

Preparación y caracterización de composites de hidroxiapatita deficiente en calcio y quitosana

Yaimara Solís Moré, Raúl García Carrodegas, Natalia Davidenko, Carlos Peniche Covas y Ruth Camerón.*

Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana, Ciudad de La Habana Código Postal 10400, Cuba. Correo electrónico: charlie@biomat.uh.cu. *Department of Materials Science and Metallurgy, University of Cambridge, Cambridge, UK.

Recibido: 23 de noviembre de 2007. Aceptado: 6 de febrero de 2008.

Palabras clave: composite, quitosana, hidroxiapatita, biomimético.
Key words: composite, chitosan, hydroxyapatite, biomimetic.

RESUMEN. Se obtuvieron composites de quitosana/hidroxiapatita deficiente en calcio (CHI/CDHA) por un método biomimético (nucleación de la fase inorgánica dentro de la matriz polimérica), con el objetivo de obtener un nuevo material que combine la biodegradabilidad y flexibilidad de la quitosana y la bioactividad y osteoconductividad de la hidroxiapatita con vistas a su posible empleo como sustituto óseo. Con este fin se prepararon sistemas con composiciones de CHI/CDHA: 20/80, 50/50 y 80/20. Las muestras fueron preparadas en forma de partículas y su morfología fue analizada a través de una lupa. Se observó que las partículas de menor contenido de quitosana son menos esféricas, más pequeñas e irregulares. Las fases orgánica e inorgánica de los composites obtenidos fueron identificadas mediante espectroscopia FTIR, difracción de Rayos X y análisis térmico. Los espectros FTIR de los composites mostraron las bandas de absorción características de ambos componentes, la quitosana y la hidroxiapatita. El análisis térmico evidenció la existencia de interacción entre la matriz de quitosana y el componente inorgánico. Se observó además, una correspondencia entre la relación quitosana/componente inorgánico de la mezcla de alimentación y la del composite resultante. Por su parte, el ensanchamiento observado en los picos de los difractogramas fueron indicativos del pequeño tamaño de los cristales de la hidroxiapatita formada *in situ*. El análisis por rayos X de los residuos de los composites calcinados a 1 000 °C por 15 h indica que la fase inorgánica de los composites es hidroxiapatita deficiente en calcio.

ABSTRACT. In this work chitosan/calcium - deficient hydroxyapatite (CHI/CDHA) composites were obtained by a biomimetic method (nucleation of the inorganic phase inside the polymeric matrix) with the objective to obtain a novel material that combine the biodegradability and flexibility of the chitosan with the bioactivity and osteoconductivity of the hydroxyapatite with a view to their possible employment as a candidate for bone replacement. For this purpose systems with the CHI/CDHA ratios 20/80, 50/50 and 80/20 were prepared. The samples were prepared as particles shape and their morphology was inspected with a magnifying glass. It was seen that the particles with less chitosan content were less spherical, smaller and irregular. The organic and inorganic phases of the composites obtained were identified by FTIR spectroscopy, X-ray diffraction and thermal analysis. The FTIR spectra of composites showed the characteristic absorption bands of both components, the chitosan and the hydroxyapatite. The thermal analysis evidenced the interaction existence between the chitosan matrix and the inorganic component. It also revealed that there is a correspondence between the chitosan/inorganic component ratio in the feed mixture and in the resulting composite. On the other hand, the broadening observed in the diffractogram peaks was indicative of the small size of the hydroxyapatite crystals formed *in situ*. The X-ray analysis of the residues after igniting the composites at 1 000 °C for 15 h indicates that the inorganic phase of the composites is calcium deficient hydroxyapatite.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, las patologías óseas son uno de los problemas fundamentales que enfrenta la Medicina debido al incremento de la longevidad de la población y del número de traumas ocasionados por accidentes de tránsito a nivel mundial. Es por ello, que ha surgido una creciente necesidad de diseñar nuevos materiales destinados a la reconstrucción del tejido óseo con una mayor similitud a él.

El material ideal para sustituir el hueso tiene que imitar al tejido que reemplaza en forma, tamaño, consistencia y funcionamiento. Debe promover una respuesta adecuada del sistema biológico y no debe provo-

car infecciones. A medida que es reabsorbido tiene que adquirir las cualidades del tejido y ser tolerado adecuadamente por el organismo, con una aceptable adaptación biomédica.

Es bien conocido que los fosfatos cálcicos como el β -fosfato tricálcico (β -TCP) y la hidroxiapatita, estequiométrica (HAp) o no (CDHA), son excelentes candidatos para la reparación y regeneración ósea, pues su composición química es muy similar a la fase mineral ósea, por lo que son frecuentemente empleados como materiales de relleno en Ortopedia.

