

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPOSITOS DE QUITOSANA/NANOTUBOS DE CARBONO

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN/CARBON NANOTUBES COMPOSITES

I. Olivas-Armendáriz^{1,2a*}, P. García-Casillas¹, A. Martel-Estrada², R. Martínez-Sánchez², A. Martínez-Villafaña² y C.A. Martínez-Pérez^{1,b}

¹ Instituto de Ingeniería y Tecnología, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez
Ave. del Charro 450 Norte, Col. Partido Romero, Cd. Juárez, Chih., México. C.P. 32310

² Depto. de Física de Materiales, Centro de Investigación en Materiales Avanzados,
Miguel de Cervantes 120 Complejo Industrial Chih. Cd. Chihuahua, Chih., México. C.P. 31300

Recibido 20 de Marzo 2009; Aceptado 13 de Julio 2009

Resumen

En la medicina regenerativa e ingeniería tisular, son necesarios soportes con alta porosidad que puedan ser adaptados para imitar la naturaleza de la matriz extracelular (ECM) en términos de estructura, composición química y propiedades mecánicas. En este trabajo se utiliza la quitosana, un polímero natural biocompatible, como soporte y fue preparado por la técnica de separación de fases inducida térmicamente con el fin de que adquiriera características apropiadas. Se investigó la influencia de diversos parámetros como la concentración del polímero, la temperatura de la separación de la fase y la incorporación de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTC). Se encontró que las propiedades mecánicas del soporte se incrementan considerablemente con la adición de bajos porcentajes de MWNTC. La caracterización de los materiales se obtuvo por microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopía infrarroja (FTIR), así como sus propiedades mecánicas y su velocidad de degradación hidrolítica.

Palabras clave: composite, quitosana, MWNTC, separación de fases inducida térmicamente.

Abstract

In regenerative medicine and tissue engineering, scaffolds with high interconnected porosity are necessary because they can be potentially tailored to mimic the natural extracellular matrix (ECM) in terms of the structure, chemical composition, and mechanical properties. In this work the preparation of Chitosan, a natural biocompatible polymer was used as scaffolds and was prepared by thermal induced phase separation in order to acquired an appropriate characteristics, the influence of several parameters as polymer concentration, quenching temperature and the incorporation of multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) was investigated where it was found that the mechanical properties of the scaffolds increase considerably with the addition of small percentage of MWCNT. The Materials characterization was made by Scanning Electronic Microscopy, Thermal Mechanical Analysis, Fourier Transformed Infrared Spectroscopy and hydrolytic degradation rate.

Keywords: composite, chitosan, MWCNT, thermal induced phase separation.

1. Introducción

En los últimos años, se han realizado diversas investigaciones en las cuales se estudian biomateriales basados en polímeros que conduzcan a la construcción, regeneración, crecimiento y mantenimiento de células y tejidos. Estos materiales no deben provocar una respuesta inflamatoria ni mostrar respuesta inmune o de citotoxicidad, deben ser biocompatible y biodegradable. Además, las

propiedades mecánicas de los biomateriales deben ser las adecuadas para la aplicación deseada y deben tener una porosidad interconectada controlable para dirigir el crecimiento celular en la forma deseada y para sostener la vascularización del tejido en crecimiento (Mylene Gravela y col., 2006). La quitosana (CH) es un polímero natural que ha generado un enorme interés debido a sus diversas ventajas como son bajo costo, fácil disponibilidad (por desacetilación de la quitina, por ser el segundo

