



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERIA QUÍMICA E INDUSTRIAS**  
**EXTRACTIVAS**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MATERIAL COMPUESTO DE ÁCIDO  
POLILACTICO/QUITOSANO PARA SU USO POTENCIAL COMO SUSTITUTO ÓSEO”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS EN METALURGIA Y MATERIALES

presenta:

**M. en C. e I. Yaret Gabriela Torres Hernández**

Directores de Tesis:

Dr. Heberto Balmori Ramírez

Dra. Lucía Téllez Jurado

Ciudad de México a 25 de junio de 2018





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14-BIS

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 11:00 horas del día 22 del mes de Junio del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESIQIE para examinar la tesis titulada:

**“Desarrollo y caracterización de un material compuesto de ácido poliláctico/quitosano para su uso potencial como sustituto óseo”**

Presentada por el alumno:

TORRES  
Apellido paterno

HERNÁNDEZ  
Apellido materno

YARET GABRIELA  
Nombre(s)

Con registro: 

A	1	4	0	1	2	5
---	---	---	---	---	---	---


aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN METALÚRGIA Y MATERIALES

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

  
DR. HEBERTO ANTONIO M. BALMORI RAMÍREZ

  
DRA. LUCÍA TÉLLEZ JURADO

  
DRA. BLANCA ESTELA GARCÍA PÉREZ  
(EXTERNO)

  
DR. ENRIQUE ROCHA RANGEL  
(EXTERNO)

  
DR. JOSÉ ORTIZ LANDEROS

  
DR. CARLOS GÓMEZ YÁÑEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

ESCUELA SUPERIOR DE  
INGENIERÍA QUÍMICA E  
INDUSTRIAS EXTRACTIVAS

  
DRA. GUADALUPE SILVA OLIVER

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
SECRETARÍA DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESION DE DERECHOS*

En la Ciudad de México el día 25 del mes Junio del año 2018, la que suscribe **Yaret Gabriela Torres Hernández** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Metalurgia y Materiales**, con número de registro **A140125**, adscrito a la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ESIQIE, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Heberto Balmori Ramírez y la Dra. Lucía Téllez Jurado, y cede los derechos del trabajo intitulado **“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MATERIAL COMPUESTO DE ÁCIDO POLILACTICO/QUITOSANO PARA SU USO POTENCIAL COMO SUSTITUTO ÓSEO”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **yaghetto@gmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Yaret Gabriela Torres Hernández

## ***Agradecimientos***

*A mi hijo Mauricio, gracias por ser la más grande inspiración de mi vida, por tu comprensión y más que nada por tu amor incondicional, nunca dejes de avanzar, de ver siempre adelante, sin dudar que contarás con todo mi apoyo.*

*A Alejandro mi esposo, por tu confianza, por creer en mí y por el apoyo que me brindas siempre, en especial desde que inicié esta nueva aventura, la culminación de algo tan importante es el principio de un mejor futuro, gracias por entenderlo así.*

*A toda mi familia (la propia y la política), en especial a Edgar por apoyarme y creer en mí, porque alcanzar esta meta es un logro de todos, gracias por ser parte de mi vida.*

*A mis amigas de ESIQIE Angélica, Rubí, Olga, Norma, por todos sus consejos, y ayuda siempre que lo necesité, y también por los momentos divertidos. Gracias Lili por darme una cordial bienvenida al I.P.N.*

*A Gloria de ENCB, gracias por tu entusiasmo en la realización de nuestro proyecto, por tu paciencia y por haber hecho más divertidas las horas de trabajo, más que una compañera encontré una amiga.*

*A mis directores de Tesis Dr. Heberto Balmori Ramírez y Dra. Lucía Téllez Jurado, por las valiosas aportaciones que han hecho a este trabajo y a mi formación académica.*

*Por otra parte quiero expresar mi mayor gratitud a los miembros del Comité Tutorial, Dr. Carlos Gómez Yáñez, Dr. José Ortiz Landeros y Dr. Enrique Rocha Rangel, así como a la Dra. Blanca Estela García Pérez, por su paciencia, valiosa asesoría y por las críticas constructivas que realizaron a lo largo de este trabajo.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de esta tesis. Así como al IPN y BEIFI, por los apoyos recibidos.*

# ÍNDICE

Resumen .....	X
Abstract .....	XI
Capítulo I .....	1
Introducción .....	1
EL TEJIDO ÓSEO .....	1
ESTRUCTURA ÓSEA .....	1
CONSTITUYENTES DEL TEJIDO ÓSEO .....	3
REPARACIÓN O CONSOLIDACIÓN OSEA .....	5
PROPIEDADES MECÁNICAS DEL HUESO .....	6
INJERTOS ÓSEOS .....	9
BIOMATERIALES .....	10
POLIMEROS REABSORBIBLES .....	11
DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA DE POLÍMEROS REABSORBIBLES .....	11
EL ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA) .....	12
PROPIEDADES MECÁNICAS .....	13
PROCESAMIENTO DEL PLA .....	13
EL PROCESO DE EXTRUSIÓN .....	13
PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL PLA .....	15
DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA DEL PLA .....	15
QUITINA .....	16
MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LA QUITINA .....	17
MÉTODO QUÍMICO .....	17
QUITOSANO .....	17
DESACETILACIÓN .....	18
APLICACIONES DEL QUITOSANO .....	18
PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS .....	19
EL ÁCIDO POLILÁCTICO EN INGENIERÍA TISULAR .....	19
ESTADO DEL ARTE .....	21
Justificación .....	23
DESARROLLO DE SUSTITUTOS ÓSEOS .....	24

Hipótesis .....	25
Objetivos .....	25
GENERAL:.....	25
ESPECÍFICOS:.....	25
Capítulo II.....	27
Métodos y materiales .....	27
EXTRACCIÓN DEL QUITOSANO .....	27
CARACTERIZACIÓN .....	29
DIFRACCIÓN DE RAYOS X.- .....	29
ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO.-.....	29
ESPECTROFOTOMETRÍA FT-IR.-.....	29
MICROSCOPIA ÓPTICA .....	29
MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO LÁSER.....	30
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	30
FABRICACIÓN DEL MATERIAL COMPUESTO .....	30
EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS.....	31
ENSAYO DE FLEXIÓN Y TENSIÓN.- .....	31
ENSAYO DE IMPACTO.....	32
BIOCOMPATIBILIDAD .....	32
Capítulo III .....	35
DISCUSIÓN Y RESULTADOS .....	35
CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO Y PLA .....	35
DIFRACCIÓN DE RAYOS X .....	35
QUITINA, QUITOSANO .....	35
ÁCIDO POLILÁCTICO .....	36
ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO .....	37
ÁCIDO POLILÁCTICO .....	38
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA .....	38
Ácido poliláctico .....	40
MICROSCOPIA ÓPTICA .....	41
CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES COMPUESTOS .....	41
ESPECTROFOTOMETRÍA FT-IR.....	45
DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	53

BIOACTIVIDAD DE LAS SUPERFICIES EN PBS .....	55
IDENTIFICACIÓN .....	56
BIOACTIVIDAD DE LAS SUPERFICIES .....	59
ACTIVIDAD METABÓLICA Y VIABILIDAD DE LOS OSTEÓBLASTOS SOBRE PLA Y MATERIALES COMPUESTOS. ....	60
ADHESION DE LOS OSTEÓBLASTOS MG-63 SOBRE LA SUPERFICIE DEL PLA Y LOS MATERIALES COMPUESTOS .....	60
VIABILIDAD Y PROLIFERACION DE LOS OSTEÓBLASTOS MG63.....	62
EVALUACIÓN CUALITATIVA DE MINERALIZACIÓN SOBRE LA SUPERFICIE DEL PLA Y LOS MATERIALES COMPUESTOS.....	64
Capítulo IV .....	66
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	66
Conclusiones .....	66
Perspectivas.....	66
REFERENCIAS .....	67
ANEXO A .....	71
ANEXO B.....	73
ANEXO C.....	74

# Índice de figuras

Figura 1.- Dos tipos de hueso.....	2
Figura 2.- Estructura de un hueso largo.....	2
Figura 3.- Esquema morfológico de la estructura ósea.....	3
Figura 3.- Células óseas osteoblastos y osteocitos.....	4
Figura 4.- Osteoclasto.....	5
Figura 5.- Fases en la reparación de una lesión ósea.....	6
Figura 6.- Curva típica esfuerzo-deformación.....	7
Figura 7.- Curva esfuerzo-deformación para huesos compacto y esponjoso.....	8
Figura 8.- Enantiómeros del D y L (PLA).....	12
Figura 9.- Obtención del ácido poliláctico por apertura de anillo.....	12
Figura 10.- Esquema de una máquina extrusora.....	14
Figura 11.- Mecanismo de hidrólisis del PLA.....	15
Figura 12.- Representación de la estructura primaria de la quitina.....	16
Figura 13.- Desacetilación de la molécula de la quitina.....	18
Figura 14.- Reacción de equilibrio en ácidos diluidos del quitosano.....	19
Figura 15.- Diagrama de bloques de la metodología experimental.....	27
Figura 16.- a) Camarón Blanco y b) exoesqueleto obtenido.....	28
Figura 17.- a) Ácido Poliláctico comercial y b) aspecto de los pellets.....	30
Figura 18.- Materiales compuestos obtenidos mediante extrusión.....	31
Figura 19.- Patrón de difracción del quitosano.....	36
Figura 20.- Patrón de difracción del PLA.....	36
Figura 21.- Termograma obtenido para el Quitosano.....	37
Figura 22.- TGA del ácido poliláctico.....	38
Figura 23.- Espectro Infrarrojo del quitosano.....	40
Figura 24.- Espectro IR del ácido poliláctico.....	40
Figura 25.- Partículas de quitosano a) 20X y b) 30X.....	41
Figura 26.-Microscopia Confocal del a) PLA, b) quitosano y c) - e) materiales compuestos.....	42
Figura 27.- Termogramas obtenidos para los diferentes compuestos.....	43
Figura 28.- Termogramas obtenidos para los diferentes compuestos.....	44
Figura 29.- Difractogramas obtenidos para los diferentes materiales.....	45
Figura 30.-Espectros infrarrojos para el PLA, quitosano y materiales compuestos.....	46
Figura 31.- a) Curvas esfuerzo-deflexión y b) Evolución del Módulo de Young para PLA y materiales compuestos.....	48
Figura 32.- Esquema de las fuerzas que actúan durante un ensayo de flexión.....	49
Figura 33.- a) Curvas esfuerzo-deflexión y b) Evolución del Módulo en Flexión para PLA y materiales compuestos.....	50
Figura 34.- Evolución del Módulo de Young.....	51
Figura 35.- Superficie de fractura del PLA y materiales compuestos observados a 25X en MEB.....	52



Figura 36.- Evaluación del pH de la solución PBS .....	54
Figura 37.- MEB a 500X de los materiales compuestos tras ser sometidos al proceso de degradación en PBS .....	56
Figura 38.- FT-IR del PLA tras ser sometidos al proceso de degradación en PBS .....	57
Figura 39.- FT-IR del quitosano tras ser sometidos al proceso de degradación en PBS .....	58
Figura 40.- Difractogramas del PLA y los materiales compuestos tras ser sometidos al proceso de degradación en PBS. ....	59
Figura 41.- Difractogramas del quitosano tras ser sometidos al proceso de degradación en PBS. ....	60
Figura 42.- Adherencia de los osteoblastos MG-63 sobre las superficies del PLA y materiales compuestos a 20X, el citoesqueleto de actina se muestra en color rojo. ....	61
Figura 43.- Adherencia de los osteoblastos MG-63 sobre las superficies del PLA y materiales compuestos a 500X, mostrando osteoblastos con morfología característica. ....	62
Figura 44.- Viabilidad y proliferación de los osteoblastos MG-63 sobre las superficies del PLA y materiales compuestos a 20X, mostrando células viables en color verde y células muertas en color rojo. ....	63
Figura 45.- Actividad Metabólica de los osteoblastos MG-63 sobre las superficies del PLA y materiales compuestos. ....	64
Figura 46.- Mineralización sobre la superficie del PLA y los materiales compuestos a 20X. ....	65

# Resumen

El presente estudio tiene como objetivo estudiar la estructura, propiedades mecánicas y biológicas de un material compuesto de ácido poliláctico (PLA) reforzado con partículas de quitosano con la finalidad de crear un material que pueda ser utilizado como sustituto óseo. En la primera parte se presenta la extracción de quitosano a partir de exoesqueleto de camarón (*Litopenaus Vannamei*) por el método químico y así como la caracterización fisicoquímica mediante técnicas como DRX, IR, MO, MEB tanto de dicho material como del ácido poliláctico. Posteriormente se fabricaron, mediante la técnica de extrusión materiales compuestos con porcentajes crecientes en peso (1, 3 y 5%) de quitosano, los cuales fueron caracterizados fisicoquímicamente mediante las técnicas antes mencionadas y mecánicamente para evaluar propiedades como resistencia a la tensión, impacto y flexión de acuerdo a las normas ASTM para materiales poliméricos. En lo concerniente a pruebas biológicas se determinó, la degradabilidad en solución buffer de fosfatos, la biomineralización, citotoxicidad así como la adherencia y viabilidad de osteoblastos de la línea celular MG-63 sobre la superficie del PLA y los compuestos fabricados, con el propósito de conocer su desempeño como potencial sustituto óseo. Los resultados experimentales obtenidos muestran que la adición de partículas de quitosano no modifica la estructura química de la matriz de ácido poliláctico, pero sí disminuye la temperatura de degradación de la misma conforme se incrementa la cantidad de partículas. Las propiedades mecánicas decaen debido principalmente a una pobre adhesión entre la matriz y las partículas, y a que éstas tienden a formar aglomerados cuando se encuentran en porcentajes mayores al 3%. La degradabilidad mostró estabilidad en el pH del quitosano así como de los materiales compuestos, el quitosano además mostró una superficie bioactiva formando cristales de hidroxiapatita, lo cual favoreció la adherencia de las células. En cuanto a la citotoxicidad tanto el PLA puro, como los materiales compuestos fabricados resultaron no tóxicos al estar en contacto con osteoblastos, los cuales se mantuvieron metabólicamente activos y presentando buena adherencia así como morfología característica y un proceso de mineralización durante el tiempo de evaluación. Lo cual revela un comportamiento favorable de los materiales compuestos en una aplicación en biomédica.

# *Abstract*

The polylactic acid (PLA) is a biodegradable and biocompatible thermoplastic polymer derived from renewable resources, it has been subject of numerous investigations in various fields. Meanwhile, chitosan is the main derivative of chitin, it is the second biopolymer most abundant on the planet, after cellulose. Qualities such as biocompatible, antimicrobial and antifungal, among others, have led to its use in various sectors, including health for several decades. This study aims to study the mechanical and biological properties of a composite material with a polylactic acid matrix reinforced with chitosan particles to create a material that can be used as a bone substitute. In the first part the extraction of chitosan from exoskeleton white shrimp (*Litopenaus Vannamei*) by chemical treatment and physicochemical characterization of this and polylactic acid was performed using techniques such as XRD, FT-IR, OM, and SEM. Subsequently manufactured by extrusion technique, composites with different amounts of chitosan (1, 3 and 5 wt %), they were characterized physicochemically by techniques afore mentioned. The evaluation of mechanical properties will be realized according to ASTM standards, tensile, impact and flexural test were evaluated. Regarding biological test, degradability in PBS solution, cytotoxicity and cell viability of PLA and composites with the human osteoblast cell line MG-63, were performed in order to meet its performance potential as a bone substitute is determined. Experimental results show that the chemical structure of matrix is not affected by the addition of chitosan, but the thermal degradation of the polylactic acid is affected, increases in the chitosan amount promote a decrease in the degradation temperature. The mechanical properties decrease with increase of amount of chitosan, for a weak adhesion between the polylactic acid and chitosan particles mainly. The degradability, shows stability in the PBS media, which is compatible with the cellular viability, and chitosan show a bioactive surface with hidroxiapatite. On the other hand PLA and composites were non-toxic, after being in contact with osteoblasts, which were kept metabolically active and exhibited good adhesion as well as characteristic morphology during the evaluation time. These results reveal an adequate behavior of the composites as a biomaterial in biomedical applications.

# Capítulo I

## *Introducción*

### EL TEJIDO ÓSEO

La idea de crear un material capaz de sustituir al hueso se ha desarrollado progresivamente, el hueso es un material compuesto natural que consiste en dos fases: una fase inorgánica que representa cerca del 70% de su peso seco que consiste de sales minerales (fosfato de calcio principalmente junto con pequeñas cantidades de sodio y magnesio), y una matriz orgánica cuyo principal componente es el colágeno tipo I. El tejido óseo posee la particular característica de combinar una gran dureza y rigidez (por parte de la fase inorgánica), con un alto grado de flexibilidad y elasticidad, siendo estas últimas proporcionadas por la matriz orgánica [4,5]. Tiene tres funciones esenciales, la mecánica (como soporte del cuerpo y zona de unión de la musculatura), metabólica (reserva de iones fosfato y calcio principalmente) y de protección para los órganos y médula ósea.

### ESTRUCTURA ÓSEA

El esqueleto está conformado por 206 huesos y representan aproximadamente 16 kg. de peso (en un adulto), anatómicamente es posible distinguir dos tipos de hueso: huesos planos (craneales, mandíbula, entre otros), y los huesos largos como la tibia, el fémur, etc., que pueden observarse en la figura 1.

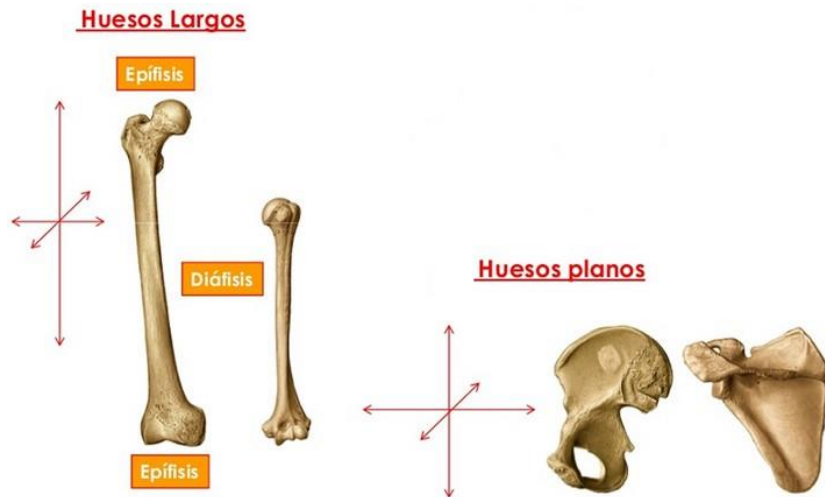


Figura 1.- Dos tipos de hueso

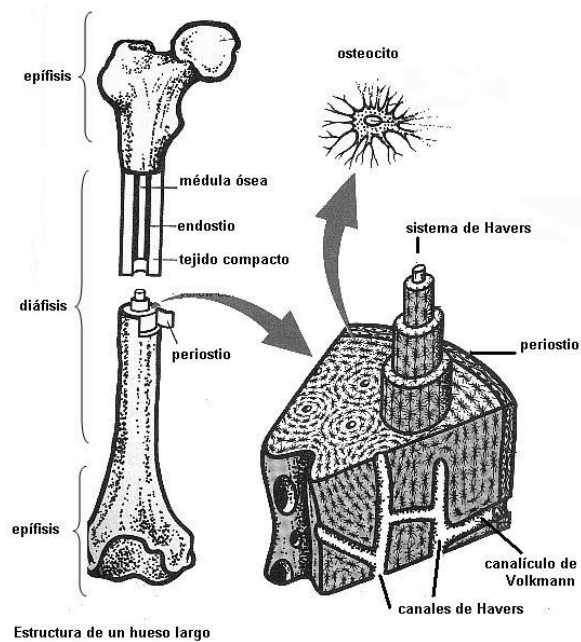
El esqueleto del individuo adulto está formado por hueso cortical (o compacto), que es el principal responsable de la integridad mecánica y por hueso trabecular (o esponjoso), responsable de las demandas metabólicas, ambos son representados en la figura 2.



Figura 2.- Estructura de un hueso largo.

Un hueso largo está formado por tres diferentes partes: dos partes anchas (epífisis), en medio una parte más o menos cilíndrica (diáfisis) y la zona entre estas dos se denomina metafisis que es la que se encuentra en continuo desarrollo. El hueso cortical constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos, así como de la parte externa de todos los huesos del cuerpo, tiene una estructura de anillos concéntricos alrededor de canales centrales, llamados canales de Havers, los cuales a su vez están

conectados con otros canales, denominados canales de Volkmann. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos linfáticos y nervios para extenderse por el hueso, y entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada existen pequeños orificios donde se encuentran los osteocitos, que son células que intercambian nutrientes con las células en el interior de los canales, como se representa en la figura 3. El canal Haversiano, junto con las láminas concéntricas que los rodean, y osteocitos, reciben el nombre de osteona [4,5].



*Figura 3.- Esquema morfológico de la estructura ósea.*

El hueso esponjoso es el principal componente de la epifisis de los huesos largos y del interior de la mayor parte de los huesos planos, el hueso esponjoso, soporta principalmente esfuerzos de compresión en cambio el hueso cortical debe soportar esfuerzos de compresión, tensión y cizalladura, la fase mineral del hueso le confiere resistencia a la tensión y cizalladura, en tanto el colágeno le proporciona resistencia a la tracción.

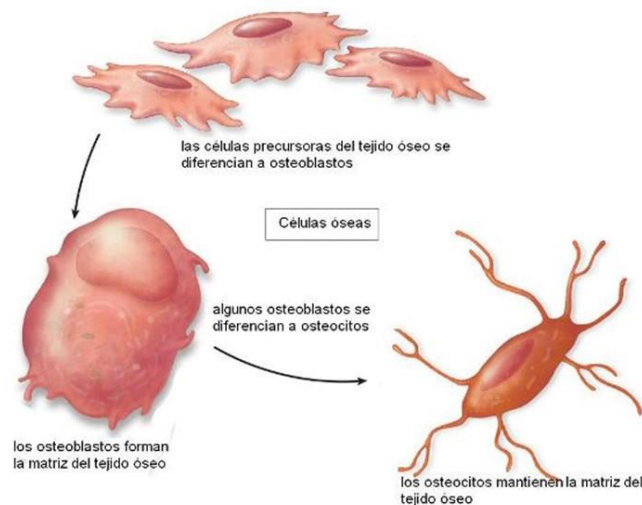
## CONSTITUYENTES DEL TEJIDO ÓSEO

**MATRIZ ÓSEA.-** Es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso y se encuentra mineralizada, está constituida por una fase mineral y una fase orgánica (35%). La fase orgánica está compuesta por fibras de colágeno tipo I y proteínas no estructurales, la fase mineral está formada por iones de fosfato cálcico depositado en forma de cristales de hidroxiapatita entre las fibras de colágeno.

**CELULAS ÓSEAS.-** En el sistema óseo existen principalmente dos tipos de células, los osteoblastos y los osteoclastos y un tercer tipo derivado de la diferenciación terminal de los osteoblastos, llamados osteocitos, los cuales constituyen menos del 2% del volumen total del hueso, pero su importancia radica en el desarrollo y mantenimiento del sistema óseo [5,6].

**OSTEOBLASTOS.-** Son las células responsables de la formación ósea, su función principal es la síntesis y deposición de proteínas de la matriz del hueso. Son células con núcleos redondos y citoplasma que generalmente se encuentran en la superficie ósea formando una monocapa adherente. Estas células están separadas de la matriz ósea mineralizada, por una capa de matriz ósea no mineralizada y regulan la diferenciación y actividad de los osteoclastos. Durante el proceso de formación ósea los osteoblastos pueden quedar embebidos en la matriz ósea donde se diferencian hacia un estado maduro dando lugar a los osteocitos (ambas células se ilustran en la figura 3).

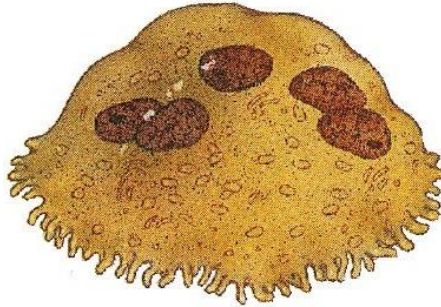
**OSTEOCITOS.-** Los osteoblastos totalmente diferenciados que quedan embebidos en la matriz ósea mineralizada se convierten en osteocitos (10 - 20%) que residen en el interior de las lagunas de hueso mineralizado. Tienen una forma variable en función de la edad, y su destino es ser resorbidos por los osteoclastos en conjunto con otros elementos para dar lugar a la matriz ósea.



*Figura 3.- Células óseas osteoblastos y osteocitos*

**OSTEOCLASTOS.-** Son células móviles gigantes (50 a 150 micrómetros de diámetro), ampliamente ramificadas que presentan varios núcleos y numerosas enzimas proteolíticas, como se muestra en la figura 4. Se disponen sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos pequeños y su principal función es el control de la homeostasis del calcio durante la reabsorción del hueso posteriormente a que el

proceso haya sido iniciado por los osteoblastos. La reabsorción ósea se desarrolla en dos etapas, primero se solubiliza el mineral y luego se digiere la matriz orgánica hasta que finalmente los osteoclastos mueren.



*Figura 4.- Osteoclasto.*

## **REPARACIÓN O CONSOLIDACIÓN OSEA**

Un hueso sometido a esfuerzos que superan su resistencia mecánica origina una fractura desencadenándose tras ella el proceso de reparación ósea que tiene como fin reestablecer la estructura tisular y las propiedades mecánicas originales. La consolidación ósea se desarrolla en tres etapas secuenciales que se superponen en el tiempo y que corresponden a las fases de inflamación, reparación y remodelación [6,7].

**FASE DE INFLAMACIÓN.-** Los traumatismos causantes de fracturas lesionan las células, vasos sanguíneos y la matriz del tejido óseo, además de comprometer tejidos adyacentes y músculos. La lesión vascular interrumpe el aporte sanguíneo a los osteocitos y por ello en los extremos de la fractura no se encuentran células vivas, entre las células inflamatorias que migran al lugar de fractura se encuentran los leucocitos, macrófagos y linfocitos y a medida que disminuye la reacción inflamatoria todos ellos son reabsorbidos y los osteoblastos se encargan de producir una nueva matriz ósea.

**FASE DE REPARACIÓN.-** El proceso de consolidación ósea es estimulado por factores quimiotácticos liberados en la fase previa y las proteínas de la matriz expuestas por la desorganización tisular el hematoma provocado por la fractura durante la fase de inflamación proporciona un soporte de fibrina que facilita la migración celular, proliferación y síntesis de la matriz ósea. En esta etapa la fosfatasa



alcanza máximo nivel de actividad favoreciendo el inicio de la mineralización del callo óseo cuya composición se modifica a medida que progresa la consolidación, de tal forma que las células sustituyen el coágulo de fibrina por una matriz fibrosa constituida por colágeno I y III, entre otros y posteriormente el tejido fibroso se transforma en fibrocartílago con un importante contenido de colágeno tipo II. Finalmente se produce la mineralización de la matriz ósea en conjunto con un aumento en la concentración de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y proteínas colágenas, proceso que concluye en la osificación de la masa del callo que envuelve los extremos de fractura y que contiene hueso inmaduro.

**FASE DE REMODELACIÓN.-** En esta última fase se sustituye el hueso inmaduro del callo óseo por hueso laminar, una vez que se ha reemplazado el hueso neoformado, el proceso de remodelación continua y al completarse totalmente las propiedades mecánicas originales se recuperan. Este proceso de reparación ósea es ilustrado en la figura 5.

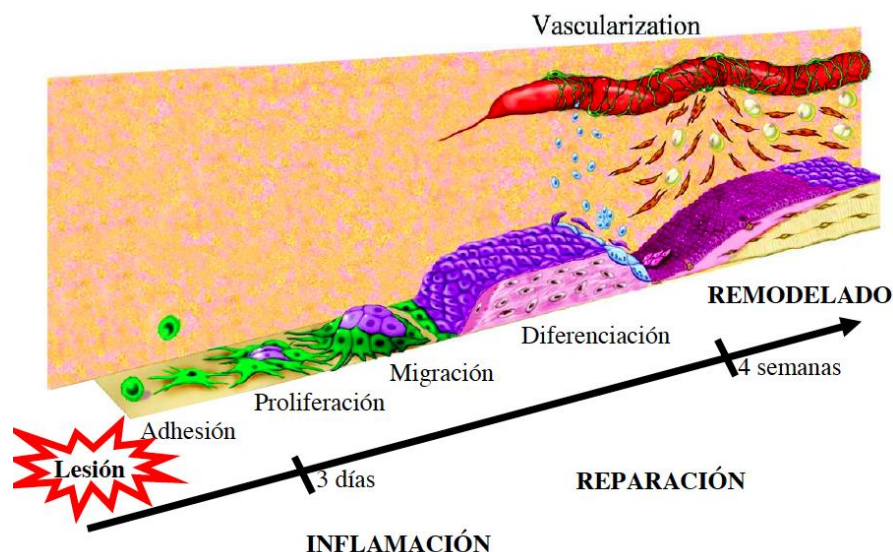


Figura 5.- Fases en la reparación de una lesión ósea.

## PROPIEDADES MECÁNICAS DEL HUESO

La principal función del esqueleto es proveer al cuerpo de soporte, las cargas a que se encuentra sometido son recurrentes fuerzas aplicadas derivadas de las actividades diarias y fuerzas de impacto durante eventos traumáticos. Los ensayos típicos usados en ingeniería de materiales son útiles para evaluar el comportamiento mecánico del hueso bajo carga, las propiedades biomecánicas describen relaciones entre cargas (fuerzas) aplicadas al hueso y las deformaciones resultantes. Dos palabras clave para la

biomecánica del hueso son esfuerzo y deformación, el esfuerzo en su forma básica está definido como fuerza por unidad de área:  $\sigma = \frac{F}{A}$  y describe la intensidad de la fuerza aplicada. La deformación local que resulta de la carga aplicada es calculada como el cambio de la longitud entre la longitud inicial:  $\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$  a diferencia del desplazamiento, la deformación está expresada en términos de un cambio relativo en el tamaño o forma de la muestra. Cuando las fuerzas son aplicadas al hueso, una compleja y variada distribución de esfuerzos y deformaciones surgen a través de la estructura ósea y pueden clasificarse como esfuerzos normales que actúan perpendicularmente (tensión y compresión) o esfuerzos de corte que actúan paralelamente y representan distorsión.

Esfuerzo y deformación por sí solas no pueden proveer toda la información sobre el comportamiento mecánico del hueso, la curva describe la cantidad de carga necesaria para producir una unidad de deformación y refleja el comportamiento estructural del hueso (figura 6), la forma de esta curva dependerá del tamaño y forma del hueso.

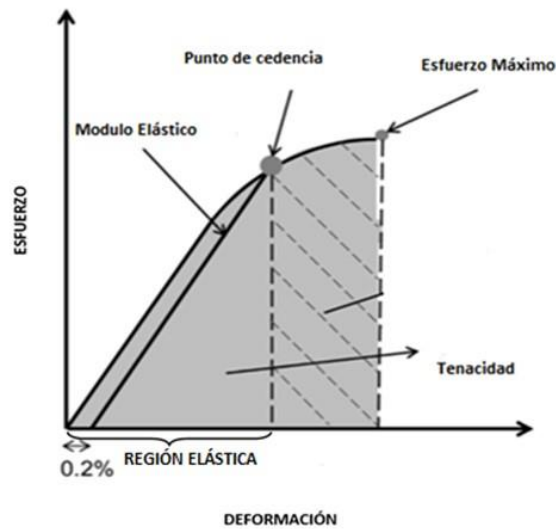


Figura 6.- Curva típica esfuerzo-deformación.

Carga y deformación se relacionan linealmente hasta el punto de cedencia, a partir de este punto la pendiente de la curva esfuerzo- deformación decrece; antes del punto de cedencia el hueso está en la región elástica y si la carga aplicada es removida, el hueso recobrará su forma original, sin deformación permanente. La pendiente a la curva en la región elástica define la rigidez del hueso y se le denomina Módulo de Young ( $E = \sigma/\varepsilon$  [MPa]). Para determinar los valores de esfuerzo y deformación de cedencia existen varios métodos,el más comúnmente empleado consiste en trazar una línea paralela a la zona elástica de la curvas esfuerzo-deformación en un 0.2% de deformación y hasta interceptar con la curva.

En contraste con la región elástica en la zona después del punto de cedencia la deformación será permanente y no se volverá a la forma original aun cuando la carga sea removida. Si la carga continua aumentando se alcanzará la fractura del material y la energía requerida para causarla se calcula como el área bajo la curva esfuerzo-deformación y es llamada tenacidad a la fractura. Para el hueso cortical (compacto), la curva esfuerzo-deformación es bastante lineal a bajos valores de esfuerzos, en contraste el hueso trabecular (esponjoso) exhibe no linealidad incluso en bajos valores de esfuerzo [8], figura 7.

