

Materiales compuestos de quitosana e hidroxiapatita

✉ Carlos Peniche¹, Yaimara Solís¹, Natalia Davidenko^{1,2}, Raúl García³

¹Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana, UH

Ave. Universidad e/ G y Ronda, AP 6120, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba

²Department of Materials Science and Metallurgy, University of Cambridge, Cambridge CB2 3QZ, UK

³Instituto de Cerámica y Vidrio, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC

Madrid 28049, España

E-mail: peniche@reduniv.edu.cu

RESUMEN

En los últimos 20 años se observa una tendencia creciente del desarrollo y empleo de biomateriales para la reparación y regeneración del tejido óseo dañado. Las biocerámicas de fosfatos de calcio han despertado gran interés en el campo de la ortopedia debido a su similitud con el componente mineral del tejido óseo. Estas se han utilizado como gránulos en implantes pequeños que no tengan que soportar cargas, como el oído medio; en recubrimientos sobre metales que las refuercen, como los implantes dentales, los implantes porosos para estimular el crecimiento de un hueso dentro del implante, y los cementos que se implantan en estado pastoso y fraguan *in vivo*. Los inconvenientes clínicos asociados con las biocerámicas se centran fundamentalmente en la pobre resistencia mecánica y la lenta cinética de reabsorción en comparación con el tejido circundante. Es por ello que los estudios actuales están encaminados a crear nuevas formulaciones compuestas por fosfatos de calcio y biopolímeros, con vistas a evitar la migración frecuente de las partículas biocerámicas del sitio del implante, disminuir la posibilidad de daños a los tejidos blandos próximos al implante, mejorar la biodegradabilidad, las propiedades de fraguado, la resistencia mecánica y la inyectabilidad de los biomateriales. El objetivo de este artículo es ofrecer una revisión de la información actualizada sobre materiales compuestos de hidroxiapatita y quitosana como sistemas soporte del tejido óseo; mencionar los principales métodos de preparación, las propiedades físico-químicas y biológicas, y las técnicas de ingeniería de tejidos que utilizan estos materiales.

Palabras clave: composite, hidroxiapatita, quitosana, tejido óseo, ingeniería de tejido óseo

Biotecnología Aplicada 2010;27:192-201

ABSTRACT

Chitosan/hydroxyapatite-based composites. In the past 20 years, there has been a growing trend towards the development and use of biomaterials for the repairing and restoration of damaged bone tissue. The calcium phosphate bioceramics have received great attention in the field of orthopaedics because of its similarity to the mineral component of bone tissue. They have been used as granules in non-load bearing small implants, such as middle ear implants, coatings on metals such as dental implants, porous implants to stimulate bone growth within the implant, and cements, which are implanted in a paste like form and harden *in vivo*. The clinical disadvantages associated with them are primarily focused on poor mechanical strength and slow resorption kinetics as compared with the surrounding tissue. That's why current studies are aimed at creating new formulations combining calcium phosphate compounds with biopolymers, in order to avoid the frequent migration of bioceramic particles from the implant site, reducing potential damage to soft tissue in the vicinity of the implant and to improve biodegradability, curing properties, mechanical strength and injectability. The aim of this paper is to bring a review of the literature concerning chitosan-hydroxyapatite composites for bone restoration with mention to: main methods of preparation, physico-chemical and biological properties, and tissue engineering techniques using these materials.

Keywords: composite, hydroxyapatite, chitosan, bone tissue, bone tissue engineering

Introducción

En la actualidad, las afecciones óseas constituyen uno de los problemas fundamentales que enfrenta la medicina regenerativa, debido al incremento de la longevidad de la población y del número de traumas ocasionados por accidentes de diversa índole. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la osteoporosis es el segundo problema sanitario asistencial en el mundo después de las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, se ha reportado que en España cada año ocurren unas 60 000 fracturas de cadera, lo que supone la ocupación de entre el 20 y el 22% de las camas de los servicios de Cirugía ortopédica y Traumatología [1].

En Cuba, la prevalencia de la osteoporosis es bastante alta, con un inicio relativamente temprano (antes

de 65 años). Más de las 3/4 partes de los casos presentan osteoporosis moderada o severa y una frecuencia de fracturas del 19%. Las tasas de mortalidad por fractura de cadera en la población anciana debido a los efectos combinados de una caída y la osteoporosis han aumentado aceleradamente [2]. Solamente en la provincia de Matanzas se reportaron 609 fallecidos por fractura de cadera desde el año 2001 al 2007. La mortalidad ascendió hacia el final del período hasta 2% desde 1.6% al inicio del período; así como la razón entre los fallecidos por fractura de cadera y los fallecidos por accidente: desde 32.2 hasta 46.1. Además, el incremento de la tasa de mortalidad por fractura de cadera se elevó directamente proporcional con la edad y el género; la cantidad de mujeres casi duplica

1. Hardiman H. Osteoporosis: The lifelong risks. *Practice Nursing* 2006;17:328-33.

2. Ochoa F, Pereira O. Encuesta sobre osteoporosis en un área de salud. *Rev Cubana Endocrinol* 1997;8(2):135-41.

3. Rodríguez P, Fernández J, Díaz O, Garróte I, Morales JM, Achiong FJ. Fallecidos por fractura de cadera en la provincia de Matanzas. *Rev Méd Electrón* 2009; 31(5). Available in: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1684-18242009000500001-&script=sci_arttext (Consulted: October 19th, 2009).

✉ Autor de correspondencia

la de hombres (16.4 frente a 9.5) [3]. Actualmente, a la osteoporosis se le ha denominado "la epidemia silenciosa del siglo XXI", y constituye la principal causa de fracturas óseas en mujeres posmenopáusicas y en ancianos [4]. Si bien en su totalidad estas afecciones no son fatales, sí pueden afectar seriamente la calidad de vida de los pacientes al provocar cuadros de dolor crónico, incapacidad física y problemas estéticos.

Una de las soluciones a estas molestias es el empleo de sustitutos óseos, ya sea para reemplazar el tejido afectado o para favorecer su regeneración. En tales casos, el tejido óseo extraído del propio paciente, es el sustituto más comúnmente empleado, por ser el que facilita la mejor recuperación. Sin embargo, es limitada la cantidad de tejido que puede ser autotrasplantado en un paciente, lo cual además, involucra al menos una segunda intervención quirúrgica. Aunque cada uno con sus limitaciones, los materiales empleados como sustitutos del tejido óseo han sido desde hueso autógeno (matriz ósea desmineralizada), hueso bovino descalcificado (colágeno), metales (titanio, acero inoxidable, aleaciones), polímeros (polimetacrilato de metilo), poliésteres (como el poliácido láctico y el poliglicólico), cerámicos (alúmina, fosfatos de calcio como hidroxiapatita (HAp), fosfato tricálcico y octacálcico y en base silicio como biovidrios y nanoapatita dopada con silicio), implantes macroporosos de β -fosfato tricálcico (β -TCP) y compuestos de HAp, natural o sintética, con polímeros, combinados en algunos casos con sustancias biológicas para mejorar su prestación [5]. Hoy la investigación se orienta cada vez más hacia el desarrollo y diseño de nuevos materiales que estimulan la regeneración y reparación de los tejidos óseos dañados, facilitan una rápida recuperación del paciente y reducen los elevados costos quirúrgicos y de los materiales que oferta el mercado internacional.

En Cuba se ha desarrollado una hidroxiapatita de origen natural (Coralina, HAP-200), que durante más de 20 años se ha aplicado con éxito como sustituto del injerto óseo y como implante ocular integrado [6]. También se produce hidroxiapatita sintética (Apafil-G), que se ha utilizado en implantes por defectos óseos, con buenos resultados [5]. Se han desarrollado además cementos de fosfatos de calcio (CPC) a base de HAp y aditivos porogénicos.

No obstante, en los últimos años, la literatura especializada ha mostrado una fuerte tendencia hacia el desarrollo de andamiajes para ingeniería de tejidos con materiales compuestos por cerámica y polímeros. Ello se basa en que los materiales cerámicos tienen excelentes propiedades osteoinductivas; a pesar de su baja degradabilidad, baja resistencia mecánica y dificultad para su conformación a las características físicas y geométricas requeridas por el sitio o defecto óseo. A su vez, los biopolímeros presentan baja osteoinductividad, pero mejores propiedades mecánicas y de degradabilidad. De ahí que la preparación de composites de fosfatos de calcio basados en biopolímeros, permita la incorporación de propiedades favorables de ambos componentes [7].

Uno de los biopolímeros empleados con más frecuencia en la preparación de compuestos con fosfatos de calcio, es la quitosana, por su reconocida biocompatibilidad, biodegradabilidad y ausencia de toxicidad.

Por el interés que despiertan los materiales compuestos basados en este biopolímero, este artículo es una revisión de la literatura científica y de las tendencias actuales relacionadas con los composites de fosfatos de calcio, en especial, de la hidroxiapatita, basados en quitosana.

Los fosfatos de calcio

En los últimos 30 años se ha demostrado que los fosfatos de calcio son biocompatibles, bioactivos y osteoconducentes, propiedades estas que los convierten en el biomaterial por excelencia para la implantología ósea. El desarrollo de las biocerámicas basadas en fosfatos de calcio con vistas a su aplicación en la clínica, comenzó en la década de los años 70 del siglo XX, debido al fracaso de los materiales empleados hasta el momento, como el acero, las aleaciones de cobalto y el poli(metacrilato de metilo).

El estudio de las cerámicas fosfato-cálcicas se ha centrado en los compuestos del sistema terciario $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$, fundamentalmente la HAp $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ y el fosfato tricálcico $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, debido a que su elevado potencial bioactivo se ha demostrado en numerosas investigaciones [8-10].

