

Recubrimientos de quitosano/fosfato de calcio obtenidos por electrodeposición sobre una aleación de titanio

Chitosan/calcium phosphate coating obtained by electrodeposition on titanium alloy

Darío Yesid Peña Ballesteros Hugo Armando Estupiñán Durán, Elcy María Córdoba Tutta, Ricardo Martínez, Custodio Vásquez Quintero*

*Universidad Industrial de Santander, Grupo de Investigaciones en Corrosión, Kilómetro 7, vía Refugio UIS. Guatiguará, Piedecuesta, Santander, Colombia

(Recibido el 27 de agosto de 2009. Aceptado el 12 de abril de 2010)

Resumen

Los recubrimientos de fosfato de calcio en Ti6Al4V como implantes ortopédicos son conocidos por acelerar el crecimiento óseo y mejorar la fijación del hueso. La deposición electrolítica de estos compuestos bioactivos ha presentado mayores ventajas que los recubrimientos obtenidos por métodos convencionales. Este método electrolítico ha facilitado la posibilidad de adicionar quitosano a la solución de iones calcio y fosfato y fijar este compuesto, funcional y estructuralmente. De esta forma se han obtenido, compuestos de fosfatos de calcio-quitosano sobre un sustrato de Ti6Al4V ELI por electrodeposición catódica, los cuales se han caracterizado morfológica y químicamente, mediante SEM-EDX, DRX y FTIR, para determinar la estructura y asociaciones químicas entre los fosfatos de calcio y el quitosano. Además, se evaluó por EIE, la incidencia de la densidad de corriente, el tiempo de electrodeposición y la concentración de quitosano en solución sobre la resistencia a la polarización de los sustratos recubiertos. Se emplearon circuitos equivalentes para modelar el comportamiento fisicoquímico de los recubrimientos desde un punto de vista electroquímico.

----- *Palabras clave:* Recubrimientos bioactivos, hidroxiapatita (HA), quitosano, EIS, electroquímica

* Autor de correspondencia: teléfono: + 57 + 4 + 634 40 00 ext. 2420, fax: + 57 + 4 + 632 04 71, correo electrónico: dypena@uis.edu.co (D. Y. Peña)

Abstract

Calcium phosphate coatings in orthopedic implants Ti6Al4V are known to accelerate bone growth and improve the fixation of bone. Electrolytic deposition of bioactive compounds has provided greater advantages than the coatings obtained by conventional methods. The electrolytic method has facilitated the ability to add chitosan to the solution of calcium and phosphate ions and fix this compound, functionally and structurally. In this way, composites of calcium phosphate-chitosan on a substrate Ti6Al4V ELI has been obtained by cathodic electrodeposition, which are morphologically and chemically characterized by SEM-EDX, XRD and FTIR, showing the chemical structure and associations between calcium phosphate and chitosan. Furthermore, the impact of the current density, electrodeposition time and the concentration of chitosan solution on the polarization resistance of coated substrates obtained were evaluated by EIS. Equivalent circuits were used to model the physicochemical behavior of the coatings from an electrochemical view point.

----- **Keywords:** Bioactive coatings, hydroxyapatite (HA), chitosan, EIS, electrochemical

Introducción

El desarrollo de técnicas de modificación superficial en el campo de los biomateriales, ha permitido producir recubrimientos sobre sustratos de aleaciones de titanio, resistentes al desgaste y a la corrosión por fluidos corporales, sin interferir en sus excelentes propiedades mecánicas. Los principales métodos usados para tal fin son: sol-gel, plasma *spray* y la deposición electroquímica de recubrimientos, Por lo general, estos recubrimientos están compuestos de hidroxiapatita HAP ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), ya que el principal componente mineral de tejido óseo es este compuesto, con lo cual se puede obtener una mayor oseointegración entre el hueso y la prótesis implantada.

Mediante el método de electrodeposición de hidroxiapatita a partir de precursores iónicos en solución, se obtienen recubrimientos bastante homogéneos sobre piezas de formas complicadas. Esta técnica se basa en el uso de los siguientes elementos: una celda electrolítica, un cátodo y un ánodo, un electrolito que actúa como conductor iónico, el cual contiene los elementos que se quieren depositar y una fuente de potencia

externa, a la cual estarán unidos los electrodos por medio de conductores eléctricos, generando la diferencia de potencial necesaria para llevar a cabo la deposición de los recubrimientos.

