



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN NANOCIENCIAS Y  
NANOTECNOLOGÍA**

**“Nanomateriales de Quitosano, Hidroxiapatita y Nanotubos de  
Carbono en Ingeniería de tejido óseo”**

**T E S I S**

Que presenta

**M.C. ALEJANDRO GOMEZ SANCHEZ**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**

Directores de la Tesis:

**DR. GABRIEL LUNA BARCENAS**

**DR. EUGENY FEDEROVICH PROKHOROV**

**Ciudad de México**

**Febrero del 2020**

## ÍNDICE

Índice de Figuras.....	3
Índice de Tablas.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCION.....	9
1.1 Estado del arte.....	11
1.2 Antecedentes.....	14
1.3 Hidroxiapatita.....	18
1.4 Quitosano.....	19
1.5 Nanotubos de Carbono.....	22
1.6 Quitosano/HA.....	27
1.7 Quitosano/MWCNT.....	28
1.8 Quitosano/HA/MWCNT.....	32
JUSTIFICACIÓN.....	35
OBJETIVOS.....	37
HIPÓTESIS.....	37
2. METODOLOGÍA.....	38
2.1 Materiales.....	38
2.2 Síntesis de películas de Quitosano.....	38
2.3 Preparación de películas de CS/nHA.....	38
2.4 Oxidación de Nanotubos de Carbono (MWCNT).....	39
2.4.1 Funcionalización convencional de MWCNT.....	39
2.4.2 Funcionalización por microondas.....	40
2.4.3 Funcionalización por Soxhlet.....	41

2.5	Preparación de películas de CS/MWCNT .....	42
2.6	Preparación de películas de CS/nHA/MWCNT .....	43
2.7	Caracterización .....	43
2.8	Espectroscopia de impedancia.....	43
2.9	Pruebas mecánicas .....	44
2.9.1	Nanoindentación.....	44
2.9.2	Esfuerzo-deformación.....	46
2.9.3	DMA .....	47
3.	RESULTADOS .....	48
3.1	Quitosano/Hidroxiapatita (CS/HA) .....	48
3.1.1	FESEM.....	48
3.1.2	FTIR.....	49
3.1.3	XRD .....	50
3.1.4	TGA .....	51
3.1.5	Perfilometría óptica .....	53
3.1.6	pH de la solución .....	55
3.1.7	Pruebas dieléctricas .....	56
3.1.8	Pruebas mecánicas .....	58
3.1.9	Proliferación celular.....	65
3.1.10	Conclusiones del capítulo .....	66
3.2	Nanotubos de pared múltiple (MWCNT) .....	67
3.2.1	FTIR.....	67
3.2.2	SEM y TEM .....	68
3.2.3	XRD .....	69
3.2.4	RAMAN.....	70
3.3	Quitosano/Nanotubos de carbono multipared (CS/MWCNT) .....	72
3.3.1	FESEM.....	72

3.3.2	FTIR.....	73
3.3.3	TGA .....	74
3.3.4	Difracción de rayo X (XRD).....	76
3.3.5	Espectroscopia de impedancia.....	77
3.3.6	Pruebas mecánicas .....	80
3.3.7	Conclusión del capítulo.....	83
3.4	Quitosano/Hidroxiapatita /Nanotubos de carbono multipared/ (CS/nHA/MWCNT).....	84
3.4.1	FESEM.....	84
3.4.2	FTIR.....	86
3.4.3	Pruebas dieléctricas .....	92
3.4.4	Pruebas mecánicas .....	95
3.4.5	Conclusiones del capítulo .....	101
4.	Conclusiones de tesis .....	103
5.	BIBLIOGRAFÍA .....	104

## Índice de Figuras

Figura 1.	Publicaciones del compuesto CS/HA/MWCNT y su campo de estudio ( <a href="https://www.lens.org/">https://www.lens.org/</a> ) .....	12
Figura 2.	Estructura y composición del hueso humano [52] .....	15
Figura 3.	Estructura cristalina e ilustración esquemática de la hidroxiapatita estequiométrica (HA). La HA contiene cationes y aniones en su estructura y tiene una alta afinidad por las moléculas orgánicas. Las esferas azul, blanca, roja y amarilla son Ca, P, O y OH, respectivamente [74]. .....	19
Figura 4.	Estructura química del quitosano.....	21
Figura 5.	Tipos de nanotubos de carbono .....	23
Figura 6.	Interacción química entre CS/HA.....	28
Figura 7.	Interacción química entre el CS y CNT. ....	29
Figura 8.	Películas de CS/nHA.....	39

Figura 9. Método convencional de funcionalización de MWCNT a reflujo y filtrado a vacío.....	40
Figura 10. Funcionalización de MWCNT por microondas y grafica donde se muestra la potencia, presión y temperatura del vial. ....	40
Figura 11. Técnica por Soxhlet para funcionalización de MWCNT.....	41
Figura 12. Preparación de películas de CS/MWCNT.....	42
Figura 13. 4294A Precision Impedance Analyzer, 40 Hz a 110 MHz.....	44
Figura 14. a) Nanoindentador Hysitron b) muescas en película de CS.....	45
Figura 15. Texturometro para pruebas de tensión y compresión de películas. ....	46
Figura 16. Dimensiones de probeta para polímeros de la norma ASTM D638-Epsilon.....	47
Figura 17. Equipo DMA y tipo de muestras utilizadas.....	47
Figura 18. Micrografías FESEM de películas de CS/nHA. ....	48
Figura 19. Espectros FTIR de quitosano, películas CS-nHA con concentración de nHA indicada en el gráfico y polvo de nHA.....	50
Figura 20. Patrones de DRX de películas de CS, CS-nHA con 20, 40, 60, 80% en peso de polvo de nHA y nHA.....	51
Figura 21. TGA de películas de CS/nHA con diferentes wt. % de HA.....	52
Figura 22. Dependencia del contenido de agua de las películas CS-nHA en la concentración de nHA.....	53
Figura 23. Dependencia de rugosidad con concentraciones de nHA. ....	54
Figura 24. La rugosidad CS, CS/nHA10%, CS/nHA20% y CS/nHA30%. ....	55
Figura 25. Cambios de pH en diferentes soluciones al aumento de nHA.....	55
Figura 26. a) Dependencia de la conductividad DC ( $\sigma$ ) de las películas CS-nHA y b) dependencia de la constante dieléctrica en el límite de frecuencia cero ( $\epsilon_S$ ) obtenida en las películas CS-nHA.....	57
Figura 27. a) Dependencia de la pérdida dieléctrica frente a la frecuencia medida a 20 ° C en películas CS-nHA con 50 % en peso de nHA, utilizando el modelo empírico Cole-Cole [25]. b) Dependencia de la temperatura del tiempo de relajación versus 1/T para películas con 50% en peso de nHA c) Dependencia de la energía de activación de los grupos laterales de CS de OH en la concentración de nHA en películas de nanocompuestos.....	58
Figura 28. a) Grafica esfuerzo deformación de películas CS/nHA b) Compresión de películas CS/nHA, c) tensión. ....	60

Figura 29. a) Imagen donde se realizaron de 20 a 25 nanoindentaciones en una matriz de 30x30 $\mu\text{m}$ b) Curvas típicas de carga-profundidad c) dureza de películas del nanocompuesto CS/nHA d) Modulo Elástico reducido.....	61
Figura 30. Ilustración de partícula de relleno, región de interfase y matriz polimérica en un compuesto polímero-cerámica.....	63
Figura 31. Proliferación celular de películas de CS/nHA .....	66
Figura 32. Espectros FTIR de MWCNT puros y funcionalizados. ....	68
Figura 33. a) Mediciones de largo y ancho de f-MWCNT, b) fHNO <sub>3</sub> -MWCNT y c) fH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /NHO <sub>3</sub> -MWCNT .....	68
Figura 34. Micrografía STEM de MWCNT.....	69
Figura 35. Difractogramas de MWCNT .....	70
Figura 36. Espectroscopia Raman de diferentes MWCNT. What means f-MWCNT-con Madethesamedesignation .....	72
Figura 37. Imagen SEM de a) CS-f-HNO <sub>3</sub> -MWCNT con 1% en peso de MWCNT (escala 1 $\mu\text{m}$ ), b) CS-f-MWCNT con 8% en peso de MWCNT (escala 1 $\mu\text{m}$ ), c) CS-fH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /NHO <sub>3</sub> -MWCNT con 10% en peso de MWCNT (escala 1 $\mu\text{m}$ ). ....	73
Figura 38. Espectros FTIR de películas de CS/MWCNT con diferentes porcentajes de MWCNT.....	74
Figura 39. Dependencia de la pérdida de peso contra concentración de MWCNT en películas de CS/MWCNT.....	75
Figura 40, Análisis termogravimétrico de películas CS/MWCNT.....	76
Figura 41. Difractogramas de XRD de películas CS/MWCNT .....	77
Figura 42. Dependencia de la conductividad eléctrica en películas CS/MWCNT.....	78
Figura 43. Cuervas esfuerzo-deformación de películas CS/MWCNT .....	80
Figura 44. Modulo Elástico de películas CS/MWCNT a) con MWCNT funcionalización química b) con MWCNT funcionalizados por sigma.....	81
Figura 45. Perfil de indentación en películas de CS/MWCNT .....	82
Figura 46. a) Dureza de películas CS/MWCNT y b) Modulo Elástico .....	83
Figura 47. CS/MWCNT3%/nHA20% b) CS/MWCNT3%/nHA50% c) CS/MWCNT3%/nHA80% .....	85
Figura 48. La figura a muestra la imagen SEM de CS-nHA (30% en peso de nHA), CS-MWCNT (3% en peso de MWCNT, figura b); CS-nHA (20% en peso) - MWCNT (3% en peso) (Fig. C); CS-nHA (50% en peso) - MWCNT (3% en peso) (Fig. D); CS-nHA (70% en peso) - MWCNT (3% en peso) (Fig. D).....	86

Figura 49. Espectros de infrarrojos de películas CS/MWCNT/nHA a) con 3 % y 40 % de MWCNT y nHA y b) con 0.5 % y 5 % nHA respectivamente. ....	89
Figura 50. FTIR de películas de CS/nHA/MWCNT con 10 % de nHa constante y MWCNT de 0.5 %-4 %.....	90
Figura 51. Espectros de FTIR de polvos de MWCNT-f y nHA.....	91
Figura 52. Dependencias de conductividad y constante dieléctrica de películas CS -nHA (40% en peso) en concentración de MWCNT. La línea roja se ajusta usando la ecuación (A). Las líneas verticales muestran la desviación estándar obtenida en las mediciones de 4 muestras.....	92
Figura 53. Dependencias de conductividad y constante dieléctrica de películas CS-MWCNT (3% en peso) en concentración de nHA .....	93
Figura 54. Dependencias de conductividad y constante dieléctrica de películas CS -MWCNT (6% en peso) en concentración de nHA. ....	94
Figura 55. Conductividad eléctrica con 3 % y 0.5 % de MWCNT .....	95
Figura 56. Modulo elástico de películas CS/MWCNT/nHA .....	96
Figura 57. Módulo de almacenamiento y módulo de pérdida de películas CS/MWCNT/nHA .....	98
Figura 58. Tan delta de películas CS/MWCNT/nHA.....	99
Figura 59. Análisis de películas de CS/MWCNT/nHA a) Modulo de almacenamiento y perdida b) tan delta .....	101

## Índice de Tablas

Tabla 1. Propiedades mecánicas del hueso compacto (cortical) y esponjoso. Reproducido y modificado [41].....	16
Tabla 2. Módulo de Young (GPa) (de acuerdo a varios niveles de arquitectura). Modificado de [42]–[44] como se indica en la tabla. ....	17
Tabla 3 Lugar de fractura y método de fijación en 117 casos. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Tabla 4 Tipo de fijación y la tasa de fracaso de los implantes en 117 fracturas. ... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Tabla 5. Rugosidad de películas de CS/nHA. ....	54

## RESUMEN

Los polímeros naturales y sintéticos están disponibles para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo, pero pueden carecer de integridad mecánica. El objetivo de este trabajo es investigar las propiedades de la capa interfacial y las interacciones de las nanopartículas dentro del material quitosano-nanohidroxiapatita-nanotubos de carbono de pared múltiple (CS/nHA/MWCNT) mediante la caracterización del material y el análisis de espectroscopia dieléctrica, para el desarrollo de un nanocompuesto biocompatible, biodegradable y mecánicamente estable. Los fenómenos de percolación mecánicas y dieléctricas en películas de CS/nHA se observan en concentraciones de 30-40% nHA, en películas de CS/MWCNT a concentración de 3% MWCNT y para las películas de CS/nHA/MWCNT baja en ambos casos a 5% nHA y 0.5% MWCNT, reduciendo considerablemente los porcentajes de nHA y MWCNT, esto causa que la dureza, el módulo elástico reducido, la conductividad y la constante dieléctrica exhiben una fuerte dependencia de la concentración de nanopartículas de tal manera que los valores máximos cambian a concentraciones mas bajas. Se utiliza un modelo trifásico para incluir la matriz de quitosano, las nanopartículas de hidroxiapatita, los MWCNT y la capa interfacial con una constante dieléctrica superior a la del quitosano, los MWCNT y la hidroxiapatita. Esta capa entre nanopartículas y matriz se debe a fuertes interacciones entre los grupos laterales de quitosano con  $\text{PO}_4^{3-}$  de hidroxiapatita y los grupos hidroxilo de los MWCNT. Al realizar simulaciones de mediciones de espectroscopía en el rango de frecuencia Hz-GHz, mostramos que un máximo en todas las propiedades se puede rastrear hasta la existencia de superposición y disminución del grosor de la capa interfacial. Nuestro estudio propone un enfoque sistemático para diseñar materiales inteligentes para la ingeniería del tejido óseo. El nanocompuesto de Quitosano, Hidroxiapatita y Nanotubos de Carbono fue caracterizado con microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis de difracción de rayos X (XRD), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), análisis térmico gravimétrico (TGA), espectroscopia Raman, Perfilometría, crecimiento celular

por MTT y MTS, espectroscopia dieléctrica y propiedades mecánicas por nanoindentación, análisis dinámico (DMA) y pruebas típicas esfuerzo-deformación.

## ABSTRACT

Natural and synthetic polymers are available for bone tissue engineering applications but may lack mechanical integrity. The objective of this work is to investigate the properties of the interfacial layer and the interactions of nanoparticles within the chitosan-nanohydroxyapatite-multi-carbon carbon nanotubes (CS/nHA/MWCNT) material by characterizing the material and dielectric spectroscopy analysis, for the development of a biocompatible, biodegradable and mechanically stable nanocomposite. Mechanical and dielectric percolation phenomena in CS / nHA films are observed in concentrations of 30-40% nHA, in CS / MWCNT films at a concentration of 3% MWCNT and for CS / nHA / MWCNT films in both cases at 5% nHA and 0.5% MWCNT, considerably reducing the percentages of nHA and MWCNT, this causes that the hardness, the reduced elastic modulus, the conductivity and the dielectric constant exhibit a strong dependence on the concentration of nanoparticles in such a way that the values high change at lower concentrations. A three-phase model is used to include the chitosan matrix, hydroxyapatite nanoparticles, MWCNT and the interfacial layer with a dielectric constant higher than that of chitosan, MWCNT and hydroxyapatite. This layer between nanoparticles and matrix is due to strong interactions between the chitosan side groups with PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> hydroxyapatite and the hydroxyl groups of the MWCNT. By performing simulations of spectroscopy measurements in the Hz-GHz frequency range, we show that a maximum in all properties can be traced to the existence of overlap and decrease in the thickness of the interfacial layer. Our study proposes a systematic approach to design intelligent materials for bone tissue engineering. The nanocomposite of Chitosan, Hydroxyapatite and Carbon Nanotubes was characterized with field emission scanning electron microscopy (FESEM), transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction analysis (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy ( FTIR), thermal gravimetric analysis (TGA), Raman spectroscopy, profilometry, cell growth by MTT and

MTS, dielectric spectroscopy and mechanical properties by nanoindentation, dynamic analysis (DMA) and typical stress-strain tests.

## 1. INTRODUCCION

La hidroxiapatita (HA),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  es el principal componente del hueso y se usa ampliamente en la ingeniería de tejido óseo. La HA se fabrica en muchas formas y se puede preparar como andamios de cerámica, polvo o cerámica porosa densa [1]. Recientemente, la hidroxiapatita de tamaño nano (nHA) se está utilizando ampliamente debido a sus propiedades análogas al hueso, posee cristales de HA con una dimensión de aprox. 20-60 nm [2]. Además, la nHA exhibe un área de superficie alta y una estructura similar a la de la apatita biológica de los huesos que ayuda a promover la adhesión de proteínas y la proliferación de células [3], una mayor biocompatibilidad y dureza mecánica [1], simula la actividad de los osteoblastos y mejora los factores de crecimiento local cuando se compara con HA pura [4]. Por lo tanto, en la literatura existe una gran cantidad de publicaciones sobre la preparación de nanocompuestos de nHA en diferentes matrices, desarrollo de membranas bioactivas, hidrogeles de cerámica y recubrimientos que utilizan nanopartículas de HA (ver, por ejemplo [5]–[7]).

En este sentido, la nHA puede representar una clase prometedora de material de injerto óseo, sin embargo, la fragilidad y la baja resistencia mecánica a tensión de la nHA hacen que no sea adecuada para su aplicación en ingeniería de tejido óseo [3]. En consecuencia, la nHA a menudo se combina con varios polímeros para mejorar sus propiedades.

Muchas publicaciones (véase, por ejemplo, [3], [8]–[13]) proponen utilizar el quitosano (CS) como material adecuado para la ingeniería de tejidos debido a su similitud química con las moléculas biológicas, compatibilidad de tejidos, bioreabsorbibilidad, actividad antibacteriana, características de capacidad hemostáticas. de modificaciones químicas e interacción con HA. Estas características hacen que el quitosano sea un candidato ideal para la ingeniería de tejidos; sin embargo, la estructura del quitosano-nano-hidroxiapatita (CS-nHA) no se ha abordado completamente a pesar de la gran cantidad de publicaciones

dedicadas a investigar la estructura, las propiedades mecánicas, la viabilidad celular y la proliferación. Aun no se han informado sus propiedades eléctricas y su dependencia de las diferentes relaciones entre CS y nHA. En general, se requieren valores máximos de propiedades mecánicas en un compuesto para el desarrollo de materiales de injerto óseo.

Sin embargo, a pesar de la bioactividad del CS y nHA, sus propiedades mecánicas para la ingeniería de tejidos, especialmente para tejido óseo no son suficientes. Para resolver esta limitante, en algunos artículos se ha reportado la adición de nanotubos de carbono (CNT) a los compósitos CS-HA. La introducción de CNT resulta atractiva en la ingeniería de tejidos, dado que ellos poseen buenas propiedades mecánicas.

Es importante notar que los compósitos con rellenos conductores (como los CNT) inmersos en polímeros aislantes (como el CS) se convierten en conductores cuando el contenido del relleno sobrepasa un valor crítico, conocido como umbral de percolación. En el umbral de percolación se produce un incremento abrupto, en varios órdenes de magnitud, de la conductividad eléctrica. El valor del umbral está en correspondencia con el wt. % del relleno conductor que es capaz de formar una microestructura interconectada aleatoriamente dentro del compuesto. Los compósitos CNT/polímeros, poseen un umbral de percolación muy bajo (entre 0.5 y un poco más en wt. %). Ello es debido a la alta relación de proporcionalidad entre longitud y diámetro de los nanotubos, así como de sus dimensiones nanométricas.

A concentraciones mayores a la correspondiente a la percolación mecánica, las propiedades mecánicas de los compósitos CS-CNT se saturan o inclusive decrecen [5], [6]. Aunque tanto el umbral de percolación de conductividad como el umbral de percolación mecánico dependen del wt. % de los CNT, de su alta relación de proporcionalidad entre longitud y diámetro y de su interacción con la matriz polimérica.

La misma situación con esta investigación las propiedades eléctricas de CS-nHA-CNT. Sus propiedades y su dependencia de la relación entre diferentes concentraciones de CS, nHA y CNT no se han investigado en el amplio rango de concentraciones.

Es necesario tener en cuenta que, debido a la alta conductividad iónica de los compuestos, es importante investigar sus propiedades eléctricas que juegan un papel importante en el diseño de los implantes óseos. Los huesos generan biopotencial eléctrico que afecta la regeneración ósea. Por lo tanto, la conductividad de los implantes debe ser menor que la conductividad del hueso que no desvíe los "potenciales generados por tensión" en los

tejidos circundantes y no produzca corrientes eléctricas que afecten el rendimiento y el rechazo de los implantes [13], [14]. Se requiere información adicional y detallada sobre las propiedades dieléctricas de tales compuestos para asegurar la biocompatibilidad de un implante ya que su constante dieléctrica debe ser similar a la de los tejidos y huesos humanos [12].

### 1.1 Estado del arte

En recientes años, un desarrollo significativo se ha hecho en sustitución de órganos, la reconstrucción quirúrgica y el uso de prótesis artificiales para el tratamiento de pérdida o falla de un órgano o tejido [15]. Los implantes ortopédicos e injertos se han utilizado para tratar diversos defectos por trauma o enfermedad, estos métodos tradicionales de tratamiento se complican por la posibilidad de infección, cicatrización inadecuada, hueso insuficiente para sellar por completo [16], [17] en la nanotecnología y la ingeniería de tejidos se tienen maneras prometedoras para reparar y reemplazar el hueso [18], [19]. Generalmente, un andamio de ingeniería de tejidos debe satisfacer varios criterios esenciales. Debe ser: biocompatible con la estructura para minimizar la respuesta al tiempo que maximiza el crecimiento celular y el tejido de integración; biodegradable con una tasa de degradación favorable, permitiendo que los andamios proporcionen soporte estructural para el crecimiento celular inicial y luego la degradan gradualmente después de la formación de nuevo tejido; y poseer propiedades mecánicas apropiadas para apoyar el crecimiento del tejido bajo cargas dinámicas y estáticas, tener una óptima conductividad y también alta resistencia a la corrosión [17], [20].

Un análisis detallado de las publicaciones revela que las mejores propiedades mecánicas de CS-Ha (resistencia a la compresión, módulo de compresión) de diferentes estructuras (membranas o andamios) y métodos de preparación se obtuvieron a concentraciones específicas de CS y HA (4 g de CS y 0.5 M de solución de nHA [21]; relación CS: HA 2:8 [22]; 40 % en peso de Ha [23]; 10 % de nHA [24]; relación CS:HA 40:60 [25]; 100:15 CS: HA ratio [26]. Es de destacar que cualquier otra combinación de concentración de CS y HA, ya sea mayor o menor que las informadas, las propiedades mecánicas se reducen considerablemente.

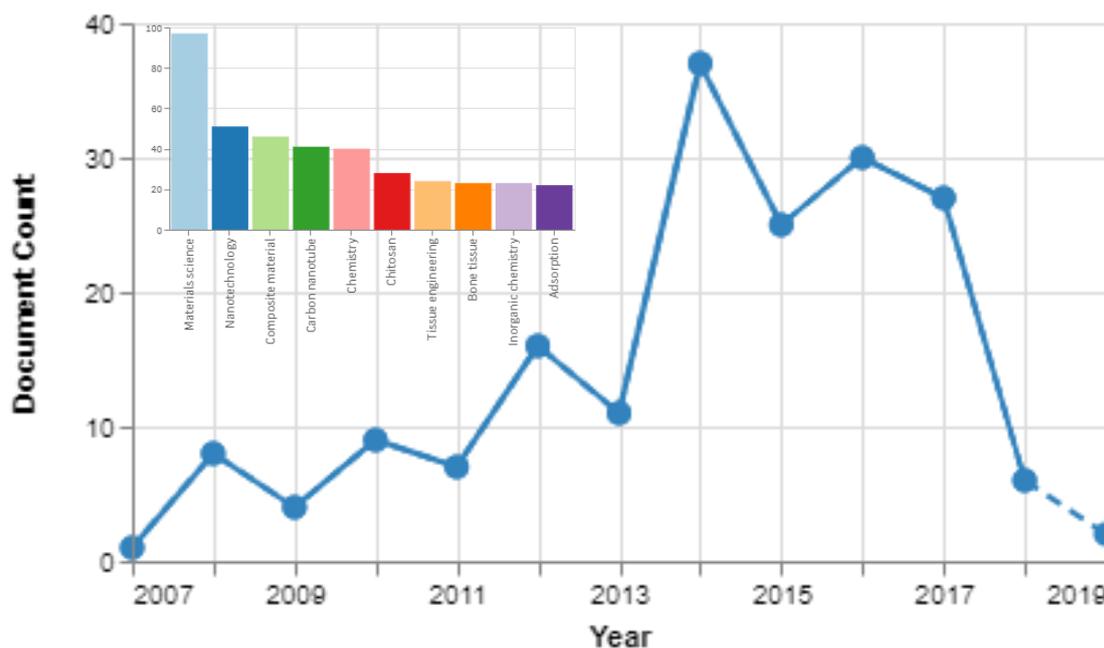


Figura 1. Publicaciones del compuesto CS/HA/MWCNT y su campo de estudio (<https://www.lens.org/>)

En la literatura se han propuesto varios métodos de dispersión de MWCNT en la matriz del polímero que han sido utilizados para este propósito, tales como la deposición superficial controlada y el proceso de reticulación [27], el método de evaporación de solución simple [28], la separación de fases inducida térmicamente seguido por secado por congelación [29], electrodeposición [30], técnica de rocío capa por capa [31], accionamiento eléctrico [32] y el método de hilatura en húmedo [33].

Sobre concentraciones de MWCNT en literatura se reportan mejoras en propiedades mecánicas del nanocompuesto. El nanocompuesto de CS/MWCNT mejorando el comportamiento mecánico con concentraciones del 5 % en peso de MWCNT en mediciones de 5 y 10 % [34]. En estudios con la adición de sólo 1 % en peso de MWCNT a la matriz de CS puede mejorar el módulo de elasticidad a la tracción y resistencia a la tracción en alrededor de 47 % y 33 %, respectivamente [35]. En otra publicación las propiedades mecánicas, incluyendo el módulo de tracción y la fuerza, de los nanocompuestos se mejoran en gran medida por aproximadamente 93% y 99%, respectivamente, con la incorporación de sólo el 0.8 % en peso de MWCNT en la matriz de quitosano. Con mediciones de 0.2, 0.4, 0.8 y 2 % de MWCNT [36] mejoran considerablemente las propiedades mecánicas.

Existen diferentes métodos de funcionalización de MWCNT usando diferentes ácidos, con el fin de tener grupos funcionales en la superficie del nanotubo y anclar otro tipo de

material a estos grupos (hidroxilo y carboxilo entre otros). Como resultado han sido introducidos en la superficie de MWCNT grupos funcionales carboxilos e hidroxilos. Además, la presencia de grupos de amino en el CS promueve la formación de enlaces de hidrogeno entre los MWCNT funcionalizados y el CS que puede afectar en la resistencia mecánica y a la conductividad del nanocompuesto. La funcionalización de MWCNT se puede conseguir por la modificación de la superficie con una solución de ácido nítrico y con ácido sulfúrico. En general, la funcionalización de MWCNT se lleva a cabo en superficie con COOH, OH, SH y amida con polímeros tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico y diversos polímeros naturales, entre los métodos de funcionalización destacan la funcionalización fotoquímica de nanotubos [37]. En los últimos 3-4 años una amplia gama más fiable de funcionalización de MWCNT está disponible, los MWCNT se calientan a reflujo en ácido nítrico y sulfúrico para producir grupos hidroxilo, carbonilo, y carboxilo en defectos en la red atómica del carbono. Los grupos hidroxilo y carbonilo anteriormente mencionados se oxidan adicionalmente a los grupos carboxilo por tratamiento con permanganato de potasio y ácido perclórico, mediada por la formación de amida entre MWCNT modificado y grupos carboxilo [38]. Los MWCNT funcionalizados tienen buena dispersión en agua, pueden ser considerados para la aplicación biomédica. Se han observado crecimientos celulares de osteoblastos en los compuestos de MWCNT con andamios al andamiaje normal. Esto indica que los MWCNT funcionalizados pueden fácilmente interactuar con células y aumentar toda la función metabólica celular. Los andamios de polimérico MWCNT y el polímero pueden fácilmente inducir la mineralización con el cuerpo estimulando solución fluida en la etapa anterior. Esta propiedad biomimética es una importante función de la mineralización ósea [39].

En otro artículo reportan con el compuesto CS/MWCNT/HA el módulo elástico y resistencia a la compresión un aumento de 509.9 a 1089.1 MPa y 33.2 a 105.5 MPa con un aumento de relaciones en peso de CS de MWCNT de 0 a 5 %, respectivamente [40]. Como conclusión la mejor concentración de MWCNT en CS que permite mejorar propiedades mecánicas está a discusión.

En la revisión bibliográfica hay seis publicaciones sobre el compuesto CS/HA/MWCNT para aplicación en ingeniería de tejidos y en las Figura 1 se muestran las publicaciones generales sobre el compuesto. En estos artículos se presentan resultados de investigación sobre síntesis y caracterización del compuesto [40], [41], efectos de dopaje en MWCNT

en la viabilidad biomimética [42], efecto del pH en la corrosión [43] y recubrimiento del compuesto en Ti [44], [45]. Existe la descripción del compuesto CS/MWCNT o CS/HA con varias publicaciones de propiedades mecánicas y crecimiento celular, cabe resaltar que no hay investigaciones sobre propiedades eléctricas, dieléctricas e investigación que relación entre dos componentes tienen mejores propiedades en la ingeniería de tejidos con estos nanomateriales.

## 1.2 Antecedentes

El hueso consiste en 69% en peso de fosfato de calcio (principalmente hidroxiapatita), 21% de colágeno, 9% de agua y 1% de otros componentes. Tiene una naturaleza con un complejo arreglo jerárquico y una microestructura muy difícil de imitar. El hueso como órgano tiene junto a su compleja composición celular una arquitectura altamente especializada orgánica-inorgánica que puede clasificarse como tejido micro y nanocompuesto. Su matriz mineralizada consiste en: [46]

- 1) una fase orgánica (principalmente colágeno, 35% de peso seco) responsable de su rigidez, viscoelasticidad y tenacidad;
- 2) una fase mineral de HA (65% en peso seco) para refuerzo estructural, rigidez y homeostasis mineral;
- 3) otras proteínas no colágenas que forman un microambiente estimulante de las funciones celulares.

Como se mencionó el tejido óseo exhibe una organización estructural jerárquica que es distinta en numerosos niveles, incluida la macroestructura (hueso esponjoso y cortical), la microestructura (sistemas harversianos, osteones, trabeculas), la subestructura (laminillas), la nanoestructura (fibrilar, colágeno y minerales incrustados) y subnanoestructura (estructura molecular de los elementos constituyentes, tales como proteínas orgánicas minerales, de colágeno y no colágenas) [20], observar la Figura 2. Macroscópicamente, el hueso consiste en una densa capa dura y cilíndrica de hueso cortical a lo largo del eje del hueso que se adelgaza a mayor distancia desde el centro del eje hacia las superficies articulares. El hueso cortical abarca cantidades cada vez mayores de hueso trabecular poroso (también llamado hueso esponjoso) en los extremos proximal y distal para optimizar la transferencia de carga articular [46]. En los seres humanos, el hueso trabecular tiene una porosidad de 50-90 % con un espaciado trabecular promedio

de alrededor de 1 mm y una densidad promedio de aproximadamente  $0.2 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  [47], [48]. El hueso de la corteza tiene una estructura mucho más densa con una porosidad de 3-12 % y una densidad promedio de  $1,80 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  [48], [49]. En una escala microscópica, los puntales trabeculares y el hueso cortical denso están compuestos de fibras de colágeno mineralizadas apiladas paralelas para formar capas, llamadas laminillas ( $3\text{--}7 \mu\text{m}$  de espesor) y luego apiladas de manera  $\pm 45^\circ$  [46]. En el hueso maduro, estas laminillas se envuelven en capas concéntricas ( $3\text{--}8$  laminillas) alrededor de una parte central llamada canal Haversiano, que contiene nervios y vasos sanguíneos para formar lo que se denomina Osteon (o sistema Haversian), una estructura cilíndrica que corre aproximadamente paralela al eje largo del hueso [20]. A nivel nanoestructural, las estructuras más prominentes son las fibras de colágeno, rodeadas e infiltradas por minerales. En el nivel subnanoestructural, tres materiales principales son los cristales de hueso, las moléculas de colágeno y las proteínas orgánicas no colágenas [20]. La matriz ósea mineralizada está poblada por cuatro células óseas activas: osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y células de revestimiento óseo. Otros tipos de células están contenidas dentro de la médula ósea que llena el canal intramedular central del eje óseo y los espacios intertrabeculares cerca de las superficies articulares [50]. El hueso debe definirse como un órgano compuesto por diferentes tejidos y también sirve como un depósito mineral afectado y utilizado por el sistema endocrino del cuerpo para regular (entre otros) la homeostasis del calcio y el fosfato en los fluidos corporales circulantes. Además, estudios recientes indican que el hueso ejerce una función endocrina en sí mismo al producir hormonas que regulan la homeostasis del fosfato y la glucosa, integrando el esqueleto en la homeostasis global de nutrientes y minerales [51].

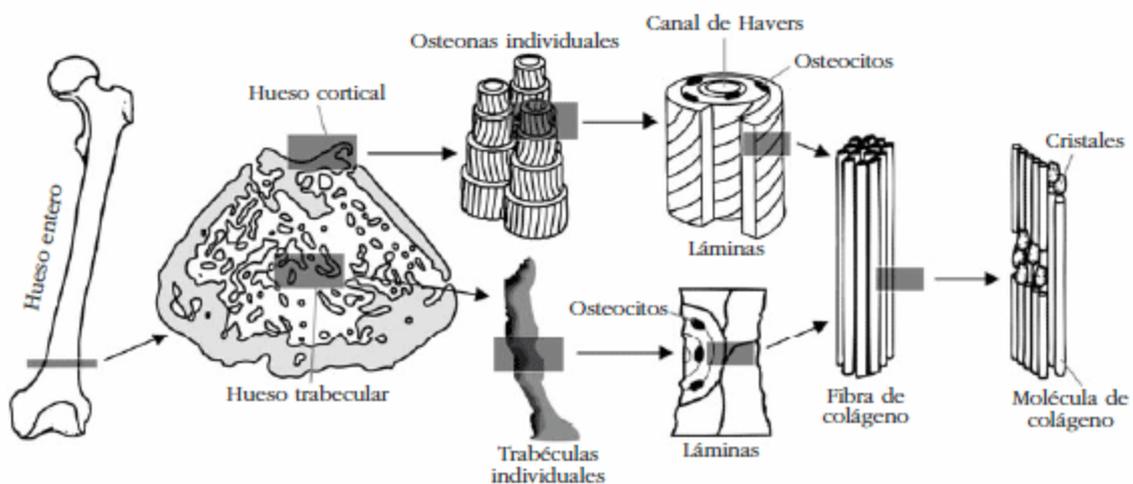


Figura 2. Estructura y composición del hueso humano [52]

El hueso es una forma altamente dinámica de tejido conectivo que se remodela continuamente (la extirpación orquestada del hueso por los osteoclastos, seguida de la formación de hueso nuevo por los osteoblastos) para adaptar de forma óptima su estructura a las demandas funcionales cambiantes (carga mecánica, estado nutricional, etc.). Desde el punto de vista de la ciencia de materiales, la matriz ósea es un material compuesto de una matriz de fibra laminar de polímero-cerámica y cada uno de estos aspectos de diseño y materiales influye en las propiedades mecánicas del tejido óseo [53]. Las propiedades mecánicas dependen de la composición ósea (porosidad, mineralización, etc.) así como de la organización estructural (arquitectura del hueso trabecular o cortical, orientación de la fibra de colágeno, daño por fatiga, etc.) [54]. El colágeno posee un módulo de Young de 1-2 GPa y una resistencia a la tracción máxima de 50-1000 MPa, en comparación con el mineral de hidroxiapatita que tiene un módulo de Young de aproximadamente 130 GPa y una resistencia a la tracción máxima de ~ 100 MPa. Las propiedades mecánicas resultantes de los dos tipos de tejido óseo, a saber, el hueso cortical y el hueso esponjoso, se muestran en la Tabla 1. Se ha informado que la edad y los cambios relacionados en la densidad ósea influyen sustancialmente en las propiedades mecánicas del hueso [55]. Como se describió anteriormente, el hueso muestra una organización estructural jerárquica distinta y, por lo tanto, es importante definir también las propiedades mecánicas en los niveles microestructurales Tabla 2. Aunque el hueso esponjoso y cortical puede ser del mismo tipo de material, la maduración del material del hueso cortical puede alterar las propiedades mecánicas a nivel microestructural.

Tabla 1. Propiedades mecánicas del hueso compacto (cortical) y esponjoso [56]

<i>Propiedad</i>	<i>Hueso cortical</i>	<i>Hueso esponjoso</i>
<i>Resistencia a la compresión / MPa</i>	100-230	2-12
<i>Flexión, resistencia a la tracción / MPa</i>	50-150	10-20
<i>Tensión a la fractura %</i>	1-3	5-7
<i>Tenacidad a la fractura / MPa</i>	2-12	-
<i>Módulo de Young / GPa</i>	7-30	0.5-0.05

Tabla 2. Módulo de Young (GPa) (de acuerdo con varios niveles de arquitectura) [57]–[59]

<i>Arquitectura</i>	<i>El módulo de Young</i>
<i>Espécimen húmedo (macroestructural)</i>	14-20
<i>Espécimen húmedo (microestructural)</i>	5.4
<i>Espécimen seco (subestructura)</i>	22

También se sabe que el tejido óseo es mecano-receptivo; Tanto la remodelación ósea normal como la fractura o la cicatrización del defecto están influenciadas por estímulos mecánicos aplicados en el sitio del defecto de regeneración y en el tejido óseo circundante [60]–[63]. En contraste con la mayoría de los otros órganos en el cuerpo humano, el tejido óseo es capaz de una verdadera regeneración, es decir, de curación sin la formación de tejido cicatricial fibrótico [64]. Un parámetro importante en la proliferación celular y la estimulación de crecimiento es la constante dieléctrica en el cuerpo humano como se observa en la tabla 3. Durante el proceso de curación, los pasos básicos del desarrollo del hueso fetal se recapitulan y el hueso regenerado de esta manera no difiere estructural ni mecánicamente del tejido óseo no dañado circundante [65]. Los parámetros dieléctricos del compuesto HA-quitosano son los mismos que los de ciertos componentes biológicos del cuerpo humano. En la Tabla 3 se presenta un estudio comparativo de los parámetros dieléctricos de los órganos humanos y su relación HA:CS [12].

Tabla 3. Constantes dieléctricas de órganos humanos y su relación HA:CS en %

<i>Órgano humano a 37 ° C</i>	<i>Constante Dieléctrica a 3 GHz</i>	<i>Composición de HA:Chitosan</i>
<i>Colágeno in vitro</i>	5.5–6.5	1:19
<i>Médula ósea in vitro</i>	4.2–5.8	1: 9
<i>Grasa de la pared abdominal</i>	4,92	2: 1
<i>Grasa en el pecho humano</i>	3.94	4: 1

Sin embargo, a pesar de esta tremenda capacidad de regeneración, el 5-10% de todas las fracturas son propensas a una unión ósea retrasada o progresarán hacia una no unión y el desarrollo de una pseudoartrosis [66], [67]. Junto con los grandes defectos óseos traumáticos y la pérdida extensa de sustancia ósea después de la resección del tumor o la cirugía de revisión después de las artroplastias fallidas, estas afecciones patológicas aún representan un desafío importante en la práctica clínica actual. La gama de materiales de

injerto óseo disponibles para tratar tales problemas en la práctica clínica moderna incluye esencialmente hueso autólogo (del mismo paciente), hueso alogénico (de un donante) y matrices de hueso desmineralizado, así como una amplia gama de biomateriales de hueso sustitutos sintéticos. tales como metales, cerámicas, polímeros y materiales compuestos. Durante las últimas décadas, las estrategias de ingeniería de tejidos para restaurar la función clínica han despertado un interés científico y comercial considerable en el campo de la cirugía ortopédica, así como en la cirugía reconstructiva y oromaxilofacial. Sin embargo, el tratamiento de los defectos óseos y la búsqueda de materiales sustitutos de los huesos no es solo un fenómeno moderno, con su historia que se remonta a milenios.

### 1.3 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita ((HA),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) es el componente principal de hueso y se utiliza ampliamente en la ingeniería de tejido óseo. Varios materiales bioactivos han sido ampliamente utilizados para el sustituto óseo como la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), bioglass ( $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ ), fosfato tricálcico sinterizado y wollastonita ( $\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ ) en  $\text{MgO}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$  en matriz vítrea. El sustituto del injerto óseo comúnmente usado es la forma granular y la estructura de poro de HA [68], [69]. La ingeniería de tejidos es un método cada vez más popular para la reparación o reemplazo del hueso defectuoso. Un candidato ideal para implantes ortopédicos y dentales es la nHA debido a su excelente biocompatibilidad y capacidad de integración ósea[6]. El uso de nHA en aplicaciones clínicas está limitado debido a su baja resistencia mecánica, fragilidad y falla por fatiga. Además, la reparación de defectos óseos de más de 30 mm utilizando métodos de ingeniería de tejidos, es un problema clínico difícil [70]. La HA natural contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, los cuales juegan un papel preponderante en la función remodeladora del hueso [71]. Por esta razón, no se le considera una apatita pura. Las hidroxiapatitas sintéticas, que se obtienen a partir de fosfatos dicálcicos y tricálcicos a través de un proceso de síntesis relativamente simple, presentan una pobre resistencia mecánica, además de disolverse fácilmente, lo cual no es deseable para utilizarla como biomaterial de sustitución ósea [72]. Por lo tanto, los nanocompuestos basados en nHA/polímeros serán un enfoque prometedor para superar los problemas anteriores [73].

El fosfato de calcio sólido con la solubilidad más baja es la hidroxiapatita. Prismas hexagonales que son pequeños y variable en tamaño con gran área superficial/peso como

se observa en la Figura 8. La HA se fabrica en muchas formas y se puede preparar como una cerámica densa, polvo o andamios de cerámica porosa [1]. Recientemente, la hidroxiapatita de tamaño nanométrico (nHA) se está utilizando ampliamente debido a sus propiedades análogas al hueso que posee cristales de HA con dimensión de 20-60 nm [2]. Además, la nHA exhibe una gran área superficial y una estructura similar a la de la apatita biológica de los huesos que ayuda a promover la adhesión de proteínas y células, la proliferación, mayor biocompatibilidad y resistencia mecánica [1], simula la actividad de los osteoblastos y la mejora de factores de crecimiento en comparación con HA más densa [4].

