

# Composición de las disoluciones y parámetros de los procesos empleados en la aplicación de recubrimientos biomiméticos sobre titanio. Estado del arte

**Jesús Eduardo González Ruiz y Adrian Paz Ramos.\***

Departamento de Investigación y Desarrollo, Dirección de Química, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana. Correo electrónico: [jesus.gonzalez@cnic.edu.cu](mailto:jesus.gonzalez@cnic.edu.cu). \*Facultad de Química, Universidad de la Habana.

Recibido: 1ro de septiembre de 2008. Aceptado: 27 de abril de 2009.

Palabras clave: fluido corporal simulado, biomimético, recubrimiento, apatita.  
Key words: simulated body fluid, biomimetic, coating, apatite.

**RESUMEN.** En años recientes, muchos investigadores han fijado su atención en procesos que ocurren en organismos vivos debido a que en algunos casos resulta posible reproducirlos *in vitro*. Basado en dicho comportamiento, Tadashi Kokubo y cols. desarrollaron un método que permite obtener recubrimientos apatíticos en superficies bioactivas a partir de su inmersión en un fluido corporal simulado. En el trabajo se presenta una actualización del estado del arte del tema, haciendo énfasis en la composición de las disoluciones y en los parámetros del proceso empleados durante el tratamiento del titanio y de sus aleaciones. Como resultado del estudio, se constató que existe la tendencia a incrementar el contenido de iones calcio y fosfato en las disoluciones con el objetivo de acelerar el proceso de formación y posterior crecimiento del recubrimiento y que se utilizan concentraciones de dichos iones que superan hasta en 10 veces las presentadas por el fluido corporal simulado. La inclusión de cloruro de sodio, de sales portadoras de magnesio y de hidrógenocarbonato en las disoluciones también puede incidir favorablemente sobre la velocidad de deposición del recubrimiento y paralelamente afectar la cristalinidad de las estructuras apatíticas resultantes del tratamiento. Elevados contenidos de iones hidrógenocarbonato y magnesio en las disoluciones pueden generar estructuras amorfas en los recubrimientos. El pH y la temperatura de exposición también pueden influir significativamente sobre la deposición de los recubrimientos, contribuyendo a acelerarla o a retardarla.

**ABSTRACT.** In recent years, many researchers have focused their attention on processes that occur in living organisms because it is possible to reproduce *in vitro*. Based on this behavior, Tadashi Kokubo and colleagues developed a method for obtaining apatite coatings on bioactive surfaces from the immersion of the samples to be coated in a simulated body fluid. An update on the state of the art of this topic, emphasizing the composition of solutions and process parameters used during the treatment of titanium and their alloys is presented. As a result of the study it was possible to confirm that there is a tendency to increase the content of calcium and phosphate ions in solutions to accelerate of formation and subsequent growth of the coating. The use of these ion concentrations at levels that exceed 10 times as much as those presented by the simulated body fluid was reported. The inclusion of magnesium and hydrogen carbonate salts carriers and sodium chloride in the solutions can also affect positively the deposition speed of the coating and at the same time they can affect the crystallinity of the resulting apatite structures. High levels of hydrogen carbonate and magnesium ions in solutions generate amorphous structures in coatings. The parameters pH and temperature also have a significant influence on the deposition process helping to control the velocity of deposition process.

## INTRODUCCIÓN

Existen notables diferencias entre la composición química y de fases presentada por los biometales y la del tejido óseo. Es por ello que la inserción en el esqueleto humano de tales materiales puede redundar en la ausencia de una unión fuerte entre el hueso y el implante, reacciones a cuerpo extraño, corrosión de la superficie del dispositivo implantado, entre otros.<sup>1-3</sup>

Los recubrimientos bioactivos han revolucionado la implantología al crear superficies capaces de producir una unión fuerte y estable entre el implante y el tejido óseo circundante, brindando solución a una de las principales causas que limita la vida útil de estos dispositivos.

Existen diversos métodos para generar recubrimientos de cerámicas bioactivas sobre superficies metálicas: plasma *spray*, sol-gel, electrodeposición, tratamiento químico y otros.<sup>4-14</sup> Los primeros recubrimientos bioactivos se aplicaron mediante el método de plasma *spray* y generalmente, se encontraban constituidos por hidroxiapatita (HA).<sup>9-11</sup> Sin embargo, este método posee un grupo de inconvenientes relacionados con el empleo de elevadas temperaturas durante la deposición del recubrimiento, la incapacidad de recubrir homogéneamente superficies irregulares, la imposibilidad de tratar agujeros y sustancias poliméricas, afectaciones en la estabilidad de la hidroxiapatita constituyente del

recubrimiento (vinculadas a la cristalinidad de dicha fase y a la presencia de fases biodegradables) y limitada adherencia de las capas con los sustratos metálicos en algunos casos.<sup>1,15</sup>

Debido a los problemas antes enunciados, se desarrollaron métodos alternativos para obtener recubrimientos de Ca-P. A finales de los años ochentas y principios de los noventas del pasado siglo, un grupo de investigadores japoneses dirigidos por Tadashi Kokubo desarrolló el método biomimético, el cual consiste en la inmersión de las muestras a recubrir en un fluido corporal simulado (SBF por sus siglas en inglés).<sup>16,17</sup> Por sus constituyentes y por el contenido de estos, el SBF resulta similar a la componente inorgánica del plasma sanguíneo humano.<sup>18,19</sup> Además, la utilización del fluido corporal simulado se extiende a la evaluación de la bioactividad *in vitro* de biomateriales.<sup>18</sup>

El método biomimético se caracteriza por su flexibilidad, simplicidad tecnológica, posibilidad de obtener recubrimientos con similar composición química y de fases que la matriz inorgánica del hueso y además, por no requerir de instalaciones especiales y elevadas temperaturas para su implementación. Adicionalmente, se distingue por la capacidad que poseen sus depósitos de servir como soporte de sistemas de liberación de biomoléculas.<sup>20-25</sup> Es por ello que en los últimos años, instituciones e investigadores de reconocido prestigio internacional han dedicado importantes esfuerzos a su perfeccionamiento.