Por medio de esta técnica, se han obtenido diversos recubrimientos, generalmente a base de fosfatos de calcio con adecuadas propiedades químicas superficiales y de biocompatibilidad [1,2]. No obstante, se ha hecho necesaria la introducción en los recubrimientos, de algunos elementos bioactivos, tales como polisacáridos, entre los cuales, se encuentra el quitosano, el cual, ha mostrado que puede mejorar la proliferación celular sobre la superficie de los recubrimientos. El quitosano es un polisacárido semidegradable de origen natural conocido por, inducir una mayor oseointegración de las prótesis [3]. En la actualidad, la tendencia es la utilización de implantes recubiertos con materiales de origen natural, por dos razones principales: primero, porque tales materiales promueven una mejor y más rápida cicatrización, exhibiendo una mayor compatibilidad con el tejido humano. En segundo lugar, porque estos materiales al biodegradarse, no generan productos tóxicos al cuerpo humano. En este sentido, el *quitosano* ha sido combinado

con varias formas de fosfatos de calcio con el objetivo de mejorar la reacción de integración del implante y evitar el rechazo por la generación de productos citotóxicos, generando una mejor regeneración del hueso [3,4].

El titanio es usado como un biomaterial, debido principalmente a que tiene la habilidad de permitir una unión íntima entre el implante y el tejido óseo, además, sus propiedades superficiales, relacionadas con la formación y configuración de óxidos, pueden ser variadas en un rango relativamente amplio [5]. Otro aspecto, que hace del titanio uno de los materiales más importantes para la aplicación en implantes biomédicos y dentales, es principalmente su excelente resistencia a la corrosión en muchos ambientes acuosos, debido a la formación espontánea de una capa pasiva, la cual es muy protectora [6].

Yokogawa et al, obtuvieron recubrimientos de fosfatos de calcio sobre derivados ricos en fósforo con quitín/*quitosano*, los cuales fueron tratados con Ca(OH)_2 y posteriormente sumergidos en SBF. El enriquecimiento en fósforo indujo a la formación de capas delgadas, formadas a partir de la hidrólisis parcial del grupo funcional PO_4 , las cuales estimularon el crecimiento de monocapas de fosfatos de calcio sobre la superficie, después de pocos días de inmersión en SBF. También, con cultivos celulares, evaluaron la biocompatibilidad de los recubrimientos, obteniendo buenos resultados en estas propiedades [7]. Muzzarelli et al, depositaron películas de quitosano a partir de una solución de acetato de quitosano, sobre una capa compuesta de hidroxiapatita y un vidrio bioactivo, por plasma *spray* sobre un sustrato de Ti6Al4V. Los resultados mostraron, proliferación celular positiva, y oseointegración [8]. Di Martino et al, revisaron el empleo del quitosano en la ingeniería de tejidos, teniendo en cuenta, el grado de desacetilación, el peso molecular del *quitosano* sobre la hidrofiliidad y las propiedades mecánicas biodegradación y biocompatibilidad de estructuras de *quitosano*, resaltando que el *quitosano* con mayor grado de desacetilación y peso molecular es el más

adecuado para aplicaciones en ingeniería de tejidos [9]. Seol et al, utilizaron esponjas porosas de quitosano fabricadas por liofilización para evaluar el crecimiento de células osteoblásticas. La densidad celular, la actividad de la fosfatasa alcalina y la deposición de calcio fueron monitoreadas por un periodo de 56 días. Los resultados mostraron que las esponjas de *quitosano* pueden ser utilizadas como un material de soporte efectivo para la formación *in Vitro* de hueso, en ingeniería de tejidos [10]. Wang et al. electrodepositaron y caracterizaron recubrimientos de fosfatos de calcio y *quitosano* sobre un sustrato de Ti6Al4V. Observaron que el *quitosano* disminuye el espesor y la rugosidad del recubrimiento. Con ensayos *in vitro*, obtuvieron una aceptable proliferación celular [11]. Pang et al, obtuvieron depósitos catódicos, relativamente uniformes de hidroxiapatita y *quitosano*, de aproximadamente, 50 μm de espesor, sobre sustratos de platino, aceros inoxidable y grafito. El método de deposición se basó en la fijación electroquímica del *quitosano* y en la deposición electroforética de las partículas de hidroxiapatita. Resultados de los ensayos electroquímicos mostraron un incremento en los valores de resistencia a la polarización, relacionados con el carácter protector del recubrimiento obtenido [12]. Wang et al, estudiaron la cinética de crecimiento de recubrimientos compuestos de fosfatos de calcio depositados electrolíticamente. Igualmente estudiaron el efecto de la densidad de corriente de deposición de *quitosano*, sobre la formación de los recubrimientos y notaron que el incremento de la densidad de corriente acelera el proceso de deposición y aumenta la cantidad de quitosano en el recubrimiento [13]. Tuzlakoglu et al, estudiaron la obtención, por métodos biomiméticos de capas de apatitas tipo óseas sobre fibras de *quitosano*, determinando la influencia de estos recubrimientos sobre la respuesta de células osteoblásticas [14].

