

Análisis de bioactividad y biocompatibilidad del recubrimiento de CaCO_3 obtenido a partir del cemento Portland

M. C. Carrillo-Herrera¹, K. R. Ríos-Rojas¹, M. V. Armendáriz-Tanaka¹, P. Pérez-Rodríguez², J. L. Sandoval-Granados², J. F. Hernández-Paz¹, C. A. Rodríguez-González¹, I. Olivas-Armendáriz^{1*}

¹ Instituto de Ingeniería y Tecnología, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, México

² Instituto de Arquitectura, Diseño y Arte, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

*iolivas@uacj.mx

Resumen

Los biomateriales base calcio promueven la viabilidad celular, por lo que el cemento Portland al contener carbonatos de calcio en su composición, además de fosfato y calcio, podría ser una alternativa para imitar la matriz extracelular en la regeneración de tejido óseo. Esta investigación se basa en la obtención de recubrimientos de CaCO_3 a partir del cemento Portland, obtenidos de acuerdo a la solicitud de patente MX/2016/015445. El material obtenido se caracterizó por SEM, EDS, FTIR, DRX y se determinó su porosidad y resistencia a la compresión. Los análisis de bioactividad y biocompatibilidad indican potenciales aplicaciones de este material en ingeniería tisular.

Palabras clave: bioactividad, biocompatibilidad, carbonato de calcio, cemento Portland.

1. Introducción

En los últimos años, se han realizado diversos estudios enfocados en el uso de materiales que posean características de osteoinducción, osteointegración y osteoconducción similares al hueso. Entre estos materiales se encuentran la obtención de carbonato de calcio a partir de cemento Portland [1]. Como ya es sabido el carbonato de calcio (CaCO_3) es uno de los minerales más abundantes en la naturaleza, y su principal característica es que ha sido utilizado en cirugías óseas. Como lo son las intervenciones para injertos o sustitutos óseos. El CaCO_3 se encuentra en tres formas cristalinas que son calcita, argonita y vaterita donde se ha comprobado que estando en forma de calcita y argonita es un material biocompatible y osteoconductor [2].

Con el fin de entender los cambios que se dan en los minerales anhidros del cemento, se ha investigado la evolución mineralógica del cemento Portland durante el proceso de hidratación, obteniendo que la hidratación ocurre de manera diferente en cada mineral ya sea por la velocidad de reacción, o por los cambios cristalinos experimentados por éstos durante la transformación de fase anhidra a hidratada [3]. Además de que, en función de la dosificación del aditivo plastificante, es posible conocer el tiempo en el que se produce la precipitación masiva de productos y los tiempos de fraguado, y que el calor desprendido como consecuencia de las reacciones, asociadas a esta etapa, es independiente de la naturaleza y dosificación del aditivo, poniendo de manifiesto que las reacciones que se producen son las mismas [4].

Por otra parte, en diferentes investigaciones se ha evaluado la biocompatibilidad del cemento Portland, las cuales han obtenido que la producción de CaCO_3 en el cemento Portland durante su hidratación, puede aumentar la biocompatibilidad y bioactividad de este material, una vez que fomenta la adherencia y proliferación celular. Encontrando evidencias que muestran las capacidades del CaCO_3 de actuar como un tampón en solución, manteniendo el pH del medio dentro de un rango fisiológico [5]. Mientras que Obando y colaboradores encontraron que materiales que en su composición contenían cemento Portland tenían capacidad de sellado apical y propiedades antimicrobianas [6]. En el 2016, Pérez et al., solicitaron la patente ante el IMPI para la obtención de un recubrimiento de CaCO_3 a partir de cemento Portland, por lo que esta investigación se enfoca en la síntesis y caracterización del recubrimiento de CaCO_3 obtenida a partir de cemento Portland para una posible aplicación como biomaterial para la regeneración de tejido óseo.

2. Metodología

2.1 Preparación y caracterización de las muestras.

Para la preparación de las muestras se utilizó cemento Portland gris tipo I y agua destilada en proporción 2:1 (%w/w), se mezcló el cemento Portland con el agua agitando constantemente hasta obtener una composición homogénea (sin grumos). Se dejó secar en una incubadora a 37 °C con una humedad relativa del 95% durante 24 horas.