Los recubrimientos biomiméticos de Ca-P (fosfatos de calcio) son usados para mejorar la bioactividad superficial de biovidrios, polímeros bioactivos, cerámicas del sistema CaSiO<sub>3</sub>, gel de sílice, compuestos del sistema biocerámica-polímero y del titanio y sus aleaciones.<sup>17,24-39</sup>

El titanio y sus aleaciones han despertado un creciente interés entre los especialistas vinculados al diseño y construcción de implantes, debido a que combinan elevadas propiedades mecánicas con biocompatibilidad y bioactividad *in vivo*.<sup>40-44</sup> No obstante, requieren de períodos de tiempo prolongados para que se produzca la osteointegración y la recuperación del paciente implantado.<sup>1</sup> Diversos estudios han demostrado que la deposición de una capa apatítica en su superficie mejora su bioactividad, permitiendo acortar el período de la osteointegración del dispositivo.<sup>43-46</sup>

El principal objetivo de esta revisión consistió en presentar una visión actualizada de la aplicación de los recubrimientos biomiméticos de Ca-P sobre titanio y sus aleaciones, haciendo énfasis en la influencia de la com-

posición de las disoluciones y de los parámetros de ese proceso sobre la velocidad de deposición y las características de las capas resultantes.

## DESARROLLO

### Composiciones de fluido corporal simulado

En sus etapas iniciales, el método biomimético consistió en emplear disoluciones que simulaban al plasma sanguíneo tanto por sus componentes inorgánicos, como por el contenido en que estos se encontraban (Tabla 1).<sup>16-19,47-49</sup> Existen diferentes variantes de SBF (Tabla 1), las que pueden ser utilizadas para evaluar la bioactividad *in vitro*, como para obtener recubrimientos de fosfatos de calcio. En estas disoluciones resulta denominador común la presencia de iones Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Las principales diferencias entre las variantes de SBF reportadas se encuentran generalmente vinculadas al contenido de iones Cl<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. El de Cl<sup>-</sup> varía entre 103 y 165 mmol · dm<sup>-3</sup> (103 mmol · dm<sup>-3</sup> es la concentración reportada para el plasma humano).<sup>18,19</sup> En las variantes denominadas como S-SBF, J-SBF O-SBF y C-SBF, se emplean contenidos de Cl<sup>-</sup> que difieren del plasma humano (165, 131, 148,8 y 147,8 mmol · dm<sup>-3</sup>, respectivamente) (Tabla 1). Mientras que en las disoluciones denominadas como O-SBF, C-SBF, N-SBF y M-SBF la concentración de los iones HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es de solo 4,2 mmol · dm<sup>-3</sup>, lo que significa una disminución de su contenido en alrededor de 6,4 veces en comparación con el plasma humano. Algunas de las variantes de SBF presentan diferencias en la concentración de los restantes constituyentes (M-SBF: Na<sup>+</sup> = 157 mmol · dm<sup>-3</sup>, I-SBF: Ca<sup>2+</sup> = 1,6 mmol · dm<sup>-3</sup> y Mg<sup>2+</sup> = 1 mmol · dm<sup>-3</sup>, O-SBF: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 0 mmol · dm<sup>-3</sup> y en el J-SBF: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 1 mmol · dm<sup>-3</sup>). En el caso del J-SBF (reportado por Jonasova y cols.) se le adiciona NaN<sub>3</sub> con el objetivo de inhibir el crecimiento bacteriano.<sup>49</sup>

### Parámetros empleados en la deposición de los recubrimientos biomiméticos

La variante de SBF inicialmente elaborada por Kokubo se caracterizaba por imitar las condiciones en que se produce el proceso de regeneración ósea (temperaturas entre 36,5 y 37 °C y pH de 7,4).<sup>18,47,48</sup> No obstante, el ulterior desarrollo del método ha hecho que algunos investigadores consideren el efecto que poseen las variables: temperatura, tiempo de exposición, pH, agitación del baño, componentes de la disolución y concentración en que se encuentran estos.<sup>27,50-55</sup> La evaluación del efecto de dichos factores sobre la velocidad de la deposición

**Tabla 1.** Composición del plasma humano y de diferentes SBF<sup>18,19,47-49</sup>

Variante de disolución	Concentración iónica (mmol · dm <sup>-3</sup> )								Referencia
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
Plasma humano	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	18, 47
SBF Original (O-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0	18
SBF revisado (R-SBF) <sup>c</sup>	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	18, 47, 48
SBF corregido (C-SBF) <sup>d</sup>	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8 <sup>a</sup>	4,2	1,0	0,5	18, 47, 48
SBF (I-SBF) <sup>c</sup>	142,0	5,0	1,0	1,6	103,0	27,0	1,0	0,5	47, 19
SBF nuevo (N-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5	18
SBF (J-SBF) <sup>e</sup>	142,0	5,0	1,0	2,5	131,0	5,0	1,0	1,0	49
SBF (M-SBF) <sup>c</sup>	157,0 <sup>b</sup>	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5	19
SBF (S-SBF) <sup>d</sup>	142,0	5,0	1,5	2,5	165,0 <sup>a</sup>	27,0	1,0	0,5	19

<sup>a</sup> Considerando la adición de 40 mmol · dm<sup>-3</sup> de Cl<sup>-</sup> con la disolución reguladora Tris-HCl.<sup>19</sup> <sup>b</sup> Considerando la adición de 15 mmol · dm<sup>-3</sup> de Na<sup>+</sup> con la disolución reguladora HEPES-NaOH.<sup>19</sup> <sup>c</sup> Se le adiciona HEPES para realizar la función de disolución reguladora.<sup>19</sup>

<sup>d</sup> Se le adiciona Tris para realizar la función de disolución reguladora.<sup>19</sup> <sup>e</sup> Se le adiciona Tris, HCl y NaN<sub>3</sub>.<sup>49</sup>

de las capas de Ca-P y sobre las demás características y propiedades de los recubrimientos a partir de datos reportados, es una tarea compleja debido a que las condiciones experimentales y el modo de presentar los resultados, en muchas ocasiones, difieren de modo apreciable al comparar los diferentes trabajos.