En este trabajo se ha estudiado la estructura, morfología, composición y configuración fisicoquímica y estabilidad electroquímica de recubrimientos de HAP con quitosano, por medio

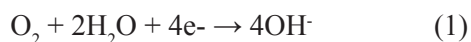
de FTIR, DSC, SEM-EDX, Tafel y EIS. Además, se examinaron los cambios que se generan en estas propiedades a partir de las reacciones de mineralización, cuando los recubrimientos son sometidos a inmersión en SBF.

Materiales y métodos

Probetas cilíndricas de Ti6Al4V de 12 mm de diámetro y 3 mm de espesor, fueron empleadas como sustratos para la obtención de los recubrimientos de quitosano/fosfato de calcio. Polvos de *quitosano* con un porcentaje de desacetilación $\geq 75\%$, fueron empleados para este fin. Se realizó la caracterización del sustrato seleccionado por medio de un análisis químico elemental por la técnica de espectrometría de fluorescencia de rayos X de energía dispersa. De igual manera, se realizaron análisis termogravimétricos (TGA) y análisis por calorimetría de barrido diferencial (DSC).

Las probetas fueron pulidas hasta papel abrasivo # 600, limpiadas ultrasónicamente con acetona y atacadas químicamente en una mezcla 1:1:1 de HCl, H₂SO₄ y H₂O. Las soluciones de deposición fueron preparadas con 1% en peso de *quitosano* disuelto en 1% en volumen de ácido acético, adicionando posteriormente, a soluciones supersaturadas de fosfatos de calcio, controlando un pH entre 8,3 y 8,6 a una temperatura de 60°C y una agitación de 600 rpm. El proceso se llevó a cabo por deposición catódica en forma galvanostática, empleando un electrodo de grafito como ánodo y los sustratos de Ti6Al4V como cátodos, conectados a una fuente de potencia regulada. Luego de este proceso, las muestras fueron retiradas, enjuagadas con agua destilada y secadas con aire caliente por diez minutos. El proceso de electrodeposición de la hidroxiapatita a partir de soluciones supersaturadas de fosfatos de calcio, según Kuo [15], consiste, básicamente en cuatro etapas:

- Reducción del O₂:



- Reducción del H₂PO₄⁻ y el HPO₄⁻²:



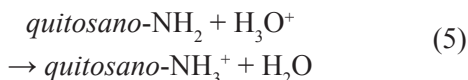
- Reducción del H₂O:



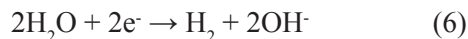
- *Migración de los iones Ca⁺²* hacia la superficie del cátodo para reaccionar con los iones 2PO₄⁻³ y OH⁻ para formar la HA (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂).

El proceso de electrodeposición del *quitosano* se basa en tres etapas:

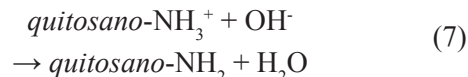
- Protonación en solución ácida: etapa en la cual, el grupo amino presente en la unidad básica de *quitosano* es cargado positivamente con los iones H⁺ presentes en la solución ácida en la cual se encuentra disuelto.



- Reacción catódica: reacción de reducción de las moléculas de H₂O sobre la superficie del cátodo para producir evolución de hidrógeno y grupos OH⁻, los cuales aumentan el pH alrededor del cátodo.



- Neutralización del *quitosano* cargado positivamente y la formación de un depósito insoluble sobre el sustrato catódico.