* Autor para la correspondencia. E-mail: ^aiolivas@uacj.mx, ^bcamartin@uacj.mx

polímero natural más abundante), carga positiva, biocompatibilidad, actividad antimicrobiana y su naturaleza hidrofílica que facilita la adhesión; proliferación y diferenciación celular. Es insoluble en ácidos débiles ($\text{pH} < 6.3$) y puede ser procesado fácilmente en películas y soportes porosos. Sin embargo, la poca flexibilidad en la regulación de propiedades mecánicas y los límites de degradación limitan su uso. No obstante, Chien-Yang y col. (2005), Shao-Feng y col. (2005) han reportado la fabricación de sistemas híbridos y composites basados en quitosana con el propósito de mejorar sus propiedades mecánicas. Desde el descubrimiento de los nanotubos de carbono(NTC) por Lijima (1991), estos han despertado un gran interés debido a sus excepcionales propiedades físicas: modulo elástico comparable al del diamante ($> 1 \text{ TPa}$), tamaño pequeño, alta resistencia y excelentes propiedades térmicas y electrónicas (Popov, 2004). Bokobza (2007) y Hsiao-Fen y col. (2007) han realizado diversas investigaciones, con el propósito de mejorar las propiedades mecánicas, incorporando nanotubos de carbono a matrices poliméricas con relativamente buenos resultados; se han estudiado composites CH-NTC para aplicaciones en biosensores (Luo y col.; 2005, Xuecai; 2005); también los NTC han sido cubiertos con quitosana por Liu y col. (2005); además un artículo reporta la preparación de MWNTC con un pequeño porcentaje de CH para su aplicación en ingeniería tisular (Ander Abarregui y col., 2008). Por todo ello, el objetivo de esta investigación es el desarrollo y caracterización de materiales compuestos de CH-MWCNT por la técnica de separación de fases inducida térmicamente.

2. Métodos

2.1 Materiales

Quitosana (mínimo 85% de desacetilación), ácido nítrico (HNO_3), fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4) y fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) fueron obtenidos de SIGMA (Monterrey, México); ácido acético, hidróxido de sodio (NaOH) y cloruro de potasio (KCl) adquiridos de Fisher-Scientific (Monterrey, México). Los nanotubos de carbono de pared múltiple (con longitud de 210 μm y un diámetro entre 70-110 nm) fueron obtenidos por pirólisis de una mezcla de ferroceno/benceno dentro de un tubo de cuarzo en el centro de estudios de materiales avanzados ,CIMAV (Chihuahua, México) por Aguilar y col. (2006).

2.2 Preparación del composite

Los nanotubos de carbono fueron purificados en una solución 4M de HNO_3 con reflujo por 2 horas a 100°C. A continuación se agitaron a 300 rpm a temperatura ambiente. Para eliminar impurezas y el HNO_3 , la mezcla se lava con agua destilada hasta

obtener un pH de 7.0. El producto fue secado en un horno a 100°C durante dos horas.

Se colocaron diversas proporciones en peso de nanotubos de carbono a 62 mL de una solución de ácido acético 1M, a continuación se dispersaron por medio de ultrasonido (10 minutos) a temperatura ambiente. Una vez dispersados se agregó 2 g de quitosana, la mezcla fue agitada a 1700 rpm para obtener la homogeneidad. La mezcla fue congelada a -78°C y después el solvente fue extraído por un sistema de liofilización durante 48 horas. Los composites fueron neutralizados en una solución acuosa de $\text{NaOH}-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (se disolvió NaOH en una solución acuosa de 80% etanol con 0.5 % en peso de NaOH) a -20°C por 12 horas, fueron sumergidos en etanol por 12 horas, lavados con agua destilada hasta la neutralización y finalmente fueron liofilizados.

2.3 Caracterización del composite

Para el análisis térmico se utilizó un equipo simultáneo TGA-DTA TA Instruments modelo SDT-Q600, se utilizaron muestras pequeñas y se calentaron con un flujo de 10°C/min bajo una atmósfera de nitrógeno, desde temperatura ambiente hasta 750°C. El espectro infrarrojo de la quitosana y de los composites se adquirió con un espectro infrarrojo marca Perkin Elmer modelo Spectrum GX, utilizando la técnica de ATR (Reflectancia total atenuada) en un sistema SMITHS, modelo Durasample IRII, que tiene una ventana de diamante de 2mm de diámetro. Todas las muestras fueron escaneadas en un rango de 550 – 4000 cm^{-1} . Fue utilizado un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Joel JSM7000F para observar la estructura y porosidad de las muestras. Se utilizó un instrumento RSA III (Rheometrics System Analyzes) TA. En un rango de frecuencia de 1×10^6 a 80 Hz. y una deformación aplicada de 0.1% se realizaron pruebas de esfuerzo-deformación a 40°C a una velocidad de deformación de 0.001mm/s.