El método biomimético puede presentarse en forma estática o dinámica.<sup>18,25,37,38</sup> Generalmente, el baño no se agita cuando se utilizan disoluciones cuyo contenido de iones calcio y fosfato es similar al SBF desarrollado por Kokubo.<sup>18</sup> Mientras que comúnmente se usa el modo dinámico cuando se emplean disoluciones que poseen un contenido elevado de dichos iones.<sup>37,38</sup>

Otro factor que puede influir sobre la velocidad de la deposición de recubrimientos biomiméticos es la relación volumen de la disolución/área a recubrir.<sup>18</sup> De particular importancia puede resultar este parámetro cuando se emplean disoluciones con relativamente bajo contenido de iones calcio y fosfato. Para dichos casos, Kokubo recomienda calcular el volumen de la disolución a emplear en el tratamiento de materiales densos mediante la expresión:

$$V_s = \frac{S_a}{10}$$

donde:

$V_s$  volumen del SBF (mL).

$S_a$  área de la superficie de la muestra (mm<sup>2</sup>).<sup>18</sup>

### Influencia de la temperatura de deposición

La temperatura es un factor que puede generar cambios significativos en los resultados de los tratamientos mediante el método biomimético. La mayoría de los trabajos publicados sobre el tema describen el empleo de temperaturas entre 36 y 37 °C.<sup>18,47-49,56-64</sup> No obstante, existe un grupo de investigaciones en las que se reporta el uso de temperaturas inferiores o superiores a las propias del cuerpo humano.<sup>50,52,55,65,66</sup>

Baker y cols. demostraron la factibilidad de obtener recubrimientos a temperatura ambiente o por debajo de esta y paralelamente, evaluaron la influencia que posee dicha variable sobre la intensidad con la que ocurre la deposición de capas de Ca-P a partir de disoluciones con gran contenido de calcio y fósforo.<sup>66</sup> Es de notar que para las condiciones experimentales reportadas por Baker, se obtiene mayor área recubierta a 21 °C que a 100 °C (Fig. 1).<sup>66</sup> Este resultado difiere de la tendencia descrita por Feng, quien reporta una mayor deposición a 80 °C.<sup>65</sup> Las diferencias entre ambos trabajos pudieran encontrarse relacionadas con la variación de las condiciones experimentales empleadas por ambos grupos de investigadores (tratamiento de activación y concentración de los iones Ca<sup>2+</sup> y HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en las disoluciones).

Otros investigadores también han reportado el uso de temperaturas superiores a las del cuerpo humano para la deposición de recubrimientos de Ca-P en disoluciones con elevado contenido de iones calcio y fosfato.<sup>50,52,55</sup> Panjian desarrolló un método de recubrimiento que permite utilizar hasta 100 °C y obtener los mejores resultados entre 35 y 55 °C.<sup>50</sup>

### Influencia del pH de la disolución

Como anteriormente se expuso, los tratamientos en fluido corporal simulado generalmente se realizan empleando un pH inicial de 7.4.<sup>18,56,67</sup> No obstante, la variación de este factor puede influir significativamente sobre la velocidad de la deposición de los recubrimien-

tos de Ca-P y sobre la composición de fases a obtener en las capas.<sup>19</sup> En diferentes trabajos se reporta el uso inicial de pH alto como ligeramente bajo cuando se utilizan disoluciones con elevado contenido de iones calcio y fosfato (poseen mayor concentración de dichos iones que el SBF tradicional) (Tabla 2).<sup>37,38,55,68,69,71,72</sup> En algunas variantes de tratamiento, el medio se transforma de ácido al inicio del proceso a básico al finalizar la deposición (Tabla 2).<sup>37,38,71</sup>

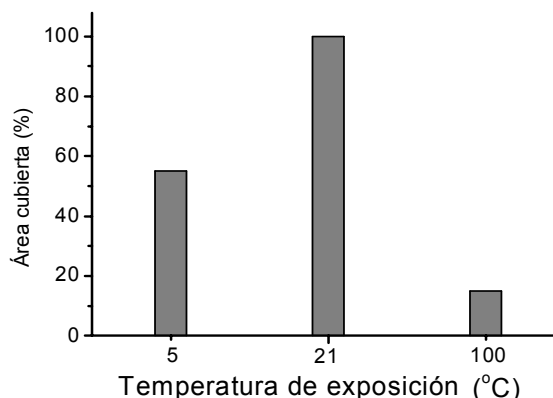
Según Lu y Yang,<sup>19</sup> el pH de la disolución puede tener un efecto significativo sobre la composición de fases en el recubrimiento resultante del tratamiento biomimético, comportamiento válido tanto para disoluciones semejantes al fluido corporal simulado, como para disoluciones con elevado contenido de iones calcio y fosfato (Tabla 3).

El pH inicial de la disolución puede afectar la deposición de los recubrimientos de Ca-P, el tamaño de las partículas formadas y la porosidad del recubrimiento. El incremento del pH de la disolución puede propiciar el surgimiento de recubrimientos densos, mientras que su disminución, en ocasiones favorece incrementos en la porosidad de las capas.<sup>55</sup>

El pH inicial en las disoluciones, también pueden influir significativamente sobre la velocidad de deposición de los recubrimientos de Ca-P.<sup>55</sup> No obstante, según los resultados reportados por Qu y Wei, la variación de la temperatura de exposición modifica el efecto de dicha variable.<sup>55</sup> A ello, se pudiera adicionar la influencia no reportada de su interacción con otros factores inherentes a la disolución y al sustrato.

### Disoluciones con elevado contenido de iones calcio y fosfato

Las disoluciones en las que se incrementa de forma apreciable el contenido de calcio y fósforo, poseen la capacidad de intensificar el proceso de deposición de los recubrimientos de Ca-P y de disminuir significativamente el tiempo necesario para su obtención.<sup>37,38,69,71-73</sup> Las disoluciones con elevado contenido de iones calcio y fosfato se pueden dividir en dos grandes grupos: las que mantienen los componentes del plasma sanguíneo (o la mayoría de estos), incrementando su contenido (disoluciones 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 12 y 13 de la tabla 3) y las que eliminan varios de sus componentes e incrementan el contenido de las fuentes portadoras de calcio y fósforo (disoluciones 5, 9, 10 y 11 de la tabla 3). Las fuentes portadoras de fósforo empleadas pueden diferir, aunque en la práctica las más utilizadas son Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.