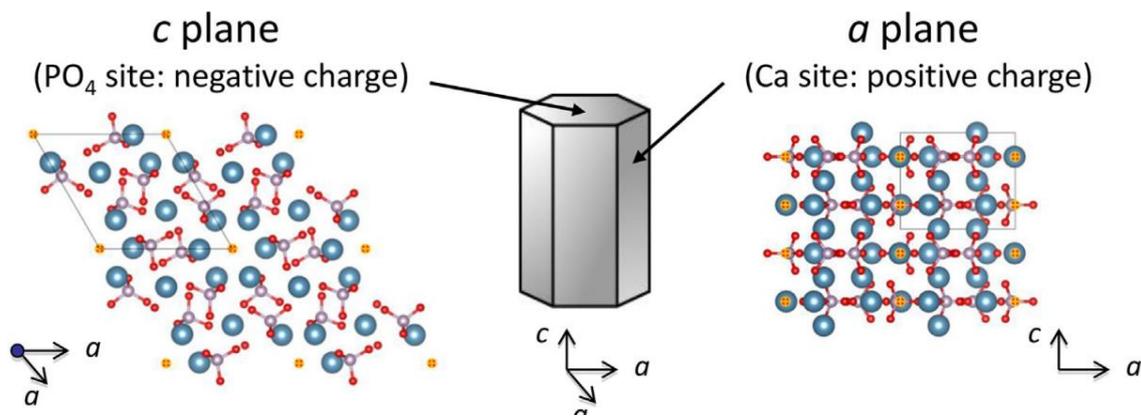


Figura 3. Estructura cristalina e ilustración esquemática de la hidroxiapatita estequiométrica (HA). La HA contiene cationes y aniones en su estructura y tiene una alta afinidad por las moléculas orgánicas. Las esferas azul, blanca, roja y amarilla son Ca, P, O y OH, respectivamente [74].

Por lo tanto, en la literatura existe un gran número de publicaciones en la preparación de nanocompuestos con nHA en diferentes matrices poliméricas, el desarrollo de membranas bioactivas, hidrogeles de cerámica y revestimientos que usan nanopartículas de HA (véase, por ejemplo [5]–[7]). En este sentido, la nHA puede representar una clase prometedora de materiales de injerto óseo sin embargo, la fragilidad y la baja resistencia mecánica de la nHA la hacen inadecuada para ser aplicada en la ingeniería de tejidos óseo [3]. En consecuencia, la nHA se combina a menudo con diversos polímeros para mejorar sus propiedades (véase, por ejemplo [3], [8]–[12]). HA-PLLA con módulo elástico arriba de 10 GPa [75].

#### 1.4 Quitosano

Muy pocos compuestos están clasificados como bioactivos, biodegradables y osteoconductores. El quitosano (CS) se encuentran entre los mejores biomateriales bioactivos en ingeniería de tejidos óseos y son reconocidos por su excelente

biocompatibilidad con el entorno del cuerpo humano [76]. La quitina es el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa. El CS se produce a partir de quitina, que es un polisacárido natural que se encuentra en el cangrejo, camarón, langosta, coral, medusas, mariposas, mariquitas y hongos. Sin embargo, las conchas de crustáceos marinos son ampliamente utilizadas como fuentes primarias para la producción de CS [77], [78]. Además, la hidrólisis química y los métodos enzimáticos, ampliamente utilizados para el aislamiento de CS a partir de cáscaras de crustáceos marinos, son bastante económicos.

El CS es un copolímero que consiste en enlaces  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) -2-acetamido-D-glucosa y  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) -2-amino-D-glucosa ver Figura 6 [79], [80]. En las últimas dos décadas, el CS se ha desarrollado considerablemente en aplicaciones biomédicas debido a su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, estructura porosa, idoneidad para el crecimiento celular, osteoconducción y naturaleza antibacteriana intrínseca [81]. El CS ofrece una amplia gama de aplicaciones, incluido el tejido de cartílago [82], curación de heridas [83] y aplicaciones ortopédicas [81]. Los implantes poliméricos degradables eliminan la necesidad de una segunda operación quirúrgica y pueden prevenir algunos de los problemas asociados con la protección contra el estrés durante la postcuración, y también pueden usarse simultáneamente para administrar medicamentos terapéuticos para tratar infecciones o factores de crecimiento para acelerar el crecimiento de hueso nuevo [84]. Existe un interés creciente en explotar el campo de la ingeniería de tejidos óseos para la preparación de compuestos. Esto ha creado una amplia gama de aplicaciones en la preparación de órganos artificiales.

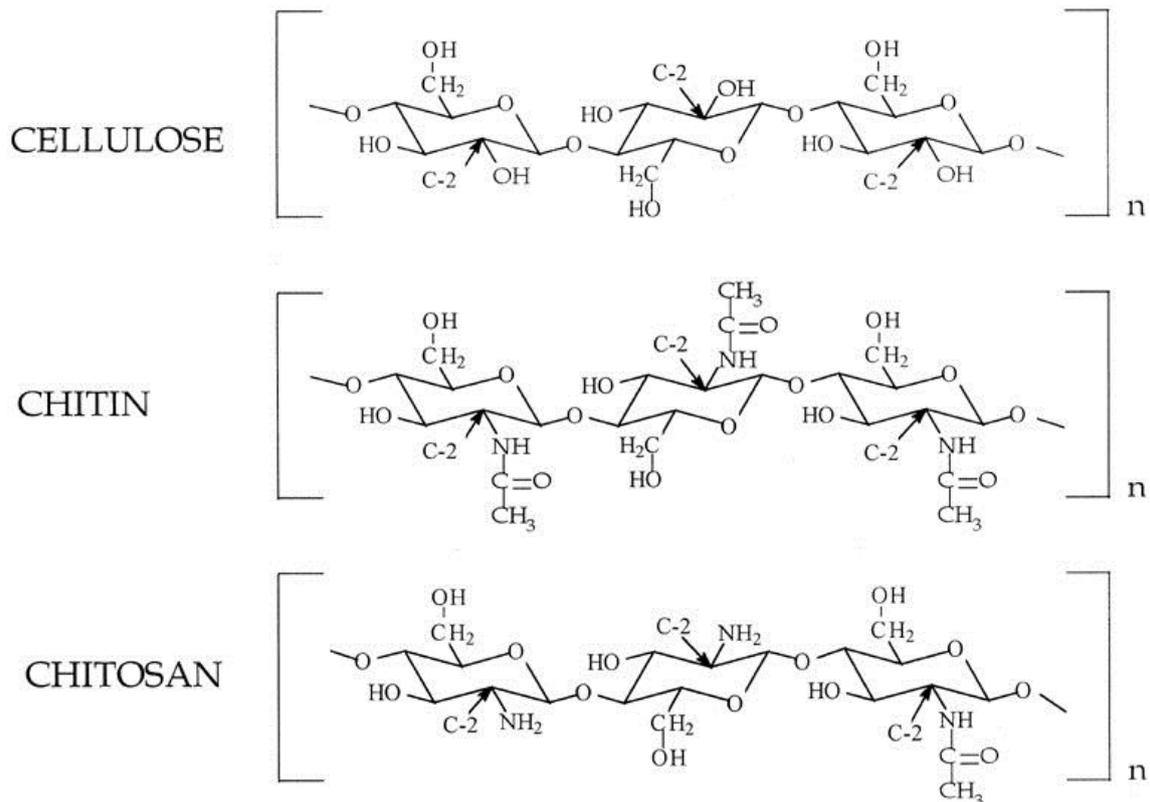


Figura 4. Estructura química del quitosano.

El CS se puede modificar fácilmente en varias formas como películas, fibras, esponjas y formas más complejas para el tratamiento ortopédico [81]. La naturaleza catiónica del CS es responsable de atraer varios proteoglicanos de carga negativa. Los materiales porosos tienen un papel muy importante en el proceso de implantación ósea. Las estructuras porosas de CS pueden formarse congelando y liofilizando en moldes adecuados [85]. El CS se ha combinado con una variedad de materiales como HA, alginato, ácido hialurónico, fosfato de calcio, poli (metacrilato de metilo), ácido poli-L-láctico en factores de crecimiento para su posible aplicación en ortopedia.

Los andamios de CS son flexibles y sus propiedades mecánicas son inferiores a las de los huesos normales, ya que no pueden soportar la carga de implantes óseos. Además, el CS en sí no es osteoconductor, aunque la adición de materiales cerámicos mejora su osteoconductividad proporcionando sitios para calcificación y aumento en su resistencia mecánica [86]. El CS ha sido ampliamente utilizado en apósitos para heridas y diversas aplicaciones de ingeniería de tejidos [9], [83] y ha demostrado tener buenas propiedades antibacterianas. Adicionalmente, esponjas porosas de CS han sido previamente utilizadas en andamios y muestran una eficiente proliferación de osteoblastos [9]. El CS también es

biodegradable a través de los lisosomas en el cuerpo [81]. Por lo tanto, el CS se utilizó como material modelo de la matriz en este estudio.

Un parámetro importante del quitosano es el grado de desacetilación (DDA), que se define como la proporción de unidades de glucosamina desacetilada con respecto al número total de monómeros [81], [87]. La DDA tiene un efecto en varias propiedades del quitosano, incluida la cristalinidad, la degradación y la resistencia mecánica. Debido a que el menor número de residuos de acetilo permite un empaquetamiento más apretado de las cadenas de polímero, el CS con DDA alto será más cristalino que el CS con DDA inferior (si todos los demás parámetros son iguales) [85], [88], [89]. Los materiales con alto contenido en CS DDA son más rígidos y más fuertes que los materiales con bajo contenido [90], [91], pero su degradación es más lenta [89], [91], [92]. Con una desacetilación por encima del 80% y un peso molecular promedio en alrededor de 350 kDa demostró el nivel más alto de actividad [93]–[96]. La superficie con una carga positiva promueve la adhesión celular debido a su carga negativa; es capaz de unirse químicamente con polisacáridos cargados positivamente y/o HA con carga negativa como proteínas y/u otro fosfato de calcio como el -TCP, formando un material de andamio más fuerte [97].

Al disolverse en medios ácidos, los grupos amino del polímero se protonan y la molécula se carga positivamente. El grado de acetilación representa la proporción de unidades de N-acetil-d-glucosamina con respecto al número total de unidades reactivas. Las propiedades del CS (pKa y solubilidad) pueden modificarse cambiando el grado de desacetilación y las propiedades de la formulación, como el pH y la fuerza iónica. A pH neutro, la mayoría de las moléculas de CS perderán su carga y precipitarán de la solución [98]–[100]. Los grupos amino primarios en la molécula son reactivos y proporcionan un mecanismo para la unión del grupo lateral utilizando una variedad de condiciones de reacción leves. Estos criterios cubren la estructura de un polímero y otros materiales, las propiedades de la porosidad y la superficie y el proceso de biodegradabilidad, lo que hace que el CS y los fosfatos de calcio sean una buena opción para funcionar como un andamio para la regeneración de tejidos óseos [82], [101], [102].

## 1.5 Nanotubos de Carbono

Tras el descubrimiento de los nanotubos de carbono por lijima [103], la nanotecnología basada en carbono se ha desarrollado rápidamente como una plataforma tecnológica para

una variedad de usos, incluidas las aplicaciones biomédicas. Los nanotubos de carbono son tubos de carbono cilíndricos que poseen diámetros nanométricos (~20 nm) con longitudes mucho más largas (~4000 nm) que dan como resultado relaciones de aspecto muy grandes como se observa en la Figura 7. Poseen una gama muy amplia de propiedades electrónicas, térmicas y estructurales definidas por el diámetro, la longitud y la quiralidad o torsión. Los nanotubos de carbono pueden estar compuestos por un solo tubo comúnmente llamado nanotubo de carbono de pared simple (SWCNT), o cilindros concéntricos de carbono, comúnmente denominados nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT).

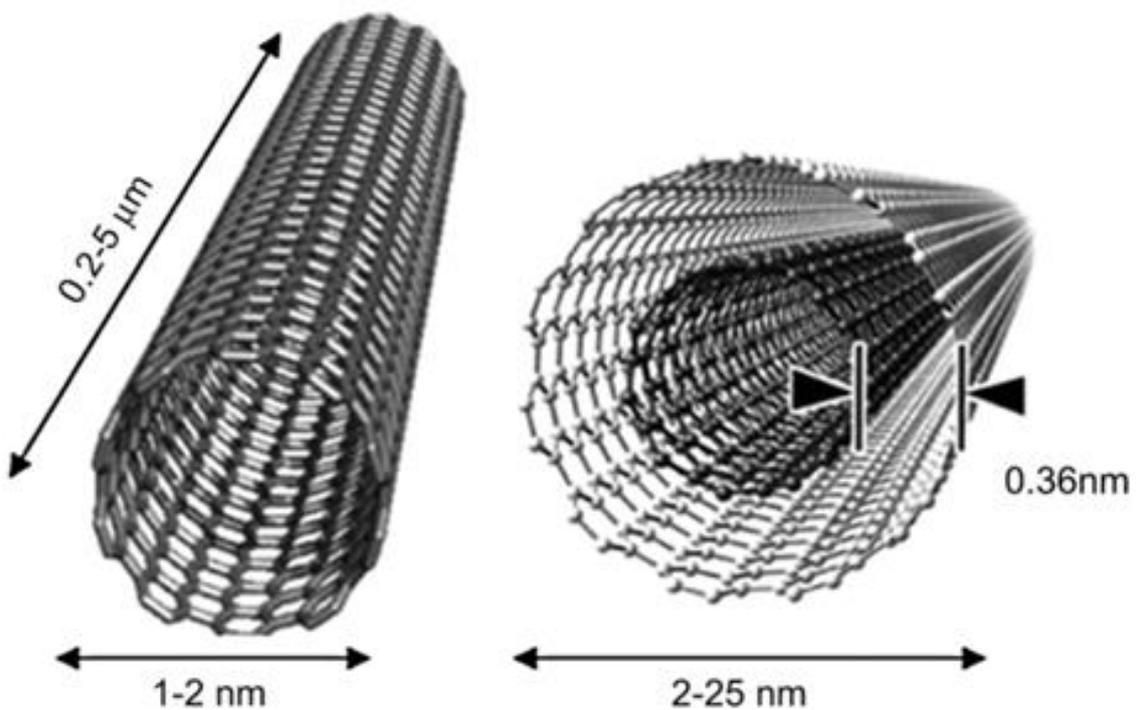


Figura 5. Tipos de nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono generalmente se preparan a través de tres métodos: descarga por arco eléctrico [104], ablación láser [105] y deposición química de vapor (CVD) [106]. CVD es el método comercial más utilizado para producir nanotubos de carbono. Este proceso generalmente implica hacer reaccionar un catalizador metálico con un material de alimentación de hidrocarburos a altas temperaturas (700 °C) para producir nanotubos de carbono que, dependiendo de las condiciones de reacción, pueden crear una amplia variedad de longitudes (nanómetros a milímetros) y anchos (1–100 nm). Los nanotubos producidos que se obtienen por este método comúnmente tienen catalizadores metálicos o depósitos carbónicos en el exterior del nanotubo. Dado que los catalizadores metálicos

como el níquel se pueden usar para el crecimiento de nanotubos de carbono, existe la preocupación de que los nanotubos de carbono sean citotóxicos. Por lo tanto, generalmente se requiere una etapa de purificación antes de que los nanotubos de carbono puedan usarse para aplicaciones biomédicas.

Existen varios enfoques para purificar los nanotubos de carbono [107]–[110]. Los nanotubos de carbono en un ácido oxidante como el ácido nítrico a reflujo es uno de los métodos más populares de purificación. Este proceso oxida y elimina los catalizadores metálicos y los depósitos carbónicos del interior y el exterior del tubo. Además, los ácidos pueden atacar los extremos más reactivos de los nanotubos de carbono que abren los extremos del tubo y crean grupos de ácido carboxílico. Además, cualquier defecto en el tubo también puede oxidarse creando grupos de ácidos carboxílicos adicionales a lo largo de la longitud del nanotubo. Estos grupos de ácido carboxílico pueden funcionalizarse aún más, lo que permite el ajuste de la química de la superficie del nanotubo.

Un área en la que los nanotubos de carbono afectarán la ingeniería de tejidos es el soporte estructural. La matriz juega un papel crítico en la ingeniería de tejidos. Es responsable de definir el espacio que ocupa el tejido diseñado y ayudar al proceso de desarrollo del tejido. Si bien los polímeros sintéticos populares como PLGA y PLA se han utilizado para la ingeniería de tejidos, carecen de la resistencia mecánica necesaria. Además, dichos polímeros no se pueden funcionalizar fácilmente en contraste con los nanotubos de carbono que se pueden funcionalizar fácilmente. Sin embargo, estas ventajas deben compararse con el inconveniente de que los nanotubos de carbono no son biodegradables.

Los nanotubos de carbono tienen el potencial de proporcionar el refuerzo estructural necesario para los andamios de tejido. Al dispersar una pequeña fracción de nanotubos de carbono en un polímero, se han observado mejoras significativas en la resistencia mecánica del material compuesto. Los nanotubos de carbono se han colocado en una gran cantidad de polímeros sintéticos y, más recientemente, en biopolímeros. Por ejemplo, los MWNT mezclados con quitosano mostraron una mejora significativa en las propiedades mecánicas en comparación con las de quitosano [28]. Los nanocompuestos con 2% de MWNT duplicaron el módulo de Young y la resistencia a la tracción en comparación con el quitosano puro. El ajuste de las propiedades mecánicas del polímero se puede ajustar dependiendo de la carga de nanotubos y con la necesidad de cantidades muy pequeñas puede contrarrestar su naturaleza no degradable.

El uso de la conductividad eléctrica de los nanotubos de carbono puede resultar una herramienta útil para el crecimiento celular dirigido. Por ejemplo, cuando se aplica una corriente alterna al sustrato, se ha demostrado que los nanocompuestos de ácido poliláctico y MWNT aumentan la proliferación de osteoblastos en un 46% y un aumento de más del 300% en la producción de calcio [111]. Además, se observó una regulación al alza de colágeno I (un componente importante en la formación de hueso orgánico), osteonectina y osteocalcina. Esto sugiere que los nanocompuestos pueden utilizarse para estimular la formación de hueso.

Además del refuerzo estructural, los nanotubos de carbono pueden funcionalizarse para proporcionar capacidades adicionales para la ingeniería de tejidos. Durante las etapas iniciales de la formación ósea, el colágeno sirve como sitio de nucleación para la deposición de hidroxiapatita, el componente principal del hueso. Los nanotubos de carbono sustituidos con fosfato pueden sustituir al colágeno para dirigir la cristalización de la hidroxiapatita que alcanza un espesor de 3 mm después de 14 días de mineralización [112]. La alta relación de aspecto de los nanotubos de carbono debería permitir que el andamio se alinee para imitar más estrechamente el hueso in vivo.

Los nanotubos de carbono también pueden funcionalizarse para liberar factores bioactivos. Se ha demostrado que tales factores, como la glucosa oxidasa, pueden unirse a los nanotubos y aún retener la actividad enzimática [113]. Esto puede permitir agregar una mezcla de diferentes nanotubos de carbono funcionalizados a un andamio para crear estructuras cada vez más sofisticadas. Potencialmente, la funcionalización enzimática o proteica, junto con las propiedades electroquímicas mencionadas anteriormente, puede permitir que las matrices proporcionen no solo la integridad mecánica para el crecimiento celular, sino también que monitoreen simultáneamente el progreso del crecimiento.

Los nanotubos de carbono tienen la capacidad de servir como materiales estructurales multifuncionales. Los nanotubos de carbono pueden proporcionar el refuerzo estructural inicial necesario para los andamios de tejido recién creados. Aunque no son biodegradables, los nanotubos de carbono pueden eliminarse rápidamente del cuerpo [114]. Esto significa que a medida que los andamios diseñados se degradan, se pueden limpiar fácilmente. Mientras que el refuerzo mecánico fue la motivación inicial para usar los nanotubos de carbono, existe evidencia de que los nanotubos de carbono pueden impartir, acelerar y dirigir el crecimiento de las células.

Existe un debate en la literatura sobre la citotoxicidad de los nanomateriales de fullereno, como las bolas de Bucky y los nanotubos de carbono. Por lo tanto, una revisión no estaría completa sin revisar la citotoxicidad de los nanotubos de carbono. Algunos estudios han indicado que los nanotubos de carbono son citotóxicos, mientras que otros han demostrado que los nanotubos son excelentes sustratos para el crecimiento celular. Los CNT que tienen como contenido el antiséptico médico ZnO (óxido de zinc), se encontró que los CNT resultaron ser un material que fortalece la actividad antibacteriana contra *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Aureus* y regula la osteogénesis de los osteoblastos [115].

Si bien las preocupaciones de que los nanotubos de carbono pueden ser citotóxicos reducen el entusiasmo de este material para aplicaciones biomédicas, se están desarrollando nuevos enfoques para mitigar su toxicidad. El cultivo de células con nanotubos de carbono funcionalizados con glicopolímeros, por ejemplo, no se distinguía de las células cultivadas en ausencia de nanotubos de carbono [116]. Estas estrategias pueden hacer que los nanotubos de carbono sean más seguros y también más útiles para la ingeniería de tejidos. Los nanotubos de carbono parecen ser muy adecuados como biomateriales y pueden convertirse en una herramienta útil para la ingeniería de tejidos.

Los nanotubos de carbono tienen la capacidad de ser utilizados en imágenes celulares, detección química y biológica, administración de agentes bioactivos e ingeniería de matrices. Mientras se desarrollan nuevos usos de los nanotubos de carbono para aplicaciones biomédicas, la preocupación por la citotoxicidad puede ser mitigada por la funcionalización química. Sin embargo, habrá algunas limitaciones para este nanomaterial ya que no es biodegradable. Sin embargo, se ha demostrado que se excreta in vivo y, por lo tanto, podría eliminarse del cuerpo una vez que ya no sea necesario.

Los CNT tienen un alto módulo de Young (1.0–1.8 TPa), alta resistencia a la tracción (30–200 GPa) y un alto alargamiento a la rotura (10–30%). Además, tienen un tamaño extremadamente pequeño (alrededor de 1 a 10 nm de diámetro), alta relación de aspecto (> 1,000), alta estabilidad química y estructural, y rigidez, así como notables propiedades eléctricas, térmicas, ópticas y bioactivas [117], [118], que han recibido mucha atención para la ingeniería de tejido en hueso [119]–[121].

## 1.6 Quitosano/nHA

Proponer el uso de quitosano (CS) como un material adecuado para la ingeniería de tejidos debido a su similitud química con las moléculas biológicas, compatibilidad con los tejidos, biorreabsorción, actividad antibacteriana, características hemostáticas y la capacidad de interacción con la HA. Estas características hacen que el quitosano sea un candidato ideal para la ingeniería de tejidos; sin embargo, la estructura de quitosano-nano-hidroxiapatita (CS-nHA) no han sido totalmente dirigida a pesar del gran número de publicaciones dedicadas a la investigación de la estructura, propiedades mecánicas, viabilidad celular y la proliferación. Por ejemplo, las refs. [13], [122] proponen la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos amino e hidroxilo del CS con iones hidroxilo en la superficie de la nHA, la formación de enlaces de coordinación entre el grupo amino de CS y el calcio de la nHA [13], las interacciones entre  $\text{PO}_4^{3-}$  de la nHA con grupos  $\text{NH}_3^+$  del CS [24]. Además, un análisis detallado de las publicaciones revela que las mejores propiedades mecánicas (resistencia a la compresión, módulo de compresión) y métodos de preparación se obtuvieron a concentraciones de CS y HA (4 g de CS y 0,5 M de solución de nHA [21]; 2:8 CS: relación de HA [22]; 40 % en peso de Ha [23]; 10 % de nHA [24]; 40:60 CS: relación de HA [25]; 100:15 CS: relación de HA [26]). Es de destacar que cualquier otra combinación en concentración CS y nHA, ya sea mayor o menor que los reportados, las propiedades mecánicas disminuyen en gran medida. En general, se requieren valores máximos de propiedades mecánicas en un material compuesto para el desarrollo de materiales de injerto óseo.

La formación de una capa interfacial influye directamente en las propiedades del compuesto tales que la interacción entre CS y nHA domina este fenómeno. Sin embargo, en nuestro conocimiento, no existen informes sobre la investigación de las propiedades de la capa interfacial entre CS y nHA. Uno de método que permite la investigación de las propiedades de capa interfacial es la espectroscopia dieléctrica.

La porosidad, las propiedades mecánicas y la biodegradación son la preocupación típica durante la preparación del hueso artificial. Los andamios de CS no pueden imitar todas las propiedades del hueso natural. El compuesto biocerámico/biopolímero es el mejor enfoque para hacer un material artificial óseo con las propiedades requeridas. La combinación del compuesto de CS/HA es un material ampliamente estudiado para el sustituto de injerto óseo[123], [124]. Como se ha comprobado, los materiales de fosfato

de calcio son osteoconductores para imitar la porción inorgánica del hueso natural, mientras que los materiales compuestos de CS/HA son prometedores para imitar la porción orgánica y la porción inorgánica del hueso natural. Se han realizado varios estudios con materiales compuestos CS/HA para la ingeniería del tejido óseo [81], [84], [102], [125]–[132].

Existe una posible interacción entre el grupo  $\text{NH}_2$  y el grupo  $\text{OH}^-$  primario y secundario de CS con  $\text{Ca}^{2+}$  (interacción de coordinación de metales) de HA. Esta interacción podría ser responsable de la mayor resistencia mecánica de los andamios compuestos en comparación con CS y HA. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  aparecen en la superficie terminada de los cristales de HA, que tienen un número de coordinación de siete y se mantienen estrictamente en la estructura (Figura 9). Por lo tanto, existe la posibilidad de formar enlaces de coordinación entre  $-\text{NH}_2$  de CS y  $\text{Ca}^{2+}$  de HA [133].

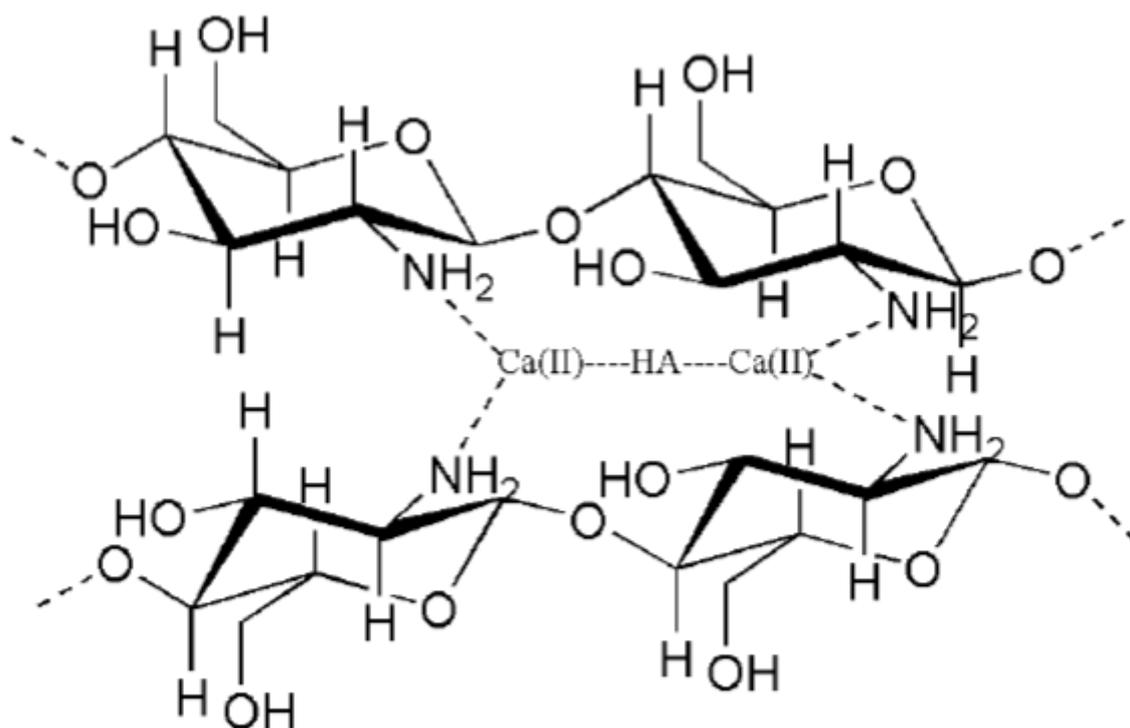


Figura 6. Interacción química entre CS/HA

### 1.7 Quitosano/MWCNT

Los CNT son principalmente hidrófobos y poco miscibles en agua. Los CNT tratados con ácido contienen muchos defectos y grupos hidrófilos, como  $-\text{OH}$  y  $-\text{COOH}$ , que son muy útiles para mejorar la solubilidad de los CNT en agua. El CS es un biopolímero hidrófilo, posee tres tipos de grupos funcionales, a saber. Los grupos amino, hidroxilo

primario y secundario en una unidad de glucosamina, y los CNT funcionalizados contienen grupos carboxilo e hidroxilo. Existe una gran posibilidad de que se formen fuertes enlaces de hidrógeno entre el quitosano y los CNT ver Figura 10. La compatibilidad y la fuerte interacción entre los CNT y la matriz mejoran en gran medida la dispersión, así como la adhesión interfacial, lo que aumenta significativamente las propiedades mecánicas de la matriz [28]. La funcionalización covalente de CS y CNT mejora la interacción entre CS y CNT, reduce el daño de CNT y aumenta sus propiedades mecánicas.

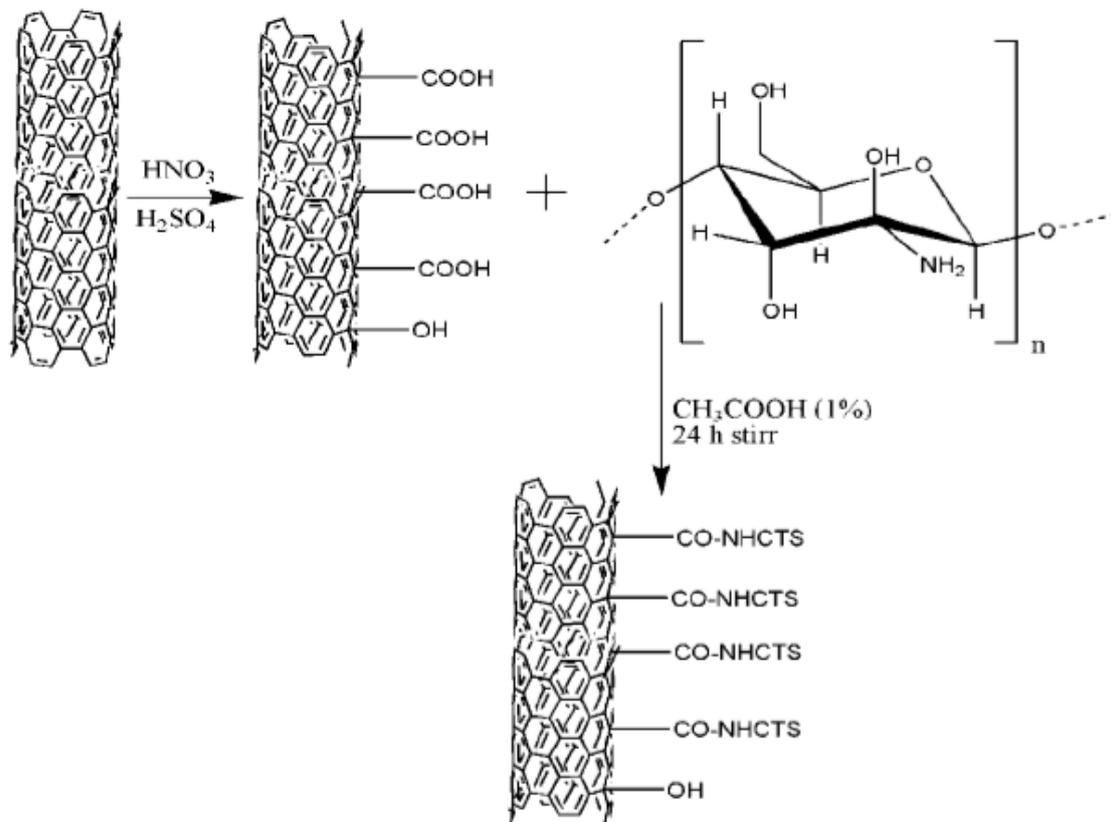


Figura 7. Interacción química entre el CS y CNT.

El uso de nanotubos de carbono de múltiples paredes (MWCNT) en el desarrollo de nanocompuestos con polímeros naturales sigue siendo de importancia científica y tecnológica. En este sentido, los nanocompuestos CS/MWCNT son potencialmente relevantes en la eliminación de metales pesados, biosensores, administración de fármacos e ingeniería de tejidos, entre otros [134]. El quitosano (CS) es un atractivo polisacárido natural con buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, pero con malas propiedades eléctricas y mecánicas. Los MWCNT son un nanomaterial atractivo debido a sus

excelentes propiedades mecánicas; cuando se formulan adecuadamente, pueden producir nanocompuestos con altas conductividades y propiedades mecánicas.

Sin embargo, la aglomeración que exhiben los MWCNT en matrices poliméricas debido a su escasa solubilidad limita sus aplicaciones. Para sortear este problema, los MWCNT pueden ser oxidados para unir grupos funcionales en su superficie; ultrasonificación o el uso de un agente tensioactivo que pueda aumentar su dispersión [135], [136]. Los MWCNT funcionalizados han demostrado ser útiles en la síntesis de nanocompuestos con CS bien dispersos; sin embargo, para mantener una dispersión estable, la concentración de MWCNT se mantiene a bajas concentraciones en peso y cerca del umbral de percolación. La alta conductividad de MWCNT ( $1-2 \cdot 10^3$  S/cm [137], [138]) induce un aumento significativo de la conductividad eléctrica del material nanocompuesto al aumentar la concentración de MWCNT; los cambios de nanocompuestos de un aislador a un conductor debido a la formación de una red conductora en la matriz aislante. El umbral de percolación es la mínima fracción de volumen de nanopartículas que forman una red de trabajo continua en el nanocompuesto [139], [140].

Estudios recientes han informado de los valores con la concentración en el umbral de percolación y conductividad para nanocompuestos de películas CS/MWCNT. Por ejemplo, Ref. [141] reporta que la conductividad del compuesto CS-MWCNT (preparado por dispersión directa de MWCNT en solución CS) aumenta con el aumento de las concentraciones de MWCNT alcanza 0,001 S/cm a 8 % en peso de MWCNT (sin umbral de percolación). Nanocompuestos similares obtenidos en la Ref. [142] exhiben un umbral de percolación a 2.89 % en peso de MWCNT y una conductividad de 0,107 S/cm; la Ref. [143] reportó un umbral de percolación a 1.3 % en peso y una conductividad de  $10^{-3}$  S/cm. Ref. [144] informa de un material preparado por liofilización que presenta dos umbrales de percolación a 0.19 % en peso y 0.48 % en peso de MWCNT con la máxima conductividad  $10^{-2}$  S/cm.

Es de destacar que los fenómenos de percolación incluyen propiedades mecánicas; en el presente documento, una exposición del nanocompuesto polimérico muestra un fuerte incremento en las propiedades mecánicas con el aumento de la fracción volumétrica de materiales de carga debido a la formación de percolación en la conexión microestructural [145]. Por encima de la concentración del umbral de percolación, no parece saturación o incluso la disminución en las propiedades mecánicas [145]–[147]. Las propiedades mecánicas de la película también dependen del método de preparación. Ref. [135] informa

del nanocompuesto de quitosano reforzado con MWCNT fabricado por dos métodos: a) secado por congelación proceso asociado a la sublimación y la compresión y b) método de evaporación de colada. Los autores propusieron que la fuerza de enlace entre las capas de quitosano puede ser el factor principal para ajustar las propiedades mecánicas. En el primer método, la unión entre los grupos funcionales en las cadenas de quitosano y la superficie funcionalizada de los MWCNT es débil y por la dureza del primer plano ( $H$ ) y el módulo de Young ( $E$ ) son bajas ( $E = 0.566$  GPa,  $H = 0,026$  GPa). En el segundo método, un fuerte enlace de hidrógeno es responsable de aumentar las propiedades mecánicas diez veces ( $E = 5.03$  GPa  $H = 0,185$  GPa).

Del mismo modo, el umbral de percolación mecánico depende del método de funcionalización de los MWCNT. Ref. [28] informa de la preparación del nanocompuesto mediante un simple método de evaporación de solución. Con una dureza máxima a 0.4 % en peso de MWCNT (umbral de percolación) fue ca. 0.16 GPa y un módulo de Young de 2.1 GPa. Al aumentar aún más de la concentración de nanotubos las propiedades mecánicas disminuyen. Ref. [148] estudiaron un nanocompuesto con MWCNT funcionalizados en el que el módulo de Young aumenta linealmente con concentración de MWCNT debajo del 3 %; el módulo de Young alcanza un valor de ca. 3 GPa sin saturación. Por el contrario, MWCNT funcionalizados por tratamiento en  $HNO_3$ , con un módulo de Young entre 0.5-1 % peso de MWCNT [149].

En general, ambos fenómenos de percolación (eléctricas y mecánicas) dependen fuertemente de la relación de aspecto de los MWCNT, concentración, grado de dispersión, y su interacción con la matriz del polímero (formación de una capa interfacial) [140], [146], [147]. Es de destacar que la interfaz entre la matriz polimérica y los MWCNT está directamente influenciada por el desarrollo de una capa interfacial con espesor variable; esta capa afecta umbrales de percolación (tanto eléctricas y mecánicas), valores máximos de conductividad, el módulo de Young y la dureza de los nanocompuestos. En consecuencia, el estudio apropiado de esta capa interfacial es de suma importancia ya que domina las propiedades y el rendimiento de nanocompuestos. Modelos trifásicos han intentado incluir una capa interfacial para proporcionar una interpretación física de la conductividad eléctrica efectiva (véase, por ejemplo [150]–[152]) y las propiedades mecánicas (véase, por ejemplo [146], [147], [151]). Ambos umbrales de percolación eléctricas y mecánicas dependen en gran medida del método de oxidación química de los MWCNT; esta oxidación afecta a la interacción de grupos

laterales CS con grupos de superficie de MWCNT. A pesar del gran número de publicaciones en la bibliografía (que se centran en investigaciones de grupos funcionales de MWCNT en nanocompuesto de polímero y sus propiedades), no hay informes sobre cómo los diferentes métodos de oxidación MWCNT afectarán a las propiedades eléctricas y mecánicas de los nanocompuestos relacionados. Por lo tanto, un objetivo de este trabajo es estudiar las propiedades eléctricas y mecánicas de nanocompuestos CS/MWCNT mediante el aprovechamiento de la presencia de la capa interfacial y su dependencia de los métodos en las rutas de oxidación química de MWCNT.

### 1.8 Quitosano/HA/MWCNT

Una revisión de la literatura especializada, en la que se realizó una consulta de libros y artículos científicos mediante la búsqueda en la base de datos de publicaciones científicas. Se encontraron un total de 17 artículos, la mayoría de los cuales se publicaron en los últimos 6 años. Las palabras clave utilizadas en la búsqueda fueron ingeniería de tejidos óseos, hidroxiapatita, quitosano, nanotubos de carbono. Algunos materiales que tienen biocompatibilidad no son ideales para su uso en la ingeniería de tejidos óseos de forma individual, pero tienen potencial para ser utilizados en combinación con otros materiales en forma de biocompuestos. La creación de estructuras tridimensionales con solo biopolímeros no es factible, ya que no tienen propiedades ideales, pero cuando estos biopolímeros se combinan, por ejemplo, con la hidroxiapatita mejora sus propiedades mecánicas, de degradación, biocompatibilidad y biofuncionalidad [153], [154].

El uso de CS combinado con HA para la producción de hidrogeles superporosos ha resultado en un material prometedor para la producción de estructuras tridimensionales para la ingeniería de tejidos óseos debido a su gran parecido con la matriz ósea[155]. Los CNT influyen significativamente en las propiedades mecánicas tridimensionales hechos de nanocompuestos poliméricos, que aumentan el módulo de compresión de las carcasas, que recubren preferentemente la superficie del compuesto polimérico. Por lo tanto, se forma una nanotextura que mejora la unión con las células y mejora la adsorción de proteínas [40]. Los compuestos de HA/CNT tienen una consistencia de espuma, tienen mejores propiedades mecánicas, microestructurales y grado de interconexión, los marcos terminaron teniendo una mezcla de poros grandes de 1-2 mm y poros pequeños de 20-300  $\mu\text{m}$ , que favorecen la osteoconducción y la formación de tejido óseo [27].

En una comparación entre CS puro, CS más HA y CS más HA y CNT, se encontró que ambos HA y CNT se distribuyen uniformemente en la matriz del polímero, y los compuestos proporcionaron el doble de soporte para el desarrollo y proliferación celular que el CS puro [154], [156]. Destacando los efectos combinados del aumento de la resistencia mecánica y la osteogenicidad que generan los CNT en los biocompuestos y la posibilidad de su uso en la cicatrización de grandes extensiones de tejido óseo [157].