Por su parte, la CDHA presenta una mayor analogía con las apatitas biológicas en cuanto a su estequiometría

y cristalinidad, características que la hacen aún más reactiva en el medio biológico, donde una vez implantado el material, ya sea a través de moldes o inyección, es rápidamente integrado a la estructura ósea y transformado en un neohueso. La velocidad de tal proceso dependerá en gran medida de las características del material empleado.

En esta dirección, los composites de quitosana (CHI), polímero natural, con diferentes fosfatos de calcio como la hidroxiapatita (HAp) constituyen materiales híbridos muy atractivos para la ingeniería de tejido óseo, específicamente, para la reconstrucción ósea guiada, pues pueden incorporar propiedades favorables de ambos componentes. La HAp proporciona bioactividad y osteoconductividad, mientras que la CHI aporta biodegradabilidad y flexibilidad, entre otras. Además, debido a la naturaleza viscoelástica de la CHI, se elimina la migración de partículas de HAp y la textura suave del composite evita daños a los tejidos blandos próximos al implante.^{1,2}

Los composites de quitosana/hidroxiapatita pueden ser obtenidos fundamentalmente por mezcla de ambos componentes, recubrimiento de HAp con CHI, incorporación de CHI a los cementos de fosfato de calcio o mediante precipitación del componente bioactivo inorgánico dentro de la matriz de CHI en forma de filmes, membranas, partículas, soportes porosos (scaffolds), cementos, entre otros. En el caso de los andamios o soportes porosos (scaffolds), matrices muy interesantes para la ingeniería de tejido óseo, generalmente se suspende el polvo cerámico en el medio que contiene CHI o se obtienen soportes como esponjas porosas por *freeze-drying* o congelamiento.^{1,3,4}

Un interesante y novedoso método recientemente implementado y que incluye el mezclado e interacción de ambos componentes: matriz y relleno, lo constituye la precipitación *in situ* y nucleación del componente bioactivo inorgánico dentro de la matriz polimérica. Este último es denominado método biomimético, ya que trata de imitar las condiciones biológicas en las que se forma el constituyente inorgánico, para garantizar una mejor biocompatibilidad de los sistemas obtenidos. La principal idea de esta vía de preparación de composites pretende obtener biomateriales donde los cristales del componente inorgánico biológicamente activo (fosfato de calcio) se encuentre disperso dentro de la matriz polimérica (quitosana), lo más homogéneamente posible para evitar inflamaciones intrínsecas de materiales microscópicamente no-homogéneos frecuentemente obtenidos empleando las técnicas anteriormente mencionadas y que provocan inflamación cuando el material es implantado.^{5,6}

Adicionalmente, los sistemas obtenidos por nucleación de la fase inorgánica *in situ* dentro de la matriz polimérica, se consideran más ventajosos, ya que permiten un mejor control de la microestructura, homogeneidad y composición química de los materiales resultantes.²

Se conocen experiencias en las que se ha empleado este novedoso método. Rusu *et al.* utilizaron disoluciones precursoras de calcio y fósforo para la preparación de los sistemas de CHI/HAp y obtuvieron como fase inorgánica una hidroxiapatita estequiométrica.⁷ Por su parte, Peña *et al.* obtuvieron composites de quitosana/hidroxiapatita deficiente en calcio, mezclando polvos de brushita con CHI y utilizando como disolvente ácido cítrico.⁸

Teniendo en cuenta el desarrollo precedente sobre esta técnica, en el presente trabajo se prepararon por el método biomimético y se caracterizaron composites de

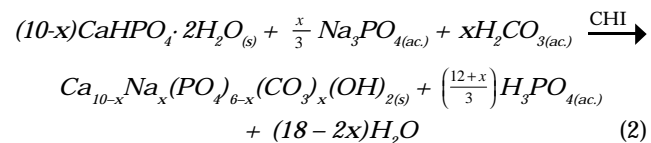
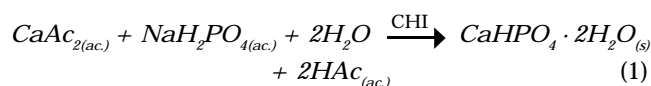
quitosana/hidroxiapatita deficiente en calcio (CHI/CDHA), a partir de disoluciones salinas precursoras de calcio y fósforo diferentes a las reportadas (que evitan la degradación por hidrólisis de la estructura final del composite, intrínseca del empleo de disoluciones ácidas o básicas), las que son mezcladas inicialmente con CHI en ácido acético, para lograr una nucleación (formación del hidrógenofosfato dihidratado de calcio, DCPD) y precipitación *in situ* de los cristales de la fase inorgánica (HAp) dentro de la matriz polimérica para lograr mayor homogeneidad de los sistemas preparados y obtener un nuevo material para sustitución ósea, con ventajas de biocompatibilidad, osteoconducción, bioactividad y biodegradabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de composites de quitosana/hidroxiapatita (CHI/HAp)