La Coralina es un biomaterial que se obtiene a partir de corales blancos de la familia porita-poritas, abundantes en la plataforma insular cubana, y que posee una estructura tridimensional interconectada, similar a la de los huesos humanos. Se produce en forma de grandes bloques, para el relleno de cavidades; y en bloques pequeños para reemplazar fragmentos de huesos. Se ha reportado que más de 20 000 pacientes han recibido estos implantes de HAp porosa, y el resultado de osteointegración es del 97%. Solo el 3.2% de los implantes en estas especialidades se han considerado fallidos. Las causas principales de estos fracasos han estado relacionadas con sepsis en el curso posoperatorio inmediato, que han aconsejado retirar el biomaterial, recidivas de tumores, y movilidad de los implantes (deficiente osteosíntesis), entre otras; pero en ningún caso, el motivo ha sido el biomaterial de implante. Las aplicaciones de la Coralina en esta especialidad han permitido tratar y corregir defectos óseos en la región endobucal y faciales que afectan la apariencia personal, y los resultados clínicos y estéticos han sido excelentes [6].

Por su parte, el granulado cerámico de HAp sintética densa de alta pureza de Apafil, con granos de diferentes tamaños, se ha aplicado como relleno en defectos periodontales y periapicales asociados a causas patológicas o traumáticas, como relleno de cavidades quísticas, en la fijación de implantes dentales intraóseos, como relleno de cavidades en trasplantes autógenos dentarios, como relleno de cavidades alveolares, en la remodelación del reborde alveolar, en recubrimientos pulpares, para la rehabilitación de lesiones radiculares y craneotomías. Las experiencias preclínicas y clínicas han demostrado que estas cerámicas de HAp basadas en Apafil son biocompatibles, bioactivas, bioestables y osteoconducentes [11, 12].

Las biocerámicas solo están disponibles en forma de bloques o granulados, lo que suscita algunas limitaciones en la práctica clínica. Las biocerámicas en forma de gránulos, por ejemplo, se utilizan en implantes pequeños, en áreas que no tengan que soportar

4. Jordán M, Pachón L, Ponce de León L, Robinas I, Moreno SE. Osteoporosis: ¿Un problema de salud prevenible? Rev Méd Electrón 2006;29(5). Available in: <http://www.cpmtz.sld.cu/revistamedica/año2006/tema16.htm> (Consulted: October 19th, 2009).

5. Legrá R. Tratamiento de los defectos óseos mediante implante con Apafil-G. Tesis presentada para optar por el título de Especialista de Primer Grado en Periodoncia Universidad Médica de Guantánamo, Guantánamo, Cuba, 2003.

6. González R. Hidroxiapatita porosa Coralina Hap-200. 15 años de aplicaciones clínicas. Rev Cenic Cienc Biol 2005; 36 (Especial):1-8.

7. Mushipe MT, Revell PA, Shelton JC. Cancerous bone repair using bovine trabecular bone matrix particulates. Biomaterials 2002;23(2):365-70.

8. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. Injury 2000;31:S-D3-47.

9. Orlovskii V, Barinov S. Hydroxyapatite and hydroxyapatite-matrix ceramics. J Inorg Chem 2001;46:S129-49.

10. Peón E, Fuentes G, Soares M, Galván JC, Llópiz JC, Bastos IN, et al. Hydroxyapatite coating by sol-gel on Ti-6Al-4V alloy as drug carrier. J Mater Sci Mater Med 2009;20:543-7.

11. Álvarez M, Carrodegua RG, García-Menocal JA, Díaz IF, Argüelles DM, Hernández JR, et al. Implantation of Cuban granulated hydroxyapatite Apafil-G in periapical bone defects. Bioceramics 1998;11:583-6.

12. García D, García L, Pérez MC, Suárez M, Delgado JA, García R, et al. Filling of post-extraction dental socket with hydroxyapatite granules Apafil-GTM. Key Eng Mater 2001;192-5:925-8.

cargas, como el oído medio, o en implantes dentales como recubrimientos sobre metales que sirvan de refuerzo, ya que son rígidas y quebradizas. Pero se ha comprobado que estos materiales granulados tienden a migrar a sitios alejados, lo que aumenta la posibilidad de complicaciones e incluso el fracaso del acto quirúrgico. A su vez, las biocerámicas en forma de bloques no siempre se adaptan adecuadamente al defecto tratado [13-15]; y en los pocos casos en que se consigue una conveniente adaptación del implante cerámico, su extremadamente lenta velocidad de reabsorción y su fragilidad mecánica pueden atentar contra el resultado esperado, y devenir su fractura a corto o largo plazo.

Por ello que se han buscado alternativas parcialmente biorreabsorbibles, de mayor similitud con el tejido óseo a sustituir, con vistas a que el nuevo hueso se forme sobre el material implantado con la misma velocidad con que este último es reabsorbido. En ese sentido se han desarrollado cerámicas parcialmente reabsorbibles de β -fosfato tricálcico (β -TCP), para la obtención de granulados macroporosos utilizando como agentes porogénicos, una solución de peróxido de hidrógeno y levadura en polvo [16].

No obstante, el componente mineral del hueso natural está constituido principalmente por HAp no estequiométrica (la relación Ca/P difiere del valor estequiométrico de 1.67), la cual se diferencia de la HAp estequiométrica, no solo por la composición química, sino también por la cristalinidad y la superficie específica, características que la hacen más reactiva en un medio biológico. Hay autores que plantean que la biodegradación de la HAp se incrementa a medida que disminuye la relación Ca/P; es decir, que la HAp deficiente en calcio (CDHA) es más biodegradable que la HAp estequiométrica, debido a su menor cristalinidad [17]. En la tabla 1 se muestra la relación Ca/P de algunos fosfatos de calcio empleados en aplicaciones biomédicas.

Recientemente se reportó la obtención de una HAp deficiente en calcio (relación Ca/P menor de 1.67), que además presenta una morfología nanoestructurada, y ha sido dopada con iones silicato con vistas a obtener mayor similitud con la apatita biológica, y por ende, más solubilidad y reabsorción *in vivo*, así como una incrementada osteoconducción y bioactividad en los materiales compuestos para los que ha sido diseñada [18].

Paralelamente, con el descubrimiento de los cementos de fosfatos de calcio (CPC) en la década de los 80, surgió toda una nueva gama de posibilidades de uso de los fosfatos de calcio en aplicaciones regenerativas del tejido óseo. De forma general, los CPC están compuestos por dos fases: una sólida y una líquida,

que al mezclarse forman una pasta, que se implanta por inyección, y fragua en condiciones fisiológicas. De manera que pueden emplearse en técnicas quirúrgicas poco invasivas.

Algunos estudios recientes han estado encaminados a crear formulaciones de cementos óseos acrílicos modificados con micro y nanopartículas de HAp, para obtener valores incrementados de resistencia a la compresión y tracción, en comparación con los resultados anteriormente reportados para este tipo de materiales, empleados por más de 40 años en Ortopedia para la fijación de prótesis articulares al tejido óseo [19].

Otra de las tendencias actuales en la preparación de cementos de fosfatos de calcio para implantes óseos es la incorporación de la macroporosidad. Esta importante propiedad, que debe ser controlada con vistas a la biorreabsorción de los implantes óseos, ya que acelera el proceso de vascularización, permite una rápida colonización de las células en el material implantado (Figura 1), y por consiguiente una reconstrucción satisfactoria del defecto óseo [20, 21]. Algunos autores consideran materiales macroporosos aquellos que presentan dimensiones de poros entre 50 y 250 μm ; sin embargo, Kawachi y cols. plantean que el tamaño del poro ideal para biocerámicas debe superar los 100 μm [22].

Los métodos utilizados para crear porosidad pueden dividirse en dos grandes grupos: formación de una emulsión, donde los poros se generan durante el proceso de fraguado pero se necesita un tratamiento térmico posterior para alcanzar la porosidad deseada; y adición de sustancias cristalinas altamente solubles y no tóxicas con las dimensiones adecuadas para producir la porosidad deseada durante el mezclado de los polvos. Este último método requiere la disolución de los aditivos luego de aplicado y fraguado el cemento en el defecto óseo.

De las diferentes técnicas vigentes para inducir porosidad en los CPC, las más difundidas son el uso de manitol, de sacarosa, de partículas congeladas de una solución de fosfato de sodio y de moléculas surfactantes. Todas ellas han permitido la formación de macroporos en los cementos, pero su interconexión no ha sido buena. Es por ello que algunos autores han planteado la creación de poros mediante la formación de un gas *in situ* mediante la adición de CaCO_3 a los polvos del cemento, y posterior reacción durante el mezclado [23]. Recientemente se desarrolló una tecnología para producir macroporos en los CPC empleando albúmina

Tabla 1. Relación Ca/P de algunos fosfatos de calcio empleados en aplicaciones biomédicas

Nombre	Fórmula	Ca/P
Fosfato tetra-cálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Hidroxiapatita deficiente en calcio	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	< 1.67
Fosfato tricálcico (α,β)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Fosfato dicálcico dihidratado (Brushita)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0

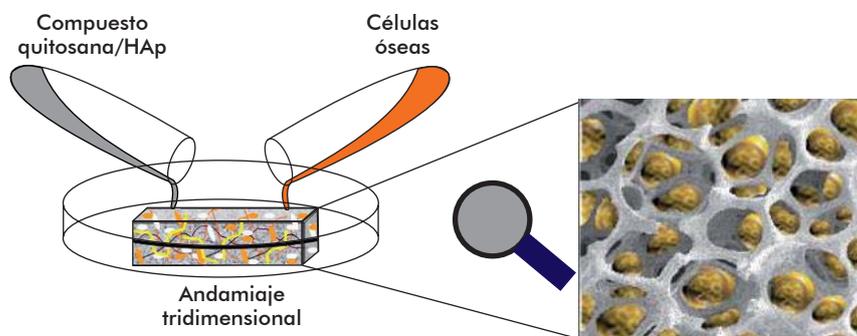


Figura 1. Proceso de colonización de osteoblastos en soportes tridimensionales.