**Fig. 1.** Influencia de la temperatura de exposición sobre el área cubierta por apatitas, según Baker y cols.<sup>66</sup> Sustrato: Ti-6Al-4V. Tiempo de exposición: 72 h.

**Tabla 2.** pH en disoluciones con elevado contenido de iones calcio y fosfato empleadas en la deposición de recubrimientos de Ca-P sobre sustratos base titanio.<sup>37,38,55,69,71</sup>

Denominación	Sustrato	Tratamiento de activación	pH inicial	pH máximo	pH final	Referencia
SBF X 5 <sup>1</sup>	Ti6Al4V	Ataque ácido	6,05	7,33	7,33	71
SBF X 5 <sup>2</sup>	Ti6Al4V	Ataque ácido	6,20	8,00	8,00	37
SBF X 5 (NaCl X 0)	Ti6Al4V	Ataque ácido	6,00	8,10	8,10	37
SBF X 5 (NaCl X 3)	Ti6Al4V	Ataque ácido	6,10	7,85	7,85	37
SBF X 5 (HCO <sub>3</sub> X 0)	Ti6Al4V	Ataque ácido	5,30	6,70	6,20	37
SBF X 5 (HCO <sub>3</sub> X 3)	Ti6Al4V	Ataque ácido	5,90	7,60	7,60	37
SBF X 5 (Mg X 0)	Ti6Al4V	Ataque ácido	5,80	7,90	7,90	38
SBF X 5 (Mg X 3)	Ti6Al4V	Ataque ácido	6,00	7,80	7,80	38
SBF X 5 (Mg X 8. HCO <sub>3</sub> X 0)	Ti6Al4V	Ataque ácido	5,30	6,60	6,40	38
SBF X 5 (Mg X 0. HCO <sub>3</sub> X 8)	Ti6Al4V	Ataque ácido	6,10	7,90	7,80	38
SCS 1 <sup>3</sup>	Titanio	Trat. con NaOH	5,97	6,20	5,60	69
SCS 2	Titanio	Trat. con NaOH	6,32	6,65	6,05	69
SCS 3	Titanio	Trat. con NaOH	6,21	6,36	5,74	69
SBF <sup>4</sup>	Titanio	Trat. con NaOH	6,40	6,56	6,52	55

<sup>a</sup> Los tratamientos se efectuaron a  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , durante 24 h de exposición, empleando una agitación del baño de 200 r/min (exceptuando las disoluciones SCS 1, 2 y 3 en las que se utilizó 80 r/min y el SBF que se realizó de forma estática a  $40 ^\circ\text{C}$ ). <sup>b</sup> Los componentes de las disoluciones aparecen en la tabla 3. <sup>c</sup> Disolución con elevado contenido de iones calcio (SCS por sus siglas en inglés). <sup>d</sup> Los componentes de la disolución denominada como SBF se corresponden con los de la disolución 13 de la tabla 3.

**Tabla 3.** Componentes inorgánicos en algunas disoluciones con elevado contenido de calcio y fósforo o de sales empleado en la preparación de las disoluciones.<sup>1,35,40,50,69,71-73</sup>

No.	Denominación	NaCl	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (mmol/dm <sup>-3</sup> )	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	NaHCO <sub>3</sub>	Fuente			
1	SBF X 5	733,5	7,5	12,5	5,0	21,0	71			
2	SBF X 5 (NaCl X 3)	440,1	7,5	12,5	5,0	21,0	35			
3	SBF X 5 (HCO <sub>3</sub> X 3)	33,5	7,5	12,5	5,0	—	35			
4	SBF x 10	1 000 <sup>a</sup>	5,0	25,0	10,0 <sup>2</sup>	9,3	72			
		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup> (mmol/dm <sup>-3</sup> )	HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
5	SCPS	142	—	—	12,5	217	—	5	—	73
6	SBF X 1,5	212,13	7,5	2,3	3,8	186,8	40,5	1,5	0,75	40
7	SBF X 3	426	15,0	4,5	7,5	443,8	12,6	3,0	1,5	1
8	SBF	65-100	1,75-3,5	0,35-1	1-2	48-125	2,5-25	0,5-1,25	—	50
9	SCS 1	6,5	—	—	5	10	1,5	5 <sup>3</sup>	—	69
10	SCS 2	4	—	—	5	10	1,5	2,5 <sup>3</sup>	—	69
11	SCS 3	4	—	—	10	20	1,5	2,5 <sup>3</sup>	—	69
12	m-SBF	127	10	3	12,5	123	35	5	—	52
13	SBF <sup>d</sup>	142	6	1,5	7,5	110	17,5	3	—	55

<sup>a</sup> Además, presenta 5 mol/L de KCl. <sup>b</sup> El dato corresponde a KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en lugar de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O. <sup>c</sup> Como H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>. <sup>d</sup> Las disoluciones 8 y 13 también poseen elevado contenido de calcio y fósforo (denominadas como SBF por sus autores).

### Influencia de la concentración iónica

La formación de recubrimientos de Ca-P mediante el método biomimético depende de la concentración de los iones calcio, fosfato, hidrógenocarbonato y magnesio que estas posean.<sup>37,38,50</sup> La concentración de iones calcio en las disoluciones empleadas para obtener recubrimientos de Ca-P puede variar en un amplio intervalo.<sup>1,18,37,40,69,71,72</sup> En el SBF original la concentración de este elemento<sup>18</sup> solo alcanza  $2,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , mientras que Barrere reporta la utilización de  $12,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (SBF X 5)<sup>37,38,71</sup> y Zheng y cols. refieren el uso de  $25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (SBF X 10).<sup>72</sup> Como se aprecia, existe la tendencia a incrementar la concentración de iones calcio en la disolución, lo cual se justifica porque dicho aumento puede contribuir a acelerar las reacciones químicas que originan y posteriormente permiten el crecimiento del recubrimiento de Ca-P en la superficie del biomaterial sometido al tratamiento.