Se utilizó quitosana de langosta (*Panulirus argus*, $M_v = 1,4 \cdot 10^5$ g/mol, grado de desacetilación = 96,3 %) obtenida en el laboratorio. El resto de los reactivos procedieron de PANREAC, España.

La obtención de los composites de CHI/HAp se realizó en dos etapas: precipitación *in situ* del hidrógenofosfato de calcio dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), y posterior hidrólisis de este a HAp [$\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$], cuyas reacciones pueden formularse como sigue:



Se prepararon tres composiciones de composite con diferentes razones en peso CHI/HAp: 20/80, 50/50 y 80/20, mediante el procedimiento siguiente: se adicionan disoluciones de NaH_2PO_4 5 % en peso (pH próximos a 4) y CaAc_2 5 % en peso (pH ajustado a 5 con HAc glacial), al volumen requerido de disolución de CHI 3 % en peso en HAc 2 % en peso (pH próximos a 4) para lograr la proporción final deseada de CHI/HAp. Se deja agitando hasta el día siguiente a temperatura ambiente. La suspensión resultante se precipita en forma de perlas mediante goteo sobre una disolución de NaOH en metanol 10 %. Las esferas de $\text{CHI/CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ obtenidas se dejan reposar como mínimo 30 min y después se separan por decantación y se lavan cuatro veces con agua fría y caliente, alternadamente. Posteriormente, se surgen en una disolución saturada de Na_3PO_4 (pH \approx 12 a 13), se le añade una disolución de tripolifosfato de sodio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) 1 % (en proporción en volumen de 1 : 1) y se dejan a 60 °C durante 72 h, agitándolas de cuando en vez. A las 72 h se separan las esferas de CHI/HAp por filtración, se lavan hasta neutralidad y se secan por liofilización.

Caracterización de los composites de quitosana/hidroxiapatita (CHI/HAp)

Análisis morfológico

La forma de los geles de composites obtenidos por coacervación y el aspecto de estas muestras después de la liofilización, se observó mediante una Lupa Nikon SMZ 1 000 acoplada a una cámara de video Sony CCD - IRIS.

Las micrografías correspondientes a los cristales de la fase inorgánica antes (DCPD) y después de la hidrólisis con Na_3PO_4 (HAp), obtenidas en iguales condiciones que los composites, pero en ausencia de CHI, fueron tomadas con un microscopio óptico ZEISS Axiotech a 500x.

Espectroscopia IR

Los espectros IR de los composites y de sus componentes puros, se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR Bruker Tensor 27 con el programa de computación OPUS, en el intervalo de 4 000 a 400 cm^{-1} , empleando la técnica de pastilla de KBr para la preparación de las muestras.

Difracción de rayos X (DRX)

Los análisis fueron realizados en el difractómetro Bruker AXS D8 Advance con rotación de la muestra. La corriente del ánodo fue de 40 mA, el voltaje de 40 kV y la radiación CuK_α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). Las mediciones se realizaron en un intervalo desde 5 hasta 80° (2θ) y un intervalo angular o paso del goniómetro de 0,01° y con un tiempo de conteo de 0,5 s. Las muestras se prensaron en forma de pastillas para su análisis.

Análisis térmico

La caracterización termogravimétrica fue realizada en un sistema de análisis térmico simultáneo STA 409 C Jupiterâ (NETZSCH, Alemania) con corriente de aire, a una velocidad de flujo de aire de 200 cm^3/min , con una velocidad de calentamiento de 2 $^\circ\text{C}/\text{min}$, utilizando un termopar de Pt/Rh y referencia de alúmina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de composites de CHI/HAp. Análisis morfológico

Las tres composiciones seleccionadas de composites de CHI/HAp fueron obtenidas en forma de esferas, debido al método de coacervación empleado. No obstante, a medida que aumenta la composición de la fase inorgánica, la forma de las partículas es más irregular y para la composición CHI/HAp: 20/80 tienen una apariencia de partículas más pequeñas e irregulares. Asimismo, las muestras de mayor contenido de CHI presentaban una morfología esférica más perfecta (Fig. 1a), resultado lógico de esperar teniendo en cuenta la reconocida capacidad de la quitosana de formar partículas esféricas en las condiciones empleadas. Esta forma se conserva aún después del secado por liofilización (Fig. 1b).