13. Liou SC, Chen SY. Transformation mechanism of different chemically precipitated apatitic precursors into beta-tricalcium phosphate upon calcinations. *Biomaterials* 2002;23:4541-7.

14. Vallet-Regí M. Ceramics for medical applications. *J Chem Soc Dalton Trans* 2001:97-108.

15. Liou S, Chen SY. Transformation mechanism of different chemically precipitated apatitic precursors into beta-tricalcium phosphate upon calcinations. *Biomaterials* 2002;23:4541-7.

16. La Serna AA. Desarrollo y caracterización de cementos óseos macroporosos de fosfato de calcio. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas. Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, La Habana, Cuba, 2005.

17. Klein CPAT. Calcium phosphate implant materials and biodegradation. In: *Academisch Proefschrift*. Vrije Universiteit te Amsterdam; 1988.

18. Davidenko N, Carrodegua RG, Peniche C, Solís Y, Cameron RE. Chitosan/apatite composite beads prepared by *in situ* generation of apatite or Si-apatite nanocrystals. *Acta Biomaterialia* 2010; 6:466-76.

19. Guadarrama D. Preparación y caracterización de cementos óseos acrílicos modificados con micro y nanopartículas de hidroxiapatita. Tesis de Diploma Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, 2009.

20. Xie JZ, Hein S, Wang K, Liao K, Goh KL. Influence of hydroxyapatite crystallization temperature and concentration on stress transfer in wet-spun nanohydroxyapatite-chitosan composite fibres. *Biomed Mater* 2008;3(2):25014.

21. Li J, Chen Y, Yin Y, Yao F, Yao K. Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan-gelatin network film *in situ*. *Biomaterials* 2007;28(5):781-90.

22. Kawachi E, Betran CA, Dos Reis RR, Alves OL. Biocerámicas: tendencias e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quim Nova* 2000;23:518-22.

23. Alonso LM. Preparación de monolitos de fosfato de calcio por vía hidrotermal. Tesis en opción al grado de Máster en Ciencia y Tecnología de Materiales. Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, 2005.

de huevo como agente espumante durante el fraguado del cemento [16]. Estos mismos autores acometieron estudios con el objetivo de producir andamiajes macroporosos de HAp a partir de los CPC utilizando peróxido de hidrógeno como agente espumante, lo que les permitió obtener cementos con macroporosidad interconectada, con tamaños de poros superiores a los 200 μm , y hasta el momento no se ha reportado otra propuesta de CPC con similares ventajas [24].

Sin embargo, pese a las ventajosas propiedades descritas para estos materiales, se ha demostrado que los CPC presentan aún una cinética de reabsorción muy lenta y una baja resistencia mecánica, lo que puede ser un inconveniente, debido a la fragilidad del material en comparación con el tejido circundante [25]. Por las limitaciones de los sistemas anteriores, se ha trabajado en la búsqueda de materiales compuestos de fosfatos de calcio basados en biopolímeros, los cuales presentan propiedades que pueden ser incorporadas al material resultante.

Los biopolímeros

Los materiales poliméricos tienen una amplia variedad de aplicaciones en el campo de la implantología médica, ya que presentan propiedades físico-químicas más cercanas a la de los tejidos vivos, que en su mayor parte están formados por polímeros naturales, también conocidos como biopolímeros, como son las proteínas y los polisacáridos [26]. Estos materiales se han empleado en investigaciones de liberación controlada de fármacos y en el campo de ingeniería de tejidos, pues son biocompatibles, no tóxicos y biodegradables en condiciones fisiológicas, con una velocidad de reabsorción *in vivo* que puede variar de acuerdo con las características de la macromolécula en cuestión.

Como se mencionó, actualmente existe la tendencia de usar biopolímeros en la formulación de materiales para fines periodontales, maxilofaciales y en la ingeniería de tejidos óseos. Si bien los materiales poliméricos presentan ciertas limitaciones que impiden su aplicación en regiones del organismo que reciben una carga o tensión alta y cíclica, como las caderas y las rodillas, por ejemplo, sus propiedades físicas son similares a las de la fase orgánica presente en los tejidos óseos, lo que promueve e induce la formación de estructura ósea a través de su matriz. Ello permite que la osteointegración y la reabsorción de los materiales compuestos con polímeros naturales sean más rápidas.

Entre los biopolímeros más ampliamente estudiados, se destacan el colágeno, la gelatina, el alginato, la quitina y la quitosana. Debido a sus excelentes propiedades y sus diversas fuentes naturales de obtención, el uso de la quitosana se ha citado extensamente en la literatura científica como un biopolímero versátil, considerado por algunos como el polímero natural del siglo XXI, con variadas aplicaciones en la biotecnología, la biomedicina y recientemente en la ingeniería de tejidos [27].

La quitosana

La quitosana [(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi- β -D-glucano] (Figura 2) se obtiene industrialmente por desacetilación extensiva de la quitina [(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucano], polisacárido ampliamente distribuido en el reino animal, y segundo en abundancia

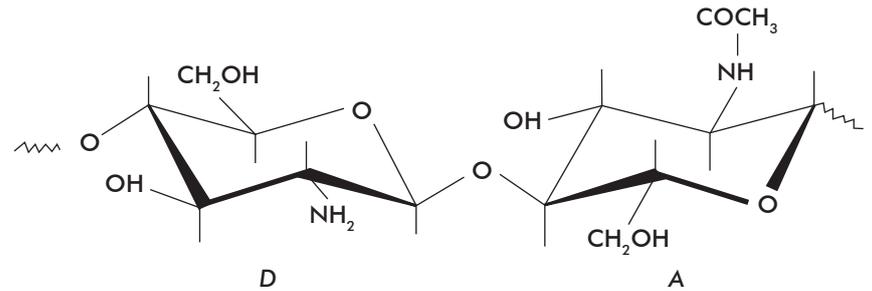


Figura 2. Unidades repetidas de la estructura química de la quitosana. (A) N-acetil-D-glucosamina y (D) D-glucosamina.

en la naturaleza después de la celulosa, y constituye un importante recurso renovable. Está compuesta por dos tipos de unidades estructurales distribuidas de manera aleatoria (distribución Bernoulliana) a lo largo de la cadena, la N-acetil-D-glucosamina (A) y la D-glucosamina (D), las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo β (1 \rightarrow 4) glicosídicos. En su forma cristalina, es normalmente insoluble en disoluciones acuosas neutras; sin embargo, en disoluciones ácidas diluidas (pH < 6.0), los grupos amino libres de la glucosamina se protonan y posibilitan la solubilidad de la molécula [28].

Dependiendo de la fuente y procedimiento de preparación, el peso molecular de la quitosana puede variar en el intervalo de 300 a 1000 kDa, y su grado de desacetilación (DD) suele abarcar desde un 60 hasta un 95%. Ha sido ampliamente demostrado su carácter biocompatible y biodegradable, ya que promueve la adhesión celular y se reabsorbe mediante procesos de hidrólisis a través de la acción de enzimas presentes en los fluidos fisiológicos [29, 30].

La quitosana puede considerarse como análogo estructural de los glucosaminoglicanos (GAG) [31, 32], los cuales son polisacáridos aniónicos que generalmente se encuentran unidos mediante interacciones electrostáticas a proteínas, formando los proteoglicanos. Estos últimos desempeñan una función importante en la organización y función de la matriz extracelular de los tejidos humanos [33].

Materiales basados en quitosana y GAG, principalmente de quitosana y sulfato de condroitina, han mostrado buena citocompatibilidad en la regeneración ósea, se han empleado con éxito en la reparación de cartílagos, y se han utilizado como componentes de piel artificial para el tratamiento de lesiones dérmicas. Estudios comparativos de diferentes materiales compuestos por quitosana y alginato, por una parte, y el poliácido láctico (PLA) por la otra, destinados a la ingeniería de tejidos articulares, demostraron que la quitosana incrementa la adhesión y proliferación celular *in vitro*, así como la actividad biosintética en relación con el alginato y el PLA [34].

Lee y cols. [35] obtuvieron un soporte formulado con quitosana, GAG, colágeno y cargado con factor de crecimiento TGF- β 1 para promover la regeneración articular mediante la liberación controlada de este. Los autores demostraron que la adición de quitosana al soporte mejoró las propiedades mecánicas y la estabilidad del enrejado formado por las macromoléculas de colágeno, e inhibieron la acción de las colagenasas. Aimin y cols. [36] demostraron la actividad

24. Delgado JA, Harr I, Almirall A, del Valle S, Planell JA, Ginebra MP. Injectability of a macroporous calcium phosphate cement. *Key Eng Mater* 2005; 284-6:157-60.

25. Bauer T, Togawa D. Bone graft substitutes: Towards a more perfect union. *Orthopedics* 2003;26:925-6.

26. Motz W, Bentley C, Tasto J. Bioabsorbable implants in orthopaedics: New developments and clinical circone applications. *J Am Acad Orthop Surg* 2001;9:280-8.

27. Pastor de Abram A, Higuera I. Generalidades in quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Pastor A, editor. Pontificia Universidad Católica de Perú, Lima; 2004, p. 22.