2.4 Degradación hidrolítica

Se pesó la muestra y se colocó en un tubo de ensayo, se le agregó 5 mL de solución buffer salina de fosfato con un pH de 7.4 y 0.02% de nitrato de sodio para prevenir crecimiento bacteriano. Se colocó la muestra en baño maría a 37°C a diferentes períodos de tiempo con agitación constante, a continuación se secó la muestra al vacío a 40°C por 10 días, después de pesar la muestra se calcula el porcentaje de la pérdida de peso, la cual se calculó de acuerdo a la Ec. (1).

$$(\%) \text{ Pérdida de peso} = \left(\frac{W_{\text{inicial}} - W_{\text{seco}}}{W_{\text{seco}}} \right) 100 \quad (1)$$

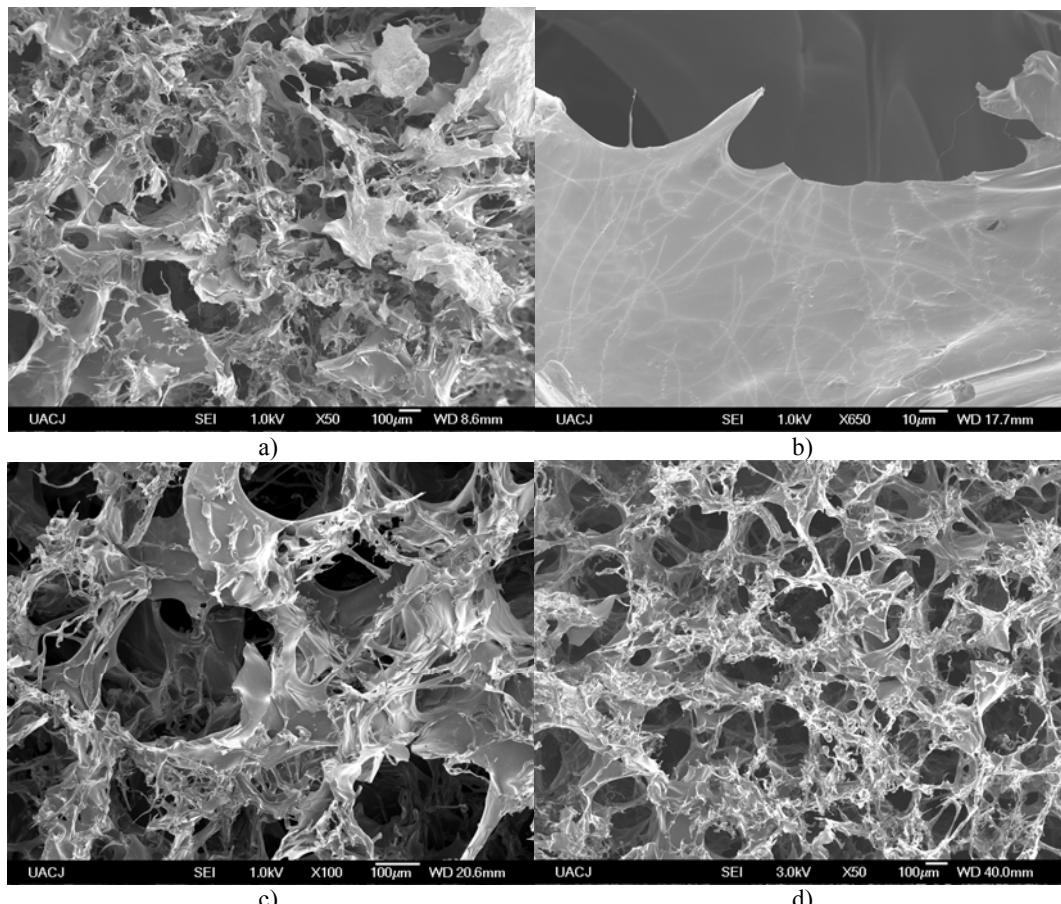


Fig. 1. Imágenes del SEM de la quitosana con MWNTC a) 0.5 % en peso , b) magnificación de la imagen del a), c) 1 % en peso de MWNTC y d) 2% en peso de MWNTC.

2.5 Análisis de regresión lineal

Se realizó un Análisis de regresión lineal simple y correlación, utilizando un análisis de varianza con la estadística F, con el modulo de análisis incluido en Microsoft Office Excel 2007.