Se realizaron ensayos para evaluar la morfología, composición, estructura química, mediante SEM-EDX, FT-IR y DRX. Ensayos electroquímicos fueron realizados en un fluido corporal simulado, formulado por Kokubo et al [16], el cual consiste de un fluido inorgánico sin células, con concentraciones iónicas similares a las existentes en el fluido fisiológico humano, principalmente con iones calcio y fósforo, con el fin de simular la formación de la matriz extracelular apatítica, durante la fijación, crecimiento y diferenciamiento celular.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de composición por espectrometría de fluorescencia de rayos X de energía dispersa y los correspondientes valores de composición química para la aleación de Ti6Al4V ELI reportados en la norma ASTM F136 [17].

Tabla 1 Composición química del Ti6Al4V

	Fe máx	S Máx	Al	V	Ti
(%)	0,183	0,342	6,102	4,119	88,66
ASTM F136	0,25	-	5,5- 6,5	3,5- 4,5	Balance

Los resultados obtenidos muestran que el material corresponde químicamente con la aleación Ti6Al4V ELI ASTM F136.

Empleando un tiempo de electrodeposición de 4 horas, una densidad de corriente de 200 mA/cm² y una variación de la concentración de quitosano entre 0,05 y 0,25 g/L; se obtuvieron los resultados de Difracción de Rayos X (DRX), mostrados en la figura 1.

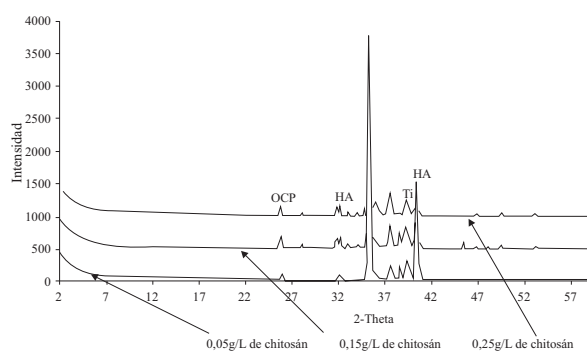


Figura 1 DRX de las muestras obtenidas a 200Ma, 4h y entre 0,05 y 0,25 g/L de quitosano

Los patrones de DRX observados en la figura 1, muestran la presencia de hidroxiapatita y fosfato octacálcico en las tres condiciones evaluadas. Se empleó el criterio del ancho del pico a la altura media (FWHM) de la curva de difracción, el cual relaciona el aumento de la cristalinidad, de

una forma cualitativa y comparativa, mediante la medición de la altura media de la intensidad de la curva de difracción, con la disminución del espesor de los cristales. En otras palabras aplicable a este análisis, cuando el ancho de la curva de difracción se incrementa, se disminuye la cristalinidad del depósito. En la figura 2 se muestra el análisis gráfico propuesto.

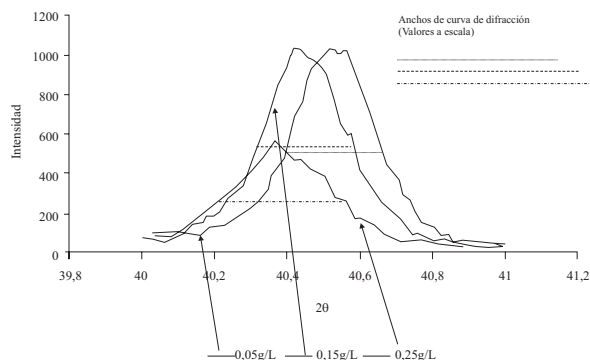


Figura 2 Comparación de los anchos de picos medios de difracción en las diferentes composiciones de quitosano empleadas

Utilizando la reflexión de máxima intensidad de la hidroxiapatita presentada en los difractogramas, entre $40,2^\circ < 2\theta < 40,8^\circ$, se observa una disminución en la cristalinidad del recubrimiento cuando se incrementa la cantidad de quitosano en la solución.

Se realizaron análisis por infrarrojo FT-IR a una muestra de quitosano pura, e igualmente a muestras de recubrimiento de fosfato de calcio-quitosano con porcentajes de 0,05, 0,15 y 0,25 g/L del polisacárido con el fin de determinar mediante el análisis de sus espectros, las bandas correspondientes a las tensiones de los grupos funcionales presentes, corroborando la presencia del polímero en los recubrimientos depositados. En la figura 3 se puede observar para el quitosano puro las bandas de intensidad media correspondientes a vibraciones de estiramiento de NH₂ ubicadas en la región de 3500-3400 cm⁻¹ traslapadas con las bandas de vibración de alargamiento del OH entre 3700 y 3000 cm⁻¹, y la banda de absorción de intensidad media a alta, relativas a las vibraciones de deformación del grupo amino a una frecuencia