Las diferencias morfológicas entre el precursor $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y la fase inorgánica final, HAp, se pudieron analizar a través de las micrografías de los geles de las muestras, antes y después de la hidrólisis con Na_3PO_4 (Fig. 2). Se pudo apreciar que en la primera etapa la fase inorgánica que precipita es $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, en forma de

cristales aplanados característicos. Sin embargo, después de la hidrólisis con Na_3PO_4 se observan cristales, homogéneamente dispersos, en forma de agujas que son característicos de apatita. La morfología de la fase apatítica obtenida se diferencia de la reportada en trabajos anteriores para la HAp estequiométrica, la cual se presenta en forma de placas con similar forma macroscópica a la del $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de partida.⁹⁻¹¹

Espectroscopia Infrarroja

Los espectros IR de los composites (Fig. 3) presentaron las bandas características de la quitosana, a través de las bandas a 1 657 (Amida I) y 1 597 (doblaje del grupo $-\text{NH}_2$), típicas de la quitosana. El espectro FTIR mostró también, los picos de absorción característicos de la hidroxiapatita, además de la presencia de sustitución por carbonato.⁸

Las bandas a 1 024 y 960 cm^{-1} han sido asignadas a las vibraciones de estrechamiento de los iones PO_4^{3-} y las bandas a 605 y 568 cm^{-1} , a las vibraciones de deformación de los iones fosfato. La banda observada a 1 101 cm^{-1} pudo asignarse al anión HPO_4^- de la fase mineral. La presencia de bandas en el intervalo de 1 500 a 1 400 cm^{-1} , conjuntamente con la banda a 874 cm^{-1} , indica la presencia de iones carbonato en la apatita.^{2,8-10,12}

Como el mineral del hueso humano contiene una cantidad importante de carbonato (4 a 8 % en peso), la presencia de carbonato en los composites CHI/HAp resulta ventajosa, ya que incrementa la bioactividad de la apatita, lo que puede contribuir a una mayor osteoconducción en la implantación. Adicionalmente, la hidroxiapatita obtenida en estas condiciones, presentó poca cristalinidad, lo que se pudo corroborar por la existencia en el espectro de solo dos picos alrededor de los 600 cm^{-1} , en lugar de tres de apatitas que aparecen en diferentes reportes para una fase más cristalina como la HAp estequiométrica.²

Análisis térmico

Las curvas termogravimétricas (TG), térmicas diferenciales (ATD) y termogravimétricas diferenciales (DTG) de los sistemas de las diferentes composiciones (Fig. 4), permitieron observar las tres etapas fundamentales de descomposición de la quitosana.¹³⁻¹⁵

En la primera etapa, tiene lugar un cambio endotérmico en el que se produce una pérdida de peso asociada a la pérdida de H_2O del sistema. Posteriormente, el segundo intervalo de temperatura se caracteriza por un proceso exotérmico complejo en el que se produce la deshidratación de los anillos sacáridos, despolimerización y descomposición de las unidades acetiladas y desacetiladas del polímero. Finalmente, la

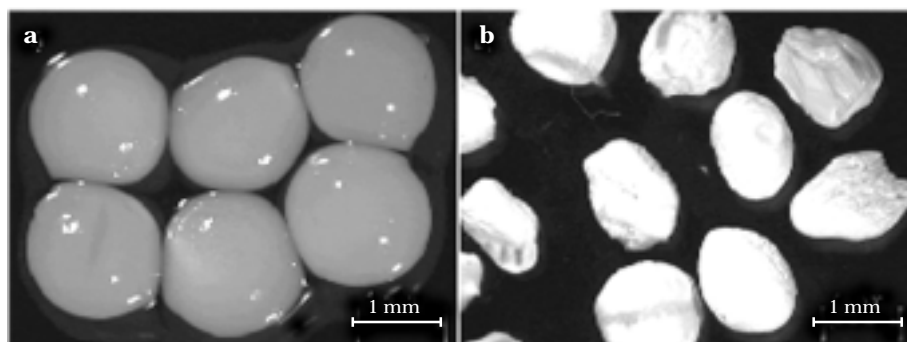


Fig. 1. Composites de CHI/HAp: 80/20 en forma de geles (a) y después de la liofilización (b).