El incremento del contenido de iones calcio y fosfato en las disoluciones ha permitido disminuir marcadamente

el tiempo necesario para obtener los recubrimientos de Ca-P. Según reportes de diferentes investigadores, el uso de SBF X 5 y de SBF X 10 posibilitó cubrir uniformemente la superficie de muestras de aleaciones de titanio con depósitos de Ca-P en 4 a 6 h.<sup>37,38,71,72</sup>

Generalmente, el incremento de la concentración de iones hidrógenofosfato o fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) o ambos en la disolución, se realiza paralelamente al aumento del contenido de iones calcio (se mantiene la relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-} = 2,5/1$ ).<sup>37,71,72</sup> No obstante, algunos investigadores han desarrollado disoluciones en las que no se mantiene dicha relación.<sup>42,69</sup> Li y cols. utilizan relaciones  $\text{Ca}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-} = 1/1$  (SCS 1),  $= 2/1$  (SCS 2) y  $= 4/1$  (SCS 3), reportando mayor velocidad en la deposición del recubrimiento al emplear las disoluciones que poseen la primera y tercera relación.<sup>69</sup> Al parecer, este comportamiento se encuentra vinculado a que un exceso de iones calcio o de iones fosfato en la disolución favorece la deposición de estos elementos en las etapas iniciales del tratamien-

to y con ello, la creación de centros de nucleación que activan la deposición posterior de las capas de Ca-P.

La variación de la relación calcio/fósforo puede influir significativamente sobre la composición de fases a obtener en el recubrimiento.<sup>69</sup> Elevado contenido de iones fosfato en la disolución pueden favorecer la aparición en el recubrimiento de estructuras más ricas en fósforo (fosfato dicálcico),<sup>19,69</sup> las que no resultan comunes en los recubrimientos depositados mediante procesos con disoluciones que poseen gran contenido de calcio y fósforo.

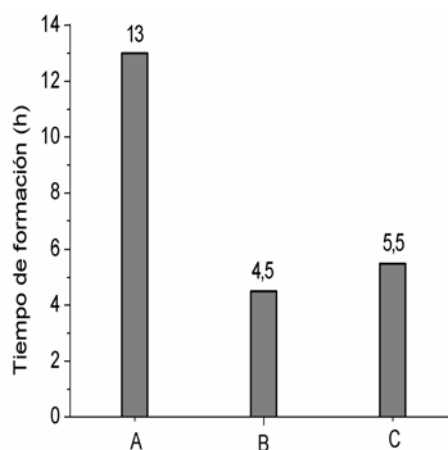
El contenido de cloruro de sodio en las disoluciones también puede tener una marcada influencia sobre la velocidad de formación del recubrimiento (Fig. 2).<sup>37</sup> Barrere y cols. emplearon concentraciones de esta sal en el intervalo comprendido entre el propio de un SBF X 0 y de un SBF X 5, manteniendo el contenido del resto de los componentes de la disolución en el nivel de un SBF X 5. Dicho grupo de investigadores logró cubrir totalmente muestras de Ti6Al4V en 4,5 h empleando un SBF X 5 con un contenido de cloruro de sodio tres veces superior al presentado por el plasma humano (Fig. 2).<sup>37</sup>

El contenido de iones  $\text{HCO}_3^-$  puede influir significativamente sobre la velocidad de la deposición de las capas de Ca-P (Fig. 3) y sobre la cristalinidad y composición de fases presentada por el depósito.<sup>37,54,70</sup> Según los resultados de Barrere y cols., el uso de un contenido de este ion inferior a los correspondientes a un SBF X 5, retarda el proceso de formación del recubrimiento (Fig. 3).<sup>37</sup>

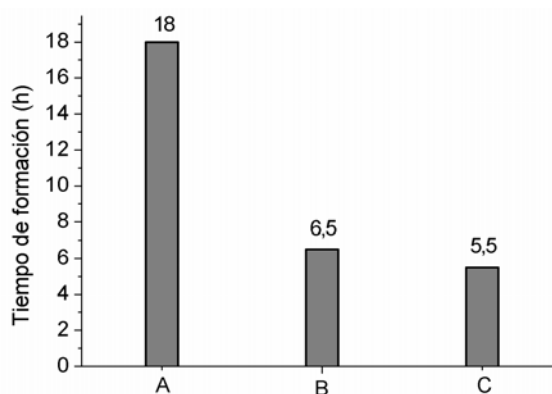
La cristalinidad del recubrimiento se ve afectada al incrementar el contenido de  $\text{HCO}_3^-$  en la disolución. El uso de un bajo contenido de este ion o su ausencia, repercute en la obtención de estructuras cristalinas,<sup>69</sup> mientras que su incremento puede provocar la formación de estructuras amorfas.<sup>37</sup> La inclusión de  $\text{HCO}_3^-$  en la disolución puede favorecer la presencia del carbono en el recubrimiento y la formación de carbonatoapatitas.<sup>37,54,70</sup>

También la concentración de iones magnesio en la disolución influye sobre las características y propiedades de los recubrimientos de Ca-P.<sup>38,50,70</sup> La ausencia de iones magnesio en la disolución puede impedir la formación del recubrimiento o retardar sensiblemente su crecimiento.<sup>38</sup> Barrere y colaboradores obtuvieron la mayor velocidad de deposición al emplear disoluciones con una concentración de dicho ion tres veces superior al plasma humano [SBF X 5 ( $\text{Mg}^{2+}$  X 3)], logrando disminuir el tiempo necesario para obtener el recubrimiento hasta 4,5 h (Fig. 4).<sup>38</sup> La influencia de dicha variable sobre la velocidad de formación del recubrimiento de Ca-P, se encuentra relacionada con la capacidad que posee este elemento de afectar el crecimiento de las partículas de fosfato de calcio en la disolución y con su deposición en las superficies a recubrir en la etapa inicial del tratamiento, activándolas y con ello, favoreciendo el crecimiento de la capa.