28. Di Martino A, Sittlinger M, Risbud MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005;26:5983-90.

29. Prasitsilp M, Jenwithisuk R, Kongsuwan K, Damrongchai N, Watts P. Cellular responses to chitosan *in vitro*: the importance of deacetylation. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:773-8.

30. Vande VPJ, Matthew HWT, Desilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of chitosan scaffold. *J Biomed Mater Res* 2002;59:585-90.

31. Dimitriu S. *Polymeric Biomaterials. Technology and Engineering*, Marcel Dekker, Inc. New York; 2002, p. 37.

32. Tangsadthakun C, Kanokpanont S, Sanchavanakit N, Pichyangkura R, Banaprasert T, Tabata Y, et al. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *J Biomater Sci Polymer Ed* 2007;18(2):147-63.

33. Sechriest VF, Miao YJ, Niyibizi C, Westerhausen-Larson A, Matthew HW, Evans CH, et al. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel compatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *J Biomed Mater Res* 2000;49(4):534-41.

34. Cui YL, Qi AD, Liu WG, Wang XH, H. Wang, DM Ma, et al. Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes *in vitro*. *Biomaterials* 2003;24:3859-68.

35. Lee JE, Kim KE, Kwon IC, Ahn HJ, Lee SH, Cho H, et al. Effects of the controlled-released TGF-beta 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials* 2004;25:4163-73.

antibacteriana de la quitosana, temática ampliamente referida en la bibliografía consultada [37]. Al emplear quitosana en conejos con osteomielitis inducida experimentalmente, observaron la reducción de la velocidad de su infección por *Staphylococcus aureus*. Sano y cols. [38] estudiaron la influencia del grado de desacetilación y el peso molecular de la quitosana sobre la inhibición de *Streptococcus sobrinus* 6715 en saliva tratada con hidroxiapatita, y demostraron el potencial de la quitosana como agente antiplaquetario, para pesos moleculares superiores (entre 5 y 6 kDa) y valores intermedios de grado de desacetilación (entre 50 y 60%) [39].

La biodegradabilidad de la quitosana es otro factor esencial que debe tenerse en cuenta para la selección adecuada de biopolímeros para ingeniería de tejidos. La lisozima, enzima que se encuentra en fluidos biológicos, es la responsable de la degradación *in vivo* de la quitosana.

La lisozima hidroliza los enlaces β -1,4 de N-acetilglucosamina adyacentes a una unidad de glucosamina. De este modo, la acción enzimática sobre quitosanas con altos porcentajes de desacetilación (> 80%) es débil. Así, no se aprecian cambios significativos en la reducción de la masa molecular de la quitosana hidrolizada en el tiempo. Esto trae consigo prolongados tiempos de degradación del biopolímero, lo que puede extender a varios meses la reabsorción *in vivo* del material basado en quitosana [40]. Mao y cols. [41] observaron la correlación directa entre el DD de la quitosana y su adhesión celular. Pudiera lograrse una rápida biodegradación si se empleara quitosana de bajos DD, pero entonces la adhesión celular resultaría limitada. Por lo tanto, la adecuada selección del grado DD de la quitosana es decisiva en el desarrollo de andamiajes tridimensionales para el control de su biodegradabilidad y biocompatibilidad.

Las propiedades de la quitosana antes señaladas [42], sus reconocidas propiedades curativas y hemostáticas, la posibilidad de ser procesada en diferentes formas (microesferas, membranas y filmes bidimensionales, así como soportes tridimensionales), su flexibilidad, mucoadhesividad y humectabilidad, así como la facultad de promover la formación del tejido óseo por osteogénesis celular en el sitio requerido, entre otras propiedades deseadas [43], sugieren el empleo de la quitosana como un excelente candidato biopolimérico en aplicaciones ortopédicas, en especial en la ingeniería de tejidos óseos [44]. No obstante, la quitosana como biopolímero no es bioactiva y posee pocas propiedades mecánicas.

Todo ello explica el creciente interés por combinar la bioactividad y la biodegradabilidad de materiales inorgánicos y las demás propiedades de la quitosana, con el objetivo de preparar novedosos materiales compuestos, con propiedades mecánicas mejoradas y características favorables para su uso en la ingeniería de tejidos óseos [45].

Preparación de composites de quitosana e hidroxiapatita: principales formulaciones, técnicas de obtención y aplicaciones

En la pasada década, los composites de fosfatos de calcio con matrices de quitosana fueron ampliamente

investigados para propósitos estructurales, específicamente para la cirugía ortopédica y maxilofacial [46], ya fuera para rellenos de defectos óseos, aumentos del reborde alveolar, implantes del oído medio, fusiones de vértebras de la columna o para el recubrimiento de prótesis metálicas, pues con ellos se logra una adecuada integración relleno-matriz [47]. Estos materiales híbridos se han preparado por distintos métodos de obtención reunidos en la tabla 2.

Método de mezclado de quitosana e hidroxiapatita

Entre las técnicas de preparación de los composites, el método de mezclado de HAP con quitosana, es de los más empleados para obtener matrices tridimensionales en la ingeniería de tejidos [48]. El procedimiento consiste en mezclar el polvo cerámico previamente preparado con una disolución de quitosana para lograr una suspensión lo más homogénea posible. Por congelamiento y liofilización, de esta mezcla se obtienen los soportes en forma de esponjas porosas [49, 50]. Murugan y cols. [51], por ejemplo, emplearon este enfoque para desarrollar un procedimiento sencillo, por vía húmeda, para la obtención de sistemas compuestos nanoestructurados (nanocompuestos) de HAP y quitosana en dos etapas: precipitación de la HAP en medio alcalino (pH 10 con NH_4OH) a partir de CaCl_2 y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (sales precursoras) y posterior mezclado de la HAP nanométrica con disoluciones de diferentes concentraciones de quitosana en ácido acético a una temperatura determinada.

Un procedimiento similar utilizaron Finisic y cols. [52] para la obtención de composites de quitosana y HAP en forma de pastillas. Ellos partieron de una pasta constituida por una mezcla de polvos de HAP, aluminio y quitosana en diferentes proporciones. Debido a la toxicidad del aluminio, lo transformaron en aluminato de sodio, empleando una disolución concentrada de hidróxido sódico, que llevó a la formación de poros con un diámetro superior a los 100 μm , debido al desprendimiento de hidrógeno gaseoso que se formó como resultado de la reacción.

Incorporación de la quitosana a cementos de fosfatos de calcio

La incorporación de quitosana a los CPC (Figura 3), constituye otra vía de obtención de materiales compuestos muy promisorios, pues mejora la inyectabilidad, la velocidad de degradación, las características del fraguado y el comportamiento mecánico de los materiales resultantes [53]. En este caso, por lo general se obtiene una suspensión de la porción sólida

36. Aimin C, Chunlin H, Juliang B, Tinyin Z, Zhichao D. Antibiotic loaded chitosan bar: An *in vitro*, *in vivo* study of a possible treatment for osteomyelitis. *Clin Orthop* 1999;366:239-47.

37. Hu SG, Jou CH, Yang MC. Protein adsorption, fibroblast activity and antibacterial properties of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) grafted with chitosan and chito oligosaccharide after immobilized hyaluronic acid. *Biomaterials* 2003;24:2685-93.

38. Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T, Takaesu Y. Effect of molecular mass and degree of deacetylation of chitosan on adsorption of *Streptococcus sobrinus* 6715 to saliva treated hydroxyapatite. *Bull Tokyo Dent Coll* 2002;43(2):75-82.

39. Sato T, Ishii T, Okahata Y. *In vitro* gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on transfection efficiency. *Biomaterials* 2001;22:2075-80.

40. Tachaboonyakiat W, Ogomi D, Serizama T, Akashi M. Evaluation of cell adhesion and proliferation on a novel tissue engineering scaffold containing chitosan and hydroxyapatite. *J Bioact Compat Pol* 2006;21:579-89.

41. Mao JS, Cui YL, Wang XH, Sun Y, Yin YJ, Zhao HM, et al. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials* 2004;25:3973-81.

42. Griffon DJ, Sedighi MR, Schaeffer DV, Eurell JA, Johnson AL. Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater* 2006;2:313-20.

43. Kosaraju S, D'ath L, Lawrence A. Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydr Polym* 2006;64:163-7.

44. Vande V, Matthew HWT, Desilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of chitosan scaffold. *J Biomed Mater Res* 2002;59:585-90.

45. Hyeong-Ho J, Chang-Hun L, Won-Ki L, Jin-Kook L, Hong-Chae P, Seog-Young Y. *In situ* formation of the hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds. *Mater Lett* 2008;62(10-11):1630-3.

46. Sun L, Xu HH, Takagi S, Chow LC. Fast setting calcium phosphate cement-chitosan composite: mechanical properties and dissolution rates. *J Biomater Appl* 2007;21(3):299-315.

47. Chesnutt B, Viano AM, Yuan Y, Yang Y, Guda T, Appleford MR, et al. Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2009;88(2):491-502.