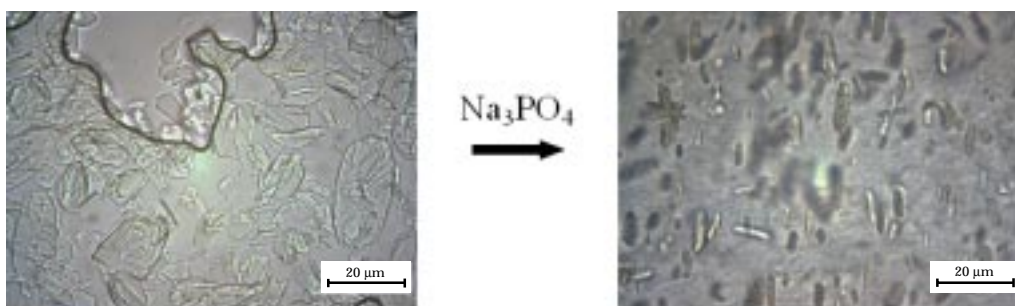


Fig. 2. Micrográficas ópticas ($\times 500\times$) correspondientes a los cristales de la fase inorgánica antes (DCPD) y después de la hidrólisis con Na_3PO_4 (HAp) en ausencia de CHI.

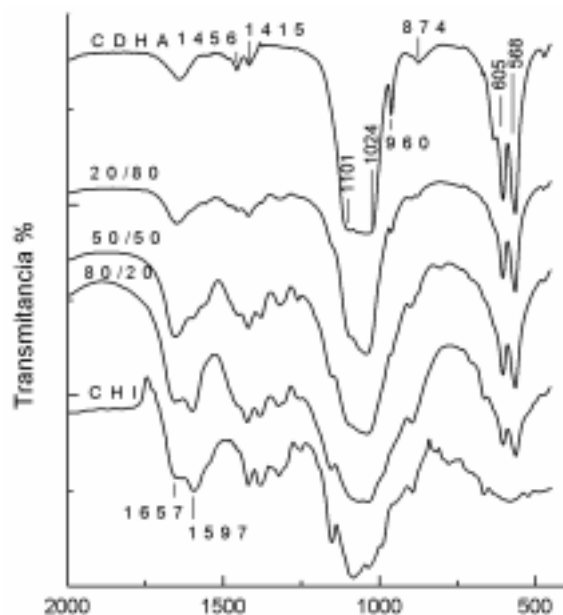


Fig. 3. Espectros FTIR de la hidroxiapatita, la quitosana y los tres composites preparados.

tercera etapa de pirólisis se relaciona con la descomposición oxidativa de los residuos de quitosana.¹⁶

A partir de los termogramas obtenidos (Fig. 4), se pudo apreciar que al variar la composición de las muestras, las curvas termogravimétricas y térmicas diferenciales fueron desplazadas a diferentes temperaturas, de modo que, tanto las temperaturas máximas de las curvas de DTG como los intervalos de temperatura correspondientes a cada etapa difieren (Tabla 1), lo que es indicativo de la existencia de interacción entre la matriz de quitosana y la fase apatítica.⁸ Esto puede deberse a que, al mezclar la quitosana con otros compuestos como la hidroxiapatita, disminuye su cristalinidad, el ordenamiento de las cadenas poliméricas y por ende, se desestabiliza el compuesto.¹⁶ Es por ello que en la medida que aumenta el contenido de CHI en los composites, estos resultan más estables térmicamente, lo que se evidencia en el incremento de las temperaturas (Tabla 1).

El porcentaje de pérdida de peso final se incrementó, como era de esperar, a medida que el contenido de quitosana era mayor (Tabla 2). Este resultado está en concordancia con los de Murugan *et al.*, quienes obtuvieron una pérdida de peso total proporcional a la concentración de CHI incorporada a los composites preparados.²

A partir de la suma de la pérdida de peso de la segunda y tercera etapas correspondientes a la descomposición propia de la CHI, teniendo en cuenta el residuo

obtenido a 580 °C de la HAp y considerando la adición de ambas fases como el 100 % de toda la fase orgánica e inorgánica presente, se pudieron determinar las composiciones finales o porcentuales resultantes de cada una de las fases en los sistemas preparados, así como la relación final de los composites de CHI/HAp, las cuales se corresponden con las composiciones de las mezclas iniciales dada la similitud encontrada entre la composición que teóricamente se pretendía preparar y las relaciones finales de los composites obtenidos (Tabla 2). Este resultado demuestra la efectividad del método empleado en el presente trabajo.

Difracción de rayos X (DRX)

Fueron obtenidos los patrones de difracción de rayos X de los composites, la quitosana de partida y la hidroxiapatita preparada de igual forma que la descrita para los composites, pero en ausencia de quitosana (Fig. 5). Para comprobar la presencia de la fase de hidroxiapatita esperada se muestra el patrón de rayos X reportado en la base de datos PCPDFWIN-98 de la CDHA, cuya ficha cristalográfica es la 46 - 0 905.