Algunos de los desafíos en el uso de prótesis en pacientes son las diferencias en la dilatación térmica entre la matriz ósea y la prótesis, y la necesidad de amortiguación entre el hueso y la prótesis en las articulaciones. El nanocompuesto de CS reforzado con CNT de pared múltiple en películas delgadas, presentó una alta capacidad de almacenamiento de energía elástica y demostró ser un buen estabilizador térmico con una buena barrera térmica [158]. El uso de nanotubos debe hacerse dentro de los rangos de uso ideales que la ciencia está tratando de identificar. Se observa que, en los estudios, con solo incrementos sutiles de CNT, las propiedades mecánicas de las matrices de CS se pueden mejorar sustancialmente, y que tanto la nHA como los CNT se distribuyen uniformemente en la matriz de CS. La incorporación de solo 0.8 % en peso de CNT de múltiples paredes en la matriz de CS mejoró las propiedades mecánicas, incluido el módulo de tracción y la resistencia, en más del 90 % en comparación con el CS puro, además de que las CNT se dispersaron homogéneamente en la matriz de CS [28]. Combinando las propiedades de los nanotubos de carbono y la versatilidad y biocompatibilidad del quitosano, se obtiene un material compuesto que presenta potencial para aplicaciones biológicas [27]. Puede observarse en nanocompuestos de CNT, HA y CS, una distribución uniforme de HA y CNT en la matriz de CS, donde estudios, observan que las adiciones de sububicación de los nanotubos mejoran sustancialmente las propiedades mecánicas de la matriz, duplicando su módulo de elasticidad y casi triplicando su resistencia a la compresión [159]. Es posible enfatizar la posibilidad de hacer prótesis con matriz polimérica que tenga CNT en su composición, [115], [160] ya que tienden a distribuirse homogéneamente en la superficie de este tipo de matriz en la forma de nanotexturas, lo que sería positivo en el control bacteriano. El uso de compuestos sintéticos tiene la ventaja de anclaje, además de la facilidad de moldearlos según la lesión del paciente en forma de andamios, requiere menos tiempo quirúrgico. Además, es posible mejorar sus propiedades dependiendo del procesamiento utilizado en la fabricación, como la configuración final del biomaterial que puede ser en forma de

hidrogeles y espumas, en su acabado que puede ser nanotexturizado, y obteniendo parámetros establecidos tales como la porosidad y el tamaño de los poros.

Con el presente trabajo fue posible realizar estudios que verifiquen el estado actual de la técnica de los compuestos de matriz de quitosano con hidroxiapatita y nanotubos de carbono, y su aplicación en la ingeniería de tejidos óseos, donde el potencial se puede evidenciar en aplicaciones tales como injertos óseos, recubrimiento de prótesis y matriz de prótesis óseas debido al hecho de que estos compuestos presentan una combinación de propiedades antibacterianas, mecánicas, biocompatibles y las proporciones más adecuadas para cada una de estas aplicaciones, que es de importancia primordial en el entorno científico y metodológico. Para obtener este compuesto, las proporciones del material de formación compuesto y sus respectivas propiedades, mejoran la comprensión de la interferencia de cada material en el conjunto de propiedades del compuesto. Los compuestos de HA/CNT en matriz de CS presentan potencial para su uso en el hueso, los injertos y el revestimiento de prótesis óseas, que tienen como homogeneidad en la distribución de HA/CNT en la matriz CS, nanotexturas superficiales formadas por CNT y nanoporos que favorecen la osteogénesis, fijación de osteoblastos y osteointegración, y también dificultan la fijación bacteriana.

En esta investigación se generó una matriz polimérica de quitosano (CS) como material biodegradable [161], [162]. A pesar de su importante capacidad de promover crecimiento de hueso a lo largo de su superficie. La integridad mecánica del hueso natural es debido a la presencia de fibrillas de colágeno, por lo tanto, para mejorar las propiedades mecánicas, adicionalmente a la hidroxiapatita (HA) le serán incorporados nanotubos de carbono multipared (MWCNT) utilizados en aplicaciones biomédicas lo cual se ha informado que proporcionan morfología nano óptima para la adhesión y proliferación celular [121], [163]. La investigación se desarrolla principalmente en la síntesis del compuesto CS/HA/MWCNT para desarrollar películas para la regeneración de hueso.

## JUSTIFICACIÓN

Los defectos óseos causados por lesiones en la superficie articular y enfermedades como la osteoartritis, daños en la superficie de la articulación, alteración mecánica de la superficie articular que limitan el cartílago, alteración mecánica del cartílago y hueso subcondral han aumentado. Por estas razones, la ingeniería de tejidos ha desarrollado una variedad de materiales para reconstruir la estructura de tejidos y órganos para regenerar y reparar las funciones del tejido dañado a base de biopolímeros.

En la ortopedia los metales son la opción más común para el reemplazo total de hueso o fijaciones del implante. Las excelentes propiedades mecánicas de los metales que reúnen los requisitos necesarios para las aplicaciones de hueso de soporte de carga. Sin embargo, el metal puede fallar debido a la tensión de blindaje, afloje las articulaciones debido al desgaste, y la compatibilidad limitada con el tejido óseo.

La naturaleza metálica de los materiales utilizados para aplicaciones de implantes y el medio corrosivo dentro del cuerpo humano, en combinación con las cargas continuas y cíclicas a los cuales estos implantes están expuestos, puede conducir a la corrosión y sus productos electroquímicos correspondientes. Las corrientes eléctricas anormales producidos durante la corrosión puede convertir cualquier implante metálico en un electrodo, y el impacto negativo en la superficie del tejido debido a estas señales extremas podrían ser una causa adicional de los malos resultados y rechazo de implantes. Las células óseas también son sensibles a la reacción química generadas durante los eventos de corrosión, pero se sabe menos acerca de cómo las señales eléctricas asociadas con la corrosión puedan afectar a la oseointegración.

Como podemos observar el área de oportunidad en biotecnología para los materiales avanzados es muy amplia, y el realizar una investigación en un nuevo material para aplicaciones óseas es factible. En el caso del nuevo material que se desarrolló se ve como algo prometedor para la aplicación de implantes óseos. Debido al hecho de que el hueso consiste en 50-70% de HA y aproximadamente 20-40 % de tejido biológico, propusimos investigar el compuesto con nanopartículas de HA y quitosano, para aumentar las propiedades mecánicas de los implantes proponemos agregar CNT.

Las características que tienen los nanotubos de carbono y la hidroxiapatita en el área de implantes óseos, por separado es prometedor como lo podemos leer en la literatura científica.

El realizar un compuesto a base de nanotubos de carbono e hidroxiapatita en un matriz polimérica como lo es el CS, se pretende mejorar las propiedades mecánicas, térmicas y físicas de este material. Tomando en cuenta las propiedades particulares de cada material para su aplicación.

Como se ha mencionado las propiedades eléctricas del compuesto juegan un rol muy importante en el desarrollo de implantes. Cabe destacar que no hay en la literatura algún reporte de propiedades eléctricas de este compuesto CS/CNT/nHA con dependencia de propiedades eléctricas entre la relación de cantidad de cada material.

Las medidas eléctricas también han sido usadas como una herramienta de caracterización para desarrollo de los implantes. Adicionalmente, si la constante eléctrica del compuesto va a ser muy diferente a la constante dieléctrica del hueso en la interfaz, puede ocurrir interferencia de polarización y aparecer potencial entre el implante y el hueso lo cual puede afectar el crecimiento del tejido. No está muy bien documentada la alta conductividad conocida sobre CNT, con alta conductividad que puede generar corriente en tejidos alrededor del implante y el rechazo del implante. Por eso se necesita tener menos conductividad que la conductividad en implantes. La designación en los principios de las propiedades mecánicas es obtener un material con propiedades mecánicas (dureza y módulo de Young cercanas al hueso). Sobre la base de la revisión de la literatura en los antecedentes, podemos proponer que es posible encontrar nanocompuestos CS/HA/CNT con la mejor relación para las aplicaciones de tejido óseo. Pero antes era necesario investigar las propiedades eléctricas y mecánicas de CS-HA y CS-CNT con una relación diferente entre los componentes y luego en función de estos resultados proponer un material estable en películas de CS/nHA/MWCNT.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

El objetivo general es la síntesis de un nanocompuesto biocompatible, biodegradable y mecánicamente estable de hidroxapatita (HA) y nanotubos de carbono (CNT) en una matriz de quitosano (CS), para la regeneración de tejido óseo.

### **Objetivos específicos**

- Síntesis del nanocompuesto CS-HA con diferente relación entre CS y HA, investigar estructura del nanocompuesto, mecanismos de interacción entre CS y HA, propiedades eléctricas y mecánicas.
- Funcionalización de MWCNT por diferentes técnicas. Síntesis del nanocompuesto con diferente relación entre porcentaje de CS y CNT. Investigar dispersión de CNT en matriz de CS y también propiedades eléctricas y mecánicas.
- Síntesis del nanocompuesto CS-HA-CNT con diferente relación entre CS, HA y CNT. Investigar estructura del nanocompuesto, mecanismos de interacción entre CS, HA y CNT, propiedades eléctricas y mecánicas.
- Evaluar crecimiento de células osteoblásticas in vitro en nanocompuestos.

## HIPÓTESIS

Existe relación entre la estructura del nanocompuesto y concentraciones del CS, CNT y HA, que permite obtener mejores propiedades mecánicas, eléctricas y biológicas.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Materiales

El quitosano con un peso molecular medio 300 kDa y un grado de desacetilación de 75-85 % se adquirió en Sigma-Aldrich. Se utilizó nanohidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ ) con tamaño de partícula ca. 50 nm (ver Figura 26d) comprados en Sigma-Aldrich y HA sintetizada por el método de sol-gel. Nanotubos de carbono de paredes múltiples puros (no oxidados, n-MWCNT) con pureza >90 % y nanotubos funcionalizados con >8 % de grupos carboxílicos (comercial, f-MWCNT) con diámetro aprox. 9.5 nm y longitud ca. 1.5  $\mu\text{m}$  de Sigma-Aldrich.

### 2.2 Síntesis de películas de Quitosano

Se añade 1 % en peso de ácido acético en agua desionizada. Se pesa 1 % de quitosano en la solución de ácido acético. Se agita la mezcla durante 5 h a temperatura ambiente. Se añade la solución de quitosano en una caja Petri de plástico (8 cm y 12 cm). Se coloca la caja Petri en el interior de un horno a 60 °C durante 24 h permitiendo que el solvente se evapore para obtener películas de CS puras. Se almacena en un desecador lejos de la luz hasta que sea necesario. Como resultado de la técnica de preparación de la película, las películas CS tienen el grupo lateral de amina protonado,  $\text{NH}_3$ , como resultado de la presencia de ácido acético; Estas películas de CS se llaman acetato de quitosano. Se retiraron fácilmente de sus soportes, y no se requirió ningún tratamiento en particular.

### 2.3 Preparación de películas de CS/nHA

La solución CS se obtuvo disolviendo 1% en peso de CS en una solución de ácido acético acuoso al 1% en peso con agitación durante 6 h para promover la disolución. La HA con diferente porcentaje en la matriz de CS (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80% en peso) se suspendió en 4 ml de un buffer de fosfato (fosfato de sodio monobásico y bibásico) esto para evitar la aglomeración de nHA [123], [164], con agitación durante 15 minutos. La suspensión de nHA se añadió a la solución de CS y se colocó en un homogeneizador mecánico (IKA Ultra-Turres T 18) a 10,000 rpm durante 15 minutos para dispersar la nHA en la matriz polimérica de manera homogénea. Finalmente, las películas con espesor ca. 30  $\mu\text{m}$  se prepararon por el método de reparto de disolvente mediante el vertido de la solución final en una caja Petri y permitiendo que el disolvente se evapore durante 24 horas a 60 °C como se observa en la Figura 14.



Figura 8. Películas de CS/nHA.

## 2.4 Oxidación de Nanotubos de Carbono (MWCNT)

En este trabajo utilizamos nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), porque hay biocompatibilidad [165]. Sin embargo, la mayoría de los nanocompuestos basados en MWCNT exhiben aglomeración debido a su escasa solubilidad que limita sus aplicaciones. Para evitar este problema, los MWCNT se pueden oxidar para unir grupos funcionales en su superficie; la ultrasonificación o el uso de un tensioactivo puede mejorar su dispersión en formulaciones acuosas de MWCNT[166]. Para mejorar la dispersión de los MWCNT, se utilizó una mezcla de ácidos sulfúricos y nítricos concentrados para modificar su superficie (esta técnica también tiende a acortar la longitud del CNT)[37], [167]–[169]. En la ref. [36] el uso de los análisis de Raman y XPS ha demostrado que el tratamiento con  $H_2SO_4/HNO_3$  variaría la característica de la superficie MWCNT e introduciría de manera eficiente los grupos carboxilo. Después de la funcionalización, los MWCNT exhibieron múltiples grupos hidroxilo en su superficie que facilitan la dispersión homogénea en la solución de quitosano.

### 2.4.1 Funcionalización convencional de MWCNT

Los MWCNT fueron funcionalizados por tratamiento de ácidos concentrados para la integración de los grupos carboxilo ( $COOH$ ) y la eliminación de impurezas del carbono, así como residuos del catalizador para reducir su citotoxicidad. Este tratamiento se realizó usando ácido nítrico ( $HNO_3$ ) al 60 % y ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 96 % en una proporción de 3:2 v/v a 70 °C por 6 h a contra flujo en 40 ml de solución y con 1 g de MWCNT. Los MWCNT se filtraron a través de un filtro de membrana de PTFE 0,2 mm como se muestra en la Figura 11, posteriormente se neutralizó la mezcla con hidróxido de sodio ( $NaOH$ ) 3M (molar). Subsecuentemente la mezcla es pasada a una centrifuga marca Hettich modelo Rotina 420R, para la separación por gravedad a 4000 rpm. El proceso de centrifugado es realizado 4 veces, por lapsos de tiempo de 15 min, para el lavado de los

nanotubos de carbono con agua destilada y finalmente con acetona a 99.56 %. El material de MWCNT obtenido es secado en vacío a una temperatura de 60 °C por 24 h.



Figura 9. Método convencional de funcionalización de MWCNT a reflujo y filtrado a vacío

#### 2.4.2 Funcionalización por microondas

Se realizó la funcionalización de MWCNT por método químico (ácido nítrico y sulfúrico) por microondas, la principal ventaja de esta técnica es que se reduce el tiempo de reacción a la orden de segundos y al número de pasos en la reacción en comparación con los procesos de funcionalización convencionales. Los MWCNT fueron tratados a variaciones de potencia de 100 a 450 W a temperatura de 200 °C (Figura 12), 10 mg de MWCNT en soluciones de 10 ml de HNO<sub>3</sub> con agitación magnética a 600 rpm. Del producto filtrado se secó durante 24 h a 80 °C.

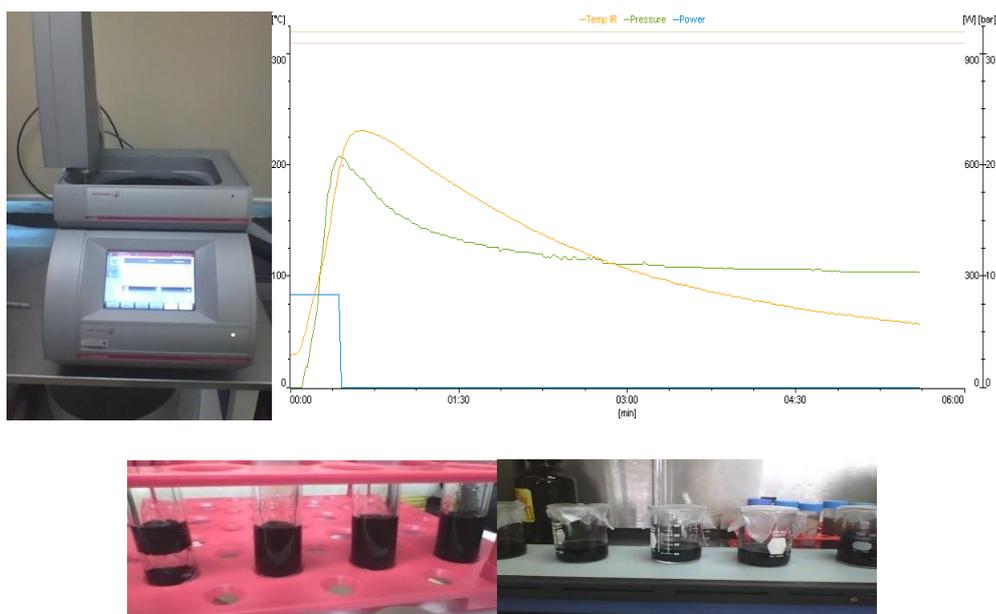


Figura 10. Funcionalización de MWCNT por microondas y grafica donde se muestra la potencia, presión y temperatura del vial.

### 2.4.3 Funcionalización por Soxhlet

El famoso extractor de laboratorio de Soxhlet (ver Figura 9) fue propuesto por primera vez en 1879 en un trabajo sobre la determinación de la grasa láctea por el químico agrícola alemán Franz Ritter von Soxhlet (1848-1926)[170]. Su característica más notoria es el uso de un sifón de nivel constante para devolver el extracto al matraz solvente después de la finalización de un determinado ciclo de extracción. Aunque el extractor de Soxhlet también se describe a menudo como continuo, esto es inexacto y se caracteriza mejor como un extractor de lotes automatizado, ya que el extracto no drena continuamente en el frasco de solvente, sino que drena sólo después de haber alcanzado el volumen crítico determinado por la altura del sifón. El extractor Soxhlet todavía tiene la ventaja de ser más eficiente que un extractor continuo, ya que en este último hay tendencia para que el disolvente condensado cree un canal de menor resistencia al pasar a través de la materia orgánica.

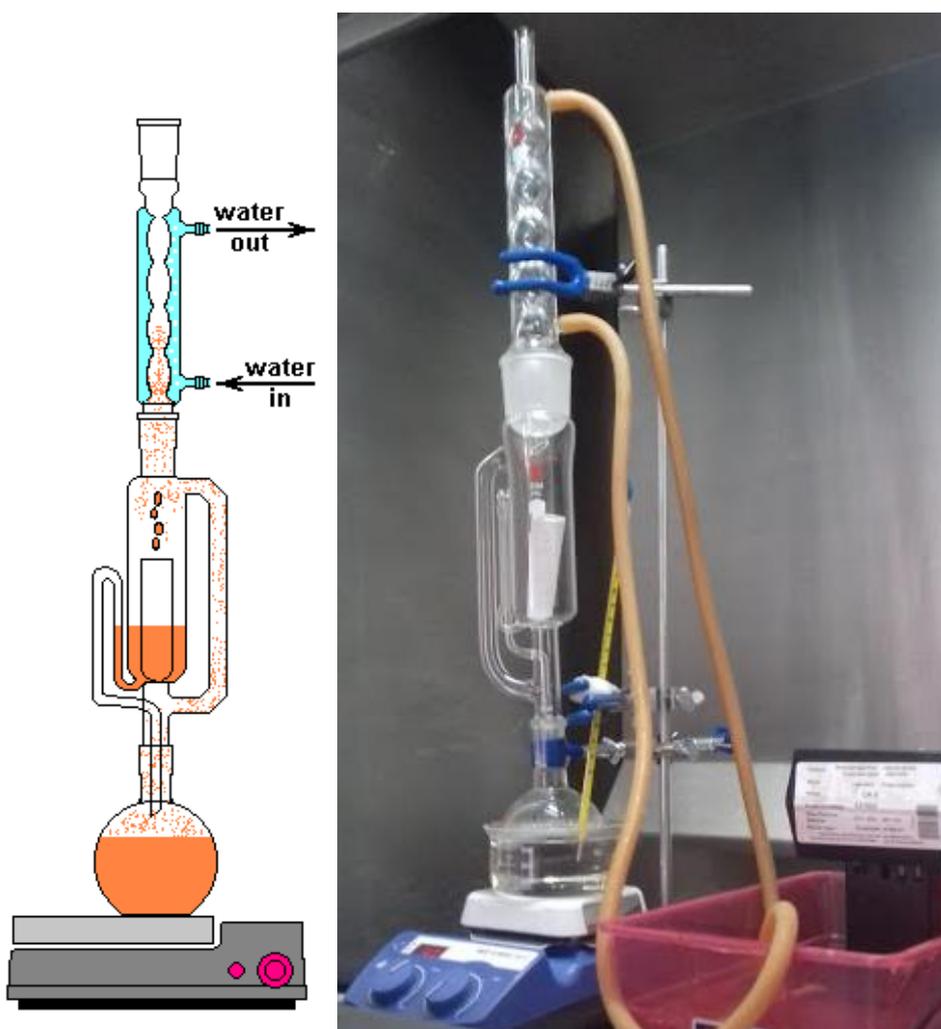


Figura 11. Técnica por Soxhlet para funcionalización de MWCNT

Cuando el líquido alcanza el nivel de desbordamiento, un sifón aspira el soluto desde el soporte del dedal y lo descarga de nuevo al matraz de destilación, llevando así lo extraído al líquido. Esta operación se repite hasta completar la extracción.

Los MWCNT puros se someten a tratamiento con  $\text{HNO}_3$  en un extractor Soxhlet en solución de  $\text{HNO}_3$  7 M durante 5 horas a  $90^\circ\text{C}$  [171].

## 2.5 Preparación de películas de CS/MWCNT

Las películas CS-MWCNT se obtuvieron mediante la adición de cantidades apropiadas de MWCNT (entre 0.5 y 18% en peso respecto al CS pesado en seco) en una solución de 1 % de ácido acético acuoso al 1% en peso de CS. La suspensión de MWCNT en CS se agitaron durante 24 h seguido de un homogeneizador mecánico (IKA Ultra-Turres T 18) a 10,000 rpm durante 30 min y finalmente se homogeneizó en un baño de ultrasonido (BRANSON 2510) durante 90 minutos a  $35^\circ\text{C}$  para eliminar las burbujas de aire. Las películas de CS/MWCNT (con un grosor de aproximadamente  $30\ \mu\text{m}$ ) se prepararon mediante el método de colada con disolvente vertiendo la dispersión de MWCNT en una caja Petri y el disolvente se dejó evaporar durante 24 horas a  $60^\circ\text{C}$ . Se utilizó la misma técnica en MWCNT y f-MWCNT (Figura 15). Además, el quitosano contiene grupos amina que ayudan a la formación de enlaces de hidrógeno entre los nanotubos funcionalizados y el quitosano, lo que conduce a un aumento en la solubilización de MWCNT [172].

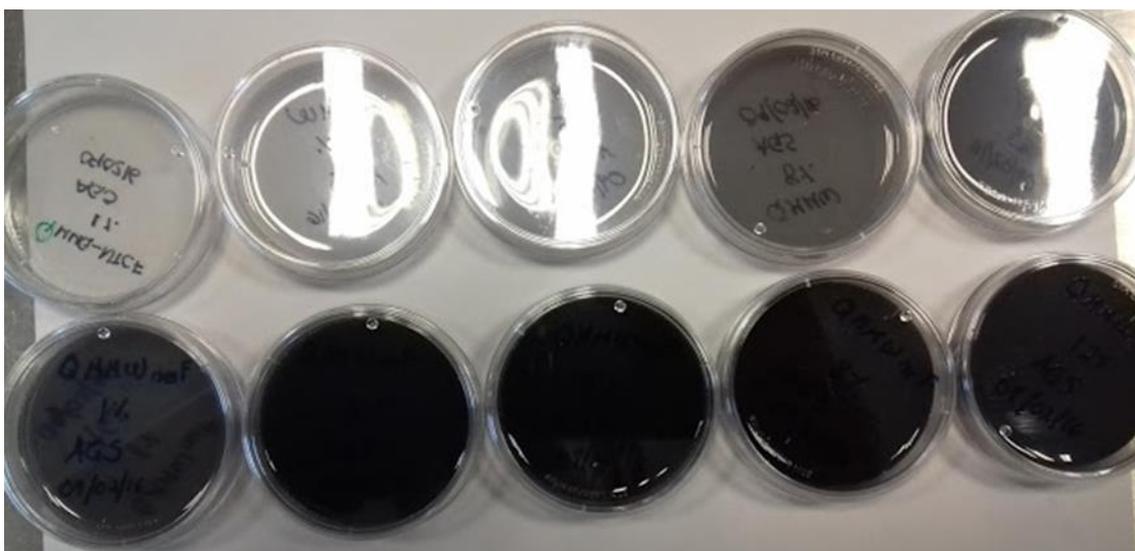


Figura 12. Preparación de películas de CS/MWCNT.

## 2.6 Preparación de películas de CS/nHA/MWCNT

Los f-MWCNT se mezclaron con nHA a las cantidades requeridas en un mortero posteriormente se dispersó en un buffer de fosfatos y finalmente se añadieron lentamente a la solución de quitosano en agitación durante 24 h y por 20 min en un homogeneizador mecánico (IKA Ultra-Turres T 18) a 10,000 rpm. Finalmente, esta mezcla se transfirió a cajas petri. Los andamios biomiméticos se prepararon en una concentración de quitosano (1% en peso) mientras se mantenía la misma proporción de ambos nanotubos (0.5, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 % en peso) y se cambiaban las concentraciones de nHA (5-40 % en peso).

## 2.7 Caracterización

La dispersión de nHA y MWCNT en la matriz de quitosano se observaron con un microscopio de emisión de campo electrónico de barrido (FESEM) JEOL 7610F con un voltaje de aceleración de 5 a 8 kV. Las dimensiones de los MWCNT fueron analizadas por un microscopio HR-STEM (Hitachi SU8230) con un cañón electrónico de cátodo frío que proporciona una resolución de 0.6 nm a 15 kV y de 0.9 nm a 1 kV. La cantidad de agua libre se determinó por análisis termogravimétrico (TGA) (Thermo gravimetric Analyzer (TGA 4000 PerkinElmer)). Las mediciones se realizaron en ambiente de nitrógeno de 25-400 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La interacción entre los grupos funcionales de CS con nHA se analizaron mediante mediciones de FTIR en un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum GX, el muestreo de la técnica fue usando ATR con punta de diamante, en el intervalo de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  a temperatura ambiente. La estructura cristalina de nHA MWCNT y las películas, fueron probados por un difractor de rayos X (Rigaku Dmax 2100) a temperatura ambiente. Con radiación  $\text{CuK}\alpha$  a 0.154 nm y a una velocidad de barrido de 5°/min. Los cambios estructurales en MWCNT tras la oxidación son estudiados por espectroscopia Raman (Horiba). La interacción entre los grupos funcionales de CS con nHA y MWCNT se analizó por mediciones de espectrofotometría FTIR en un Perkin Elmer Spectrum GX usando ATR con una punta de diamante, en el rango de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  a temperatura ambiente.

## 2.8 Espectroscopia de impedancia

La información detallada acerca de las propiedades dieléctricas de estos nanocompuestos es necesario para asegurar la biocompatibilidad de un implante, su constante dieléctrica debe ser similares a las del tejido humano y la médula ósea [12]. Por lo tanto, la

espectroscopia dieléctrica juega un papel importante en el desarrollo de materiales para la ingeniería de tejido óseo.

Para las mediciones dieléctricas, se depositaron capas finas de oro por pulverización catódicamente en vacío en ambos lados de las películas para que pudieran usarse como electrodos. Mediciones de espectroscopia dieléctrica se llevaron a cabo en la gama de frecuencias de 40 Hz a 110MHz usando Agilent Precision Impedancia Analizador 4249A (Figura 16) y en el rango de frecuencia de 1 MHz - 3 GHz utilizando Agilent 4991A. La amplitud de la señal de medición fue de 100 mV. Para las mediciones dependientes de la temperatura se realizaron en una célula especial con controlador de temperatura de 12 °C a 200 °C a una velocidad de calentamiento constante de 5 °C/min. Las mediciones a cada temperatura se dejaron durante 3 min para garantizar el equilibrio térmico.

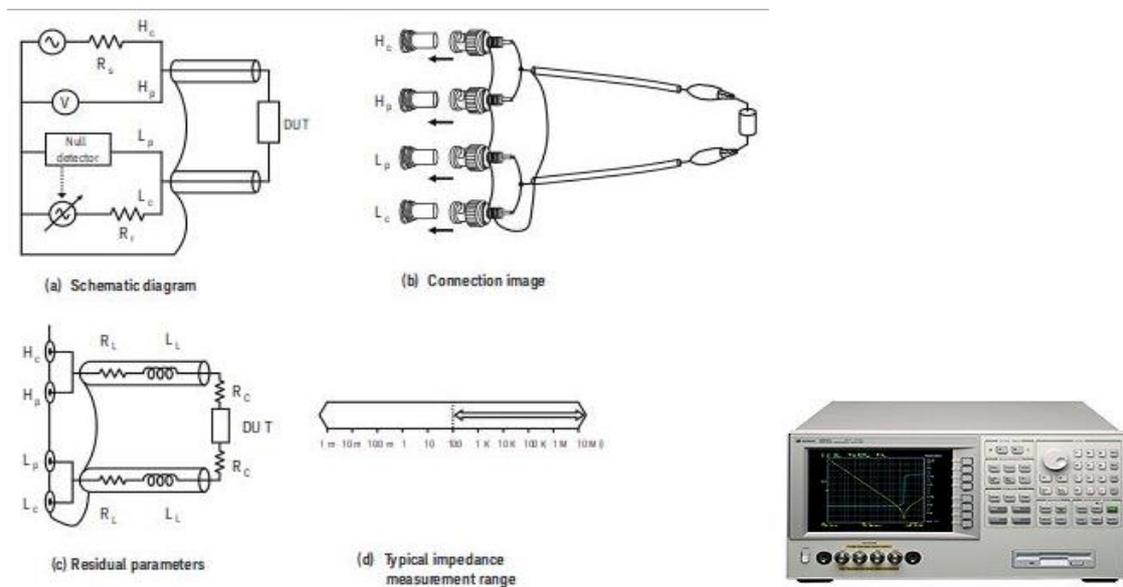


Figura 13. 4249A Precision Impedance Analyzer, 40 Hz a 110 MHz

## 2.9 Pruebas mecánicas

### 2.9.1 Nanoindentación

Las propiedades técnicas de los nanocompuestos han sido medidas por 2 métodos usando nanoindentación y Esfuerzo-deformación. En el primer método, las mediciones se realizaron en el área local y proporcionan información sobre las propiedades mecánicas locales y la homogeneidad del material. En el segundo método, las mediciones dan información sobre las propiedades integrales de las películas. Las propiedades mecánicas se evaluaron utilizando un nanoindenter triboscopio Hysitron (Ubi 1 Hysitron, Inc.) como se observa en la Figura 17, con punta de nanoindentación triangular de diamante

Berkovich, con un ángulo de  $142^\circ$  y un radio de punta de aproximadamente 100-200 nm. La máquina y la función de área de la punta se calibraron antes de las mediciones. Los experimentos se realizaron a una profundidad máxima fija de 200 nm y la función de carga consistía en una sección de carga y descarga  $100 \mu\text{N}$ , a temperatura ambiente utilizando una carga de función de dos segmentos que se completaron durante un tiempo de 20 s. Se realizaron al menos de 10-25 muescas en cada película en un área de  $30 \times 30 \mu\text{m}$  como se observa en la Figura 17.

Las relaciones fundamentales a partir de las cuales se puede determinar la dureza ( $H$ ) y el módulo elástico reducido ( $Er$ ) [173]:

$$H = \frac{P}{Ac}$$

$$Er = \frac{\sqrt{\pi}}{2\beta} \frac{S}{\sqrt{Ac}}$$

donde  $P$  es la carga, determinada a partir de las mediciones,  $Ac$  es el área de contacto proyectada en esa carga,  $\beta$  es una constante que depende de la geometría de la punta del nanoindentador y  $S$  es la rigidez de contacto.

El penetrador de Berkovich revela que las curvas de descarga se pueden describir con precisión por relación de ley:

$$P = B(h - hf)^m$$

donde  $h$  se ha obtenido de mediciones,  $hf = 200 \text{ nm}$ ,  $(h-hf)$  es el desplazamiento elástico,  $B$  y  $m$  son constantes del material.



Figura 14. a) Nanoindentador Hysitron b) muescas en película de CS

### 2.9.2 Esfuerzo-deformación

Las probetas se analizaron mediante pruebas de tensión en la máquina de ensayos universales INSTRON de 5 kg a una velocidad de 1 mm por segundo y con un TA.XT2 como se observa en la Figura 18 donde se calcularon manualmente las gráficas esfuerzo deformación y modulo elástico, siendo sujetadas mediante las mordazas dispuestas para tal fin en cada uno de los extremos de esta en forma vertical.



Figura 15. Texturometro para pruebas de tensión y compresión de películas.

La parte central de la probeta es usualmente (no siempre), de sección menor que los extremos para provocar que la falla ocurra en una sección donde los esfuerzos no resulten afectados por las mordazas de sujeción. Todo lo anterior en apego con la norma ASTM D638-Epsilon (Figura 19). El Módulo de Young se determina posteriormente mediante conversiones matemáticas de los datos obtenidos y el cálculo de la pendiente en las gráficas esfuerzo-deformación.

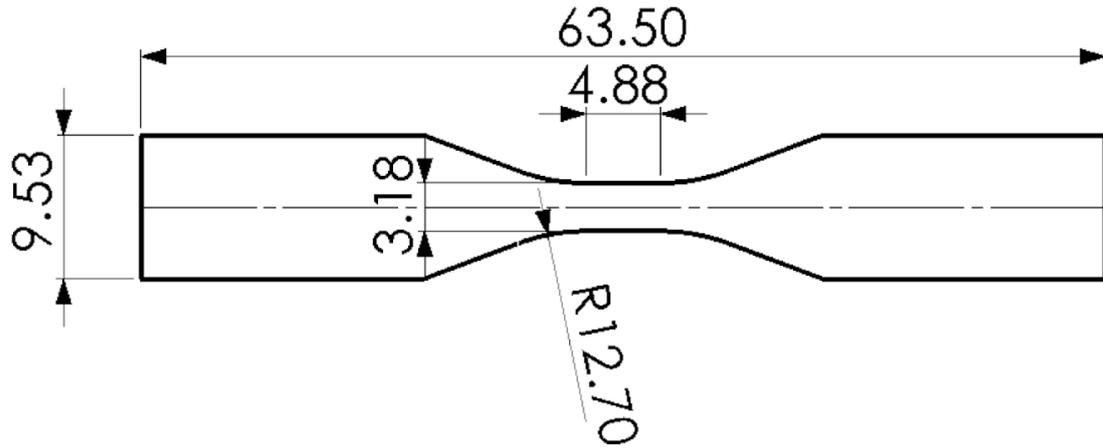


Figura 16. Dimensiones de probeta para polímeros de la norma ASTM D638-Epsilon.

### 2.9.3 DMA

Las propiedades mecánicas se midieron con un TA Instruments DMA Q800 como se observa en la Figura 20, usando la abrazadera de tensión para película rectangular y una temperatura de barrido de -30 a 180 °C, bajo las siguientes condiciones: rampa de calentamiento 5 °C/min, tensión inicial 0.01%, fuerza de precarga 0.3 N, y frecuencia 1 Hz. Se realizaron tres mediciones para cada película.

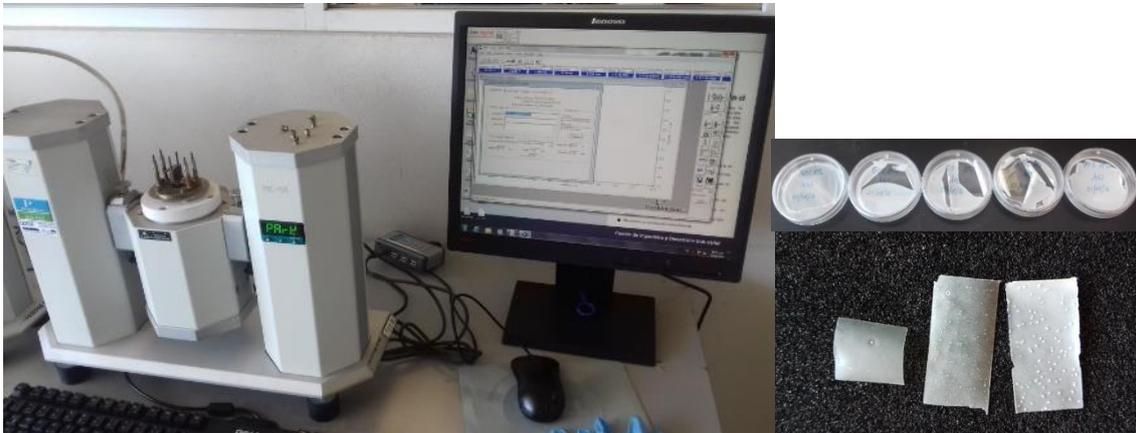


Figura 17. Equipo DMA y tipo de muestras utilizadas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Quitosano/Hidroxiapatita (CS/HA)

##### 3.1.1 FESEM

La dispersión de nHA fue analizada por un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) como se muestra en Figura 26. La imagen representativa SEM registrada de las películas de CS-nHA con 10% en peso de nHA muestra una distribución homogénea de nanopartículas en la matriz de CS con la forma esférica (Figura 26a). El tamaño de la nHA varió entre ca. 20-120 nm con valor medio de ca. 50 nm (ver histograma Figura 26d). En las películas con 30% en peso de nHA se observaron aglomeración de nHA (Figura 26c) y con 50% en peso de nHA todas las nanopartículas aglomeradas en racimos grandes (Figura 26d). Esta observación juega un papel importante en la explicación de las propiedades estructurales de los nanocompuestos.

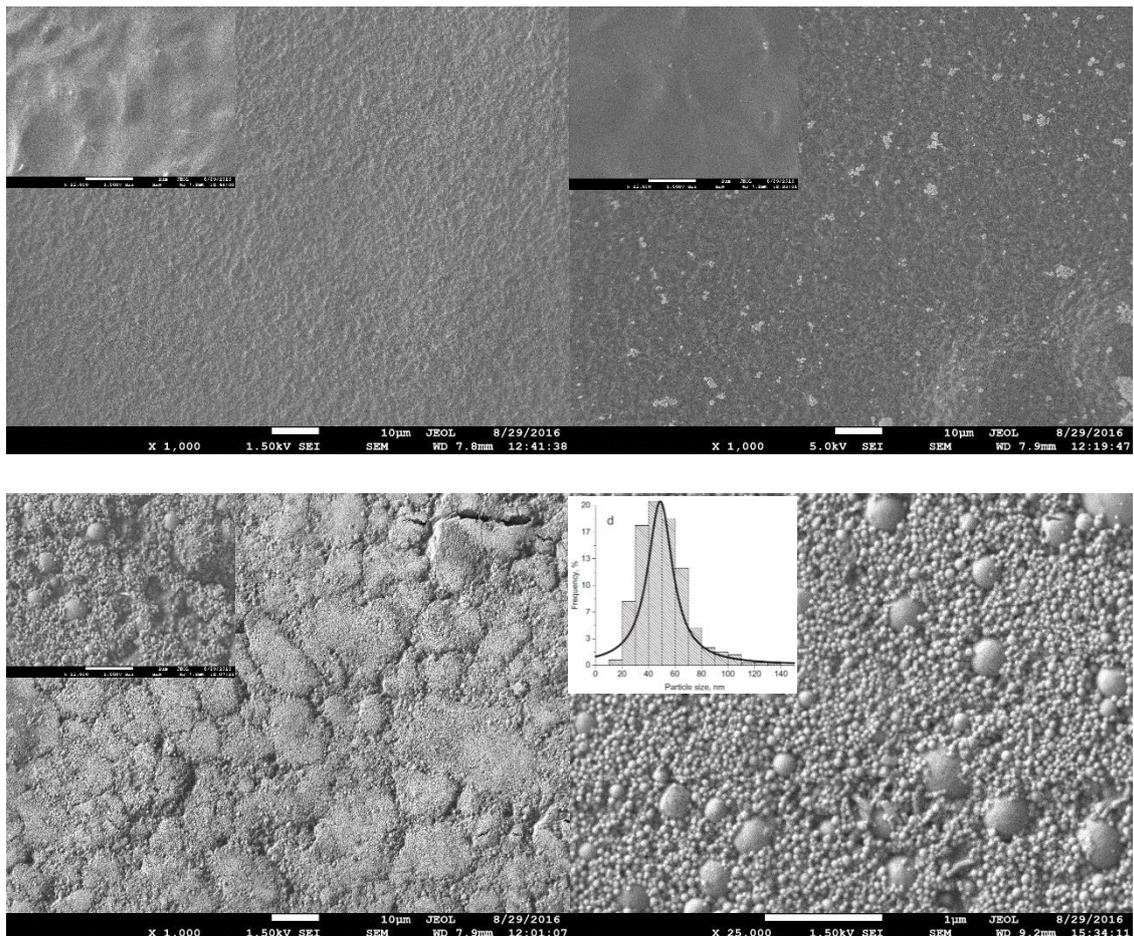


Figura 18. Micrografías FESEM de películas de CS/nHA.

Cuando el quitosano se disuelve en una solución de ácido orgánico diluido, sus grupos amino libres son protonados, aunque es insoluble en una solución acuosa a  $\text{pH} > 7$ . Cuando la solución de la mezcla de quitosano se agrega la solución de nHA altamente alcalina, la suspensión de quitosano precipitado con nHA forma el compuesto de quitosano/nHA y a mayores concentraciones pierde solubilidad por el aumento de pH.

### 3.1.2 FTIR

El espectro FTIR de las películas del nanocompuesto CS-nHA con diferente % en peso de nHA se muestran en la Figura 27. El espectro del CS muestra vibraciones características en el rango de  $3700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a la vibración de los grupos amina e hidroxilo (ca.  $3400\text{ cm}^{-1}$ ) [174], [175]. Adicionalmente, se observó las bandas características a  $1640\text{ cm}^{-1}$  (Grupo I amida) y  $1,545\text{ cm}^{-1}$  (banda de vibraciones de  $\text{NH}_3$ ) [174]. El cambio de posición y la disminución de los picos de intensidad de  $3,400\text{ cm}^{-1}$  a  $3276\text{ cm}^{-1}$  con el aumento de nHA en peso % representa el movimiento de grupos polares de CS; esta observación sugiere que los iones hidroxilo en la superficie de nHA podrían interactuar con los grupos amino e hidroxilo del CS mediante la formación de enlaces covalentes entre CS y nHA [176]. Además, el cambio de banda de  $1545\text{ cm}^{-1}$  a  $1556\text{ cm}^{-1}$  está probablemente relacionado con la alta interacción observada entre grupos  $\text{NH}_3$  del CS y  $\text{PO}_4^{3-}$  de la nHA. Esta interacción se puede observar a una concentración de nHA mayor al 30 % en peso de nanopartículas de nHA.

En los espectros FTIR de nHA las bandas de  $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  corresponden a modos de vibración del grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  de hidroxiapatita [176], [177]. La ampliación de la banda en  $1050\text{ cm}^{-1}$  de las películas CS-nHA con 50 y 70% en peso de nHA muestra la presencia de interacción del CS con los grupos fosfato [178]. Los resultados obtenidos sugieren una interacción más fuerte entre CS y nHA en el contenido de nHA mayor a 30% en peso; esta observación se correlaciona bien con las mediciones de TGA y XRD.