entre 1650-1580 cm^{-1} . Bandas de alargamiento del CH_2 en la región de 3000 a 2800 cm^{-1} , y bandas de flexión del enlace C-OH en el rango de 1450-1300 cm^{-1} . También están presentes, bandas de absorción de intensidad media a débil para el enlace C-N de las aminas alifáticas primarias en la región de 1250 a 1020 cm^{-1} . En los espectros de infrarrojo de los sustratos recubiertos a diferentes concentraciones de quitosano, se observan las bandas propias de las vibraciones correspondientes a los enlaces de NH_2 , lo cual confirma la presencia del polímero en los recubrimientos. Por otro lado, también se puede apreciar el pico correspondiente al enlace PO_4^{-3} a 1030 cm^{-1} , proveniente de los fosfatos de calcio presentes.

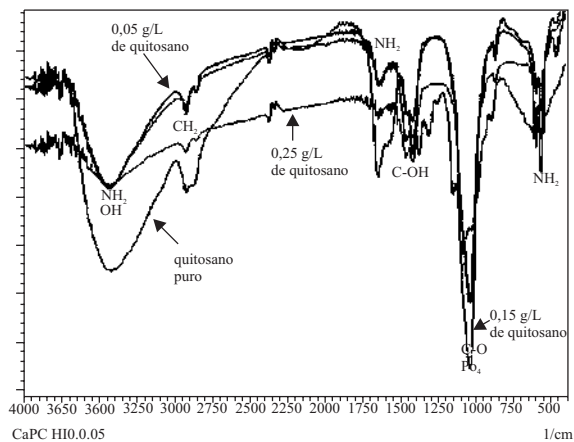


Figura 3 Espectro FT-IR del quitosano puro y los recubrimientos obtenidos a los diferentes porcentajes de quitosano

La caracterización electroquímica se realizó con el propósito de evaluar la estabilidad de los recubrimientos obtenidos a las diferentes concentraciones de quitosano en la solución de electrodeposición. En la figura 4 se muestra la caracterización por la técnica de polarización potenciodinámica a los diferentes recubrimientos. Se observan potenciales de corrosión en el rango entre -0,5 y -0,7 voltios, en el cual, la tendencia a la degradación de los materiales obtenidos disminuye en el siguiente orden de concentración de quitosano: 0,05 - 0,10 - 0,15 - 0,25 - 0,20 g/L de quitosano. De igual forma, se observó esta tendencia con las densidades de co-

rriente de corrosión, indicando un efecto importante entre la presencia y la cantidad de quitosano en el recubrimiento y la estabilidad y cinética de disolución del material con el recubrimiento. Comportamientos similares de estabilidad, fueron observados con la diferentes concentraciones de quitosano empleadas, sin embargo, se presentan unas diferencias en estas curvas, específicamente en la región catódica, debido a que, al aumentar la concentración del polisacárido, se pasa de un comportamiento más pasivo a uno más activo a partir de 0,15 g/L de quitosano. Sin embargo, esta hipótesis da lugar a suposiciones erróneas, ya que la inestabilidad electroquímica y el aumento en la densidad de corriente de corrosión, pueden estar relacionados con un incremento en la bioactividad del Ti6Al4V recubierto con fosfato de calcio y quitosano, lo cual correspondería a una deducción más lógica. Esto se puede afirmar porque los rangos de potencial y de densidad de corriente entre las muestras con diferentes concentraciones de quitosano son muy pequeños, y estas pequeñas variaciones deberían estar más relacionadas a cambios de reactividad superficial producidos por la naturaleza reactiva de los compuestos que componen el recubrimiento, lo que puede beneficiar la reacción con el tejido óseo.