Las muestras se analizaron por microscopía electrónica de barrido (JEOL JSM-7000F), acoplado a un sistema de espectrometría por energía dispersiva de rayos X. Los espectros FTIR de las muestras se determinaron usando un modo de transmisión en un espectrómetro IR (Nicolet 6700, Thermo Scientific). El análisis de las fases presentes de las muestras se realizó utilizando un difractómetro de polvo Panalytical XRD modelo X'pert con radiación de un filamento de cobre con λ de 1.5406 Å. El análisis de comprensión de las muestras de cemento Portland y el recubrimiento brillante de CaCO_3 se llevó a cabo con la máquina universal de ensayos Syntech 20D, a una velocidad de 254 mm/min.

2.2 Análisis de bioactividad de las muestras.

Para el análisis de bioactividad, se preparó una solución del fluido fisiológico simulado (SBF) 1.5X con concentraciones iónicas similares a las encontradas en el cuerpo humano, ajustando el pH a 7.4. Se colocaron muestras del cemento Portland y el recubrimiento de CaCO_3 en tubos de ensayo, se les agregó 5mL de la SBF y fueron incubadas a 37 °C por diferentes periodos de tiempo. Una vez concluido el periodo de tiempo las muestras fueron caracterizadas por FT-IR, SEM y DRX.

2.3 Análisis de biocompatibilidad de las muestras.

Las muestras estériles y desgasificadas fueron sembradas con 5000 células de osteoblastos de la línea celular MC3T3, se agregó medio α -MEM conteniendo 1% de antibiótico penicilina/estreptomina, 10% de suero fetal bovino, 3 mM de β -Glicerofosfato y 10 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico. Se incubaron las muestras a 37 °C y 5% de CO_2 por diferentes periodos de tiempo. A cada muestra y control (células sin exponerse al material) se les retiró el medio en el que permanecieron durante su incubación, se les añadió 200 μl de α -MEM y 50 μl de la solución MTT (con una concentración de 5 mg / mL en PBS). Posteriormente, se incubó a 37 °C por un periodo de 2 horas. Al finalizar este tiempo, se extrajo el sobrenadante y se agregaron 250 μl de dimetil sulfóxido a cada muestra, se homogenizó la solución y

se prosiguió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm con ayuda de un espectrofotómetro de microplacas.

Para el análisis de diferenciación celular se disolvieron dos pastillas de 5 mg cada una, del sustrato p-nitrofenil fosfato (P-NNP) en 10 ml de la solución tampón de dietanolamina. Una vez terminado el tiempo de incubación los materiales sembrados y los controles se sometieron a tres ciclos de choque térmico, mediante una congelación -80°C y una descongelación a 37°C , esto para conseguir la lisis celular. Se tomaron $100\ \mu\text{L}$ de dicha muestra y se agregó $100\ \mu\text{L}$ de la solución de P-NPP, fueron incubados a 37°C por 30 minutos, se determinó la producción de p-nitrofenol P-NP a una absorbancia de 405 nm en el espectrofotómetro de microplacas. Para la tinción con los fluoróforos, se preparó una solución de $10\ \mu\text{g}$ de DAPI en 100 ml de PBS 1X y se agregó en cada pocillo $200\ \mu\text{l}$, así mismo, se añadió $100\ \mu\text{l}$ de solución Calceína AM. Finalmente, se incubó durante 1 hora, se observó mediante microscopía de fluorescencia (Axio Vert.A1, Carl Zeiss), utilizando el software ZEN blue para capturar las imágenes. Para el análisis de mineralización de los cultivos de osteoblastos en las muestras se realizó una fijación de células con una solución al 3% de glutaraldehído y deshidratación de las mismas (secuencias de etanol al 70, 80, 90, 95 y 100%) para ser analizadas a través de FTIR y DRX.