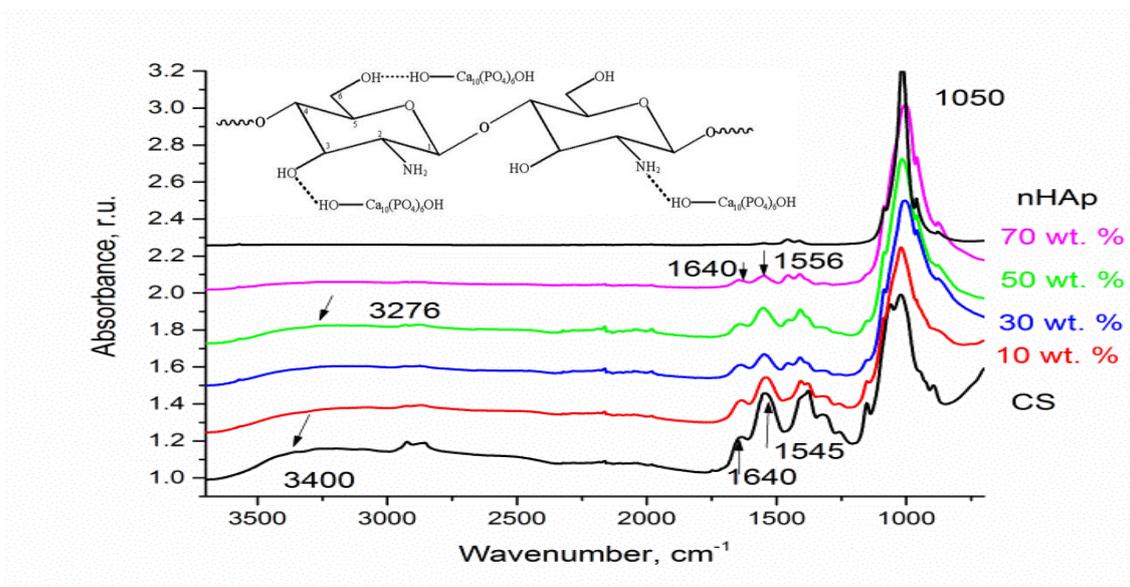


Figura 19. Espectros FTIR de quitosano, películas CS-nHA con concentración de nHA indicada en el gráfico y polvo de nHA

### 3.1.3 XRD

La Figura 28 muestra los patrones de difracción de rayos X de películas de CS y CS-nHA con diferente % en peso de nHA. Un pico más ancho en  $2\theta$  cerca de  $19^\circ$  se asocia con un quitosano amorfo. Por otro lado, la fracción cristalina (pico débil  $2\theta$  cerca de  $12^\circ$ ) se caracteriza por fases cristalinas hidratadas Forma I [174]. Con el aumento de la concentración de nHA este pico desaparece, que significa que con el aumento de % en peso de nHA disminuye la absorción del agua en las películas. Los patrones de difracción de la nHA en polvo corresponden a la fase hexagonal P63/m (176) de la hidroxiapatita (líneas verticales en Figura 28 expresa posición e intensidad de la fase hexagonal P63/m (176)). El cálculo del tamaño de los nanocristales fue de acuerdo con la fórmula de Scherrer [13], dio el valor de **crystalitos** aproximadamente de 45 nm, que se correlacionan bien con las mediciones de FESEM de las dimensiones de nanopartículas descritas en el siguiente apartado. Esto significa que la mayor parte de las nanopartículas consisten en cristalitos. Además, se obtuvo que el tamaño de cristal de las películas de nHA en CS es el mismo que en polvo. Por lo tanto, se propone en este método de trabajo que la preparación de las películas (disolución de nHA en una solución de buffer de fosfato) permite obtener la misma dimensión de nanopartículas en contraste con otros métodos en el que la dimensión de los cristalitos disminuye en películas CS-nHA [13], [21], [23], [24]. Tales efectos tienen diferentes explicaciones: el ácido acético puede disolver los cristales de nHA y como resultado la disminución de dimensión de cristales en nHA [13];

la presencia de unión entre las partículas de nHA y la matriz del polímero [21], [23]. Los nanocompuestos caracterizados exhiben una fuerte unión entre las partículas de nHA y la matriz del CS mientras que las dimensiones de tamaño de nHA no cambiaron. Es plausible que la disminución del tamaño de cristal de nHA se reportó en muchos estudios anteriores y puede estar relacionado con el método de preparación [13], [21], [23], [24].

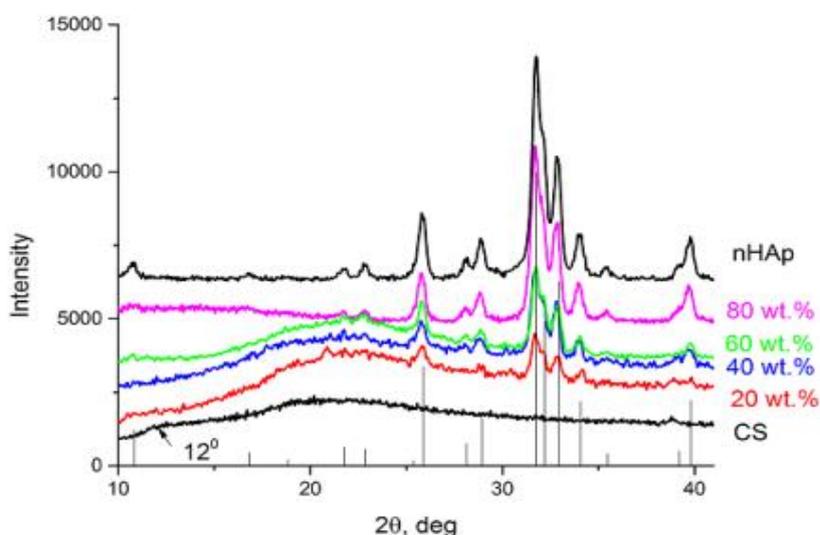


Figura 20. Patrones de DRX de películas de CS, CS-nHA con 20, 40, 60, 80% en peso de polvo de nHA y nHA

#### 3.1.4 TGA

El contenido de agua en películas CS-nHA se determinó mediante análisis termogravimétrico (TGA). Hay dos etapas de degradación como se observa en la Figura 29. La primera gama (50-200 °C) está asociada con la pérdida de agua de aproximadamente 5-20 % en peso, mientras que la segunda gama (200-400 °C) corresponde a la degradación y desacetilación del quitosano y dejó alrededor de 40-90 % en peso de residuo sólido. El CS/nHA a mayor % de nHA se descomponen más lento y por lo tanto son más estables que el CS. La reducción de nHA en quitosano induce fuertemente la degradación térmica de la matriz.

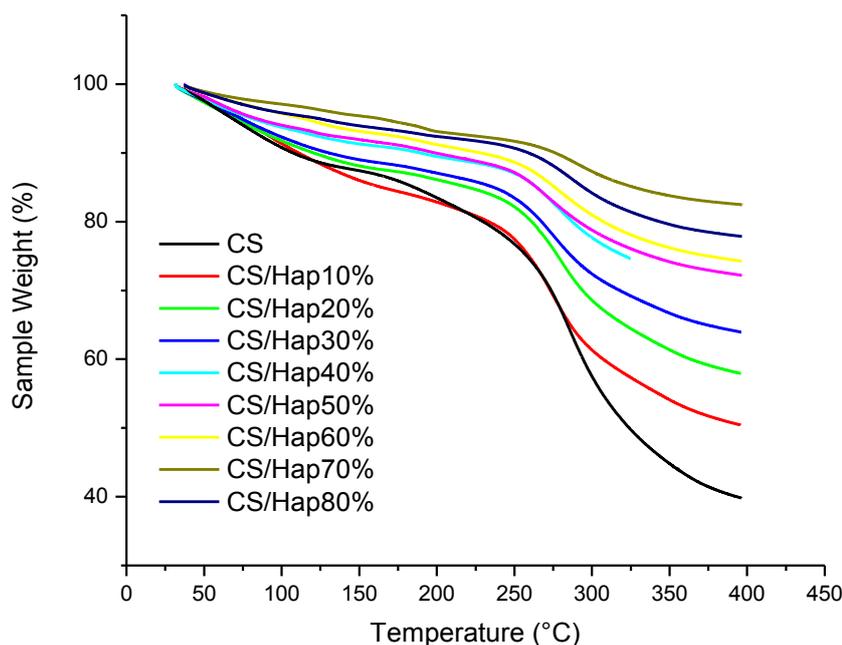


Figura 21. TGA de películas de CS/nHA con diferentes wt. % de HA

La cantidad de agua libre puede evaluarse mediante la disminución del peso de la muestra durante los ciclos de calentamiento. La pérdida de peso a 130 °C es el resultado de la evaporación del agua. La Figura 30 muestra la dependencia del contenido de humedad en la concentración de nHA: aumento de % en peso de nHA conduce a un menor contenido de humedad en las películas de nanocompuestos. De acuerdo con las referencias [174], [175], [179], las moléculas de agua se unen por hidrógeno con ambos grupos -OH y -NH<sub>3</sub> de quitosano. Por lo tanto, la disminución del contenido de agua con el aumento de la concentración de nHA indicó la fuerte interacción entre los grupos reactivos NH<sub>3</sub> y OH de CS con nHA. Se puede obtener más información sobre la interacción entre CS y nHA a partir de las mediciones de FTIR.

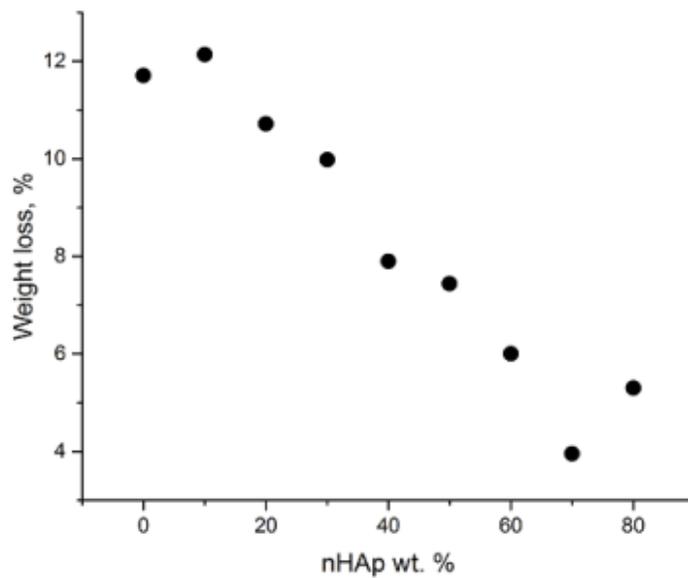


Figura 22. Dependencia del contenido de agua de las películas CS-nHA en la concentración de nHA

### 3.1.5 Perfilometría óptica

Teniendo en cuenta los datos enumerados en la Tabla 5 y la Figura 31, las películas de CS/nHA utilizadas deben considerarse como superficies rugosas porque la escala de rugosidad está en micrómetros. La rugosidad media en la superficie de CS es de  $0.23 \pm 0.08 \mu\text{m}$  y el aumento de nHA tiene un aumento en la rugosidad de la superficie. Este aumento se puede ver claramente a partir del 40 % de nHA con  $R_a$  de  $0.79 \pm 0.05$  y en muestras de 40 % a 80 % nHA son muy similares. En investigación previas sobre los efectos de la rugosidad en mayor proliferación celular se obtienen con  $R_a$  menores a  $1.2 \mu\text{m}$  [180] y mayores a  $0.05 \mu\text{m}$  [181] por lo que está dentro de los parámetros de rugosidad establecidos. En este tipo de experimentos, existen diferencias entre los cambios en la topografía de la superficie según el método de preparación y tamaño de partícula y concentración de nHA durante la síntesis de las películas. El aumento de la rugosidad puede dar como resultado el aumento de la adhesión de cualquier capa depositada sobre la superficie activada. Cuando se agrega el 10 % de nHA en matriz de CS la rugosidad fue mínima  $0.09 \pm 0.01 \mu\text{m}$  (Tabla 5).

Tabla 4. Rugosidad de películas de CS/nHA.

	RUGOSIDAD $R_A$	ERROR
<b>CS</b>	0.23825	0.0812
<b>CS/10%NHA</b>	0.099	0.0148
<b>CS/20%NHA</b>	0.304	0.0218
<b>CS/30%NHA</b>	0.396	0.0743
<b>CS/40%NHA</b>	0.7965	0.0579
<b>CS/80%NHA</b>	0.776	0.0285

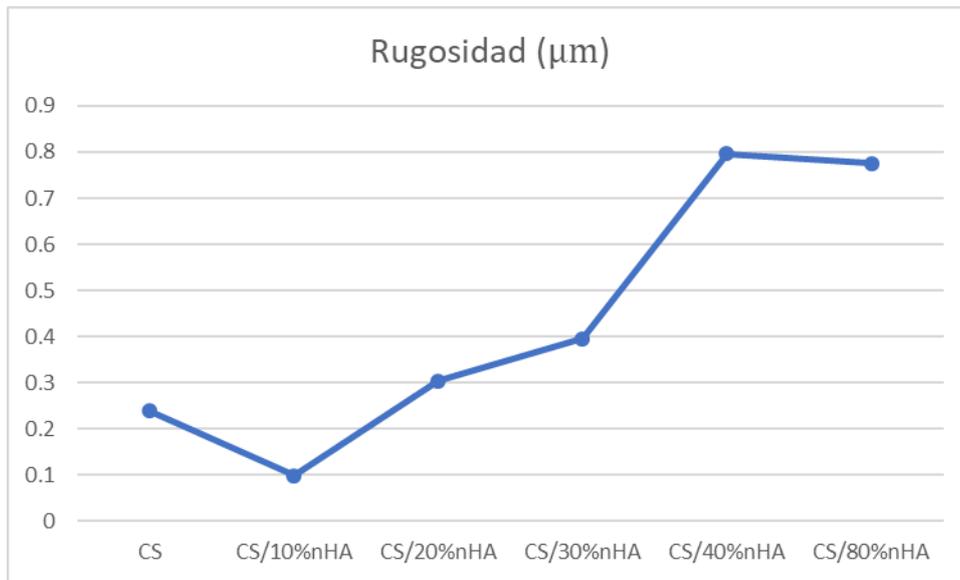
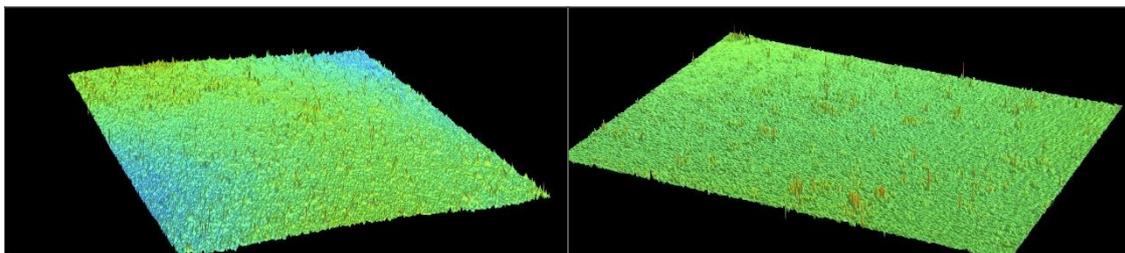


Figura 23. Dependencia de rugosidad con concentraciones de nHA.

Como se puede ver en la Figura 32, la superficie del quitosano exhibe una estructura uniforme en comparación con concentraciones mayores al 20% de nHA debido a la conglomeración de nanopartículas de nHA y saturación dentro de la matriz de CS. La película de CS/10%nHA muestra una superficie homogénea debido a la buena interacción que se tiene al 10 % de nHA comprobado con la caracterización realizada en este trabajo. Incluso en concentraciones al 30 % de nHA la rugosidad en la Figura 32d, se pueden ver claramente las esferas formadas por la saturación de nHA.



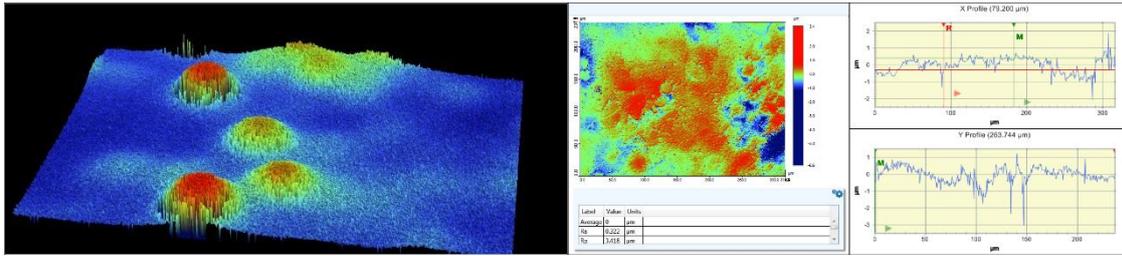


Figura 24. La rugosidad CS, CS/nHA10%, CS/nHA20% y CS/nHA30%.

### 3.1.6 pH de la solución

La estabilidad in vitro de la solución de CS con y sin nHA se midió cuantitativamente y se representó gráficamente en la Figura 33. La adición de hidroxiapatita tiene un efecto alcalino sobre el pH de la solución en diferentes preparaciones con y sin buffer de fosfatos. Como se anticipó, hubo un aumento drástico de pH de 2.8 a 3.9 al agregar 20 % de nHA en ácido acético. La solubilidad de nHA se puede controlar optimizando la cantidad de nHA en la solución de quitosano durante la reacción.

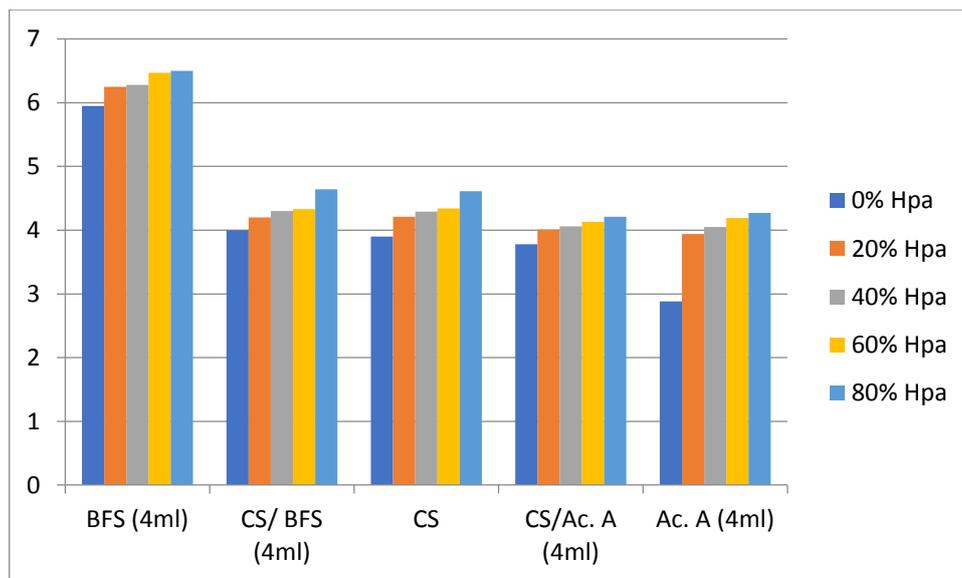


Figura 25. Cambios de pH en diferentes soluciones al aumento de nHA.

Si la concentración iónica, y por lo tanto el pH sube por encima de un valor crítico, se producirá citotoxicidad. Las células deben poder unirse al andamio ya que la mayoría de las células no pueden sobrevivir sin adherirse a una superficie. La adhesión celular se ve afectada por las propiedades de la superficie, incluida la carga, la textura y la rigidez [88], [182], [183]. Por tal motivo se utilizó el buffer para tener un pH más alcalino.

### 3.1.7 Pruebas dieléctricas

Información adicional sobre la estructura y las propiedades del nanocompuesto de las películas CS-nHA se pueden obtener a partir de mediciones de espectroscopia dieléctricas como se muestra en Figura 34, muestra espectros de impedancia experimental del nanocompuesto CS-nHA en el rango de frecuencia 40 Hz-100MHz. Todas las películas exhiben los semicírculos característicos. Los valores de resistencia de DC y la capacitancia de las películas se han obtenido por el fitting de estos semicírculos utilizando la expresión de Cole-Cole y el programa ZView [179].  $R_{dc}$  se calculó por la intersección del semicírculo con el eje  $Z'$ . Conductividad eléctrica DC ( $\sigma_{dc}$ ) y la constante dieléctrica en el límite de la frecuencia cero ( $\epsilon_s$ ) puede ser entonces calculada por las siguientes relaciones:

$$\sigma_{dc} = \frac{d}{R_{dc} * A}$$
$$\epsilon_s = C * \frac{d}{\epsilon_0 * A} \epsilon_s$$

donde  $d$  es el espesor de la película,  $A$  es el área de la película y  $\epsilon_0$  es la constante dieléctrica de vacío, respectivamente.

La Figura 34a muestra la dependencia de la conductividad ( $\sigma_{dc}$ ) y la constante dieléctrica en el límite de la frecuencia cero ( $\epsilon_s$ ) como función del % en peso de nHA y la fracción volumétrica. Con el fin de convertir la fracción en peso (wt %) a la fracción volumétrica (V) de la nHA, la siguiente ecuación se puede usar [184]:

$$V = \frac{Wt}{Wt + (\rho_{HA}/\rho_{CS})(1 - Wt)}$$

dónde,  $\rho_{HA}$  y  $\rho_{CS}$  denotan la densidad de la nHA y el CS. La densidad de la película del CS es ca.  $1.5 \text{ g cm}^{-3}$ [185], [186], la densidad aparente de la nHA (tamaño ca. 30 nm) está en el intervalo de  $1.5\text{-}2,7 \text{ g cm}^{-3}$ [187], [188]. En este estudio, se utilizó un valor medio de  $2.1 \text{ g cm}^{-3}$ . Es evidente a partir Figura 34 que todas las dependencias exhiben un máximo en la concentración de nHA de ca. 30-40 % en peso. Por regla general, el efecto de la constante dieléctrica de la mezcla de dos materiales dieléctricos (como en el caso de CS y nHA) puede calcularse utilizando modelos como el de Maxwell, Bruggeman o Lichtenecker [189], [190]. Sin embargo, todos estos modelos producen un crecimiento monótono en el efecto de la constante dieléctrica con el aumento de concentración de las

nanopartículas en la matriz del polímero [190]; no muestran ningún máximo como se observa en Fig. 34b. Es de destacar que lo informado en la literatura no abordan plenamente las propiedades de conductividad de nanocompuestos CS-nHA.

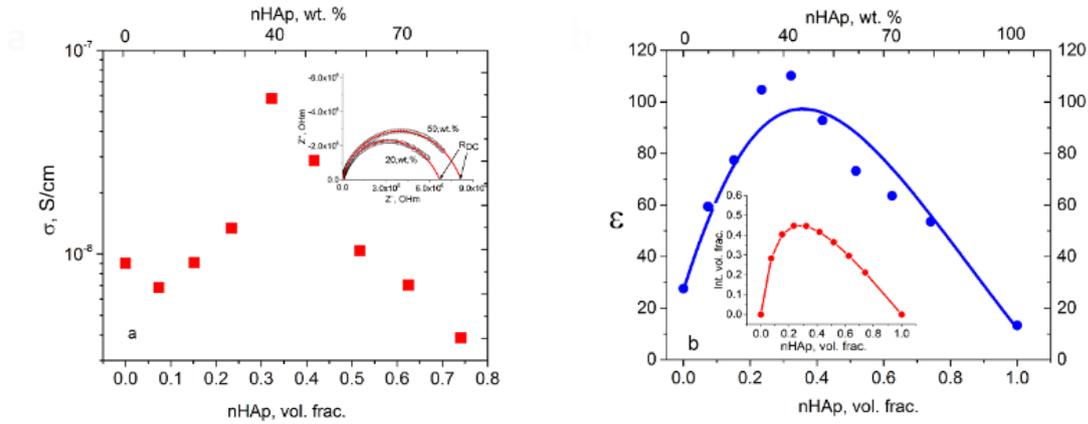


Figura 26. a) Dependencia de la conductividad DC ( $\sigma$ ) de las películas CS-nHA y b) dependencia de la constante dieléctrica en el límite de frecuencia cero ( $\epsilon_s$ ) obtenida en las películas CS-nHA

Para arrojar más información sobre las interacciones moleculares entre la matriz CS y la nHA se llevaron a cabo mediciones adicionales de espectroscopia dieléctrica en el rango de frecuencia de GHz. Se ha informado anteriormente de que en el rango de frecuencia de  $10^7$ - $3 \times 10^9$  Hz la dependencia de la pérdida dieléctrica de la frecuencia exhibe dos procesos de relajación relacionados con la rotación de OH (centrado en ca.  $5 \times 10^8$  Hz) y grupos  $\text{NH}_3$  de CS (centrado ca.  $1 \times 10^9$  Hz) [123]. Estos dos procesos de relajación se observan también en películas de CS/nHA con concentraciones de nHA debajo de 30 % en peso. En concentraciones de nHA superiores a 40 % en peso, en películas de nanocompuestos, el proceso de relajación relacionados con la rotación de grupos  $\text{NH}_3^+$  se desvanece, pero la posición y la amplitud relacionada con la rotación de grupos OH prácticamente no cambian ver Figura 35a. Además, la energía de activación de rotación de los grupos OH aumenta aproximadamente tres veces (Figura 35c).

Las mediciones de temperatura permitieron obtener la energía de activación de rotación de grupos OH de CS. La Figura 35b muestra las dependencias de tiempo de relajación frente a la temperatura recíproca en películas con 50 % en peso de nHA. El proceso de relajación puede ser descrita por la dependencia de tipo Arrhenius:

$$\tau = \tau_0 \exp \frac{E_a}{RT}$$

donde  $E_a$  es la energía de activación.

Tras el calentamiento por encima de 50 °C, la energía de activación demuestra la pendiente positiva debido a la evaporación de agua y la rotura del enlace H entre los grupos secundarios de CS y moléculas de agua [174]. En la Figura 35c se muestra la dependencia de la energía de activación en concentraciones de nHA en las películas del nanocompuesto. Es plausible que existe una fuerte interacción entre los grupos secundarios OH de CS con nHA.

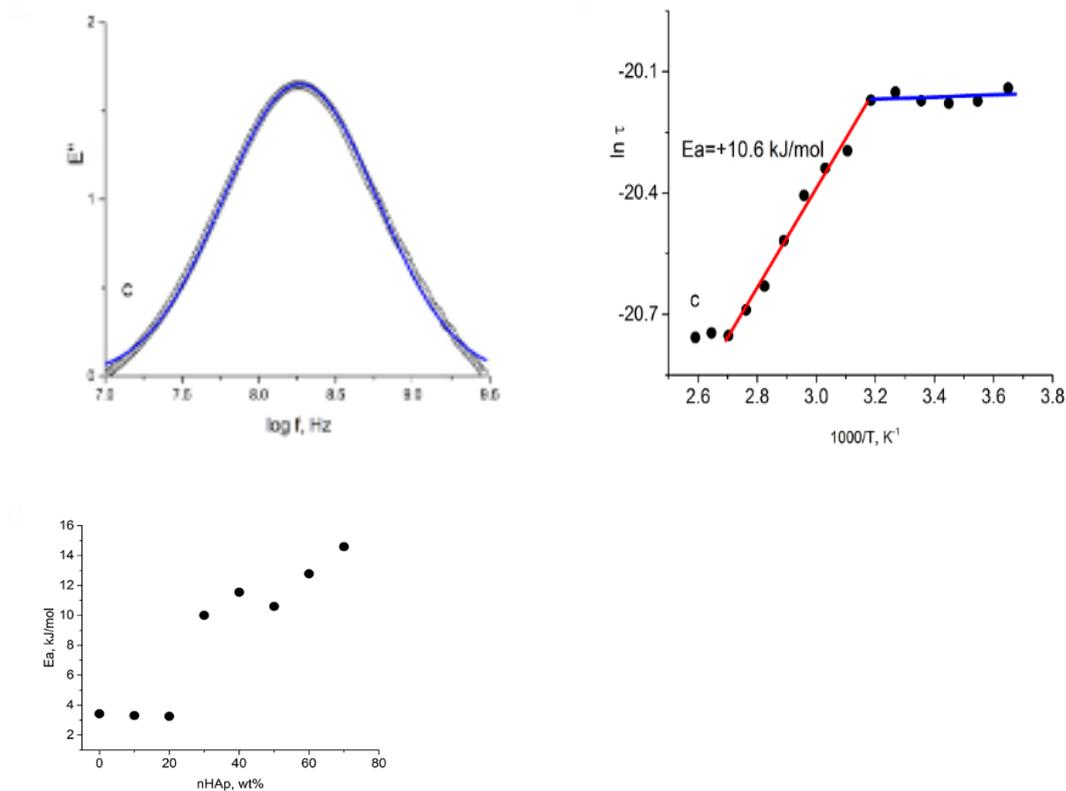


Figura 27. a) Dependencia de la pérdida dieléctrica frente a la frecuencia medida a 20 ° C en películas CS-nHA con 50 % en peso de nHA, utilizando el modelo empírico Cole-Cole [25]. b) Dependencia de la temperatura del tiempo de relajación versus 1/T para películas con 50% en peso de nHA c) Dependencia de la energía de activación de los grupos laterales de CS de OH en la concentración de nHA en películas de nanocompuestos.

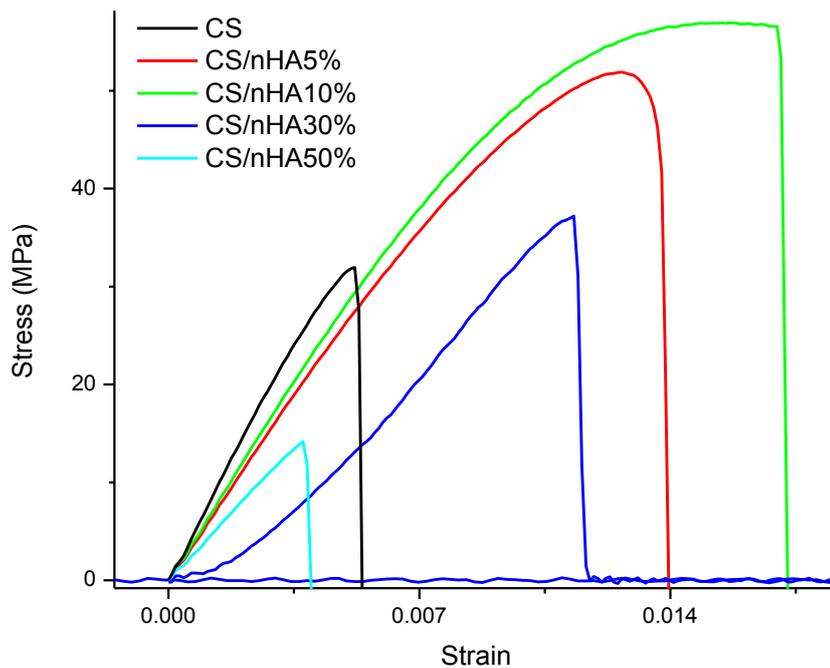
### 3.1.8 Pruebas mecánicas

#### 3.1.8.1 Pruebas de tensión

Las propiedades de tracción se midieron utilizando la máquina y el software del equipo que generó la curva de fuerza-desplazamiento de las películas del nanocompuesto,  $\sigma = F/A$  la se divide entre el área transversal de las películas para calcular el esfuerzo y la resta del desplazamiento final menos el inicial obtenemos la deformación. Como se observa en la Figura 36 la gráfica esfuerzo-deformación hay un aumento en la deformación del 0.53 % en CS hasta el 1.3 y 1.7 % con 5 % y 10 % de nHA respectivamente para después

reducirse a un mínimo de 0.38 % con el 50 % nHA. La resistencia a la tracción, el alargamiento en la rotura y el módulo de Young se obtuvieron de las curvas de tensión y deformación calculando la pendiente en la región plástica de la curva esfuerzo-deformación y restando las longitudes para obtener de deformación. Los resultados de las pruebas mecánicas realizadas a las diferentes concentraciones de nHA, donde se evidencia un comportamiento muy marcado en 30 % de nHA. Para las películas con más del 30 % de nHA las propiedades como el módulo elástico a tensión y compresión caen más del 70% debido a la saturación de nHA en la matriz del CS y causa que el material pierda rigidez como se observa en la Figura 36. Con un módulo elástico de 1.85 GPa a compresión y 6 GPa a tensión, un aumento del 105 % y del 140 % respectivamente al 30 % de nHA, este es el comportamiento esperado al agregar un material rígido a una matriz termoplástica como el CS.

El CS presenta una mayor cantidad de grupos hidroxilo, que promueven la absorción de humedad y por ende la elasticidad del material. Siendo el material más elástico, reduce su capacidad de resistir a la tensión y por eso bajan sus propiedades respecto a las películas con mayor % de nHA. Un aumento en la cantidad de nHA en las películas debe resultar en una disminución de la ductilidad [191]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en literatura [1], [11], [125], [126], [192]–[194].



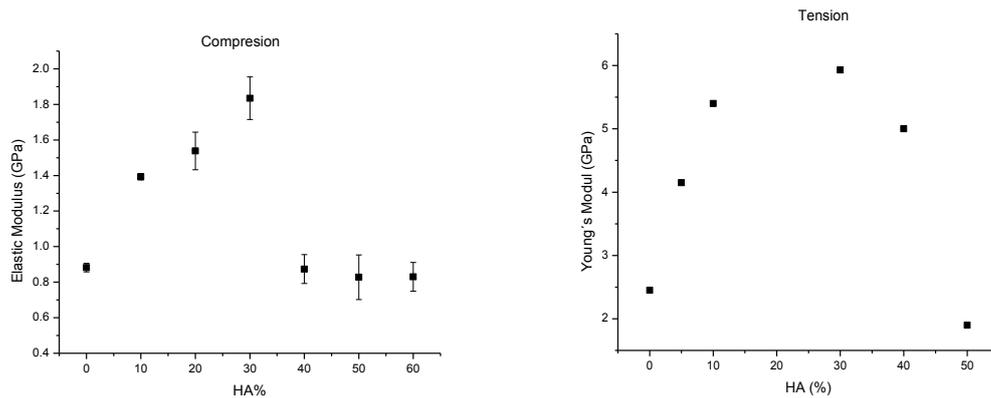


Figura 28. a) Grafica esfuerzo deformación de películas CS/nHA b) Compresión de películas CS/nHA, c) tensión.

Se cree que la adición de nHA mejoró las propiedades mecánicas de los compuestos, sin embargo, el mecanismo de acción se puede entender completamente con los estudios previos de TGA y FTIR. El Módulo de Young es un parámetro muy importante para un material, ya que permite calcular la deformación de una muestra bajo cierta carga. Se muestra una relación obvia entre el módulo de Young y el contenido de nHA. El 30 % de nHA es la mejor opción de todos los materiales fabricados, ya que tiene el Módulo Young más alto tanto a tensión como a compresión.

### 3.1.8.2 Nanoindentación

Las curvas típicas de indentación de carga-desplazamiento de las películas del compuesto CS-nHA de las cuales la dureza ha sido calculada como se muestra en la Figura 37. Todas las muestras mostraron la naturaleza típica elastoplástico de deformación. Con ello se espera a partir de la combinación una mayor rigidez y dureza con el aumento de nHA a 30 % en peso. La dureza (H) y el módulo elástico reducido (Er) se muestran en Figura 37a y 37b respectivamente que exhibe un máximo; H aumenta de 0,3 GPa a 1,09 GPa y Er de 6 GPa a 31 GPa en películas con 30 % en peso de nHA cuando se compara con CS puro. En la mayor concentración de nHA, H y Er en ambos se obtiene una disminución. La dureza (H) en materiales compuestos con 30 % en peso nHA muestra valores más altos que los de hueso cortical bovino en las direcciones longitudinales y transversales:  $H_{\text{longitudinal}} = 0.505 \text{ GPa}$ ,  $H_{\text{transversal}} = 0.387 \text{ GPa}$  [195], y  $H_{\text{longitudinal}} = 0,74 \text{ GPa}$ ,  $H_{\text{transversal}} = 0,64 \text{ GPa}$  [196]. En la Figura 37 está claro que H y E se han incrementado para películas CS-nHA con 30-40 % en peso de nHA. A mayor concentración de nHA ambos H y E disminuyen. Es de destacar que nuestro nanocompuesto no sigue el comportamiento esperado de mezcla de la mayoría de los materiales compuestos polímero-cerámico [197].

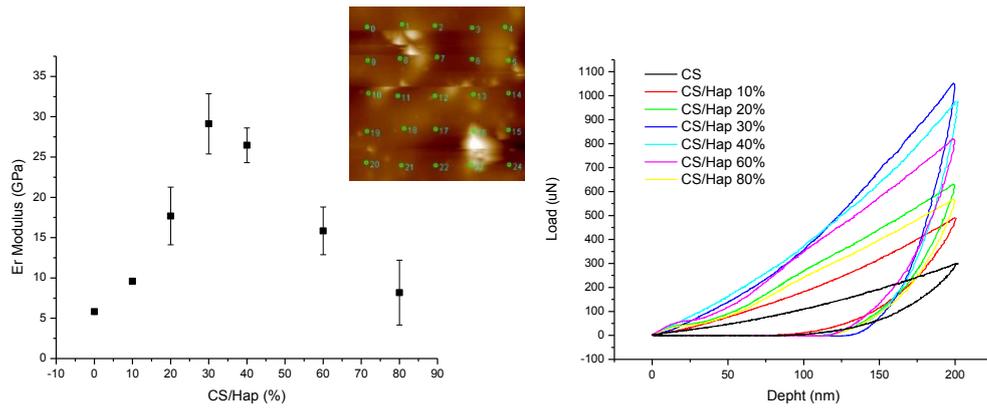


Figura 29. a) Imagen donde se realizaron de 20 a 25 nanoindentaciones en una matriz de 30x30 µm b) Curvas típicas de carga-profundidad c) dureza de películas del nanocompuesto CS/nHA d) Modulo Elástico reducido.

Estas 2 mediciones independientes que utilizan nanoindentación y pruebas de tensión han demostrado una buena repetibilidad que confirma que las propiedades locales y de volumen son las mismas. Además, estas mediciones demuestran que las mejores propiedades mecánicas se observaron al 30% en peso de HA.

### 3.1.8.2.1 Mecanismo de interacción entre CS y HA Capa de interfaz.

Todas las propiedades investigadas de las películas de nanocompuestos CS-nHA como la dureza (Figura 37c), el módulo elástico reducido ( $E_r$ ) (Figura 37d), la conductividad de CC (Figura 34a) y la constante dieléctrica (Figura 34b) exhiben un fuerte aumento en el valor cuando la concentración de nHA aumenta de 0 wt. % a 30-40 wt. % (a mayor concentración disminuyen los parámetros). Tal aumento brusco de los valores de las propiedades está relacionado con la formación de microestructuras conectadas o percoladas en nanocompuestos. El fenómeno más estudiado son las percolaciones de conductividad eléctrica (ver, por ejemplo, [139], [140]); los modelos teóricos asociados proporcionan una explicación de la conductividad eléctrica del compuesto a la concentración crítica (o umbral de percolación) de la fase conductiva en la matriz dieléctrica. Recientemente, se han propuesto otros modelos para describir los fenómenos de percolación mecánica [145], [146], [198] y dieléctrica [139].

Es de destacar que los modelos clásicos de percolación de una matriz con inclusiones no pueden describir muchos resultados experimentales observados en una nanoestructura percolada. Para sortear este problema, los modelos modernos consideran una fase adicional, a saber, la capa interfacial para caracterizar mejor las propiedades efectivas de los nanocompuestos. Dichos modelos trifásicos se han propuesto para conductividad

eléctrica [139], mecánica [145], [146], [198] y fenómenos de percolación dieléctrica [172].

En base a las observaciones anteriores, ahora intentamos adaptar el modelo trifásico a nuestro estudio de las películas CS-nHA. Primero, reconocemos que las dependencias de dureza de la propiedad-nHA de la concentración y el módulo elástico reducido ( $E_r$ ) sugieren fuertemente propiedades de percolación mecánica, es decir, al aumentar la concentración de nHA existe un fuerte aumento en las propiedades mecánicas probablemente debido a la existencia de una capa interfacial entre nHA y Matriz CS. A medida que aumenta la concentración de nHA, las regiones interfaciales que rodean las nanopartículas se superponen, lo que indica la percolación en los grupos de alta densidad que domina las propiedades mecánicas. Es de destacar que los modelos de percolación mecánica propuestos en las referencias [145], [146], [199] predicen la saturación de propiedades mecánicas por encima del umbral de percolación. Por el contrario, hemos observado una fuerte disminución en las propiedades mecánicas por encima de la percolación (ver Figura 37). Se han observado previamente efectos similares de propiedades mecánicas decrecientes en nanocompuestos [200]. Los modelos teóricos no pueden predecir resultados experimentales por encima del umbral de percolación probablemente debido a la suposición de que se mantiene un espesor constante de la capa interfacial; Es posible que una aglomeración significativa por encima de la percolación provoque una superposición de conglomerados que finalmente reduce el grosor de la capa interfacial y la posterior segregación de fase. Esta suposición se basa en la consideración de que el grosor de la capa interfacial cambia por encima de la percolación que afecta las propiedades dieléctricas de los nanocompuestos.

La dependencia de la constante dieléctrica de la concentración de nHA que se muestra en la Figura 37b es análoga al comportamiento observado en la Figura 37; también se produce un máximo a la concentración de nHA ca. 30-40 wt. % Como se discutió previamente, todos los modelos de dos fases (inclusiones dieléctricas de matriz polimérica) predicen un aumento monótonico de la constante dieléctrica efectiva al aumentar la concentración de nanopartículas [189], [190]. Aquí, la constante dieléctrica efectiva de los materiales compuestos de partículas de polímero depende de la concentración de partículas, la capa interfacial y la interacción entre el relleno de polímero en la región interfacial.