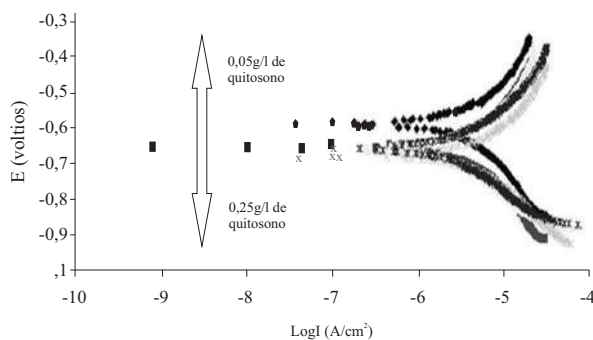


Figura 4 Curvas de polarización potenciodinámicas a diferentes concentraciones de quitosano

Para determinar los parámetros electroquímicos de los procesos farádicos y no farádicos que ocurren en la interfase sustrato-recubrimiento-electrolito, los cuales están relacionados con la bioactividad electroquímica, se realizaron ensayos de espectros-

copía de impedancia electroquímica a las muestras obtenidas con las diferentes concentraciones de quitosano. En la figura 5 se presentan los espectros de Impedancia (Nyquist), correspondientes a los recubrimientos obtenidos con 0,1 y 0,2 g/L de quitosano. En la figura 5 se observa claramente la similitud en los comportamientos electroquímicos, correspondientes a una y posiblemente, dos constantes de tiempo, las cuales disminuyen con la resistencia a la polarización, al aumentar la concentración de quitosano, confirmando que se presenta un aumento en la reactividad del recubrimiento, al adicionar más cantidad de quitosano. Al mismo tiempo se corrobora el análisis realizado por DRX, en el cual, a mayores cantidades de quitosano se presentó una menor cristalinidad. Los materiales de mayor carácter cristalino suelen presentar un mejor ordenamiento atómico-estructural presentando una energía libre superficial más baja, lo que implica que el material presenta menor tendencia a degradarse.

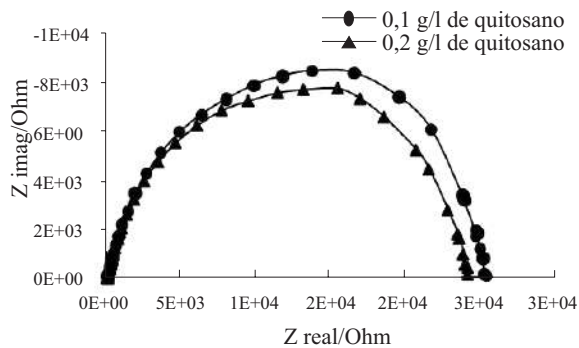


Figura 5 Espectros de Nyquist de los recubrimientos de fosfato de calcio-quitosano, a diferentes concentraciones

En la figura 6 se muestran los espectros de Bode de los recubrimientos obtenidos a 0,1 y 0,2 g/L de quitosano, se observa la posible presencia de dos constantes de tiempo muy traslapadas definidas en el rango de frecuencia entre 0,1 y 10.000 Hertz. Las pequeñas disminuciones en el ángulo de fase al aumentar la concentración de quitosano, confirman una posible reacción de disolución con un aumento en el pH local, un aumento en la conductividad cercana a la superficie

del recubrimiento y en términos generales, una mayor reactividad [18,19]. Estas dos constantes de tiempo fueron asumidas en un modelo de circuitos equivalentes propuesto, el cual permitió simular el comportamiento electroquímico del sistema resistencia a la solución, resistencia y capacitancia de la doble capa electroquímica en la interfase electrolito/recubrimiento y resistencia y capacitancia de la doble capa electroquímica en la interfase recubrimiento/metal. En la figura 7 se presenta el modelo propuesto. Capacitancias como elementos de fase constante, han sido empleados para representar las desviaciones en la transferencia de carga producidas por las irregularidades, tanto de la superficie del recubrimiento, como de la interfase metal/recubrimiento. Las dos constantes de tiempo descritas anteriormente, correspondientes a dos semiarcos traslapados en los espectros de impedancia, se representan en la figura 7 como dos sistemas RC en paralelo y estos a su vez, en serie con la resistencia del electrolito.

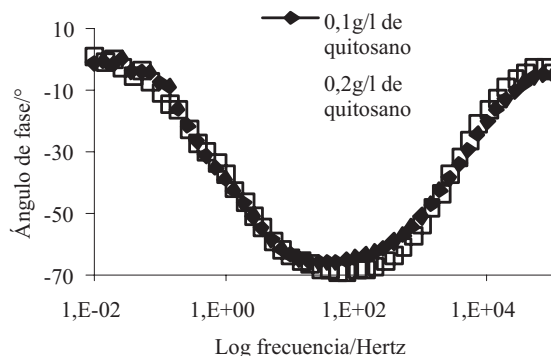


Figura 6 Espectro de Bode de los recubrimientos obtenidos a 0,1 y 0,2 g/L de quitosano

En la figura 8 se muestra el análisis morfológico realizado por SEM en las muestras obtenidas con 0,1 y 0,2 g/L de quitosano. Se observa un aumento en las irregularidades superficiales al aumentar la cantidad de quitosano, corroborando la inestabilidad superficial observada en los ensayos de DRX y en los ensayos electroquímicos. Estas irregularidades superficiales son primordiales en la intención de contar con propiedades que mejoren la fijación con el hueso en este tipo de recubrimientos.