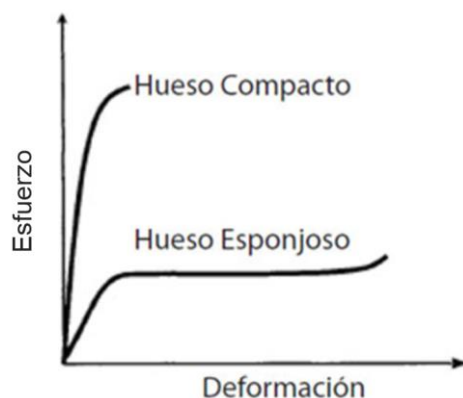


Figura 7.- Curva esfuerzo-deformación para huesos compacto y esponjoso.

El esfuerzo máximo puede o no ser igual al esfuerzo de fractura, los materiales frágiles tendrán una pequeña o nula deformación antes de llegar a la fractura, en tanto un material dúctil experimentará una deformación significativa antes de la fractura. En la tabla I se enlistan algunas propiedades mecánicas para el hueso humano trabecular [9]. La variación en los valores reportados se debe a factores como la edad del espécimen, la microarquitectura y los métodos experimentales empleados para medirlos.

Tabla I.- Intervalo de valores reportados en la literatura para el hueso Trabecular.

Propiedad	Intervalo	Ubicación	Descripción
Módulo de Young [MPa]	389-3230	Fémur	Compresión
	445-1091	Tibia	Compresión
	597-2700	Fémur	Tensión
	1068	Tibia	Tensión
	301-349	Vertebra	Tensión
Esfuerzo de Cedencia	3.21-17.45	Fémur	Compresión
	5.83	Tibia	Compresión
	0.95-2.02	Vertebra	Compresión

	2.44-10.93	Fémur	Tensión
	4.50	Tibia	Tensión
	1.72-1.75	Vertebra	Tensión
<b>Esfuerzo Máximo [MPa]</b>	5.6-8.05	Fémur	Compresión
	2.22-5.33	Tibia	Compresión
	2.23	Vertebra	Tensión

El tejido óseo es el único capaz de regenerarse por sí mismo por completo cuando aparece una lesión ya que los mecanismos osteoformadores actúan de inmediato, sin embargo cuando existen pérdidas masivas de dicho tejido (por accidentes, cirugías, entre otros), es necesario recurrir a los sustitutos óseos o injertos a fin de acelerar la reparación.

## INJERTOS ÓSEOS

La incorporación de los injertos es un proceso dinámico simultáneo de reabsorción de hueso necrótico y neoformación ósea, la integración de los injertos óseos incluye un englobamiento del hueso donante por el nuevo tejido óseo que forma el receptor y tiene muchas semejanzas con el proceso de reparación ósea. Tradicionalmente los defectos óseos se han tratado implantado tejido óseo autólogo, heterólogo (alogénico o xelogenico) o mediante la implantación de sustitutos.

El *autoinjerto* es un proceso que involucra tomar material del propio paciente de una zona no lesionada para su posterior trasplante en el sitio de la lesión, las características principales que lo hacen el de mayor elección son sus propiedades. *Osteoconductoras* al proveer una matriz en la cual las células óseas puedan proliferar. *Osteoinductivas* al proveer factores esenciales que inducen la proliferación de células diferenciadas y su diferenciación a osteoblastos (es decir producen el cambio de células primitivas a un tipo de célula con funciones especializadas). *Osteogénicas* al ser un depósito de células con la capacidad de generar nuevo hueso.

Sin embargo el uso de autoinjertos representa desventajas debido principalmente a la pequeña cantidad que puede ser tomada y a la morbilidad en el sitio de extracción. Los *aloinjertos* implican la toma y procesamiento del hueso de un cadáver y luego su trasplante al paciente, es acelular y presenta malos resultados en comparación con un autoinjerto, debido a que no hay en él células osteoprogenitoras, además de que puede causar una reacción inmune o transmitir agentes patógenos del donante.

Los *xenoinjertos* consisten en pequeños fragmentos de hueso obtenidos de animales de diferente especie, su uso se limita al relleno de orificios óseos como un material inorgánico.

Los *sustitutos óseos* se denominan a aquellos tejidos o materiales que pueden emplearse para rellenar defectos del hueso cuyo objetivo es regenerar y reparar el tejido óseo. Existen dos tipos de sustitutos óseos: los injertos óseos (fragmento de hueso natural implantable), y los biomateriales los cuales se diseñan y fabrican para imitar algunas propiedades del hueso natural.

## **BIOMATERIALES**

Un biomaterial es una sustancia o combinación de origen sintético o natural que constituye un conjunto o parte de un sistema que aumenta o reemplaza algún tejido u órgano o función del organismo [10]. Los biomateriales se pueden clasificar de acuerdo con los siguientes criterios [11]:

- a) Según el problema a resolver en el organismo, por ejemplo reemplazo de partes dañadas o enfermas, curaciones, corregir problemas de estética, asistencia en el diagnóstico, entre otras.
- b) Considerándolo desde un nivel de tejidos, nivel de órgano o como un sistema.
- c) Según la naturaleza de los materiales de los que está formado: polímeros, metales, cerámicos o materiales compuestos.
- d) En función de la respuesta interfacial de los materiales con el tejido: bioinertes, bioactivos o biodegradables.

Los biomateriales también se pueden clasificar en biomédicos de origen natural (metales, cerámicos, polímeros y compuestos) y biológicos, esto es de origen natural, animal o humano (colágeno, quitina). Actualmente se diseñan, fabrican y procesan biomateriales de tal forma que se permita no solo las mejores prestaciones de la pieza si no su reproducibilidad y fiabilidad. Los materiales usados como biomateriales tienen que poseer un carácter inerte, tolerable o bien bioactivo, y sus productos de degradación no deben originar toxicidad. Se debe tener en cuenta la reacción de las células frente a la composición química del biomaterial. Los biomateriales se pueden clasificar en biomédicos de origen natural (metales, cerámicos, polímeros y compuestos) y biológicos, esto es de origen natural, animal o humano (colágeno, quitina). Los biomateriales poliméricos son ampliamente utilizados, y deben su éxito a las posibilidades que presentan tanto para combinarse formando compuestos como por la facilidad de fabricarlos de distintas maneras con características determinadas.

## **POLIMEROS REABSORBIBLES**

El uso de implantes fabricados con polímeros reabsorbibles se ha popularizado en los últimos años, las razones de su empleo vienen dadas por que se evita el riesgo de una segunda cirugía de extracción después de conseguir el objetivo, permiten una transferencia gradual y progresiva de tensiones al hueso, son eliminados por completo del organismo y promueven el restablecimiento del tejido original. Para ser utilizados en la fabricación de implantes, los polímeros han de poseer resistencia y rigidez inicial, que se pierda a medida que avanza el proceso de reparación, deben ser totalmente reabsorbibles y los subproductos de su degradación (preferentemente por hidrólisis), no deben ser tóxicos, mutagénicos o carcinogénicos, y por último deben permitir su esterilización sin pérdida de las propiedades anteriores [12]. Los polímeros sintéticos reabsorbibles más comunes son el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polidoxanona, poligliconato y co-polímeros de los primeros, los cuales, han sido ampliamente estudiados para su uso como materiales de implante, en la reparación de tejidos blandos y en lesiones óseas. El sustituto óseo ideal poseer propiedades como ser biocompatible, biodegradable, capaz de brindar soporte estructural, fácilmente utilizable en clínica y con una buena relación costo/beneficio, algunas de éstas características son más deseables que otras en función de cada caso.

## **DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA DE POLÍMEROS REABSORBIBLES**

Las reacciones que sufren los polímeros en el organismo vivo son un tema muy importante ya que son afectados por una gran variedad de factores que pueden modificar el proceso degradativo, el medio fisiológico cuenta con agentes biodegradativos como agua, sales (aniones y cationes), pH del medio fisiológico y agentes enzimáticos. La degradación hidrolítica de un polímero se produce por el contacto del material con un medio acuoso, la penetración del agua provoca la hidratación de las moléculas, ruptura de puentes de hidrogeno intermoleculares, el hinchamiento y finalmente la hidrólisis de los enlaces inestables. El agua interacciona eficazmente con polímeros hidrofílicos, dando lugar a fenómenos de hinchamiento y disolución, por lo que puede ser responsable de la biodegradación de polímeros en el organismo humano, en cambio diferentes electrolitos que se encuentren presentes (aniones y cationes), así como la acidez o basicidad del medio tendrán un efecto importante en la degradación hidrolítica. En particular para los portadores de grupos carbonilo (ésteres, amidas, anhídridos) los iones fosfato son bastante efectivos como catalizadores de la degradación hidrolítica a la temperatura del organismo y se encuentran presentes en todos los fluidos del organismo humano. Otra consecuencia de dicho proceso hidrolítico es la pérdida de propiedades mecánicas en el material, por lo cual es necesario que la

hidrólisis se produzca a un ritmo tal que dé tiempo necesario para que se consolide el hueso, antes que el material haya perdido totalmente su resistencia mecánica.

## EL ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA)

La unidad básica del ácido poliláctico (PLA por sus siglas en inglés) es el ácido láctico (LA), una molécula quiral (aquella que tiene un átomo de carbono unido a cuatro sustituyentes diferentes), que existe en dos enantiómeros (imágenes especulares no superponibles) L y D [13], mismos que se ilustran en la figura 8.

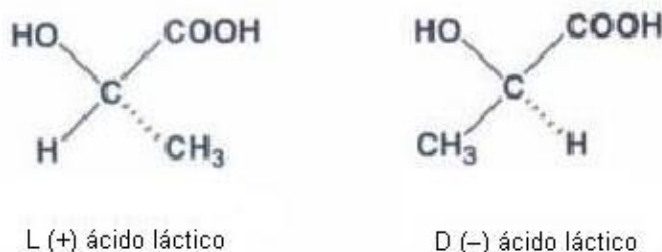


Figura 8.- Enantiómeros del D y L (PLA)

Es posible obtenerlo por fermentación a partir de azúcares o almidones, figura 9, utilizando una cepa optimizada de *Lactobacillus*. El ácido poliláctico es un polímero semicristalino con una temperatura de transición vítrea entre los 55 y los 59°C y un punto de fusión entre los 174-184°C.

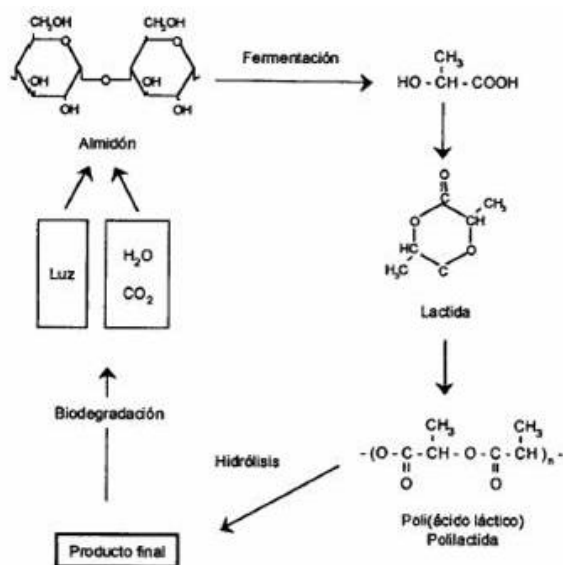


Figura 9.- Obtención del ácido poliláctico por apertura de anillo.

## PROPIEDADES MECÁNICAS

El PLA posee una alta resistencia mecánica, elevado módulo de Young, plasticidad térmica y buena procesabilidad para ser fabricado en diversas formas, en la tabla II se muestran algunas de estas propiedades las cuales se comparan con la de algunos polímeros provenientes del petróleo.

**Tabla II.-Propiedades mecánicas del PLA y de otros polímeros comerciales\*.**

NOMBRE	MODULO DE TRACCIÓN [MPa]	RESISTENCIA AL IMPACTO[J/m]	MÓDULO DE FLEXIÓN [MPa]	PORCENTAJE DE ELONGACIÓN A LA RUPTURA
Ácido Poliláctico	3.834	24.6	3.689	4
Poliestireno	3.400	27.8	3.303	2
Polipropileno	3.400	80.1	1.503	400
Polietileno de alta densidad	1.000	128.1	800	600

\*Bastioli, C. Handbook of Biodegradable Polymers, Rapra Technology Limited, United Kingdom, pp. 1-291, (2005)

Su resistencia aunada a un bajo porcentaje de elongación hace a este polímero adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga como son las suturas y fijaciones ortopédicas [13,14].

## PROCESAMIENTO DEL PLA

Los polímeros de ácido láctico son degradables en general y pueden ser procesados por las mismas técnicas utilizadas para los termoplásticos tradicionales como: extrusión, colada, inyección, moldeo, por compresión o por disolución en un solvente. El principal problema durante el procesamiento es la pérdida de masa molecular que sufre el polímero debido a la sensibilidad hidrolítica y térmica de los enlaces del polímero; por ello el proceso también influye en las propiedades mecánicas finales de la pieza obtenida [16].

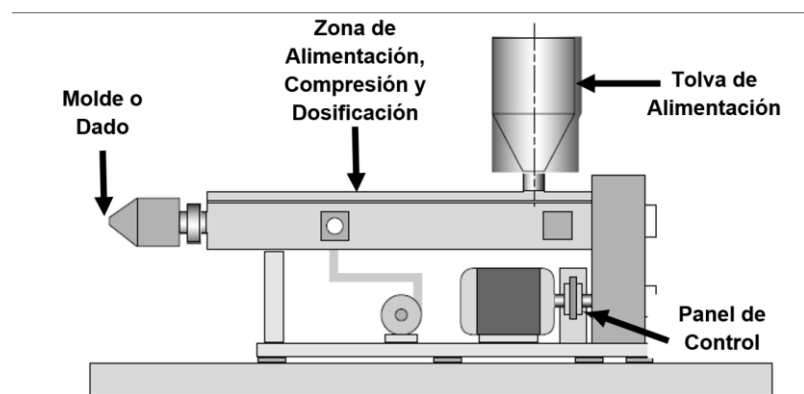
## EL PROCESO DE EXTRUSIÓN

El proceso de extrusión, es uno de los más importantes en la industria de transformación de plástico, entre los productos que se pueden manufacturar se encuentran: tubería, manguera, fibras, película y un número ilimitado de perfiles. El proceso de extrusión se utiliza, además para mezclar y formular



materiales compuestos, y producir materia prima, como por ejemplo, gránulos de concentrado. El interior de un extrusor, es un husillo o tornillo que gira dentro de un cilindro y es capaz de bombear (empujar) un material a una velocidad específica, bajo ciertas condiciones de operación. Los materiales utilizados en el proceso de extrusión son, por lo general, termoplásticos, los cuales se suavizan cuando se calientan y se transforman en fluidos, que posteriormente se endurecen cuando se enfrían y se transforman en sólidos.

Cuando un material termoplástico se alimenta al extrusor, el husillo lo empuja hacia adelante a lo largo del barril, donde se calienta y se transforma en fluido. Este fluido continúa y al final se le hace pasar a través de un dado que proporciona el perfil o la forma final deseada. Una vez que sale del dado, el fluido debe ser enfriado rápidamente para mantener la forma que se obtiene en el dado. Este dado puede considerarse como una resistencia de flujo. Entre más largo y pequeña sea el orificio de paso, mayor será la resistencia y a su vez, mayor será la potencia necesaria para empujar el material fundido a través del dado. La figura 10, muestra un diagrama típico de un extrusor, donde se señalan las partes principales.



*Figura 10.- Esquema de una máquina extrusora*

Los intereses de la investigación en ingeniería han sido cambiar los materiales convencionales a materiales compuestos, debido a que con los últimos se obtienen mayores propiedades mecánicas. La combinación más simple de los materiales compuestos consiste únicamente en dos elementos, donde uno actúa como refuerzo (generalmente el más duro y resistente) y el otro como matriz, recomendando que se presente en la interfase una buena adherencia entre los componentes. En el presente trabajo de investigación se realiza el desarrollo de un material compuesto de matriz polimérica de PLA reforzado con partículas de quitosano.

## PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL PLA

**DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA DEL PLA.-** El ácido poliláctico se degrada por hidrólisis de los grupos éster, dependiendo de la cristalinidad, peso molecular, rapidez de difusión del agua dentro de las cadenas del polímero, y el estereoisomerismo [15]. Durante este proceso ocurre una disminución del peso molecular, de las cadenas en función del tiempo de degradación lo cual ocurre como consecuencia del ataque del agua o de iones ácidos o básicos a los enlaces éster de las cadenas. El pKa del ácido carboxílico terminal del PLA y sus oligómeros es bajo (~3), comparado con otros ácidos carboxílicos, en este caso los grupos terminales de ácido carboxílico catalizan la hidrólisis de los ésteres, que se traduce en una mayor velocidad de degradación a medida que el polímero se degrada (autocatálisis). Entran en juego dos mecanismos de reacción: el primero es una ruptura de cadena al azar y la segunda es una hidrólisis de los extremos de las cadenas. En el cuerpo humano el PLA se incorpora en el ciclo del ácido tricarbónico y es excretado por el pulmón en forma de CO<sub>2</sub> y por el riñón en forma de agua, el ácido poliláctico tiene una degradación lenta que conduce a un tiempo largo de vida *in vivo* que podría ser de algunos años incluso en algunos casos, lo cual representa un serio problema para aplicaciones en ortopedia. El ácido poliláctico es relativamente hidrofóbico con un ángulo de contacto estático en agua de 80°, lo cual resulta en una baja afinidad celular y puede provocar una respuesta inflamatoria al estar en contacto con los fluidos biológicos [16].

El PLA se degrada por hidrólisis simple del enlace éster, tal como se observa en la siguiente figura (11):

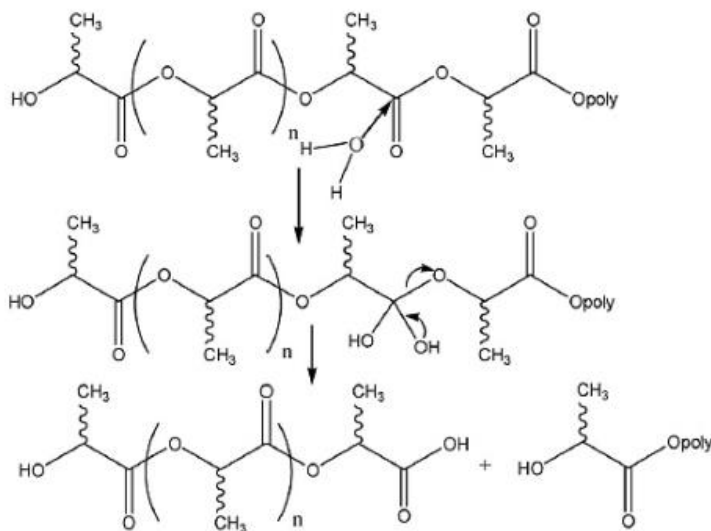


Figura 11.- Mecanismo de hidrólisis del PLA.

## QUITINA

La quitina (N-acetil-glucosamina) cuya estructura se muestra en la figura 12, es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza y se encuentra presente en los exoesqueletos de artrópodos, crustáceos y en cutículas de insectos, ha sido ampliamente estudiado por más de 40 años.

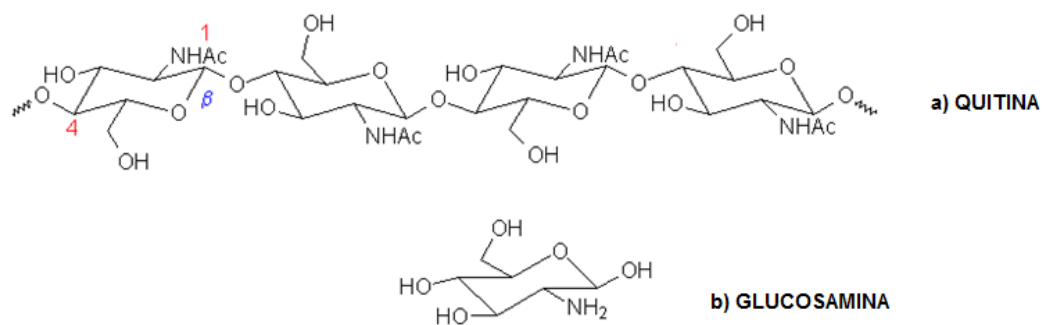


Figura 12.- Representación de la estructura primaria de la quitina

Se ha encontrado que entre un 25-62% del peso seco de estos desechos contienen quitina como se reporta en la Tabla III, la quitina es el precursor del quitosano el cuál puede ser extraído por métodos enzimáticos, o químicos con una elevada pureza de acuerdo a la literatura [18,19 y 20], y siendo México uno de los principales productores a nivel mundial de camarón [21], la materia prima es abundante y económica.

Tabla III.- Composición química aproximada en base seca del exoesqueleto de crustáceos.

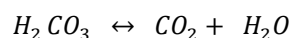
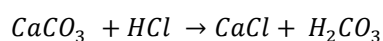
FUENTE	PROTEINA	QUITINA	CENIZA	LIPIDOS
Cangrejo	25.1	13.5	58.6	2.1
Camarón	41.9	17.0	34.2	5.2
Langosta	29.8	13.2	46.6	5.6
Krill	41.0	24.0	23.0	11.6
Gamba	61.6	33.0	29.4	1.4

## MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LA QUITINA

Como se mencionó en párrafos anteriores la quitina se encuentra asociada a diferentes compuestos como minerales, proteínas y lípidos en los organismos que la contienen, por lo que es necesaria la aplicación de métodos drásticos para poder removerla. Se han desarrollado métodos enzimáticos y químicos siendo estos últimos los más empleados a nivel industrial y que se detallan a continuación.

### MÉTODO QUÍMICO

El tratamiento químico de los exoesqueletos de camarón consiste en una etapa de desmineralización, ya que los crustáceos tienen un contenido de ellos que oscila entre el 30-50% en peso y está constituido por carbonato de calcio principalmente y en menor medida fosfatos de calcio. La eliminación de estos constituyentes se da de acuerdo con la siguiente reacción:



El tiempo de tratamiento, la concentración de las soluciones y la cantidad a usar de las mismas, puede variar dependiendo del tipo de materia prima. Cuando los exoesqueletos han quedado desmineralizados se aplica una hidrólisis alcalina, generalmente usando soluciones de NaOH a temperaturas entre los 65 y 100°C, durante 1 a 24 horas, las condiciones óptimas dependerán del tipo de crustáceo. Esta etapa tiene como fin romper la estructura de la matriz polimérica haciendo solubles las proteínas, las cuales llevan consigo lípidos y pigmentos (astaxantina principalmente) presentes en el exoesqueleto del camarón y siendo de especial importancia, ya que existen proteínas en los mariscos (camarones, langostas, cangrejos, etc.) como la tropomiosina y la miosina que provocan reacciones alérgicas en el cuerpo humano [22].

### QUITOSANO

Una vez que la quitina ha sido obtenida, la siguiente etapa consiste en desacetilarla (figura 13), es decir hidrolizar los grupos acetoamida de la quitina hasta grupos amino, grupo funcional característico del quitosano.

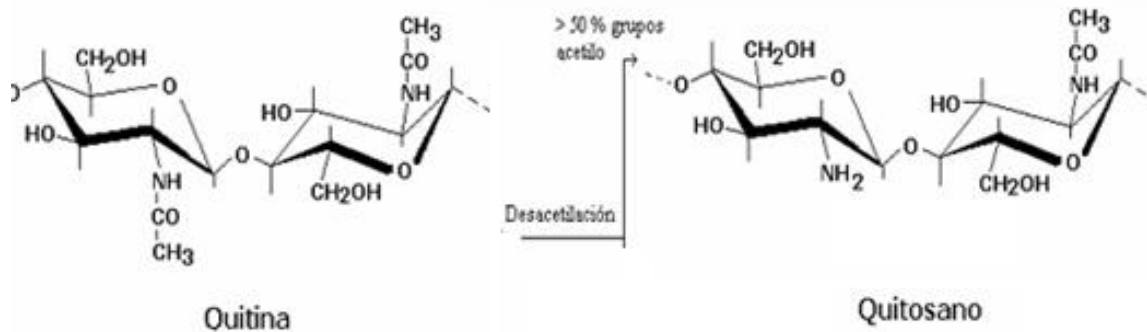


Figura 13.- Desacetilación de la molécula de la quitina.

## DESACETILACIÓN

Este proceso se realiza con soluciones alcalinas (generalmente NaOH ó KOH), muy concentradas y a altas temperaturas (60°C o más), estas condiciones se dan por la baja reactividad de la quitina la cuál es ocasionada por la compactación de las cadenas de la estructura cristalina de la quitina que dificultan el paso del álcali a los sitios reactivos de la molécula. La desacetilación completa difícilmente es alcanzada y en realidad no es necesaria ya que la solubilidad en soluciones de ácidos diluidos se logra a partir del 60% de desacetilación. El quitosano obtenido puede variar en su peso molecular y composición (número y distribución de grupos amino), estas variaciones se deben a las condiciones del proceso las cuales cambian en base a la fuente de la cual sea extraído [23, 24].

## APLICACIONES DEL QUITOSANO

Dada la versatilidad de este material, se presenta una breve clasificación por área sobre las aplicaciones del quitosano: En química analítica: como intercambiador de iones, absorción de metales pesados, y aplicaciones cromatográficas entre otras. En biomedicina: como membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, agente cicatrizante en quemaduras, sistemas liberadores de fármacos, transporte de agentes anticancerígenos, adelgazantes, por mencionar algunas. También se ha empleado en la agricultura para recubrimiento de semillas, sistemas liberadores de fertilizantes, aditivo en el alimento de animales, en formulación de pesticidas. En la industria de los cosméticos en la fabricación de espumas de afeitar, cremas para piel, tratamientos anticelulitis. Y en el tratamiento de aguas como agente floculante, coagulante, tratamientos de flotación para la remoción de aceites, agentes filtrantes. Por su composición química y estructura el quitosano tiene excelentes propiedades, incluyendo la actividad antimicrobial,

biocompatibilidad debido a que su estructura es similar a la glucosamina de la matriz extracelular, puede ser usado en la curación de heridas, promoción del crecimiento óseo, y para el reclutamiento de agentes bioactivos como factores de crecimiento. Las diversas presentaciones del quitosano (polvo, gel y solución) permiten su utilización como vehículo y liberador de fármacos y péptidos, así como potenciador de la absorción, siendo un excelente candidato para aplicaciones en tratamientos para tejidos blandos, dada su actividad anti infecciosa [23, 24].

## PROPIEDADES FISICO QUÍMICAS

Los grupos amino e hidroxilo presentes en la molécula de quitosano le confieren una buena reactividad, las principales son viscosidad, peso molecular y grado de desacetilación. La presencia de los grupos amino a lo largo de la cadena del quitosano, permite la disolución de esta molécula en soluciones de ácidos diluidos, por medio de la protonación de esos grupos, por lo que se espera que ocurra un hinchamiento al entrar en contacto con el agua, ya que es una molécula hidrofílica. En medios ácidos diluidos tiene lugar el siguiente equilibrio (figura 14):



*Figura 14.- Reacción de equilibrio en ácidos diluidos del quitosano*

Al adquirir la carga positiva, la amina del quitosano aumenta su capacidad hidrofílica y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas formando sales ya que el pKa del grupo amino en el quitosano es 6.5. Los productos de degradación del quitosano son la glucosamina o la N-acetilglucosamina, las cuales se dispersan en el organismo sin efecto tóxico alguno. La adición de partículas de quitosano en una matriz de PLA modificaría las propiedades de este debido a que el quitosano tiene propiedades biológicas adecuadas, como la biocompatibilidad y biodegradabilidad que ocurre gracias a la hidrólisis de los enlaces glicosídicos presentes en la molécula, además de ser no tóxico y poseer efectos antimicrobianos [12-14].

## EL ÁCIDO POLILÁCTICO EN INGENIERIA TISULAR

La ingeniería de tejidos (ingeniería tisular) se basa en el desarrollo y uso de biomateriales con características tales como ser bioactivos, bioabsorbibles y capaces de estimular la respuesta celular para que actúen como soportes temporales en la reparación de defectos óseos. El ácido poliláctico se ha empleado exitosamente en aplicaciones biomédicas como andamios para vasos sanguíneos [25], para promover la regeneración ósea [26], y en aplicaciones donde se tiene que soportar una carga como son las suturas y fijaciones ortopédicas [12]. Diversas investigaciones han reportado el uso del ácido poliláctico en el desarrollo de materiales para ingeniería de tejidos, sin embargo su comportamiento al ser implantado en el cuerpo presenta algunos problemas como la degradación que en una etapa inicial es lenta y genera productos ácidos de bajo peso molecular, mismos que son eliminados por el metabolismo, pero en una segunda etapa se acelera la reacción provocando que los productos ácidos se acumulen y se manifiesten produciendo inflamación. Por otra parte pruebas de viabilidad celular, con células de médula ósea de ratón muestran que el PLA puro no promueve el crecimiento, ni la proliferación celular debido a que presenta una superficie hidrofóbica que impide la adherencia celular. Investigaciones sobre el ácido poliláctico reforzado con partículas se han desarrollado con el fin de poder mejorar sus propiedades y poder emplearlo como sustituto óseo, tal es el caso de un estudio donde se fabricó un material compuesto cuya matriz es el ácido poliláctico y partículas vítreas como fase de refuerzo en diversos porcentajes (30, 40, 50 y 70% en peso), para la elaboración de estos materiales se utilizó la técnica de disolución y colada (*solvent casting*), la cual se basa en la disolución del polímero en un solvente orgánico y una vez disuelto, se vierte en un molde y se espera a la evaporación del solvente, dicho método permitió incorporar altos porcentajes del material de refuerzo, en una segunda etapa el material obtenido es prensado en caliente [36]. Se encontró que dicho proceso disminuye la cristalinidad del material tanto por la disolución como por el proceso de prensado, además de afectar también la Tg del material (disminuye). En cuanto al comportamiento mecánico del compuesto se observó un claro ascenso en el Módulo de Young conforme se incrementa la cantidad de refuerzo, y alcanzando un valor máximo en 50% de partículas de vidrio; sin embargo en las pruebas de resistencia a la flexión disminuye en todos los casos, debido principalmente a la falta de adhesión entre la fase orgánica y la fase inorgánica. Otro estudio sobre nanocompuestos base PLA y arcillas [37] como refuerzo fue desarrollado, en el los compuestos se fabrican mediante la técnica de extrusión se prepararon nanocompuestos en base de ácido poliláctico, con varios porcentajes de arcilla, se empleó un ácido poliláctico comercial PLA 2002 D y una montmorillonita modificada orgánicamente OMMT (cloisite 30 B), la preparación de las mezclas se efectúa en una extrusora de doble husillo, a una temperatura entre los 160 y 195 C, y con una velocidad de 80 rpm y combinando 1 y 5% en pesos de arcilla. Se estudió la influencia del procesado sobre el PLA, en el caso del índice de fluidez se

registró un incremento conforme aumenta el porcentaje de arcilla, esto debido a la utilización de un modificador orgánico incluido en la arcilla. Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido, muestran que el porcentaje de cristalinidad aumenta con la presencia de arcilla y en cuanto a la Tg disminuye con la adición de arcilla. Para el caso de las propiedades mecánicas se evaluó la resistencia a la tracción de dichos materiales, en general existe un incremento en el módulo de Young de hasta el 11 % con respecto al PLA puro conforme se incrementa el porcentaje de arcilla; sin embargo el porcentaje de deformación y la resistencia a la tracción en el punto de cedencia disminuye, debido a una baja adherencia entre la matriz y la fase inorgánica.