3. Resultados y Discusión

La Fig. 1 muestra imágenes de las superficies del material obtenido a partir del cemento Portland. En ellas podemos observar que ambas tienen un color blanco, sin embargo, la superficie del inciso a) podemos ver una superficie blanca con acabado superficial brillante, la cual nombraremos como recubrimiento brillante de CaCO_3 , mientras que la superficie del inciso b) es una superficie con acabado opaco y que nombraremos como cemento Portland.

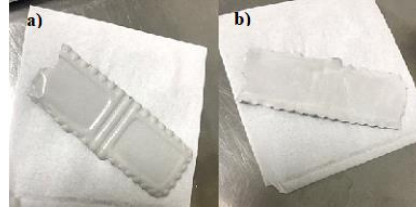


Fig. 1. a) muestra de la superficie del recubrimiento brillante de CaCO_3 y b) cemento Portland.

La Fig. 2 (a, b) podemos observar los espectros de difracción del recubrimiento CaCO_3 y cemento Portland. En ellos podemos observar la presencia de las fases típicas del cemento como lo es el CaCO_3 , alita o silicato tricálcico (C_3S), belita o silicato bicálcico (C_2S) y Aluminato tricálcico (C_3A) [7-8]. Sin embargo, en la Fig. 2a del recubrimiento brillante, presenta un pico adicional en el ángulo 2θ entre 17 y 20, el cual puede ser atribuido a la presencia de portlandita derivado de la hidratación del silicato bicálcico y del silicato tricálcico del cemento Portland [3, 9]. Mientras que en el cemento Portland se observa la aparición del pico característico del CaCO_3 identificado con la fase polimórfica calcita en $2\theta = 29.4$. Lo que estaría indicando que parte del calcio del CH pudo haberse consumido en la formación de CaCO_3 por acción del CO_2 del aire sobre el sistema. Al mismo tiempo podría aparecer en otras formas por ejemplo como vaterita ($m\text{-CaCO}_3$), en fases de aluminatos de calcio hidratados y posiblemente en la estructura de la tobermorita C-S-H [3]. En ambos espectros de difracción se observan los picos que identifican al CaCO_3 , donde se identifica la vaterita y calcita, esta última como fase mayoritaria tanto en el recubrimiento brillante CaCO_3 como en la superficie de cemento Portland [10].

En la Fig. 2 (c, d) se puede observar imágenes de SEM del recubrimiento brillante y la superficie de cemento Portland. En ellas se aprecia el carácter nanométrico de las mismas, observándose además un

cierto acumulamiento entre los granos. De acuerdo a otros investigadores [3] sucede que los granos de aluminato tricálcico (C_3A), a medida que se hidratan y se van convirtiendo en tobermorita, se van uniendo los unos a los otros creando de esta forma una matriz continua y en forma de capas, a los que están unidos difícilmente se les diferencia el contorno de sus lados, mientras que este límite es más evidente en los cristales aislados como se observa en la Fig. 2 inciso d. También se aprecia un cambio de grises en la estructura debido a que existe una diferencia de composición química [9]. Mientras que la Fig. 2 (e, f) muestra el EDS del recubrimiento brillante y cemento Portland donde se observa la presencia de Ca, C y O como elementos principales del recubrimiento, confirmando la presencia de $CaCO_3$, fase típica de este tipo de material. Además de otros elementos que conforman el cemento Portland como por ejemplo Si, Al y K.