Se probó la hipótesis de:

$$H_0: \beta = 0$$

$$H_1: \beta \neq 0$$

donde la hipótesis nula señala que el modelo es $\mu_{Y|x} = \alpha$. Es decir, la variación en Y resulta del azar o de las fluctuaciones aleatorias que son independientes de los valores de x (Walpole y Myers, 1999).

2.6 Porosidad

La Porosidad fue determinada de acuerdo al siguiente método. Primero todas las muestras fueron cortadas en piezas pequeñas cuadradas de 1cm de altura (h), 1 cm de largo (l) y 1 cm de ancho. Todas las piezas fueron medidas con un vernier, para calcular los volúmenes de las muestras ignorando la porosidad (V_c). Enseguida las muestras fueron pesadas en una balanza analítica (w_1) y colocadas en un vaso de precipitado de 10ml, para ser cubiertas

por etanol (con densidad, ρ_e) y colocadas en un congelador a -6°C por 40 minutos. A continuación se sacó la muestra humedecida y se peso (w_2). Finalmente se calcularon el volumen del esqueleto de la muestra (V_s), el volumen de los poros (V_p), el volumen del etanol en la muestra (V_e) y porosidad.

$$V_c = h \times l \times \text{ancho} \quad (2)$$

$$V_e = V_s + \left(\frac{w_2 - w_1}{\rho_e} \right) \quad (3)$$

$$V_c = V_s + V_e \quad (4)$$

$$\rho_e = w/V \quad (5)$$

$$V_e = V_p \quad (6)$$

$$\% \text{ porosidad} = \left(\frac{V_c - V_s}{V_c} \right) 100 \quad (7)$$

3. Resultados y discusión

Se obtuvo una porosidad mayor del 90% en todos los composites. Por otro lado la Fig. 1 muestra imágenes del SEM de los composites conteniendo 0.5, 1 y 2% en peso de MWNTC, se puede apreciar una morfología altamente porosa, el tamaño del poro se encuentra entre 100 y 300 μm . En la Fig. 1b se puede apreciar como los MWNTC están dispersos de mane-

Tabla. 1. T_{inicial} , T_{final} temperatura de máxima degradación (T_{max}) y % de peso residual a 450°C de la CH y los composites CH/MWNCT.

Muestra	Segundo paso de la degradación			
	T_{inicial} (°C)	T_{final} (°C)	T_{max} (°C)	(%) peso residual a 450°C
CH/10%MWCNT	222.39	392.12	280.21	46
CH/5%MWCNT	195.50	392.12	280.01	45
CH/2%MWCNT	192.51	391.19	277.60	41
CH/1%MWCNT	190.86	390.26	276.82	38
CH/0.5%MWCNT	193.64	386.55	275.06	37
CH/0.25%MWCNT	192.71	387.48	277.58	37
CH	181.58	386.55	276.91	32

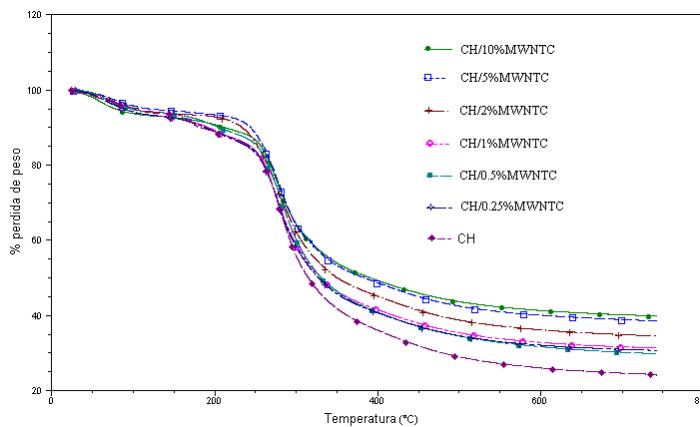


Fig. 2. TGA de la quitosana y los composites CH/MWNCT a 10°C/min.

ra homogénea y distribuidos de forma aleatoria en la matriz polimérica, confirmando que los MWNCT se encuentran cubiertos por la matriz de la quitosana formando una estructura porosa. Esto sugiere una buena adhesión (aunque no fue corroborado directamente). Resultados similares fueron obtenidos para composites de polipropileno/MWNCT (Assouline, 2003). Las Figs. 1c y 1d muestran las imágenes del SEM de los composites de quitosana conteniendo 1% y 2% de MWNCT, la morfología permanece semejante lo que indica que la incorporación de diferentes porcentajes de MWNCT no afecta la morfología del composite.