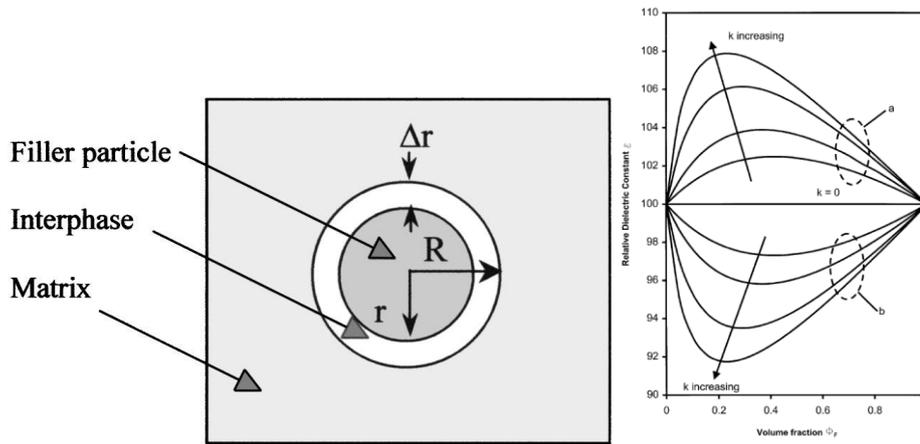


Figura 30. Ilustración de partícula de relleno, región de interfase y matriz polimérica en un compuesto polímero-cerámica

La predicción de la constante dieléctrica efectiva en función de la fracción de volumen de nanopartículas [201] propuso que el efecto de percolación dieléctrica se puede describir cuando la fracción de volumen del relleno dieléctrico alcanza el umbral de percolación. Por encima de este punto, las capas interfaciales se superponen, reduciendo así la fracción de volumen interfacial que cambia efectivamente las propiedades de la capa interfacial. Para describir dicho sistema trifásico, [139] introducen un parámetro  $K$ , denominado constante de volumen interfacial, que explica la fuerza de interacción matriz-relleno como:

$$\phi_{int} = K\phi_{NPs}\phi_{pol}$$

donde  $\phi_{int}$ ,  $\phi_{NPs}$  y  $\phi_{pol}$  son las fracciones de volumen de la fase interfacial, las partículas dieléctricas y el polímero, respectivamente.  $K$  depende del grado de agrupamiento de partículas. La suma de todas las fracciones volumétricas de polímero, partículas dieléctricas y fase interfacial debe ser igual a 1, como se muestra:

$$1 = \phi_{pol} + \phi_{NPs} + \phi_{int}$$

Al aumentar la fracción de volumen de nanopartículas (NP) hasta alcanzar el umbral de percolación, la superposición de la fase interfacial reduce  $\phi_{int}$  (es decir, las aglomeraciones de NP observadas). Este efecto es responsable de la dependencia no monótona de la constante dieléctrica efectiva. Un valor de cero para  $K$  indica que no hay una región de fase interfacial entre las NP y la matriz polimérica. Los valores positivos para  $K$  están relacionados con una fuerte interacción entre el polímero y las NP; si  $K$  aumenta, hay un aumento efectivo de la constante dieléctrica del nanocompuesto.

Este modelo ha demostrado que la dependencia de la constante dieléctrica de la concentración de partículas no es monótona y puede exhibir un extremo en función de la concentración de NP. Este comportamiento se logra si se cumplen las siguientes relaciones:

$$K > 0, \epsilon_{\text{interfacial}} > \epsilon_{\text{polymer}}, \epsilon_{\text{interfacial}} > \epsilon_{\text{filler}}$$

donde  $\epsilon_{\text{polymer}}$  es la constante dieléctrica de la matriz polimérica,  $\epsilon_{\text{interfacial}}$  es la constante dieléctrica de la fase interfacial, y  $\epsilon_{\text{filler}}$  es la constante dieléctrica de las cargas.

En este trabajo, ajustamos valores obtenidos experimentalmente de la constante dieléctrica efectiva CS-nHA es usando el programa Scilab. El ajuste de mínimos cuadrados se realizó utilizando funciones estándar de optimización de algoritmos genéticos en el paquete computacional numérico Scilab. La constante dieléctrica de CS ( $\epsilon_{\text{polymer}}$ ) y nHA ( $\epsilon_{\text{filler}}$ ) se ha obtenido a partir de mediciones en películas CS limpias y pellet nHA seco. Solo los valores de K y los parámetros  $\epsilon_{\text{interfacial}}$  son los parámetros ajustables. Los límites inferior y superior para los parámetros variables se eligieron como  $0 < K < 100$  y  $0 < \epsilon_{\text{interfacial}} < 500$ . Como resultado de la optimización, los valores ajustados son  $K = 5.65$  y  $\epsilon_{\text{int}} = 318$ .

Los resultados de los accesos referidos se muestran en la Figura 37b como una línea continua. Se puede observar que este modelo trifásico se ajusta bien a los resultados experimentales al predecir un máximo en la constante dieléctrica. Los valores positivos de K significan que las interacciones entre interfaces nHA-CS significativas están presentes como sondeado por las mediciones de FTIR (Figura 34). Es digno de mención que un valor constante dieléctrico de capa interfacial de 318 es considerablemente más alto que el de CS y nHA, de modo que se cumple la relación anterior. Desde el punto de vista físico, este extremo puede estar relacionado con la aglomeración de nHA en los grupos, cambiando así el grosor de la capa interfacial y la interacción entre nHA con la matriz CS (los valores de K aumentan).

El cambio en el grosor o la fracción de volumen de la capa interfacial se puede obtener directamente de las ecuaciones y el valor de K obtenido del ajuste. El recuadro de la Figura 37b muestra las dependencias calculadas de la fracción de volumen interfacial en función de la fracción de volumen nHA. Este gráfico muestra claramente que a una concentración de nHA superior a 30-40 wt. % (donde se observa el umbral de percolación dieléctrica), la fracción de volumen interfacial disminuye debido a la superposición del

clúster. Los resultados obtenidos se correlacionaron bien con las imágenes SEM que se muestran en la Figura 31, es decir, películas con una concentración de nHA superior a 30-40 wt. El 1% exhibe aglomeración significativa de nHA racimos.

Los altos valores reportados de constante dieléctrica obtenida en los compuestos CS-nHA están relacionados con el alto valor constante dieléctrico interfacial debido a la fuerte interacción entre CS y nHA (entre PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de nHA con grupos NH<sub>3</sub><sup>+</sup> de CS) que confirman FTIR y mediciones dieléctricas de alta frecuencia.

También es plausible que el máximo observado en la conductividad y las propiedades mecánicas pueda estar relacionado con los presentes de la capa interfacial.

### 3.1.9 Proliferación celular

La proliferación celular en nanocompuestos CS/nHA se cuantificó utilizando el ensayo alamar blue. La Figura 40 presenta la proliferación de células MC3T3-E1 de preosteoblastos en compuestos CS/nHA con diferentes proporciones de peso de nHA después de 3 de cultivo. Vale la pena señalar que la proliferación celular MC3T3-E1 en la superficie CS/nHA a los 3 días de cultivo es mayor que al primer día de cultivo con 10 y 20 % nHA, lo que indica una buena biocompatibilidad in vitro de CS/nHA a esas concentraciones. La proliferación se evaluó mediante un indicador metabólico no tóxico Alamar Blue (Life technologies, EE. UU.). En resumen, a los 1 y 3 días, las películas sembradas de células se enjuagaron tres veces con PBS y luego se incubaron con medio fresco que contenía 10% (v / v) de indicador azul de Alamar en la oscuridad a 37 ° C bajo 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 h. La absorbancia del colorante extraído, que es proporcional al número de células en las películas, se midió mediante un analizador de inmunoensayo enzimático (Thermo, EE. UU.) a longitudes de onda de 570 y 590 nm.

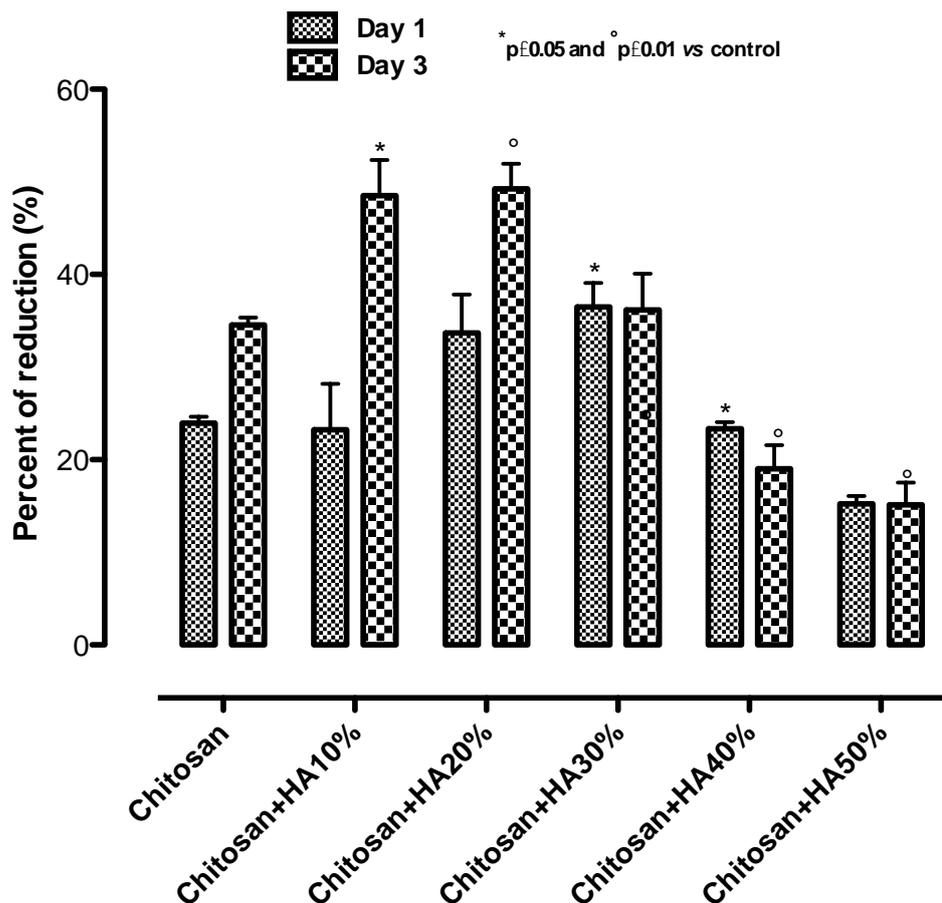


Figura 31. Proliferación celular de películas de CS/nHA

### 3.1.10 Conclusiones del capítulo

La investigación de las películas CS-nHA muestra que se observa un valor máximo en las propiedades mecánicas, dieléctricas y de conductividad cuando se pasa de concentraciones bajas a altas de nHA. Este máximo puede estar relacionado con la aglomeración de clúster de nHA por encima del umbral de percolación (ca. 30-40% en peso de nHA). Las propiedades mecánicas, dieléctricas y de conductividad de las películas de nanocompuestos CS-nHA se han interpretado utilizando un modelo trifásico que incluye: 1) matriz CS, 2) partículas nHA y 3) capa de interfaz entre la matriz nHA y CS. Los resultados del ajuste utilizando el modelo trifásico demostraron una buena correlación con los resultados experimentales. Además, hemos correlacionado el umbral de percolación tanto dieléctrico como mecánico al realizar mediciones dieléctricas relativamente simples. A este respecto, es posible ajustar las propiedades mecánicas, eléctricas y dieléctricas de las películas CS-nHA que se requieren en la ingeniería del tejido óseo.

### 3.2 Nanotubos de pared múltiple (MWCNT)

Los MWCNT disperso en matriz polimérica demuestra aglomeración debido a su escasa solubilidad. Para evitar este problema, los MWCNT se pueden oxidar para unir grupos funcionales en su superficie; la ultrasonificación o el uso de un tensioactivo puede mejorar su dispersión en formulaciones acuosas de MWCNT.

En este trabajo utilizamos MWCNT comercial (funcionalizados por ácido puro y carboxílico) y MWCNT puro funcionalizados utilizando diferentes métodos:

a) Los MWCNT puros están sujetos a tratamiento con HNO<sub>3</sub> en el extractor Soxhlet hirviendo en solución de HNO<sub>3</sub> 7 M durante 3 horas a 90°C (f HNO<sub>3</sub>-MWCNT).

b) Los MWCNT puros se ponen en contacto con una mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / NHO<sub>3</sub> (fH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / NHO<sub>3</sub>-MWCNT). En esta ruta, los MWCNT se sometieron a reflujo durante 120 minutos a 70°C en una mezcla de ácidos sulfúrico y nítrico (relación 3: 1) seguido de sonicación durante 30 minutos. Los MWCNT se filtran a través de una membrana de PTFE de 0,2 mm y se lavan con agua destilada.

c) Los MWCNT puros se trataron en microondas.

#### 3.2.1 FTIR

La estructura de MWCNT y su funcionalización han sido investigadas por mediciones FTIR. Los espectros FTIR de los MWCNT funcionalizados por diferentes técnicas se observan en la Figura 23 se obtuvieron para determinar los grupos químicos formados en las paredes laterales de nanotubos y extremos del nanotubo. Espectros FTIR de no funcionalizados y oxidados los MWCNT se comparan en la figura (2). Los espectros indican bandas intensivas en números de onda 3458 cm<sup>-1</sup> (superficie -OH grupos en grupos carboxilo) [27, 28]. La intensidad creciente puede estar relacionado con el creciente número de estos grupos [29]. Los espectros FTIR de MWCNT funcionalizados exhiben bandas en 1640 cm<sup>-1</sup> de carbono doble enlace C = O que es característico de grupos funcionales carboxilo [27, 28]. Adicional, en fH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / NHO<sub>3</sub>-MWCNTs, hay una banda a 1560 cm<sup>-1</sup>. El origen de esta banda sigue siendo controvertida, y puede estar relacionada con vibraciones de las paredes gráficas en MWCNT [30] o en insaturadas estructural de enlace C = C o defectos en nanotubos paredes [27].

Es necesario tener en cuenta que MWCNT funcionalizados usando microondas ha mostrado los mismos espectros de FTIR que MWCN comercial puro. Esto significa que, probablemente, la energía de microondas o el tiempo de tratamiento no permitieron obtener MWCNT funcionalizados. Por lo tanto, para una investigación futura solo pura, se han utilizado f HNO<sub>3</sub>-MWCNT y fH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / NHO<sub>3</sub>-MWCNT.

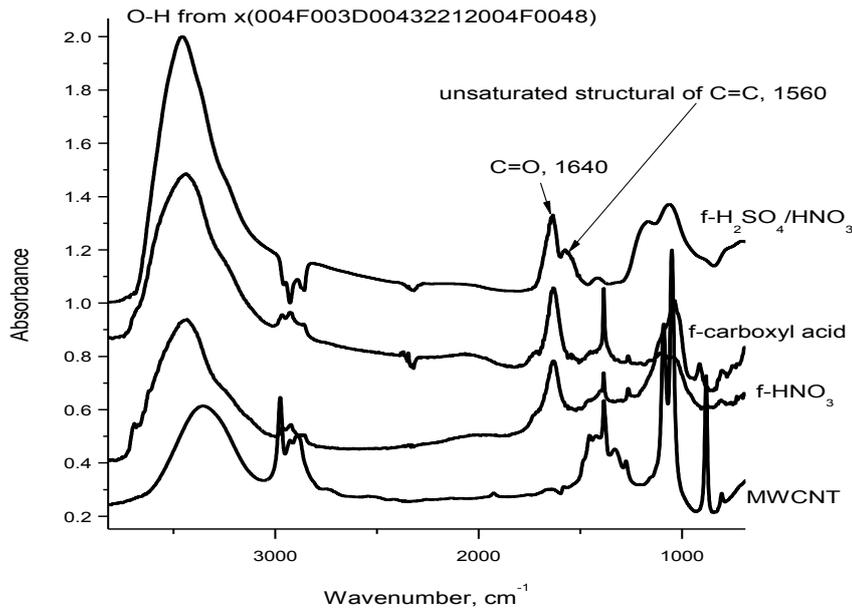


Figura 32. Espectros FTIR de MWCNT puros y funcionalizados.

### 3.2.2 SEM y TEM

Las imágenes SEM de MWNT muestran que la longitud de los MWCNT, f-MWCNT (comercial) y fHNO<sub>3</sub>-MWCNT es aprox. 3-10 μm (Figura 21). Por el contrario, la longitud de fH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NHO<sub>3</sub>-MWCNT se redujo considerablemente a 0.3-1 μm (Figura 21c) debido al tratamiento agresivo del ácido.

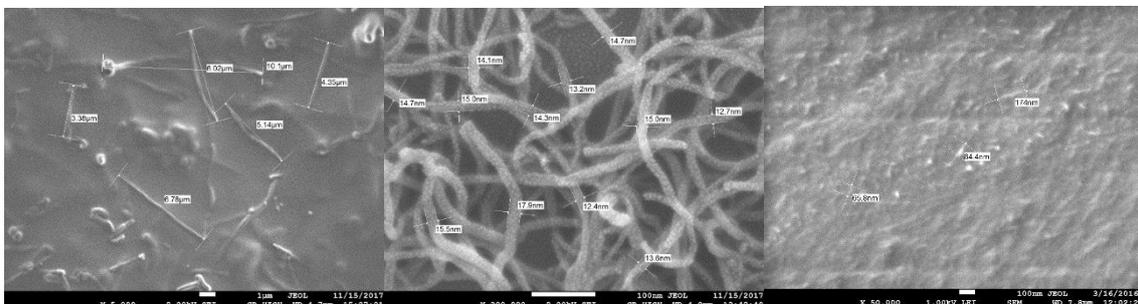


Figura 33. a) Mediciones de largo y ancho de f-MWCNT, b) fHNO<sub>3</sub>-MWCNT y c) fH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NHO<sub>3</sub>-MWCNT

Se muestran las micrografías STEM de muestras MWCNT en la Figura 22. Se revelaron estructuras de filamentos huecos para todas las muestras y se descubrió que sus

características específicas varían según los diferentes métodos de funcionalización. Además de lo observado en las micrografías anteriores, las imágenes STEM revelaron una distribución uniforme del diámetro y una alta pureza.

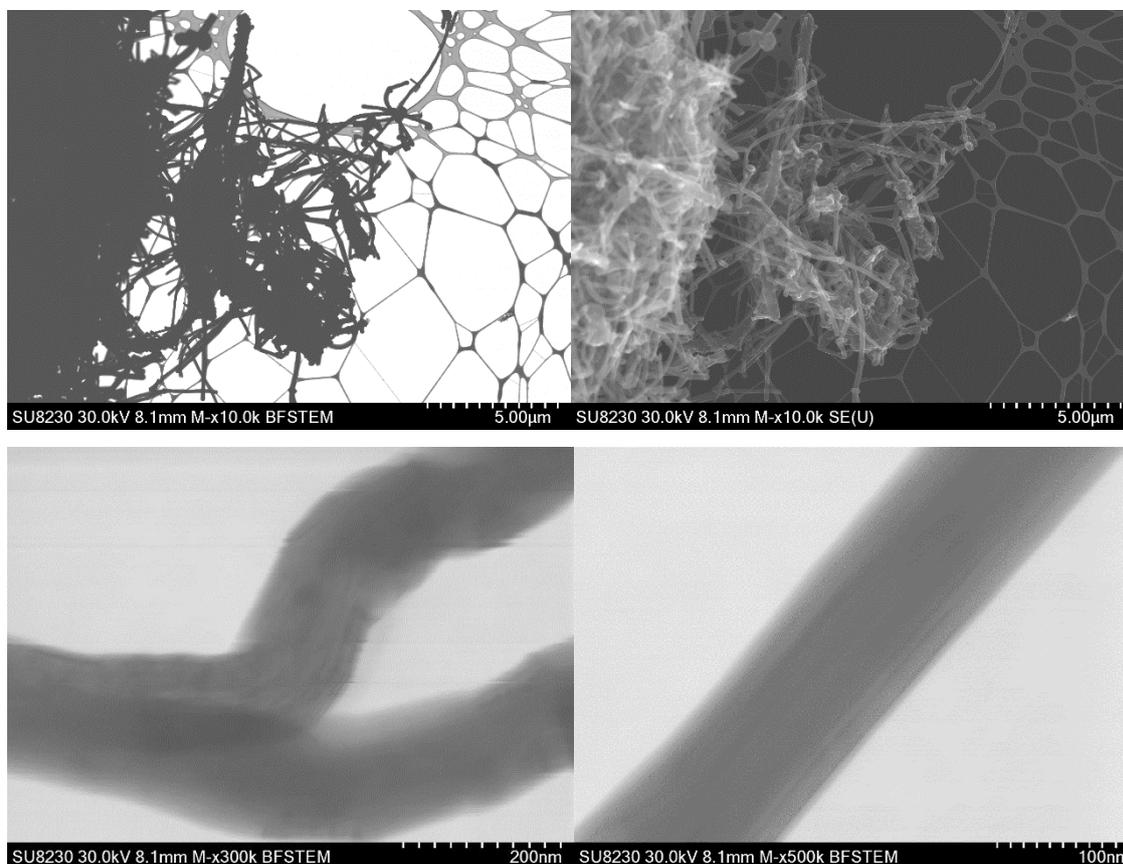


Figura 34. Micrografía STEM de MWCNT

### 3.2.3 XRD

La Figura 24 se muestran los perfiles de XRD de los MWCNT. Se puede encontrar que las muestras puras y oxidadas poseen una estructura similar a la del cristal de grafito, lo que indica que el proceso de funcionalización no cambia la estructura en masa de los MWCNT. El pico de difracción más fuerte y agudo para todas las muestras es alrededor de  $2\theta = 26.3^\circ$  podría indexarse como la reflexión C (002) del grafito. La agudeza del pico C (002) indica que la estructura de grafito de los MWCNT se oxidó con dos ácidos sin daños significativos. Los XRD se usaron para medir el tamaño del cristal y el espaciado entre capas. Debido a la naturaleza intrínseca de los CNT, las características principales del patrón de difracción de rayos X son similares a las del grafito. Las mediciones del tamaño de cristal ( $d$ ) se pueden lograr a partir de este pico y la ecuación de Scherrer. Como se mencionó anteriormente, el tamaño promedio de cristalitas de los MWCNT se

determinó utilizando los patrones XRD, a través de la conocida ecuación de Scherrer[202]:

$$d = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

donde  $\beta$  es el ancho completo a la mitad del máximo (FWHM),  $\theta$  es el ángulo de difracción,  $\lambda$  es la longitud de onda (1.54 Å),  $d$  es el tamaño de la partícula (cristalito) y  $k$  es la constante de Scherrer (0.91). La ecuación de Scherrer se deriva de la ley de Bragg, y se limita solo a partículas a nanoescala. Se sabe que una disminución en el orden de cristalinidad en los materiales de carbono hará que los picos de XRD sean más amplios. En consecuencia, todas las muestras tratadas tenían un FWHM más amplio, lo que implica que la oxidación de los MWCNT realmente había deteriorado el grado de cristalinidad. Sin embargo, las cantidades son muy pequeñas. Esto concuerda con las micrografías STEM.

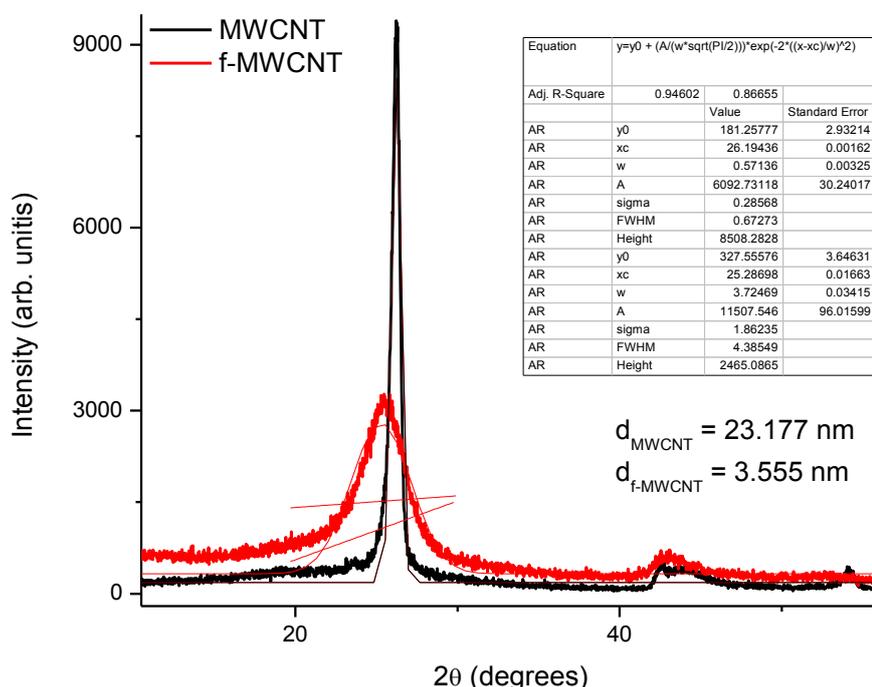


Figura 35. Difractogramas de MWCNT

### 3.2.4 RAMAN

Se componen de la banda G aproximadamente  $1590 \text{ cm}^{-1}$  relacionada con el modo de grafito e indicando vibraciones de estiramiento C-C y dos bandas D inducidas por

trastornos aproximadamente  $1345\text{ cm}^{-1}$  y G'a aproximadamente  $1620\text{ cm}^{-1}$ , lo que refleja la alta densidad de los estados de la zona de bordes y los fonones de zona media, respectivamente[203]. La relación de intensidades de las bandas D y G,  $I_D/I_G$  evalúa la densidad del trastorno de las paredes de los nanotubos. A partir de la Figura 25, se puede observar un aumento de intensidad para las bandas inducidas por trastornos en MWCNT obtenidos con diferentes procesos de oxidación.  $I_D/I_G \approx 0.21$  para los MWCNT no funcionalizados (no oxidados) y para  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ -MWCNT  $I_D/I_G \approx 1.90$ . Esto significa que la oxidación química de MWCNT promueve un mayor número de defectos que los MWCNT no oxidados y comerciales.

Las mediciones Raman (Figura 25) ayudan a explicar los cambios estructurales adicionales en MWCNT  $\text{f-H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$  tras la oxidación. Los espectros Raman de MWCNT exhiben dos bandas características: el modo G estiramiento tangencial ( $1500$ - $1600\text{ cm}^{-1}$ ) y el modo D ( $1350\text{ cm}^{-1}$ ) [203]. La relación de las intensidades de las bandas puede ser utilizada para evaluar la densidad de trastorno de las paredes de nanotubos. De la Figura 25, se puede observar un aumento en la intensidad de bandas inducido en MWCNT obtenidos con procesos de oxidación diferentes  $\approx 0,26$  para los MWCNT no funcionalizados (no oxidado) y  $\approx 1,86$  para  $\text{f-H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ -MWCNTs. Esto significa que promueven un mayor número de defectos que MWCNT no oxidados y comerciales; confirma que la banda FTIR a  $1560\text{ cm}^{-1}$  que está relacionada con los defectos estructurales de enlace C=C.

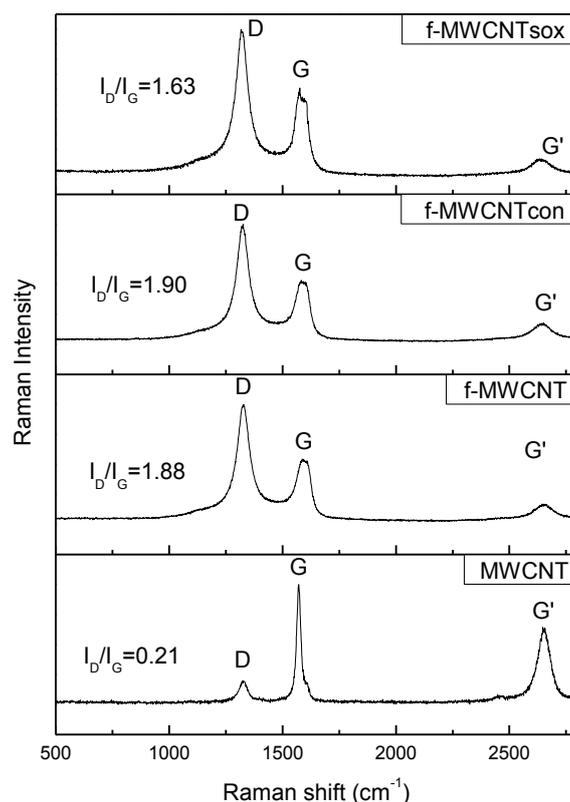


Figura 36. Espectroscopia Raman de diferentes MWCNT. What means f-MWCNT-con Madethesamedesignation

### 3.3 Quitosano/Nanotubos de carbono multipared (CS/MWCNT)

#### 3.3.1 FESEM

La microestructura y dispersión de los MWCNT en la matriz de CS fue analizada por FESEM, se muestra que la longitud de MWCNT en películas con n-MWCNT (no oxidado), f-MWCNT (comercial) y  $f_{HNO_3}$ -MWCNT (oxidación por  $HNO_3$ ) es ca. 10  $\mu m$  (Figuras. 40a, 40b). En contraste, la longitud de  $f_{H_2SO_4/NHO_3}$ -MWCNT se redujo considerablemente a 0,3-1  $\mu m$  (Figura 41) debido al tratamiento agresivo del ácido. Además, las imágenes de FESEM muestran relativamente buena dispersión de MWCNT (no oxidado, f-comercial y f- $HNO_3$ ) en la matriz de quitosano a baja concentración; se observa aglomeración a concentraciones más altas de MWCNT de 3-5 % en peso. A concentraciones de MWCNT en las que se observa aglomeración dependen del método de la ruta de oxidación química. A la inversa, las películas de nanocompuestos con  $f_{H_2SO_4/NHO_3}$  presentan una buena dispersión, incluso a 12 % en peso de MWCNT.

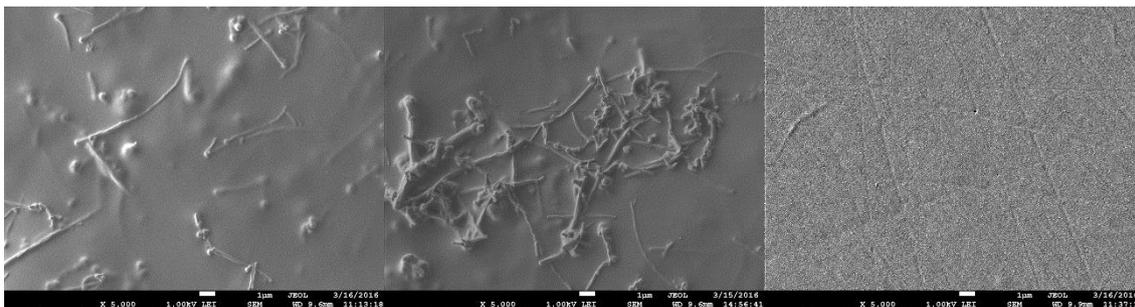


Figura 37. Imagen SEM de a) CS-f-HNO<sub>3</sub>-MWCNT con 1% en peso de MWCNT (escala 1 μm), b) CS-f-MWCNT con 8% en peso de MWCNT (escala 1 μm), c) CS-fH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NHO<sub>3</sub>-MWCNT con 10% en peso de MWCNT (escala 1 μm).

### 3.3.2 FTIR

Los espectros FTIR de MWCNT no funcionalizados y oxidados se observan en la Figura 42. Los espectros indican bandas intensas en la banda 3458 cm<sup>-1</sup> (grupos -OH, grupos carboxilo) [167], [204]. El aumento de la intensidad puede estar relacionado con el aumento del número de estos grupos [205]. Los espectros FTIR de MWCNT funcionalizados banda en 1640 cm<sup>-1</sup> de carbono de doble enlace C=O que es característico de grupos funcionales carboxilo [167], [204]. Adicional, los MWCNT f-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NHO<sub>3</sub>, hay una banda a 1560 cm<sup>-1</sup>. El origen de esta banda es todavía controvertido, y puede estar relacionado con las vibraciones de las paredes de los MWCNT [203] o una saturación estructural de enlace C = C o defectos en las paredes de los nanotubos [167].

Se estudió cómo los grupos carboxilo y los defectos afectarán la interacción entre MWCNT y la matriz de CS utilizando mediciones de FTIR. La Figura 41 muestra los espectros FTIR de quitosano puro y películas del nanocompuesto CS-MWCNT con MWCNT no funcionalizados y nanotubos funcionalizados. El espectro del CS y CS-nf-MWCNT son prácticamente similares. Por el contrario, los espectros de nanotubos funcionalizados-CS presentan las siguientes diferencias:

a) Los espectros de FTIR para quitosano muestra bandas de vibración de ancho centrada a 3326 cm<sup>-1</sup>, que tiende a trasladarse con la banda de vibración de grupos OH y NH. Esta banda en CS-MWCNT funcionalizados se vuelve más amplio y cambia a 3246 cm<sup>-1</sup> debido al extenso enlace de hidrógeno entre estos grupos de CS con grupos funcionales carboxilo de nanotubos [172].

b) La banda observada a 1643 cm<sup>-1</sup> pertenece al grupo amida I (vibración de estiramiento CO) y la banda a 1553 cm<sup>-1</sup>, que se atribuye a la flexión NH<sub>2</sub> en el cambio de espectro a 1630 cm<sup>-1</sup> y 1534 cm<sup>-1</sup>. Este resultado indica que el grupo -NH<sub>2</sub> en las cadenas de CS ya

han reaccionado con los grupos  $-\text{COOH}$  sobre las superficies de los defectos de los MWCNT y por lo tanto se han convertido a grupos  $-\text{NH}-\text{CO}$  [206]. Las mediciones de FTIR sugieren que los grupos amino e hidroxilo presentes en CS formen un fuerte enlace de hidrógeno con los MWNT funcionalizados que contienen grupos carboxílicos e hidroxilo. La compatibilidad y la fuerte interacción entre MWNT y la matriz de CS mejoran en gran medida la dispersión de MWCNT funcionalizados en la matriz CS [84]. Además, estas mediciones han demostrado que la mayor interacción de MWCNT con matriz CS se observa en películas con MWCNT f- $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ ; este fenómeno es el principal responsable de la mejor dispersión en la matriz CS como se observó en imágenes FESEM. Sin embargo, según los estudios de FESEM (Figura 40), la longitud de MWCNT f- $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$  redujeron de  $10\ \mu\text{m}$  a  $0,3\text{-}1\ \mu\text{m}$  y tienen un gran número de defectos

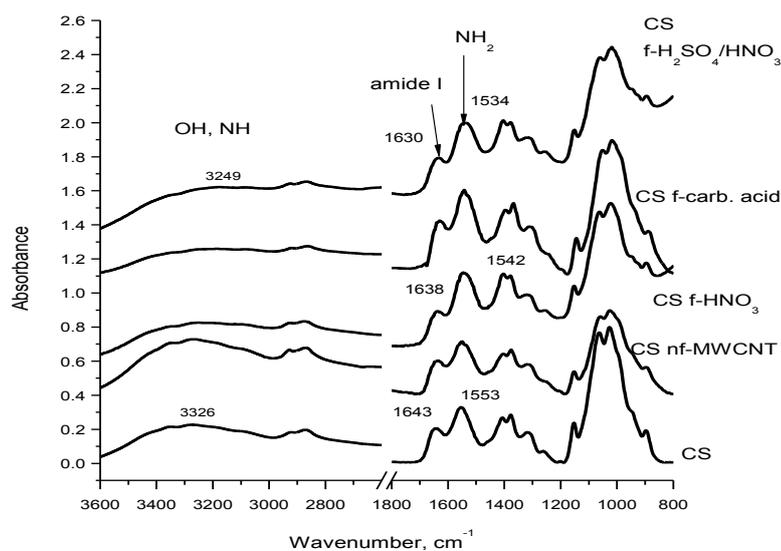


Figura 38. Espectros FTIR de películas de CS/MWCNT con diferentes porcentajes de MWCNT

Se puede obtener información adicional sobre la interacción entre los grupos laterales CS y MWCNT a partir de mediciones de TGA y XRD.

### 3.3.3 TGA

En la Figura 44 se muestran los resultados de las mediciones de TGA para todos los nanocompuestos investigados de CS/MWCNT medidos a temperatura  $150^\circ\text{C}$ . Para las películas no funcionalizadas CS- MWCNT la pérdida de peso no depende significativamente de la concentración de MWCNT; de acuerdo con las mediciones de

FTIR, no hay interacción química entre la matriz de CS y MWCNT no funcionalizados. En contraste, en el caso de las películas con MWCNT funcionalizados, la pérdida de peso disminuye exponencialmente a medida que el contenido de MWCNT aumenta. En el quitosano,  $\text{NH}_2/\text{NH}_3$  y grupos OH pueden ser considerados sitios de sorción específicas para las moléculas de agua por medio de enlaces de hidrógeno [143], [207]. Con el aumento en la concentración de MWCNT la interacción entre los grupos hidrófilos de CS y grupos de MWCNT funcionalizados como  $-\text{COOH}$  y  $-\text{OH}$  forman una fuerte unión de hidrógeno lo que disminuye la capacidad de absorción de agua de los materiales compuestos como los nanotubos. Por lo tanto, en un nanocompuesto con el aumento de la interacción entre el CS y MWCNT (o con el cambio más alto de las bandas de vibración en mediciones FTIR) se observa decrecimiento de la pérdida de peso.

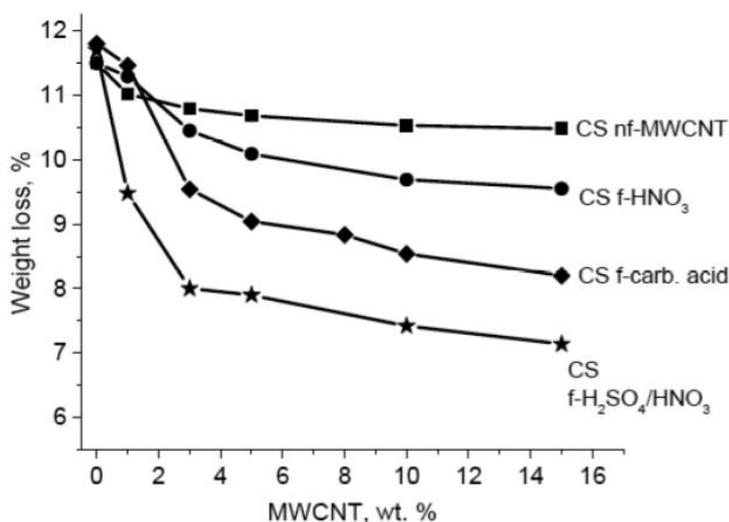


Figura 39. Dependencia de la pérdida de peso contra concentración de MWCNT en películas de CS/MWCNT

El estudio de TGA de la muestra CS/MWCNT mostró que se descompone dentro del rango de temperatura  $\sim 200-800$  ° C en dos pasos, lo que generalmente se asemeja a la descomposición térmica de la muestra CS como se observa en la Figura 45. Las muestras con mayores concentraciones de MWCNT demostró ser más estable que el CS. La pérdida de masa de una muestra de MWCNT tuvo lugar en el intervalo de temperaturas de  $\sim 430-660$ °C. El resto del material a temperaturas más altas ( $\sim 6\%$ ) correspondía a metales de transición que se introdujeron durante la síntesis de CNT.

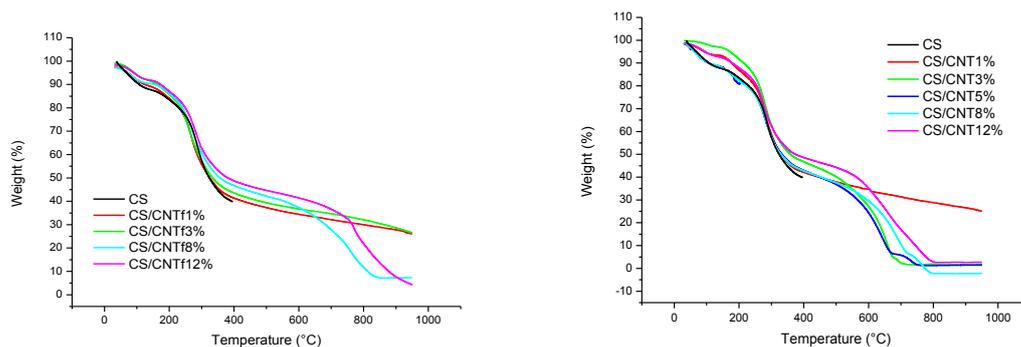


Figura 40, Análisis termogravimétrico de películas CS/MWCNT

### 3.3.4 Difracción de rayo X (XRD)

Las mediciones de XRD confirman los resultados obtenidos a partir de mediciones de TGA. La Figura 43 muestra patrones de XRD de películas CS y f-MWCNT con diferente % en peso de MWCNT. El CS exhibe solamente un pico amplio y débil alrededor de  $24^\circ$ . Como es sabido, los CNT exhiben solamente un pico característico alrededor de  $26^\circ$  entre  $5^\circ$  y  $40^\circ$ . La menor cristalinidad del CS podría atribuirse a su bajo peso molecular. Además, la modificación química también puede afectar la cristalinidad del quitosano.

La estructura cristalina hidratada da una reflexión a  $2^\circ$   $10^\circ$  (o picos en torno a  $8^\circ$  y  $12^\circ$ ), y la estructura cristalina da uno a  $2^\circ$  y  $15^\circ$ . El quitosano muestra picos característicos alrededor de  $2\theta$   $8,5^\circ$ ,  $11,6^\circ$ ,  $18,6^\circ$  y  $23^\circ$ . Los dos primeros picos corresponden a la estructura cristalina hidratada, mientras que el pico más amplio alrededor de  $2\theta$   $23^\circ$  indica la existencia de una estructura amorfa [174], [208]. Al aumentar concentración de MWCNT estos picos desaparecen probablemente debido a la disminución de la adsorción de agua (el aumento de % de MWCNT). Se observa que la incorporación de MWNT no afecta significativamente a la estructura cristalina del quitosano, como lo apoya la observación de que el patrón XRD de los compuestos de CS/MWNT aún mantiene los picos característicos del quitosano puro.

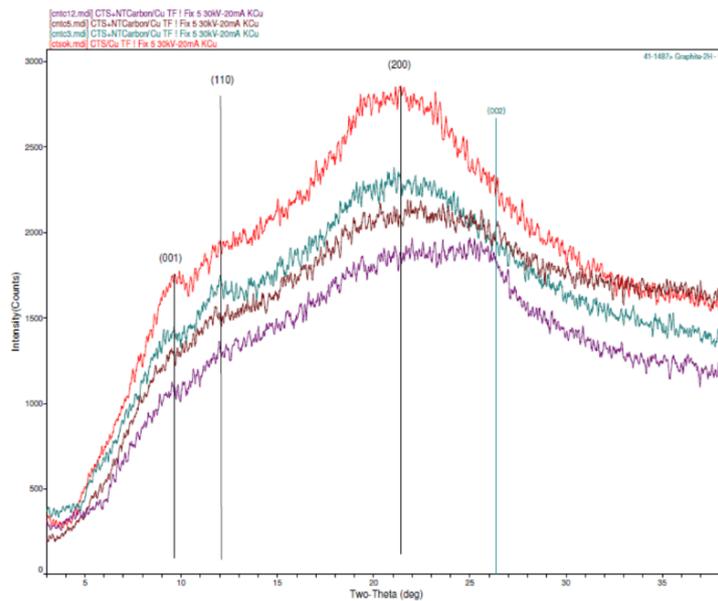


Figura 41. Difractogramas de XRD de películas CS/MWCNT

Todos los resultados anteriores sugieren fuertemente que diferentes métodos de oxidación de MWCNT afectan la estructura y la interacción de los nanotubos con la matriz CS. En consecuencia, la pregunta principal, no abordada anteriormente, es cómo dichos cambios estructurales afectarán las propiedades eléctricas y mecánicas del nanocompuesto. Para responder a esta pregunta, se realizaron mediciones eléctricas y mecánicas adicionales en todos los nanocompuestos.