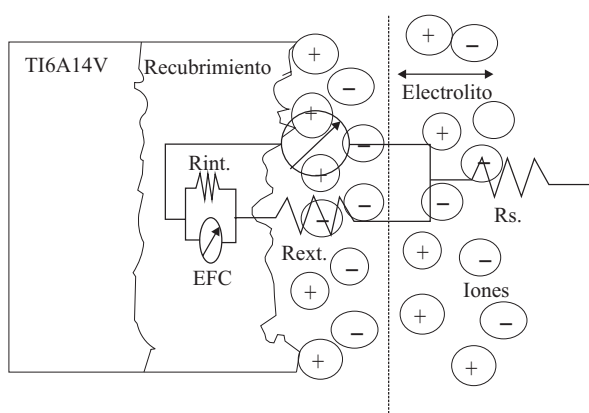


Figura 7 Modelo de circuitos equivalentes propuesto para representar los procesos de doble capa electroquímica obtenidos en los ensayos de EIE

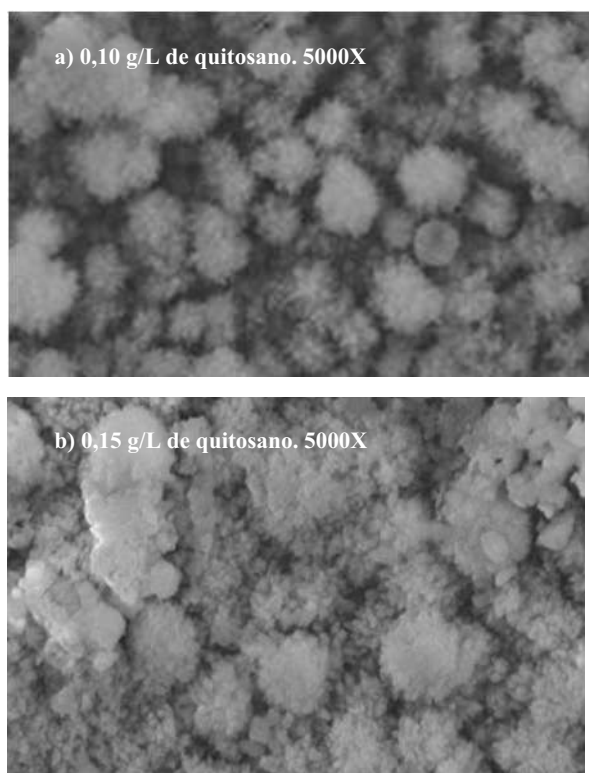


Figura 8 SEM de las muestras obtenidas con 0,1 a) y 0,2 g/L b) de quitosano

Conclusiones

Se obtuvieron recubrimientos de fosfato octacálcico-hidroxiapatita-quitosano por un método

de electrodeposición catódica sobre sustratos de Ti6Al4V F136. Estos recubrimientos presentaron una estructura, cuya cristalinidad disminuyó al aumentar la cantidad de quitosano empleado en la solución de electrodeposición. Los resultados de DRX confirmaron el efecto de la concentración del polisacárido sobre la variación de la cristalinidad. Estas deducciones fueron corroboradas mediante los ensayos de polarización potenciodinámica y espectroscopía de Impedancia Electroquímica, los cuales mostraron una menor estabilidad electroquímica en los recubrimientos obtenidos con mayor cantidad de quitosano. Pequeñas diferencias en los resultados electroquímicos, hacen suponer que el mecanismo activo presentado en las muestras obtenidas con mayor cantidad de quitosano, se haya presentado por un aumento en la reactividad superficial, lo cual se puede relacionar con una mayor bioactividad.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a COLCIENCIAS por el financiamiento de esta investigación. Proyecto con Código: 1102-403-20771, Contrato 055-2008