Tabla 2. Métodos de obtención de composites de quitosana y HAP, y sus formulaciones

Método de obtención	Formulaciones
Mezclado de ambos componentes: quitosana e hidroxiapatita	Membranas [118], filmes [119] y andamiajes [120, 121]
Incorporación de la quitosana a los cementos de fosfato de calcio (CPC)	Soportes macroporosos [122] y materiales inyectables [123]
Recubrimiento de hidroxiapatita con quitosana	Filmes multicapas [68], placas [124], andamiajes porosos [125] y otros [77]
Precipitación y co-precipitación <i>in situ</i> del componente bioactivo inorgánico dentro de la matriz polimérica	Filmes [126], partículas [127], soportes porosos [128] y otros [129]

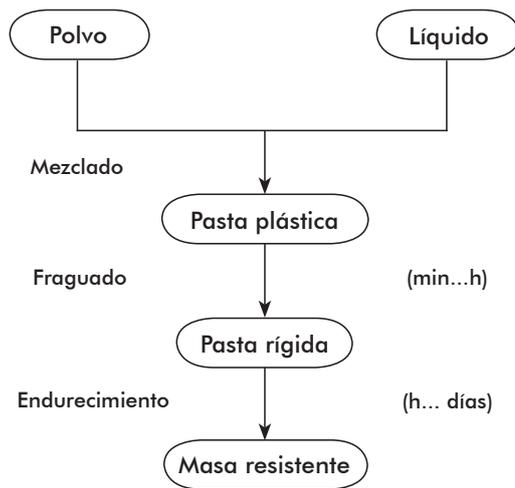


Figura 3. Preparación de un material tipo cemento.

en la matriz polimérica a pH ácidos próximos a 6, en los cuales la fracción de grupos $-NH_2$ protonados de la quitosana es suficiente para que esté solubilizada, lo que permite su inclusión en la fracción líquida del cemento. Posteriormente se prepara una pasta viscoelástica de tipo inyectable en el que están incorporadas las quitosana en la parte líquida del cemento y los precursores de HAp en la fracción sólida. Luego de la inyección de esta pasta en el sitio óseo que se desea tratar, el sistema inyectado gelifica, debido al aumento del pH (a pH fisiológico, 7.4), que induce la neutralización de los grupos amino. En este proceso, la carga inorgánica queda atrapada físicamente (fragua *in situ*) dentro la matriz del gel en un intervalo de 5 a 8 minutos, significativamente menor que en los CPC controles (61.7 min), que no tienen quitosana en su composición [54]. Los materiales resultantes mejoran también sus propiedades mecánicas, y muestran una resistencia a la compresión de 15 a 25 MPa, superior a la determinada para el CPC (10.4 MPa) [55].

Aprovechando estas bondades, algunas investigaciones se han basado en composites quitosana-CPC [56-62] como materiales de interés con posibles aplicaciones en la ingeniería de tejido óseo y la liberación controlada de agentes terapéuticos, con resultados muy promisorios en la regeneración de defectos óseos periodontales [63]. En este sentido, se ha acumulado una amplia experiencia en la síntesis y caracterización de materiales compuestos, con el empleo de fosfatos de calcio como relleno (β -TCP y HAp, tratados superficialmente o no) y polímeros naturales (quitosana, alginato de sodio) y acrílicos (principalmente poli(ácido acrílico), poli(acrilamida) y poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) para la restauración del tejido óseo y como potenciales sistemas de liberación controlada de principios activos [64, 65].

Método de recubrimiento

La obtención de composites de fosfatos de calcio con quitosana en forma de recubrimientos, se puede lograr por métodos electroquímicos y electroforéticos, mediante los cuales se consigue la co-deposición de las partículas de HAp y quitosana. Esta técnica permite la

preparación de los materiales híbridos a temperatura ambiente, lo cual resulta muy favorable teniendo en cuenta su posterior empleo con fines biomédicos.

Recientemente Pang y cols. [66] desarrollaron un método de co-deposición electroforética en forma de capas del composite HAp-quitosana para la protección de materiales de acero en contacto con soluciones fisiológicas. Con el propósito de modificar superficialmente y brindar protección anticorrosiva a los materiales con memoria de forma a partir de aleaciones de níquel-titanio, Sun y cols. [67] prepararon compuestos de heparina, HAp y biovidrio en una matriz polimérica de quitosana en forma de filmes mediante deposición electroforética catódica. También Redepenning y cols. prepararon por vía electroquímica, compuestos de HAp y quitosana a partir de brushita y quitosana en medio alcalino, para el recubrimiento de materiales de titanio [68].

Por otro lado, algunos autores han estudiado las ventajas notables de esta técnica utilizando biomateriales como el Bioverit II, recubierto con composites nanoestructurados de quitosana-HAp, para mejorar la interacción del implante con las células y su aceptación en el tejido subcutáneo [69] y en la reconstrucción del oído medio [70].

Método de precipitación *in situ*

A pesar de las innumerables ventajas de los métodos de obtención referidos, se ha demostrado que los sistemas compuestos preparados mediante técnicas de mezclado, incorporación de la quitosana a la CPC y el recubrimiento de las partículas de HAp con soluciones de quitosana, con frecuencia son no-homogéneos microscópicamente debido a la dificultad de lograr una distribución uniforme de los constituyentes inorgánicos en el seno de la matriz polimérica. Esto puede causar inconvenientes en su aplicación práctica, ya que la falta de homogeneidad puede inducir síntomas de inflamación por la formación de cápsulas fibróticas voluminosas constituidas por tejido conectivo denso o granulado. Ello provoca una fuerte reacción de rechazo del biomaterial implantado o alteraciones alrededor de la prótesis.

En tal sentido, el método de precipitación *in situ* del componente bioactivo inorgánico dentro de una matriz polimérica, citado en diversas publicaciones como método biomimético o bioinspirado [71], pudiera resultar mucho más atractivo para la preparación de este tipo de compuestos, ya que permite obtener sistemas mucho más homogéneos.

Este procedimiento está inspirado precisamente en la naturaleza (el hueso, la dentina, la cáscara de huevo, los carapazones de moluscos, etc.), donde existe una perfecta combinación de las características de composición y estructura, las cuales son las responsables de las propiedades micro y macroscópicas. La precipitación *in situ* de fosfatos de calcio permite controlar la arquitectura (estructura) y composición química de los materiales resultantes.

La esencia de este procedimiento consiste en la obtención de compuestos nanoestructurados y microcristalinos del componente biológicamente activo (fosfato de calcio), disperso homogéneamente en la matriz polimérica (quitosana), con el fin de imitar la apatita biológica presente en el tejido óseo, para su

48. Hua Y, Ning C, Xiaoying L, Buzhong Z, Wei C, Xiaoling S. Natural hydroxyapatite/chitosan composite for bone substitute materials. *Eng Med Biol Soc* 2005; 5:4888-91.

49. Nie H, Wang CH. Fabrication and characterization of PLGA/HAP composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA. *J Control Release* 2007;120(1-2): 111-21.

50. Niu X, Feng Q, Wang M, Guo X, Zheng Q. Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. *J Control Release* 2009;134(2):111-7.

51. Murugan R, Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials* 2004;25:3829-35.

52. Finisic M, Josué A, Fávère VT, Laranjeira MCM. Synthesis of calcium-phosphate and chitosan bioceramics for bone regeneration. *An Acad Bras Cienc* 2001; 73(4):525-32.

53. Granja P, Silva AIN, Borges JP, Barrias CC, Amaral IF. Preparation and characterization of injectable chitosan-hydroxyapatite microspheres. *Key Eng Mater* 2004;254-6:573-6.

54. Carey L, Xu HHK, Simon CG, Takagi S, Chow LC. Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. *Biomaterials* 2005;26:5002-14.

55. Xu H, Simon CG Jr. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 2005;26:1337-48.

56. Lian Q, Li DC, He JK, Wang Z. Mechanical properties and *in vivo* performance of calcium phosphate cement-chitosan fibre composite. *Proc Inst Mech Eng [H]* 2008;222(3):347-53.

57. Zou Q, Li Y, Zhang L, Zuo Y, Li J, Li X. Characterization and cytocompatibility of nano-hydroxyapatite/chitosan bone cement with the addition of calcium salts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;90(1):156-64.

58. Padois K, Rodriguez F. Effects of chitosan addition to self-setting bone cement. *Biomed Mater Eng* 2007;17(5):309-20.

59. Teng S, Lee EJ, Wang P, Shin DS, Kim HE. Three-layered membranes of collagen/hydroxyapatite and chitosan for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;87(1):132-8.

60. Weir M, Xu HH. High-strength *in situ*-setting calcium phosphate composite with protein release. *J Biomed Mater Res A* 2008;85(2):388-96.

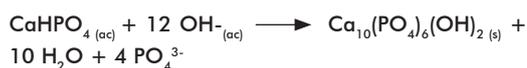
61. Xu H, Quinn JB, Takagi S, Chow LC. Synergistic reinforcement of *in situ* hardening calcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(6):1029-37.

62. Zhang Y, Xu HH. Effects of synergistic reinforcement and absorbable fiber strength on hydroxyapatite bone cement. *J Biomed Mater Res A* 2005;75(4):832-40.

63. Xu H, Takagi S, Sun L, Hussain L, Chow LC, Guthrie WF, et al. Development of non-rigid, durable calcium phosphate cement for use in periodontal bone repair. *J Am Dent Assoc* 2006;137(8):1131-8.

aplicación en la ingeniería de tejido óseo, específicamente en la regeneración ósea guiada [72] y en la liberación controlada de fármacos [73] y moléculas biológicamente activas [74].

Hasta el presente se han reportado varias vías para la preparación de estos materiales. Yamaguchi y cols. [75] han desarrollado una metodología de co-precipitación en un paso al gotear una solución de quitosana en H_3PO_4 sobre una suspensión de hidróxido de calcio. Fan y cols. han empleado la biomineralización de la quitosana en forma sólida, por inmersión en fluido biológico simulado (SBF) [76]. Redepenning y cols. mezclaron una disolución del biopolímero con precursores inorgánicos de fosfato de calcio empleados como relleno, seguido de la precipitación del compuesto en forma de hidrogel o de partículas [77]. Hu y cols. [78] reportaron una metodología interesante en la que emplearon hidrogeles de quitosana para su mineralización por una vía de hibridación *in situ*, y controlaron el proceso a través de difusión iónica. Rusu y cols. [79] estudiaron la cinética de formación de compuestos de quitosana y HAp preparados por co-precipitación, en que el pH de la solución de quitosana y los precursores salinos ($CaCl_2$ y NaH_2PO_4) se incrementaron gradualmente por adición de una disolución de hidróxido de sodio, y se obtuvieron compuestos con mayor grado de organización estructural debido al uso de precursores salinos solubles (ecuación 1).