## *ESTADO DEL ARTE*

Para minimizar los efectos adversos del ácido poliláctico en la ingeniería de tejidos, en este estudio se propone la adición de quitosano, un biopolímero natural, hidrofílico, biocompatible y biodegradable, cuyos usos en ortopedia se han impulsado debido a su capacidad de inducir y promover la formación ósea, sólo o en combinación con fosfatos de calcio [27,28] y que en la ingeniería de tejidos se ha empleado en la fabricación de andamios que soportan el crecimiento celular [29, 30]. El quitosano en su estructura presenta muchos grupos -O-H y -N-H que generan puentes de hidrógeno, restringiendo así la infiltración y difusión de agua. Otra característica importante es que el quitosano es un polisacárido alcalino lo cual puede coadyuvar a la neutralización de los productos ácidos del PLA. Sin embargo, las combinaciones que de estos materiales se han dado presentan dificultades como el hecho de que hasta la fecha no se ha reportado ningún solvente para ambas sustancias, el quitosano solo se disuelve en soluciones acuosas de ácidos diluidos en tanto que el PLA solo puede ser disuelto por algunos solventes orgánicos, por lo que la combinación de éstos materiales, genera una separación de fases. Estudios relacionados [30, 31] han evaluado andamios porosos 3D basados en quitosano y diferentes poliésteres alifáticos creados mediante la técnica de moldeo por derretimiento y compresión, seguido por lixiviación de sal. Mediante dicha técnica se obtuvieron andamios con propiedades distintivas concernientes a la porosidad, interconectividad y propiedades mecánicas, dependiendo de la cantidad y el tamaño de partícula de quitosano, así como por la proporción y tipo de poliéster alifático utilizado en la mezcla. En un estudio posterior [32], se llevó a cabo la evaluación biológica de materiales a base de polímeros alifáticos tales como Policaprolactona (PCL), Succinato de polibutileno (PBS), entre otros y quitosano y se demostró que son adecuados para ser usados como soporte o andamio debido a que presentaron



adhesión, viabilidad/proliferación y diferenciación osteoblástica de una línea de células progenitoras de médula ósea de ratón. Por otro lado, se han desarrollado numerosas investigaciones para producir andamios de ácido poliláctico con quitosano, en uno de ellos se fabrican disolviendo polvos de quitosano en solución acuosa de ácido láctico en 2.5% en peso y su posterior liofilización. Se realizaron pruebas de biodegradabilidad *in vitro* y degradación *in vivo* que muestran que la velocidad de degradación copolimero (PLA/Quitosano) fue similar a la velocidad de degradación del quitosano puro. Los cuales se degradan lentamente durante la primera semana y posteriormente de forma más lenta durante la segunda y cuarta semana, posteriormente pierden peso dramáticamente llegando a ser del 77% al término de 16 semanas de haber sido implantado. Pruebas de viabilidad celular, empleando células de médula ósea de ratón las cuales mostraron que el PLA puro no promueve el crecimiento ni la proliferación celular debido a que presenta una superficie hidrofóbica que impide la adherencia celular, en cuanto al quitosano si muestra crecimiento y proliferación desde los primeros días y se incrementa con el paso del tiempo y con el incremento en la proporción P, así como también el copolímero y se incrementa esta propiedad con el aumento de la proporción PLA:quitosano. Estudios histológicos *in vivo* muestran que los andamios de quitosano puro presentan infiltración celular en los poros, los diferentes copolímeros muestran comportamiento similar, presentando respuesta inflamatoria mínima e infiltración celular, en cambio los andamios de PLA puro se degradan lentamente y sólo se observa embebido en el tejido, la histocompatibilidad e hidrofiliidad del copolímero, refleja un buen comportamiento para su uso en la reparación de tejidos. Otro estudio sobre la fabricación de películas de PLA con partículas de (800- 180 $\mu$ m) y quitosano en porcentajes del 5 y 10% en peso, por medio de la técnica de extrusión con el fin de evaluar el efecto del tamaño de partícula y del contenido de quitosano en propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas es presentado; los resultados muestran que las partículas de quitosano no forman aglomerados dentro de la matriz, el comportamiento térmico del PLA no presenta cambios importantes, variando su Tg tan sólo en dos grados tanto con 5% como con 10%. Se analizó el comportamiento en tensión de las películas obtenidas y se encontró que el tamaño de partícula no tiene influencia en dicha propiedad, sin embargo se reporta que conforme se incrementa la cantidad de quitosano reduce la resistencia a la tensión, el esfuerzo de cedencia y el módulo elástico, por lo que se descarta un efecto de reforzamiento en cuanto al PLA puro en resistencia a la tensión. En cuanto a la permeabilidad se reporta que conforme se incrementa el contenido de quitosano la permeabilidad aumenta y que el quitosano presenta gran afinidad con las moléculas de agua, lo que favorece su transporte a través de la película. Las propiedades antimicrobianas mostraron que para el compuesto hubo una reducción del conteo microbiano, mismo que se atribuye a la actividad antibacterial del

quitosano, la cual se asocia con la interacción de cargas positivas presentes en la cadena polimérica del quitosano y las cargas negativas provenientes de los residuos de macromoléculas (como las proteínas). Otros autores desarrollaron materiales compuestos de una mezcla PLA/quitosano/queratina por la técnica de moldeo por compresión, se analizaron propiedades mecánicas como, Modulo de Young y resistencia al impacto, así como algunas propiedades biológicas. Los resultados muestran que la incorporación de quitosano mejora el Modulo de Young pero provoca un decremento en la resistencia al impacto. En cuanto a la evaluación biológica se realizó cultivo celular y pruebas de citotoxicidad por medio del ensayo MTS, se probó que existe adhesión y proliferación de las células después de 24 horas y posteriormente comienza a decaer [11]. Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo de investigación se plantea el desarrollo de un material compuesto de matriz polimérica de PLA reforzado con partículas de quitosano, que posea propiedades mecánicas con la capacidad de mantener la estabilidad biomecánica del hueso y que al mismo tiempo presente cualidades como control en la velocidad de degradación, y propiedades biológicas que faciliten la adhesión y proliferación celular, para uso potencial como sustituto óseo.

## *Justificación*

Existen en el mundo millones de personas con algún tipo de prótesis, la utilidad y necesidad de todo tipo de implantes se ha incrementado sobre todo en los últimos años, factores sociológicos como el aumento en la esperanza de vida, hacen que el desarrollo de biomateriales sea de vital importancia ya que la longevidad tiene implicaciones para mantener la calidad de vida. Los biomateriales deben cumplir con las condiciones esenciales de ser biocompatibles, esto es que no produzcan reacciones adversas en la interfaz tejido-material y asegurar una determinada vida media acorde a las prestaciones específicas de la aplicación a que vayan destinados en función de que sea provisional o definitivo [1]. Por ello es indispensable la investigación y el desarrollo de nuevos materiales, con propiedades mecánicas y características biológicas similares al hueso con el que van a interactuar y que preferentemente faciliten el crecimiento de tejido óseo, el desarrollo de este tipo de materiales (biomateriales) es un campo de la ingeniería de tejidos. En el caso del tejido óseo en la actualidad ocupa uno de los primeros lugares en los trasplantes realizados más frecuentemente, algunas de las causas son el creciente envejecimiento de la población y las enfermedades óseas tales como (osteoporosis, osteogénesis, cáncer de hueso), cirugías ortopédicas, traumatismos, entre otras. El tratamiento médico más recurrente es el autoinjerto, el cual se

realiza con material del propio paciente; sin embargo, la pequeña cantidad de material disponible, el riesgo de infección y necesidad de cirugías adicionales, entre otras complicaciones hacen esta terapia insatisfactoria.

## DESARROLLO DE SUSTITUTOS ÓSEOS

El desarrollo de materiales en ortopedia y traumatología, presenta dos vertientes materiales porosos y no porosos. Un ejemplo de aplicaciones de material no poroso son los clavos para fijaciones óseas, relleno de cavidades óseas y liberación de fármacos, entre otros; en el caso de los porosos (andamios), se utilizan para regeneración del tejido óseo. En el tratamiento de fracturas los materiales metálicos son los más empleados dadas sus elevadas propiedades mecánicas y gran estabilidad *in vivo*. Sin embargo esto es un inconveniente ya que son mucho más rígidos que el hueso, para ello basta una comparación entre el módulo de Young de un metal típicamente empleado en ortopedia como el Titanio ( $E_{Ti}=106-114$  GPa) y el hueso cortical de humano ( $E_{h. Cortical}=10-20$  GPa), esta notable diferencia trae consigo la pérdida de masa ósea y atrofia del hueso por desmineralización (osteopenia), por lo que el hueso debilitado es más propenso a sufrir una fractura, haciendo necesaria la remoción del implante [1,3]. Además otro problema es la migración de iones y pequeñas partículas metálicas a zonas circundantes al implante y en algunos casos a órganos como pulmones e hígado, y la imposibilidad de regenerar hueso. En lo que se refiere a los cerámicos se introducen en la década de los 70, cuando comenzaron a presentarse fracasos en los biomateriales empleados hasta ese momento (acero, aleaciones de cobalto, entre otros), lo cual se debía principalmente a que estos materiales se encapsulaban teniendo nula osteointegración, entonces los materiales cerámicos presentaron una excelente opción ya que poseen una buena compatibilidad y osteointegración [10,11], y son más parecidos al componente mineral del hueso; sin embargo la fragilidad de los materiales cerámicos restringen en gran medida su campo de aplicación; así por ejemplo se usan en la fabricación de implantes que no deban soportar cargas, como son el relleno de defectos óseos tanto en cirugía bucal como en ortopedia y en recubrimiento de implantes dentales y articulaciones metálicas. Las excepciones son la alúmina y la zirconia que se emplean en articulaciones de cadera pero dada su nula interacción con el tejido óseo se aíslan y forman una capa fibrosa alrededor del implante. El desarrollo de materiales poliméricos como lo son los polímeros reabsorbibles ha sido de gran interés en este ámbito, se han utilizado exitosamente en barras, agujas y clavos de ácido poliglicólico (PGA) y ácido poliláctico (PLA), principalmente para la fijación de fracturas maxilofaciales o de tobillo; sin embargo a pesar de sus grandes ventajas, carecen de propiedades mecánicas suficientes para aplicaciones en las cuales se precise soportar cargas [12,13]. Por ello desde hace algunas décadas se han desarrollado los materiales

compuestos, cuya finalidad es combinar ventajas de diferentes materiales (matriz y refuerzo), para así obtener un material con propiedades mecánicas y biológicas similares a las del hueso, además que de ser posible faciliten el crecimiento de tejido óseo. Por lo anterior, en el presente trabajo de investigación se plantea el desarrollo de un material compuesto de matriz polimérica de PLA reforzado con partículas de quitosano, que presente propiedades mecánicas con la capacidad de mantener la estabilidad biomecánica del hueso y que al mismo tiempo que presente propiedades biológicas que faciliten la adhesión y proliferación celular, para uso potencial como sustituto óseo.

## *Hipótesis*

El quitosano mejorará las propiedades mecánicas, afectará la velocidad de degradación del ácido poliláctico y favorecerá la adhesión y proliferación celular resultando un material útil para su uso como sustituto óseo.

## *Objetivos*

### **GENERAL:**

Diseñar y desarrollar materiales compuestos de ácido poliláctico/quitosano por extrusión, y estudiar el efecto de la fracción peso de quitosano en las propiedades mecánicas y biológicas, para el óptimo diseño de un potencial sustituto óseo.

### **ESPECÍFICOS:**

- Obtener quitosano a partir de exoesqueletos de camarón.
- Caracterizar los materiales de partida y materiales compuestos mediante técnicas como DRX, FT-IR, MEB, ATG.
- Fabricar materiales compuestos PLA/quitosano variando su relación peso mediante la técnica de extrusión.

- Evaluar *In vitro* degradabilidad, citotoxicidad, viabilidad y mineralización del PLA y materiales compuestos.
- Estudiar el efecto del quitosano en las propiedades mecánicas y biológicas de los materiales compuestos.

# Capítulo II

## Métodos y materiales

En el presente trabajo, los compuestos quitosano/PLA se obtuvieron mezclando el ácido poliláctico con diferentes contenidos de quitosano mediante extrusión. El quitosano fue extraído a partir de exoesqueletos de camarón blanco, en tanto que el PLA se obtendrá de manera comercial. La metodología experimental seguida se resume en el siguiente diagrama (ver figura 15):

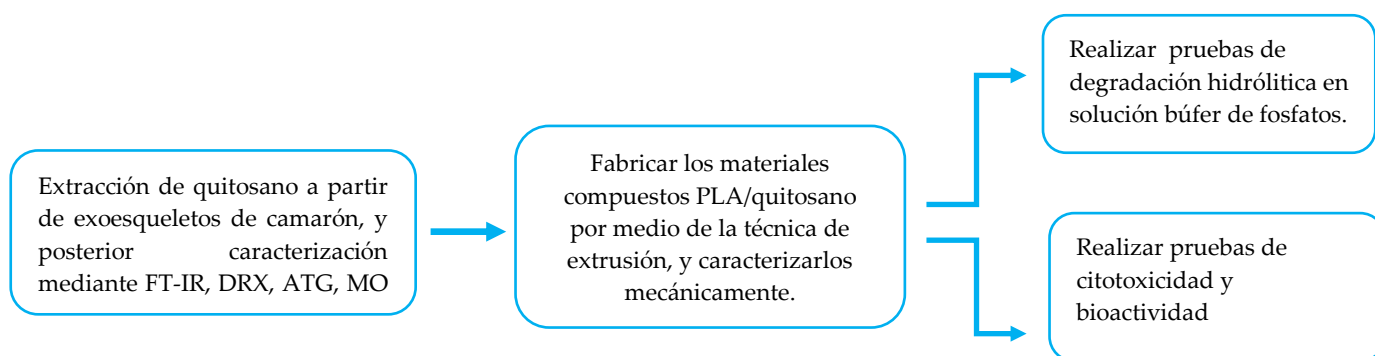
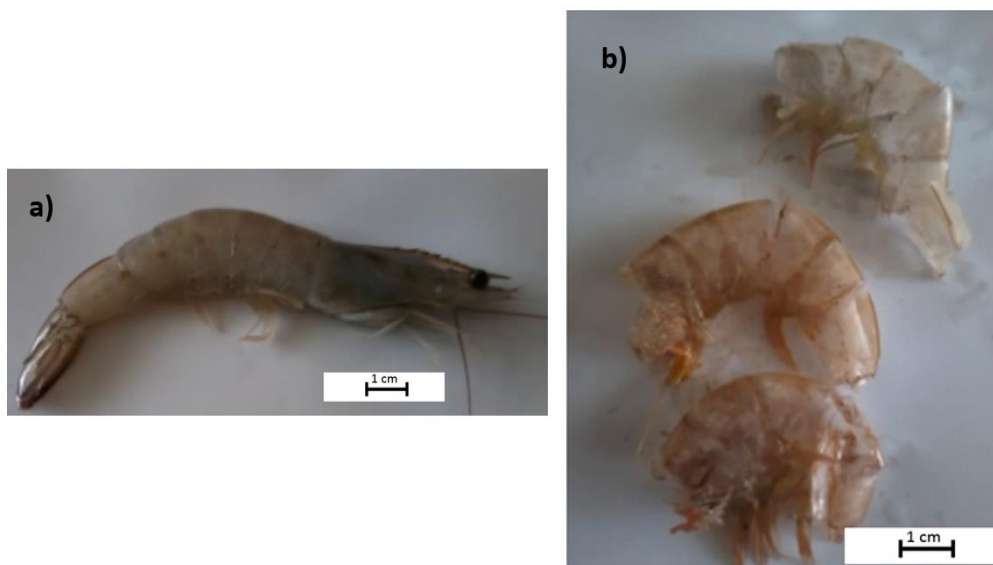


Figura 15.- Diagrama de bloques de la metodología experimental.

A continuación se hace la descripción de las etapas de extracción del quitosano.

### EXTRACCIÓN DEL QUITOSANO

El camarón se extrae por tratamiento químico de acuerdo con la literatura, se han reportan protocolos para extraer quitina y quitosano de caparazón de crustáceos que consisten de cuatro etapas: desproteínización, desmineralización, desacetilación y purificación, usando diferentes concentraciones de los reactivos, temperaturas y tiempos de reacción. Los materiales empleados en la obtención del quitosano a partir de exoesqueletos de camarón fueron: exoesqueletos de camarón Blanco (*Litopenaeus Vannamei*), que se muestran en las figuras 16 a) y b) respectivamente. Todas las sustancias empleadas fueron grado reactivo.



*Figura 16.- a) Camarón Blanco y b) exoesqueleto obtenido.*

**DESMINERALIZACIÓN.-** Se colectaron aproximadamente 4 kg de desechos de camarón para ser separados, lavados con agua corriente, y posteriormente secados a 80°C por 4 h en una estufa. Posteriormente el producto obtenido fue tratado químicamente, de la siguiente manera: se colocaron los exoesqueletos de camarón en un matraz conteniendo una solución de HCl 0.6N en una relación 1:11 sólido-líquido a una temperatura de 30°C durante 3 horas. En este trabajo se utiliza el HCL (0.6 N) para desmineralizar dada su alta disponibilidad, eficiencia y al ser el más empleado a nivel industrial [38].

**DESPROTEINIZACIÓN.-** En esta etapa se empleó NaOH al 1% a temperatura ambiente toda vez que de acuerdo con [39] concentraciones y temperaturas más elevadas pueden resultar en la rotura de las cadenas poliméricas de la quitina. El producto de la etapa anterior se coloca en una solución de NaOH al 1 % volumen a una temperatura de 28°C durante 24 horas de agitación constante para asegurar una completa desproteínización, finalmente se realizaron lavados exhaustivos con agua destilada hasta lograr la eliminación del exceso de base (NaOH) y alcanzar la neutralidad del medio. Después de la desmineralización y desproteínización se obtiene la quitina en polvo, misma que será desacetilada para obtener el quitosano.

**DESACETILACIÓN.-** En esta etapa se obtiene el quitosano como derivado de la quitina, este proceso se realizó utilizando una solución de NaOH al 50% volumen como reactivo, con el cual se han reportado los mejores resultados [38], por 1 hora a una temperatura de 60°C. Se deja enfriar y luego se realizan lavados exhaustivos hasta alcanzar la neutralidad del medio, el producto obtenido en esta etapa es el quitosano.

**DESPIGMENTACIÓN.-** Esta etapa el producto obtenido será tratado para eliminar pigmentos, ya que muchos de ellos son agentes alérgenos [22] y por tanto indeseables dada la aplicación que se desea como biomaterial. El proceso consistió en la inmersión del producto en una solución de 15% éter, 75% acetona y 10% agua, en una relación 1:10 (S-L), a temperatura ambiente con agitación continua por 2 hrs. Transcurrido este tiempo el sólido fue filtrado, y lavado con agua destilada exhaustivamente, para finalmente ser secado en una estufa a 60°C por 4 hrs. Posteriormente el quitosano fue sometido a procesos de molienda manual en un mortero de ágata y posteriormente tamizado.

## **CARACTERIZACIÓN**

### **DIFRACCIÓN DE RAYOS X.-**

La cristalinidad de los distintos materiales fue analizada empleando un difractómetro semiautomático Focus, D-8, Bruker, usando Cu- $\alpha$  radiación ( $\lambda=0.15147$  nm). Los parámetros de análisis fueron:  $2\theta$  de 5 a 40° en pasos de 0.05°.

### **ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO.-**

Los análisis térmicos se llevaron a cabo en un equipo Shimadzu, modelo DTG-60, la metodología utilizada para realizar el análisis TGA se basó en la norma ASTM E 1131-03, en modo dinámico. Se tomó una masa de  $4.090 \pm 0.001$  mg de muestra, se utilizó un intervalo de temperatura desde 30 hasta 600°C, con una velocidad de calentamiento de 5°/min y un flujo de nitrógeno de 20 ml/min.

### **ESPECTROFOTOMETRÍA FT-IR.-**

La identificación de grupos funcionales en cada material fueron identificados mediante un espectrofotómetro FT-IR, marca Perkin Elmer, modelo Frontier. La región analizada fue la de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . La medición se realizó por triplicado.

### **MICROSCOPIA ÓPTICA**

Las diferentes muestras fueron observadas en un estereomicroscopio marca Olympus, modelo SZX 10, equipado con una cámara digital para obtener información acerca de la morfología de las partículas de quitosano. Las partículas obtenidas fueron observadas mediante el estereomicroscopio y se realizaron



mediciones mediante el software Image Pro-plus V. 4.5, que se encuentra acoplado en el mismo equipo, considerando el diámetro de Feret promedio en una muestra de 100 partículas, y obteniéndose un tamaño promedio de 300  $\mu\text{m}$ , con una desviación estándar de  $\pm 10.514 \mu\text{m}$ .

## MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO LÁSER

La distribución de las partículas en la matriz y su morfología fue estudiada mediante un Microscopio Confocal-Multifotónico LSM 710 NLO (Carl Zeiss). Las imágenes fueron obtenidas en un intervalo de longitud de onda entre los 400-800 nm.

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La superficie de fractura del PLA y los materiales compuestos fue observada en Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL, modelo 6300, por ser materiales no conductores fueron recubiertos con oro empleando un voltaje de aceleración de 15 kV.

## FABRICACIÓN DEL MATERIAL COMPUESTO

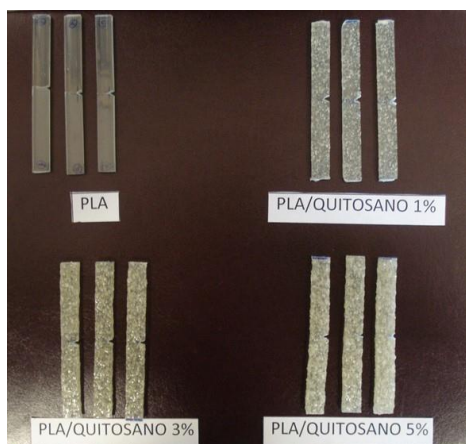
Se fabricó un material compuesto de matriz polimérica, para lo cual se mezclaron mecánicamente los diferentes contenidos de partículas de quitosano (1, 3 y 6% en peso), con los pellets de ácido poliláctico comercial (PLA 2002 D, PROMAPLAST®) que se muestran en las figuras 17 a) y b) respectivamente, cuyas propiedades se especifican en el anexo B.



Figura 17.- a) Ácido Poliláctico comercial y b) aspecto de los pellets

Posteriormente la mezcla fue procesada por medio de una extrusora monohusillo Marca Beutel Spacher® con cilindro de 19 mm, relación L/D-24:1. La temperatura de extrusión empleada se basa en las propiedades mecánicas obtenidas a los perfiles obtenidos a diferentes temperaturas, mismos que se detallan en el Anexo A, temperatura y velocidad empleadas durante el proceso se detallan en la Tabla IV, una vez que ocurre dicho proceso se obtiene un perfil que permite fabricar probetas para ensayos mecánicos de acuerdo a las normas ASTM, como se ilustra en la figura 18.

**Tabla IV.- Temperaturas en las diferentes zonas de la extrusora**



ZONA	TEMPERATURA
Alimentación	150°C
Compresión	150°C
Dosificación	150°C
Velocidad de husillo	20 r.p.m

*Figura 18.- Materiales compuestos obtenidos mediante extrusión.*

## EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS

Los materiales compuestos fueron sometidos a diversas pruebas mecánicas basadas en las normas ASTM para materiales compuestos con matriz polimérica, (se realizaron 10 ensayos de cada prueba para tener datos estadísticos), como a continuación se detalla:

### ENSAYO DE FLEXIÓN Y TENSIÓN.-

Se realizaron los ensayos utilizando una máquina universal (United, modelo: SSTM-1), se fabricaron probetas del perfil obtenido por extrusión del biopolímero según la Norma ASTM D-790 y ASTM D-638, respectivamente. Se utilizó el aditamento para ensayos de flexión en 3 puntos y una distancia entre apoyos de 72 milímetros. Se empleó una celda de 10 kN, una longitud entre las mordazas de 2 centímetros (para el ensayo de tensión) y una velocidad de ensayo de 5 mm/min, en ambos casos. Durante el ensayo todos los datos fueron registrados mediante un software específico (Test-Man).

## ENSAYO DE IMPACTO

Se utilizó un péndulo de impacto Izod de marca Tinius Olsen, y para lo cual se fabricarán probetas del perfil obtenido por extrusión del biopolímero según la Norma ASTM D-256, y para lo cual se utilizará la cortadora para hacer la muesca de acuerdo a la norma, los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Todos los datos fueron registrados en el equipo.

## EVALUACION IN VITRO DE LA DEGRADABILIDAD

El comportamiento ante la degradación de los materiales (PLA, quitosano y compuestos) *in vitro*, se evaluará con la finalidad de predecir la bioactividad de la superficie. Tres muestras de cada material con forma de barra rectangular fueron tomadas, con las siguientes dimensiones: ancho 9 mm x largo 10 mm y espesor de 4 mm. Las muestras fueron inicialmente pesadas y posteriormente colocadas en viales de 10 ml, los cuales contenían una solución Buffer de Fosfatos (PBS), bajo el número de producto (P3813, Sigma-Aldrich, U.S.A) con un pH  $7.4 \pm 0.1$  a  $37^{\circ}\text{C}$  en una incubadora por periodos determinados de tiempo (1- 28 días). El pH fue determinado usando un pH metro calibrado, marca Radiometer Analytical SAS, modelo PH 220), una vez estabilizado el valor fue registrado. Se reporta un valor de pH promedio de las tres muestras. Cada muestra fue sacada de la solución, y posteriormente fue secada en un horno de vacío a  $30^{\circ}\text{C}$  por una semana. La degradación será determinada midiendo la variación del pH y la pérdida de peso. La pérdida de peso fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$w_{loss} (\%) = \frac{w_0 - w_1}{w_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde,  $w_0$  es el peso inicial de la muestra y  $w_1$  es el peso de la muestra después de ser sometida al proceso de degradación.

## BIOCOMPATIBILIDAD

La biocompatibilidad se puede definir como la aceptabilidad biológica y el estudio de la interacción de los biomateriales con los tejidos del organismo, dicha respuesta puede examinarse por medio de ensayos tales como: estudios de citotoxicidad, proliferación y adhesión celular que en este estudio se llevaron a cabo en colaboración con la ENCB, bajo la dirección de la Dra. Blanca Estela García Pérez, y con el apoyo de Gloria Michel Ortega Díaz.

## CULTIVO CELULAR

Los osteoblastos de la línea celular MG63 (ATTC CRL-1427) fueron cultivados en  $\alpha$ -Medio Mínimo Esencial (Thermo Scientific, E.U.), suplementado con 10% de suero fetal de bovino inactivado por calor

(FCS, Gibco) en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37° C. El medio se renovó cada tres días y cuando las células alcanzaron la confluencia se utilizó una solución de Tripsina- para separar las células confluentes de los frascos.

## **CULTIVO CELULAR SOBRE LOS MATERIALES**

El PLA y los materiales compuestos fueron esterilizados por inmersión en alcohol etílico al 70% durante 1 hora y posteriormente fueron expuestos a luz UV durante 15 minutos después de este proceso todo se realiza con esterilidad. Para todos los experimentos todos los materiales ya esterilizados fueron incubados en  $\alpha$ -MEM durante la noche y entonces fueron transferidas a placas de 96 pozos estériles. Las células MG63 fueron cultivadas en una densidad de  $5 \times 10^4$  células por cm<sup>3</sup> de material y se mantuvieron en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. El medio se cambió todos los días y la disposición del citoesqueleto, adherencia, viabilidad celular fue evaluada a los 1, 7, 14 y 21 días de cultivo.

## **TINCIÓN DE ACTINA**

Para evaluar la morfología de los osteoblastos sobre los materiales, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia a fin de analizar la distribución de filamentos de actina. Los osteoblastos humanos MG-63 se sembraron en materiales esterilizados a una densidad de  $5 \times 10^4$  células cm<sup>3</sup> por 1, 7, 14 y 21 días e incubados en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Después de cada periodo de tiempo fueron retirados y fijados con 4% de paraformaldehído durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se efectuaron 3 lavados con solución salina de fosfatos (PBS), posteriormente se realizó la tinción con faloidina-rodamina (50 ng/ $\mu$ L) por 20 minutos a temperatura ambiente, y realizando 5 lavados con PBS al terminar este periodo de tiempo para eliminar el exceso. El análisis de las muestras se realizó en el microscopio confocal. (LSM5 Pascal, Zeiss).

## **MORFOLOGÍA**

Los osteoblastos MG63 crecidos sobre PLA y los materiales compuestos por 1, 7, 14 y 21 días, fueron fijados con glutaraldehído al 2.5% y posteriormente se le colocó una solución acuosa de tetraóxido de osmio al 1%. Posteriormente, los materiales con las células fueron lavados tres veces con PBS y luego se realizó una deshidratación con diferentes concentraciones de etanol (30-100%) y secado a punto crítico con CO<sub>2</sub>, para finalmente ser recubiertas con oro y poder observarlas en MEB.

## **VIABILIDAD CELULAR**

Para evaluar la viabilidad celular de los osteoblastos crecidos sobre la superficie del PLA y los materiales compuestos, se realizó un método colorimétrico empleando el reactivo (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5 difeniltetrazólico). Para ello los osteoblastos fueron sembrados a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/material e incubados en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas, transcurrido este tiempo los materiales fueron transferidas a una nueva placa estéril, para permitir el crecimiento de las células que se adhirieron a la superficie de los materiales. Transcurridos 1, 7, 14 y 21 días, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por  $100 \mu\text{L}$  de  $100 \text{ mg/mL}$  de una solución de MTT, permitiendo que ocurriera la reacción en un periodo de tiempo de 3 horas  $37^\circ\text{C}$ , tiempo después del cual se añadieron  $100 \mu\text{L}$  por pozo de una solución de dimetil sulfóxido (DMSO), para disolver el precipitado y se mantuvo en agitación durante 15 min. Posteriormente se tomó una lectura de absorbancia empleando un lector de placas ELISA (Thermo Fisher Scientific model Multiskan GO).

La viabilidad de los osteoblastos sobre el PLA y los materiales compuestos fué confirmada mediante Microscopía Confocal. Para ello los osteoblastos fueron sembrados a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/material e incubados en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  y siguiendo una cinética de crecimiento de 1, 7, 14 y 21 días. Después de cada periodo de tiempo las células adheridas sobre los materiales fueron teñidas con una mezcla de colorantes de ácido nucleico Syto9 ( $5 \mu\text{mol/L}$ ) y Yoduro de Propidio (PI; 30 micromoles/L) y analizadas mediante Microscopía Confocal.

## **TINCIÓN CON ALIZARINA RED**

Las células crecidas sobre el PLA y los materiales compuestos fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, una vez transcurrido este tiempo se retiran y lavan 3 veces con PBS y se agregaron  $200 \mu\text{L}$  del reactivo ARS (alizarina red) a cada muestra, y se incubo a temperatura ambiente durante 20 minutos en agitación suave, posteriormente se retiró y lavó con PBS 5 veces. Finalmente, la superficie de los materiales fue observada con un Microscopio Invertido.

## Capítulo III

# DISCUSIÓN Y RESULTADOS

En este capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos de la síntesis de quitosano, y materiales compuestos así como su caracterización, con el fin de identificar los diferentes materiales compuestos, se empleó la siguiente nomenclatura:

Tabla V.- Nomenclatura empleada para los diferentes materiales fabricados.

Muestra	Composición [%]	
	PLA	Chitosan
PLA	100	0
PLA/Q 1	99	1
PLA/Q 3	97	3
PLA/Q 5	95	5

### CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO Y PLA

Dependiendo de la fuente de extracción del quitosano pueden existir diferencias en su cristalinidad, intensidad de grupos funcionales, etc., por ello en esta sección se muestran los resultados de la caracterización del quitosano obtenido experimentalmente.

### DIFRACCIÓN DE RAYOS X QUITINA, QUITOSANO

En el caso de la quitina proveniente del camarón blanco, la forma cristalina en que se encuentra es la  $\alpha$ -quitina, la cual muestra en su patrón de difracción cinco reflexiones cristalinas a 10.6, 15.6, 21, 27, y 34° (JCPDS No.35-1974). El quitosano en estado sólido también posee regiones cristalinas y en su patrón de difracción muestra dos reflexiones  $2\theta = 10.23^\circ$  y  $20.15^\circ$  (JCPDS No.39-1894), lo cual es consistente con lo reportado en la literatura [19, 20, 24]. Ambos patrones se muestran en la figura 19.

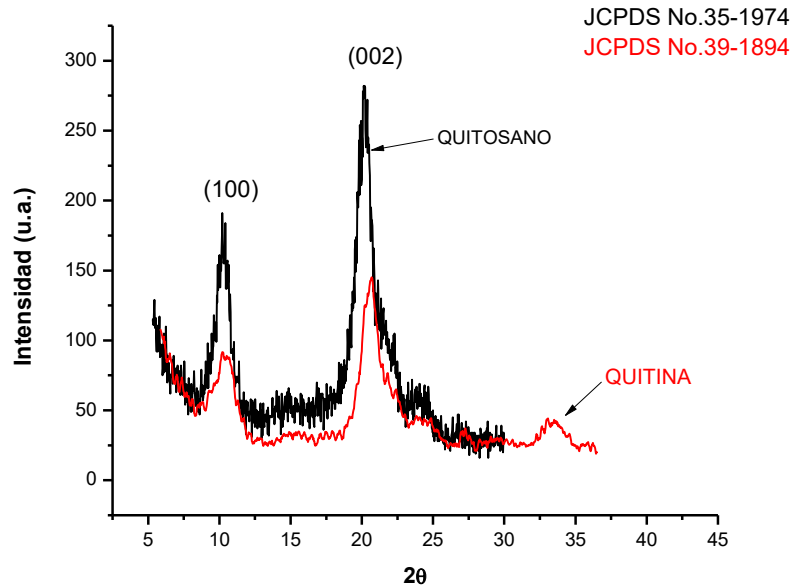


Figura 19.- Patrón de difracción del quitosano.

## ÁCIDO POLILÁCTICO

En la figura 20, se muestra el patrón de difracción del ácido poliláctico, el cual posee los picos característicos de este material en  $2\theta = 17.32^\circ$  y  $19.92^\circ$  que indica su cristalinidad y concuerda con lo reportado por otros autores [33,34].