### 3.3.5 Espectroscopia de impedancia

La Figura 46 muestra la dependencia de la conductividad DC en % peso de nanotubos en las películas de CS-MWCNT obtenidas a partir de mediciones de impedancia como se informó anteriormente. La dependencia de conductividad DC vs % MWCNT muestra un aumento brusco en la conductividad por concentraciones crecientes y una saturación posterior es típicamente observable para los fenómenos de percolación. Exposiciones de CS en el comportamiento dieléctrico y arroja una conductividad muy baja (ca.  $1 \cdot 10^{-8}$  S/cm). A la inversa, los MWCNT muestran alta conductividad (aproximadamente  $1-2 \cdot 10^3$  S/cm [137], [138]). En consecuencia, una mezcla de materiales de alta y de baja conductividad exhibirá un fenómeno de percolación eléctrica: la conductividad del nanocompuesto cambiará de uno de los componentes dieléctricos a uno de los componentes metálicos. Según la teoría de percolación, la conductividad DC por encima del umbral de percolación se puede caracterizar por una ley de potencia [179], [209], [210]:

$$\sigma \propto ((p - p_c)^t$$

donde,  $p$  representa el % en peso de la fase de conductividad,  $p_c$  es la fracción crítica en el umbral de percolación y  $t$  es un exponente crítico que sólo depende de la dimensionalidad del sistema de percolación. El recuadro en la Figura 45 muestra la dependencia del log-log de la conductividad de los materiales compuestos de CS en  $\log(p - p_c)$ , que de acuerdo con la ecuación debe exhibir dependencia lineal. El análisis de ajuste de mínimos cuadrados según la ecuación anterior de los resultados de percolación en un umbral de percolación de 2.5 % en peso para nanocompuestos con n-MWCNT; 4 % en peso para los nanocompuestos con f-HNO<sub>3</sub>-MWCNT; 5.5 % en peso para nanocompósitos f-MWCNT. Por el contrario, la conductividad DC de las películas f-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NHO<sub>3</sub>-MWCNTs sigue siendo muy baja y no difiere cualitativamente desde el puro quitosano.

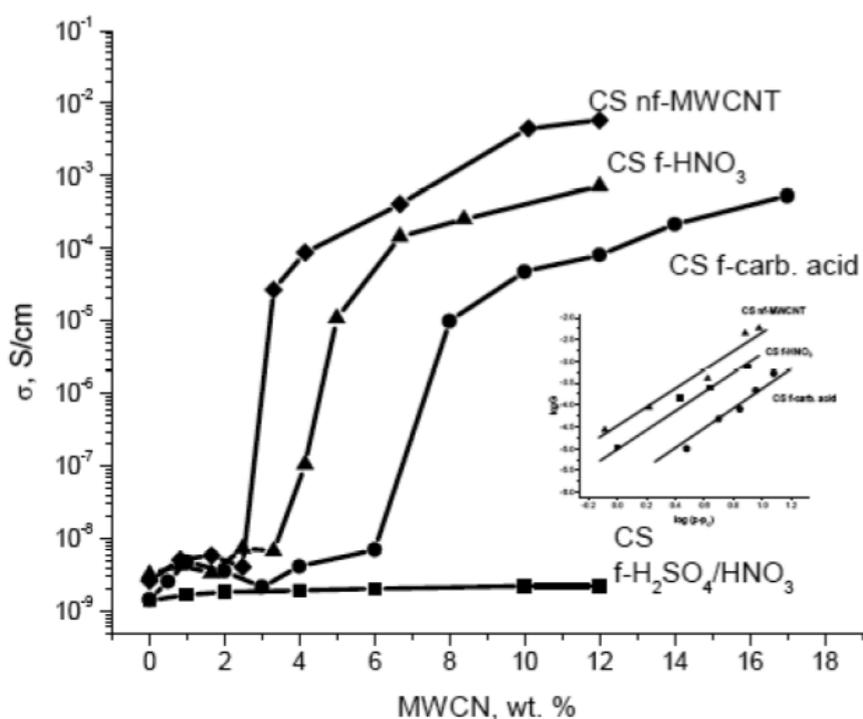


Figura 42. Dependencia de la conductividad eléctrica en películas CS/MWCNT

De acuerdo con las mediciones de FTIR (Figura 42) las interacciones moleculares entre CS y MWCNT son responsables del “grado de dispersión” de tales cargas en la matriz de CS tal que el umbral de percolación aumenta. Es de destacar que la mejor dispersión en la matriz CS se alcanzó con f-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NHO<sub>3</sub>-MWCNT; Sin embargo, la conductividad del nanocompuesto prácticamente no cambió.

Es de destacar que los nanocompuestos CS-MWCNT exhiben diferente conductividad en la región de saturación. Dicho efecto se ha observado en muchos polímeros con alta conductividad con nanopartículas y puede ser explicado por la presencia de una capa interfacial fina que coexiste entre nanotubos y la matriz del polímero [140], [211]. Esta capa interfacial aparece debido a las interacciones entre los MWCNT y la matriz como se ha mencionado anteriormente. Los parámetros de esta capa interfacial se pueden estimar mediante el uso de un modelo que ha sido propuesto para el cálculo de la resistencia  $R_c$  de contacto entre los nanotubos de carbono individuales embebidos en la matriz polimérica. De acuerdo con [212],  $\sigma$  la conductividad de los materiales compuestos de polímero con nanotubos con longitud  $l$  y radio  $r$  está dada por la relación:

$$\sigma \approx \frac{L}{2\pi r^2} \frac{\Phi^{2\chi+1}}{R + R_c}$$

donde  $R$  es la resistencia de un nanotubo,  $\Phi$  es la fracción en peso de los nanotubos y el exponente  $2\chi + 1$  se puede obtener de la pendiente del  $\log \sigma$  frente a  $\log \Phi$  del gráfico por encima del umbral de percolación.

El uso de valores de  $L$  y  $d$  estimada a partir de mediciones SEM, los valores de la resistencia de contacto  $R_c$  entre los nanotubos de carbono individuales ha sido calculado para nanocompósitos con n-MWCNT  $R_c = 6.7 \cdot 10^6$  Ohm; para nanocompuestos con f-HNO<sub>3</sub>-MWCNT  $R_c = 2.74 \cdot 10^7$  Ohm; para nanocompuestos con f-comercial  $R_c = 1.24 \cdot 10^8$  Ohm; para nanocompuestos con f-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NHO<sub>3</sub>-MWCNT  $R_c = 8.7 \cdot 10^{10}$  Ohm. A partir de mediciones de FTIR está claro que el valor de  $R_c$  depende de la fuerza de las interacciones moleculares entre los grupos funcionales del CS con grupos carboxílicos e hidroxilo de MWCNT. Esta interacción afecta el espesor de la capa interfacial entre MWCNT y la matriz de CS, que de acuerdo con [213], controla la conductividad de los nanocompósitos y afecta a la resistencia de tunelización entre nanotubos.

Los MWCNT no funcionalizados presentan un umbral de percolación típico en aproximadamente 4% en peso. Se espera obtener interacciones interfaciales fuertes de MWCNT funcionalizados y con la matriz de CS que serán responsables de altos valores de la resistencia. Inicialmente, se realizó una suspensión al 1, 3, 5, 8 y 12 % en peso de MWCNT mediante la adición de un volumen apropiado de la suspensión MWCNT en la solución de CS previamente calculada.

### 3.3.6 Pruebas mecánicas

#### 3.3.6.1 Esfuerzo-deformación

Las curvas de esfuerzo-deformación obtenidas de pruebas de tensión uniaxiales bajo una tasa de desplazamiento constante de 1 mm/s se muestran en la Figura 46, a temperatura ambiente. La tasa de deformación correspondiente fue entre 0.6 y 1.5 %. Una posible razón que explica la mayor tasa de aumento del módulo de Young en MWCNT funcionalizados es la buena dispersión y el fuerte enlace entre los grupos de CS y MWCNT. El rango de deformación utilizado no afecta significativamente el módulo de Young porque los comportamientos no lineales de tensión-deformación son fácilmente visibles en la Figura 47. Se observan disminuciones significativas en la deformación para los compuestos CS/MWCNT en comparación con puro CS con una tensión sin variaciones extremas entre 7 y 9 MPa. Se analizaron cuatro muestras para cada material, lo que confirmó que la reproducibilidad de los experimentos era buena.

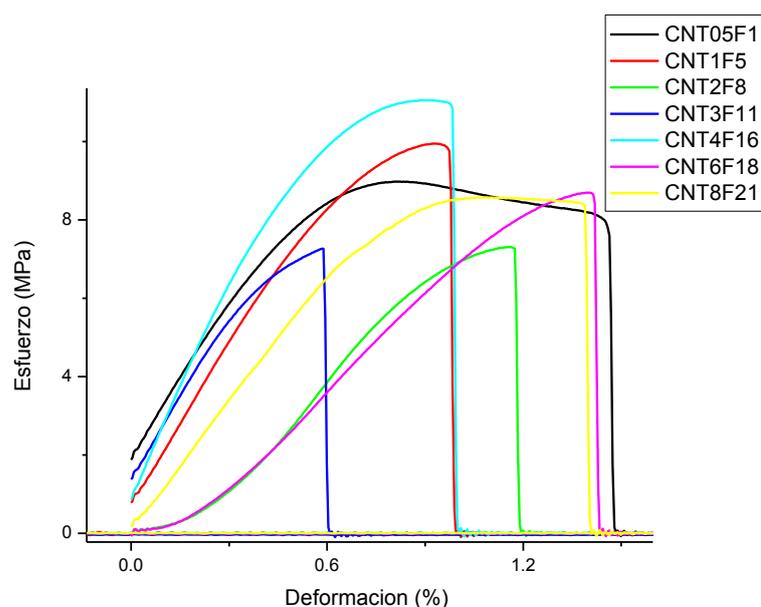


Figura 43. Curvas esfuerzo-deformación de películas CS/MWCNT

Las propiedades mecánicas, como el módulo de Young y la resistencia a la tracción (definida como la tensión requerida para romper una muestra) del CS reforzado con MWNT. Los datos promedio y las desviaciones estándar del módulo de Young de las cuatro muestras en función del contenido de MWCNT en las Figura 47. El nanocompuesto con una pequeña carga de MWCNT muestra una mejora significativa en las propiedades mecánicas. Para el material nanocompuesto CS/MWCNT el módulo de Young aumenta de 1.2 GPa a 2 GPa sin MWCNT y con el 1 % de MWCNT

respectivamente. Los resultados de la prueba mecánica revelan que los MWCNT modifican las propiedades mecánicas con bajas concentraciones. Este resultado indica que la fracción de peso arriba del 3 % de MWCNT generalmente conduce a la aglomeración de MWCNT y eso es perjudicial para mejorar las propiedades mecánicas. Mientras tanto, la incorporación de MWCNT no funcionalizados probablemente introduce muchas microgrietas en la matriz compuesta debido al pobre enlace interfacial entre MWCNT y CS. Las microgrietas generalmente forman grietas en el proceso de la prueba mecánica que empeoran la resistencia a la tracción del compuesto.

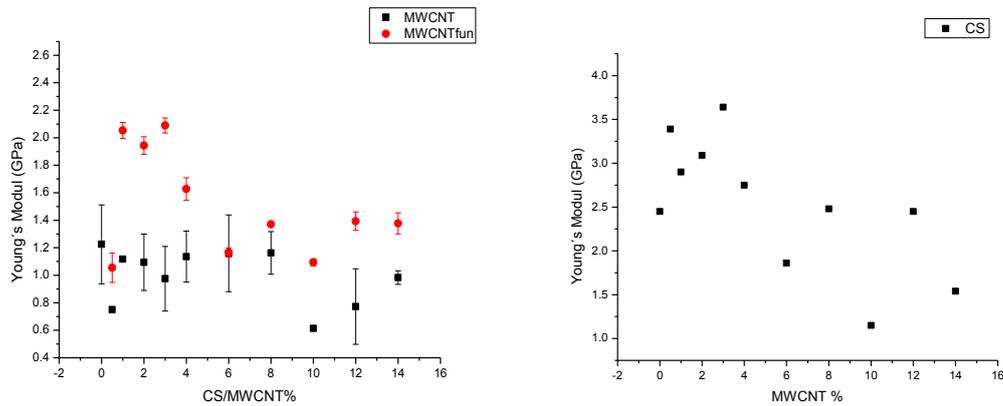


Figura 44. Modulo Elástico de películas CS/MWCNT a) con MWCNT funcionalización química b) con MWCNT funcionalizados por sigma

En la Figura 49 se observa el módulo elástico con MWCNT funcionalizados comerciales lo cual confirma la misma tendencia que funcionalizados con ácido, un aumento de 2.4 GPa a 3.7 GPa en película de CS y con el 3 % de MWCNT respectivamente. Cabe resaltar que con el 0.5 % de MWCNT se obtiene un módulo elástico aproximado al máximo obtenido al 3 % de MWCNT.

### 3.3.6.2 Nanoindentación

El módulo de carga y descarga y los perfiles de dureza a lo largo de la dirección de indentación del CS y CS/MWCNT se muestran en la Figura 50. En general, los módulos de los nanocompuestos son similares que el sistema puro.

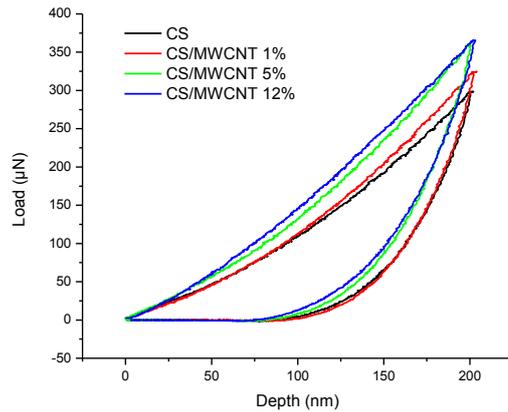


Figura 45. Perfil de indentación en películas de CS/MWCNT

La fuerza de interacción entre los grupos funcionales del CS con grupos carboxílicos e hidroxilo de MWCNT y el espesor de capa interfacial afecta de las propiedades mecánicas de los nanocompuestos. La Figura 51 muestra la dependencia de la dureza (Figura 51a) y el módulo de Young (Figura 51b) de películas CS-MWCNT con diferente % en peso de nanotubos. La dureza y el módulo de Young en CS-f-MWCNT son suficientemente más altos que en f-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>-MWCNT. Por otra parte, en las películas de CS-f-comerciales, los dos parámetros exhiben un máximo; tales máximos se han observado previamente en nanotubos de carbono en nanocompuestos de CS-MWCNT [200]. Este máximo se atribuye a la formación de una red conectada de nanotubos por encima del umbral de percolación mecánica [214]. El umbral de percolación mecánica, lo mismo que la percolación eléctrica, depende del espesor de la capa interfacial [215]. Además, se encontró que la capa interfacial entre la matriz polimérica y CNT puede reducir el umbral de percolación en nanocompuestos y reducir el rendimiento mecánico [144], [205], como se observa en CS-fH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>-MWCNT.

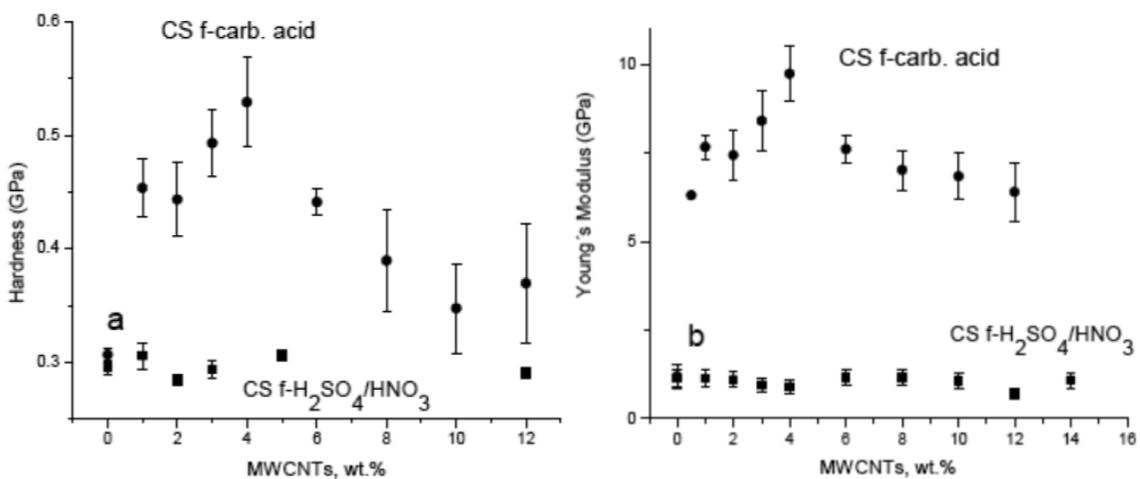


Figura 46. a) Dureza de películas CS/MWCNT y b) Modulo Elástico

El aumento de la concentración de MWCNT no funcionalizados no muestra cambios significativos en la dureza del nanocompuesto. Es interesante observar que, con mayor concentración de MWCNT, el perfil de carga está desplazándose hacia arriba con una profundidad de indentación decreciente. Se cree que el incremento de módulo para los nanocompuestos con mayor % de MWCNT es probablemente debido al efecto de dispersión de los nanotubos distribuida homogéneamente sobre el polímero.

Esfuerzo-deformación y Nanoindentación demostró buenas correlaciones.

Además, la dureza y el módulo de Young en el compuesto CS-f-MWCNT son suficientemente más altos que en fH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / NHO<sub>3</sub>-MWCNT. Además, en las películas comerciales CS-f, ambos parámetros exhiben un máximo; dicho máximo se ha observado previamente en nanocompuestos de nanotubos de carbono CS-multiwall [40]. Este máximo se atribuye a la formación de una red conectada de nanotubos por encima del umbral de percolación mecánica [20]. El umbral de percolación mecánica, igual que la percolación eléctrica, depende del grosor de la capa interfacial [41]. Además, se descubrió que la capa interfacial entre la matriz polimérica y la CNT puede reducir el umbral de percolación en nanocompuestos y reducir el rendimiento mecánico [11,29], como se observó en CS-fH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / NHO<sub>3</sub>-MWCNT.

### 3.3.7 Conclusión del capítulo.

Se demostró que el efecto de las rutas de oxidación química afecta las propiedades de los nanocompuestos basados en MWCNT. El tratamiento químico afectó la abundancia de grupos carboxílicos y defectos que a su vez influyen en la interacción entre los MWCNT y la matriz CS. Esta interacción es responsable de la dispersión de los nanotubos y afecta la resistencia de contacto y el grosor de la capa interfacial entre los MWCNT y la matriz CS. Los nanocompuestos CSMWCNT exhibieron efectos de percolación eléctrica y mecánica y sus parámetros dependen del grosor de la capa interfacial. Además, se demostró que las películas CS-MWCNT obtenidas mediante el tratamiento de MWCNT en mezclas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / NHO<sub>3</sub> exhibían buena dispersión; sin embargo, no se observan fenómenos de percolación. Los valores de conductividad y de módulo de Young son prácticamente los mismos que los de CS puro. Estos resultados se han explicado en términos de la fuerte interacción de MWCNT con grupos laterales CS y la aparición de una capa interfacial gruesa. Por lo tanto, una buena dispersión de MWCNT no garantiza las mejores propiedades eléctricas y mecánicas del nanocompuesto, que se han

considerado el factor clave para obtener propiedades eléctricas y mecánicas superiores para muchas aplicaciones.

### 3.4 Quitosano/Hidroxiapatita /Nanotubos de carbono multipared/ (CS/nHA/MWCNT)

Ahora investiguemos cómo cambiarán las propiedades de los nanocompuestos en la mezcla de casos de HA y MWCNT en la matriz CS.

#### 3.4.1 FESEM

La Figura 52 presenta la morfología de una película compuesta que contiene nHA y MWCNT en una matriz de quitosano. La Figura 51 presenta la misma estructura con 3 % de MWCNT, la concentración de nHA de la suspensión aumento (20, 50 y 80 %). Como se puede ver, es evidente una distribución de hidroxiapatita y MWCNT en una matriz de quitosano. La introducción de más nHA en la suspensión da como resultado mayores cantidades de nHA fuera de la matriz de CS (Figura 51a, b). Por otro lado, la introducción de MWCNT crea más sitios para la adsorción de células óseas y la nucleación de cristales de apatita de calcio [216]. Gran cantidad de MWCNT en el recubrimiento es citotóxico y se debe considerar cuidadosamente para lograr un equilibrio entre la citotoxicidad y mejorar la adhesión del tejido, por otro lado [217].

La Figura 52 muestra que los MWCNT se adjuntan a la superficie de la matriz de CS. La nHA se distribuye uniformemente sobre los espacios entre la matriz de CS y los MWCNT a concentraciones por debajo del 20 % de nHA. En primer lugar, las nanopartículas de HA se dispersan uniformemente con MWCNT en un mortero. Cuando se agregó nHA/MWCNT a la solución de CS, los grupos hidroxilo y grupos amino en las cadenas moleculares del CS reaccionaron con los grupos carboxilo de los MWCNT, y también hubo un fuerte enlace de hidrógeno entre los grupos que contienen oxígeno en los MWCNT y las cadenas moleculares amino e hidroxilo en CS. Como resultado, las cadenas moleculares del CS unidas a los MWCNT y algunas de las cadenas moleculares del CS actuaron como el puente de MWCNT adyacentes. Al mismo tiempo, la nHA se adhirieron a la superficie de MWCNT debido a la fuerte interacción del enlace de hidrógeno de CS y la adhesión con partículas de nHA. Cabe señalar que superficies tan rugosas pueden aumentar efectivamente la adhesión de las células óseas [218]. Estos efectos son responsables de la agregación y formación de la estructura en capas. Para una

mejor comprensión de la interacción entre la matriz CS con nHA y MWCNT y la confirmación del mecanismo propuesto, las mediciones FTIR se llevaron a cabo en diferentes películas compuestas binarias y ternarias.

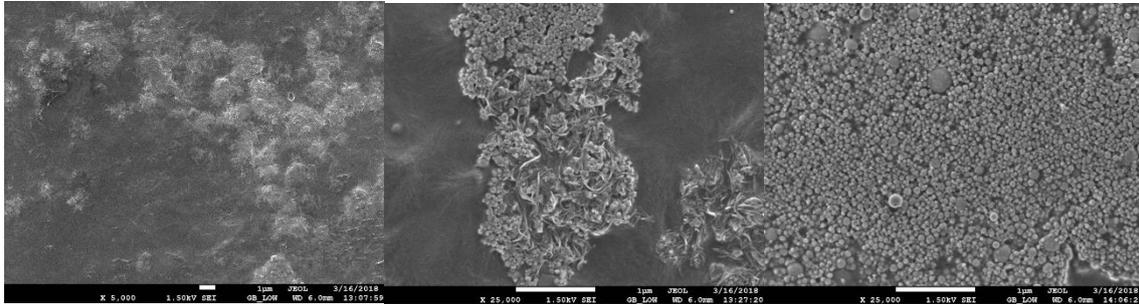
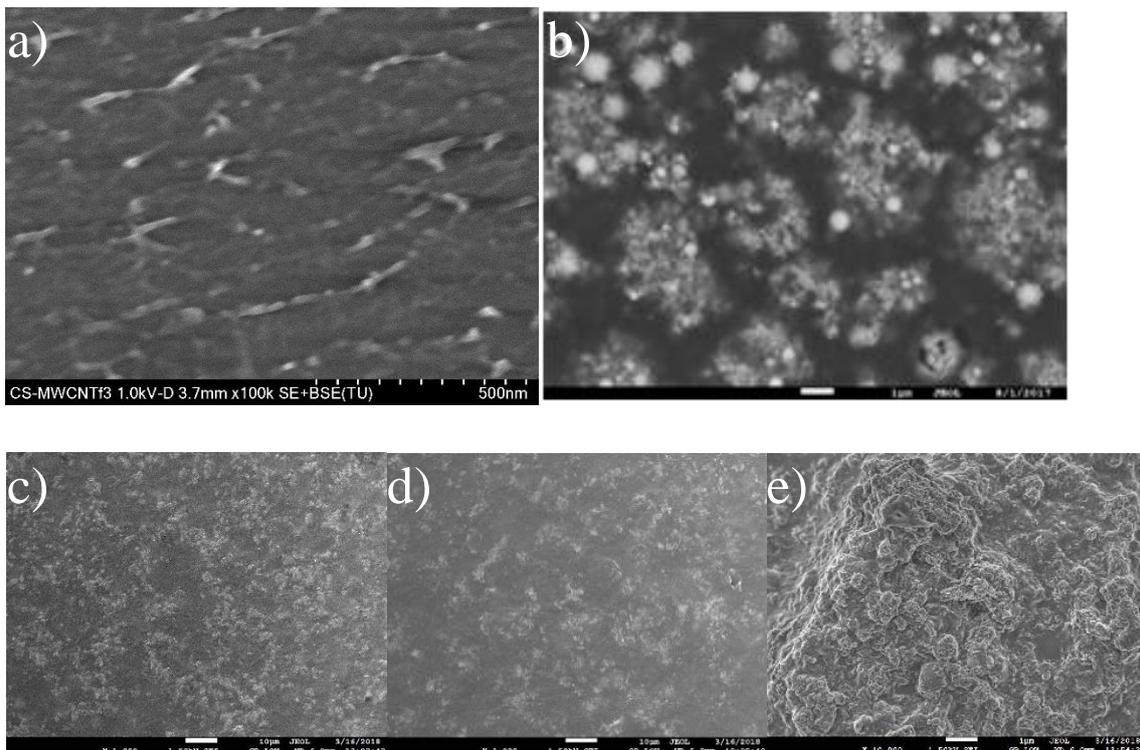


Figura 47. CS/MWCNT3%/nHA20% b) CS/MWCNT3%/nHA50% c) CS/MWCNT3%/nHA80%

El quitosano es insoluble en agua, pero como su estructura molecular contiene grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, puede disolverse en soluciones ácidas. Después de la disolución, las aminas protonadas hacen que el quitosano se cargue positivamente [219]. Dado que la suspensión de CS/nHA se obtiene mediante la adición de una suspensión de fosfato en nHA al quitosano previamente disuelto en ácido acético, las moléculas de quitosano cargadas positivamente atraen partículas de nHA, estabilizando electrostáticamente la suspensión de CS/nHA[160]. Los MWCNT interactúan con el quitosano debido a la gran cantidad de electrones  $p$  en los orbitales híbridos  $sp^2$  de átomos de carbono en los MWCNT y los grupos funcionales, las paredes cargadas negativamente se autoensamblan con grupos amina protonados en el quitosano, creando una suspensión estable [219].



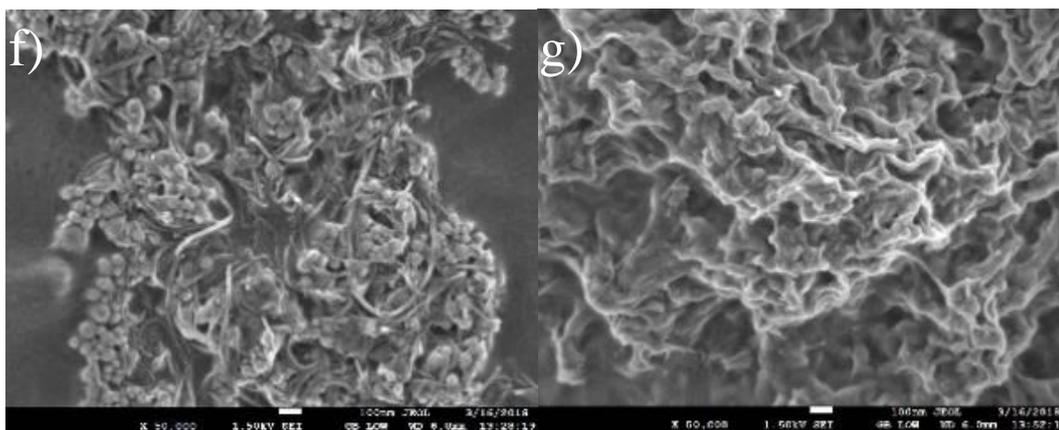


Figura 48. La figura a) muestra la imagen SEM de CS-nHA (30% en peso de nHA), CS-MWCNT (3% en peso de MWCNT, figura b); CS-nHA (20% en peso) - MWCNT (3% en peso) (Fig. c); CS-nHA (50% en peso) - MWCNT (3% en peso) (Fig. d); CS-nHA (70% en peso) - MWCNT (3% en peso) (Fig. e).

En contraste con CS-nHA (Fig..... a) y CS-MWCNT (Fig..... b) en el que se encuentra por debajo del umbral de percolación (aproximadamente 30-40% en peso de nHA en películas CS-HAP y aproximadamente 6% en peso de MWCNT) observó una distribución prácticamente homogénea de cargas, en las películas CS-nHA-MWCNT se observó aglomeración de cargas. Más claro se puede ver en la Fig. Fig. en la imagen con mayor resolución. Además, la figura g muestra la formación de una estructura en capas como un andamio.

### 3.4.2 FTIR

En el capítulo anterior, se han investigado los espectros FTIR de compuestos binarios CS-nHA y CS-MWCNT. Ahora investiguemos cómo cambian los espectros con la incorporación de nHA y MWCNT en la matriz de quitosano.

Como se muestra en la Figura 53 se observan los espectros FTIR de las películas CS/MWCNT/nHA. Los f-MWCNT muestran bandas anchas típicas de los grupos hidroxilo (-OH) formados por oxidación tras el tratamiento con ácidos a  $3438\text{ cm}^{-1}$ . La banda de transmisión a  $1633\text{ cm}^{-1}$  se relacionó con las vibraciones C=C[220], [221], mientras que las bandas en  $1089$  y  $1047\text{ cm}^{-1}$  fueron el pico de absorción de vibración de estiramiento del enlace C-O y la banda de vibración de flexión en el plano de -OH, [220], [221], respectivamente. La nHA muestra una banda alrededor de  $1016\text{ cm}^{-1}$  se atribuyeron a  $\text{PO}_4^{3-}$ . Los espectros FTIR para quitosano muestran amplias bandas de vibración centradas de  $3185\text{-}3326\text{ cm}^{-1}$ , que pertenece a la superposición de la vibración de estiramiento de los grupos OH y NH. La banda típica centrada en  $1634\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó a la base (-C=N) grupo amida I, y la banda a  $1540\text{ cm}^{-1}$  se debió a la superposición parcial entre la banda de amida II y la banda de absorción del grupo amino [222].

El material más estable en resultados mecánicos y eléctricos fue de CS/MWCNT3% y CS/nHA40% como se analizó anteriormente, ahora se utilizan esas concentraciones para analizar la interacción en películas con CS/MWCNT3%/nHA40%. La banda a 1540  $\text{cm}^{-1}$ , que se atribuye a la flexión de  $\text{NH}_2$  con un desplazamiento del espectro a 1534  $\text{cm}^{-1}$ . Este resultado indica que los grupos  $-\text{NH}_2$  en las cadenas CS ya han reaccionado con los grupos  $-\text{COOH}$  en las superficies defectuosas de los MWCNT y, por lo tanto, se han convertido en grupos  $-\text{NH-CO}$  [31]. MWCNT funcionalizados con CS la banda se ensancha y cambia a 3093  $\text{cm}^{-1}$  debido al extenso enlace de hidrógeno entre estos grupos de CS con grupos carboxilo funcionales de nanotubos [223]. Es notable que la banda característica de los grupos hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) se redujo a 3093  $\text{cm}^{-1}$ , lo que puede deberse a la reacción de policondensación entre el grupo reactivo  $-\text{OH}$  en la superficie de MWCNT y los grupos hidroxilos de las moléculas de CS y nHA. Mientras tanto, la banda característica de  $-\text{OH}$  (3438  $\text{cm}^{-1}$ ) se hizo más débil, lo que fue causado por la ausencia de grupos hidroxilo en el nanocompuesto. El cambio también se observa con CS/nHA la posición y la intensidad de 3264  $\text{cm}^{-1}$  a 3093  $\text{cm}^{-1}$  representa el movimiento de grupos polares de CS; Esta observación sugiere que los iones hidroxilo en la superficie de nHA podrían interactuar con los grupos amino e hidroxilo de CS al formar enlaces entre CS y nHA [28]. Además, con la incorporación de MWCNT el cambio máximo de 1550  $\text{cm}^{-1}$  a 1534  $\text{cm}^{-1}$  probablemente esté relacionado con la alta interacción observada entre los grupos  $\text{NH}_3$  de CS y nHA lo cual muestra una fuerte interacción entre los tres materiales. La ampliación de la banda a 1026  $\text{cm}^{-1}$  películas CS/MWCNT/nHA muestra un aumento en la interacción CS con los grupos fosfato al incorporar el enlace  $-\text{OH}$  de los MWCNT [30]. Todos estos resultados revelaron que el CS se ancló sucesivamente en la superficie de los nanomateriales.

### **CS/nHA40%**

Con la incorporación del nHA a la matriz de CS, se muestra en las bandas relacionadas a la sobreposición de vibración de grupos OH y NH con un desplazamiento de 3221  $\text{cm}^{-1}$  a 3273  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a la vibración de los grupos amina e hidroxilo [174] y representa el movimiento de grupos polares de CS; sugiere que los iones hidroxilo en la superficie de nHA podrían interactuar con los grupos amino e hidroxilo del CS al formar enlaces entre CS y nHA [179]. En el CS se observaron los picos característicos a 1634  $\text{cm}^{-1}$  (grupo amida I) y 1540  $\text{cm}^{-1}$  (vibraciones de flexión de  $\text{NH}_3$ ) [174]. El cambio observado de 1540  $\text{cm}^{-1}$  a 1550  $\text{cm}^{-1}$  esté relacionado con la alta interacción observada

entre los grupos  $\text{NH}_3$  de CS y nHA. En los espectros FTIR de nHA, las bandas a  $1016\text{ cm}^{-1}$  corresponden a modos de vibración del grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  de hidroxiapatita [176], [177]. La ampliación de la banda a  $1016\text{ cm}^{-1}$  y desplazamiento de  $1030\text{ cm}^{-1}$  en la película CS-nHA muestra la presencia de interacción del CS con los grupos fosfato de nHA [178].

### **CS/MWCNT3%**

Los espectros de FTIR para quitosano muestran amplias bandas de vibración centradas en  $3185\text{ cm}^{-1}$ , que pertenece a la superposición de la vibración de estiramiento de los grupos OH y NH. Con la incorporación del 3 % de MWCNT a la matriz de CS la banda muestra desplazamiento de  $3221$  a  $3278\text{ cm}^{-1}$  debido a enlace de hidrógeno entre estos grupos de CS con grupos carboxilo de nanotubos [172]. La banda observada a  $1634\text{ cm}^{-1}$  pertenece al grupo amida I (vibración de estiramiento C-O) y el pico a  $1540\text{ cm}^{-1}$ , que se atribuye a la flexión de  $\text{NH}_3$  en el desplazamiento del espectro a  $1644\text{ cm}^{-1}$  y  $1554\text{ cm}^{-1}$ . Este resultado indica que los grupos  $-\text{NH}_2$  en las cadenas CS ya han reaccionado con los grupos  $-\text{COOH}$  en las superficies defectuosas de los MWCNT y, por lo tanto, se han convertido en grupos  $-\text{NHCO}-$  [206]. Las mediciones de FTIR sugieren que los grupos amino e hidroxilo presentes en CS forman un fuerte enlace de hidrógeno con los MWNT funcionalizados que contienen grupos carboxílico e hidroxilo. Por lo tanto, se vio que los grupos CS secundarios muestran la misma interacción y el mismo desplazamiento debido a la interacción con nHA y MWCNT.

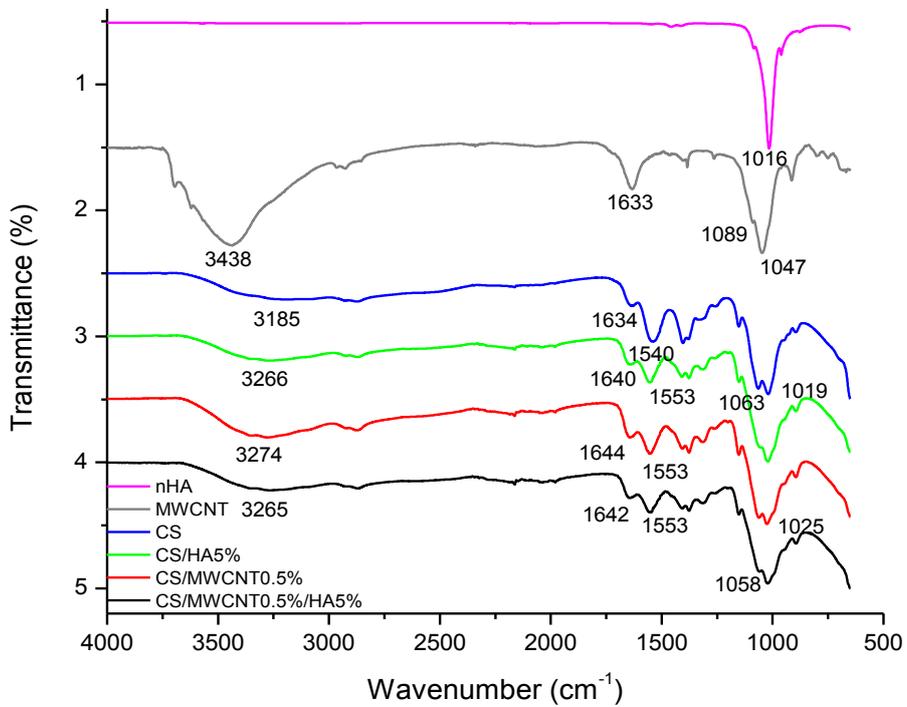
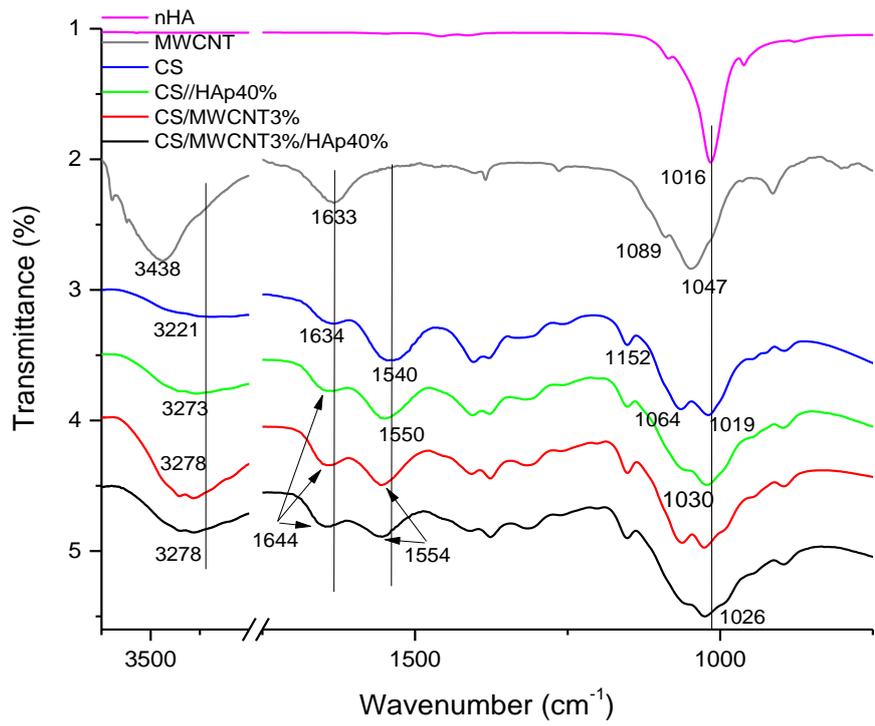


Figura 49. Espectros de infrarrojos de películas CS/MWCNT/nHA a) con 3 % y 40 % de MWCNT y nHA y b) con 0.5 % y 5 % nHA respectivamente.

## CS/MWCNT3%/nHA40%

Los espectros FTIR de nanocompósito con incorporación en CS 3% de MWCNT y 40% nHA demuestran las mismas bandas de vibración que en CS-nHA y CS-MWCNT. Esto significa que a partir de las mediciones FTIR no es posible la contribución separada de nHA y MWCNT en su interacción con CS. Sin embargo, en estos nanocompuestos, la concentración de nHA es mayor que la concentración de MWCNT, por lo tanto, probablemente, la interacción de CS y nHA es más fuerte que la interacción de CS con MWCNT.