Del análisis de los difractogramas de rayos X para los composites de CHI/HAp: 80/20, 50/50, 20/80 y la CHI pura (Fig. 5), se evidenció un elevado contenido de componente amorfo perteneciente a la CHI.¹⁷⁻¹⁹ También se pudo apreciar la presencia de CDHA en los composites,

Tabla 1. Resultados de TG, ATD y DTG.

Composición teórica	Etapas descomposición	Máximo DTG (°C)	ΔT
CHI/HAp 20/80	Primera	36	30-140
	Segunda	242	200-295
	Tercera	326	313-372
CHI/HAp 50/50	Primera	47	35-150
	Segunda	235	210-327
	Tercera	449	383-520
CHI/HAp 80/20	Primera	69	30-150
	Segunda	270	235-405
	Tercera	458	425-718

Tabla 2. Resultados de pérdidas de peso.

CHI/Hap teórico	Residuo a 580 °C			CHI/Hap Final
	H ₂ O	CHI (%)	(%)	
20/80	5,6	17,2	77,2	18,2/81,8
50/50	6,5	45,6	47,9	48,8/51,2
80/20	6,9	69,43	23,66	74,6/25,4

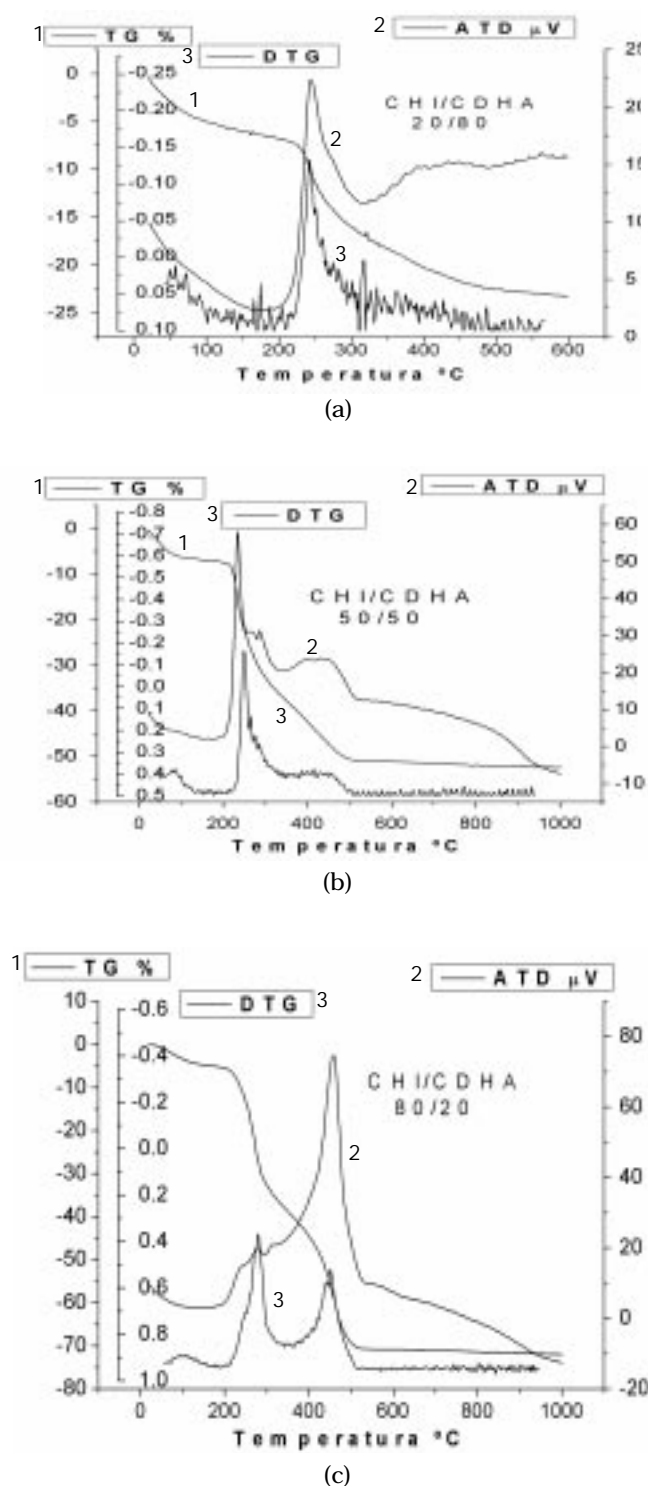


Fig. 4. Curvas termogravimétrica (TG), de análisis térmico diferencial (ATD) y termogravimétrica diferencial (DTG) de los composites. a) 20/80. b) 50/50. c) 80/20.