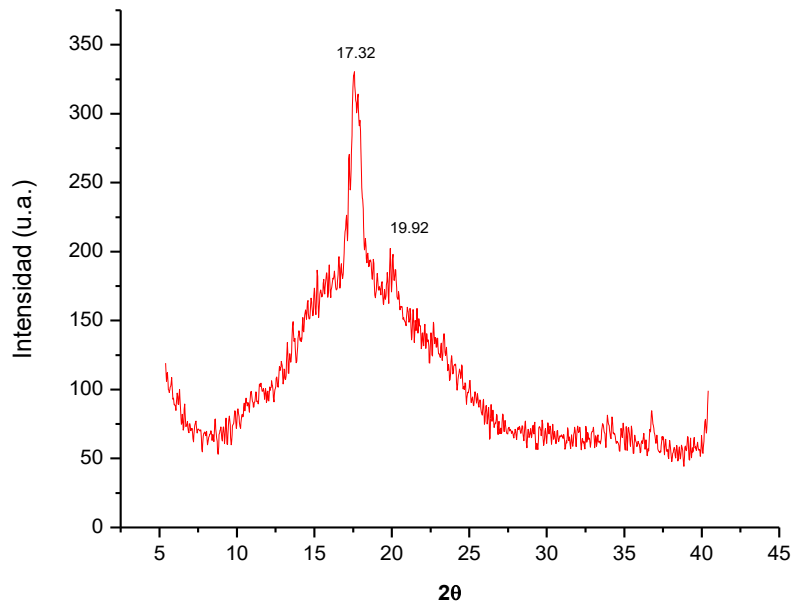


Figura 20.- Patrón de difracción del PLA

## ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

### QUITINA, QUITOSANO

En la figura 21 se muestran las curvas obtenidas para quitina y quitosano, las cuales muestran un comportamiento similar, para ambos materiales el primer evento térmico es la pérdida de humedad del material y es  $\sim 8\%$  en peso, entre  $T_{\text{ambiente}} - 200^{\circ}\text{C}$ ; para la quitina y para el caso del quitosano ocurre entre  $T_{\text{ambiente}} - 87^{\circ}\text{C}$  y representa una pérdida de  $\sim 5\%$  en peso para el quitosano. El segundo evento se presenta entre los  $200$  y  $389^{\circ}\text{C}$  con una pérdida de  $\sim 46\%$  en peso, y para el quitosano comienza a los  $251$  y termina a los  $356^{\circ}\text{C}$ , con una pérdida de peso de aproximadamente  $55\%$ , dichos eventos se relacionan con la despolimerización del material (ruptura de los anillos sacáridos), descomponiéndose en productos volátiles de bajo peso molecular y carbono, en ambos casos. Por último el tercer evento con un pérdida de  $\sim 5\%$  en peso, es la pirolisis por la descomposición de los grupos aminos de los  $390^{\circ}\text{C}$  para la quitina y de  $356^{\circ}\text{C}$  en adelante para el quitosano, como se observa en la figura 36 y lo cual es consistente con la literatura [19, 20, 23, 24].

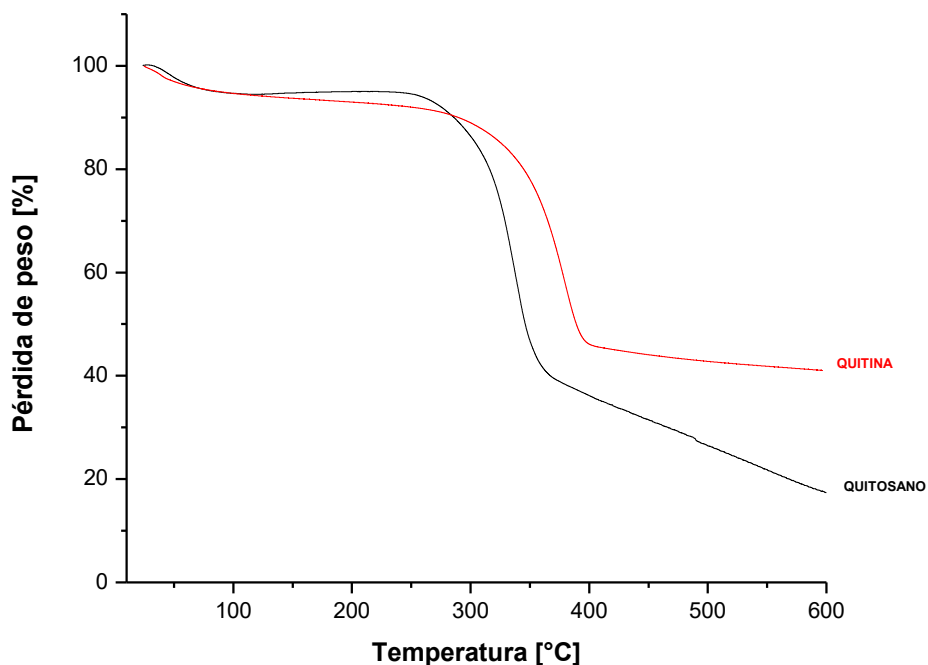


Figura 21.- Termograma obtenido para el Quitosano.



## ÁCIDO POLILÁCTICO

El análisis Termogravimétrico se llevó a cabo en los materiales de partida (quitosano y PLA), mismos que se muestra en la figura 22, esto con el fin de determinar si la temperatura de procesamiento durante la fabricación del material compuesto no compromete la integridad fisicoquímica del material. Para el ácido poliláctico comercial, posee tres diferentes zonas, en la primera de  $T_{amb}$  a  $325^{\circ}C$ , hay una pérdida mínima de peso del material que corresponde a la eliminación de humedad, la segunda zona entre  $325$  y  $380^{\circ}C$  presenta una gran pérdida de masa de  $\sim 95\%$  en peso y corresponde a la degradación térmica por el rompimiento del entrecruzamiento de los enlaces, por arriba de  $380^{\circ}C$  se presenta la completa descomposición térmica del polímero, dichos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores [33,34].

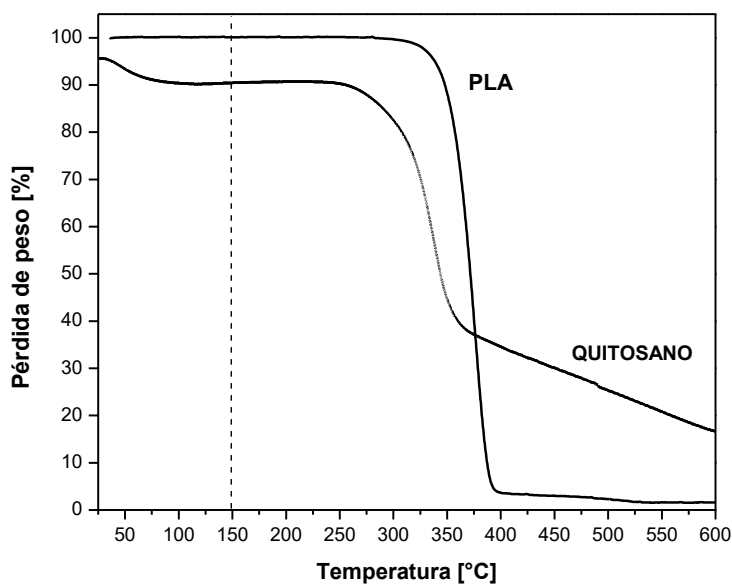


Figura 22.- TGA del ácido poliláctico

## ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

El espectro IR del quitosano se observa en la figura 23, la banda en  $3258\text{ cm}^{-1}$  se asocia con estiramientos de los enlaces N-H y O-H que se traslapan, las picos presentes entre  $2926$  y  $285\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a la tensión del grupo funcional C-H, las bandas entre  $1626$  y  $1584\text{ cm}^{-1}$  se asocian al grupo amida (I y II) respectivamente, la banda en la zona de los  $1380\text{ cm}^{-1}$  y  $1008\text{ cm}^{-1}$  corresponden a estiramientos de los enlaces COOH y C-O, una pequeña banda a los  $876\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones propias de la estructura de sacárido del quitosano [33,34].

La quitina y el quitosano son poliglucosaminas que son distinguidas únicamente por el grado de la acetilación de los grupos amino de aquí la importancia de calcular a partir del espectro infrarrojo del quitosano, el grado de N- acetilación ya que muchas de sus aplicaciones dependen de este parámetro. Existen diversas formas de calcularlo pero uno de los más prácticos y precisos consiste en una correlación de las bandas de absorción:

$$\text{Grado de N - Acetilación (\%)} = 31.92 \left( \frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 12 \quad (2)$$

Donde *A subíndice* es la banda de referencia de los grupos metilo, y el porcentaje de desacetilación se calcula de acuerdo con:

$$\text{Grado de DA (\%)} = 100 - \text{grado de N - acetilación} \quad (3)$$

Los datos arrojados están en Transmitancia, por lo que para realizar el cálculo fue necesario convertirlos Absorbancia mediante la siguiente ecuación:

$$A = (2 - \text{Log}(\%T)) \quad (4)$$

Considerando los valores de las bandas requeridos en la ecuación (2), los valores en Absorbancia de las bandas 1320 y 1440 son:

$$\begin{aligned} \%T_{1440} &= 85.75245 \\ \%T_{1320} &= 85.74877 \end{aligned}$$

Aplicando la ecuación 3, los valores son:

$$A = (2 - \text{Log}(85.75)) = 0.06675$$

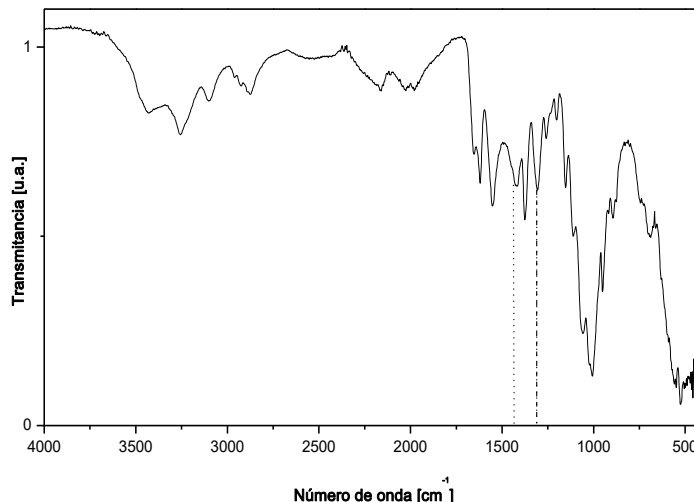
$$A = (2 - \text{Log}(85.74)) = 0.06677$$

Y aplicando la ecuación 1 tenemos:

$$\text{Grado de N - acetilación (\%)} = 31.92 \frac{0.06677}{0.06675} - 12.2 = 18.0456$$

El porcentaje de desacetilación, usando la ecuación 3:

$$\text{Grado de DA (\%)} = 100 - 19.711 = 81.95\%$$

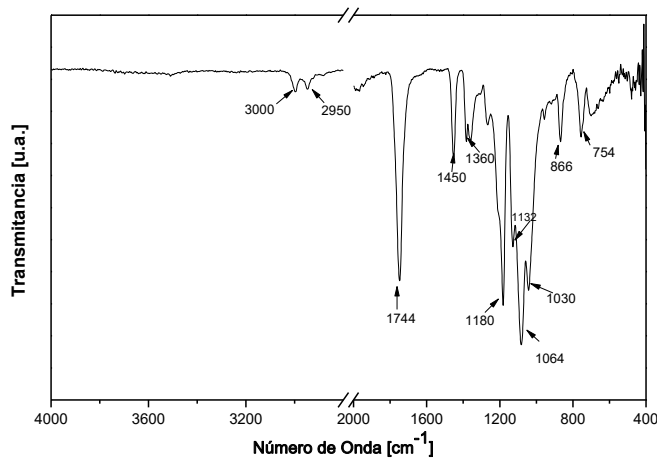


*Figura 23.- Espectro Infrarrojo del quitosano.*

El grado de desacetilación obtenido, es bueno debido a que está directamente ligado a la adhesión celular [40], aunque también varía dependiendo el tipo de célula.

### Ácido poliláctico

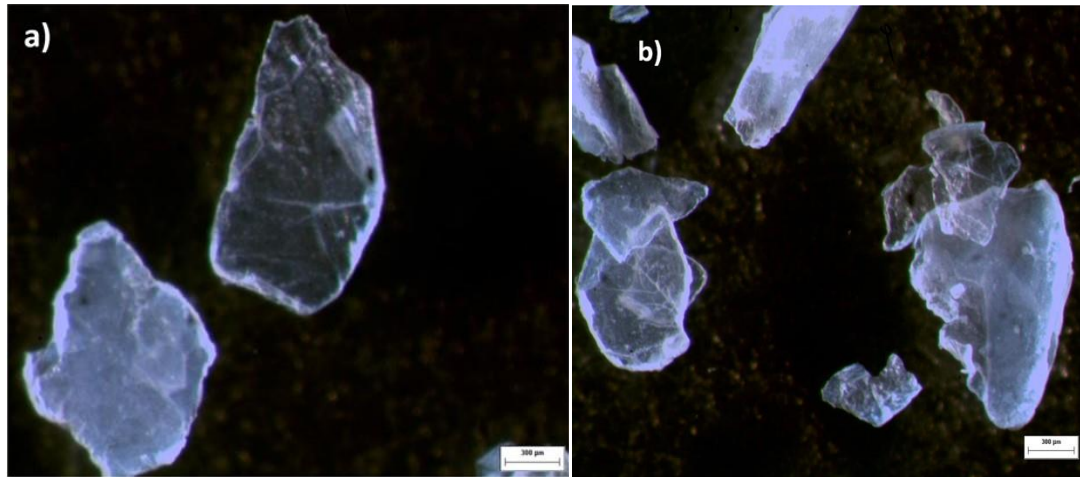
La figura 24 muestra el espectro IR del ácido poliláctico en el cual se distinguen los siguientes picos importantes que corresponden a la tensión del enlace carbonilo C=O en  $1744\text{ cm}^{-1}$ , tensión asimétrica en  $1064\text{ cm}^{-1}$  y tensión simétrica en  $1180\text{ cm}^{-1}$  del enlace C-O-C, deformación – flexión del enlace C-H en el grupo CH<sub>3</sub> en  $1360\text{ cm}^{-1}$ , tensión de los grupos CH y CH<sub>3</sub> en  $2950\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ , deformación del enlace C-O en  $1132\text{ cm}^{-1}$  y por último enlace C-CH<sub>3</sub> en  $1030\text{ cm}^{-1}$ . Dichos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores [30, 31, 35].



*Figura 24.- Espectro IR del ácido poliláctico*

## MICROSCOPIA ÓPTICA

Los resultados de las observaciones mediante microscopía óptica se aprecian en las figuras 25 a) y b), en las cuales se hace evidente que las partículas son de forma irregular y diversos tamaños tras la realización del tratamiento químico y molienda manual, su aspecto es casi transparente y no se observa porosidad en la superficie.



*Figura 25.- Partículas de quitosano a) 20X y b) 30X*

## CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES COMPUESTOS

### DISTRIBUCIÓN DEL QUITOSANO EN LA MATRIZ DE PLA

La distribución de las partículas de quitosano en la matriz de PLA fue evaluada mediante Microscopía Confocal (Figura 26). Las imágenes muestran que las partículas para los compuestos con 1 y 3% en peso se encuentran bien distribuidas en la matriz y presentan forma de hojuelas con una longitud mayor a 500  $\mu\text{m}$ . En el caso del compuesto con 5% en peso, se presentan aglomerados.

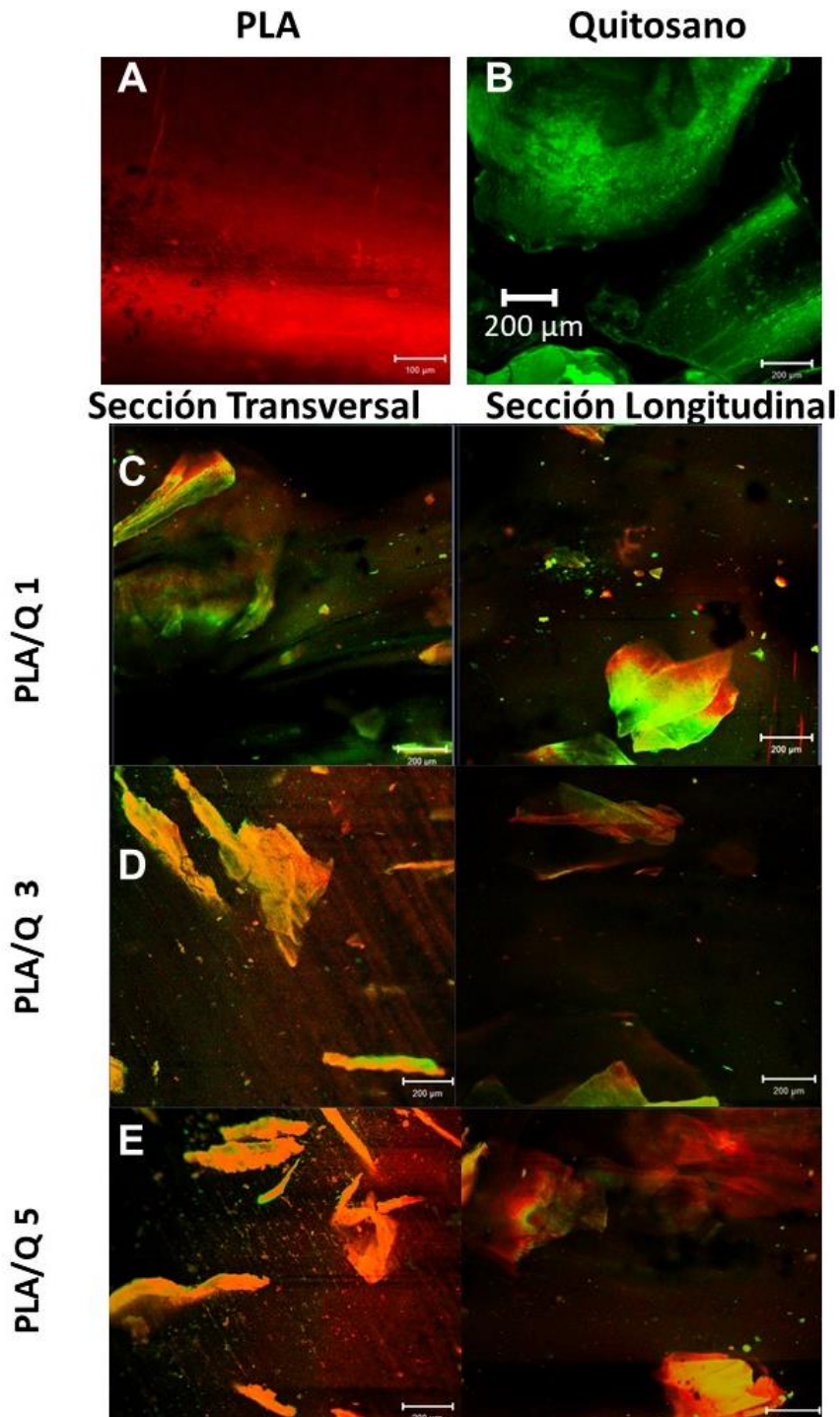


Figura 26.-Microscopia Confocal del a) PLA, b) quitosano y c) - e) materiales compuestos.

## COMPORTAMIENTO TÉRMICO

Las curvas obtenidas en el análisis termogravimétrico para los diferentes materiales (1, 3, y 5%) se muestran en la figura 27, y de su estudio se desprende que la adición de partículas de quitosano a la matriz de ácido poliláctico provoca una disminución en la temperatura de degradación, conforme se incrementa el porcentaje de quitosano, llegando a ser de hasta 48°C para el compuesto con 5%, lo cual se atribuye a que la temperatura de degradación del quitosano es menor que la de la matriz polimérica como se ha discutido en párrafos anteriores; algunos autores reportan que dicho comportamiento se debe a las agresivas condiciones de procesamiento que provocan una disminución del peso molecular del polímero y una consecuente reducción de la temperatura de degradación [26]. Se han reportado comportamientos similares con otros refuerzos hidrofílicos [41], como es el caso del quitosano, señalando que el decaimiento en la temperatura de degradación también se debe a que durante el procesamiento se producen pequeñas moléculas de agua que pueden inducir al rompimiento de cadenas poliméricas del PLA.

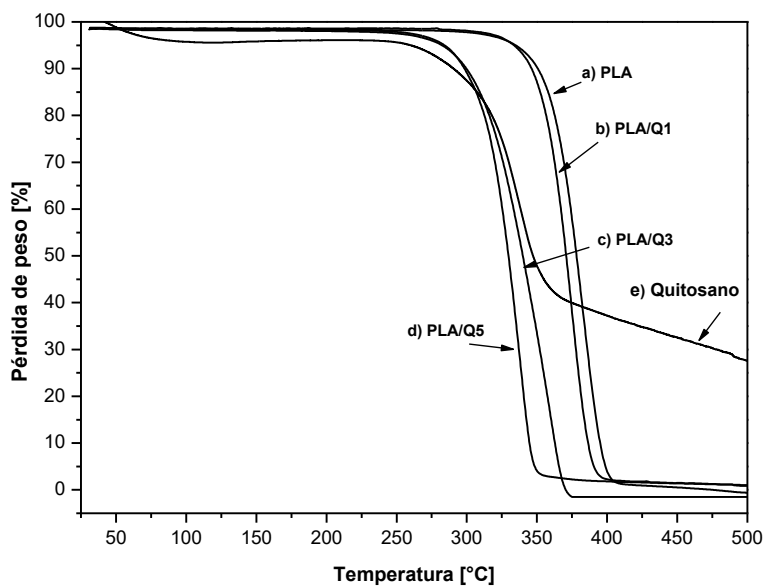


Figura 27.- Termogramas obtenidos para los diferentes compuestos.

En la figura 28 se muestran las curvas correspondientes a la primera derivada del peso, las cuales muestran para el caso del PLA un solo evento endotérmico, el cual como ha sido reportado se asocia al rompimiento de los enlaces éster y otros subproductos como acetaldehído, y monóxido de carbono, los cuales se liberan durante el proceso de calentamiento. Como se discutió arriba la adición de partículas de

quitosano no tiene un efecto significativo en el comportamiento térmico del polímero, sin embargo para el caso del 5% en peso de quitosano comienza a evidenciarse una disminución en la temperatura de degradación del material compuesto, lo cual se debe a que el quitosano al encontrarse en mayor proporción y ser un material higroscópico afecta la estabilidad térmica del PLA, lo cual se refleja en el primer evento endotérmico, que corresponde al fenómeno descrito anteriormente y un segundo pico que se asocia a la temperatura de descomposición del quitosano.

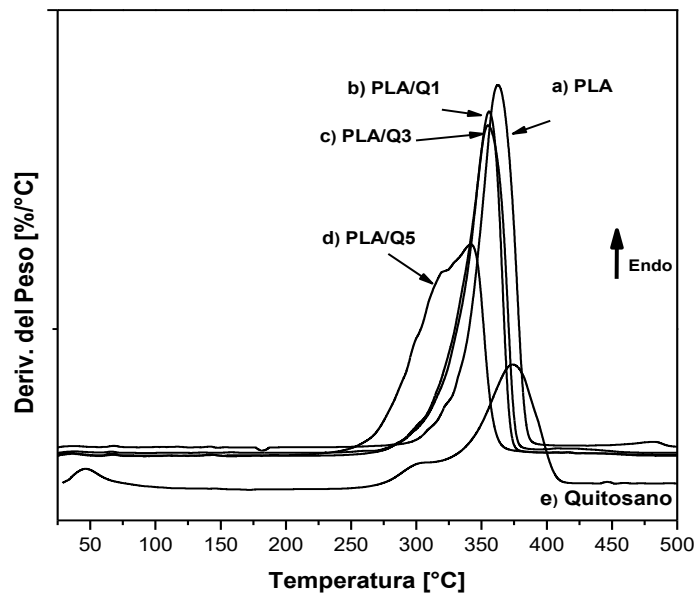


Figura 28.- Termogramas obtenidos para los diferentes compuestos.

## CRISTALINIDAD

En la figura 29 se muestran los patrones de difracción para los materiales compuestos, en donde se observa claramente que no existe cambio en la cristalinidad de los compuestos con respecto al polímero puro, conforme se incrementa el porcentaje de quitosano, esto se debe en parte a que la proporción de quitosano es pequeña, lo cual también dificulta la posible interacción por esta técnica. Otros autores han reportado un aumento en la cristalinidad de este tipo de materiales compuestos, ya sea con PLA [42] o bien con algún otro polímero alifático como PCL o PBS [26], sin embargo en estos casos el porcentaje de quitosano añadido supera el 10% en peso.

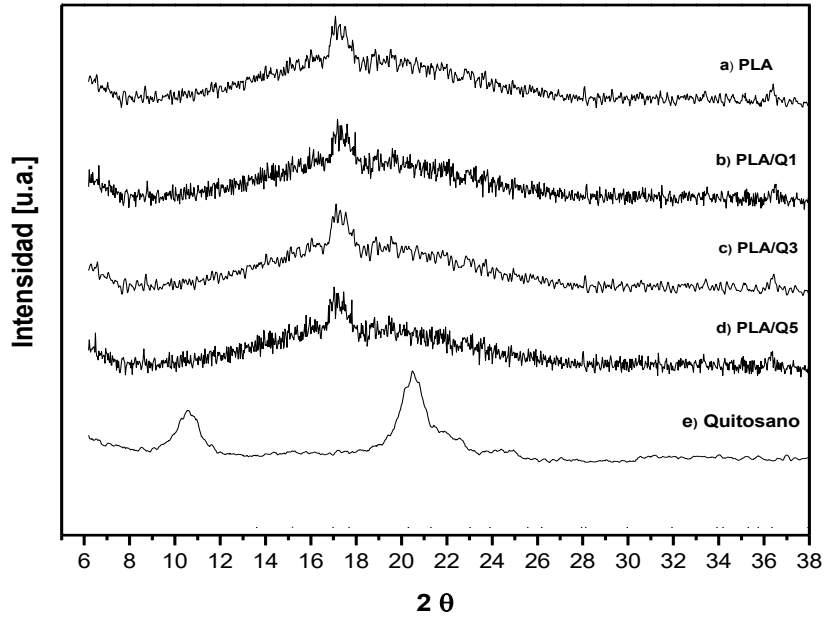


Figura 29.- Difractogramas obtenidos para los diferentes materiales

## ESPECTROFOTOMETRÍA FT-IR

Los espectros correspondientes a los materiales compuestos se muestran en la figura 30, los cuales presentan bandas fuertes a  $2996$  y  $2943\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C-H. Se ha reportado que el grupo carbonil de la cadena de ácido poliláctico, puede interactuar con el grupo hidroxil en la estructura del quitosano, creando enlaces éster y amida [43 y 44], sin embargo se trata de los mismos componentes (PLA y quitosano) pero mezclados por métodos que involucran disolución, lo cual favorece dicha interacción, sin embargo en este caso, comparados con el espectro del PLA puro no se produce ningún desplazamiento, ni existe la presencia de nuevas bandas que indiquen interacciones entre los componentes a nivel molecular, esto debido a que las partículas de quitosano son grandes ( $300\ \mu\text{m}$ ) y la cantidad de éstas en el material compuesto es mínima, y que el método de síntesis es un mezclado mecánico, que no involucra ninguna interacción química.



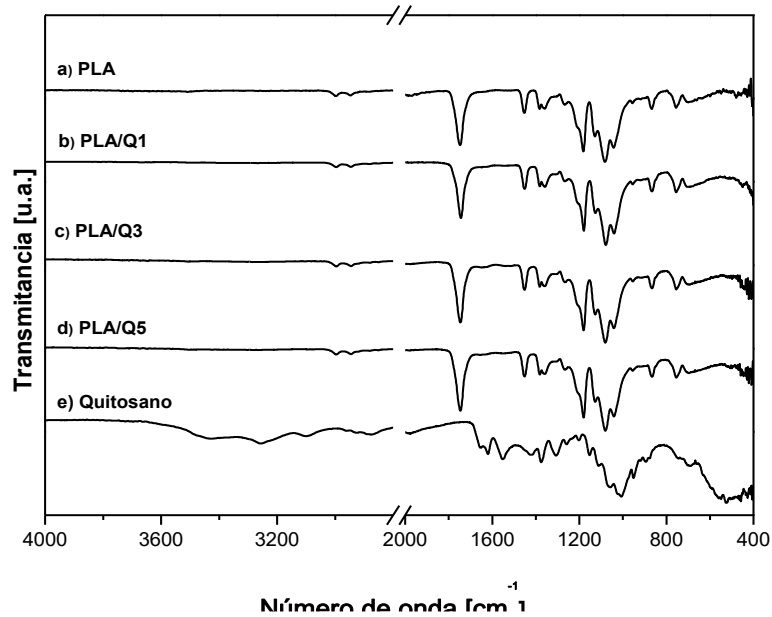


Figura 30.-Espectros infrarrojos para el PLA, quitosano y materiales compuestos.

## PRUEBAS MECÁNICAS

El uso de un determinado biomaterial obliga a evaluar su capacidad de soportar cargas mecánicas a las que estará sometido durante el cumplimiento de su función específica, algunos de los modos de sollicitación básicos son: fuerzas axiales (tracción), y flexión entre otros, por lo que en este estudio se evaluaron algunas propiedades mecánicas importantes, las cuales se presentan a continuación.

## ENSAYO DE TENSIÓN

Las propiedades aquí reportadas difieren con las obtenidas por otros investigadores, debido no solo a las diferencias del quitosano como son grado de desacetilación, origen, peso molecular, etc., sino también al proceso de fabricación, condiciones ambientales y velocidad del análisis. En la figura 31, se presenta una curva típica esfuerzo vs. deformación para el PLA, y materiales compuestos, los materiales ensayados presentaron una zona de deformación elástica, seguida por una zona de deformación plástica, luego de la cual sigue la fractura. La resistencia a la tensión del PLA puro, fue de 49.36 MPa, y el valor más alto fue para el material compuesto PLA/Q1 (56.34 MPa), para porcentajes mayores de quitosano se observa que la resistencia a la tensión disminuye al aumentar el contenido de partículas, por lo que no hay verificación del efecto reforzante del quitosano, y se le considera únicamente un relleno. Una de las

causas, son las pobres propiedades mecánicas que posee el quitosano y que han sido reportados en diversos estudios [45, 46], así mismo la baja adhesión partícula-matriz (que puede ser observada en las imágenes de MEB (figura 35), en las que se aprecia la formación de huecos en la interfase partícula-polímero, los cuales se comportan como un concentrador de esfuerzos y fomentan la fractura del material. Los esfuerzos que actúan sobre la matriz se transmiten a las partículas a través de la interfase, cuando la adhesión interfacial es débil, las propiedades mecánicas del material compuesto no mejoran. Sin embargo hay incremento en la ductilidad de los materiales compuestos con respecto al polímero puro. Un resumen de dichas propiedades se muestra en la Tabla V. Para obtener el módulo de Young ( $E$ ), se tomó la región elástico-lineal de la curva esfuerzo-deformación y se realizó un regresión lineal a fin de obtener la pendiente de dicha curva.

Para la resistencia a la tensión ( $\sigma_{m\acute{a}x}$ ) :

$$\sigma_{m\acute{a}x} = \frac{P_{m\acute{a}x}}{A_0}$$

Para el alargamiento a la rotura:

$$\varepsilon_f = \frac{L_f - L_0}{L_0} \times 100$$

donde:  $P_{m\acute{a}x}$ =Carga máxima [N]

$A_0$  = área inicial de la probeta

$L_0$  = longitud inicial de la probeta

$L_f$  = longitud final de la probeta

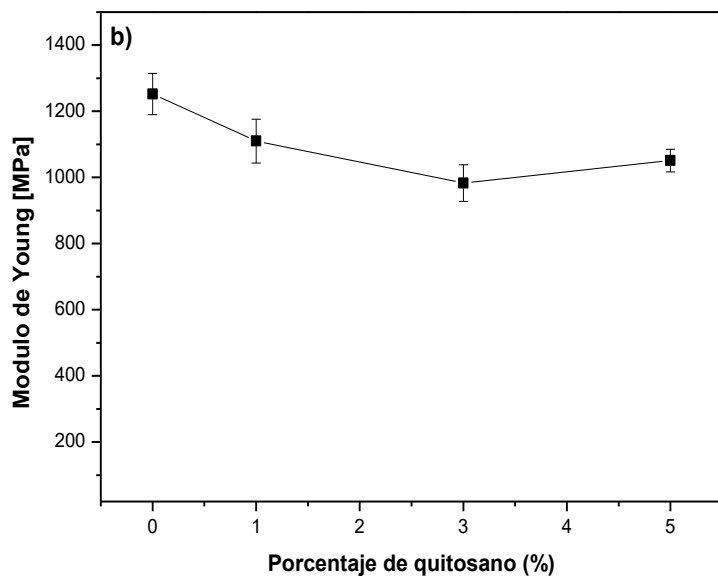
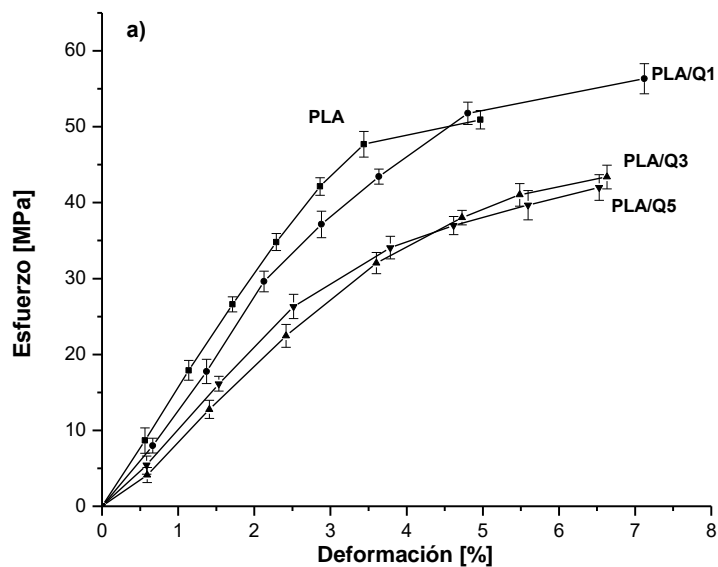


Figura 31.- a) Curvas esfuerzo-deflexión y b) Evolución del Módulo de Young para PLA y materiales compuestos

Tabla V.- Propiedades mecánicas obtenidas del ensayo de tensión.