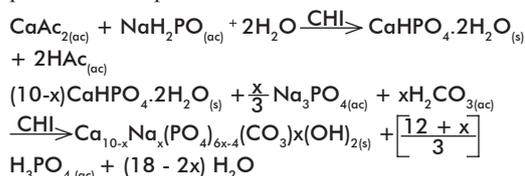


Estos mismos autores sugirieron el empleo de sales y ácidos débiles como precursores de iones Ca y fosfato, en lugar de ácidos o bases fuertes, para evitar el posible impacto destructivo en las cadenas poliméricas de quitosana en la preparación de estos compuestos. Chang y cols. [80] reportaron un procedimiento similar para preparar nanocompuestos de HAp y gelatina, en los cuales se controla la concentración de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} por difusión, a través de procesos de disolución y co-precipitación.

Estas vías de obtención *in situ* han permitido una adecuada incorporación de rellenos inorgánicos dentro de la estructura de los compuestos, tanto a escala micrométrica como nanométrica. Es importante mencionar que cada uno de los métodos citados conduce a un tipo particular de material compuesto de quitosana y HAp, con sus respectivas propiedades estructurales.

Considerando que la fase mineral ósea está constituida por una HAp no estequiométrica (relación Ca/P < 1.67), resulta conveniente tratar de asemejar el componente inorgánico de estos composites a la apatita biológica. Con este objetivo, Peña y cols. [81] han mezclado brushita en polvo ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) con una solución de quitosana en ácido cítrico, y mantenido el pH alcalino por adición de hidróxido sódico. A pesar de la similitud de la fase apatítica a la esperada en el compuesto final, el uso de disoluciones de ácido cítrico como disolvente es cuestionable, ya que si bien este promueve la nucleación de fosfatos de calcio amorfos, la transformación a HAp resulta inhibida. Además en la literatura se plantea que los ligandos de citrato pudieran afectar el tamaño del cristalito y de la celda, debido a la inclusión de grupos carboxílicos [82].

En nuestro laboratorio se han preparado compuestos de quitosana e HAp deficiente en calcio (quitosana y CDHA), a partir de soluciones de sales precursoras de hidroxiapatita (acetato de calcio y $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) y de quitosana en ácido acético, controlando la composición de la fase fosfato cálcica por optimización de las condiciones de hidrólisis [83]. Las ecuaciones 2 y 3 representan las etapas de formación de la apatita no estequiométrica obtenida *in situ*, dentro de la matriz polimérica de quitosana.



Las micrografías ópticas que se muestran en la (Figura 4), corresponden a los cristales de la fase inorgánica antes, hidrógeno fosfato cálcico dihidratado ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ o DCPD), y después de la hidrólisis con Na_3PO_4 , (CDHA) precipitada en ausencia y en presencia de quitosana, obtenidas en cada una de las etapas según las ecuaciones 2 y 3.

El examen morfológico permite apreciar que en la primera etapa, la fase inorgánica que precipita en las condiciones de reacción empleadas, corresponde a los cristales aplanados típicos de $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ (brushita). Sin embargo, después de la hidrólisis con Na_3PO_4 , se obtuvieron cristales mucho más pequeños, producto de la formación de la fase apatita esperada (CDHA), por lo que se logró una completa transformación de una fase cristalina en otra.

Recientemente hemos preparado por vía *in situ*, compuestos de quitosana con HAp no estequiométrica, a la cual se le han incorporado iones silicato con vistas a obtener un material con una mayor osteointegración al sistema biológico [84]. La incorporación de antibióticos y otros principios activos (como por ejemplo, factores de crecimiento) en estos tipos de matrices tridimensionales podría ser una vía para lograr una mayor proliferación celular y una más rápida y eficiente formación y mineralización del tejido óseo.

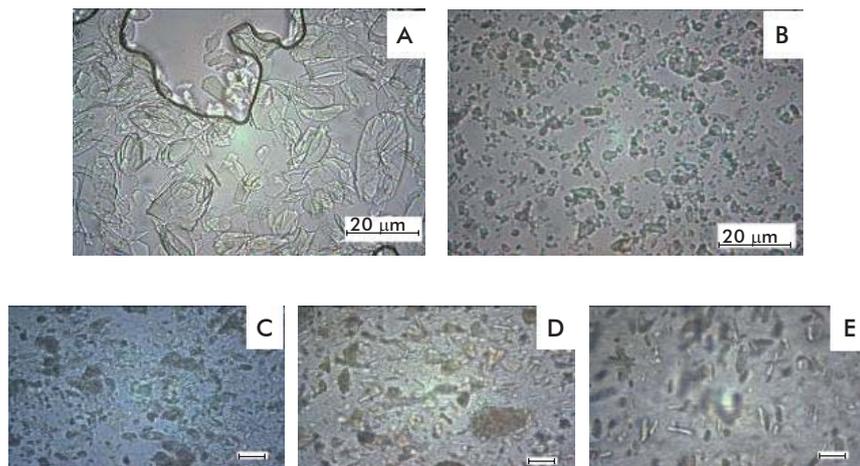


Figura 4. Micrografías ópticas (500x) correspondientes a cristales de la fase inorgánica (A) antes de la hidrólisis con Na_3PO_4 ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$, DCPD) y (B) después de la hidrólisis (CDHA), en ausencia de quitosana. Compuestos de quitosana/HAp: C) 20/80, D) 50/50 y E) 80/20.

64. Fuentes G, Rojas ML, Delgado JA, López JC, Peón E. Physical chemical and thermoanalytical characterization of cements based on synthetic hydroxyapatite. Rev Cenic Cienc Quím 2006;37(2):63-8.

65. Fuentes G, Hernández Y, Campos Y, López N, Rojas NM, Peón E, et al. Composition influence on properties of acrylic composites loaded with synthetic hydroxyapatite. Lat Am Appl Res 2008; 38:105-12.

66. Pang X, Zhitomirsky I. Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite-chitosan coatings. Mater Character 2007;58(4):339-48.

67. Sun F, Sask KN, Brash JL, Zhitomirsky I. Surface modifications of Nitinol for biomedical applications. Colloids Surf B Biointerfaces 2008;67(1):132-9.

68. Redepenning J. Electrolytic deposition of coatings for prosthetic metals and alloys. US Patent 7387846. June 17th, 2008.

69. Vogt J, Brandes G, Krüger I, Behrens P, Nolte I, Lenarz T, et al. Comparison of different nanostructured biomaterials in subcutaneous tissue. J Mater Sci Mater Med 2008;19(7):2629-36.

70. Turck C, Brandes G, Krueger I, Behrens P, Mojjallal H, Lenarz T, et al. Histological evaluation of novel ossicular chain replacement prostheses: an animal study in rabbits. Acta Otolaryngol 2007;127(8):801-8.

71. Manjubala I, Woesz A, Pilz C, Rimpler M, Fratzl-Zelman N, Roschger P, et al. Biomimetic mineral-organic composite scaffolds with controlled internal architecture. J Mater Sci Mater Med 2005; 16(12):1111-9.

72. Kong L, Ao Q, Wang A, Gong K, Wang X, Lu G, et al. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. J Biomater Appl 2007;22(3):223-39.

73. Teng S, Lee EJ, Wang P, Jun SH, Han CM, Kim HE. Functionally gradient chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for controlled drug release. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009;90(1):275-82.

Caracterización físico-química de los sistemas compuestos de quitosana y HAP

Las propiedades físico-químicas de los compuestos de quitosana y HAP muestran gran similitud con la del tejido óseo [85]. El comportamiento biodegradable, biocompatible y osteoconductor de estos materiales compuestos, resulta muy interesante para futuras aplicaciones biomédicas [86].

De manera general, el refuerzo inorgánico de este tipo de compuestos debe aportar la bioactividad y a la vez la resistencia y la rigidez al material resultante; mientras que la matriz polimérica es la encargada del relleno del volumen. Sin embargo, se ha demostrado que la incorporación de la quitosana permite además mejorar características biológicas del material obtenido [87].

Biodegradación

La biodegradación o alteración que sufre el dispositivo implantado al ser expuesto al medio fisiológico natural o simulado, es una propiedad determinante que ha sido extensamente tratada en la literatura [88, 89]. Ello puede ser por diferentes factores: disolución físico-química, desintegración física de partículas mayores en pequeñas, por agentes biológicos como las enzimas [90], los cuales disminuyen el pH del sitio [91], o por las características de la matriz polimérica empleada, entre otros [92, 93].

En este sentido, Yang y cols. demostraron que la velocidad de biodegradación puede ser controlada mediante la selección del derivado N-acetilado de la quitosana, y tiene mayor rapidez de reabsorción una quitosana más acetilada (menores valores de DD) debido a la acción preferencial de la lisozima sobre los enlaces glicosídicos que unen las unidades acetiladas del biopolímero [93]. Sin embargo, Freier y cols. observaron que la adhesión celular de filmes de quitosana con menores DD promueven una pobre adhesión celular [88]. Igualmente, Chatelet y cols. mostraron que los fibroblastos no proliferan sobre filmes de quitosana, independientemente de su grado de desacetilación, debido a una gran adhesión celular de estas células sobre el material, lo cual inhibe su proliferación posterior [94]. Todo lo anterior sugiere que las propiedades biológicas de los materiales compuestos basados en quitosana no solo dependen del grado de acetilación y desacetilación del polímero natural, sino también del tipo de célula empleada para promover su adhesión y proliferación sobre el sustrato en cuestión.