pues en todos se destacan las líneas de mayor intensidad de la fase hidroxiapatita esperada: $2\theta = 31,7^{\circ}$ (211); $32,2^{\circ}$ (112); $32,8^{\circ}$ (300). La posible obtención de la fase hidroxiapatita esperada, pudiera justificarse además, por la presencia de iones sodio en gran concentración en el medio de hidrólisis y por la escasa cristalinidad, observada a través del ensanchamiento de los picos de difracción, lo que indica el pequeño tamaño de los cristales de la apatita formada *in situ*.

Además la hidroxiapatita (JCPDF 9 - 432) y una pequeña cantidad de β -CaNaPO₄ (JCPDF 29 - 1 193), esta última, mezcla de β -TCP con los iones sodio del medio

de hidrólisis, fueron las fases cristalinas detectadas por difracción de rayos X en los residuos después de calcinar los composites a 1 000 $^{\circ}C$ durante 15 h. Según se refiere, la aparición de otras fases fosfato cálcicas cuando se calcina la HAp, indica que la fase mineral difiere de la hidroxiapatita estequiométrica.¹²

De este modo, mediante este método de preparación de las muestras *in situ* a bajas temperaturas, que además resulta adecuado por la sencillez de la síntesis, es posible obtener composites con las características morfológicas, microestructurales y composición deseadas, obteniendo como fase inorgánica mayoritaria la esperada CDHA, lo que ratifica la efectividad y ventajas en relación con otras técnicas, de la novedosa técnica biomimética en la obtención de composites de quitosana con fosfatos de calcio como la hidroxiapatita, pues intentando imitar la naturaleza ósea, se obtienen pequeños cristales de una hidroxiapatita no estequiométrica, deficiente en calcio y poco cristalina dentro de una matriz polimérica de quitosana que exhibe una buena interacción entre las diferentes fases.^{12,20,21}

CONCLUSIONES

Se prepararon composites de CHI/CDHA con una relación de componentes 20/80, 50/50 y 80/20 mediante un nuevo método caracterizado por la formación *in situ* de cristales pequeños de CDHA a partir de CaHPO₄ · 2H₂O dentro de una matriz polimérica de CHI. Los espectros FTIR de los composites evidenciaron la presencia de las fases principales (CHI y CDHA) y también de carbonato asociado a la apatita, lo cual resulta ventajoso, para lograr una mayor osteoconducción de estos sistemas. El análisis térmico mostró la existencia de interacción entre la matriz y el componente inorgánico, así como una correspondencia aproximadamente directa de la composición de la mezcla inicial con la del composite resultante, lo que permite confirmar la efectividad del método empleado. Los patrones de difracción de rayos X de los composites permitieron verificar la presencia de la fase de hidroxiapatita esperada, CDHA.

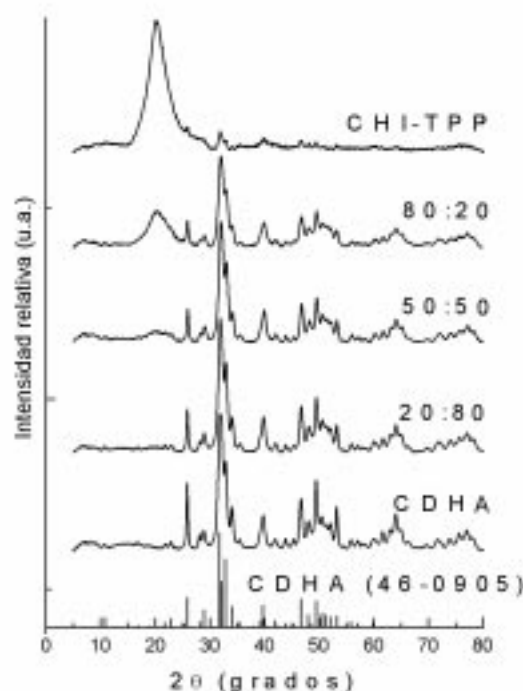


Fig. 5. Patrones de difracción de rayos X de los componentes individuales (CHI y CDHA), los composites y patrón reportado para CDHA (46-0 905).

El ensanchamiento de los picos de DRX es indicativo del pequeño tamaño de los cristales de la apatita formada *in situ*.