MUESTRA	RESISTENCIA A LA TENSIÓN [MPa]	MÓDULO DE YOUNG [MPa]	ELONGACIÓN [%]
PLA	49.36±4.44	1252±62	4.97±0.76
PLA/Q 1	56.34 ±2.64	1110±66	7.12±0.63
PLA/Q 3	43.38±3.29	983±55	6.63±0.54
PLA/Q 5	42.19±2.55	1051±34	6.52±0.86

## FLEXIÓN EN TRES PUNTOS

Los ensayos de flexión descritos a continuación se realizaron para el PLA, y materiales compuestos PLA/quitosano (1, 3 y 5 % de quitosano), como se observa en la figura 32, sobre la probeta se aplica una fuerza (F) de forma perpendicular, hasta la fractura del material.

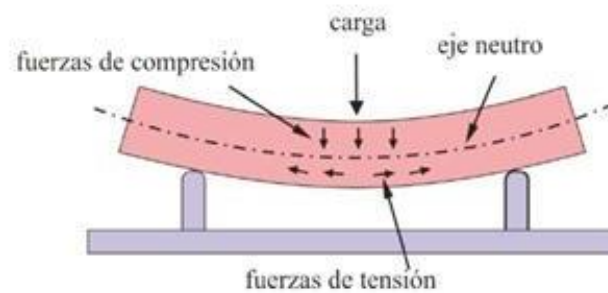


Figura 32.- Esquema de las fuerzas que actúan durante un ensayo de flexión

Las ecuaciones utilizadas para el cálculo del módulo de Young ( $E$ ) y la resistencia a la flexión ( $\sigma_f$ ) fueron las siguientes:

$$E = \frac{L^3 m}{4bd^3} \quad [\text{MPa}] \quad \text{-----} \quad (1)$$

donde:

$L$ = distancia entre apoyos inferiores [mm]

$m$ = pendiente de la parte lineal de la curva esfuerzo-deflexión

$b$ = ancho de la muestra [mm]

$d$ = espesor de la muestra [mm]

$P_{\text{máx}}$ =Carga máxima [N]      y :

$$\sigma_f = \frac{3 P_{\text{máx}} L}{2bd^2} \quad [\text{MPa}] \quad \text{-----} \quad (2)$$

En las figuras 33 a) y b), se muestran las curvas típicas esfuerzo vs. Deflexión, así como la evolución del Módulo de Young respectivamente para el ensayo de flexión en 3 puntos para el PLA y el material compuesto PLA/quitosano.

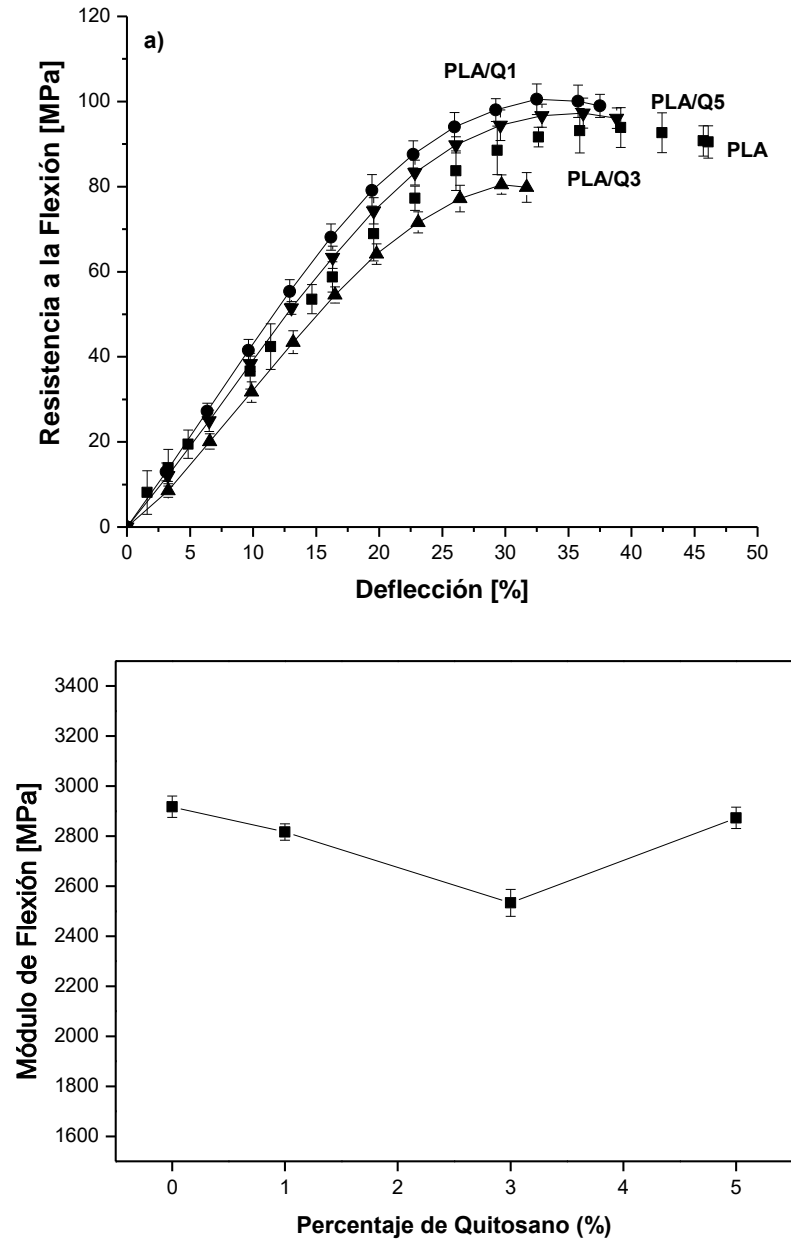


Figura 33.- a) Curvas esfuerzo-deflexión y b) Evolución del Módulo en Flexión para PLA y materiales compuestos.

La diferencia más notable entre este ensayo y el de tensión es que el material compuesto presenta mayor resistencia en flexión pero su elasticidad se ve mermada, lo cual es un indicio de que la dirección en que se aplican los esfuerzos, afecta su comportamiento mecánico, por lo que se concluye que el material es anisotrópico. Por otra parte como se discutió en párrafos anteriores los diversos defectos que presenta el material como la formación de aglomerados, el tamaño de partícula y una interfase débil partícula-matriz, afecta el comportamiento mecánico de los materiales compuestos.

**Tabla VI.- Propiedades mecánicas obtenidas del ensayo de flexión.**

MUESTRA	RESISTENCIA A LA FLEXIÓN [MPa]	MÓDULO DE FLEXIÓN [GPa]	DEFLECCIÓN [%]
PLA	93.33 ± 2.9	2.9 ± 0.5	51.17 ± 1.8
PLA/Q 1%	110.25 ± 3.5	2.82 ± 0.3	36.45 ± 1.4
PLA/Q 3%	79.63 ± 3.22	2.23 ± 0.4	35.024 ± 2.0
PLA/Q 5%	92.09 ± 2.2	2.87 ± 0.2	34.68 ± 3.0

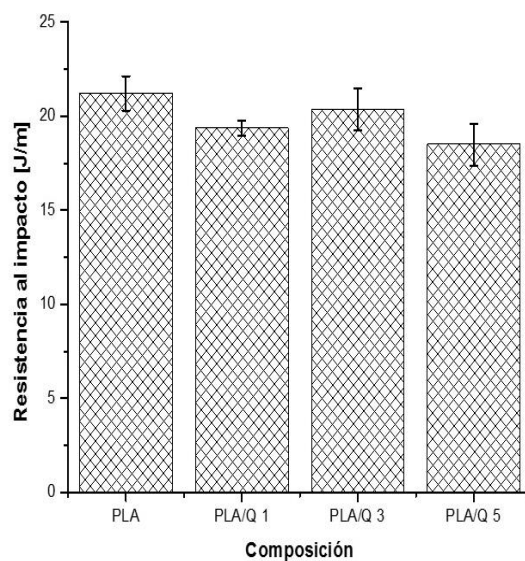
## RESISTENCIA AL IMPACTO

Para la Resistencia al impacto Izod los resultados muestran que la adición de quitosano no promueve un cambio significativo en dicha propiedad, el valor más bajo alcanzado fue para el material compuesto PLA/Q 5, con un 12% por debajo del valor obtenido para la matriz pura.

**Tenacidad al impacto:** El contenido de partículas disminuye la tenacidad del material, la baja adhesión interfacial partícula-polímero crean una interface débil como ha sido descrito anteriormente, los espacios vacíos entre las fases pueden observarse claramente en las imágenes de MEB (ver figura 35) de las superficies de fractura.

**Tabla V.- Resistencia al impacto del PLA y materiales compuestos**

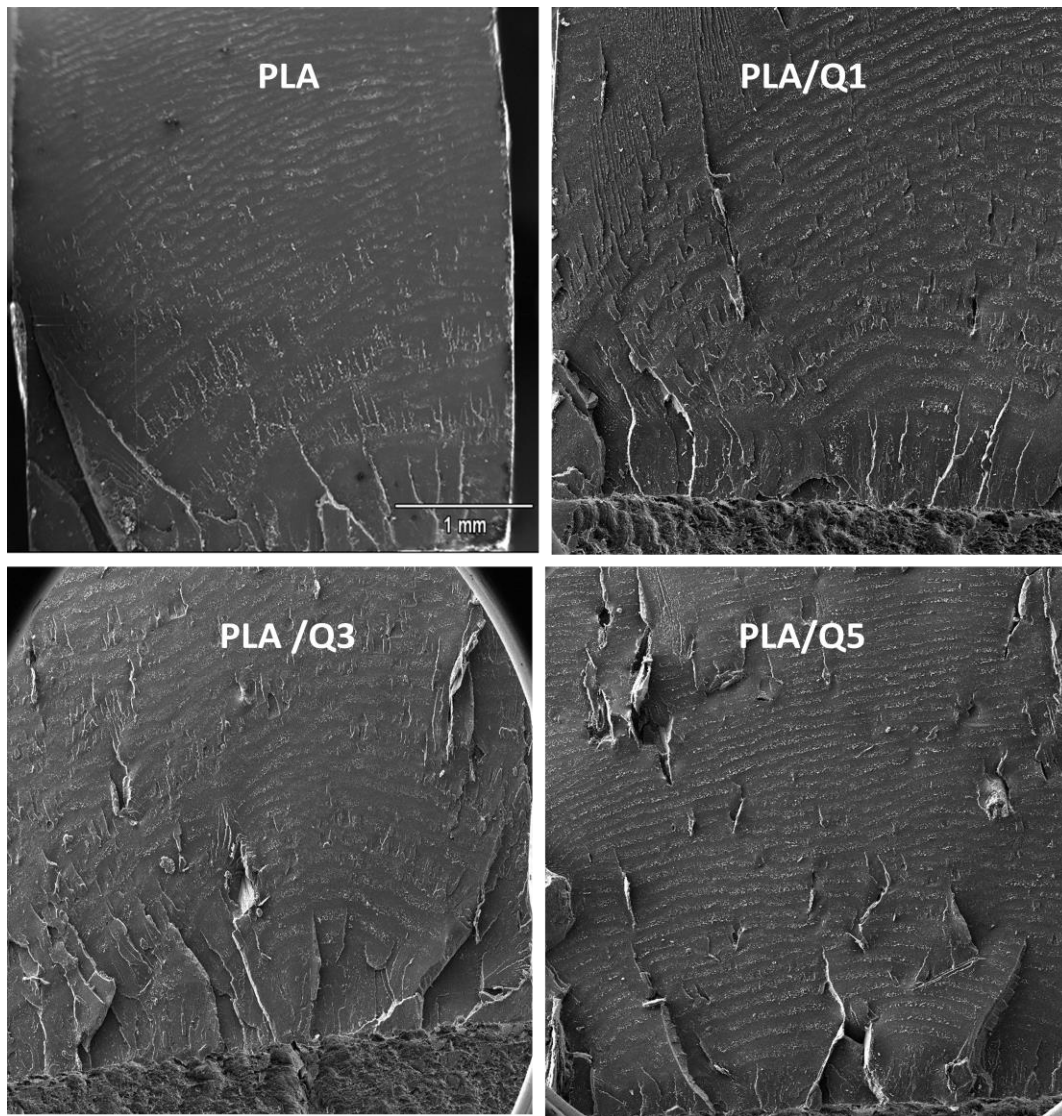
MUESTRA	RESISTENCIA AL IMPACTO [J/m]
PLA	21.21 ± 0.9
PLA/Q 1%	19.37 ± 0.4
PLA/Q 3%	20.34 ± 1.0
PLA/Q 5%	18.50 ± 1.1



*Figura 34.- Evolución del Módulo de Young.*

## SUPERFICIES DE FRACTURA

La morfología de la superficie de fractura del PLA y los materiales compuestos, fueron analizadas mediante imágenes obtenidas por MEB una vez realizada la prueba de impacto. En el caso del PLA se puede observar una región inicial adyacente a la punta del entalle llamada “mirror”, con un ancho en su punta central que corresponde a la zona de crecimiento lento de la grieta, una segunda zona denominada “mist” que presenta patrones de río. Posteriormente se identifica claramente el avance de la grieta en forma de ondas, siguiendo el patrón conocido como “mackerel” y que se caracteriza por estrechas líneas paralelas y que corresponden a un crecimiento rápido de la grieta [47, 48], el tipo de fractura es frágil.



*Figura 35.- Superficie de fractura del PLA y materiales compuestos observados a 25X en MEB.*

En general, un patrón de fractura típico que presentan los materiales compuestos no presentan la zona de “mirror” y en cambio sus superficies pueden observarse laminadas y exhibiendo un patrón makerel en su totalidad, lo cual indica una rápida propagación de la grieta, si bien es ligeramente afectado por la adición de las partículas causando pequeños desgarros, éstos no llegan a provocar que la grieta se detenga. Siendo estas características indicadores de una fractura frágil, típica de polímeros amorfos sometidos a ensayo de impacto y como se ha descrito en trabajos anteriores [48, 49].

## **DEGRADACIÓN *IN VITRO***

La velocidad de degradación es un criterio importante para aplicaciones biomédicas, ya que una degradación demasiado rápida puede originar una reacción inflamatoria aguda asociada a la acumulación de los productos de degradación, por lo que en este estudio la degradabilidad de los materiales se evaluó sumergiendo los materiales durante periodos establecidos de tiempo en una solución buffer de fosfato (PBS), midiendo la variación de pH y peso de las muestras. La figura 36 muestra la variación del pH en la solución en donde fueron inmersos.



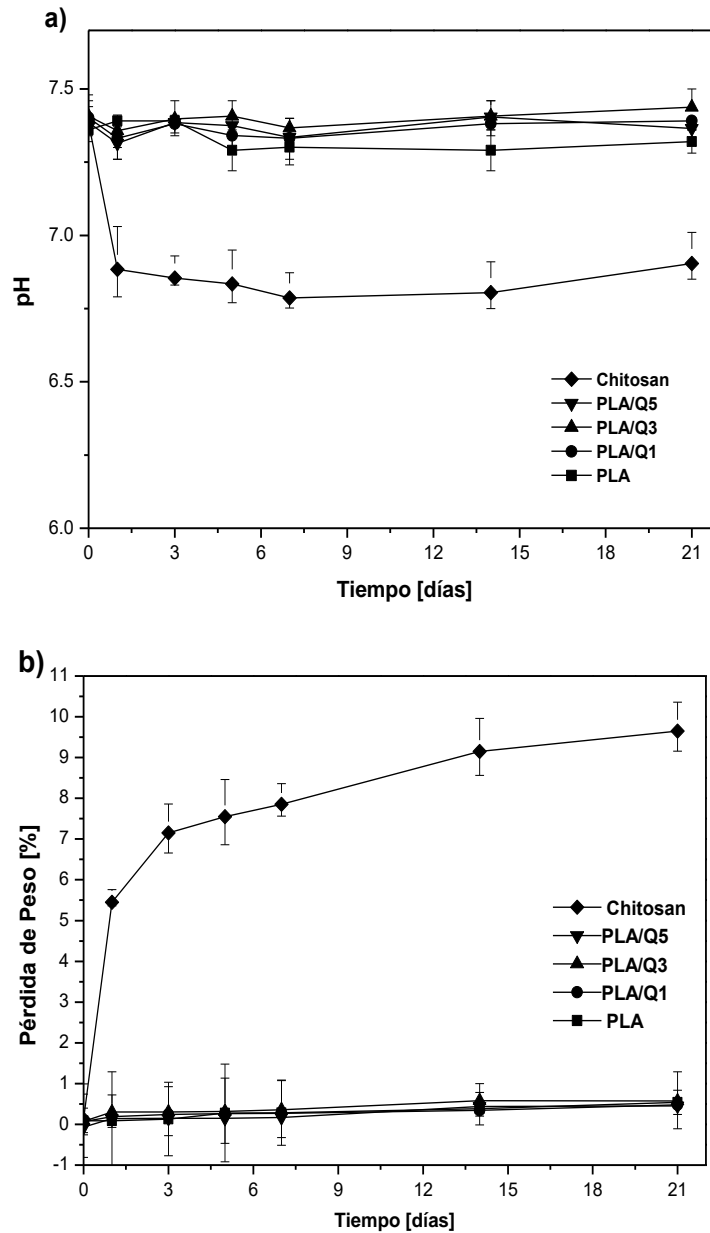


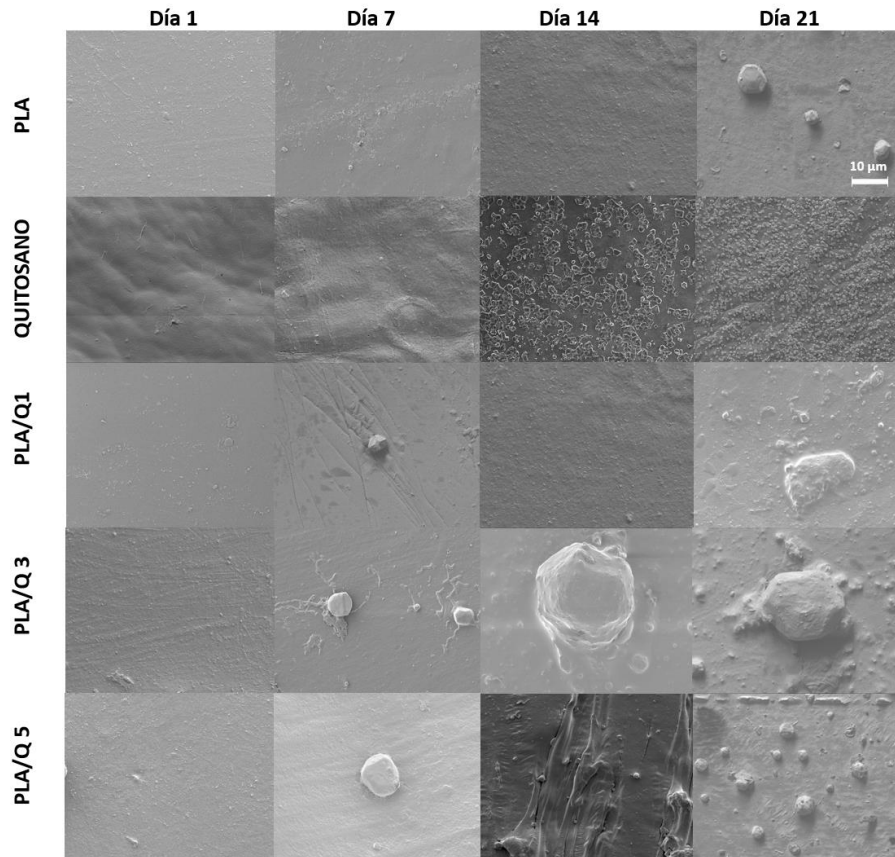
Figura 36.- Evaluación del pH de la solución PBS

Como se observa en dicha figura, el pH disminuye ligeramente para el PLA, y el material compuesto PLA/Q1 desde el primer día, posteriormente en el día 7 todos los materiales presentan el mismo pH (7.33), aunque después dicho valor se estabiliza. En el caso del quitosano, presenta un decaimiento de pH alcanzando un valor de 6.7, lo cual se atribuye a que se trata de un polímero lineal con propiedades catiónicas [24,]. El quitosano tiene una baja densidad de carga y aproximadamente 60% de los grupos  $\text{NH}^{3+}$  se encuentran desprotonados en medio básico o neutro, sin embargo existen interacciones electrostáticas entre los aniones presentes en el medio ( $\text{PO}^{4-}$ ) y los grupos amino del quitosano, los cuales

pueden provocar un repentino o gradual cambio de pH, de acuerdo con lo reportado por Bhumkar et al. [50] con quitosano y otras moléculas que contienen grupos fosfato. El quitosano al mantener una carga positiva, le confiere la capacidad de adherirse a materiales cargados negativamente como superficies celulares. En cuanto a la degradación del PLA, quitosano y materiales compuestos, la figura 35 b) revela que el PLA no muestra una significativa pérdida de peso, ya que al igual que los materiales compuestos exhiben una ligera pérdida < 0.5 %, después de 28 días. El carácter hidrofóbico del PLA lo hace poco susceptible a la degradación por hidrólisis o bien su cinética de degradación en los tiempos evaluados es lenta. La diferencia que se encontró entre el polímero puro y los compuestos se basa en que en el caso del PLA la entrada del líquido no puede separar las cadenas por estar covalentemente unidas, mientras que en los compuestos la entrada de líquido puede penetrar las cadenas separándolas debido a que las fuerzas que las mantienen unidas son de origen físico. Topográficamente los materiales compuestos no son lisos y pueden fácilmente provocar esta reacción. Por otra parte el quitosano, registra una pérdida de peso de ~ 10%, esto debido a su carácter hidrofílico, debido a la presencia de grupos amino e hidroxilo en la estructura del quitosano, que son lugares donde puede fácilmente situarse agua adicional [45], y dando inicio a un proceso de hinchamiento, el cual después de una rápida absorción llega a una etapa de reposo. El quitosano “in vivo”, se degrada principalmente debido a la susceptibilidad de ser hidrolizado enzimáticamente por la lisozima, una enzima proteolítica no específica presente en todos los tejidos del cuerpo humano.

## **BIOACTIVIDAD DE LAS SUPERFICIES EN PBS**

En la figura 37, se presentan las superficies del PLA, quitosano y materiales compuestos observadas mediante MEB, la evolución de la superficie de los materiales muestra que en PBS el PLA se mantuvo sin cambios hasta los 14 días, posteriormente a los 21 días comienza a presentar sobre su superficie precipitados de forma globular, por su parte el quitosano presenta precipitados dispersos sobre su superficie, esto debido a que el quitosano es un polímero lineal de propiedades catiónicas, que a un pH alrededor de 6.5 mantiene una carga positiva, la cual le confiere la capacidad de adherirse a materiales cargados negativamente como son los fosfatos, lo cual indica que la superficie del quitosano es bioactiva.



*Figura 37.- MEB a 500X de los materiales compuestos tras ser sometidos al proceso de degradación en PBS*

El análisis por MEB mostró interesantes cambios en la morfología de la superficie de los materiales compuestos durante el periodo de degradación en PBS en comparación con la superficie del PLA. Inicialmente todos presentan una superficie plana interrumpida únicamente por algunas líneas debidas al proceso de extrusión, sin embargo después de 7 días de inmersión en PBS comenzó a observarse la presencia de precipitados, que conforme se incrementa la cantidad de quitosano en el material y el número de días en inmersos en la solución de PBS se incrementa el número de ellos.

## IDENTIFICACIÓN

En las figuras 38 y 39, se encuentran los espectros infrarrojos de los materiales compuestos después de estar inmersos por diferentes periodos de tiempo en la solución de PBS. Los espectros obtenidos son idénticos, no se observa desplazamiento de ninguna banda, ni la formación de una nueva a pesar de que la Microscopia de barrido muestra claramente la presencia de precipitados, los cuales fueron

identificados como cloruro de sodio por medio del análisis EDS y que al ser transparente a la luz infrarroja no produce ninguna nueva banda en el espectro de la muestra.

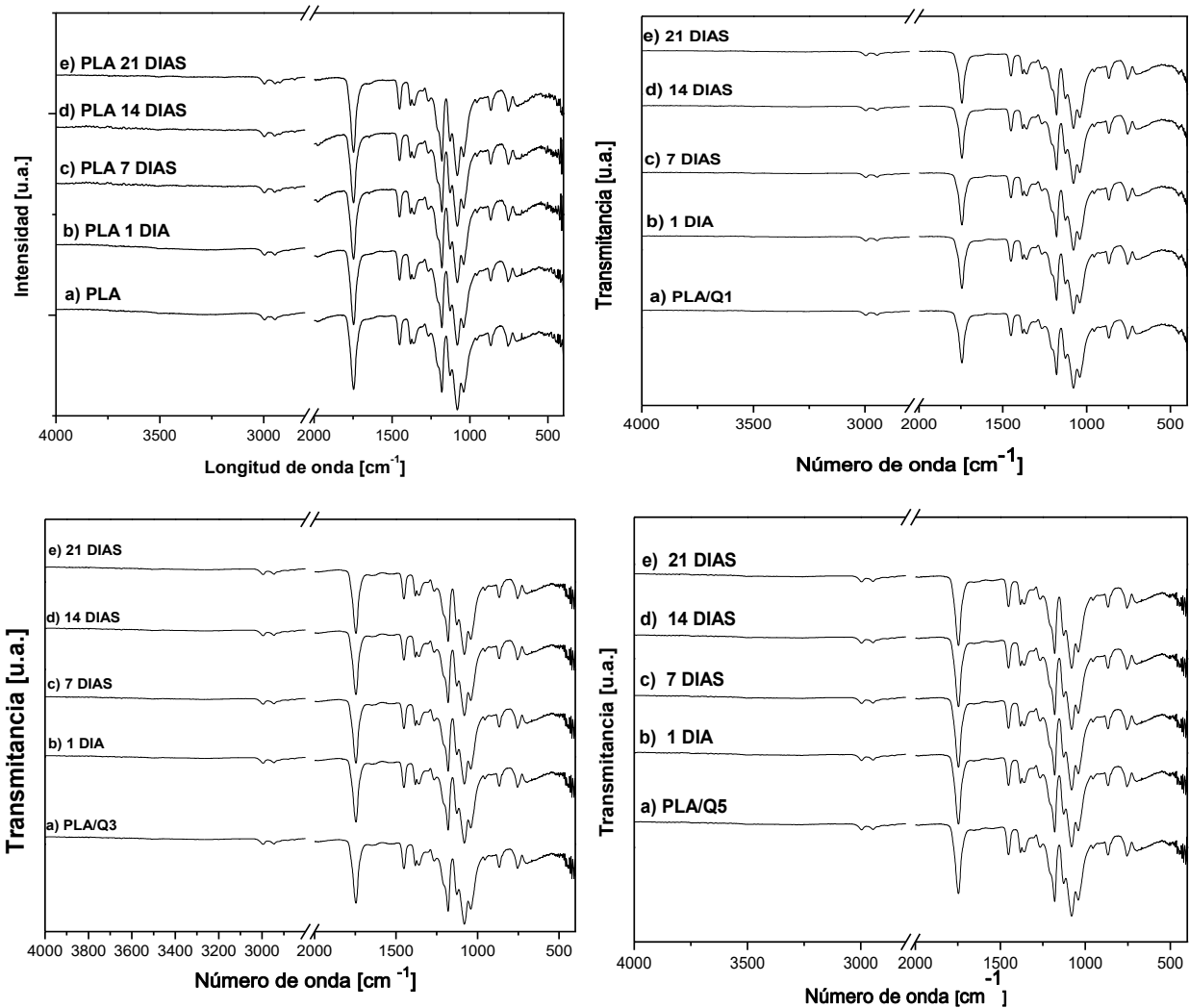


Figura 38.- FT-IR del PLA tras ser sometidos al proceso de degradación en PBS

De acuerdo al análisis por espectroscopía infrarroja, en donde se observan bandas en 450 y 560  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a la presencia de fosfatos y a las morfologías observadas por MEB, en donde se muestran precipitados, que corresponden a hidroxiapatita con cristales de halita embebidos.

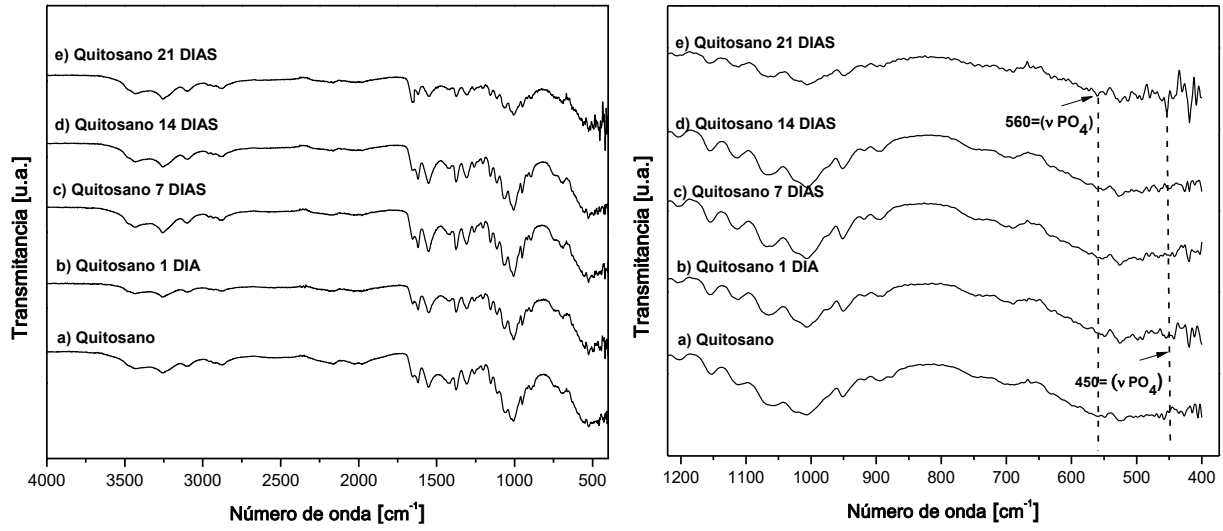


Figura 39.- FT-IR del quitosano tras ser sometidos al proceso de degradación en PBS

## BIOACTIVIDAD DE LAS SUPERFICIES

En las figuras 39 y 40, se encuentra la caracterización estructural por difracción de Rayos X para el PLA y los materiales compuestos, después de estar inmersos en la solución PBS. Para PLA y los materiales compuestos se identificó un pequeño pico en  $2\theta = 32$ , el cuál se debe a la presencia de NaCl en su forma halita, sin embargo debido a la pequeña cantidad de éstos precipitados no es posible observar todos los picos representativos de dicho compuesto.