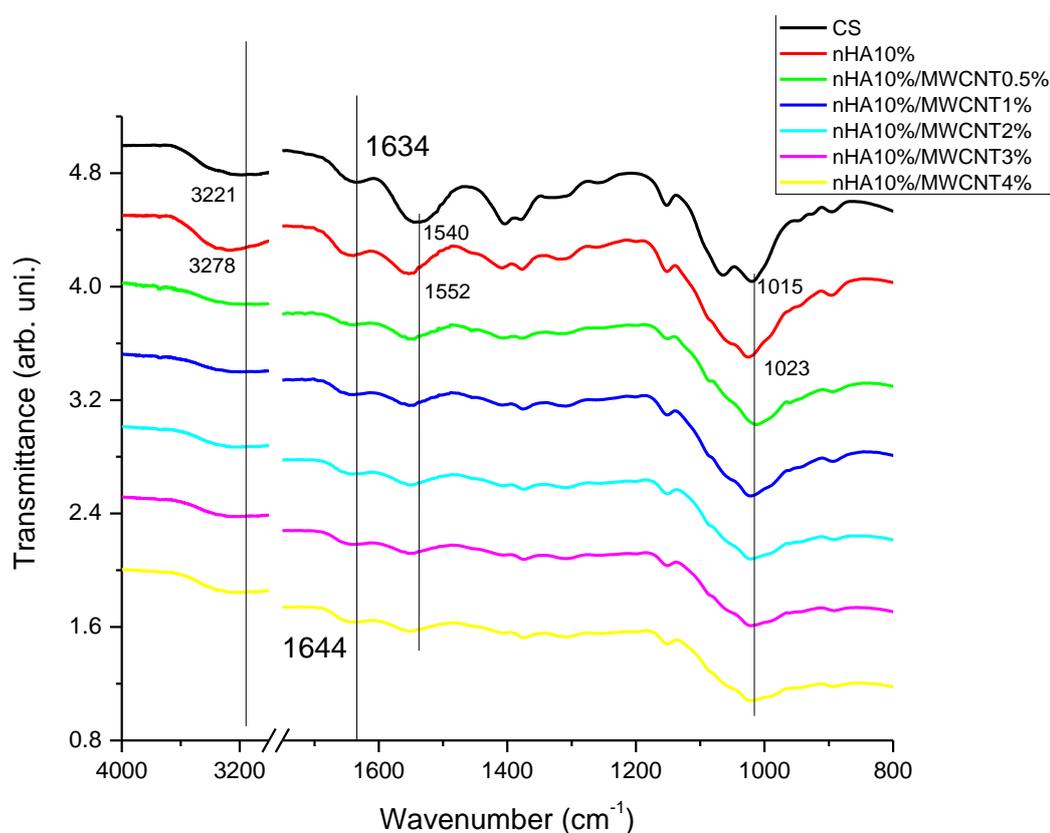


Figura 50. FTIR de películas de CS/nHA/MWCNT con 10 % de nHa constante y MWCNT de 0.5 %-4 %

## nHA-MWCNT

Se puede obtener información adicional sobre las propiedades del nanocompuesto ternario a partir de mediciones FTIR solo HAP y MWCNT como se muestra en la Fig.... Esta figura muestra los espectros FTIR de nHA (40% en peso) con 0,5 y 3% en peso adicional de MWCNT. En los espectros FTIR de nHA, las bandas a  $1016\text{ cm}^{-1}$  corresponden a modos de vibración del grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  de hidroxiapatita. Poco adicional de nanotubos es responsable de la ampliación de la banda y el cambio a  $1024\text{ cm}^{-1}$ .

Esto significa que existe interacción entre  $\text{PO}_4^{3-}$  de hidroxiapatita y con los grupos  $-\text{COOH}$  en las superficies defectuosas de los MWCNT que puede cambiar suficientemente las propiedades del nanocompuesto.

Los resultados de FTIR confirman la explicación propuesta de agregación y formación de estructura en capas en películas ternarias.

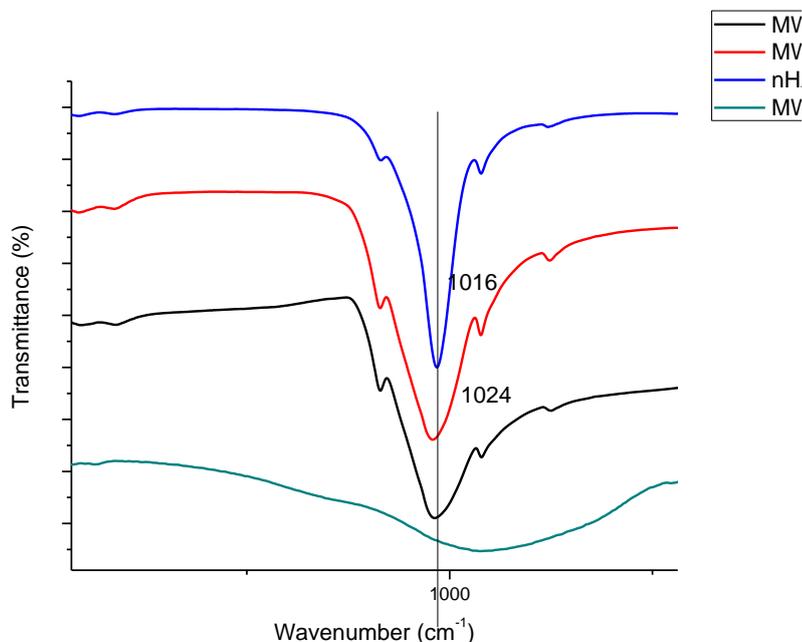


Figura 51. Espectros de FTIR de polvos de MWCNT-f y nHA

Esta conclusión confirma las mediciones de FTIR en nanocompuestos CS-10% en peso de HAP y diferentes% en peso de MWCNT (Fig.). En esta Fig. No se observaron cambios en la posición de los picos de vibración al aumentar la concentración de MWCNT. Entonces, la interacción más fuerte observada entre CS y HAP.

Los resultados mecánicos y eléctricos muestran cambios al incorporar nHA y MWCNT a la matriz de CS donde cambia la percolación del sistema al mezclar estos tres materiales, encontramos un material más estable a concentraciones de CS/MWCNT0.5%/nHA5% y por lo tanto se analizan FTIR a estos porcentajes como se puede ver en la Figura 53b. Los cambios que destacar muestran desplazamientos de 3185 a 3265  $\text{cm}^{-1}$ , resulta en una mayor interacción en grupos  $-\text{OH}$  en la matriz. Se observa mayor interacción a estas concentraciones con el grupo amino en la banda de 1634 a 1642  $\text{cm}^{-1}$  y de 1540 a 1535  $\text{cm}^{-1}$ . Las observaciones anteriores nos hacen creer que el compuesto CS/f-

MWCNT0.5% sirve como matriz para las nanopartículas de HA y proporciona un lugar de anclaje para las nanopartículas de HA sin saturar el sistema.

### 3.4.3 Pruebas dieléctricas

La conductividad eléctrica se determinó utilizando 4 muestras para cada material. Cada muestra variaba según el contenido de MWCNT y nHA. El contenido se expresó como un porcentaje (% en peso) de los dos nanomateriales diferentes, MWNT y nHA. Como se ha observado en el capítulo 2, CS-nHA demuestra el umbral de percolación dieléctrica a 30-40 wt. % de nHA (Fig. 26). Por lo tanto, se llevaron a cabo mediciones eléctricas en películas CS con 40% en peso de nHA y diferentes concentraciones de MWCNT (Fig. 51).

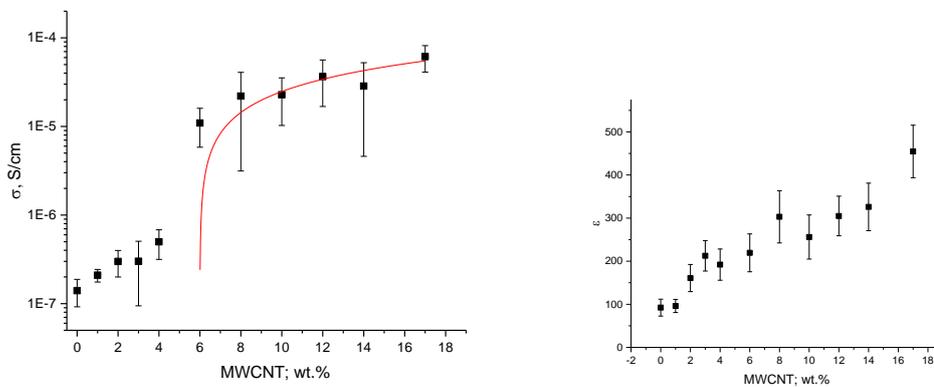


Figura 52. Dependencias de conductividad y constante dieléctrica de películas CS -nHA (40% en peso) en concentración de MWCNT. La línea roja se ajusta usando la ecuación (A). Las líneas verticales muestran la desviación estándar obtenida en las mediciones de 4 muestras.

Está claro que, al igual que las películas CS-MWCNT, estas películas de nanocompuestos ternarios demuestran propiedades de percolación de conductividad con el umbral de percolación ca. 6 wt. % de CNT. Este umbral de percolación es el mismo que en las películas CS-MWCNT (Fig. 41) pero con una conductividad más baja en la región de saturación (aproximadamente  $5 \cdot 10^5$  S / cm en comparación con aproximadamente  $10^{-3}$  S / cm en las películas CS-MWCNT). Esto significa que esa capa de interfaz en las películas CS-nHA-MWCNT entre CNT tiene una mayor resistencia entre nanotubos en comparación con la resistencia de la capa interfacial en CS-MWCNT. De acuerdo con FTIR existe interacción entre  $\text{PO}_4^{3-}$  de hidroxiapatita y con los grupos -COOH en las superficies defectuosas de los MWCNT que aumentan la resistencia de la capa interfacial. Además, el aumento constante dieléctrico con el aumento de la concentración de MWNT debido a la polarización interfacial entre la matriz de CS e inclusiones.

Se puede obtener más información sobre la interacción entre nHA, MWCNT y la matriz CS a partir de mediciones en películas con% en peso constante de MWCNT y variación de la concentración de nHA.

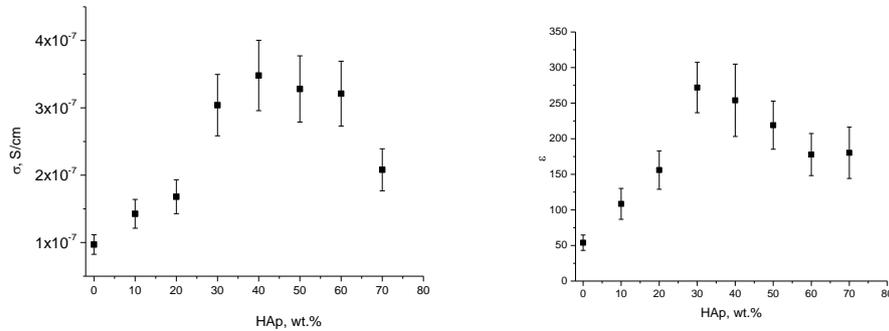


Figura 53. Dependencias de conductividad y constante dieléctrica de películas CS-MWCNT (3% en peso) en concentración de nHA

La figura 52 muestra las dependencias de conductividad y constante dieléctrica de las películas CS -MWCNT (con 3% en peso constante de MWCNT) en la concentración de nHA. Estas dependencias, como las dependencias obtenidas en películas binarias de CS-nHA (Fig. 26) demuestran el máximo en ca. 40% en peso de nHA, pero el valor de la constante dieléctrica en el máximo (ca. 275) es mayor que la constante dieléctrica en el máximo de las películas CS-nHA (ca. 110, Fig. 26). Esta observación significa que en las películas compuestas ternarias se observó un efecto de percolación dieléctrica, pero MWCNT afectó la constante dieléctrica y el grosor de la capa interfacial. En otras palabras, probablemente, existe una interacción adicional entre nHA y MWCNT que afectó a la capa interfacial, sin embargo, las propiedades de la capa interfacial no son posibles de calcular debido a los presentes en las películas en tres fases.

Por el contrario, en películas con una concentración de MWCNT superior al umbral de percolación eléctrica (6% en peso, Fig.53), no se han observado máximas dependencias de la constante dieléctrica y la conductividad de la concentración de nHA. Estos resultados pueden explicarse que MWCNT cambia suficientemente la interacción entre nHA y la matriz CS debido a la interacción entre ellos.

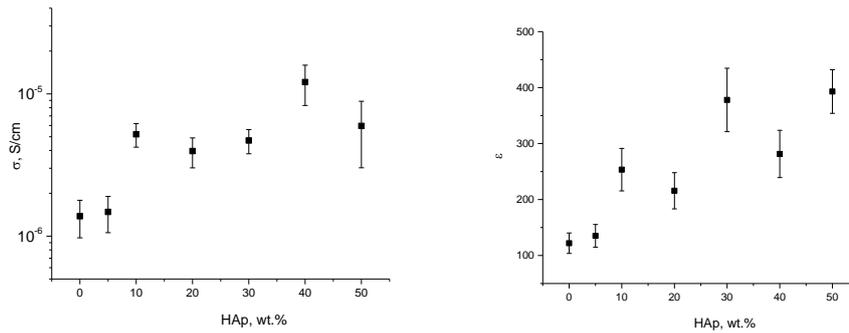


Figura 54. Dependencias de conductividad y constante dieléctrica de películas CS -MWCNT (6% en peso) en concentración de nHA.

Por lo tanto, el uso de nHA solo en la película de nanocompuestos no tuvo ningún efecto sobre la conductividad a concentraciones de 6 % de MWCNT. Sin embargo, la carga a mayores concentraciones arriba del 10 % de nHA tuvo un efecto sobre la conductividad de la película de nanocompuestos que contiene MWCNT. Por lo tanto, una relación de 10 a 20 % de nHA en la película de nanocompuesto de quitosano fue la carga óptima para mejorar la conductividad a 2 % de MWCNT.

A concentración constante del 40 % de nHA la conductividad del nanocompuesto aumentó gradualmente en relación con el contenido de MWCNT. Este cambio gradual en la conductividad resulta de la formación de una estructura interconectada de MWCNT y puede considerarse como el umbral de percolación eléctrica.

Estudios similares en películas de polímero bidimensional conductivo con MWCNT informaron concentraciones de percolación de 10% en peso para alcohol polivinílico [224] y 10% en peso para un polímero de polifenilenvinileno [225]. Además, la nHA podría facilitar la transferencia de electrones entre nanotubos mientras se dispersa en la matriz polimérica porque el nanocompuesto adquiriría más canales conductores a través de interacciones entre las superficies de MWCNT y nHA. Lo que se observa en la figura 54 es que a concentraciones mínimas del 0.5 % de MWCNT y 5 % de nHA se obtiene misma conductividad que 3 % MWCNT y 30 % de nHA.

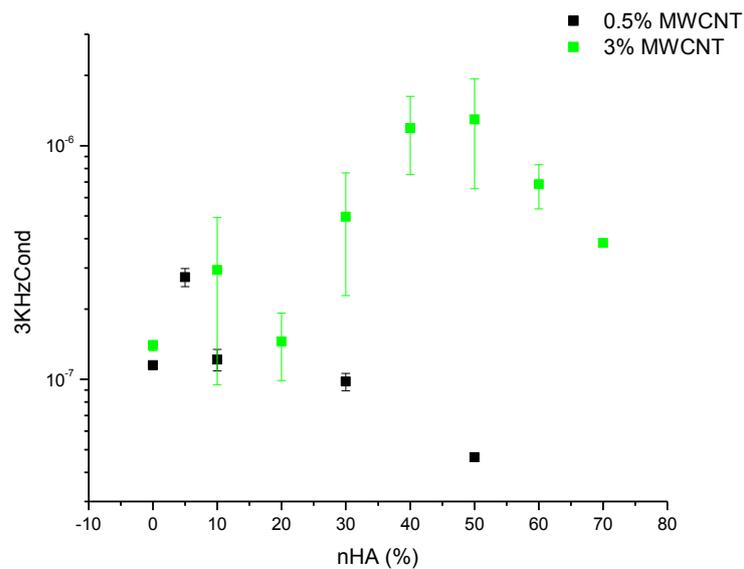


Figura 55. Conductividad eléctrica con 3 % y 0.5 % de MWCNT

### 3.4.4 Pruebas mecánicas

#### 3.4.4.1 Esfuerzo-Deformación

En la literatura se ha informado que la adición de CNT mejora las propiedades mecánicas del nanocompuesto CS-nHA-MWCNT en comparación con CS puro o en la relación fija entre CS-nHA[40], [226]

En este trabajo, por primera vez se han investigado las propiedades mecánicas de los compuestos ternarios en la relación de un rango amplio entre nHA y MWCN. Una máquina de prueba universal probó las propiedades mecánicas del compuesto CS / MWNT / nHA con diferentes relaciones de peso MWNT / nHA. Todas las pruebas se realizan a cabo bajo una carga de tensión a 1 mm / s.

La figura muestra el módulo elástico de CS-MWCNT que demostró un máximo de E a la concentración de aprox. 3% en peso de MWCNT y a una concentración más alta de CNT E disminuyen. Por el contrario, en todas las películas CS-HAP con aumento de la concentración máxima de MWCNT observada a 0,5% en peso de nanotubos. Este máximo es mayor que en las películas binarias CS-MWCNT. Como se ha informado en [145], [146], [199].

Propiedades mecánicas que dependen de las propiedades de la capa interfacial entre la matriz polimérica y los rellenos. Como se informó anteriormente, a partir de FTIR y mediciones de impedancia, la interacción entre nHA y MWCNT afectó el valor de la capa

interfacial y, por lo tanto, las propiedades mecánicas de las películas ternarias. Además, la aglomeración observada de rellenos a su alta concentración conduce a la superposición de capas interfaciales que es responsable de la disminución de E.

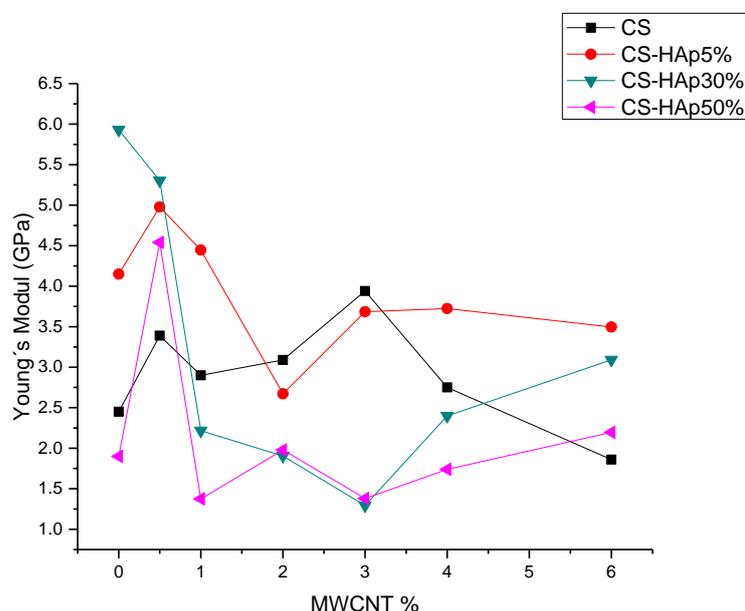


Figura 56. Modulo elástico de películas CS/MWCNT/nHA

Debido al hecho de que a 50 y 70% en peso de nHA y 0.5% en peso de MWCNT se observó una estructura en capas como andamios (SEM, Fig.32) que aumentan efectivamente la adhesión de las células en el extranjero y tienen el módulo elástico más alto, este material es lo mejor para la ingeniería del tejido óseo. En la Figura55se muestra los resultados del móduloelástico de las películas de CS/MWCNT/nHA. Los resultados de las pruebas de tracción que tanto las partículas de hidroxapatita como losMWCNT mejoraran el módulo de Young de las películas. En particular, el 5 y 10 % de nanohidroxapatita y 0.5%MWCNT en quitosano pueden mejorar significativamente los módulos elásticos en comparación con los controles de CS/MWCNT y CS/nHA. Se ha demostrado que MWCNT y la nHA pueden mejorar las propiedades mecánicas.

Los datos demostraron que todas las muestras presentaron un comportamiento similar de esfuerzo-deformación con 4 repeticiones por cada muestra. El esfuerzo aumentó bruscamente durante la etapa inicial de tensión y luego se redujo hasta que finalmente se alcanzó la fractura. En comparación con los compuestos CS/nHA y CS/MWCNT, los compuestos CS-MWNT/nHA exhibieron mayor moduloque los controles. Claramente, el nivel de carga de MWCNT y nHA tiene un profundo efecto en las propiedades mecánicas.

Es de resaltar que el módulo elástico aumento bruscamente en todas las películas con el 0.5 % MWCNTy con el 50 % de nHA fue donde se observó el mayor incremento de 1.9 GP a 4.5 GPa; también se resalta que por encima de las demás películas hay un aumento considerable con el 10 % de nHA prácticamente sin cambios representativos a diferente % de MWCNT. Se podrían determinar algunos de los factores que conducen a la mejora de las propiedades mecánicas del nanocompuesto CS/MWCNT/nHA:

- (1) la fuerte interacción interfacial entre la fase inorgánica y orgánica obtenida por los grupos funcionales de los MWCNT y la interacción de iones hidroxilo en la superficie de nHA, en la matriz de CS;
- (2) la introducción de MWNT, que tiene altas propiedades mecánicas, como fase de refuerzo;
- (3) dispersión uniforme de MWNT y nHA en la matriz polimérica.

Sin embargo, se ha informado que el hueso natural tiene un módulo mucho más alto (10.9 GPa) [227] que el del nanocompuesto CS/MWNT/nHA. Por lo tanto, se puede mejorar la unión interfacial entre MWNT, nHA y CS, pueden mostrar un alto módulo y pueden incluso igualar las propiedades de los huesos naturales y ampliar su uso en aplicaciones quirúrgicas. Como se observó en FTIR a concentraciones de 5 % de nHA y 0.5 de MWCNT en la matriz de CS hay muy buena interacción.

#### 3.4.4.2 DMA

Para observar los efectos de los factores en los procesos de relajación, se trazaron gráficas del módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida contra la temperatura como se muestra en la Figura 57. El módulo de almacenamiento corresponde al componente real del módulo complejo ( $E^* = E' + iE''$  donde  $i = -1^{1/2}$ ) y es la medida de la rigidez de la muestra, mientras que el módulo de pérdida  $E''$  corresponde al componente imaginario y es la medida de la capacidad de amortiguación de la muestra. Se observó que el módulo de almacenamiento del material aumentó a bajas temperaturas y luego disminuyó a temperaturas más altas, lo que está relacionado con el aumento de la viscosidad y la movilidad de la cadena de polímeros de la matriz a temperaturas más altas. Por otro lado, se observa que con la disminución de nHA en una matriz de CS/MWCNT 0.5% hay un aumento tanto del módulo elástico y el módulo de pérdida, lo que aumenta las propiedades viscoelásticas del material. Se entiende que el factor de pérdida ( $\tan \delta$ ) está relacionado con la relación entre la cantidad de energía mecánica perdida y la energía almacenada

durante un ciclo. El módulo de pérdida viene dado por  $\tan \delta = E''/E'$  y proporciona detalles de las transiciones que tienen lugar durante los procesos de calentamiento (picos  $\tan \delta$ ). Por lo tanto, para comprender las transiciones que tuvieron lugar en las películas CS/MWCNT/nHA, las muestras se calentaron entre los rangos de temperatura de -80 a 150 °C. La Figura 58 muestra gráficos del factor de pérdida ( $\tan \delta$ ) frente a la temperatura.

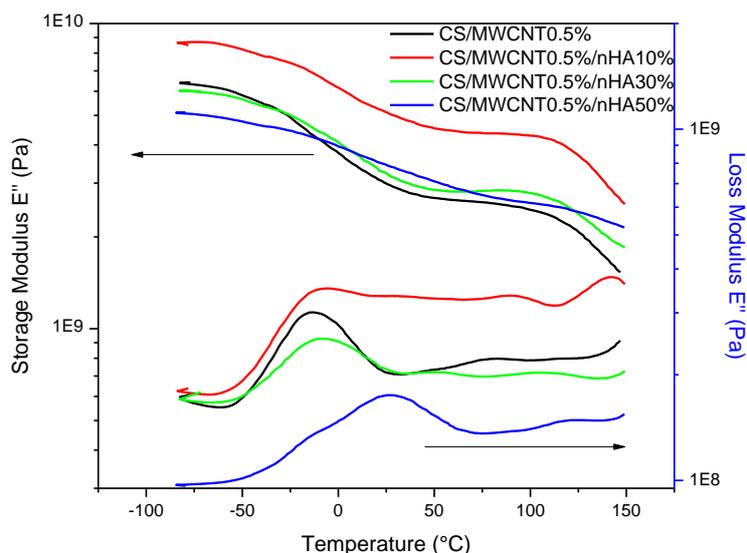


Figura 57. Módulo de almacenamiento y módulo de pérdida de películas CS/MWCNT/nHA

A partir del gráfico de la Figura 58, se observaron dos procesos básicos de relajación en el rango de temperaturas mencionado anteriormente. La transición (picos  $\delta$ ) se observaron en el rango de temperatura de -6 a 33 °C. El pico  $\delta$  concuerda con los valores que informaron picos de  $\tan \delta$  para películas delgadas de quitosano entre 30 y 50 °C [228]–[230]. Esta transición de relajación que ocurre a baja temperatura puede atribuirse al movimiento de cadenas laterales del polímero. En este régimen de temperatura, el proceso de relajación puede ser causado principalmente por la influencia del agua, cuya presencia puede conducir a la aparición de enlaces de hidrógeno con grupos  $-OH$  y  $-NH_2$  o ácido acético, que se evaporan en esta región de temperatura (efecto de plastificación). Tales procesos se atribuyen a la reorganización estructural del empaque de quitosano debido a un aumento de la movilidad del agua residual. Curiosamente, en este rango de temperatura, los resultados de relajación dieléctrica se muestran como un proceso relacionado con la conductividad de DC debido a la conductividad protónica [231]. Este proceso también podría originarse, en cuanto a la respuesta mecánica, a partir de la creciente movilidad de las moléculas de agua con el

aumento de la temperatura. Por otro lado, la segunda transición se puede asignar de (130-150 °C) y se debe a la transición vítrea ( $T_g$ ) de la película de quitosano. Los incrementos de  $\tan\delta$  muestran que la temperatura de transición vítrea se produce en un rango de temperatura y no a una temperatura particular. Es importante tener en cuenta que el valor de  $T_g$  de quitosano depende de muchos factores, como la DDA, el contenido de agua. Se observó que el módulo de pérdida, que es una medida de esta energía disipada, alcanzaba un máximo a 150 °C. También hubo un aumento en el factor de pérdida cerca de la transición vítrea que sugiere el rápido aumento de la viscosidad a temperaturas cercanas a la temperatura de transición vítrea. Además, los picos se ampliaron con frecuencia sugiriendo una amplia distribución de  $T_g$ . Este hecho sugiere que este es un verdadero proceso de relajación. A partir de estos resultados, conocer la temperatura a la que ocurren las dos transiciones puede dar una idea del rango de temperatura de funcionamiento del nanocompuesto.

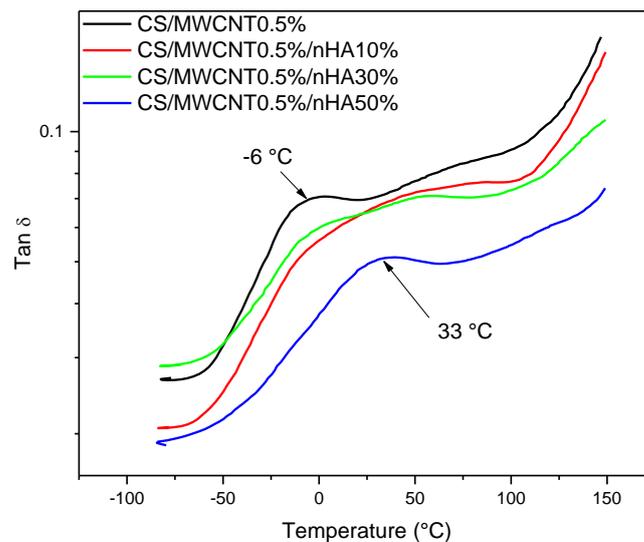


Figura 58. Tan delta de películas CS/MWCNT/nHA

Las variaciones del módulo de almacenamiento y de pérdida ( $E'$ ,  $E''$ ) de las películas compuestas CS/MWCNT/nHA con diferentes concentraciones de MWCNT a 10 % nHA, se muestran en la Figura 59. Los compuestos con MWCNTa concentraciones bajas tienen una  $E'$  y  $E''$  más alta, lo contrario pasa a concentraciones más elevadas de nHA lo que sugiere que las interacciones entre la matriz CS, 10 % nHA y 0.5 % MWCNT fueron más fuertes. Esto confirmó que los compuestos de CS/MWCNT/nHA poseían propiedades mecánicas mejoradas a bajas temperaturas. Las temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) de

los compuestos CS/MWCNT/nHA se determinaron a partir de las curvas  $\tan\delta$  (Figura 59b). Se determinó que los valores de  $T_g$  fueron mayores a 150 °C. Estos resultados parecen contradecir los resultados de la prueba de tracción que se mostraron en la Figura 55, en la que los módulos más altos se correlacionan con una  $T_g$  más baja con concentraciones diferentes de nHA, con variaciones en MWCNT no muestra cambios significativos en  $T_g$ . Este comportamiento observado se denomina antiplastificación, que se definió como una disminución simultánea de la  $T_g$  con un aumento de la rigidez mecánica y la fragilidad causada por la adición de sustancias particulares a los polímeros. Los resultados de tracción (Figura 55) mostraron que la adición de nHA arriba del 10 % indujo la fragilidad de la matriz (es decir, una tendencia decreciente de alargamiento final). El mecanismo de antiplastificación es quizás una combinación de varios factores: el volumen libre de las moléculas de polímero, la interacción entre los grupos polares del polímero y del antiplastificador, una acción de endurecimiento físico debido a la presencia de pequeñas moléculas rígidas adyacentes a los grupos polares del polímero y, en consecuencia, la restricción de los movimientos moleculares en cadena no cooperativos locales [232]. Debido a que las porciones más flexibles de un polímero de condensación rígido son sus grupos polares (por ejemplo, grupos amino), la interacción de estos grupos con moléculas antiplastificantes rígidas y polares debería reducir la flexibilidad. Se puede concluir razonablemente que el mecanismo del volumen libre de una matriz polimérica y el endurecimiento físico debido a la presencia de nanopartículas de HA rígidas puede ser la única causa de antiplastificación del sistema.

La altura del pico  $\tan\delta$  se mejoró en el compuesto CS/MWCNT0.5% en comparación con las muestras de CS/MWCNT/nHA. La magnitud del pico  $\tan\delta$  está relacionada con la capacidad de amortiguación o la disipación de energía vibracional, que refleja la dureza o rigidez de un material a la temperatura de relajación [233]. Estos resultados corroboran aún más las observaciones del estudio térmico de CS/MWCNT/nHA.

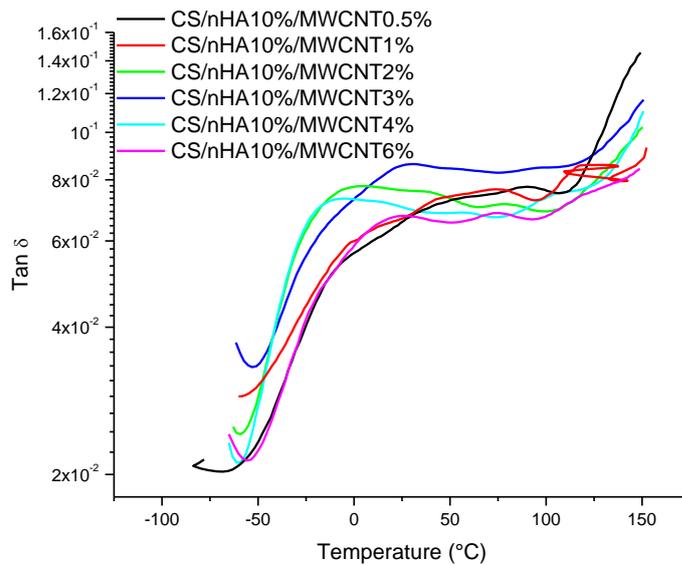
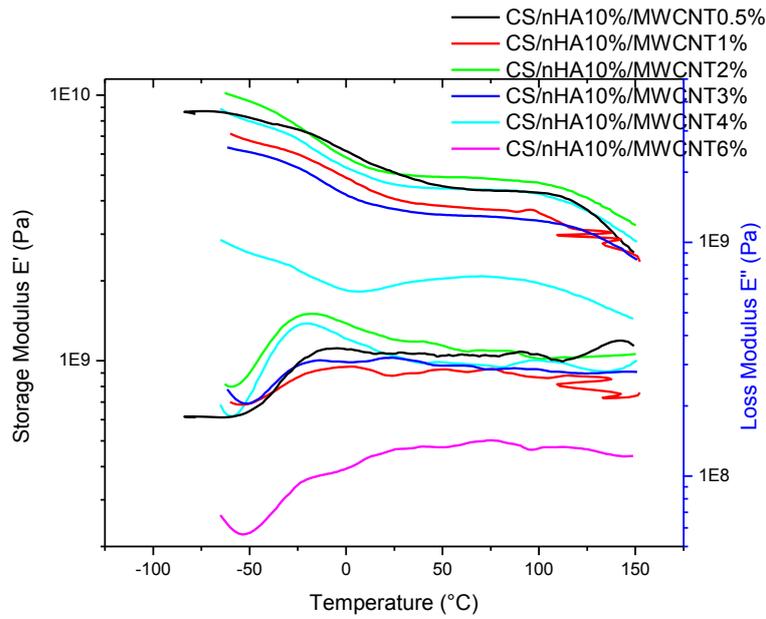


Figura 59. Análisis de películas de CS/MWCNT/nHA a) Modulo de almacenamiento y perdida b) tan delta

### 3.4.5 Conclusiones del capítulo

En este capítulo, se ha llevado a cabo el desarrollo del compuesto de nHA y MWCNT en una matriz de CS y la caracterización mecánica y eléctrica. Los resultados de nuestro estudio demostraron que las películas mostraron iguales o mejores resultados a concentraciones de 0.5 % de MWCNT y 5 % nHA en la matriz de CS comparado con los capítulos anteriores con percolaciones del 3 % de MWCNT en CS y de 40 % de nHA en CS. FTIR (las bandas en 3265, 1553 y el ensanchamiento en 1016) muestran buena integración en 5 y 40 % de nHA y 0.5 y 3 % de MWCNT en la matriz de CS, SEM

muestra buena dispersión entre los tres materiales. Hemos mejorado el módulo elástico (de 4 a 5GPa) con el 3 % de MWCNT a 0.5 % de MWCNT y 5 % nHA en CS.

Como se muestra en FTIR de la Figura 53, la interfaz entre las fases inorgánica y orgánica es buenas, porque los nanocristales de HA tienen una alta afinidad con la matriz CS-MWNT. A partir de los resultados de las pruebas mecánicas, podemos ver que el módulo elástico aumentó con el aumento de las relaciones de peso MWNT/CS en 0.5 y 3 % de MWCNT.

En resumen, hemos fabricado con éxito CS/MWCNT/nHA que exhiben excelentes propiedades mecánicas, eléctricas, que han cumplido algunas propiedades requeridas de la matriz extracelular del hueso. Además, se observó una distribución uniforme de partículas de HA y MWNT en la matriz polimérica, lo que atribuye a la precipitación in situ. Con base en la investigación anterior, llegamos a la conclusión de que los nanocompuestos CS/MWNT/nHA son biomateriales prometedores para la ingeniería del tejido óseo. Desarrollamos un método biocompatible para mejorar las propiedades mecánicas de los andamios de quitosano utilizando nanotubos de carbono funcionalizados sin tener efectos secundarios significativos en la proliferación celular a diferentes concentraciones de nHA.

Se mostró interacción entre  $\text{PO}_4^{3-}$  de hidroxiapatita y con los grupos -COOH en las superficies defectuosas de los MWCNT que puede cambiar suficientemente las propiedades del nanocompuesto y la capa interfacial entre la matriz CS y los rellenos.

Por primera vez, se han investigado las propiedades mecánicas de los compuestos ternarios en la amplia relación entre nHA y MWCN. Se demostró que CS-HAP-MWCNT con 50-70% en peso de nHA y 0.5% en peso de MWCNT demuestran el módulo elástico más alto y pueden usarse para la ingeniería del tejido óseo.

## 4. Conclusiones de tesis

En primera vez la investigación de las películas CS-nHA muestra que se observa un valor máximo en las propiedades mecánicas, dieléctricas y de conductividad cuando se pasa de concentraciones bajas a altas de nHA. Este máximo puede estar relacionado con la aglomeración de clúster de nHA por encima del umbral de percolación (ca. 30-40% en peso de nHA). Las propiedades mecánicas, dieléctricas y de conductividad de las películas de nanocompuestos CS-nHA se han interpretado utilizando un modelo trifásico que incluye: 1) matriz CS, 2) partículas nHA y 3) capa de interfaz entre la matriz nHA y CS. It was shown that interface phase is responsible for electrical, dielectric and mechanical properties of nanocomposite.

Se demostró que el efecto de las rutas de oxidación química afecta las propiedades de los nanocompuestos basados en MWCNT. El tratamiento químico afectó la abundancia de grupos carboxílicos y defectos que a su vez influyen en la interacción entre los MWCNT y la matriz CS. Los nanocompuestos CSMWCNT exhibieron efectos de percolación eléctrica y mecánica y sus parámetros dependen del grosor de la capa interfacial. Por primera vez se muestra que una buena dispersión de MWCNT no garantiza las mejores propiedades eléctricas y mecánicas del nanocompuesto, que se han considerado el factor clave para obtener propiedades eléctricas y mecánicas superiores para muchas aplicaciones.

Por primera vez, se ha investigado la estructura de CS-HAP-MWCNT ternario en un amplio rango de relación entre HA y MWCNT. Se demostró que debido a la interacción entre  $\text{PO}_4^{3-}$  de hidroxiapatita y con los grupos  $-\text{COOH}$  en las superficies defectuosas de los MWCNT cambia las propiedades de la capa interfacial entre la matriz CS y los rellenos. Debido al hecho de que a 50 y 70% en peso de nHA y 0.5% en peso de MWCNT observó estructura en capas como andamios que aumentan efectivamente la adhesión de las células en el extranjero y tienen el módulo elástico más alto, este material es el mejor para la ingeniería de tejido óseo.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Kantharia, S. Naik, S. Apte, M. Kheur, S. Kheur, and B. Kale, "Nano-hydroxyapatite and its contemporary applications," 2014.
- [2] M. Shakir, R. Jolly, M. S. Khan, N. e Iram, and H. M. Khan, "Nano-hydroxyapatite/chitosan-starch nanocomposite as a novel bone construct: Synthesis and in vitro studies.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 80, pp. 282–92, Sep. 2015.
- [3] A. K. Teotia *et al.*, "Nano-Hydroxyapatite Bone Substitute Functionalized with Bone Active Molecules for Enhanced Cranial Bone Regeneration," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 8, pp. 6816–6828, Mar. 2017.
- [4] M. Bayani, S. Torabi, A. Shahnaz, and M. Pourali, "Main properties of nanocrystalline hydroxyapatite as a bone graft material in treatment of periodontal defects. A review of literature," *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 31, no. 2, pp. 215–220, Mar. 2017.
- [5] P. Turon, L. del Valle, C. Alemán, and J. Puiggali, "Biodegradable and Biocompatible Systems Based on Hydroxyapatite Nanoparticles," *Appl. Sci.*, vol. 7, no. 1, p. 60, Jan. 2017.
- [6] H. Zhou and J. Lee, "Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 7, pp. 2769–2781, Jul. 2011.
- [7] S. M. Zakaria, S. H. Sharif Zein, M. R. Othman, F. Yang, and J. A. Jansen, "Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: a review.," *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 19, no. 5, pp. 431–41, Oct. 2013.
- [8] X. Pang and I. Zhitomirsky, "Electrodeposition of composite hydroxyapatite–chitosan films," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 94, no. 2–3, pp. 245–251, Dec. 2005.
- [9] J. Venkatesan and S. K. Kim, "Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview," *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 8, pp. 2252–2266, 2010.
- [10] L. Pighinelli and M. Kucharska, "Chitosan-hydroxyapatite composites," *Carbohydr. Polym.*, vol. 93, no. 1, pp. 256–262, 2013.
- [11] T. Sun, T. H. Khan, and N. Sultana, "Fabrication and *In Vitro* Evaluation of Nanosized Hydroxyapatite/Chitosan-Based Tissue Engineering Scaffolds," *J. Nanomater.*, vol. 2014, pp. 1–8, Feb. 2014.
- [12] R. Augustine, U. G. Kalappura, and K. T. Mathew, "Biocompatibility study of hydroxyapatite-chitosan composite for medical applications at microwave frequencies," *Microw. Opt. Technol. Lett.*, vol. 50, no. 11, pp. 2931–2934, Nov. 2008.
- [13] C. Xianmiao, L. Yubao, Z. Yi, Z. Li, L. Jidong, and W. Huanan, "Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite / chitosan membranes for bone guided regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 1, pp. 29–35, 2009.
- [14] G. A. S. T. S. D. D. M. BC Muddugangadhar, "Biomaterials for Dental Implants: An

- Overview," *Int. J. Oral Implantol. Clin. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 13–24, 2011.
- [15] J. Venkatesan, B. Ryu, P. N. Sudha, and S.-K. Kim, "Preparation and characterization of chitosan-carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 50, no. 2, pp. 393–402, 2012.
- [16] C. Myeroff and M. Archdeacon, "Autogenous Bone Graft: Donor Sites and Techniques," *J. Bone Jt. Surgery-American Vol.*, vol. 93, no. 23, pp. 2227–2236, Dec. 2011.
- [17] M. W. Tibbitt and K. S. Anseth, "Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 103, no. 4, pp. 655–663, Jul. 2009.
- [18] L. Zhang and T. J. Webster, "Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration," *Nano Today*, vol. 4, no. 1, pp. 66–80, Feb. 2009.
- [19] R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue engineering.," *Science*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–6, May 1993.
- [20] J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone.," *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 2, pp. 92–102, Mar. 1998.
- [21] M. R. Nikpour, S. M. Rabiee, and M. Jahanshahi, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan nanocomposite materials for medical engineering applications," *Compos. Part B Eng.*, vol. 43, no. 4, pp. 1881–1886, Jun. 2012.
- [22] H. Zhao, H. Jin, and J. Cai, "Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite with enhanced compressive strength by urease-catalyzed method," *Mater. Lett.*, vol. 116, pp. 293–295, Feb. 2014.
- [23] N. Pramanik, D. Mishra, I. Banerjee, T. K. Maiti, P. Bhargava, and P. Pramanik, "Chemical synthesis, characterization, and biocompatibility study of hydroxyapatite/chitosan phosphate nanocomposite for bone tissue engineering applications.," *Int. J. Biomater.*, vol. 2009, p. 512417, 2009.
- [24] X. Li, K. Nan, S. Shi, and H. Chen, "Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan cross-linking composite membrane intended for tissue engineering," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 50, no. 1, pp. 43–49, Jan. 2012.
- [25] X. Cai, L. Chen, T. Jiang, X. Shen, J. Hu, and H. Tong, "Facile synthesis of anisotropic porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 32, p. 12015, Aug. 2011.
- [26] I. Petrov *et al.*, "Dielectric and electric properties of new chitosan-hydroxyapatite materials for biomedical application: Dielectric spectroscopy and corona treatment," *Carbohydr. Polym.*, vol. 151, pp. 770–778, Oct. 2016.
- [27] Y. Liu, J. Tang, X. Chen, and J. H. Xin, "Decoration of carbon nanotubes with chitosan," *Carbon N. Y.*, vol. 43, no. 15, pp. 3178–3180, Dec. 2005.
- [28] S.-F. Wang, L. Shen, W.-D. Zhang, and Y.-J. Tong, "Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites.," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 6, pp. 3067–72, 2005.