Una forma de evaluar la velocidad de degradación es mediante el seguimiento de liberación de iones Ca^{2+} de los compuestos sumergidos en un medio fisiológico. Los resultados muestran mayor velocidad de liberación de los iones en la medida en que se incrementa el contenido de quitosana incorporado en los compuestos. La naturaleza hidrofílica de la matriz polimérica de quitosana, origina un bajo porcentaje de cristalinidad en los compuestos, y por consiguiente, aumentan la solubilidad del sistema, la velocidad de disolución y la liberación al medio de iones calcio. Ello permite un gradual incremento de la biorreabsorción en la medida que aumenta el contenido del biopolímero presente en los materiales compuestos [95].

Morfología

La morfología final de los compuestos es otra propiedad importante que influye sobre la funcionalidad de estos materiales. Sobre ella influyen las condiciones de reacción, tales como la concentración, la temperatura, el pH, la conformación, el tiempo y la interacción relleno-matriz. De forma general, la morfología de los compuestos puede variar ampliamente de acuerdo con la versatilidad geométrica que le confiere la matriz polimérica (filmes, nano y micropartículas, membranas, cementos, etc.), y con la aplicación para la que serán destinados. Normalmente se analiza la morfología, el tamaño y su distribución mediante técnicas de microscopía óptica y/o electrónica de barrido y transmisión (SEM, TEM). Un aspecto importante es la fase apatítica obtenida sobre la superficie de los compuestos, la cual frecuentemente se aprecia en forma de agregados globulares o grupos de pequeños cristales con diferentes características, en dependencia del componente inorgánico presente en los compuestos en mayor proporción [96]. Por ejemplo, el β -fosfato tricálcico (β -TCP) se presenta en forma de partículas prismáticas, el fosfato octacálcico (OCP) en forma de agregados de pequeñas placas, similar a la HAP estequiométrica, y el DCPD en forma de cristales anchos de gran tamaño y forma aplanada, mientras que la CDHA, generalmente presenta una apariencia de agujas finas y pequeñas que pueden originarse de un punto común (Figura 4) [97].

Composición

La composición de los compuestos de quitosana/HAP es frecuentemente estudiada por espectroscopia infrarroja (IR) para identificar los grupos funcionales principales y la presencia de iones carbonato o no. La difracción de rayos X (DRX) se emplea para analizar la cristalinidad y las fases inorgánicas presentes; la espectroscopia de energía dispersiva (EDS) para determinar el contenido de Ca y P; y termogravimetría (TG) y análisis térmico diferencial (ATD) para hallar la composición del sistema [98].

Los constituyentes individuales de los compuestos de fosfatos de calcio basados en quitosana, mantienen su identidad físico-química: es decir, no se disuelven o fusionan completamente uno en el otro, de modo que pueden normalmente ser identificadas de forma independiente la fase inorgánica y la matriz polimérica. No obstante, ambas pueden interactuar a través de los grupos amino reactivos de la quitosana y los grupos fosfato e hidroxilo, y los iones calcio de la HAP [99].

Ensayos biológicos de composites de quitosana/HAP

La biocompatibilidad es la propiedad de un material de ajustarse en una aplicación específica sin provocar reacciones alérgicas, inmunitarias o de otro tipo, cuando se pone en contacto con los tejidos vivos [100]. Ensayos biológicos con diferentes células han demostrado la biocompatibilidad de los compuestos de fosfatos de calcio y quitosana [101].

Compuestos de HAP basados en quitosana y alginato fueron impregnados con fármacos y mostraron su efectividad como sistemas locales de liberación en estudios *in vitro* [102]. De igual modo, se analizó

74. Tang Y, Du Y, Li Y, Wang X, Hu X. A thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel containing hydroxyapatite for protein delivery. *J Biomed Mater Res A* 2009;91(4):953-63.

75. Yamaguchi I., Tokuchi K, Fukusaki H, Koyama Y, Takakura K, Monma H, et al. Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites. *J Biomed Mater Res* 2001;55:20-7.

76. Fan Y, Lü X. A study of apatite formation on natural nano-hydroxyapatite/chitosan composite in simulated body fluid. *Front Mater Sci China* 2008;2(1):91-4.

77. Redepenning J, Venkataraman G, Chen J, Stafford N. Electrochemical preparation of chitosan/hydroxyapatite composite coatings on titanium substrates. *J Biomed Mater Res* 2003;66A:411-6.

78. Hu Q, Li B, Wang M, Shen J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials* 2004;25:779-85.

79. Rusu V, Wilke Ch, Ng M, Tiersch B, Fratzl P, Peter MG. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials. *Biomaterials* 2005; 26:5414-26.

80. Chang M, Ko CC, Douglas WH. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposites. *Biomaterials* 2003;24(17):2853-62.

81. Peña J, Izquierdo-Barba I, Martínez A, Vallet-Regí M. New method to obtain chitosan/apatite materials at room temperature. *Solid State Sci* 2006;8:513-9.

82. Van der Houwen J, Cressey G, Cressey BA, Valsami-Jones E. The effect of organic ligands on the crystallinity of calcium phosphate. *J Cryst Growth* 2003;249:572-83.

83. Solís Y, García R, Davidenko N, Peniche C, Cameron R. Preparación y caracterización de composites de hidroxiapatita deficiente en calcio y quitosana. *Rev Cenic Cienc Quím* 2008;39(1):17-22.

84. Davidenko N, Carrodegua RG, Peniche C, Solís Y, Cameron RE. Chitosan/apatite composite beads prepared by in situ generation of apatite or Si-apatite nanocrystals. *Acta Biomaterialia* 2010;6:466-76.

85. Murugan R, Kumar TSS, Yang F, Ramakrishna S. Hydroxyl carbonate apatite hybrid bone composites using carbohydrate polymer. *J Compos Mater* 2005;39(13):1159-67.

86. Katti K, Katti DR, Dash R. Synthesis and characterization of a novel chitosan/montmorillonite/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering. *Biomed Mater* 2008;3(3):034122.

87. Mano J, Sousa RA, Boesel LF, Neves NM, Reis RL. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Compos Sci Technol* 2004;64:789-817.

88. Freier T, Shan KH, Kazazian K, Shoichet M. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials* 2005;26:5872-8.

89. Muramatsu K, Masuda S, Yoshihara Y, Fujisawa A. In vitro degradation behavior of freeze-dried carboxymethyl-chitin sponges processed by vacuum-heating and gamma irradiation. *Polym Degrad Stab* 2003;81:327-32.

la encapsulación y osteoconducción *in vitro* de fibroblastos de los ligamentos periodontales humanos en microesferas de quitosana/HAp, y se obtuvo una adecuada diferenciación osteogénica [103].

La bioactividad de un material es la propiedad para formar una capa de carbohidroxiapatita biológicamente activa sobre su superficie, lo cual facilitará la unión interfacial con el tejido óseo, garantizando un enlace directo con el hueso sin interposición de una cápsula fibrosa. De este modo, se logra una buena integración material-hueso, que permite la presencia de células óseas necesarias para el proceso de regeneración sobre la superficie del material [104]. La fase inorgánica a integrarse debe ser, por consiguiente, química y estructuralmente semejante a la fase mineral constituyente del hueso. En este sentido, la excelente bioactividad de la HAp [105] y la presencia del grupo N-acetilglucosamina en la quitosana (análogo de los GAG) promueve la estimulación del crecimiento óseo [106].

La biodegradabilidad de los sistemas para IT es otra importante propiedad que debe tenerse en cuenta para su selección, y a la cual la quitosana contribuye favorablemente. De esta forma se establece un proceso dinámico de formación y reabsorción de tejidos óseos, donde estos materiales hacen la función de andamiajes para la infiltración y sustitución de los tejidos, y a su vez estimulan el crecimiento celular a través suyo [107].

Recientemente se reportó la obtención de los andamiajes porosos tridimensionales de compuestos de fosfatos de calcio y quitosana para su utilización en ingeniería de tejido óseo [108, 109]. Se demostró que estos sistemas, obtenidos a partir de cementos de fosfatos de calcio y derivados de quitosana, fosfato tricálcico/quitosana, alginato/HAp y quitosana/HAp [110] exhiben una rápida diferenciación y crecimiento de osteoblastos (Figura 1), y muestran efectos osteogénicos [111]. Zhao y cols. [112] por ejemplo, prepararon un enrejado 3D de HAp/quitosana/gelatina (compuesto con similar estructura a la del hueso humano) mediante precipitación *in situ*, para inducir una adhesión favorable, el crecimiento y la diferenciación osteogénica de un cultivo de células mesenquimales humanas, con vistas al empleo de estas matrices en ingeniería de tejido óseo.

Por su parte, Zhang [113] ha publicado diversos trabajos en los que obtuvo andamiajes porosos del biopolímero reforzado con HAp en polvo y de compuestos de fosfatos de calcio/quitosana, incorporando biovidrio o no, para el cultivo de células osteoblásticas humanas (MG63). En todos los materiales compuestos hubo una proliferación o diferenciación solamente de células osteoblásticas (proliferación fenotípica). El

empleo de soportes de quitosana con biovidrios de fosfatos de calcio evita la rápida degradación en un medio fisiológico, lo que trae consigo la liberación de subproductos ácidos que pudieran afectar la diferenciación de las células osteoblásticas [114].