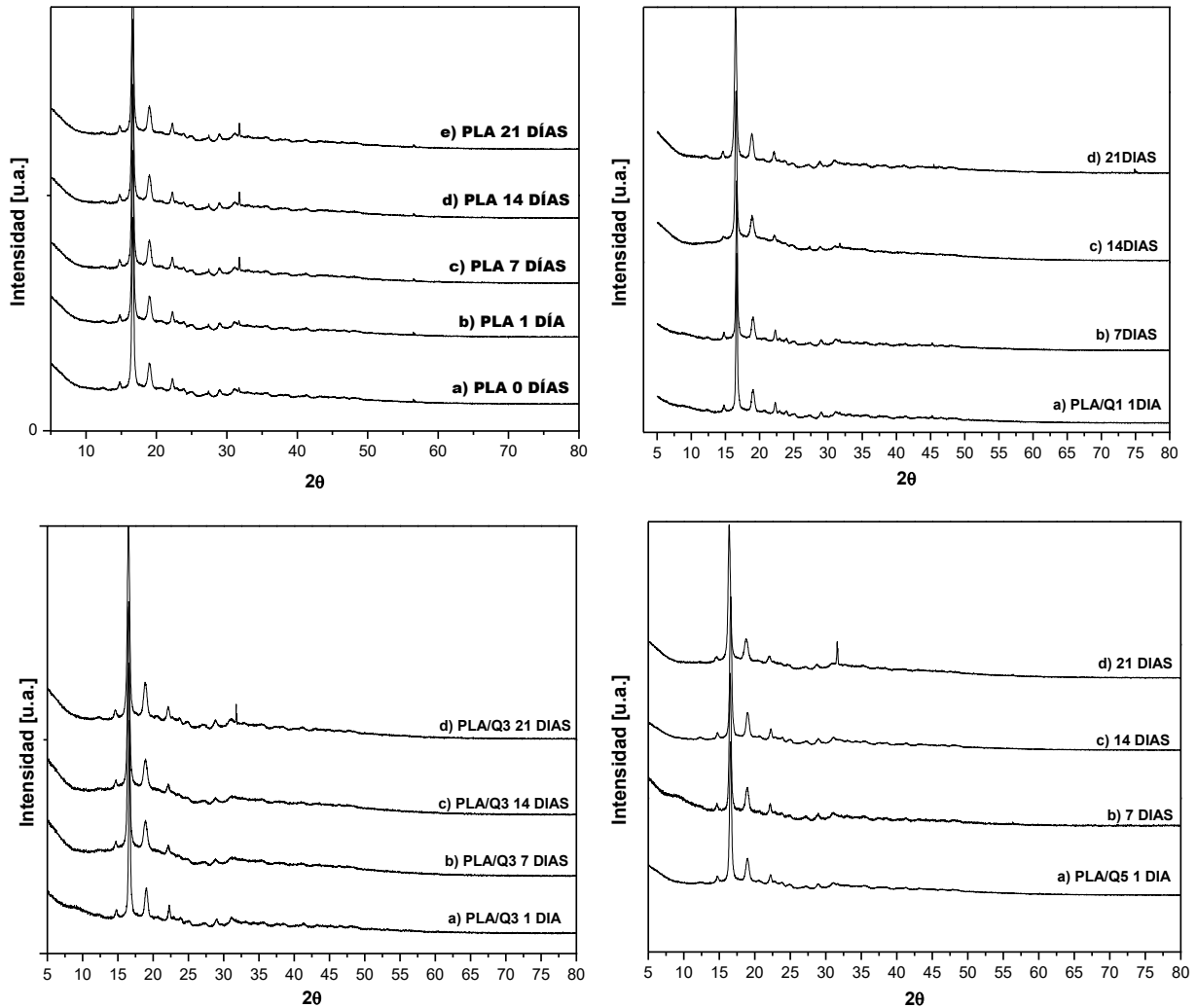


Figura 40.- Difractogramas del PLA y los materiales compuestos tras ser sometidos al proceso de degradación en PBS.

En el caso del quitosano, se encontraron picos, los cuales son atribuidos a la presencia de Hidroxiapatita JCPDS No.09-0432

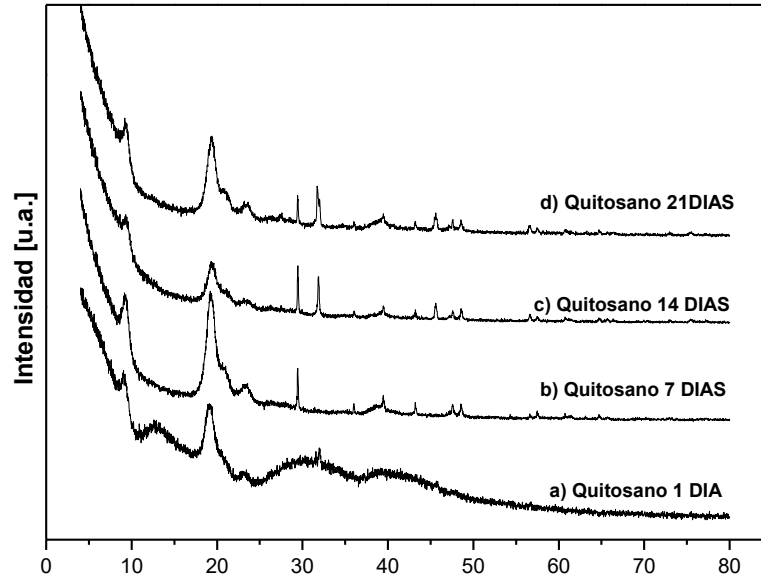


Figura 41.- Difractogramas del quitosano tras ser sometidos al proceso de degradación en PBS.

## ACTIVIDAD METABÓLICA Y VIABILIDAD DE LOS OSTEÓBLASTOS SOBRE PLA Y MATERIALES COMPUESTOS.

En esta sección se muestran los resultados de las pruebas biológicas realizadas en el PLA y materiales compuestos, cabe aclarar que las imágenes aquí mostradas son el resultado de la colaboración con la ENCB. Las unidades estructurales sacáridas del quitosano la N-acetil-glucosamina y la Glucosamina, están presentes en diferentes Glucoaminoglucanos, dichos compuestos son heteropolisacáridos lineales y aniónicos presentes en las matrices extracelulares de los tejidos humanos. El quitosano por lo tanto es un compuesto análogo a estos compuestos y eso le confiere algunas de sus propiedades biológicas [51, 52].

## ADHESION DE LOS OSTEÓBLASTOS MG-63 SOBRE LA SUPERFICIE DEL PLA Y LOS MATERIALES COMPUESTOS

La adhesión y distribución de los osteoblastos MG-63 sobre la superficie del PLA y los materiales compuestos a diferentes tiempos de incubación fue estudiada mediante Microscopía Confocal y MEB, respectivamente, las imágenes son presentadas en las figuras 42 y 43. La superficie del PLA muestra una buena distribución de células y poblaciones proliferativas desde el primer día, mismas que se incrementan con el tiempo. La superficie de los materiales compuestos muestra el mismo comportamiento, pero mucho más rápido que en el caso del PLA puro y es notable el incremento de células conforme se incrementa el porcentaje de partículas de quitosano.

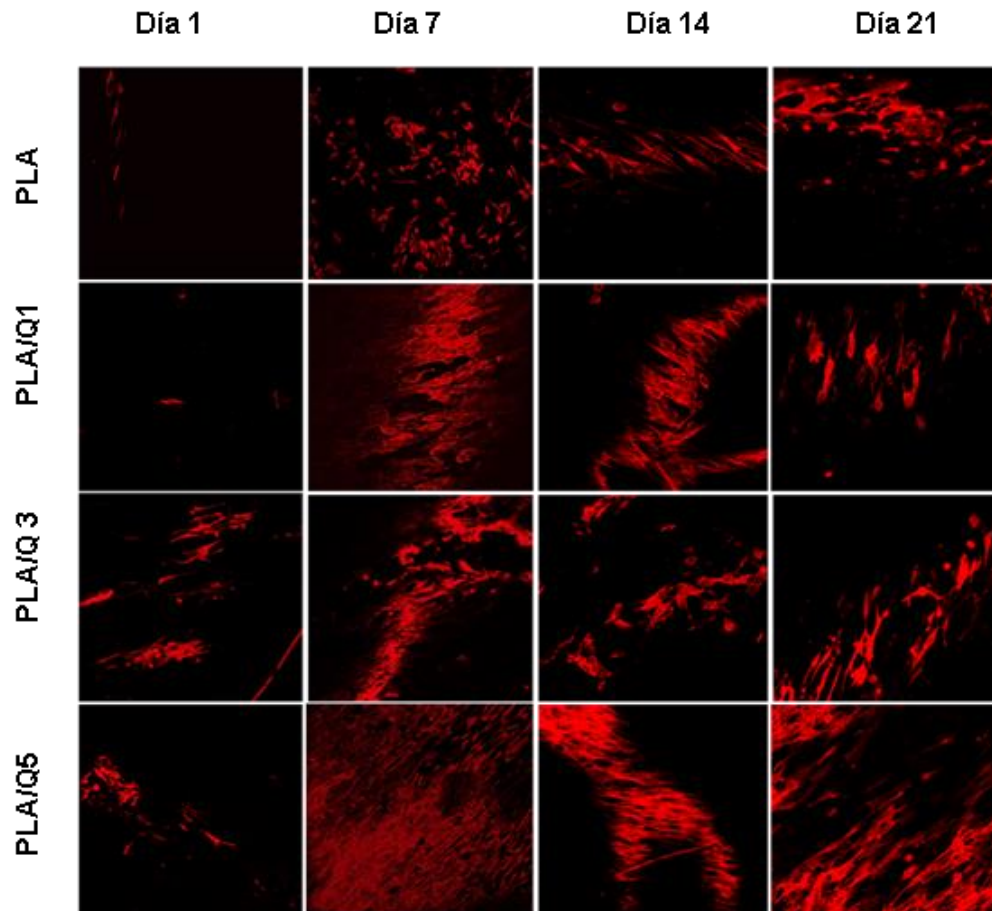
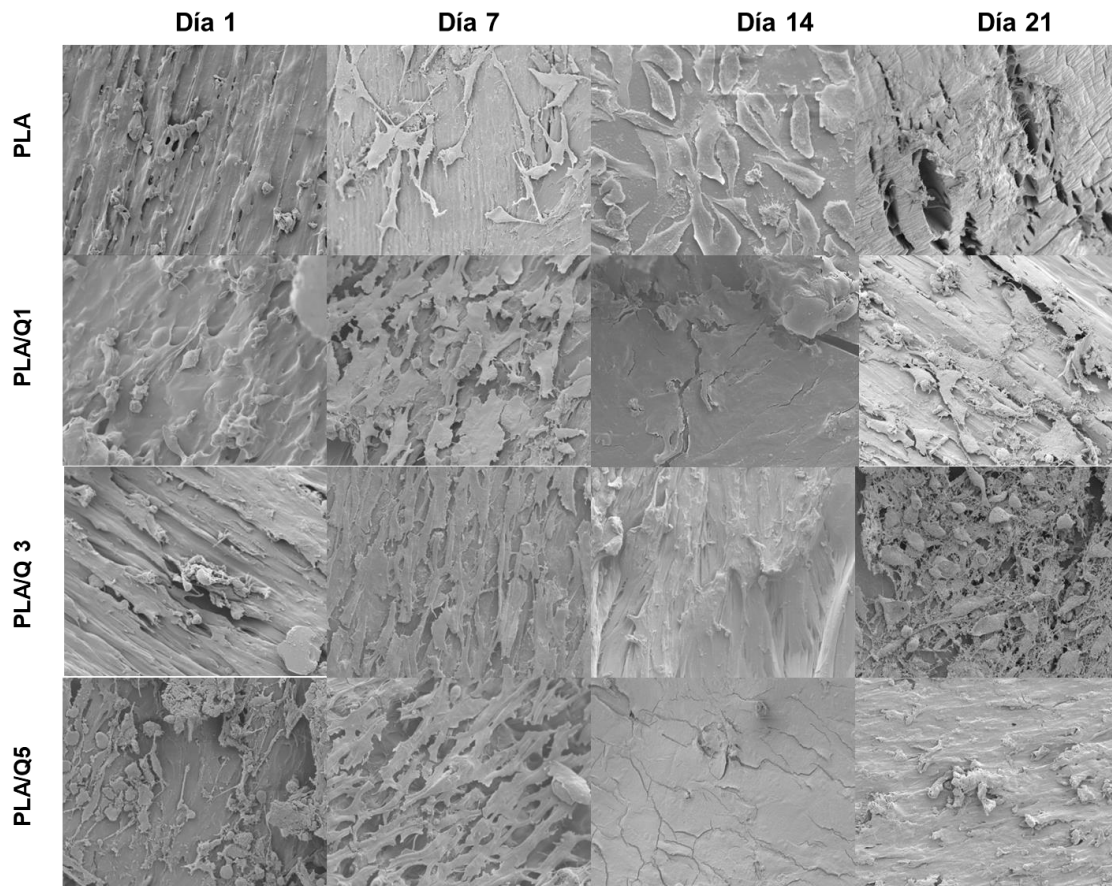


Figura 42.- Adherencia de los osteoblastos MG-63 sobre las superficies del PLA y materiales compuestos a 20X, el citoesqueleto de actina se muestra en color rojo.

En las imágenes de MEB se observa claramente que después de 7 días la superficie de los materiales compuestos, está completamente cubierta y posteriormente se forma una monocapa, manteniéndose así hasta el final del estudio. Además este análisis muestra que las células adheridas presentan la morfología osteoblástica y prolongaciones citoplasmáticas características de este tipo celular, las cuáles le permiten adherirse a la superficie de los materiales. Este comportamiento, es atribuido a que el carácter hidrofílico del quitosano influencia la adhesión y proliferación de las células. Resultados similares han sido reportados con BMSC (Bone Mesenchymal Stem Cells), por sus siglas en inglés, sobre la superficie de materiales de ácido polylactico/quitosano obtenidos por grafting [45], en el cuál un incremento en la proporción de quitosano/ácido láctico favorece la adherencia de un mayor número de células. Algunos autores señalan que el tipo de célula empleada en los ensayos *in vitro* puede influenciar la viabilidad, densidad y distribución de las mismas en un mismo material. Así mismo el proceso de fabricación de los materiales y características resultantes del mismo como la rugosidad de la superficie, afectan y en



algunos casos favorece las interacciones electrostáticas con moléculas cargadas negativamente como son los glucoaminoglucanos que permiten retener y concentrar factores de crecimiento, que son secretados por las células osteogénicas ejerciendo un efecto quimiotáctico e incrementando la osteoconducción.

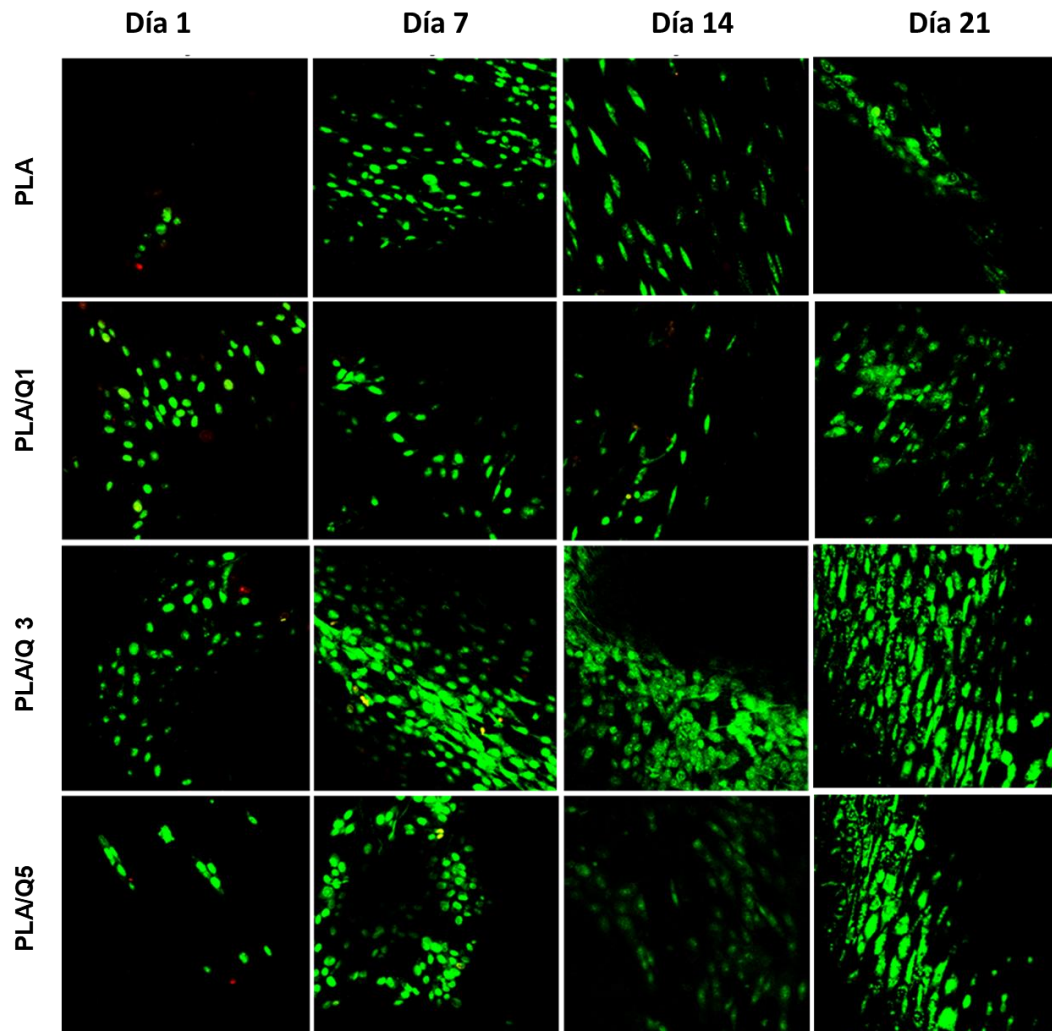


*Figura 43.- Adherencia de los osteoblastos MG-63 sobre las superficies del PLA y materiales compuestos a 500X, mostrando osteoblastos con morfología característica.*

## VIABILIDAD Y PROLIFERACION DE LOS OSTEObLASTOS MG63

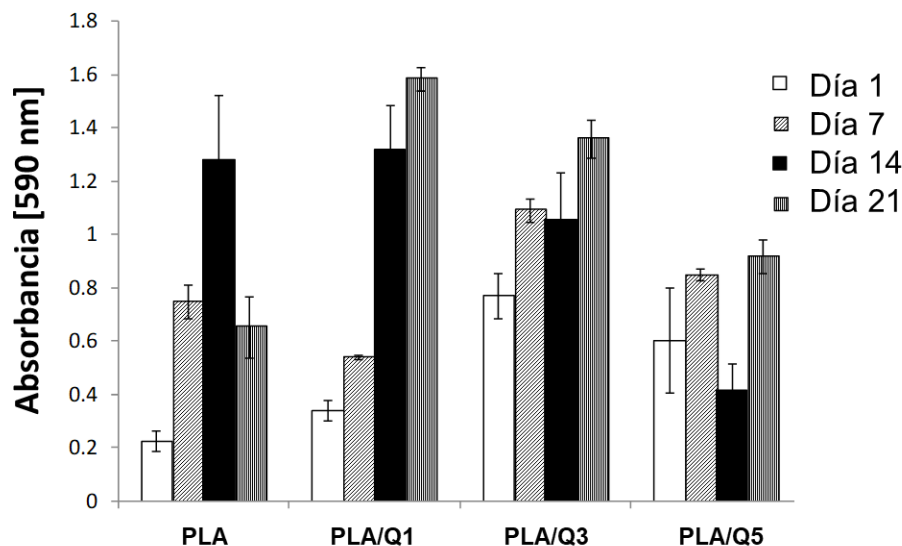
La viabilidad de las células adheridas sobre el PLA y los materiales compuestos, fue analizada cualitativamente por fluorescencia y cuantitativamente por el ensayo MTT. Los resultados son presentados en las Figuras 44 y 45 respectivamente, las células que permanecen viables están teñidas en color verde, en tanto que aquellas no viables presentan una tinción en color rojo. El PLA muestra un escaso número de células adheridas, aunque se encuentran viables. En cambio los materiales compuestos

muestran una gran cantidad de células viables adheridas durante los 21 días, y escasas células no viables únicamente el primer día.



*Figura 44.- Viabilidad y proliferación de los osteoblastos MG-63 sobre las superficies del PLA y materiales compuestos a 20X, mostrando células viables en color verde y células muertas en color rojo.*

En la siguiente gráfica se observa que para el PLA puro y el material compuesto con 5% de quitosano los valores de absorbancia decrecen después de los 14 y 7 días respectivamente, en tanto los materiales compuestos con 1 y 3 % de quitosano presentan un máximo de absorbancia a los 21 días, siendo su valor el más alto. La actividad metabólica de los osteoblastos se incrementó, cuando éstos se desarrollaron sobre la superficie de los materiales compuestos, siendo más evidente a los 21 días, estos resultados indican que los osteoblastos permanecen viables sobre los materiales durante el periodo de tiempo analizado, como se muestra en la siguiente gráfica:



*Figura 45.- Actividad Metabólica de los osteoblastos MG-63 sobre las superficies del PLA y materiales compuestos.*

Estos datos se correlacionan con los resultados obtenidos por fluorescencia, los cuáles fueron discutidos anteriormente y que dejan en claro que tanto el PLA como los materiales compuestos fabricados, no son tóxicos y que si existe un decremento en la actividad metabólica, se debe a que la superficie de los materiales se encuentra totalmente cubierta por células impidiendo que otras células se adhieran y provocando entonces su muerte, y no debido a un efecto citotóxico, como ha sido reportado por otros autores [51]

## **EVALUACIÓN CUALITATIVA DE MINERALIZACIÓN SOBRE LA SUPERFICIE DEL PLA Y LOS MATERIALES COMPUESTOS**

La presencia de nódulos mineralizados sobre el PLA y los materiales compuestos fue evaluada cualitativamente mediante la tinción de células con una solución de Alizarina y los resultados se muestran en la figura 46, puede observarse que el PLA presenta mineralización mínima, en tanto que los materiales compuestos muestran una gran cantidad de deposiciones minerales y presentan incluso nódulos en color rojo intenso, principalmente a partir del día 14 y se mantiene hasta el día 21. La adición de quitosano mejora significativamente la mineralización en los materiales compuestos debido a sus propiedades bioactivas, al tratarse de un material con superficie policatiónica absorbe iones calcio y fosfato, y entonces comienza un proceso de nucleación y crecimiento, como ha sido reportado en otras investigaciones [52, 53].

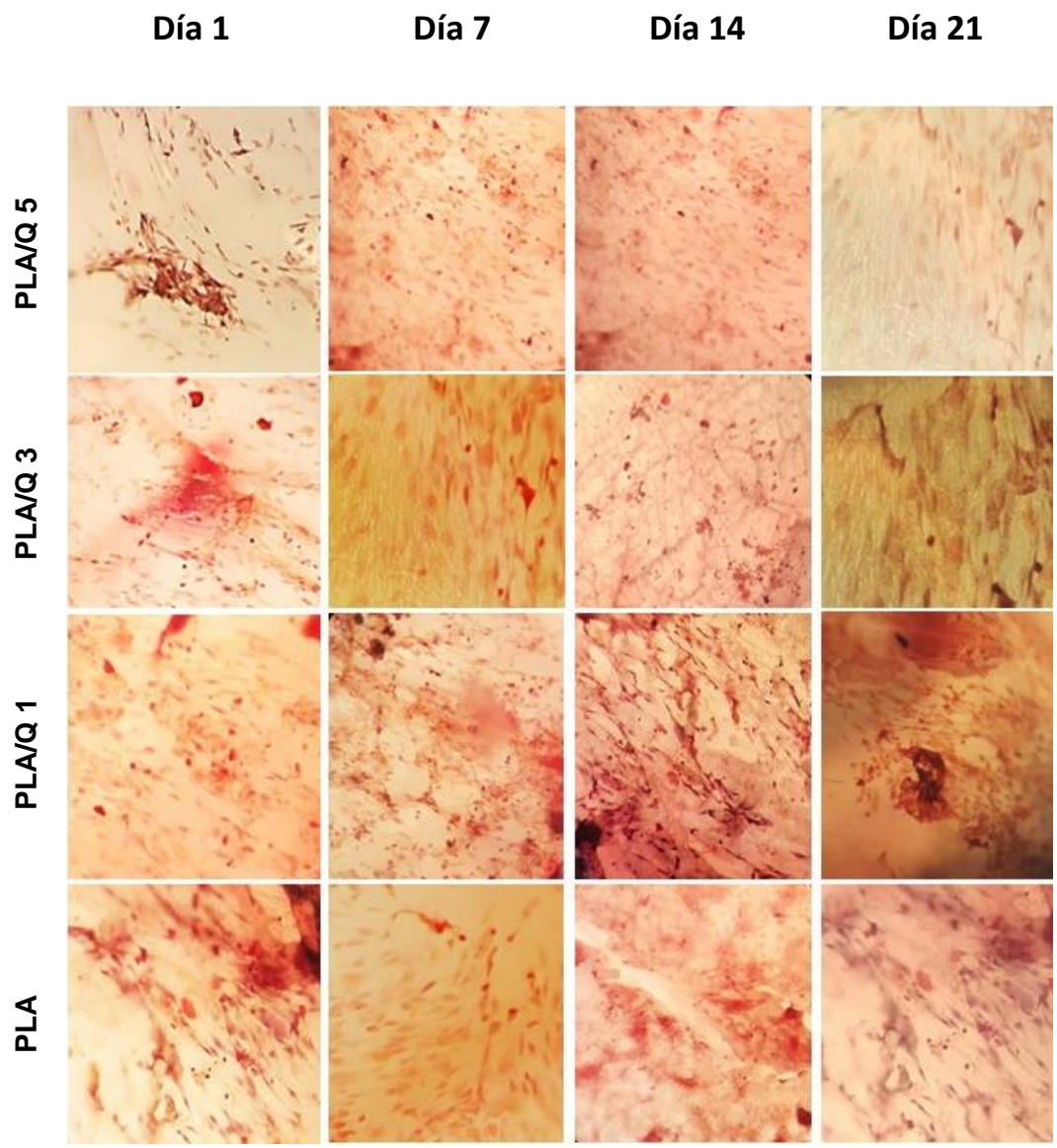


Figura 46.- Mineralización sobre la superficie del PLA y los materiales compuestos a 20X.

## *Capítulo IV*

# **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

## *Conclusiones*

Los materiales compuestos PLA/quitosano, empleando quitosano proveniente de desechos de camarón fueron fabricados por extrusión, sin el uso de solventes que comprometan la biocompatibilidad de los materiales compuestos fabricados. El incremento en el porcentaje de quitosano, disminuye la temperatura de degradación del polímero puro llegando a ser de hasta 50°C para el caso de 5% en peso. Las propiedades mecánicas de los materiales compuestos disminuyen con respecto al PLA puro, sin embargo dichas propiedades son adecuadas para su uso como biomateriales. Los materiales fabricados demostraron no ser tóxicos, así como favorecer la viabilidad, proliferación y mineralización de los osteoblastos MG-63. Todos los materiales compuestos fabricados son candidatos potenciales para ser empleados en Ingeniería de Tejidos como andamios celulares, al haber sido un buen soporte para el crecimiento de células óseas durante los ensayos in vitro.

## *Perspectivas*

Los resultados obtenidos sugieren que los materiales compuestos fabricados puede soportar el crecimiento de tejido óseo, sin embargo es necesario investigar la expresión de diversas proteínas tales como: fosfatasa alcalina, osteopontina, osteonectina y osteocalcina entre otras; así como factores de

transcripción como Runx2, a fin de establecer las características osteoinductivas de los materiales compuestos.

## REFERENCIAS

- [1] María Vallet Regi, "Biomateriales: repuestos para el cuerpo humano", Colección ¿Qué sabemos de? Ed. CSIC, (2013).
- [2] Martini, F.H.; Timmons, M.J.; Tallitsch, R.B. "The skeletal System: Osseous Tissue and Skeletal Structure". Human Anatomy. 6° Ed. Pearson Education. Benjamin Cummings Publishing Company. (2009) Cap 5: 912 p
- [3] Tatay Díaz A., Pérez Sánchez J.M., Ribera Zabalbeascoa J., Cordero Fernández J. A., Mella Sousa M., "Sustitutos óseos", Revista de la Sociedad Andaluza de Traumatología y Ortopedia, Vol. 26. Núm. 1-2, p.p. 2-13, (2008).
- [4] Abarretegi López A., "Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhBMP-2", Tesis presentada para optar por el grado de Doctore en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, p.p. 1-205, (2008).
- [5] Baron R.E., "Anatomy and biology of bone matrix and celular elements", Chapter 1, General principles of Bone Biology, 5a. Ed. American Society for Bone and Mineral Research, Washington D.C., p.p.1-8, /2003)
- [6] Mundy G.R., "Bone Resorbing Cells.", Primer on the metabolic bone deseases and disorders of mineral mentabolism, 2<sup>nd</sup>. Ed. Favus M.J., New York: Raven Press, p.p. 25-32, (1993).
- [7] Mellibovsky Saidler L., Díez Pérez A., "Qué significa la calidad ósea", Seminarios de la Fundación Española de Reumatología, Volume 7, Issue 4, (2006), p.p. 165-176, ISSN 1577-3566.
- [8] Gamboa Marquez A., Garzón Alvarado D., "Factores mecánicos en enfermedades osteocondrales", Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, p.p. 174-193, (2011).
- [9] Karim L., Hussein A., Morgan E., Bouxsein Mary, "The Mechanical behavior of bone", Osteoporosis Vol. 2, 4th ed. Academic Press, Chap. IV, (2013).
- [10] Boretos J.W. and Eden M., "Contemporary Biomaterials", Woyes Publications, New Jersey, pp. 477-492, (1984).
- [11] Park, J. B., Bronzino J. D., "Biomaterials Principles and applications", 2<sup>a</sup>. Edición, Ed. CRC, Press Boca Raton, FL 2000. ISBN 0-84931491-7).
- [12] Marin R. M., "Injertos sustitutos no óseos: Aportaciones del ácido poliláctico y poliglicólico", Avances en Periodoncia, Madrid, vol. 21, No. 1, (2009).
- [13] Herryman Munilla, M., Blanco Carracedo, G. "Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias". ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar (2005), ISSN 0138-6204.
- [14] Razak, Saiful Izwan Abd; Sharif, Noor Fadzliana Ahmad; Rahman, Wan Aizan Wan Abdul "Biodegradable Polymers and their bone applications: A Review", International Journal of Basic & Applied Sciences, Vol. 12, p.p. 31-49, (2012).
- [15] Figueira Maldonado E. "Degradación hidrolítica a diferentes pH de un material compuesto PLA/Quitosano", Tesis para obtener el título de Ingeniero en Materiales por la Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela, (2008)]
- [16] Rahul M. Rasal, Amol V. Janorkar, Douglas E. Hirt "Poly(lactic acid) modifications", Progress in Polymer Science, Vol. 35, (2010), P.P. 338-356, ISSN 0079-6700



- [17] Dillow Angela K., Dehghan F., Jrkach J. S., Foster N., and Langer R., "Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p.p. 96.
- [18] Nava Arenas I., "Demostración de la actividad de quitina desacetilasa en *Bacillus Thuringiensis*", Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químico Biológicas", Instituto Politécnico Nacional, (2009).
- [19] F.A. Al Sagheer, M.A. Al-Sughayer, S. Muslim, M.Z. Elsabee, "Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf", *Carbohydrate Polymers*, Volume 77, Issue 2, 10 June 2009, p.p. 410-419, ISSN 0144-861.
- [20] D. M. Escobar Sierra, C. P. Ossa Orozco, M. A. Quintana, W. A. Ospina, "Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos", *Scientia et Technica* Año XVIII, Vol. 18, No 1, p.p. (2013).
- [21] "Producción mundial total de camarón silvestre según principales países", Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, CONAPESCA-SAGARPA, México, (2012).
- [22] Ayuso, R., Grishina G., Ibañez M. D., Blanco C., Carrillo T., Bencharitwong R., Sánchez S., Nowak-Wegrzyn A., and Sampson H.A., "Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen". *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 124, p.p. 114-120, (2009).
- [23] N. V., Majeti, Ravi Kumar, "A review of chitin and chitosan applications", *Reactive & Functional Polymers* 46, pp. 1-27, (2000).
- [24] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and application", *Progress in Polymer Science*, 31, pp. 603-632, (2006).
- [25] Wang, S., Zhang, Y., Yin, G., Wang, H. and Dong, Z. "Electrospun polylactide/silk fibroin-gelatin composite tubular scaffolds for small-diameter tissue engineering blood vessels". *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 113, p.p.2675-2682, (2009),
- [26] Correlo, V. M.; Boesel L. F.; Pinho E.; Costa-Pinto A. R.; Alves da Silva, M. L.; Bhattacharya, M., Mano, J.F.; Neves, N.M.; Reis, R.L., "Melt-based compression-molded scaffolds from chitosan-polyester blends and composites: Morphology and mechanical properties". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 91(2): 489-504 (2009).
- [27] Y. Solis, C. Betancour, Zaluaga Corrales H.F., Valencia Llano C.H., "Implantación de un relleno de ácido poliláctico para regeneración ósea", *Revista Informador Técnico*, No. 73, p.p. 6-15, (2009).
- [28] Yokoyama A., Yamamoto, S., Kawasaki, T. and Nakasu M., "Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials", *Biomaterials*, 23, p.p. 1091-1101, (2002).
- [29] D. M. Escobar Sierra, C. A. Urrea Llano, M. Gutiérrez Guerra, P. A. Zapata Ocampo, "Producción de matrices de quitosano extraído de crustáceos", *Revista ingeniería Biomédica*, ISSN 1909-9762, vol. 5, No. 9, p.p. 20-25, Medellín, Colombia, (2011).
- [30] Koegler, W., "Fabrication of tissue engineering scaffolds with spatial control over architecture and cell matrix interactions in 3D". *Massachusetts Institute of Technology*, p.p. 24, (2004).
- [31] Wang, Y., Yu, Wu, H., Wang, Z., and Wen, D. "Porous conductive chitosan scaffolds for tissue engineering II. In vitro and in vivo degradation". *Journal of materials science: Materials in medicine*, 16,
- [32] Costa-Pinto, A. R., Salgado, A. J., Correlo, V. M., Sol, P.; Bhattacharya, M.; Charbord, P.; Reis, R. L.; Neves, N.M. "Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of a mouse mesenchymal stem cell line (BMC9) seeded on novel melt-based chitosan/polyester 3D porous scaffolds". *Tissue Engineering Part A*, 14(6):1049-1057, (2008).
- [33] B.Harintharavimal, H. Azman, U. Mat, "Novel toughened polylactic acid nanocomposite: Mechanical, thermal and morphological properties", *Materials & Design*, 31, pp. 3289-3298, (2010).