- [29] C. Lau, M. J. Cooney, and P. Atanassov, "Conductive Macroporous Composite Chitosan–Carbon Nanotube Scaffolds," *Langmuir*, vol. 24, no. 13, pp. 7004–7010, Jul. 2008.
- [30] J.-D. Qiu, H.-Y. Xie, and R.-P. Liang, "Preparation of porous chitosan/carbon nanotubes film modified electrode for biosensor application," *Microchim. Acta*, vol. 162, no. 1–2, pp. 57–64, Jul. 2008.
- [31] B. Kumar, J.-F. Feller, M. Castro, and J. Lu, "Conductive bio-Polymer nano-Composites (CPC): Chitosan-carbon nanotube transducers assembled via spray layer-by-layer for volatile organic compound sensing," *Talanta*, vol. 81, no. 3, pp. 908–915, May 2010.
- [32] S. Ozarkar, M. Jassal, and A. K. Agrawal, "pH and electrical actuation of single walled carbon nanotube/chitosan composite fibers," *Smart Mater. Struct.*, vol. 17, no. 5, p. 055016, Oct. 2008.
- [33] G. M. Spinks, S. R. Shin, G. G. Wallace, P. G. Whitten, S. I. Kim, and S. J. Kim, "Mechanical properties of chitosan/CNT microfibers obtained with improved dispersion," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 115, no. 2, pp. 678–684, Jun. 2006.
- [34] A. Kroustalli *et al.*, "Carbon nanotubes reinforced chitosan films: Mechanical properties and cell response of a novel biomaterial for cardiovascular tissue engineering," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 12, pp. 2889–2896, 2013.
- [35] A. Aryaei, A. H. Jayatissa, and A. C. Jayasuriya, "Mechanical and biological properties of chitosan/carbon nanotube nanocomposite films," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 8, pp. 2704–2712, 2014.
- [36] S.-F. Wang, L. Shen, W.-D. Zhang, and Y.-J. Tong, "Preparation and Mechanical Properties of Chitosan/Carbon Nanotubes Composites," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 6, pp. 3067–3072, Nov. 2005.
- [37] K. Balasubramanian and M. Burghard, "Chemically functionalized carbon nanotubes," *Small*, vol. 1, no. 2, pp. 180–192, 2005.
- [38] T. Sainsbury and D. Fitzmaurice, "Templated assembly of semiconductor and insulator nanoparticles at the surface of covalently modified multiwalled carbon nanotubes," *Chem. Mater.*, vol. 16, no. 19, pp. 3780–3790, 2004.
- [39] C. T. Laurencin, S. G. Kumbar, and S. P. Nukavarapu, "Nanotechnology and orthopedics: a personal perspective," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 1, no. 1, pp. 6–10, Jan. 2009.
- [40] L. Chen, J. Hu, X. Shen, and H. Tong, "Synthesis and characterization of chitosan-multiwalled carbon nanotubes/hydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 8, pp. 1843–1851, 2013.
- [41] J. Venkatesan, Z. J. Qian, B. Ryu, N. Ashok Kumar, and S. K. Kim, "Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan - Natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering," *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 2, pp. 569–577, 2011.

- [42] A. Fonseca-García *et al.*, "Effect of doping in carbon nanotubes on the viability of biomimetic chitosan-carbon nanotubes-hydroxyapatite scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 10, pp. 3341–3351, 2014.
- [43] F. Batmanghelich and M. Ghorbani, "Effect of pH and carbon nanotube content on the corrosion behavior of electrophoretically deposited chitosan-hydroxyapatite-carbon nanotube composite coatings," *Ceram. Int.*, vol. 39, no. 5, pp. 5393–5402, 2013.
- [44] Z. Zhong, J. Qin, and J. Ma, "Electrophoretic deposition of biomimetic zinc substituted hydroxyapatite coatings with chitosan and carbon nanotubes on titanium," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 7, pp. 8878–8884, 2015.
- [45] P. C. Rath, B. P. Singh, L. Besra, and S. Bhattacharjee, "Multiwalled Carbon Nanotubes Reinforced Hydroxyapatite-Chitosan Composite Coating on Ti Metal: Corrosion and Mechanical Properties," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 95, no. 9, pp. 2725–2731, Sep. 2012.
- [46] T. J. Webster and E. S. Ahn, "Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone.," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 103, pp. 275–308, 2007.
- [47] T. M. Keaveny, E. F. Morgan, G. L. Niebur, and O. C. Yeh, "Biomechanics of Trabecular Bone," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 3, no. 1, pp. 307–333, Aug. 2001.
- [48] F. Barrère, T. A. Mahmood, K. De Groot, and C. A. Van Blitterswijk, "Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions," 2008.
- [49] D. M. L. Cooper, J. R. Matyas, M. A. Katzenberg, and B. Hallgrímsson, "Comparison of Microcomputed Tomographic and Microradiographic Measurements of Cortical Bone Porosity," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 74, no. 5, pp. 437–447, May 2004.
- [50] J. P. Bilezikian, L. G. (Lawrence G. Raisz, and G. A. Rodan, *Principles of bone biology*. Academic Press, 2002.
- [51] D. J. DiGirolamo, T. L. Clemens, and S. Kousteni, "The skeleton as an endocrine organ," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 8, no. 11, pp. 674–683, Nov. 2012.
- [52] J. R. Caeiro, P. González, and D. Guede, "Biomecánica y hueso (y II): ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea," *Rev. Osteoporos. y Metab. Miner.*, vol. 5, no. 2, pp. 99–108, Jun. 2013.
- [53] R. B. Martin, "Bone as a Ceramic Composite Material," *Mater. Sci. Forum*, vol. 293, pp. 5–16, Aug. 1998.
- [54] R. B. Martin, "Determinants of the mechanical properties of bones.," *J. Biomech.*, vol. 24 Suppl 1, pp. 79–88, 1991.
- [55] G. M. Kiebzak, "Age-related bone changes.," *Exp. Gerontol.*, vol. 26, no. 2–3, pp. 171–87, 1991.
- [56] L. L. Hench and J. Wilson, *An Introduction to Bioceramics*. WORLD SCIENTIFIC, 1993.

- [57] D. T. Reilly, A. H. Burstein, and V. H. Frankel, "The elastic modulus for bone.," *J. Biomech.*, vol. 7, no. 3, pp. 271–5, May 1974.
- [58] K. Choi, J. L. Kuhn, M. J. Ciarelli, and S. A. Goldstein, "The elastic moduli of human subchondral, trabecular, and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus.," *J. Biomech.*, vol. 23, no. 11, pp. 1103–13, 1990.
- [59] J. Y. Rho, T. Y. Tsui, and G. M. Pharr, "Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation.," *Biomaterials*, vol. 18, no. 20, pp. 1325–30, Oct. 1997.
- [60] M. Jagodzinski and C. Krettek, "Effect of mechanical stability on fracture healing — an update," *Injury*, vol. 38, no. 1, pp. S3–S10, Mar. 2007.
- [61] D. P. Pioletti, "BONE QUALITY SEMINARS: BONE FRACTURE HEALING AND STRENGTHENING Biomechanics and tissue engineering."
- [62] J. Klein-Nulend, R. G. Bacabac, and M. G. Mullender, "Mechanobiology of bone tissue," *Pathol. Biol.*, vol. 53, no. 10, pp. 576–580, Dec. 2005.
- [63] D. R. Epari, W. R. Taylor, M. O. Heller, and G. N. Duda, "Mechanical conditions in the initial phase of bone healing," *Clin. Biomech.*, vol. 21, no. 6, pp. 646–655, Jul. 2006.
- [64] R. Marsell and T. A. Einhorn, "The biology of fracture healing," *Injury*, vol. 42, no. 6, pp. 551–555, Jun. 2011.
- [65] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, and P. V Giannoudis, "Bone regeneration: current concepts and future directions," *BMC Med.*, vol. 9, no. 1, p. 66, Dec. 2011.
- [66] T. A. Einhorn, "Enhancement of fracture-healing.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 77, no. 6, pp. 940–56, Jun. 1995.
- [67] G. M. Calori, W. Albisetti, A. Agus, S. Iori, and L. Tagliabue, "Risk factors contributing to fracture non-unions.," *Injury*, vol. 38 Suppl 2, pp. S11-8, May 2007.
- [68] T. Kokubo, H.-M. Kim, and M. Kawashita, "Novel bioactive materials with different mechanical properties.," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2161–75, Jun. 2003.
- [69] A. S. Brydone, D. Meek, and S. Maclaine, "Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering," *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, vol. 224, no. 12, pp. 1329–1343, Dec. 2010.
- [70] X. Li, Q. Feng, X. Liu, W. Dong, and F. Cui, "Collagen-based implants reinforced by chitin fibres in a goat shank bone defect model," *Biomaterials*, vol. 27, no. 9, pp. 1917–1923, Mar. 2006.
- [71] J. A. F. Tresguerres and C. Ariznavarreta Ruiz, *Fisiología humana* . .
- [72] N. Takeshita *et al.*, "Osteoclastic features of multinucleated giant cells responding to synthetic hydroxyapatite implanted in rat jaw bone.," *J. Electron Microsc.* (Tokyo)., vol. 41, no. 3, pp. 141–6, Jun. 1992.
- [73] W. Jie and L. Yubao, "Tissue engineering scaffold material of nano-apatite crystals and polyamide composite."

- [74] M. Okada and T. Matsumoto, "ScienceDirect Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications," *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, vol. 51, pp. 85–95, 2015.
- [75] D. W. Hutmacher, J. T. Schantz, C. X. F. Lam, K. C. Tan, and T. C. Lim, "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 1, no. 4, pp. 245–260, Jul. 2007.
- [76] M. Wang, "Developing bioactive composite materials for tissue replacement.," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2133–51, Jun. 2003.
- [77] P. Madhavan and K. G. Ramachandran Nair, "f CHITIN."
- [78] F. Shahidi and R. Abuzaytoun, "Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects," in *Advances in food and nutrition research*, vol. 49, 2005, pp. 93–135.
- [79] J.-Y. Je and S.-K. Kim, "Water-soluble chitosan derivatives as a BACE1 inhibitor," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 13, no. 23, pp. 6551–6555, Dec. 2005.
- [80] Y.-J. JEON, F. SHAHIDI, and S.-K. KIM, "PREPARATION OF CHITIN AND CHITOSAN OLIGOMERS AND THEIR APPLICATIONS IN PHYSIOLOGICAL FUNCTIONAL FOODS," *Food Rev. Int.*, vol. 16, no. 2, pp. 159–176, May 2000.
- [81] A. Di Martino, M. Sittinger, and M. V. Risbud, "Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering," *Biomaterials*, vol. 26, no. 30, pp. 5983–5990, Oct. 2005.
- [82] J.-K. F. Suh and H. W. T. Matthew, "Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review," 2000.
- [83] H. Ueno, T. Mori, and T. Fujinaga, "Topical formulations and wound healing applications of chitosan.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 52, no. 2, pp. 105–15, Nov. 2001.
- [84] Q. Hu, B. Li, M. Wang, and J. Shen, "Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture.," *Biomaterials*, vol. 25, no. 5, pp. 779–85, Feb. 2004.
- [85] S. V Madihally and H. W. Matthew, "Porous chitosan scaffolds for tissue engineering.," *Biomaterials*, vol. 20, no. 12, pp. 1133–42, Jun. 1999.
- [86] K. Gkioni, S. C. G. Leeuwenburgh, T. E. L. Douglas, A. G. Mikos, and J. A. Jansen, "Mineralization of hydrogels for bone regeneration.," *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 16, no. 6, pp. 577–85, Dec. 2010.
- [87] I.-Y. Kim *et al.*, "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications," *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–21, Jan. 2008.
- [88] C. Shi, Y. Zhu, X. Ran, M. Wang, Y. Su, and T. Cheng, "Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine," *J. Surg. Res.*, vol. 133, no. 2, pp. 185–192, Jun. 2006.

- [89] S. Bagheri-Khoulenjani, S. M. Taghizadeh, and H. Mirzadeh, "An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation," *Carbohydr. Polym.*, vol. 78, no. 4, pp. 773–778, Nov. 2009.
- [90] R. Seda Tıǵlı, A. Karakeçili, and M. Gümüşderelioǵlu, "In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, no. 9, pp. 1665–1674, Aug. 2007.
- [91] W. W. Thein-Han and Y. Kitiyanant, "Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 80B, no. 1, pp. 92–101, Jan. 2007.
- [92] K. Tomihata and Y. Ikada, "In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives.," *Biomaterials*, vol. 18, no. 7, pp. 567–75, Apr. 1997.
- [93] C. Chatelet, O. Damour, and A. Domard, "Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films.," *Biomaterials*, vol. 22, no. 3, pp. 261–8, Feb. 2001.
- [94] M. N. . Ravi Kumar, "A review of chitin and chitosan applications," *React. Funct. Polym.*, vol. 46, no. 1, pp. 1–27, Nov. 2000.
- [95] K. V. Harish Prashanth and R. N. Tharanathan, "Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 18, no. 3, pp. 117–131, Mar. 2007.
- [96] J. Nunthanid, S. Puttipipatkachorn, K. Yamamoto, and G. E. Peck, "Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan Films," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 27, no. 2, pp. 143–157, Jan. 2001.
- [97] S. V. Dorozhkin, "Bioceramics of calcium orthophosphates," *Biomaterials*, vol. 31, no. 7, pp. 1465–1485, Mar. 2010.
- [98] R. A. A. Muzzarelli, "Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers.," *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 2, pp. 292–312, Feb. 2010.
- [99] A. Niekraszewicz *et al.*, "Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its," 2009.
- [100] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, Jul. 2006.
- [101] L. Kong, Y. Gao, G. Lu, Y. Gong, N. Zhao, and X. Zhang, "A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering," *Eur. Polym. J.*, vol. 42, no. 12, pp. 3171–3179, 2006.
- [102] S.-J. Ding, "Biodegradation behavior of chitosan/calcium phosphate composites," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 353, no. 24–25, pp. 2367–2373, Jul. 2007.
- [103] S. Iijima, "Helical microtubules of graphitic carbon," *Nature*, vol. 354, no. 6348, pp. 56–58, Nov. 1991.
- [104] C. Journet *et al.*, "Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by

- the electric-arc technique," *Nature*, vol. 388, no. 6644, pp. 756–758, Aug. 1997.
- [105] Thess *et al.*, "Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes," *Science*, vol. 273, no. 5274, pp. 483–7, Jul. 1996.
- [106] †,‡ Alan M. Cassell, † Jeffrey A. Raymakers, † and Jing Kong, and † Hongjie Dai\*, "Large Scale CVD Synthesis of Single-Walled Carbon Nanotubes," 1999.
- [107] K. L. Strong, D. P. Anderson, K. Lafdi, and J. N. Kuhn, "Purification process for single-wall carbon nanotubes," *Carbon N. Y.*, vol. 41, no. 8, pp. 1477–1488, Jan. 2003.
- [108] D. Chattopadhyay, I. Galeska, and F. Papadimitrakopoulos, "Complete elimination of metal catalysts from single wall carbon nanotubes," *Carbon N. Y.*, vol. 40, no. 7, pp. 985–988, Jun. 2002.
- [109] R. Andrews, D. Jacques, D. Qian, and E. C. Dickey, "Purification and structural annealing of multiwalled carbon nanotubes at graphitization temperatures," *Carbon N. Y.*, vol. 39, no. 11, pp. 1681–1687, Sep. 2001.
- [110] A. C. Dillon, T. Gennett, K. M. Jones, J. L. Alleman, P. A. Parilla, and M. J. Heben, "A Simple and Complete Purification of Single-Walled Carbon Nanotube Materials," *Adv. Mater.*, vol. 11, no. 16, pp. 1354–1358, Nov. 1999.
- [111] P. R. Supronowicz, P. M. Ajayan, K. R. Ullmann, B. P. Arulanandam, D. W. Metzger, and R. Bizios, "Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 59, no. 3, pp. 499–506, Mar. 2002.
- [112] Bin Zhao, Hui Hu, and Swadhin K. Mandal, and R. C. Haddon\*, "A Bone Mimic Based on the Self-Assembly of Hydroxyapatite on Chemically Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes," 2005.
- [113] K. Besteman, J.-O. Lee, F. G. M. Wiertz, H. A. Heering, and C. Dekker, "Enzyme-Coated Carbon Nanotubes as Single-Molecule Biosensors," *NANO Lett.*, vol. 3, no. 6, 2003.
- [114] R. Singh *et al.*, "Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 9, pp. 3357–3362, Feb. 2006.
- [115] Y. Zhu, X. Liu, K. W. K. Yeung, P. K. Chu, and S. Wu, "Biofunctionalization of carbon nanotubes/chitosan hybrids on Ti implants by atom layer deposited ZnO nanostructures," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 400, no. 400, pp. 14–23, Apr. 2017.
- [116] \*,†, Charles H. Reynolds *et al.*, "Gadolinium-Loaded Nanoparticles: New Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging," 2000.
- [117] Z. WU, L. HE, and Z. CHEN, "Fabrication and characterization of hydroxyapatite/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> biocomposite coating on titanium," *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, vol. 16, no. 2, pp. 259–266, Apr. 2006.
- [118] Y. C. Yang and B. Y. Chou, "Bonding strength investigation of plasma-sprayed HA coatings on alumina substrate with porcelain intermediate layer," *Mater. Chem.*

*Phys.*, vol. 104, pp. 312–319, 2007.

- [119] L. S. Sundar, R. Hawaldar, E. Titus, J. Gracio, and M. K. Singh, “Integrated Biomimetic Carbon Nanotube Composites for Biomedical Applications,” 2012.
- [120] K. Sahithi, M. Swetha, K. Ramasamy, N. Srinivasan, and N. Selvamurugan, “Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 46, no. 3, pp. 281–283, 2010.
- [121] B. S. Harrison and A. Atala, “Carbon nanotube applications for tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 2, pp. 344–353, 2007.
- [122] H. Jiang *et al.*, “Biomimetic Spiral-Cylindrical Scaffold Based on Hybrid Chitosan/Cellulose/Nano-Hydroxyapatite Membrane for Bone Regeneration,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 22, pp. 12036–12044, Nov. 2013.
- [123] J. Zhang, J. Nie, Q. Zhang, Y. Li, Z. Wang, and Q. Hu, “Preparation and characterization of bionic bone structure chitosan/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 25, no. 1, pp. 61–74, Jan. 2014.
- [124] B. Chudhuri, D. Bhadra, S. Dash, G. Sardar, K. Pramanik, and B. K. Chaudhuri, “Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Chitosan Composite from Crab Shell,” *J. Biomater. Tissue Eng.*, vol. 3, no. 6, pp. 653–657, Dec. 2013.
- [125] I. Yamaguchi *et al.*, “Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, no. 1, pp. 20–27, 2001.
- [126] S.-H. Teng, E.-J. Lee, B.-H. Yoon, D.-S. Shin, H.-E. Kim, and J.-S. Oh, “Chitosan/nanohydroxyapatite composite membranes via dynamic filtration for guided bone regeneration,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 88A, no. 3, pp. 569–580, Mar. 2009.
- [127] F. Chen, Z.-C. Wang, and C.-J. Lin, “Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials.”
- [128] Y. Zhang, J. R. Venugopal, A. El-Turki, S. Ramakrishna, B. Su, and C. T. Lim, “Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 32, pp. 4314–4322, 2008.
- [129] L. Kong, Y. Gao, W. Cao, Y. Gong, N. Zhao, and X. Zhang, “Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 75, no. 2, pp. 275–282, 2005.
- [130] I. Manjubala, P. Basu, and U. Narendrakumar, “In situ synthesis of hydroxyapatite/carboxymethyl cellulose composites for bone regeneration applications,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 296, no. 10, pp. 1729–1737, Oct. 2018.
- [131] W. W. Thein-Han and R. D. K. Misra, “Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 4, pp. 1182–1197, May 2009.

- [132] J. M. Oliveira *et al.*, “Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 36, pp. 6123–6137, Dec. 2006.
- [133] M. Kikuchi *et al.*, “Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 64, no. 6, pp. 819–825, May 2004.
- [134] Z. Moridi, V. Mottaghitalab, and A. K. Haghi, “A DETAILED REVIEW OF RECENT PROGRESS IN CARBON NANOTUBE/CHITOSAN NANOCOMPOSITES,” 2011.
- [135] F. Sun *et al.*, “Mechanical properties of multilayered chitosan/CNT nanocomposite films,” *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 528, no. 21, pp. 6636–6641, Aug. 2011.
- [136] A. Martinez-Hernandez, C. Velasco-Santos, and V. Castano, “Carbon Nanotubes Composites: Processing, Grafting and Mechanical and Thermal Properties,” *Curr. Nanosci.*, vol. 6, no. 1, pp. 12–39, Feb. 2010.
- [137] Y. Ando, X. Zhao, H. Shimoyama, G. Sakai, and K. Kaneto, “Physical properties of multiwalled carbon nanotubes,” *Int. J. Inorg. Mater.*, vol. 1, no. 1, pp. 77–82, Apr. 1999.
- [138] M. Miao, “Electrical conductivity of pure carbon nanotube yarns,” *Carbon N. Y.*, vol. 49, no. 12, pp. 3755–3761, Oct. 2011.
- [139] W.-Z. Cai, S.-T. Tu, and J.-M. Gong, “A Physically Based Percolation Model of the Effective Electrical Conductivity of Particle Filled Composites,” *J. Compos. Mater.*, vol. 40, no. 23, pp. 2131–2142, Dec. 2006.
- [140] R. Taherian, “Development of an Equation to Model Electrical Conductivity of Polymer-Based Carbon Nanocomposites,” *ECS J. Solid State Sci. Technol.*, vol. 3, no. 6, pp. M26–M38, May 2014.
- [141] J. B. Marroquin, K. Y. Rhee, and S. J. Park, “Chitosan nanocomposite films: Enhanced electrical conductivity, thermal stability, and mechanical properties,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 92, no. 2, pp. 1783–1791, 2013.
- [142] N. Piri, V. Mottaghitalab, and S. Arbab, “Development and characterization of MWNTs/Chitosan biocomposite fiber,” *Fibers Polym.*, vol. 14, no. 2, pp. 236–242, Feb. 2013.
- [143] J. Hernández-Vargas *et al.*, “Chitosan/MWCNTs-decorated with silver nanoparticle composites: Dielectric and antibacterial characterization,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 9, p. n/a-n/a, May 2014.
- [144] J. Yan, H. Wang, T. Wu, X. Li, and Z. Ding, “Elastic and electrically conductive carbon nanotubes/chitosan composites with lamellar structure,” *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.*, vol. 67, pp. 1–7, Dec. 2014.
- [145] V. Padmanabhan, “Percolation of high-density polymer regions in nanocomposites: The underlying property for mechanical reinforcement,” *J.*

*Chem. Phys.*, vol. 139, no. 14, p. 144904, Oct. 2013.

- [146] S. C. Baxter, B. J. Burrows, and B. S. Fralick, "Mechanical percolation in nanocomposites: Microstructure and micromechanics," *Probabilistic Eng. Mech.*, vol. 44, pp. 35–42, 2015.
- [147] B. S. Fralick, E. P. Gatzke, and S. C. Baxter, "Three-dimensional evolution of mechanical percolation in nanocomposites with random microstructures," *Probabilistic Eng. Mech.*, vol. 30, no. June, pp. 1–8, 2012.
- [148] S. K. Yadav, S. S. Mahapatra, M. K. Yadav, and P. K. Dutta, "Mechanically robust biocomposite films of chitosan grafted carbon nanotubes via the [2 + 1] cycloaddition of nitrenes," *RSC Adv.*, vol. 3, no. 45, p. 23631, Oct. 2013.
- [149] A. Zaman, T. U. Rashid, M. A. Khan, and M. M. Rahman, "Preparation and Characterization of Multiwall Carbon Nanotube (MWCNT) Reinforced Chitosan Nanocomposites: Effect of Gamma Radiation," *Bionanoscience*, vol. 5, no. 1, pp. 31–38, Mar. 2015.
- [150] W. Xiao *et al.*, "Preparation, structure, and properties of chitosan/cellulose/multiwalled carbon nanotube composite membranes and fibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 128, no. 2, pp. 1193–1199, 2013.
- [151] Y. Zare and K. Y. Rhee, "A simple model for electrical conductivity of polymer carbon nanotubes nanocomposites assuming the filler properties, interphase dimension, network level, interfacial tension and tunneling distance," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 155, pp. 252–260, Feb. 2018.
- [152] Y. Wang, G. J. Weng, S. A. Meguid, and A. M. Hamouda, "A continuum model with a percolation threshold and tunneling-assisted interfacial conductivity for carbon nanotube-based nanocomposites," *J. Appl. Phys.*, vol. 115, no. 19, p. 193706, May 2014.
- [153] A. S. Mesgar, Z. Mohammadi, and S. Khosrovan, "Improvement of mechanical properties and *in vitro* bioactivity of freeze-dried gelatin/chitosan scaffolds by functionalized carbon nanotubes," *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 67, no. 5, pp. 267–276, Mar. 2018.
- [154] L. H. Leung and H. E. Naguib, "Viscoelastic properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-hydroxyapatite micro-and nano-composites," 2012.
- [155] I. G. Beşkardeş, T. T. Demirtaş, M. D. Durukan, and M. Gümüşderelioğlu, "Microwave-assisted fabrication of chitosan-hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 9, no. 11, pp. 1233–1246, Nov. 2015.
- [156] J. Venkatesan, Z.-J. Qian, B. Ryu, N. Ashok Kumar, and S.-K. Kim, "Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan – Natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering," *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 2, pp. 569–577, Jan. 2011.
- [157] Z. Jing *et al.*, "Carbon Nanotube Reinforced Collagen/Hydroxyapatite Scaffolds Improve Bone Tissue Formation In Vitro and In Vivo," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 45,

no. 9, pp. 2075–2087, Sep. 2017.

- [158] G. Venugopal, J. C. Veetil, N. Raghavan, V. Singh, A. Kumar, and A. Mukkannan, "Nano-dynamic mechanical and thermal responses of single-walled carbon nanotubes reinforced polymer nanocomposite thinfilms," *J. Alloys Compd.*, vol. 688, pp. 454–459, Dec. 2016.
- [159] G. Shen, X. Hu, G. Guan, and L. Wang, "Surface Modification and Characterisation of Silk Fibroin Fabric Produced by the Layer-by-Layer Self-Assembly of Multilayer Alginate/Regenerated Silk Fibroin," *PLoS One*, vol. 10, no. 4, p. e0124811, Apr. 2015.
- [160] Y. Y. Shi *et al.*, "Electrophoretic deposition of graphene oxide reinforced chitosan–hydroxyapatite nanocomposite coatings on Ti substrate," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 27, no. 3, p. 48, Mar. 2016.
- [161] L. Song, L. Gan, Y. Xiao, Y. Wu, F. Wu, and Z. Gu, "Antibacterial hydroxyapatite / chitosan complex coatings with superior osteoblastic cell response," *Mater. Lett.*, vol. 65, no. 6, pp. 974–977, 2011.
- [162] R. A. A. Muzzarelli, G. Biagini, A. DeBenedittis, P. Mengucci, G. Majni, and G. Tosi, "Chitosan-oxychitin coatings for prosthetic materials," *Carbohydr. Polym.*, vol. 45, no. 1, pp. 35–41, 2001.
- [163] a a White, S. M. Best, and I. a Kinloch, "Hydroxyapatite-carbon nanotube composites for biomedical applications: A review," *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, vol. 4, pp. 1–13, 2007.
- [164] L. E. Bertassoni and P. G. Coelho, *Engineering mineralized and load bearing tissues*. .
- [165] A. Abarrategi *et al.*, "Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes," *Biomaterials*, vol. 29, no. 1, pp. 94–102, 2008.
- [166] K. Yang, M. Gu, Y. Guo, X. Pan, and G. Mu, "Effects of carbon nanotube functionalization on the mechanical and thermal properties of epoxy composites," *Carbon N. Y.*, vol. 47, no. 7, pp. 1723–1737, 2009.
- [167] L. Stobinski *et al.*, "Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods," *J. Alloys Compd.*, vol. 501, no. 1, pp. 77–84, 2010.
- [168] A. G. Osorio, I. C. L. Silveira, V. L. Bueno, and C. P. Bergmann, "H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>/HCl-Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 5 PART 1, pp. 2485–2489, 2008.
- [169] Y. P. Sun, K. Fu, Y. Lin, and W. Huang, "Functionalized Carbon Nanotubes: Properties and Applications," *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, no. 12, pp. 1096–1104, 2002.
- [170] M. D. Luque de Castro and F. Priego-Capote, "Soxhlet extraction: Past and present panacea," *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 16, pp. 2383–2389, Apr. 2010.
- [171] R. Rocha *et al.*, "Tuning CNT Properties for Metal-Free Environmental Catalytic

- Applications," *C*, vol. 2, no. 3, p. 17, Jun. 2016.
- [172] D. G. Zarate-Triviño *et al.*, "The effect of CNT functionalization on electrical and relaxation phenomena in MWCNT/chitosan composites," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 155, pp. 252–261, 2015.
- [173] W. C. Oliver and G. M. Pharr, "An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments," *J. Mater. Res.*, vol. 7, no. 6, pp. 1564–1583, Jun. 1992.
- [174] S. Kumar-Krishnan *et al.*, "Novel gigahertz frequency dielectric relaxations in chitosan films," *Soft Matter*, vol. 10, no. 43, pp. 8673–84, Nov. 2014.
- [175] A. Nogales, T. A. Ezquerro, D. R. Rueda, F. Martinez, and J. Retuert, "Influence of water on the dielectric behaviour of chitosan films," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 275, no. 5, pp. 419–425, May 1997.
- [176] S. N. Danilchenko, "Chitosan–hydroxyapatite composite biomaterials made by a one step co-precipitation method: preparation, characterization and in vivo tests," *J. Biol. Phys. Chem.*, vol. 9, no. 3, pp. 119–126, Sep. 2009.
- [177] F. Bakan, O. Laçin, and H. Sarac, "A novel low temperature sol–gel synthesis process for thermally stable nano crystalline hydroxyapatite," *Powder Technol.*, vol. 233, pp. 295–302, Jan. 2013.
- [178] C. E. Tanase, M. I. Popa, and L. Verestiuc, "Chitosan-Hydroxyapatite Composite Obtained by Biomimetic Method as New Bone Substitute," in *2009 Advanced Technologies for Enhanced Quality of Life*, 2009, pp. 42–46.
- [179] J. B. González-Campos, E. Prokhorov, G. Luna-Bárceñas, A. Fonseca-García, and I. C. Sanchez, "Dielectric relaxations of chitosan: The effect of water on the  $\alpha$ -relaxation and the glass transition temperature," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 47, no. 22, pp. 2259–2271, Nov. 2009.
- [180] C. Wu, M. Chen, T. Zheng, and X. Yang, "Effect of surface roughness on the initial response of MC3T3-E1 cells cultured on polished titanium alloy," 2015.
- [181] A. Zareidoost, M. Yousefpour, B. Ghaseme, and A. Amanzadeh, "The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, no. 6, pp. 1479–88, Jun. 2012.
- [182] L. L. Hench and J. M. Polak, "Third-Generation Biomedical Materials," *Science (80- .)*, vol. 295, no. 5557, pp. 1014–1017, Feb. 2002.
- [183] C. Muzzarelli and R. A. A. Muzzarelli, "Natural and artificial chitosan-inorganic composites," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 92, no. 2, pp. 89–94, Nov. 2002.
- [184] A. Z. Zakaria and K. Shelesh-Nezhad, "The Effects of Interphase and Interface Characteristics on the Tensile Behaviour of POM/CaCO<sub>3</sub> Nanocomposites," *Nanomater. Nanotechnol.*, vol. 4, p. 17, Sep. 2014.
- [185] J. Nunthanid *et al.*, "Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets," *J. Control. Release*, vol. 99, no. 1, pp. 15–26, Sep. 2004.

- [186] E. A. Mezina, I. M. Lipatova, and N. V. Losev, "Effect of mechanical activation on rheological and film-forming properties of suspensions of barium sulfate in chitosan solutions," *Russ. J. Appl. Chem.*, vol. 84, no. 3, pp. 486–490, Mar. 2011.
- [187] G. Eddy Jai Poinern, R. Krishna Brundavanam, X. Thi Le, and D. Fawcett, "The Mechanical Properties of a Porous Ceramic Derived from a 30 nm Sized Particle Based Powder of Hydroxyapatite for Potential Hard Tissue Engineering Applications," *Am. J. Biomed. Eng.*, vol. 2, no. 6, pp. 278–286, Jan. 2013.
- [188] N. Monmaturapoj, "Nano-size Hydroxyapatite Powders Preparation by Wet-Chemical Precipitation Route," 2008.
- [189] P. Barber *et al.*, "Polymer Composite and Nanocomposite Dielectric Materials for Pulse Power Energy Storage," *Materials (Basel)*, vol. 2, no. 4, pp. 1697–1733, Oct. 2009.
- [190] X. Zeng, S. Yu, R. Sun, and R. Du, "Microstructure, thermal and dielectric properties of homogeneous bismaleimide-triazine/barium titanate nanocomposite films," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 131, no. 1–2, pp. 387–392, Dec. 2011.
- [191] G. Singh, H. Bhunia, A. Rajor, and V. Choudhary, "Thermal properties and degradation characteristics of polylactide, linear low density polyethylene, and their blends," *Polym. Bull.*, vol. 66, no. 7, pp. 939–953, Apr. 2011.
- [192] I. Yamaguchi *et al.*, "Preparation and microstructure analysis of chitosan / hydroxyapatite nanocomposites," 2000.
- [193] I. Yamaguchi, S. Iizuka, A. Osaka, H. Monma, and J. Tanaka, "The effect of citric acid addition on chitosan/hydroxyapatite composites," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 214, no. 1–3, pp. 111–118, 2003.
- [194] H. R. Le, S. Qu, R. E. Mackay, and R. Rothwell, "Fabrication and mechanical properties of chitosan composite membrane containing hydroxyapatite particles," *J. Adv. Ceram.*, vol. 1, no. 1, pp. 66–71, 2012.
- [195] M. Lau, K. Lau, Y. Yao Yeo, C. Au Yeung, and J. Lee, "Measurement of Bovine Bone Properties through Surface Indentation Technique," *Mater. Manuf. Process.*, vol. 25, no. 5, pp. 324–328, May 2010.
- [196] D. Carnelli, R. Lucchini, M. Ponzoni, R. Contro, and P. Vena, "Nanoindentation testing and finite element simulations of cortical bone allowing for anisotropic elastic and inelastic mechanical response," *J. Biomech.*, vol. 44, no. 10, pp. 1852–1858, Jul. 2011.
- [197] X. Chen, K. E. Gonsalves, G.-M. Chow, and T. D. Xiao, "Homogeneous dispersion of nanostructured aluminum nitride in a polyimide matrix," *Adv. Mater.*, vol. 6, no. 6, pp. 481–484, Jun. 1994.
- [198] B. S. Fralick, E. P. Gatzke, and S. C. Baxter, "Three-dimensional evolution of mechanical percolation in nanocomposites with random microstructures," *Probabilistic Eng. Mech.*, vol. 30, pp. 1–8, 2012.

- [199] B. S. Fralick, "Three-Dimensional Evolution of Mechanical Percolation in Nanocomposites with Random Microstructures," 2013.
- [200] C. Tang *et al.*, "Largely improved tensile properties of chitosan film via unique synergistic reinforcing effect of carbon nanotube and clay.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 13, pp. 3876–81, Apr. 2008.
- [201] M. O. Mendoza, E. M. V. Acosta, E. Prokhorov, G. L. Barcenas, and S. K. Krishnan, "Percolation Phenomena In Polymer Nanocomposites," *Adv. Mater. Lett.*, vol. 7, no. 5, pp. 353–359, 2016.
- [202] P. Debye and P. Scherrer, "Interferenzen an regellos orientierten Teilchen im Röntgenlicht. I.," *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Math. Klasse*, vol. 1916, pp. 1–15.
- [203] S. Osswald, M. Havel, and Y. Gogotsi, "Monitoring oxidation of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 38, no. 6, pp. 728–736, Jun. 2007.
- [204] M. A. Atieh, O. Y. Bakather, B. Al-Tawbini, A. A. Bukhari, F. A. Abuilaiwi, and M. B. Fettouhi, "Effect of carboxylic functional group functionalized on carbon nanotubes surface on the removal of lead from water," *Bioinorg. Chem. Appl.*, vol. 2010, 2010.
- [205] S. Sahebian, S. M. Zebarjad, J. vahdati Khaki, and A. Lazzeri, "A study on the dependence of structure of multi-walled carbon nanotubes on acid treatment," *J. Nanostructure Chem.*, vol. 5, no. 3, pp. 287–293, Sep. 2015.
- [206] X. Cao, H. Dong, C. M. Li, and L. A. Lucia, "The enhanced mechanical properties of a covalently bound chitosan-multiwalled carbon nanotube nanocomposite," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 113, no. 1, pp. 466–472, Jul. 2009.
- [207] S. Despond, E. Espuche, N. Cartier, and A. Domard, "Hydration mechanism of polysaccharides: A comparative study," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 43, no. 1, pp. 48–58, Jan. 2005.
- [208] K. Ogawa, T. Yui, and M. Miya, "Dependence on the Preparation Procedure of the Polymorphism and Crystallinity of Chitosan Membranes.," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 56, no. 6, pp. 858–62, Jan. 1992.
- [209] S. Kirkpatrick, "Percolation and Conduction," *Rev. Mod. Phys.*, vol. 45, no. 4, pp. 574–588, 1973.
- [210] A. Heilmann, *Polymer Films with Embedded Metal Nanoparticles*. Springer Berlin Heidelberg, 2003.
- [211] K. Y. Yan, Q. Z. Xue, Q. B. Zheng, and L. Z. Hao, "The interface effect of the effective electrical conductivity of carbon nanotube composites," *Nanotechnology*, vol. 18, no. 25, Jun. 2007.
- [212] J. Z. Kovacs, B. S. Velagala, K. Schulte, and W. Bauhofer, "Two percolation thresholds in carbon nanotube epoxy composites," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 67, no. 5, pp. 922–928, Apr. 2007.

- [213] L. Guadagno *et al.*, "Effect of functionalization on the thermo-mechanical and electrical behavior of multi-wall carbon nanotube/epoxy composites," *Carbon N. Y.*, vol. 49, no. 6, pp. 1919–1930, May 2011.
- [214] N. Nikfar, Y. Zare, and K. Y. Rhee, "Dependence of mechanical performances of polymer/carbon nanotubes nanocomposites on percolation threshold," *Phys. B Condens. Matter*, vol. 533, pp. 69–75, Mar. 2018.
- [215] Y. Zare and K. Y. Rhee, "Accounting the reinforcing efficiency and percolating role of interphase regions in tensile modulus of polymer/CNT nanocomposites," *Eur. Polym. J.*, vol. 87, pp. 389–397, Feb. 2017.
- [216] E. Zawadzak *et al.*, "Polyurethane foams electrophoretically coated with carbon nanotubes for tissue engineering scaffolds," *Biomed. Mater.*, vol. 4, no. 1, p. 015008, Feb. 2009.
- [217] W. Wang *et al.*, "Carbon nanotubes/hydroxyapatite nanocomposites fabricated by spark plasma sintering for bonegraft applications," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 262, pp. 194–199, Dec. 2012.
- [218] D. D. Deligianni, N. D. Katsala, P. G. Koutsoukos, and Y. F. Missirlis, "Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength.," *Biomaterials*, vol. 22, no. 1, pp. 87–96, Jan. 2001.
- [219] C. Liu, J. Zhang, E. Yifeng, J. Yue, L. Chen, and D. Li, "One-pot synthesis of graphene–chitosan nanocomposite modified carbon paste electrode for selective determination of dopamine," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 17, no. 4, pp. 183–188, Jul. 2014.
- [220] H.-L. Guo, X.-F. Wang, Q.-Y. Qian, F.-B. Wang, and X.-H. Xia, "A Green Approach to the Synthesis of Graphene Nanosheets," *ACS Nano*, vol. 3, no. 9, pp. 2653–2659, Sep. 2009.
- [221] S. Y. Toh, K. S. Loh, S. K. Kamarudin, and W. R. W. Daud, "Graphene production via electrochemical reduction of graphene oxide: Synthesis and characterisation," *Chem. Eng. J.*, vol. 251, pp. 422–434, Sep. 2014.
- [222] E. De Giglio, L. Sabbatini, S. Colucci, and G. Zambonin, "Synthesis, analytical characterization, and osteoblast adhesion properties on RGD-grafted polypyrrole coatings on titanium substrates," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 11, no. 10, pp. 1073–1083, Jan. 2000.
- [223] C. Mao *et al.*, "Various approaches to modify biomaterial surfaces for improving hemocompatibility," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 110, no. 1–2, pp. 5–17, Jun. 2004.
- [224] M. S. P. Shaffer and A. H. Windle, "Fabrication and characterization of carbon nanotube/poly(vinyl alcohol) composites," *Adv. Mater.*, vol. 11, no. 11, pp. 937–941, 1999.

- [230] A. Toffey and W. G. Glasser, "Chitin Derivatives III Formation of Amidized Homologs of Chitosan," *Cellulose*, vol. 8, no. 1, pp. 35–47, 2001.
- [231] M. T. Viciosa, M. Dionísio, and J. F. Mano, "Dielectric characterization of neutralized and nonneutralized chitosan upon drying," *Biopolymers*, vol. 81, no. 3, pp. 149–159, Feb. 2006.
- [232] W. J. Jackson and J. R. Caldwell, "Antiplasticization. II. Characteristics of antiplasticizers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 11, no. 2, pp. 211–226, Feb. 1967.
- [233] T. Kuila, S. Bose, P. Khanra, N. H. Kim, K. Y. Rhee, and J. H. Lee, "Characterization and properties of in situ emulsion polymerized poly(methyl methacrylate)/graphene nanocomposites," *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.*, vol. 42, no. 11, pp. 1856–1861, Nov. 2011.