La estabilidad térmica de la quitosana y los composites CH/MWNCT fue evaluada con un análisis termogravimétrico bajo una atmósfera de nitrógeno (Fig. 2 y Tabla 1). La degradación térmica de la quitosana y los composites ocurre en dos pasos, el primero debido a la eliminación de humedad contenida en el material, con una pérdida de peso entre 6.5 y 10%. El segundo paso ocurre en un rango de temperatura entre 181.58°C y 392.12°C con una máxima pérdida de peso entre 276.91°C y 280.21°C. La temperatura inicial (T_{onset}) y final (T_{end}) de esta etapa indican menos estabilidad térmica en la quitosana con respecto a los composites, es decir, se retarda el inicio de la segunda etapa de la degradación de la quitosana entre 10 y 40°C. Reportándose una tendencia similar de fibras de polibutileno tereftalato reforzadas con MWNCT (Mathew y col., 2005). Finalmente, el porcentaje en peso residual a 450°C son 46, 45, 41, 38, 37, 37, and

32 para los composites CH/10%MWCNT, CH/5%MWCNT, CH/2%MWCNT, CH/1%MWCNT, CH/0.5%MWCNT, CH/0.25%MWCNT, y CH respectivamente. Pudiendo ser atribuido la diferencia en los residuos a los MWNCT añadidos.

Por otro lado, en el análisis de regresión se obtuvo una $R^2=0.8458$, en la cual sólo el 84.58 % de la variación del valor de la T_{inicial} es explicada por una relación lineal con el porcentaje de nanotubos de carbonos en el composite (Fig. 6b). Por lo cual se verificó la calidad de la línea de regresión estimada, realizando un análisis de varianza, utilizando la prueba F. Para un nivel de confianza del 95 %, $f_a(1,n-2)=6.61$, que fue menor que la F calculada, por lo que se rechazó la hipótesis nula y se pudo aceptar que hay una cantidad significativa de variación en la respuesta explicada por el modelo que se postuló. Es decir, hay una relación lineal entre el porcentaje de nanotubos de carbono y la temperatura de degradación inicial obtenida. Estos resultados muestran que la incorporación de MWNCT afecta la estabilidad térmica de la quitosana, ya que la degradación del polímero es desplazada, sin embargo no afecta el número de pasos en los cuales ocurre la degradación.

El espectro infrarrojo de los composites CH/MWNCT (Fig. 3) muestra una banda característica de la quitosana a los 3300 cm^{-1} asociada a estiramientos de los grupos N-H y O-H. Los picos alrededor de los 1643 cm^{-1} y 1551 cm^{-1} son asignados a la amida I y la amida II. Los picos a los

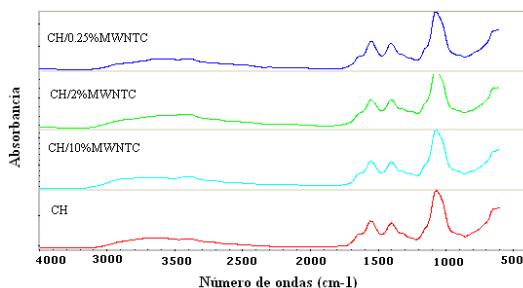


Fig. 3. Espectro infrarrojo de la quitosana y los composites conteniendo 0.25%, 2%, y 10% de MWNTC.

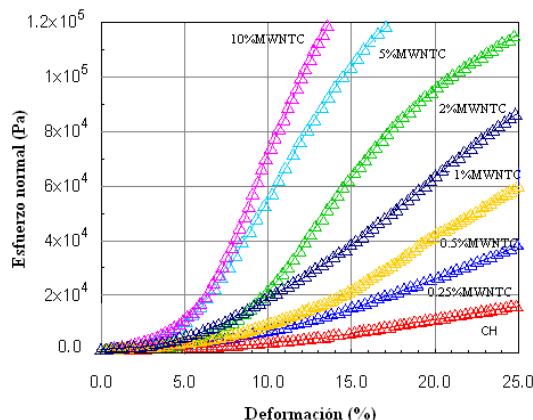


Fig. 4. Curvas de esfuerzo-deformación de la quitosana y los composites CH/MWNTC.