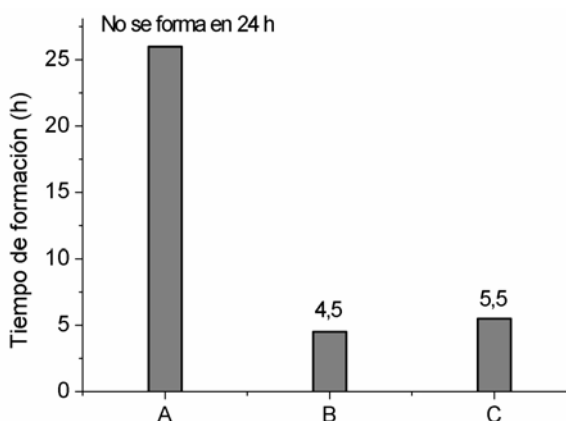
El incremento del contenido de magnesio en la disolución puede afectar la cristalinidad de las fases presentes en los recubrimientos de Ca-P.<sup>38</sup> Según los resultados de Barrere y cols., el uso de disoluciones con una concentración de este elemento tres veces superior a la del plasma humano [SBF X 5 ( $\text{Mg}^{2+}$  X 3)] repercute en que se forme una estructura de poca cristalinidad.<sup>38</sup> No obstante, los propios autores reportan que la obtención de recubrimientos con elevada cristalinidad al emplear una disolución que combina un contenido de iones  $\text{Mg}^{2+}$  ocho veces superior al del plasma humano con la ausencia de



**Fig. 2.** Influencia del contenido de cloruro de sodio en la disolución sobre el tiempo de formación de los recubrimientos de Ca-P, según Barrere y cols.<sup>37</sup> Substrato: Ti6Al4V. A - SBF X 5 ( $\text{NaCl}$  X 0), B - SBF X 5 ( $\text{NaCl}$  X 3), C - SBF X 5.



**Fig. 3.** Influencia del contenido de iones hidrógenocarbonato en la disolución sobre el tiempo necesario para formar un recubrimiento de Ca-P, según Barrere y cols.<sup>37</sup> Substrato: Ti6Al4V. A - SBF X 5 ( $\text{HCO}_3^-$  X 0), B - SBF X 5 ( $\text{HCO}_3^-$  X 3), C - SBF X 5.



**Fig. 4.** Influencia del contenido de iones  $\text{Mg}^{2+}$  presente en las disoluciones sobre el tiempo de deposición del recubrimiento de Ca-P, según Barrere y cols.<sup>38</sup> Substrato: Ti6Al4V. A - SBF X 5 ( $\text{Mg}^{2+}$  X 0), B - SBF X 5 ( $\text{Mg}^{2+}$  X 3), C - SBF X 5 ( $\text{Mg}^{2+}$  X 5).

iones  $\text{HCO}_3^-$  [SBF X 5 ( $\text{Mg}^{2+}$  X 8,  $\text{HCO}_3^-$  X 0)], se obtienen recubrimientos con una elevada cristalinidad. Este comportamiento debe encontrarse relacionado con la interacción entre la concentración de iones  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{HCO}_3^-$

en la disolución (la ausencia de iones  $\text{HCO}_3^-$  contrarresta el efecto de la elevada proporción en que aparecen los iones  $\text{Mg}^{2+}$ ).

## CONCLUSIONES

El método biomimético permite depositar recubrimientos de Ca-P en superficies bioactivas y con ello, mejorar su comportamiento *in vivo*. Este método se ha desarrollado de forma significativa, surgiendo un gran número de variantes de disoluciones.

Existe la tendencia a incrementar el contenido de iones calcio y fosfato en las disoluciones y se reportan composiciones hasta 10 veces más ricas en dichos iones que el SBF originalmente desarrollado por Kokubo y cols. Estos incrementos repercuten en la disminución del tiempo de exposición necesario para obtener un recubrimiento de Ca-P. Otras variantes empleadas para acortar el tiempo de deposición del recubrimiento se encuentran relacionadas con la inclusión de cloruro de sodio, sales portadoras de magnesio e hidrógenocarbonato en disoluciones que poseen elevado contenido de iones calcio y fosfato.

Como resultado de numerosos trabajos desarrollados sobre el tema, se ha acertado apreciablemente la duración de los procesos, aspecto que hace más competitivo al método en comparación con otras variantes de deposición de recubrimientos de Ca-P sobre superficies metálicas. Las posibilidades de continuar reduciendo los tiempos de exposición en los procesos biomiméticos se encuentran vinculadas a la optimización de las disoluciones (componentes, contenido de cloruro de sodio y de iones calcio, fosfato, hidrógenocarbonato y magnesio) y su combinación con una adecuada utilización de los parámetros de exposición (pH y temperatura).