- [34] F. Carrasco, P. Pagès, J. Gámez-Pérez, O.O. Santana, M.L. Maspocho, "Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties", *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 95, Issue 2, (2010), p.p. 116-125, ISSN 0141-3910.
- [35] M.L. Duarte, M.C. Ferreira, M.R. Marvão, João Rocha, "An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy", *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 31, Issues 1–3, 20 December 2002, Pages 1-8, ISSN 0141-8130).
- [36] M. E. Navarro Toro, "Desarrollo y caracterización de Materiales Biodegradables para regeneración ósea", Tesis presentada para obtener el grado de Ciencias Especialidad-Ingeniería Química por la Universidad Politécnica de Catalunya, pp. 1-295, (2008).
- [37] T. Richard, "Preparación y caracterización de nanocompuestos en base PLA", Tesis para obtener el grado de Maestría, Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona, pp. 1-54, (2008).
- [38] Percot, C. Viton, A. Domard, "Optimization of chitin extraction from shrimp shells", *Biomacromolecules* No.4, pp.12-18, (2003).
- [39] Einbu, A. Nalum A. Elgsaeter, "Solution properties of chitin alkali", *Biomacromolecules*, No.5, pp.2048-2054, (2004).
- [40] ASTM F2103-01 Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue engineering medical product applications.
- [41] Liu X., Khor S., Petinaki E., Yu L., Simon G. P., Dean K. M., Bateman S., "Effects of hydrophilic fillers on the thermal degradation of poly(lactic acid)", *Thermochimica Acta*, 509, pp. 147- 151, (2010).
- [42] Iuliana Spiridon, Oana Maria Padurararu, Mirela Fernanda Zaltariov, and Raluca Nicoleta Darie, "Influence of Keratin on Poly(lactic acid)/Chitosan Composite Properties. Behavior upon Accelerated Weathering", *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2013 52 (29), 9822-9833
- [43] Wan Y., Wu H., Yu A., and Wen D., "Biodegradable Polylactide/Chitosan Blend Membranes", *Biomacromolecules*, No. 7, pp. 1362–1372, (2006).
- [44] Estrada y Col. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol.11, No. 3, pp. 502-512 (2012).
- [45] Zhang Z, Cui H. Biodegradability and Biocompatibility Study of Poly (Chitosan-g-lactic Acid) Scaffolds. *Molecules*. 2012;17:3243-3258.
- [46] Wan Y, Xiao YC, Zhang S, Wang S, Wu Q. Fibrous poly(chitosan-g-dl-lactic acid) scaffolds prepared via electro-wet-spinning. *Acta Biomaterialia*. (2008); (4): 876-886.
- [47] *The Physics of Glassy Polymers*, R. N. Haward, Applied Science Publishers LTD, (1973).
- [48] Gao H, Qiang T. Fracture Surface Morphology and Impact Strength of Cellulose/PLA Composites. Chen D, ed. *Materials*. 2017;10(6):624. doi:10.3390/ma10060624.
- [49] Nascimento, L and Gamez-Perez, Jose and O. Santana, O and Velasco, José and Maspocho, M and Franco-Urquiza, Edgar, Effect of the Recycling and Annealing on the Mechanical and Fracture Properties of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment* ,2010, (18), 654-660.
- [50] Bhumkar, D.R.; Pokharkar, V.B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS PharmSciTech* 2006, 7, E138–E143.
- [51] Wurm, M.; Moest, T.; Bergauer, B.; Rietzel, D.; Wilhelm, N.F.; Cifuentes, S.; Wilmowsky, C. In-vitro evaluation of Poly(lactic acid) (PLA) manufactured by fused deposition modeling. *J. Biol. Eng.* 2017, 29, doi:10.1186/s13036-017-0073-4.

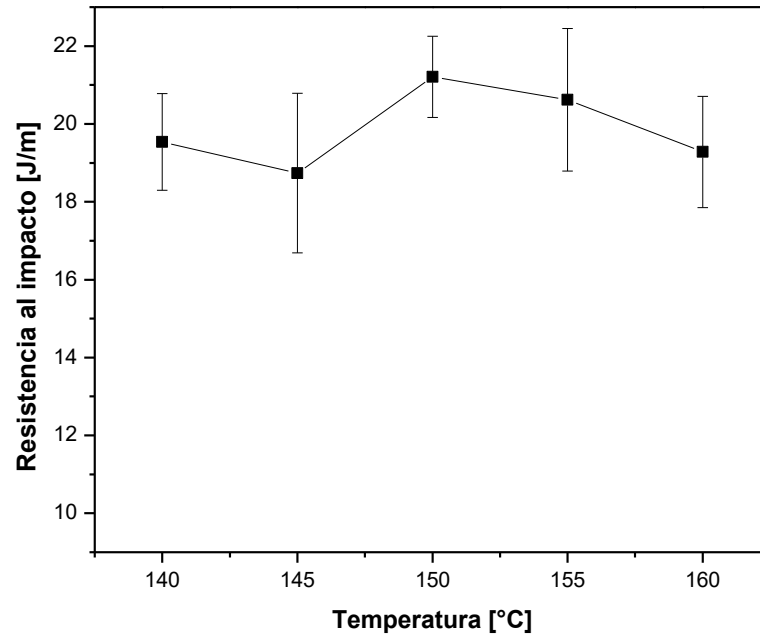


[52] Wang, X.; Wang, G.; Liu, L.; Zhang, D. The mechanism of a chitosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation. *Sci. Rep.* 2016, 6, 39322.

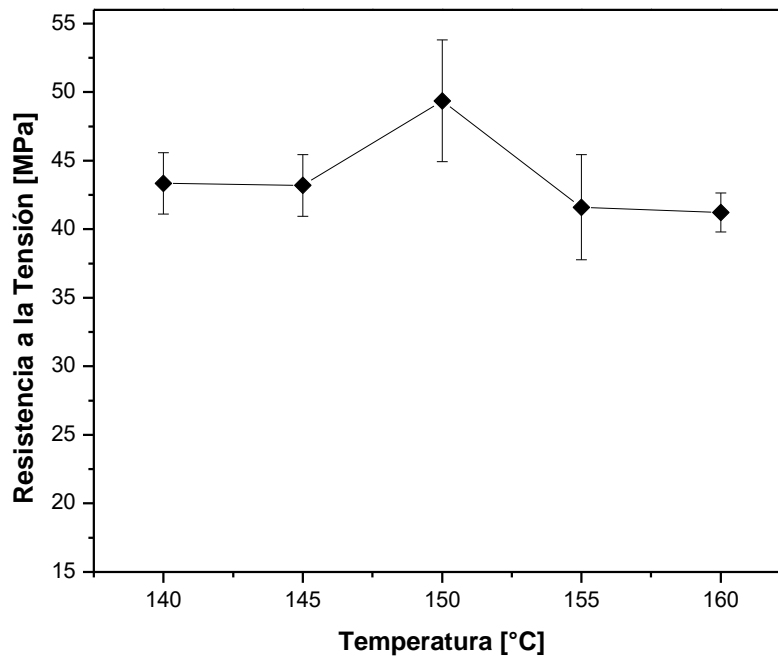
[53] Lai, G.J.; Shalumon, K.T.; Chen, S.H.; Chen, J. P. Composite chitosan/silk fibroin nanofibers for modulation of osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Carbohydr. Polym.* 2014, 111, 288–297.

## ANEXO A

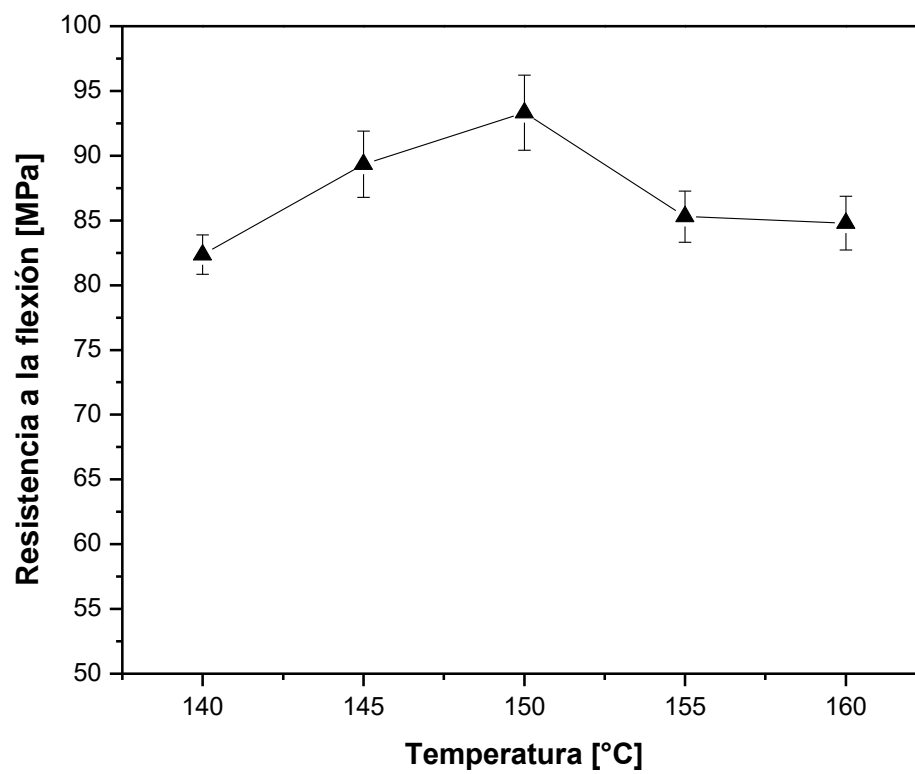
### GRAFICA DE RESISTENCIA AL IMPACTO PARA PLA A DIFERENTES TEMPERATURAS DE EXTRUSIÓN



### GRAFICA DE RESISTENCIA A LA TENSIÓN PARA PLA A DIFERENTES TEMPERATURAS DE EXTRUSIÓN



## GRAFICA DE RESISTENCIA A LA FLEXIÓN PARA PLA A DIFERENTES TEMPERATURAS DE EXTRUSIÓN



## NatureWorks® PLA Polymer 2002D Extrusion/Thermoforming

NatureWorks® PLA polymer 2002D, a NatureWorks LLC product, is a thermoplastic resin derived from annually renewable resources and is specifically designed for extrusion/thermoforming applications. PLA polymer 2002D is a clear extrusion sheet grade and processes easily on conventional extrusion and thermoforming equipment. See table at right for properties.

### Applications

Potential applications for PLA polymer 2002D include:

- Dairy containers
- Food serviceware
- Transparent food containers
- Blister packaging
- Cold drink cups

### Processing Information

PLA polymer 2002D is easily processed on conventional extrusion equipment. The material is stable in the molten state, provided that the drying procedures are followed. More detailed recommendations and processing requirements are found in the NatureWorks® PLA sheet extrusion processing guide, the purging technical data sheet, and the drying and crystallizing processing guide; all of which can be found at [www.natureworkslc.com](http://www.natureworkslc.com).

### Machine Configuration

PLA polymer 2002D will process on conventional extrusion machinery with the following equipment: General purpose screw with L/D ratios from 24:1 to 32:1 and compression ratio of 2.5:1 to 3:1. Smooth barrels are recommended.

Typical Material & Application Properties <sup>(1)</sup>		
Physical Properties	PLA Polymer 2002D	ASTM Method
Specific Gravity	1.24	D792
Melt Index, g/10 min (210°C/2.16kg)	5-7	D1238
Clarity	Transparent	
Mechanical Properties		
Tensile Strength @ Break, psi (MPa)	7,700 (53)	D882
Tensile Yield Strength, psi (MPa)	8,700 (60)	D882
Tensile Modulus, kpsi (GPa)	500 (3.5)	D882
Tensile Elongation, %	6.0	D882
Notched Izod Impact, ft-lb/in (J/m)	0.24 (12.81)	D256
Shrinkage is similar to PET <sup>(2)</sup>		

(1) Typical properties, not to be construed as specifications.

(2) Refer to NatureWorks® PLA Sheet Extrusion Processing Guide

### Process Details

#### Startup and Shutdown

PLA polymer 2002D is not compatible with a wide variety of commodity resins, and special purging sequences should be followed:

1. Clean extruder and bring temperatures to steady state with low-viscosity, general-purpose polystyrene or polypropylene.
2. Vacuum out hopper system to avoid contamination.
3. Introduce PLA polymer into the extruder at the operating conditions used in Step 1.
4. Once PLA polymer has purged, reduce barrel temperatures to desired set points.
5. At shutdown, purge machine with high-viscosity polystyrene or polypropylene.

#### Drying

In-line drying may be required. A moisture content of less than 0.025% (250 ppm) is recommended to prevent viscosity degradation. Typical drying conditions for crystallized granules are 2 hours at 195°F (90°C) or to a dew point of -40°F (-40°C), airflow rate of greater than 0.5 cfm/lbs per hour of resin throughput. The resin should not be

exposed to atmospheric conditions after drying. Keep the package sealed until ready to use and promptly reseal any unused material.

Pellets that have been exposed to the atmosphere for extended time periods will require additional drying time. Amorphous regrind must be crystallized prior to drying, to assure efficient and effective drying.

Processing Temperature Profile <sup>(1)</sup>		
Melt Temperature	410°F	210°C
Feed Throat	113°F	45°C
Feed Temperature	355°F	180°C
Compression Section	375°F	190°C
Metering Section	390°F	200°C
Adapter	390°F	200°C
Die	375°F	190°C
Screw Speed	20-100 rpm	



Article

## Biological Compatibility of a Polylactic Acid Composite Reinforced with Natural Chitosan Obtained from Shrimp Waste

Yaret Gabriela Torres-Hernández <sup>1,\*</sup>, Gloria Michel Ortega-Díaz <sup>2</sup>, Lucía Téllez-Jurado <sup>3</sup>,  
Nayeli Shantal Castrejón-Jiménez <sup>2</sup>, Alejandro Altamirano-Torres <sup>3</sup>, Blanca Estela García-Pérez <sup>2</sup> and  
Heberto Balmori-Ramírez <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Metallurgical and Materials Engineering, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas (ESIQIE), Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos (UPALM), Av. Instituto Politécnico Nacional S/N, C.P., Ciudad de México 07738, México; ltellezj@ipn.mx (L.T.-J.); hbalmori@ipn.mx (H.B.-R.)

<sup>2</sup> Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Department of Microbiology, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Casco de Santo Tomás. C.P., Ciudad de México 11340, México; belimax\_pelusa@hotmail.com (G.M.O.-D.); naye\_nice85@hotmail.com (N.S.C.-J.); abrilstela@hotmail.com (B.E.G.-P.)

<sup>3</sup> Department of Materials, Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, San Pablo No.180, Col. Reynosa-Tamaulipas, C.P., Ciudad de México 02200, México; aat@correo.azc.uam.mx

\* Correspondence: yagheto@gmail.com; Tel.: +52-55-531-8900 (ext. 2132)

Received: 14 May 2018; Accepted: 1 June 2018; Published: x June 2018

**Abstract:** The aim of this work is to evaluate the effect of chitosan content (1, 3 and 5 wt %) dispersed in polylactic acid (PLA) on the structure and properties of composites. Also, the hydrolytic degradation, and the cell viability and adhesion of human MG-63 osteoblasts are analyzed to determine the composites' suitability for use in tissue engineering. For the manufacture of the materials, natural chitosan was extracted chemically from shrimp exoskeleton. The composites were fabricated by extrusion, because it is a low-cost process, it is reproducible, and it does not compromise the biocompatibility of the materials. FT-IR and XRD show that the chitosan does not change the polymer structure, and interactions between the composite components are discarded. In vitro degradation tests show that the composites do not induce significant pH changes in phosphate buffer solution due to their low susceptibility to hydrolytic degradation. The adhesion and morphological characteristics of the osteoblasts are evaluated using confocal microscopy and scanning electron microscopy. The cell viability is determined by the MTT assay. Osteoblasts adhesion is observed on the surface of PLA and composites. A higher amount of chitosan, higher number of cells with osteoblastic morphology, and mineralized nodules are observed on the composite surface. The highest metabolic activity is evidenced at 21 days. The results suggest that the Polylactic acid/chitosan composites are potentially suitable for use as a biomaterial.

**Keywords:** biocomposites; polylactic acid; chitosan; osteoblasts; cellular viability; biomineralization

## 1. Introduction

The development of materials that combine the mechanical properties, chemical stability, and biological characteristics required to promote tissue growth is the main focus of research in the field of tissue engineering. A biomaterial must be biocompatible, biodegradable, and able to stimulate cell adhesion, cell proliferation, and in the case of stem cells, differentiation and maturation. The biomaterials must allow the normal formation of new bone tissue, not having as a final goal an implant material but a new, native bone [1], and its degradation products must produce minimal immune reactions. On the other hand, the mechanical properties are one of the most difficult requirements to satisfy, since the scaffold must withstand the mechanical demands of the injured site throughout the regeneration process, implying that the mechanical properties and the degradation mechanisms must work in equilibrium with the formation of new tissue [2,3].

Common biodegradable polymers used in tissue regeneration are polyglycolic acid (PGA), polylactic acid (PLA), PGA-PLA copolymers, polyhydroxyalkanoates (PHA) and polycaprolactone (PCL) [4–6]. The linear aliphatic thermoplastic polyester PLA is derived from renewable resources, with wide availability and easy processability by injection molding or extruding [6–9]. PLA has a high modulus of elasticity (3.5–3.8 GPa) and tensile strength (48–110 MPa); however, the inherent brittleness and low toughness limit its applications [7–9]. Because of its biodegradability, biocompatibility, and osteoconductive properties, it has been successfully used in drug delivery systems and in fracture fixation devices, but its hydrophobic surface produces an inflammatory response, and its degradation causes a decline of cell adhesion and cell proliferation [10]. The polymer blends, such as PLA-PLC, PLA-phosphates, PLA-PLGA, PLA-hydroxyapatite, and PLA-chitosan [11–15], are focused on obtaining useful properties. The chitosan blends have a great potential in tissue engineering because chitosan is a biocompatible polymer with a similar structure to the glucosamine of the extracellular matrix. It shows antimicrobial activity, and its hydrophilic surface promotes adhesion, proliferation, and cell differentiation. It has been successfully used for wound healing, promotion of bone growth, and to enhance the anti-inflammatory response [16,17].

Natural chitosan is obtained by deacetylation of chitin, which is the main component of the exoskeleton of crustaceans, arthropods, and cell walls of some fungi [18–21]. However, due to its low mechanical properties [1,22], it is necessary to combine it with other synthetic or natural polymers. Some investigations about PLA-chitosan composites are described below. Chitosan microspheres with Bone Morphogenic Proteins (BMPs) have been dispersed into a PLA matrix in order to obtain PLA-chitosan composites by thermally induced phase separation [23]. The results from this research show that the introduction of different contents of microspheres improves the composites' compression strength. In vitro degradation tests reveal that the degradation of chitosan is faster than that of PLA; therefore, the authors suggest that the composite offers a novel scaffold design for non-loaded bone regeneration. In another research, polylactide/chitosan blend membranes were obtained by solvent casting, and it was found that the two components interact, probably due to hydrogen bonds [24]. However, the use of organic solvents in the two processes mentioned could compromise the composites biocompatibility. The fabrication by vacuum reaction of a scaffold through grafting of lactic acid on the amino groups in chitosan, and the in vitro (lysozyme/PBS solution) and in vivo (Kunming mice) degradation showed that the mass loss is faster in vivo than in vitro, and that PLA/chitosan copolymers have better histocompatibility than chitosan or PLA alone [22]. Physicochemical and antimicrobial properties have also been studied in a PLA film with 5 and 10% of chitosan and two particle sizes (715 and 180  $\mu\text{m}$ ) fabricated by extrusion [25]. The main results from this research show that the incorporation of chitosan particles decreases the stiffness and extensibility of the films. The thermal behavior of the PLA is not affected by chitosan due to the low ratio of chitosan in the composites, and the water vapor permeability is higher than for pure PLA films. The antimicrobial activity decreases in the presence of chitosan. Finally, methods such as 3D printing [26], gel casting, and stereolithography require costly equipment, the manufacture time is long, and the material is required in

powder. In gel casting and stereolithography, it is necessary to employ polymers which are compatible with UV rays [26–28].

As previously mentioned, the advantage of composite materials is to improve or combine the properties of the individual components in order to obtain a new material with the best properties according to the requirements. Chitosan has a similar structure to the glucosamine of the extracellular matrix, and improves the cells adhesion, proliferation, and differentiation; however, due to its low mechanical properties, it is necessary to combine it in a PLA matrix that has better mechanical properties, and then to reduce the inflammatory responses caused by acid products of the hydrolytic degradation process [10,14]. The composites formed with PLA matrix that incorporates chitosan particles present an alternative biomaterial, due to their properties when they are combined.

In this work the aim is to combine the best properties of both PLA and chitosan in order to obtain a biomaterial with an adequate degradation rate, as well as to regulate bone cell functions, such as adhesion and proliferation. The employed chitosan was extracted from shrimp waste, and PLA/chitosan composite bars have been fabricated without the use of solvents by extrusion, which is a process that does not compromise the biocompatibility; these factors reduce the cost of the production of the material.

## 2. Experimental Procedures

### 2.1. Materials and Methods

The polylactic acid (PLA, 2002D, Nature Works®, Minnetonka, MN, USA) used had 4.25% of isomer D content, molecular weight of 212 kDa, polydispersity index of 3.06, specific gravity of 1.24 (ASTM D256), and melt index 5–7 (ASTM D1238), [29]. The chitosan used as filler was extracted from white shrimp exoskeletons (*Litopenaus Vannamei*), and it had an 80% of deacetylation degree and average particle size of 300  $\mu\text{m}$ .

#### 2.1.1. Extraction of Chitosan

The chitosan was extracted from shrimp waste by a chemical treatment method [18–21], described as follows. Four kilograms of shrimp exoskeletons were washed with water, and oven-dried at 80 °C for 4 h. The washed wastes were ground in an agate mortar, and then subjected to a chemical treatment in a 1% NaOH solution at 28 °C for 24 h, with magnetic stirring for removal of proteins. After that, the minerals were removed in a 0.6 N HCl solution, with a 1:11 solid-liquid ratio at 30 °C for 3 h. The deacetylation process was carried out by adding 50% of NaOH solution with a 1:11 solid-liquid ratio at 60 °C for 2 h. A discoloration process was made with a solution of 15% ether, 75% acetone, and 10% distilled water at 65 °C for 2 h, with magnetic stirring. Finally, the sample was exhaustively washed with distilled water. All chemical reagents used were reagent grade.

#### 2.1.2. Composites Preparation

The chitosan particles were mixed with PLA pellets in an  $\alpha$ -alumina cylindrical container without milling balls; the mixtures were processed for 2 h at 200 rpm. The composite's nomenclature was PLA, PLA/Q1, PLA/Q3, and PLA/Q5 for composites with 0, 1, 3 and 5 wt % of chitosan particles, respectively. The composites were fabricated by extrusion in a single-screw extruder (Beutel Spacher, Mexico City, Mexico) with 24:1 Length:Diameter ratio, at 150 °C with a rotor speed of 20 rpm, with a profile extrusion die that creates manufactured specimens for mechanical testing. Previous to the extrusion, the mixtures of PLA and chitosan were dried in a furnace at 80 °C for 6 h.

### 2.2. Microstructural and Mechanical Characterization

The PLA and chitosan particle morphology, as well as the chitosan dispersion in the polymeric matrix, were characterized by Confocal Laser Microscopy (Confocal Multiphotonic Microscope, Carl Zeiss, LSM 710 NLO, Jena, Germany), using an excitation wavelength of 400 nm with an emission range of 400–800 nm. The specimen's crystallinity was analyzed by X-ray diffraction (XRD) in a Focus, D-8, Bruker (Billerica, MA, USA) diffractometer, using Cu- $\alpha$  radiation. The diffraction patterns were recorded from 5° to 40° in 2 $\theta$ , with a step wise of 0.05°. The functional group identification, and interactions between the composite components were studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA, model Spectrum One). The spectra were recorded in the middle infrared range of 4000–400 cm<sup>-1</sup>, in transmission mode at intervals of 2 cm<sup>-1</sup> and 16 $\times$  scanning. The biomaterial's thermal behavior was studied using a SDTQ 600, TA Instrument (New Castle, DE, USA) in the temperature range of 25–500 °C, heating at 5 °C/min in controlled nitrogen. For the mechanical tests, the specimens were cut longitudinally to the extrusion direction, the tensile tests (ASTM D-638 [30]) were performed at room temperature using a Universal Testing Machine (United, model: SSTM-1) with a load cell of 10 kN and cross-head speed of 0.2 in/min. Ten specimens of each composite composition were used.

### 2.3. Biocompatibility Analysis

#### 2.3.1. In Vitro Degradation in PBS

The materials' in vitro degradation was measured using a phosphate buffer solution (PBS, 3813, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Samples of 9 mm  $\times$  10 mm  $\times$  4 mm were weighed before placing them in 10 mL vials with PBS, at a pH = 7.4  $\pm$  0.1 at 37 °C by predetermined periods of time (1–28 days). The change in pH was measured using a pH meter (Radiometer Analytical SAS, Lyon, France, model pH 220). The reported pH value is the average of three samples.

#### 2.3.2. Cell Culture

The human osteoblast cell line MG-63 (ATTC CRL-1427) was cultured in  $\alpha$ -Minimal Essential Medium (MEM, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific) and antibiotics (gentamicin-penicillin, 25 mg/L and 50,000 U/L, respectively), at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Media was renewed every three days, and when the cells reached confluence, a trypsin-EDTA solution (0.05 g/L trypsin and 0.05 g/L EDTA) was used to detach the cells from culture flasks.

#### Cell Culture on Biomaterials

The PLA and composites were sterilized by immersion in a 70% ethylic alcohol solution and by exposition to UV-light for 30 min. For all experiments, sterilized biomaterials were incubated with  $\alpha$ -MEM overnight, and were then transferred to a 96-well sterile culture plate. MG-63 cells were cultured at 5  $\times$  10<sup>4</sup> cells/biomaterial of density, and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Culture media was changed daily and the cytoskeletal arrangement, cell adherence, and cell viability was measured on days 1, 7, 14, and 21.

#### Actin Stain

To evaluate the osteoblast morphology on biomaterials, immunofluorescence assays were conducted to analyze actin distribution. MG-63 osteoblast-like cells were seeded onto sterilized biomaterials at a density of 5  $\times$  10<sup>4</sup> cells/biomaterial for 1, 7, 14 and 21 days, and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After each time, the samples were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich), followed by washing three times with PBS. Actin filaments were stained with rhodamine-phalloidin (10 ng/ $\mu$ L, Sigma-Aldrich) for 20 min



at room temperature, and the excess of rhodamine was eliminated by washing five times with PBS. Preparations were viewed in a confocal laser scanning microscope system (LSM5 Pascal, Zeiss).

#### Scanning Electron Microscopy

MG-63 osteoblasts grown on PLA and composites for 1, 7, 14, and 21 days were fixed with 2.5% glutaraldehyde and post-fixed with 1% aqueous osmium tetroxide. Afterwards, cells were washed three times, followed by dehydration with increasing concentrations of ethanol and critical point dried with liquid CO<sub>2</sub>. The preparations were coated with gold (Denton Vacuum-Desk II, Moorestown, NJ, USA) and observed using a scanning electron microscope (JSM 7800, JEOL, Tokyo, Japan).

#### Cell Viability

To evaluate the cell viability of the osteoblasts that grew in the PLA and composites, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) assay was performed. For that, osteoblasts were cultured at a density of 50,000 cells/biomaterial and grown at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. After that period, the biomaterials were transferred to a new plate to permit the growth of cells that were attached to the surface. After 1, 7, 14, and 21 days, the media was removed and replaced for 100 µL of 100 mg/mL MTT solution (Sigma). The reaction was allowed to occur for 3 h at 37 °C. After that time, 100 µL of dimethyl sulfoxide were added to dissolve the precipitate. The absorbance was read at 590 nm using an ELISA plate reader (Thermo Fisher Scientific, Multiskan GO).

The osteoblasts viability on the PLA and composites was confirmed by confocal microscopy analysis. For that, 50,000 osteoblasts were cultured on biomaterials and the growing kinetics was followed for 1, 7, and 14 days. After each time, the cells attached on the biomaterials were stained with a mix of nucleic acid dyes, Syto9 (5 µmol/L; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and propidium iodide (PI; 30 µmol/L; Sigma-Aldrich), and analyzed by confocal microscopy. Three experiments of each incubation time were measured and their standard deviation was calculated. Statistically significant differences were determined by comparing the optic density of 7, 14, and 21 days with the optic density of 1 day. The variance (ANOVA) was calculated with the Sigma Stat software (3.5), *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

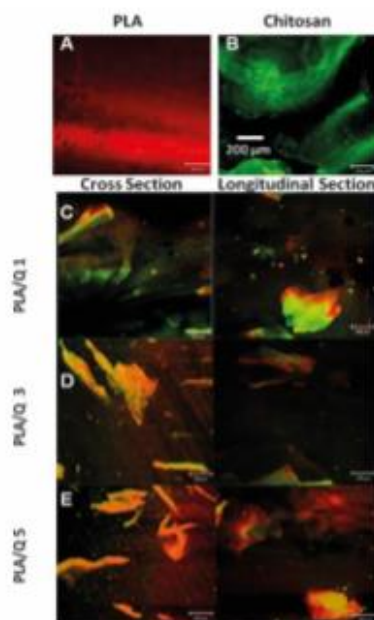
#### Alizarin Red Stain

The cells that grew on the PLA and composites were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Then, the cells were washed 3 times with PBS, and 200 µL of 2% Alizarin red were added to each sample. Cells were incubated during 20 min with gentle agitation, and washed 5 times with PBS. Finally, the cells were analyzed under an inverted microscope (Primovert, Zeiss).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Distribution of Chitosan in PLA

The chitosan particle distribution in the composites matrix was evaluated by confocal microscopy (Figure 1). The images show that the chitosan particles for the composites with 1 and 3 wt % chitosan were evenly distributed in the , and that they have flake morphology with lengths of up to 500 µm. The composite with 5 wt % chitosan showed some agglomerates. The average particle size and the morphology of the particles, as well as the processing method of the composites, have a great influence in the homogeneity and dispersion of the particles in the matrix [8,29]. The PLA/Q1 and PLA/Q3 composites show a good dispersion of chitosan in the PLA matrix, although the particles are aligned along the extrusion direction because of their flake morphology. The PLA/Q5 composite shows the presence of agglomerates that result in poor adhesion with the PLA matrix.

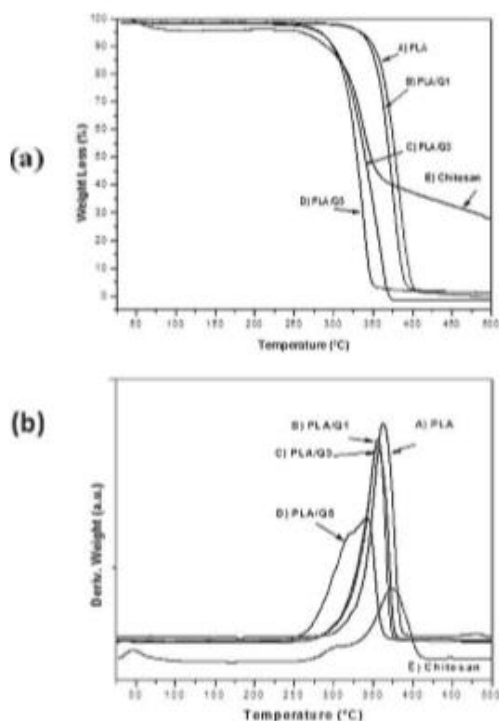


**Figure 1.** Confocal microscopy micrographs of (A) Poly(lactic acid) (PLA), (B) Chitosan particles, and (C-E) PLA/chitosan composites. The PLA and chitosan particles show red (A) and green (B) autofluorescence, respectively.