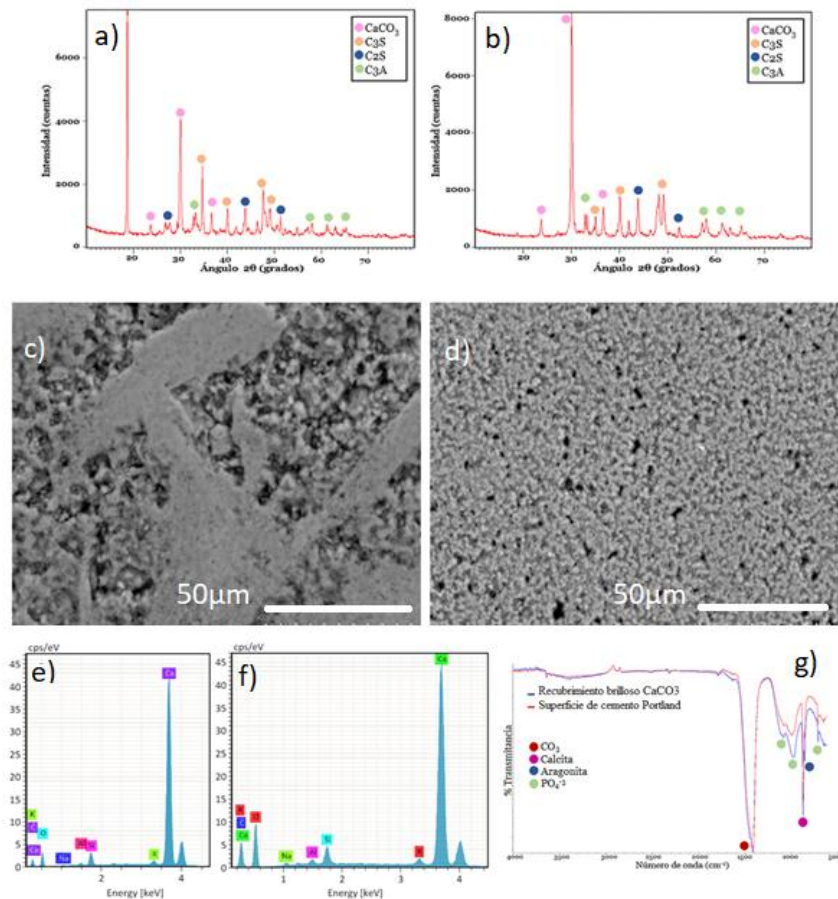


Fig. 2. DRX de la superficie del a) recubrimiento de $CaCO_3$ y b) cemento Portland; Imágenes de SEM de c) recubrimiento brillante $CaCO_3$ y d) superficie de cemento Portland; EDS de la superficie del e) recubrimiento de $CaCO_3$ y f) cemento Portland; FTIR del recubrimiento de $CaCO_3$ y cemento Portland (g).

De acuerdo a la medición de la distribución del tamaño de poro del recubrimiento brillante y superficie de cemento portland, se obtuvieron tamaños promedio de poro de $10.34 \mu m \pm 3.29 \mu m$ y de $5.80 \mu m \pm 3.47 \mu m$, respectivamente. En estos resultados se puede observar un incremento en el tamaño

de poro del recubrimiento brillante. El tamaño de poro juega un papel importante en el diseño de implantes, puesto que según sea su tamaño, la regeneración del hueso será directamente afectada, ya que el tamaño de poro de 5 μm permite una nueva vascularización, poros entre 15 μm y 40 μm permiten el crecimiento de osteoblastos y la interconectividad se da a través de poros con tamaños que van de 10 μm a 80 μm . La porosidad del hueso cortical oscila entre 1 μm y 100 μm , y en hueso trabecular entre 150 μm y 400 μm [11].

Los espectros de FTIR del recubrimiento brillante y cemento Portland se muestran en la Fig. 2 g. De 600 a 1500 cm^{-1} se encuentra la zona de la huella dactilar donde se origina la flexión de enlaces CH, CO, CN y CC. Se observa una banda de adsorción a los 1426 cm^{-1} y otra a los 700 cm^{-1} , las cuales determinan la unión del carbono y oxígeno lo que indica la presencia del grupo funcional CO_3^{2-} [12]. Se observa otra banda prominente en el rango de 1000 cm^{-1} atribuida a la torsión fuera del plano del dímero carboxilo [13]. A los 605, 900 y 1089 cm^{-1} se observan bandas asignadas al fosfato de calcio (PO_4^{3-}), mientras que en la zona entre 850 y 880 cm^{-1} se observan dos bandas, que, de acuerdo a López, se atribuyen a fases del CaCO_3 , la banda de 875 cm^{-1} asignada a la fase calcita y la banda de 855 cm^{-1} a la fase aragonita [14].