La cristalinidad en los recubrimientos de fosfatos de calcio depende del contenido de iones hidrógenocarbonato y magnesio presente en las disoluciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boon Sing NG, Annergren I, Soutar AM, Khor KA, Jarfors A. Characterisation of a duplex  $\text{TiO}_2/\text{CaP}$  coating on Ti6Al4V for hard tissue replacement. *Biomaterials*. 2005;26(10):1087-95.
- Gücleryüz H, Cimenoglu H. Effect of thermal oxidation on corrosion and corrosion-wear behaviour of a Ti-6Al-4V alloy. *Biomaterials*. 2004;25(16):3325-33.
- Liu Q, Ding J, Mante FK, Wunder SL, Baran GR. The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique. *Biomaterials*. 2002;23(15):3103-11.
- Hero H, Wie H, Jorgensen RB, Ruyter IE. Hydroxyapatite coating on titanium produced by isostatic pressing. *J Biomed Mater Res*. 1994;28(3):344-8.
- Takatsura K, Yamamuro T, Kitsugi T, Nakamura T, Shibuya T, Oto G. A new bioactive glass-ceramic as a coating material on titanium alloy. *J. Appl. Biomater*. 1993;4:317-29.
- Izquierdo I, Salinas A, Vallet M. *In vitro* calcium phosphate layer formation on sol-gel glasses of  $\text{CaO-SiO}_2$  system. *J. Biomed. Mater. Res*. 1999;47(2):243-50.
- Jansen JA, Wolke JG, Swann S, Van der Waerden JP, De Groot K. Application of magnetron sputtering for producing ceramic coatings on implant materials. *Clin. Oral Implan. Res*. 1993;4(1):28-34.
- Izquierdo I, Salinas A, Vallet M. The role of precursor concentration on characteristics of  $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ . *J. Sol-gel Sci. Tech*. 2003;26:1179-82.
- De Groot K, Geesink RGT, Klein CP, Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*. 1987;21(12):1375-87.
- Yang CY, Lin RM, Wang BC, Lee TM, Chang E, Hang YS, Chen PQ. *In vitro* and *in vivo* mechanical evaluations of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on titanium implants: The effect of coating characteristics. *J Biomed Mater Res*. 1997;37(3):335-45.
- Story B, Burgess A. Inventors. Prosthetic implants coated with hydroxylapatite and process for treating prosthetic implants plasma-sprayed with hydroxylapatite. US Patent 5,730,598, 1998.
- Shirkhanzadeh M. Direct formation of nanophase hydroxyapatite on cathodically polarized electrodes. *J Mater Sci Mater Med*. 1998;9(2):67-72.
- Ban S, Maruno S. Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in a modified simulated body fluid. *Biomaterials*, 1998;19(14):1245-53.
- Cleries L. *In vitro* studies of calcium phosphate coatings obtained by laser ablation, [tesis en opción al título de doctor en ciencias técnicas]. Barcelona, Universidad de Barcelona; 1999.
- Song WH, Jun YK, Han Y, Hong SH. Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania. *Biomaterials*. 2004;25(17):3341-9.
- Kokubo T, Kushitani H, Abe Y, Kitsugi T, Yamamuro T. Apatite coatings on various substrates in simulated body fluids. *Bioceramics*. 1989;2:235-42.
- Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res*. 1990;24(6):721-34.
- Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006;27(15):2907-15.
- Lu X, Yang L. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials*. 2005;26(10):1097-08.
- Radin S, Campbell J, Ducheyne P, Cuckler J. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials*. 1997;18(11):777-82.
- Do Serro A, Fernandes A, De Jesus B. Calcium phosphate deposition on titanium surfaces in the presence of fibronectin. *J Biomed Mater Res*. 2000;49(3):345-52.
- Wen H, De Wijn J, Van Blitterswijk C, De Groot K. Incorporation of bovine serum albumin in calcium phosphate coating on titanium. *J Biomed Mater Res*. 1999;46(2):245-52.
- Lind M, Overgaard S, Glerup H, Soballe K, Bünger C. Transforming growth factor- $\alpha$  adsorbed to tricalcium phosphate coated implants increases peri-implant bone remodeling. *Biomaterials*. 2001;22(3):189-93.
- Spoerke ED, Stupp SI. Synthesis of a poly(l-lysine)-calcium phosphate hybrid on titanium surfaces for enhanced bioactivity. *Biomaterials*. 2005;26(25):5120-9.
- Vallet M, Doadrio AL, Gil FJ. Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: Avances y perspectivas. Madrid: Realigraf; 2000: p.171-200.
- Fujibayashi S, Neo M, Kim H, Kokubo T, Nakamura T. A comparative study between *in vivo* bone ingrowth and *in vitro* apatite formation on  $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2$  glasses. *Biomaterials*. 2003;24(8):1349-56.
- Siriphannon P, Kameshima Y, Yasumori A, Okada K, Hayashi S. Comparative study of the formation of hydroxyapatite in simulate body fluid under static and flowing system. *J Biomed Mater Res*. 2002;60(2):175-85.
- Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, Nakamura T, Yamamuro T. Process of formation of bone-like apatite layer on silica gel. *J. Mater. Sci.: Mater Med*. 1993;4:127-31.
- Ni J, Wang M. *In vitro* evaluation of hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composite. *Mater Sci Eng*. 2002;20(1):101-9.
- Leonor IB, Kim HM, Balas F, Kawashita M, Reis RL, Kokubo T, et al. Functionalization of different polymers with sulfonic groups as a way to coat them with a biomimetic apatite layer. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(10):1923-30.
- Rich J, Jaakkola T, Tirri T, Na Rhi T, Yli-Urpo A, Seppa J. *In vitro* evaluation of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide)/bioactive glass composite. *Biomaterials*. 2002;23(10):2143-50.
- Takadama H, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. An X-ray photoelectron spectroscopy study of the process of apatite formation on bioactive titanium metal. *J Biomed Mater Res*. 2001;55(2):185-93.