### 3.2. Structural Characterization of the PLA/Chitosan Composites

The thermal behaviors of PLA, chitosan, and composites were evaluated by thermogravimetric (TG) analysis, and the weight losses during heating and their derivatives are shown in Figure 2a,b, respectively. The TG curve of chitosan exhibits three decomposition stages. The first occurs from room temperature to  $\sim 87^\circ\text{C}$  with  $\sim 5\text{ wt } \%$  loss; it can be attributed to the evaporation of adsorbed water. The second stage starts at  $250^\circ\text{C}$ , with a maximum weight loss rate at  $\sim 300^\circ\text{C}$ , but it is overlapped with the beginning of the third stage, that presents a maximum weight loss rate at  $390^\circ\text{C}$  that continues above  $500^\circ\text{C}$ . The total weight loss of both stages is  $\sim 75\%$ ; this is due to the degradation process which includes the dehydration of saccharide rings and the polymerization and decomposition of acetylated and deacetylated units of chitin. For PLA, there is one weight loss stage between  $300$  and  $390^\circ\text{C}$ , with a maximum rate at  $357^\circ\text{C}$ , and a total weight loss of  $\sim 95\%$ , that is related to the breaking of ester bonds and the release of gaseous products such as cyclic oligomers, lactide molecules, acetaldehyde, and carbon monoxide [31]. The PLA/chitosan composites present two stages of decomposition. In comparison with the PLA matrix thermal decomposition, the composite's decomposition temperatures decrease with increasing the amount of chitosan particles. In the PLA/Q5 composite, the first decomposition step starts at  $\sim 230^\circ\text{C}$ , and has a maximum weight loss rate at  $\sim 320^\circ\text{C}$ . These two temperatures roughly correspond with chitosan's first decomposition stage, so this is probably related to the decomposition of chitosan in the composite. The PLA/Q5 composite shows a second decomposition event that has a maximum rate at  $\sim 340^\circ\text{C}$ ; this temperature is lower than the maximum decomposition rate temperature for PLA and chitosan alone;

therefore, it is reasonable to assume that the decomposition of the PLA and chitosan composite components occurs simultaneously, and that the liberated decomposition products accelerate the decomposition reaction of both.



**Figure 2.** (a) Thermogravimetric (TG) and (b) TG derivative curves for PLA, chitosan and PLA/chitosan composites with 1 wt % (PLA/Q1), 3 wt % (PLA/Q3) and 5 wt % (PLA/Q5) chitosan.

The thermal behavior of the PLA and PLA/chitosan composites discard a thermal decomposition of the components during the extrusion at 150 °C that was implemented to make them. The observed thermal events agree with those reported in the literature [6, 25]. The two decomposition stages observed in the PLA/chitosan composites are related to the decomposition of chitosan, and the simultaneous decomposition of PLA and chitosan in the composite. Also, the presence of chitosan in the PLA matrix decreases the thermal decomposition temperature of the composites as the chitosan amount increases. The PLA shows a thermal degradation temperature ~300 °C, and the composite with 5 wt % chitosan shows a ~50 °C temperature decrease. This is related to the low degradation temperature of chitosan which is observed at ~250 °C, as is reported by some researches, which occurs in the range of 220–260 °C [32], depending on the source of the chitosan.

The decomposition products of chitosan, such as small polar molecules and H<sub>2</sub>O from opening of the pyranose ring (dehydration of saccharide rings, and the polymerization) and deamination reactions

(decomposition of acetylated and deacetylated units of chitin), break down the PLA polyester chain, promoting a decrease in the composite's degradation temperature. Similar results have been reported by other authors [33] using hydrophilic fillers, such as cellulose, in PLA matrix.

The material's crystallinity was analyzed by XRD (Figure 3a). The XRD pattern of PLA shows a small, broad peak at  $17.20^\circ$  in  $2\theta$ . The chitosan pattern shows two peaks at  $10.2^\circ$  and  $20.5^\circ$  in  $2\theta$ . The composite's diffraction patterns were similar to the PLA pattern. The crystallinity of chitosan depends on its extraction source. The chitosan obtained from shrimp exoskeletons by chemical treatment has a high crystallinity degree because the intermediate product is  $\alpha$ -chitin, which produces chitosan with higher crystallinity; other sources produce  $\beta$ -chitin, yielding chitosan with less crystallinity [18,19,31]. In our work, poor crystallinity was observed, since only a small and broad peak in the biocomposites XRD patterns, corresponding to the characteristic pattern of PLA [7,8], was observed. The chitosan signal in the patterns was not observed because the amount of chitosan was below the technique detection limit.

The functional groups of PLA, chitosan, and composites were identified by FT-IR; the spectra are shown in Figure 3b. The FT-IR spectrum of PLA shows several characteristic bands: at  $1744\text{ cm}^{-1}$  it shows a strong band due to the C=O stretching vibration of the ester group and the bending vibration of this group appears at  $1180\text{ cm}^{-1}$ ; the band at  $866\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the amorphous phase, and at  $754\text{ cm}^{-1}$  appears the band that corresponds to the crystalline phase of PLA [7,8]. The chitosan spectrum shows bands at  $3256$  and  $3104\text{ cm}^{-1}$  due to O-H and N-H stretching vibrations. The bands at  $1659$  and  $1548\text{ cm}^{-1}$  are attributed to C=O stretching vibrations of the amide group (I and II). The stretching vibrations of C-H bond in C-H<sub>2</sub> are located at  $2868\text{ cm}^{-1}$ , the bands at  $890$  and  $1152\text{ cm}^{-1}$  correspond to wagging of the saccharide unit of chitosan, and the bands at  $1069$ – $1021\text{ cm}^{-1}$  are attributed to CH<sub>2</sub> bending vibration [32, 34]. The bands at  $2996\text{ cm}^{-1}$  and  $2943\text{ cm}^{-1}$  are assigned to the C-H stretching vibration. The FT-IR spectra of the composites are similar to the PLA spectrum.

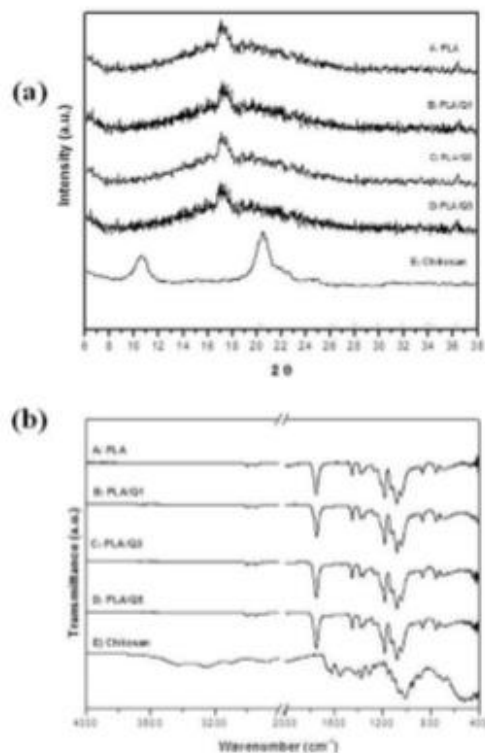


Figure 3. (a) X-ray diffraction patterns and (b) FT-IR spectra of A) PLA; PLA/chitosan composites with B) 1 wt % (PLA/Q1), C) 3 wt % (PLA/Q3), D) 5 wt % (PLA/Q5) chitosan, and E) chitosan.

The interaction of chitosan and PLA depends on the components, chemical structure, and the processing method used to integrate them. When the materials are fabricated by grafting lactic acid onto chitosan's amino group, the carbonyl group of PLA interacts with the hydroxyl groups in the structure of chitosan, creating ester and amide bonds which promote a displacement of the absorption bands in the FT-IR spectra and the presence of a new band at  $\sim 1728 \text{ cm}^{-1}$  that corresponds to the ester bond [22]. On the other hand, the two components do not interact when chitosan particles are only dispersed in the PLA matrix [25], as can be seen in our work.

### 3.5. Mechanical Properties of the PLA/Chitosan Composites

The mechanical properties of PLA and PLA/chitosan composites were investigated to find out the effect of chitosan in the PLA matrix. Typical stress-strain curves in tension are shown in Figure 4, and the relevant properties are given in Table 1. For PLA, the behavior is brittle, and the addition of chitosan improves the ductility. Regarding the effect of chitosan on the ultimate tensile strength, it increases  $\sim 14\%$  for the PLA/Q1 composite, but it decreases for higher chitosan contents. The modulus of elasticity decreases as the percentage of chitosan increases.

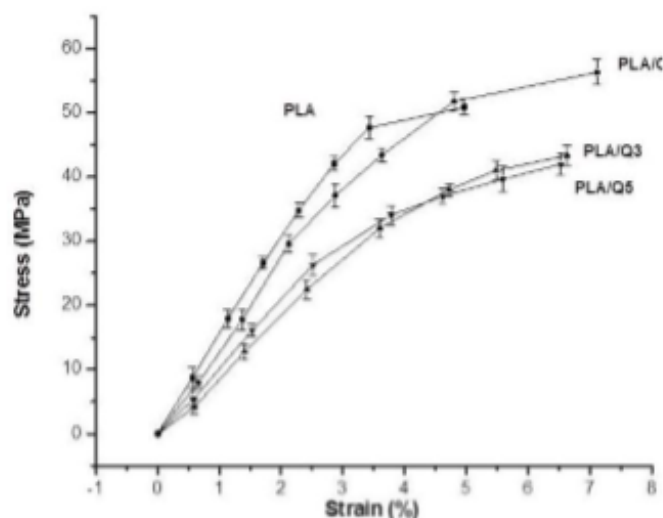


Figure 4. Stress-strain curves in tension of PLA and PLA/chitosan composites with 1 wt % (PLA/Q1), 3 wt % (PLA/Q3) and 5 wt % (PLA/Q5) chitosan.

Table 1. Relevant mechanical properties of Poly(lactic acid) (PLA) and Poly(lactic acid)/chitosan composites with different amounts of chitosan.

Sample	Amount of Chitosan (wt %)	Tensile Strength (MPa)	Young's Modulus (MPa)	Elongation at Break (%)
PLA	-	49.36 ± 4.44	1252 ± 62	4.97 ± 0.76
PLA/Q1	1	56.34 ± 2.64	1110 ± 66	7.12 ± 0.63
PLA/Q3	3	43.38 ± 3.29	983 ± 55	6.63 ± 0.54
PLA/Q5	5	42.19 ± 2.55	1051 ± 34	6.52 ± 0.86

The PLA/Q1 composite has a higher tensile strength ( $56.34 \pm 2.64$  MPa) than PLA ( $49.36 \pm 4.44$  MPa); this is due to a good dispersion of the particles in the matrix. The increase of the amount of particles impairs the homogeneous distribution and the interfacial adhesion, and favors the formation of chitosan agglomerates. This effect reduces the tensile strength of PLA/Q3 ( $43.38 \pm 3.29$  MPa) and PLA/Q5 ( $42.19 \pm 2.55$  MPa) composites. However, the tensile strengths of the PLA/chitosan composites are within the range of properties of a variety of tissues, and fulfill the requirements for biomaterial applications [35-37]. The decrease of the composites modulus of elasticity is due to the lower modulus of chitosan, and for the composites with 3 and 5 wt %, it is also due to the formation of chitosan agglomerates and weak interfacial adhesion at the chitosan-PLA interface.

#### 3.4. Biocompatibility of the PLA/Chitosan Composites

The degradability and biocompatibility of the PLA/chitosan composites were studied through a series of experiments that involved following the changes in pH as a function of time when the composites were

submerged in PBS medium, as well as the proliferation and adhesion of the human osteoblast cell line MG-63 (ATCC CRL-1427) on the composites surface. The results are presented in the following paragraphs.

#### 3.4.1. Hydrolytic Degradation of Composites in PBS

The effect of PLA, chitosan, and the composites in the pH of PBS as a function of the immersion time, is shown in Figure 5. It shows that the immersion of chitosan induces a decrease of the pH medium from ~7.4 to ~6.8 from the first day, and it varies relatively little thereafter. The change in pH of the PBS solution is negligible when the PLA and the composites are immersed, and it remains relatively constant at ~7.4 to 7.3.

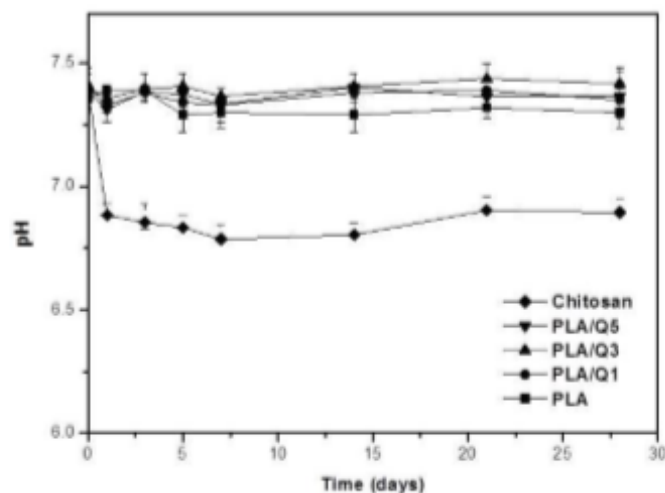


Figure 5. Changes in pH of PBS solution after different immersion times of PLA, chitosan, and PLA/chitosan composites with 1 wt % (PLA/Q1), 3 wt % (PLA/Q3), and 5 wt % (PLA/Q5) chitosan.

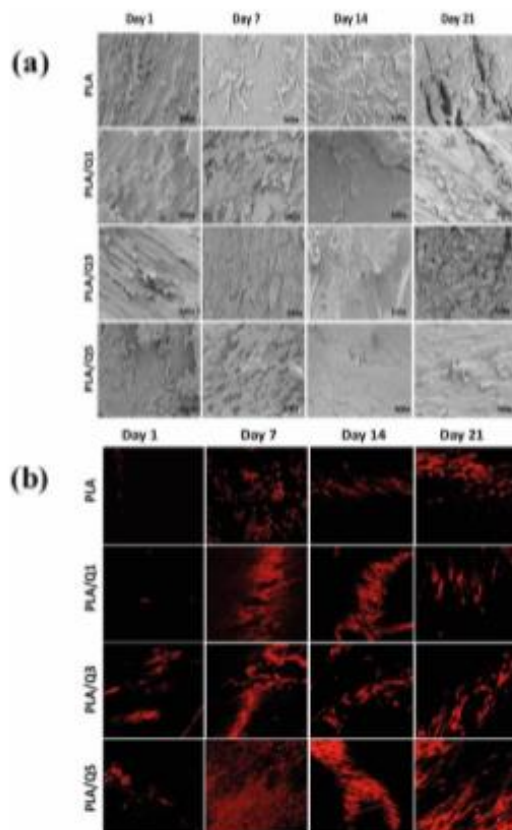
The composites and the PLA are hydrolytically stable, since the immersion tests in PBS showed only a slight change in the pH values that remain in the range of 7.4–7.3. On the other hand, immersion of chitosan decreased the pH value to 6.9, because it has cationic properties [18,19,38] with low charge density, and ~60% of the  $\text{NH}_2$  groups are deprotonated in neutral or basic medium; however there are electrostatic interactions between the anions present in the medium phosphate and the amino groups from the chitosan, which provoke the pH change of the solution medium. Similar behavior has been observed in molecules with phosphate groups and chitosan [38, 39]. The current results show that the composites obtained by extrusion using commercial PLA and a chitosan extracted from shrimp waste are suitable for biological applications. These results coincide with other research that obtained PLA/chitosan composites by a different fabrication process [22,23].

#### 3.4.2. Adhesion of MG-63 Osteoblasts on the Composites PLA/Chitosan

The adhesion and distribution of the MG-63 osteoblast cells on the PLA and the composites surface after different incubation times were studied by SEM and Confocal Microscopy; the images are visualized in Figure 6a,b, respectively. The PLA surface shows a good cell distribution and proliferative cell population that starts slowly from the first day, and increases with time. The cell adhesion and proliferation



on the PLA/Q1, PLA/Q3, and PLA/Q5 composite surfaces advances faster than that of a single PLA, and it is quicker as the chitosan content increases. After 7 days, the surfaces of the PLA/Q3 and PLA/Q5 composites are almost completely covered, and this condition is maintained until the end of the kinetic tests. The cells adhered on PLA, and composites showed a normal cytoskeletal rearrangement with actin filaments longitudinally distributed. The SEM analysis shows that the adhered cells maintained the osteoblasts characteristic ultrastructural morphology. The cells were elongated with membranal prolongations that allowed them to join to the biomaterial surface.



**Figure 6.** Adherence of MG-63 osteoblasts on PLA and PLA/chitosan composites after different incubation times. (a) SEM images taken at 500 $\times$ ; (b) Confocal microscopy images taken at 20 $\times$ , the actin cytoskeleton is shown in red.

The biological studies show that the MG-63 osteoblast cells are well adhered on the PLA and on the composites surfaces, and they present a characteristic and typical morphology that consists of membrane projections, some filopodia, and actin filaments longitudinally distributed. From the first test day, many cells adhered were viable and proliferate on the materials surfaces; this is due to the hydrophilic character of chitosan that influences cell adhesion and proliferation [40, 41]. Among the three composites, the



composites with 1 wt % (PLA/Q1) and 3 wt % (PLA/Q3) chitosan show greater osteoblast growth with respect to single PLA and to the composite with 5 wt % chitosan (PLA/Q5). Similar results have been reported with bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) on poly(lactic acid)/chitosan obtained by grafting, in which the increase of the ratio of chitosan/lactic acid favors a higher number of BMSC cells [22]. Some authors have reported a low number of cells, and variation in their viability, density, and distribution [42]. These variations are due to different cell types and composites fabrication methods; this has been attributed to electrostatic interactions with negatively charged molecules such as glycosaminoglycans that permit to retain and concentrate the growth factors that are secreted by the osteogenic cells, exerting a chemotactic effect and increasing the osteoconduction [43, 44].

### 3.4.3. Viability and Proliferation of MG-63 Osteoblasts on the PLA/Chitosan Composites

The viability of the cells adhered on the PLA and the biocomposites surface was analyzed qualitatively by fluorescence, and quantitatively by MTT assays. The results are presented in Figure 7a,b, respectively, where the viable cells are green and the non-viable ones are red. The PLA showed a low number of adhered cells compared with the composites, although the cells were viable. The three composites showed a high number of viable cells; only day 1 presented a small number of non-viable cells. These data are correlated with the quantitative results obtained in the MTT assays, and the results are shown in Figure 7b. Composites with 1 and 3 wt % chitosan show a maximum absorbance at 21 days, and they also present the highest values. For PLA and the composite with 5 wt % chitosan, the absorbance decreases after 14 and 7 days, respectively, because the available surface for cell proliferation is minimal due to the formed cell layers that already occupy the surface, as shown in Figure 6.

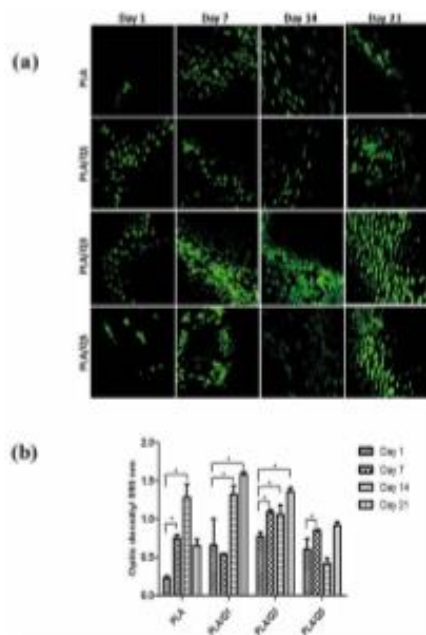


Figure 7. Viability and proliferation of osteoblasts on the PLA and PLA/chitosan composites surfaces. (a) Fluorescence of osteoblasts on PLA and composites. Viable cells are visualized in green and death cells are in red. Images were taken at 20 $\times$ ; (b) MTT metabolic activity of the osteoblasts on PLA and composites.

The biological tests therefore suggest the biocompatibility of PLA/chitosan composites, and they agree with the increase of the cell metabolic activity observed by MTT assays, promoting cell proliferation on the composite surface. In the case of the PLA/Q5 composite, metabolic activity decreases because the composite surface is completely covered with cells after only 7 days, and many cells die because of the limited surface that is still available for continuous growth, indicating that the cell death is not due to a cytotoxic effect, as has been described in other works [1,6,42,43].

#### 3.4.4. Qualitative Evaluation of Mineral Deposition on PLA/Chitosan Surfaces

The presence of mineralized nodules on the surface of PLA and composites was evaluated qualitatively by staining the cells with an Alizarin red solution; the results are shown in Figure 8. The behavior that is observed for each material follows the same trend perceived in the other assays shown in Figures 6 and 7. The PLA showed minimal mineralization at all evaluated test times. The PLA/chitosan composites showed a greater amount of mineral deposition, and presented an intense red staining, with nodules significantly bigger than those of PLA. This effect increases with time, starting on day 14, and is maintained until day 21. The chitosan addition to the composites significantly increases the mineralization. On day 14, there are many more mineralization nodules on the composite surfaces compared to PLA. The chitosan enhances the osteoblast mineralization due to its bioactive properties. The cells differentiate on the anionic matrix, absorbing calcium and phosphate ions, and then the calcification occurs by a nucleation and growth process [44,45].

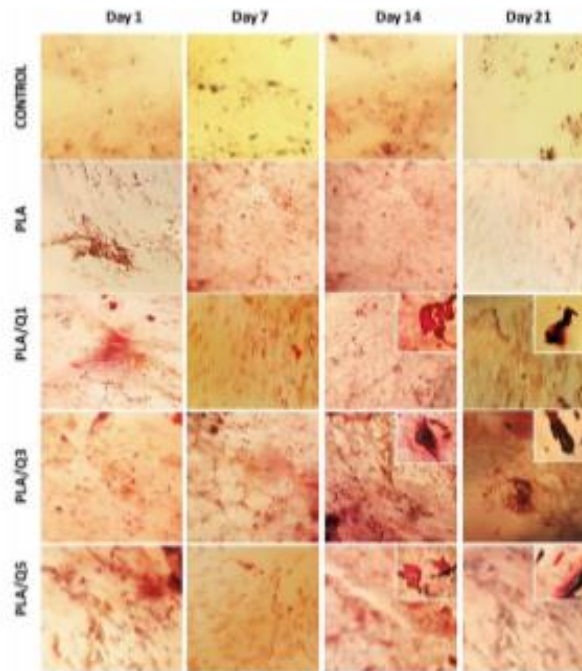


Figure 8. Osteoblasts grown on PLA and composites surfaces and mineralization. Cells were stained with Alizarin Red solution. Images were taken at 20x.

These results suggest that the PLA/chitosan composites can support the growth of bone tissue. However, it is necessary to investigate the expression of several proteins, such as alkaline phosphatase, osteopontin, osteonectin, and osteocalcin, among others, and some transcription factors like Runx2, to establish the osteoinductive characteristic of the composites.

#### 4. Conclusions

Composites of polylactic acid with 1, 3, and 5 wt % chitosan have been fabricated without the use of solvents by extrusion of chitosan particles extracted from shrimp exoskeletons and PLA, for the purpose of improving the biocompatibility of PLA alone. The investigation shows that the raw materials, composition, and fabrication with a low cost process implemented is reproducible, and does not compromise the biocompatibility of the biocomposites. The composites are non-toxic, and increasing the chitosan content favors cell adhesion, proliferation, and metabolic activity on the composites' surface. The composites are appropriate for the growth of MG-63 osteoblast cells, and further cell reproduction and mineralization. Their mechanical properties are suitable for biomaterial applications. The PLA/chitosan composites with 1–5 wt % chitosan are potential candidates for applications in tissue engineering, for use as scaffolds.

**Author Contributions:** Conceptualization, Y.G.T.-H., A.A.-T., L.T.-J., B.E.G.-P. and H.B.-R.; Formal analysis, Y.G.T.-H., G.M.O.-D. and H.B.-R.; Funding acquisition, H.B.-R.; Investigation, Y.G.T.-H. and G.M.O.-D.; Methodology, Y.G.T.-H.; Project administration, L.T.-J., B.E.G.-P. and H.B.-R.; Resources, A.A.-T., N.S.C.-J., B.E.G.-P. and H.B.-R.; Supervision, L.T.-J., B.E.G.-P. and H.B.-R.; Validation, Y.G.T.-H., G.M.O.-D., A.A.-T. and H.B.-R.; Writing—original draft, Y.G.T.-H., L.T.-J., B.E.G.-P. and H.B.-R.; Writing—review & editing, Y.G.T.-H., L.T.-J. and H.B.-R.

**Funding:** This work was supported by SIP/IPN project 2017 and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) project 222001.

**Acknowledgments:** Y.G.T.-H. and G.M.O.-D. received scholarships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Instituto Politécnico Nacional (IPN)-BEIFI. L.T.-J., B.E.G.-P. and H.B.-R. received support from IPN-COFAA, IPN-EDI and CONACYT-SNI. The technical support from IPN-Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) and the IPN-ENCB Electron Microscopy Central is highly appreciated.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Rodríguez-Vázquez, M.; Vega-Ruiz, B.; Ramos-Zúñiga, R.; Alexander Saldaña-Koppel, D.; Quiñones-Olvera, L.F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 821279, doi:10.1155/2015/821279.
2. Amini, A.; Laurencin, C.; Nukavarapu, S. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *40*, 363–405.
3. Vacanti, J.; Langer, R. Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* **1999**, *354*, 532–534.
4. Freed, L.E.; Vunjak-Novakovic, G.; Biron, R.J.; Eagles, D.B.; Lesnoy, D.C.; Barlow, S.K.; Langer, R. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **1994**, *12*, 689.
5. Razak, S.I.A.; Sharif, N.F.A.; Rahman, W.A.W.A. Biodegradable Polymers and their Bone Applications: A Review. *Int. J. Basic Appl. Sci.* **2012**, *12*, 31–49.
6. Tanase, C.E.; Spiridon, I. PLA/Chitosan/keratin composites for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *40*, 242–247.
7. Rasal, R.M.; Janorkar, A.V.; Hirt, D.E. Poly(lactic acid) modifications. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 335–356.
8. Balakrishnan, H.; Hassan, A.; Wahit, M.U.; Yussuf, A.A.; Razak, S.B.A. Novel toughened polylactic acid nanocomposite: Mechanical, thermal and morphological properties. *Mater. Des.* **2010**, *31*, 3289–3298.

9. Carrasco, F.; Fagés, J.; Gámez-Pérez, O.O.; Santana, M.L. Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. *Polym. Degrad. Stab.* 2010, *95*, 116–125.
10. Hamad, K.; Kaseem, M.; Yang, H.W.; Deri, F.; Ko, Y.G. Properties and medical applications of polylactic acid: A review. *Express Polym. Lett.* 2015, *9*, 435–455.
11. Rezwan, K.; Chen, Q.Z.; Blaker, J.J.; Boccaccini, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006, *27*, 3413–3431.
12. Scaffaro, R.; Lopresti, F.; Botta, L.; Maio, A. Mechanical behavior of polylactic acid/polycaprolactone porous layered functional composites. *Compos. Part B Eng.* 2016, *98*, 70–77.
13. Bleacha, N.C.; Nazhata, S.N.; Taunera, K.E.; Kellom, M.; Tormala, P. Effect of filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate-poly(lactide) composites. *Biomaterials* 2002, *7*, 1579–1585.
14. Xiao, L.; Wang, B.; Yang, G.; Gauthier, M. Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. In *Biomedical Science, Engineering and Technology*; IntechOpen: London, UK, 2012; doi:10.5772/23927.
15. Danoux, C.B.; Barbieri, D.; Yuan, H.; Bruijn, J.D.; Blitterswijk, C.A.; Habibovic, P. In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration. *Biomater* 2014, *4*, 2159–2535.
16. Busscher, H.J.; Engels, E.; Dijkstra, R.J.B.; Van Der Mei, H.C. Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth in vitro. *Eur. J. Oral Sci.* 2008, *116*, 493–495.
17. Wang, Y.; Wu, H.; Wang, Z.; Wen, D. Porous conductive chitosan scaffolds for tissue engineering II, in vitro and in vivo degradation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2005, *16*, 1017–1028.
18. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and application. *Prog. Polym. Sci.* 2006, *31*, 603–632.
19. Kumar, M.N.R. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 2000, *46*, 1–27.
20. Percot, A.; Viton, C.; Domard, A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules* 2003, *4*, 12–18.
21. Kandra, P.; Mohan, M.; Padma, J.H.K. Efficient use of shrimp waste: Present and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, *93*, 17–29.
22. Zhang, Z.; Cui, H. Biodegradability and Biocompatibility Study of Poly(Chitosan-g-lactic Acid) Scaffolds. *Molecules* 2012, *17*, 3243–3258.
23. Niu, X.; Feng, Q.; Wang, M.; Guo, X.; Zheng, Q. In vitro degradation and release behavior of porous poly(lactic acid) scaffolds containing chitosan microspheres as a carrier for BMP-2-derived synthetic peptide. *Polym. Degrad. Stab.* 2009, *94*, 176–182.
24. Wan, Y.; Wu, H.; Yu, A.; Wen, D. Biodegradable Polylactide/Chitosan Blend Membranes. *Biomacromolecules* 2006, *7*, 1362–1372.
25. Borilla, J.; Fortunati, E.; Vargas, M.; Chiralt, A.; Kenny, J.M. Effects of chitosan on the physicochemical and antimicrobial properties of PLA films. *J. Food Eng.* 2013, *119*, 236–243.
26. Almeida, C.R.; Serra, T.; Oliveira, M.I.; Planell, J.A.; Barbosa, M.A.; Navarro, M. Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: Unraveling the effect of 3-D structures on inflammation. *Acta Biomater.* 2014, *10*, 613–622.
27. Liu, X.; Ma, P.X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Ann. Biomed. Eng.* 2004, *32*, 477–486.
28. Yang, S.; Leong, K.F.; Du, Z.; Chua, C.K. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques. *Tissue Eng.* 2002, *8*, 1–11.
29. Murariu, M.; Dubois, P. PLA composites: From production to properties. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016, *107*, 17–46.
30. ASTM Standard D-638-10. "Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics-1." ASTM International, West Conshohocken, PA, USA DOI: 10.1520/D0638-10, 2010.
31. Correlo, V.M.; Boesel, L.F.; Bhattacharya, M.; Mano, J.F.; Neves, N.M.; Reis, R.L. Properties of melt processed chitosan and aliphatic polyester blends. *Mater. Sci. Eng.* 2005, *403*, 57–68.
32. Entsar, S.; Khaled, S.A.; Elsabee, M.Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresour. Technol.* 2006, *99*, 1359–1367.
33. Liu, X.; Khor, S.; Petinaki, E.; Yu, L.; Simon, G.P.; Dean, K.M.; Bateman, S. Effects of hydrophilic fillers on the thermal degradation of poly(lactic acid). *Thermochimica* 2010, *509*, 147–151.

34. Duarte, M.L.; Ferreira, M.C.; Marvão, M.R.; Rocha, J. An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, *31*, 1–8.
35. Ahmed, J.; Mulla, M.; Arfat, Y.A. Mechanical, thermal, structural and barrier properties of crab shell chitosan/graphene oxide composite films. *Food Hydrocoll.* **2017**, *71*, 141–148.
36. Mi, H.Y.; Salick, M.R.; Jing, X.; Jacques, B.R.; Crone, W.C.; Peng, X.F.; Turng, L.S. Characterization of thermoplastic polyurethane/polylactic acid (TPU/PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2013**, *33*, 4767–4776.
37. Shoufeng, Y.; Leong, K.F.; Du, Z.; Chua, C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Eng.* **2001**, *6*, 679–689.
38. Di Martino, A.; Sittering, M.; Risbud, M.V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* **2015**, *26*, 5983–5990.
39. Bhumkar, D.R.; Pokharkar, V.B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS PharmSciTech* **2006**, *7*, E138–E143.
40. Cai, K.; Yao, K.; Cui, Y.L.; Lin, S.; Yang, Z.; Li, X.; Xie, H.; Qing, T.; Luo, J. Surface modification of poly(D,L-lactic acid) with chitosan and its effects on the culture of osteoblasts in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 398–404.
41. Ho, M.H.; Liao, M.H.; Lin, Y.L.; Lai, C.H.; Lin, P.I.; Chen, R.M. Improving effects of chitosan nanofiber scaffolds on osteoblast proliferation and maturation. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 4293–4304.
42. Wan, Y.; Xiao, Y.C.; Zhang, S.; Wang, S.; Wu, Q. Fibrous poly(chitosan-g-DL-lactic acid) scaffolds prepared via electro-wet-spinning. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 876–886.
43. Wurm, M.; Moest, T.; Bergauer, B.; Rietzel, D.; Wilhelm, N.F.; Cifuentes, S.; Wilmowsky, C. In-vitro evaluation of Polylactic acid (PLA) manufactured by fused deposition modeling. *J. Biol. Eng.* **2017**, *29*, doi:10.1186/s13036-017-0073-4.
44. Wang, X.; Wang, G.; Liu, L.; Zhang, D. The mechanism of a chitosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39322.
45. Lai, G.J.; Shalumon, K.T.; Chen, S.H.; Chen, J. P. Composite chitosan/silk fibroin nanofibers for modulation of osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *111*, 288–297.



© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).