En cuanto a las propiedades mecánicas, el material debe tener al menos la misma resistencia que el hueso, por lo que un equilibrio entre porosidad y resistencia mecánica se hace absolutamente imprescindible. Los valores de los ensayos de resistencia a la compresión fueron calculados a partir de las curvas de esfuerzo-deformación. Obteniendo un máximo esfuerzo de 15.98 ± 2.5 MPa, un módulo de Young de 3.48 ± 0.35 MPa y un porcentaje de elongación de 0.68 ± 0.13 . Los resultados obtenidos muestran que están por debajo de los requeridos por la norma ISO 5833. Sin embargo, materiales con baja resistencia podrían ser utilizados como relleno de hueso trabecular o hueso esponjoso, dado que la resistencia a compresión de este tipo de tejido oscila entre los 3 MPa y 20 MPa y las cifras para el hueso esponjoso oscilan entre 1 MPa y 7 MPa [15].

La Fig. 3 muestra los resultados del análisis de bioactividad del material. Los incisos a, b, c, d, e y f muestran imágenes del material expuesto a SBF de la primera semana a la sexta, respectivamente. En ellas se puede observar la deposición de la capa de apatita biológica sobre la superficie del material desde la primera semana y como se fue depositando hasta observar una capa uniforme aglomerada en forma de coliflor. El EDS de la primera semana de exponer al material a la SBF (Fig. 3g) muestra la presencia de los mismos elementos antes de ser expuesto (Fig. 3a), así como P, Mg, y Na indicando la presencia de la apatita biológica. Fig. 3h, derivada de la resta de los espectros infrarrojos del material expuesto a la SBF durante las diferentes con el espectro infrarrojo del material antes de ser expuesto, nos muestra picos de absorción atribuidos a los grupos carbonatos a los 876, 1134, 1429 y 1472 cm^{-1} , mientras que a los 1033, 962 y 566 cm^{-1} aparecen los grupos fosfato [16]. Por otro lado, El DRX (Fig. 3i), obtenidos para verificar la presencia de apatita biológica en la superficie de acuerdo al standard card (01-074-0565), observa (durante las diferentes semanas) las fases típicas obtenidas del material sin exponerse además de la presencia de nuevas fases de la hidroxiapatita y la Monetita.

La Fig. 4 muestra los resultados de los análisis de proliferación, diferenciación y calcificación de los materiales sembrados con células osteoblasticas. En el inciso a) podemos observar la proliferación celular de los osteoblastos, no observándose diferencias significativas (en los diferentes periodos de tiempo) entre el control y material, resultados que sugieren que la superficie de carbonato de calcio, obtenida a partir de cemento Portland, no afecta la adhesión y viabilidad celular de los osteoblastos. La Fig. 4b muestra los resultados de la actividad de la fosfatasa alcalina durante el periodo de estudio y en ella se puede observar cómo se incrementa a medida que avanzaban los días de cultivo celular, lo cual corrobora lo obtenido por Olivas y colaboradores donde encontraron una reducida actividad de la fosfatasa alcalina durante los 3 primeros días de exposición y la máxima actividad después del décimo día. Encontrándose diferencias significativas entre el control y el material durante los diferentes periodos de estudio, Resultados que sugieren que el material podría promover una diferenciación celular más rápida que la observada en el grupo control.