1403 y 1072 corresponden a estiramientos de las bandas de los grupos —COOH y C—O , respectivamente. Sin embargo no se observan los estiramientos correspondientes a los modos activos $\text{A}2\text{u}$ y $\text{E}1\text{u}$ que deben aparecer alrededor de 850 cm^{-1} y 1590 cm^{-1} en todo espectro infrarrojo de nanotubos de carbono, independientemente de la simetría de los diámetros. Observándose claramente que los espectros infrarrojos de los composites quitosana/MWNTC son casi idénticos al espectro infrarrojo de la quitosana. Además de la pequeña cantidad de MWNTC, lo anterior puede deberse a que estos picos pueden estar traslapados con la señal de las vibraciones de la amida II o al hecho de que los MWNTC están cubiertos por la matriz de la quitosana. Corrobmando lo obtenido por Lu y col. (2006) en cuyo trabajo los espectros de los composites de polidifenilamina/c-MWNT eran idénticos al del espectro infrarrojo de la polidifenilamina.

Los resultados de las propiedades mecánicas a la compresión de la quitosana y los composites se muestra en la Fig. 4. Estos resultados exhiben un aumento significativo en el esfuerzo a la deformación de los composites conforme se incrementaba el contenido de MWNTC en el composite, siendo el composite con un 10% de MWNTC el que obtuvo mejores propiedades mecánicas, este obtuvo el mayor esfuerzo en una

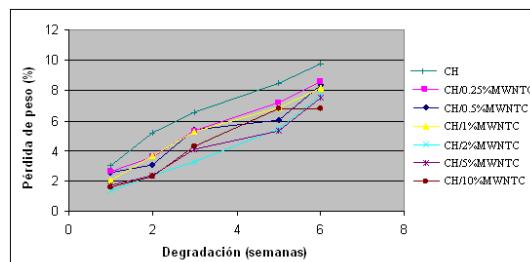


Fig. 5. Pérdida de peso con la degradación hidrolítica de la quitosana y composites CH/MWNTC.

menor deformación (mayor modulo de Young's), seguido por los composites CH/5%MWNTC, CH2%MWNTC, CH/1%MWNTC, CH/0.5% MWNTC y finalmente el composite CH/0.25% MWNTC. Estos resultados, como lo verifican las imágenes del SEM son la consecuencia de una dispersión homogénea de los MWNTC dentro de la matriz polimérica. Por otro lado, el aumento en el modulo de Young fue menor a lo esperado y quizás se deba a que el diámetro de los MWNTC se encontraba entre 70-110 nm. Ya que según la literatura se ha encontrado que entre menor sea el diámetro de los MWNTC mayor es su modulo de Young (Xiao y Gillespie, 2006) y por lo tanto se esperaría que al reforzar la matriz polimérica con los NTC se obtenga un mayor modulo de Young.

Por otro lado, se realizó un Análisis de regresión lineal simple y correlación, Fig. 6a. Como $R^2=0.9006$, se puede decir que el 90.06 % de la variación del valor del Módulo de Young es explicada por una relación lineal con el porcentaje de nanotubos de carbonos en el composite. Con la finalidad de verificar la calidad de la línea de regresión estimada se realizó un análisis de varianza, utilizando la prueba F. Para un nivel de confianza del 95 %, $f_a(1,n-2)=7.71$, que es menor que la F calculada, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se puede aceptar que haya una cantidad significativa de variación en la respuesta explicada por el modelo que se postuló. Es decir, hay una relación lineal entre el porcentaje de nanotubos de carbono y el Módulo de Young obtenido. Estos resultados demuestran la potencialidad de los NTC como relleno en el refuerzo de materiales poliméricos y como las propiedades mecánicas pueden ser moduladas variando la concentración de MWNTC.