Referencias

1. J. Wang, P. Layrolle, M. Stigter, K. de Groot. "Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physiochemical characteristics and cell attachment". *Biomaterials*. Vol. 25. 2004. pp. 583-592.
2. T. M. Sridhar, U. Kamachi Mudali, M. Subbaiyan. "Preparation and characterization of electrophoretically deposited hydroxyapatite coatings on type 316L stainless steel". *Corrosion Science*. Vol. 45. 2003. pp. 237-252.
3. R. Sastre, S. de Aza, J. San Román. *Biomateriales. CYTED*. Faenza Editrice Ibérica S. L. San Román. 2003. pp. 109-128.
4. E. Lee, D. Shin, H. Kim, Y. Koh, J. Jang. "Membrane of hybrid chitosan-silica xerogel for guided bone regeneration". *Biomaterials*. Vol. 30. 2009. pp. 743-750.
5. B. Finke, F. Luethen, K. Schroeder, P. D. Mueller, C. Bergemann, M. Frant, A. Ohl, B. J. Nebe. "The effect of positively charged plasma polymerization on initial osteoblastic focal adhesion on titanium surfaces". *Biomaterials*. Vol. 28. 2007. pp. 4521-4534.

6. Y. Li, I. Lee, F. Cui, S. Choi. "The biocompatibility of nanostructured calcium phosphate coated on micro-arc oxidized titanium". *Biomaterials*. Vol. 29. 2008. pp. 2025-2032.
7. K. Teraoka, T. Nonami, Y. Doi, H. Taoda, K. Naganuma, Y. Yokogawa, T. Kameyama. "Hydroxyapatite implantation on the surface of pure titanium for orthopedic implants". *Materials Science and Engineering: C*. Vol. 13. 2000. pp. 105-107.
8. R. A. Muzzarelli, G. Biagini, A. De Benedittis, P. Mengucci, G. Majni, G. Tosi. "Chitosan-Oxychitin Coating for Prosthetic Materials". *Carbohydrate Polymers*. Vol. 45. 2001. pp. 35-41.
9. A. Di Martino, M. Sittinger, M. V. Risbud. "Chitosan: A versatile biopolymer for orthopedic tissue-engineering". *Biomaterials*. Vol. 26. 2005. pp. 5983-5990.
10. S. Yang-Jo, L. Jue-Yeon, P. Yoon-Jeong. "Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation". *Biotechnology letters*. Vol. 26. 2004. pp. 1037-1041.
11. J. Wang, J. Boer, K. De Groot. "Preparation and Characterization of Electrodeposited Calcium Phosphate/Chitosan Coating on Ti6Al4V Plates". *Journal of Dental Research*. Vol. 83. 2004. pp. 296-301.
12. X. Pang, I. Zhitomirsky. "Electrodeposition of Composite hydroxyapatite-chitosan films". *Materials Chemistry and Physics*. Vol. 9. 2005. pp. 245-251.
13. W. Jiawei. "Electrolytic deposition of calcium phosphate/chitosan coating on titanium alloy: growth kinetics and influence of current density, acetic acid, and chitosan". *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. Vol. 76. 2006. pp. 503-511.
14. K. Tuzlakoglu, R. L. Reis. "Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffold by a biomimetic spraying process". *J. Mater Sci: Mater. Med.* Vol. 18. 2007. pp. 1279-1286.
15. M. C. Kuo, S. K. Yen. "The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature". *Materials science & engineering C. Biomimetic and supramolecular Systems*. Vol. 8. 2002. pp. 153-160.
16. T. Kokubo, H. M. Kim. "Process of calcification on artificial materials". *Zeitschrift für Kardiologie*. Vol. 90. 2001. pp. 86-91.
17. ASTM, F136-08e1. *Specification for wrought Ti6Al4V ELI alloy for surgical implant applications*. ASTM International West Conshohocken. PA. 2008. DOI 10.1520/F036-08. www.astm.org.
18. R. Souto. "Degradation characteristics of hydroxyapatite coatings on orthopedic TiAlV in simulated physiological media investigated by electrochemical impedance spectroscopy". *Biomaterials*. Vol. 24. 2003. pp. 4213-4221.
19. M. Metikos-Hukovic, E. Tkal, A. Kwokal, J. Piljac. "An in Vitro study of Ti and Ti-alloys coated with sol-gel derived hydroxyapatite coatings". *Surface and Coatings Technology*. Vol. 165. 2003. pp. 40-50.