La Fig. 4c muestra imágenes de SEM y EDS de los materiales cultivados, en ella se pueden apreciar células con morfología poliédrica y textura rugosa granular aglomeradas a través de la superficie del material, siendo esta morfología típica de osteoblastos activos, así como la interacción célula-material y como las células pudieron adherirse, extenderse y propagarse sobre la superficie del material. La composición química de los materiales cultivados fue analizada mediante el SEM por la técnica de espectroscopia de energía dispersa (EDS, por sus siglas en inglés), observando la presencia de componentes inorgánicos del hueso como: Ca, P, Mg y sodio. Por otra parte, el inciso c) muestra el difractograma de los materiales cultivados a diferentes periodos, en ellos podemos encontrar picos característicos de la hidroxiapatita producidos en $2\theta=26^\circ, 32^\circ, 33^\circ, 34^\circ, 39.5^\circ, 44^\circ$ y 49° [17], así como el pico característico de fosfato de calcio fueron visualizados en $2\theta = 29.8^\circ$. Estos resultados son respaldados por otros investigadores quienes refieren que la fase sólida inicial del fosfato de calcio formado en el hueso amorfo, es reemplazado por apatita en estructura cristalina y posteriormente, se transforma en apatita cristalina madura. En base a esto, la presencia de fosfato de calcio amorfo se debe a las células osteoblásticas que todavía estaban dirigiendo el proceso de mineralización de la formación ósea [17]. Además, los espectros FTIR fundamentan el proceso de biomineralización del material debido a que se encontraron los picos característicos de fosfatos y carbonatos. La Fig. 4e muestra las bandas de absorción correspondientes a los picos de fosfato de calcio PO_4^{3-} ($1089, 960$ y 605 cm^{-1}) y carbonato de calcio ($1458, 1462$ y 912 cm^{-1}), los cuales concordaron con Olivas y colaboradores [11]. Asimismo, se muestran bandas características de Amida I (1658 cm^{-1}), grupo hidroxilo (1476 cm^{-1}) y grupo Amino (1932 cm^{-1}), esto sugiere la presencia de glicosaminoglicanos, proteoglicanos y colágeno, entre otras proteínas los cuales están asociados a la organización de la matriz extracelular secretada por las células [11].

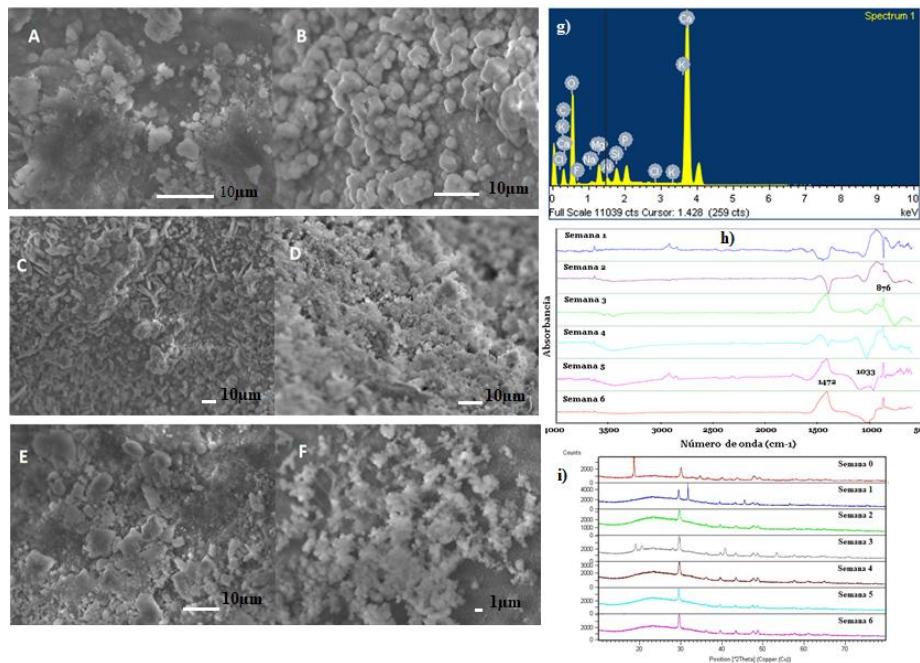


Fig. 3. Imágenes de SEM, EDS, espectros infrarrojos y DRX del material al ser expuesto a la SBF: a) primera semana, b) segunda semana, c) tercera semana, d) cuarta semana, e) quinta semana, f) sexta semana de exposición, g) EDS de la primera semana de exposición, h) resta de los espectros infrarrojos de las diferentes semanas de exposición con el espectro infrarrojo del material sin exponerse y i) DRX de las muestras durante las 6 semanas de exposición.