La degradación hidrolítica de la quitosana y los composites CH/MWNTC fue investigada por el monitoreo del cambio en la pérdida de peso durante la degradación en la solución buffer de fosfato (Fig. 5). La mayor pérdida de peso se observa en la quitosana, la cual exhibió una pérdida cercana al 10% durante el periodo de estudio. Por otro lado al final del periodo los composites CH/0.25%MWCNT, CH/0.5%MWCNT, CH/1%MWCNT, CH/2% MWCNT, CH/5%MWCNT y CH/10%MWCNT aun mantiene su estructura, perdiendo 8.63%, 8.32%, 8.13%, 7.69%, 7.5% y 6.81% de sus masas

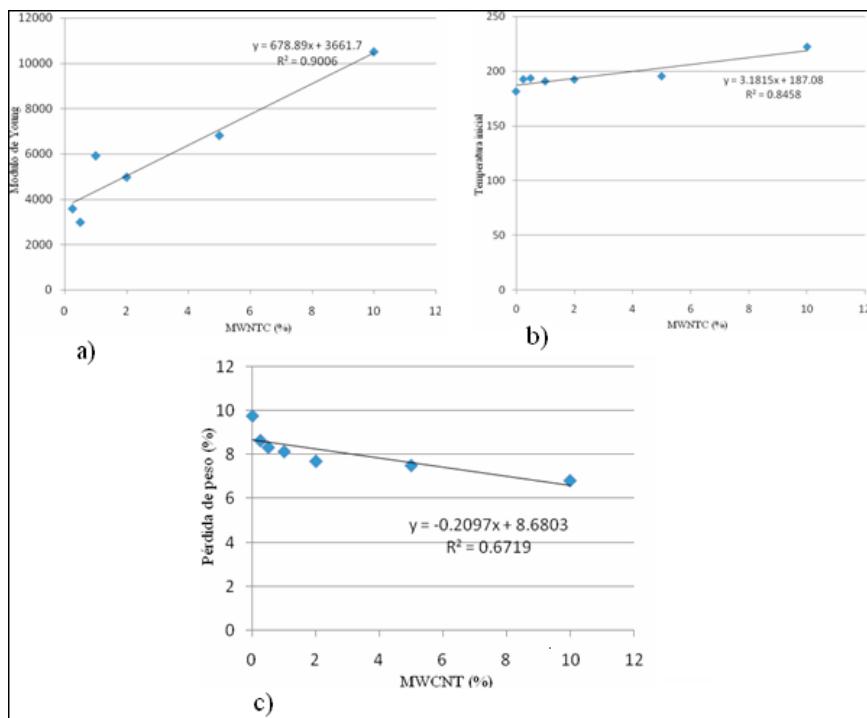


Fig. 6. Regresión lineal simple de: a) Modulo de young, b) T_{inicial} , de la segunda etapa de la degradación y c) % de pérdida de peso de la sexta semana de la degradación hidrolítica de los composites conteniendo 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% y 10% de MWNTC.

respectivamente. La pérdida de peso fue mayor durante la primera semana para la quitosana y los composites, posteriormente se tornó más lenta, mostrando un comportamiento casi lineal. Durante las 6 semanas el composite que mostró una pérdida de peso menor fue el composite Chi/10%MWCNT. Lo anterior fue corroborado con el análisis de regresión lineal en el cual se obtuvo que $R^2=0.6719$ (Fig. 6c), por lo cual se puede decir que sólo el 67.19 % de la variación del valor de la degradación a la sexta semana es explicada por una relación lineal con el porcentaje de nanotubos de carbono en el composite. Con la finalidad de verificar la calidad de la línea de regresión estimada se realizó un análisis de varianza, utilizando la prueba F. Para un nivel de confianza del 95 %, $f_a(1,n-2) = 6.61$, que es menor que la F calculada, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se puede aceptar que haya una cantidad significativa de variación en la respuesta explicada por el modelo que se postuló. Es decir, hay una relación lineal entre el porcentaje de nanotubos de carbono y la temperatura de degradación inicial obtenida. Aunque los valores obtenidos para la prueba F de este análisis permiten rechazar la hipótesis nula, la validez predictiva del modelo, se considera insuficiente para objetivos de nuestra investigación. Se pueden proponer otros modelos, con una mayor validez, de acuerdo con la dispersión de los datos, como un modelo polinomial de orden dos, cuya validez estadística no fue confirmada, salvo por la línea de tendencia de manera gráfica. Por lo que estos resultados muestran que los

MWNCT no tienen influencia en la degradación hidrolítica de los composites.