33. Takadama H, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. TEM-EDX study of mechanism of bonelike apatite formation on bioactive titanium metal in simulated body fluid. *J Biomed Mater Res.* 2001;57(3):441-8.
34. Lee BH, Kim YD, Shin JH, Lee KH. Surface modification by alkali and heat treatments in titanium alloys. *J Biomed Mater Res.* 2002;61(3):466-73.
35. Zhang Q, Leng Y, Xin R. A comparative study of electrochemical deposition and biomimetic deposition of calcium phosphate on porous titanium. *Biomaterials.* 2005;26(16): 2857-65.
36. Feng B, Chen J. Y, Qic S, He J, Zhao Z, Zhang X. Carbonate apatite coating on titanium induced rapidly by precalcification. *Biomaterials.* 2002;23(1):173-9.
37. Barrere F, Van Blitterswijk CA, De Groot K, Layrolle P. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBF X 5 solution. *Biomaterials.* 2002;23(9):1921-30.
38. Barrere F, Van Blitterswijk CA, De Groot K, Layrolle P. Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBF X5 solution: influence of magnesium. *Biomaterials.* 2002;23(10):2211-20.
39. Leonor IB, Oliveira AL, y Reis RL. *Biomateriales.* Madrid: Faenza Editrice Iberica; 2004: p.307-22.
40. Chen X, Li Y, Hodgson PD, Wen C. Microstructures and bond strengths of the calcium phosphate coatings formed on titanium from different simulated body. *Mater Sci Eng C.* 2009;29(1):165-71.
41. Borsari V, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, Salito A, Chiesa R, Chiusoli L, Volpert A, Rimondini L, Giardino R. Physical characterization of different-roughness titanium surfaces, with and without hydroxyapatite coating, and their effect on human osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res. B Appl Biomater.* 2005;75(2):359-68.
42. Bigi A, Boanini E, Bracci B, Facchini A, Panzavolta S, Segatti F, Sturba L. Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method. *Biomaterials.* 2005;26(19):4085-9.
43. Dekker R, De Bruijn J D, Stigter M, Barrere F, Layrolle P, Van Blitterswijk C. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. *Biomaterials.* 2005;26(25):5231-9.
44. Hamada K, Kon M, Hanawa T, Yokoyama K, Miyamoto Y, Asoaka K. Hydrothermal modification of titanium surface in calcium solutions. *Biomaterials.* 2006;23(10):2265-72.
45. Rigo ECS, Boschi AO, Yoshimoto M, Allegrini S, Konig B, Carbonari MJ. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. *Mat Sci Eng C.* 2004;24(5):647-51.
46. Guéhenne C, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007;23(7):844-54.
47. Oyane A, Kim HM, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *J Biomed Mater Res.* 2003;65(2):188-95.
48. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res.* 1996;32(3):409-17.
49. Jonasova L, Muller FA, Helebrant A, Strnad J, Greil P. Hydroxyapatite formation on alkali-treated titanium with different content of Na<sup>+</sup> in the surface layer. *Biomaterials.* 2002;23(15):3095-01.
50. Panjian L. Inventor. Bioactive ceramic coating and method. US Patent 6,569,489, 2003.
51. Hyun-Man K, Jea-Seung K, Yoon-Ji K, Soo-Jin P. Inventors. Method for preparation of the supersaturated solution of calcium phosphate and the thin film of calcium phosphate crystal by using the solution. US Patent 6,720,023, 2004.
52. Qu H, Wei M. Improvement of bonding strength between biomimetic apatite coating and substrate. *J Biomed Mater Res, Part B, Appl Biomater.* 2008;84(2):436-43.
53. Oliveira AL, Mano JF, Reis RL. Nature-inspired calcium phosphate coatings: present status and novel advances in the science of mimicry. *Curr Opin Solid St. M.* 2003;7(4):309-18.
54. Müller L, Müller FA. Preparation of SBF with different HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> content and its influence on the composition of biomimetic apatites. *Acta Biomater.* 2006;2(2):181-9.
55. Qu H, Wei M. The effect of temperature and initial pH on biomimetic apatite coating. *J Biomed Mater Res, Part B: Appl Biomater.* 2008;87(1):204-12.
56. Wang X, Yan W, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. Apatite deposition on thermally and anodically oxidized titanium surfaces in a simulated body fluid. *Biomaterials.* 2003;24(25):4631-7.
57. Jonasova L, Müller FA, Helebrant A, Strnad J, Greil P. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials.* 2004;25(7):1187-94.
58. Gu YW, Tay BY, Lim CS, Yong MS. Biomimetic deposition of apatite coating on surface-modified NiTi alloy. *Biomaterials.* 2005;26(34):6916-23.
59. Vanzillotta PS, Sader MS, Bastos IN, Soares GA. Improvement of *in vitro* titanium bioactivity by three different surface treatments. *Dental Mat.* 2006;22(3):275-82.
60. Li SJ, Yang R, Niinomi M, Hao YL, Cui YY. Formation and growth of calcium phosphate on the surface of oxidized Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy. *Biomaterials.* 2004;25(13):2525-32.
61. Jalota S, Bhaduri SB, *et al.* Effect of carbonate content and buffer type on calcium phosphate formation in SBF solutions. *J Mater Sci Mater M.* 2006;17(8):697-07.
62. Zhang Q, Leng Y. Electrochemical activation of titanium for biomimetic coating of calcium phosphate. *Biomaterials.* 2005;26(18):3853-9.
63. Forsgren J, Svahn F, Jarmar T, Engqvist H. Formation and adhesion of biomimetic hydroxyapatite deposited on titanium substrates. *Acta biomaterialia.* 2007;3(6):980-4.
64. Da Silva EC, García R, Carvalho CA, Ortega A. Characterization of biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V alloy. *Revista CENIC Ciencias Químicas,* 2006; 37(2):59-62.
65. Lin HF, Hsu Y, Chen T. The growth of hydroxyapatite on alkaline treated Ti-6Al-4V soaking in higher temperature with concentrated Ca<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2+</sup> simulated body fluids. *Mater Chem Phys.* 2004;87(1):24-30.
66. Baker KC, Anderson MA, Oehlke SA, Astashkina AI, Haikio DC, Drelich J, Donahue, SW. Growth, characterization and biocompatibility of bone-like calcium phosphate layers biomimetically deposited on metallic. *Mater Sci Eng C.* 2006;26(8):1351-60.
67. Wang XX, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka AA. Comparative study of *in vitro* apatite deposition on heat-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, and NaOH- treated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res. Part A.* 2000;54(2):172-8.
68. Kuroda K, Ichino R, Okido M, Takai O. Effects of ion concentration and pH on hydroxyapatite deposition from aqueous solution onto titanium by the thermal substrate method. *J Biomed Mater Res.* 2002;61(3):354-9.
69. Li F, Feng QL, Cui FZ, Li HD, Schubert H. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. *Surf. Coat. Technol.* 2002;154(1):88-93.
70. Barrere F, Layrolle P, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg<sup>2+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Bone.* 1999;25(2):107-11.
71. Barrere F, Snel M, Van Blitterswijk CA, De Groot K, Layrolle P. Nano-scale study of the nucleation and growth of calcium phosphate coating on titanium implants. *Biomaterials.* 2004;25(14):2901-10.
72. Zheng CY, Li SJ, Tao XJ, Hao YL, Yang R, Zhang L. Calcium phosphate coating of Ti-Nb-Zr-Sn titanium alloy. *Mater Sci Eng C.* 2007;27(4):824-31.
73. Lu X, Zhao Z, Leng Y. Biomimetic calcium phosphate coatings on nitric-acid-treated titanium surfaces. *Mater Sci Eng C.* 2007;27(4):700-08.