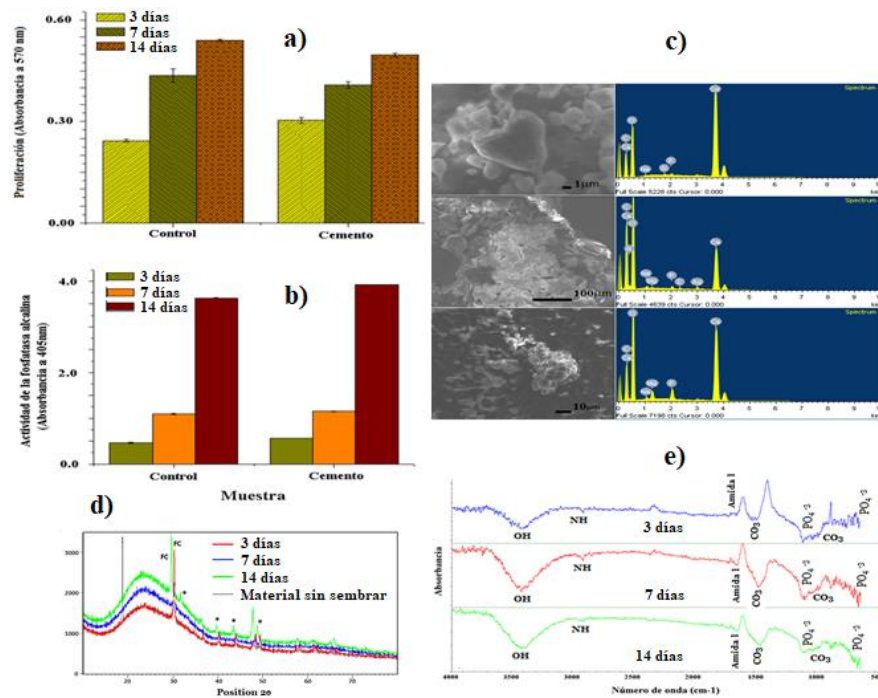


Fig. 4. a) Proliferación celular, b) Diferenciación celular, c) Imágenes de SEM y EDS, d) DRX (FC: fosfatos de calcio, *: hidroxipatita) y e) espectros infrarrojos a los 3, 7 y 14 días de cultivo.

Conclusiones

Se preparó un nuevo biomaterial formado por cemento Portland con recubrimiento de carbonato de calcio mediante la hidratación del cemento. Este facilita la proliferación y formación de nódulos mineralizados de los osteoblastos de la línea celular MC3T3-1, logrando inducir la diferenciación celular de los osteoblastos por sus características estructurales y químicas favorables. Por medio del ensayo MTT se confirma que la proliferación aumenta gradualmente conforme pasan los días de investigación evidenciando la biocompatibilidad del material. La morfología de los osteoblastos cultivados no presenta ninguna diferencia con respecto al control, además, estas células lograron adherirse y propagarse sobre la superficie del cemento formando cristales de hidroxipatita en la superficie del soporte confirmando la bioactividad in vitro induciendo la hidroxipatita. La obtención del recubrimiento de carbonato de calcio, constituye un biomaterial prometedor para desarrollar la próxima generación de andamios en la ingeniería tisular.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés para este trabajo.