En general, se pudo comprobar, que el método de precipitación *in situ* resulta más ventajoso que los otros en que se mezcla quitosana y polvos de apatita, ya que se logran sistemas donde los cristales de hidroxiapatita no estequiométrica, deficiente en calcio y poco cristalina se encuentran homogéneamente dispersos dentro de una matriz polimérica de quitosana exhibiendo una buena interacción entre ambas fases, lo que resulta ventajoso para lograr una mayor biodegradabilidad, bioactividad y osteoconducción del sistema estudiado en su futuro empleo como sustituto óseo.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto Internacional Conjunto de la Real Sociedad de Reino Unido "Development of Chitosan /Calcium phosphate-based Bone Implants and Scaffolds", por el financiamiento de los trabajos investigativos realizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Gallardo A., Aguilar M.R., Elvira C., Peniche C. and San Román J. Chitosan based microcomposites from biodegradable microparticles to self-curing hydrogels. In *Biodegradable Systems in Tissue Engineering*. Reis R. and San Román J. (ed.) Boca Ratón, EE. UU., CRC Press, 145-162, 2005.
- Murugan R. and Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. **Biomaterials**, **25**, 3829-3835, 2004.
- Seal B.L., Otero T.C. and Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Mat. Sci. Eng. R.**, **34**, 147-230, 2001.
- An Y.H., Woolf S.K. and Friedman R.J. Pre-clinical *in vivo* evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. **Biomaterials**, **21**, 2635-52, 2000.
- Mano J.F., Sousa R.A., Boesel L.F., Neves N.M. and Reis R.L. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacent: state of the art and recent developments. **Composites Science and Technology**, **64**, 789-817, 2004.
- Yamaguchi I., Tokuchi K., Fukusaki H., Koyama Y., Takakura K., Monma H. and Tanaka J. Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxiapatite nanocomposites. **J. Biomed. Mater. Res.**, **55**, 20-27, 2001.
- LeGeros R.Z. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Chapter 2. Biologically Relevant Calcium Phosphates: Preparation and Characterization, First Edition, Howard M. Myers, New York, 4-45, 1991.
- Redepenning J., Venkataraman G., Chen J. and Stafford N. Electrochemical preparation of chitosan/hydroxyapatite composite coatings on titanium substrates. **J. Biomed. Mat. Res.**, **66A**, 411-416, 2003.
- Granja P.L., Silva A.I.N., Borges J.P., Barrias C.C. and Amaral E.F. Preparation and Characterization of Injectable Chitosan-Hydroxyapatite Microspheres. **Key Engineering Materials**, **254-256**, 573-576, 2004.
- Joschek S., Nies B., Krotz R. and Gopferich, A. Chemical and Physicochemical Characterization of Porous Hydroxyapatite Ceramics made of Natural Bone. **Biomaterials**, **21**, 1645, 2000.
- Murugan R., Sampath Kumar T.S., Yang F. and Ramakrishna S. Hydroxyl Carbonateapatite Hybrid Bone Composites Using Carbohydrate Polymer. **Journal of Composite Materials**, **39**, 1159-1167, 2005.
- Peña J., Izquierdo-Barba I., Martínez A. and Vallet-Regí M. New method to obtain chitosan/apatite materials at room temperature. **Solid State Sciences**, **8**, 513-519, 2006.
- Finisio M.R., Josué A., Fávère V.T. and Laranjeira M.C.M. Synthesis of calcium-phosphate and chitosan bioceramics for bone regeneration. **Anais Academia Brasileira de Ciencias**, **73**, 525-532, 2001.
- Pang X. and Zhitomirsky I. Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatitechitosan coatings. **Materials Characterization**, **58**, 339-348, 2007.
- Peniche-Covas C., Argüelles-Monal W. and San Román J. A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and mercaptan derivate of chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, **39**, 21-28, 1993.
- Marin V., Ng C., Wilke M., Tiersch B., Fratzl P. and Peter M.G. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials. **Biomaterials**, **26**, 5414-5426, 2005.
- Di Martino A., Sittering M. and Risbud M.V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, **26**, 5983-5990, 2005.
- Xu H.H.K., Simon Jr.C.G. Fast setting calcium phosphate - chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. **Biomaterials**, **26**, 1337-1348, 2005.
- Carey L.E., Xu H.H.K., Simon C.G., Takagi S. and Chow L.C. Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. **Biomaterials**, **26**, 5002-014, 2005.
- Liu H. and Webster T.J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**, **28**, 354-369, 2007.
- Yang Y.M., Hu W., Wang X.D. and Gu X.S. The controlling biodegradation of chitosan fibers by *N*-acetylation *in vitro* and *in vivo*. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, **18**, 2117-2121, 2007.