También Zhao y cols. [115] han desarrollado materiales híbridos biomiméticos de HAp-quitosana-gelatina para analizar el comportamiento celular en ratas. Los resultados demostraron proliferación celular, formación de nuevo tejido óseo y mineralización de los soportes obtenidos, en solamente 3 semanas [116].

Las investigaciones demuestran la factibilidad de uso de matrices tridimensionales de fosfato de calcio y quitosana como sistemas favorables para soportes e implantes en procedimientos de la ingeniería de tejidos óseos [117]. La selección de la composición del sistema a diseñar estará determinada por la aplicación final del andamiaje.

Conclusiones

Las biocerámicas de fosfatos de calcio tales como la HAp, los cementos óseos de fosfatos de calcio y el β -fosfato tricálcico son biocompatibles, bioactivas y osteoconductoras, propiedades estas que las convierten en excelentes biomateriales para la ortopedia. Sin embargo, la disponibilidad en forma de gránulos o bloques de los primeros, la fragilidad mecánica de los cementos, así como la lenta reabsorción o degradación *in vivo* de los materiales desarrollados hasta el presente, limitan su aplicación clínica y la duración del material con las características deseadas, a corto y largo plazo, en el organismo hospedante. Las formulaciones de composites basados en polímeros naturales como la quitosana y la gama de métodos de obtención para su preparación, han permitido obtener materiales con un mejor y más adecuado diseño, con una fortaleza incrementada y superiores osteoconductoras, homogeneidad, bioactividad, biodegradabilidad y similitud al tejido óseo que se desea reparar o sustituir, por lo que se amplía su aplicación en el extenso campo de la ortopedia y la traumatología, en comparación con los biomateriales que le preceden. La tendencia actual es a desarrollar andamiajes tridimensionales de compuestos con propiedades incrementadas, a partir de materiales inorgánicos con mayor biodegradabilidad y bioactividad (por ejemplo, HAp no estequiométrica dopada con Si) y con la incorporación de antibióticos y otros principios activos (como por ejemplo, factores de crecimiento) en la matriz de quitosana (u otro biopolímero), para obtener una adecuada proliferación celular y una más rápida y eficiente formación y mineralización del tejido óseo dañado.

90. Tachaboonyakiat W, Serizawa T, Akashi M. Inorganic-organic polymer hybrid scaffold for tissue engineering-II: partial enzymatic degradation of hydroxyapatite-chitosan hybrid. *J Biomater Sci Polym Ed* 2002;13(9):1021-32.

91. Zhou G, Li Y, Zhang L, Zuo Y, Jansen JA. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan/konjac glucomannan composite. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83(4):931-9.

92. Weir M, Xu HH, Simon CG Jr. Strong calcium phosphate cement-chitosan-mesh construct containing cell-encapsulating hydrogel beads for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2006;77(3):487-96.

93. Yang Y, Hu W, Wang XD, Gu XS. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation *in vitro* and *in vivo*. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:2117-21.

94. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* 2001;22:261-8.

95. Liyun J, Yubao L, Li Z, Jianguo L. Preparation and properties of a novel bone repair composite: nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(3):981-7.

96. Araújo A, Lemos AF, Ferreira JM. Rheological, microstructural, and *in vitro* characterization of hybrid chitosan-poly(lactic acid)/hydroxyapatite composites. *J Biomed Mater Res A* 2009;88(4):916-22.

97. Teng S, Lee EJ, Yoon BH, Shin DS, Kim HE, Oh JS. Chitosan/nano-hydroxyapatite composite membranes via dynamic filtration for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2009;88(3):569-80.

98. Yang D, Jin Y, Zhou Y, Ma G, Chen X, Lu F, et al. *In situ* mineralization of hydroxyapatite on electrospun chitosan-based nanofibrous scaffolds. *Macromol Biosci* 2008;8(3):239-46.

99. Sivakumar M, Rao KP. Preparation, characterization, and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-alginate composite microspheres. *J Biomed Mater Res A* 2003;65(2):222-8.
100. Krisanapiboon A, Buranapanitkit B, Oungbho K. Biocompatibility of hydroxyapatite composite as a local drug delivery system. *J Orthop Surg* 2006;14(3):315-8.
101. Tang X, Gui L, Lü XY. Hard tissue compatibility of natural hydroxyapatite/chitosan composite. *Biomed Mater* 2008;3(4):441-5.
102. Vechasilp J, Tangtrakulwanich B, Oungbho K, Yuenyongsawad S. The efficacy of methotrexate-impregnated hydroxyapatite composites on human mammary carcinoma cells. *J Orthop Surg* 2007;15(1):56-61.
103. Inanç B, Eser-Elçin A, Koç A, Baloş K, Parlar A, Murat-Elçin Y. Encapsulation and osteoinduction of human periodontal ligament fibroblasts in chitosan-hydroxyapatite microspheres. *J Biomed Mater Res A* 2007;82(4):917-26.
104. Sailaja G, Ramesh P, Kumary TV, Varma HK. Human osteosarcoma cell adhesion behaviour on hydroxyapatite integrated chitosan-poly(acrylic acid) polyelectrolyte complex. *Acta Biomater* 2006;2(6):651-7.
105. Wu J, Liu Y, Yang TF, Mu YH, Guo T, Li YB. Porous polyvinyl alcohol hydrogel composite prepared and studied initially for biocompatibility. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007;38(4):705-8.
106. Kong L, Gao Y, Cao W, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2005;75(2):275-82.
107. Li Z, Yubao L, Aiping Y, Xuelin P, Xuejiang W, Xiang Z. Preparation and in vitro investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone substitute materials. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16(3):213-9.
108. Fulmer M, Ison I, Hankermayer C, Constantz B, Ross J. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. *Biomaterials* 2002;23:751-5.
109. Gallardo A, Aguilar MR, Elvira C, Peniche C, San Román J. Chitosan based microcomposites from biodegradable microparticles to self-curing hydrogels. In: *Biodegradable Systems in Tissue Engineering*, SRJ Reis R, editor. 2005, CRC Press: Boca Raton, USA, p. 145-62.
110. Buranapanitkit B, Srinilta V, Ingviga N, Oungbho K, Geater A, Ovatlarnporn C. The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system. *Clin Orthop Relat Res* 2004;424:244-52.
111. Baran E, Tuzlakoglu K, Salgado AJ, Reis RL. Multichannel mould processing of 3D structures from microporous coralline hydroxyapatite granules and chitosan support materials for guided tissue regeneration/engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(2):161-5.
112. Zhao F, Grayson WL, Ma T, Bunnell B, Lu WW. Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan-gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development. *Biomaterials* 2006;27(9):1859-67.
113. Zhang Y, Zhang M. Cell growth and function on calcium phosphate reinforced chitosan scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(3):255-60.
114. Zhang Z, Ni M, Zhang M, Ratner B. Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2003;9(2):337-45.
115. Zhao F, Yin Y, Lu WW, Leong JC, Zhang W, Zhang J, et al. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials* 2002;23(15):3227-34.
116. Zhao F, Yin YJ, Yao KD, Guo G, Wang BL, Zhang JY, et al. Tissue engineering study on chitosan-gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds-osteoblasts culture. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2002;16(2):130-3.
117. Zhao F, Yin YJ, Song XF. Study on chitosan-gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds preparation and morphology. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2001;15(5):276-9.
118. Maachou H, Bal KE, Bal Y, Chagnes A, Cote G, Alliouche D. Characterization and *in vitro* bioactivity of chitosan/hydroxyapatite composite membrane prepared by freeze-gelation method. *Trends Biomater Artif Organs* 2008;22(1):15-24.
119. Kim S, Lim B, Sun F, Koh K, Ryu S, Kim H, et al. Preparation of high flexible composite film of hydroxyapatite and chitosan. *Polym Bull* 2009;62(1):111-8.
120. Jiang L, Li Y, Wang X, Zhang L, Wen J, Gong M. Preparation and properties of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose composite scaffold. *Carbohydr Polym* 2008;74(3):680-4.
121. Xiao X, Liu R, Huang Q. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(11):3429-35.
122. Zhang Y, Xu HHK, Takagi S, Chow LC. In situ hardening hydroxyapatite-based scaffold for bone repair. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17(5):437-45.
123. Xu HH, Quinn JB, Takagi S, Chow LC. Processing and properties of strong and nonrigid calcium phosphate cement. *J Dent Res* 2002;81(3):219-24.
124. Wang J, De Boer J, De Groot K. Proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells on calcium phosphate/chitosan coatings. *J Dent Res* 2008;87(7):650-4.
125. Huang Z, Dong Y, Chu C, Lin P. Electrochemistry assisted reacting deposition of hydroxyapatite in porous chitosan scaffolds. *Mater Lett* 2008;62(19):3376-8.
126. Kumar R, Prakash KH, Cheang P, Gower L, Khor KA. Chitosan-mediated crystallization and assembly of hydroxyapatite nanoparticles into hybrid nanostructured films. *J R Soc Interface* 2008;5(21):427-39.
127. Chen F, Wang Z, Lin C. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nanocomposite for use in biomedical materials. *Mater Lett* 2002;57(4):858-61.
128. Kong L, Gao Y, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Polym J* 2006;42(12):3171-9.
129. Pramanik N, Mishra D, Banerjee I, Maiti TK, Bhargava P, Pramanik P. Chemical synthesis, characterization, and biocompatibility study of hydroxyapatite/chitosan phosphate nanocomposite for bone tissue engineering applications. *Int J Biomater* 2009;2009:512417.

Recibido en noviembre de 2009. Aprobado en julio de 2010.