Referencias

- [1] I. C. Quintana, E. Llamosas and R. M. de la Luz, "Evaluación de la biocompatibilidad del cemento Portland implantado en tejido conectivo subepitelial de ratas," *Revista de la ADM.*, vol. 60, no. 2, pp. 45-51, 2003.
- [2] A. Tatay Díaz, J.M. Pérez Sánchez, J. Ribera Zabalbeascoa, J.A. Cordero Fernández, M. Mella Sousa. "Sustitutos óseos," *Revista de la SATO.*, Vol. 26, pp. 2-13, 2008.
- [3] M. A. Giraldo and J. I. Tobón, "Evolución mineralógica del cemento Portland durante el proceso de hidratación," *Dyna*, vol. 73, no. 148, pp. 69-82, 2006.
- [4] F. Puertas and T. Vázquez, "Hidratación inicial del cemento. Efecto de aditivos superplastificantes," *Mater. de Construcción*, vol. 51, no. 262, pp. 53-61, 2001.
- [5] D. G. Bello, M. L. Hernández and N. B. Guerra, "Determinación de propiedades mecánicas y temperatura máxima de polimerización de cementos óseos acrílicos modificados con micro y nanopartículas de hidroxapatita," *Rev. LatinAm Metal Mater.*, pp. 91-98, 2010.
- [6] A. F. Ledesma, F. H. Santana, L. B. Galindo, J. A. Alatorre, J. L. Sil, "Análisis químico elemental y de fases por medio de PIXE, DSC, TGA y DRX en MTA Angelus® y un cemento Portland blanco," *Rev Odont Mex.*, vol.20, no.3, pp. 187-192, 2016.
- [7] G. A. Obando-Pereda, K. E. Torres-Chávez, H. Salas-Beltrán, and J. F. Hofling, "Análisis de la composición química, capacidad de sellado apical y propiedades antimicrobianas del MTA y del cemento Portland," *Endodoncia*, vol. 27, no. 3, pp. 111-20, 2009.
- [8] V. L. Bonavetti, V. F. Rahhal and E. F. Irassar, "Evolution of the Hydration in Cements with Additions. *Mater de construcción*," vol. 52, no. 268, pp. 57-64, 2002.
- [9] A. P. Mansur and H. S. Mansur, "Preparation and characterization of 3D porous ceramic scaffolds based on portland cement for bone tissue engineering". *En J Mater Sci: Mater Med* 20, pp. 497-505, 2009.
- [10] L. Fernández, J. Rodríguez and M. Prieto, "Interacción entre cristales de yeso y soluciones carbonatadas: cinética y transformaciones," *Macla*, vol. 9, pp. 93-94, 2008.
- [11] I. Olivas-Armendariz, E. Santos Rodríguez, S. Correa Espinoza, D. Domínguez Domínguez, I. Márquez Méndez, M. Mendoza Duarte, M. C. Chavarría Gaytán. "Evaluation of Mechanical and Thermophysical Properties of Chitosan/Poly (DL-Lactide-co-Glycolide)/Multiwalled Carbon Nanotubes for Tissue Engineering". *Am J Mater Sci.*, vol. 5(1), pp. 9-16, 2015.
- [12] L. Fernández, J. Rodríguez and M. Prieto, "Interacción entre cristales de yeso y soluciones carbonatadas: cinética y transformaciones," *Macla*, vol. 9, pp. 93-94, 2008.
- [13] D. G. Bello, M. L. Hernández and N. B. Guerra, "Determinación de propiedades mecánicas y temperatura máxima de polimerización de cementos óseos acrílicos modificados con micro y nanopartículas de hidroxapatita," *Rev latinam metal mater.*, pp. 91-98, 2010.
- [14] D.B. Trushina, T.V. Bukreeva, M.V. Kovalchuk and M.N. Antipina, "CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications." *Mater Sci Eng.*, vol. 45, pp. 644-658, 2014.
- [15] M. A. Trezza, and A. N. Scian, "Aporte de las técnicas ATD/TG y espectroscopía FT-IR al estudio de la carbonatación de la matriz cementicia," *Afinidad*, vol. 70, pp. 562, 2013.
- [16] R. V. Coronado, J. C. Rodríguez, J. C. Graciano and A. M. Richa, "Estudio de las propiedades de cementos óseos preparados con metacrilatos funcionalizados e hidroxapatita". *Rev Mex Ing Bioméd*, vol. 22(2), pp. 54-55, 2001.
- [17] S. Jaramillo-Martínez, C. Vargas-Requena, C. Rodríguez-González, A. Hernández-Santoyo, I. Olivas-Armendáriz. "Effect of extrapallial protein of *Mytilus californianus* on the process of in vitro biomineralization of chitosan scaffolds". *Heliyon*, vol. 5(8), pp. e02252, 2019.