Conclusiones

En este trabajo se demostró que es posible preparar un composite de CH/MWNCT por la técnica de separación de fases inducida térmicamente sin afectar la morfología y degradación hidrolítica del material. Las propiedades mecánicas del composite se incrementan de forma lineal con la cantidad de MWNCT lo que da lugar a que las propiedades mecánicas puedan ser moduladas. Este composite pudiera ser utilizado como soporte en aplicaciones biomédicas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a CONACYT México por su apoyo financiero.

Referencias

- Aguilar-Alguézabal A., Antúnez W., Alonso G., Delgado F., Espinosa F., y Miki-Yshida M. (2006). Study of carbon nanotubes síntesis by spray pyrolysis and model of growth. *Diamond and related materials* 15, 1329-1335.
- Abarrategi A., Gutiérrez M.C., Moreno-Vicente C., Hortigüela M.J., Ramos V., López-Lacomba J.L., Ferrer M.L., del Monte F. (2008).

- Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials* 29, 94-102.
- Assouline E., Lustiger A., Barber A. H., Cooper C. A., Klein E., Wachtel E., y Wagner H. D. (2003). Nucleation ability of multiwall carbon nanotubes in polypropylene composites. *Journal of Polymer Science* 41, 520-527.
- Bokobza, L. (2007). Multiwall carbon nanotube elastomeric composites: A review. *Polymer*. 48, 4907-4920.
- Chien-Yang Hsieh, S.-P.T., Da-Ming Wang, Yaw-Nan Chang, and Hsyue-Jen Hsieh. (2005). Preparation of γ -PGA/chitosan composite tissue engineering matrices. *Biomaterials* 28, 5617-5623.
- Hsiao-Fen Wei, G.-H.H., Chin-Yh Liu. (2007). Surface modification of multi-wall carbon nanotubes by a sol-gel reaction to increase their compatibility with PMMA resin. *Composites Science and Technology* 67, 1018-1026.
- Lijima, S., (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354, 56.
- Liu Y., Tang J., Chen, X., Xin, J.H. (2005). Decoration of carbon nanotubes with chitosan. *Carbon* 43, 3178-3180.
- Lu X., Chao D., Zheng J., Zhang W., y Wei Y. (2006). Preparation and characterization of polydiphenylamine/multi-walled carbon nanotube composites. *Polymer International* 57, 945-950.
- Luo, X.L., Xu J.J., Wang J.L., Chen, H.Y. (2005). Electrochemically deposited nanocomposite of chitosan and carbon nanotubes for biosensor application. *Chemical Communications* 16, 2169-2171.
- Mathew G., Hong J. P., Rhee J. M., Lee H. S., y Nah C. (2005). Preparation and characterization of properties of electrospun poly(butylene terephthalate) nanofibers filled with carbon nanotubes. *Polymer Testing* 24, 712-717.
- Mylene Gravela, T.G., Razi Vagob, Maryam Tabrizian. (2006). Responses of mesenchymal stem cell to chitosan-coralline composites microstructured using coralline as gas forming agent. *Biomaterials* 9, 1899-1906.
- Popov, V.N. (2004). Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering Research* 43, 61-102.
- Shao-Feng Wang, L.S., Wei-De Zhang, and Yue-Jin Tong. (2005). Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites. *Biomacromolecules* 6, 3067-3072.
- Walpole R., Myers R., and Myers S. *Probabilidad y Estadística para ingenieros* (Sexta ed.). Prentice Hall, México.
- Xiao J., y Gillespie Jr. J. (2006). Nanomechanics of single-walled carbon nanotubes as composite reinforcement. *Polymer Engineering and Science* 10, 1051-1059.
- Xuecai Tan, M.L., Peixiang Cai, Lijun Luo, Xiaoyong Zou. (2005). An amperometric cholesterol biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and organically modified sol-gel/chitosan hybrid composite film. *Analytical Biochemistry* 337, 111-120.