

# EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO *IN VITRO* DE RECUBRIMIENTOS DE HIDROXIAPATITA DEPOSITADOS MEDIANTE PROYECCIÓN TÉRMICA POR COMBUSTIÓN OXIACETILÉNICA SOBRE UN SUSTRATO DE Ti6Al4V

## IN VITRO EVALUATION OF OXY-FUEL THERMAL SPRAYED HYDROXYAPATITE COATINGS ONTO Ti6Al4V SUBSTRATES

HAMILTON COPETE

*Ingeniero de Materiales, Grupo GIPIMME, Universidad de Antioquia, Colombia. hamiltoncopete@gmail.com*

MARÍA ESPERANZA LÓPEZ

*Ph.D. Ciencia y Tecnología de Materiales, Grupo GIPIMME, Universidad de Antioquia, Colombia. melopez@udea.edu.co*

FABIO VARGAS

*Ph.D. Ingeniería, Grupo GIPIMME, Universidad de Antioquia, Colombia. vargasf@udea.edu.co*

ALEJANDRO ECHAVARRÍA

*Ph.D. Ciencias Químicas, Grupo CIDEMAT, Universidad de Antioquia, Colombia. aechave@udea.edu.co*

TATIANA RIOS

*Bioingeniera, Industrias Médicas Sampedro, investigacion@imsampedro.com*

Recibido para revisar Marzo 9 de 2012, aceptado Octubre 8 de 2012, versión final Noviembre 15 de 2012

**RESUMEN:** Recubrimientos de Hidroxiapatita sintética producida por precipitación y calcinación a 850 °C fueron depositados sobre sustratos de Ti6Al4V mediante proyección térmica por combustión. Las fases presentes en el material sintetizado y en los recubrimientos elaborados fueron determinadas mediante Difracción de Rayos X. Los recubrimientos fueron evaluados en condiciones *in vitro* con fluido fisiológico a 37 °C que simula el plasma humano, por periodos de 3, 7, 15 y 30 días. La superficie de los recubrimientos fue caracterizada antes y después de los ensayos *in vitro* mediante Microscopía Electrónica de Barrido y por Barrido de Energía Dispersiva. La concentración de iones de fosfato y de calcio en el fluido fisiológico fue determinada mediante espectrofotometría. Los resultados de las pruebas *in vitro* sugieren la acción de dos mecanismos: disolución del recubrimiento en el fluido fisiológico y posterior precipitación de cristales de calcio y fósforo sobre la superficie de la capa de Hidroxiapatita.

**PALABRAS CLAVE:** Hidroxiapatita, Proyección térmica por combustión, Biomaterial, Ensayo *in vitro*.

**ABSTRACT:** Coatings were elaborated onto Ti6Al4V substrates using the oxyacetylene flame spraying process from hydroxyapatite synthesized by precipitation and calcination to 850 °C. The phases in the hydroxyapatite powders and coatings were determined by X Ray Diffraction. The surface of coating was exposed to *in vitro* condition using a Simulated Biological Fluid (SBF), which was heated to 37 °C. The *in vitro* tests were realized during 3, 7, 15 and 30 days. The surface of coatings was evaluated before and after the *in vitro* tests, by Scanning Electron Microscopy and chemical microanalysis was realized by Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy, while the phosphate and calcium ions in the SBF were determined by spectrophotometry. The *in vitro* tests results indicate that phosphate and calcium ions were dissolved from the surface of coating to fluid and then, calcium phosphate crystals were precipitate on the coatings.

**KEYWORDS:** Hydroxyapatite, Thermal Spraying Process, Biomaterial, *In vitro* test.

### 1. INTRODUCCIÓN

Los fosfatos cálcicos son un tipo de materiales cerámicos que han sido ampliamente utilizados como sustitutos óseos. Entre éstos, la hidroxiapatita (HA)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , tiene un largo historial de uso como

biomaterial en injertos óseos, ingeniería de tejidos óseos y matrices para liberación controlada de drogas debido a sus propiedades de biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad, no toxicidad y ausencia de reacciones pirógenas o inflamatorias [1-3].

Por su parte, el Ti6Al4V es una aleación ampliamente empleada en aplicaciones industriales y biomédicas. En este material el aluminio actúa como un estabilizante de la fase  $\alpha$ , la cual dificulta su conformado en caliente, mientras que el V es un estabilizante de la fase  $\beta$ , la cual aumenta la resistencia mecánica de éste material cuando es tratado térmicamente y sometida a envejecimiento [4].

La proyección térmica abarca un conjunto de técnicas que se basan en brindarle simultáneamente a una partícula, energía térmica y cinética. Dicha partícula cuando llega al sustrato, formará un recubrimiento compacto por adición de gran cantidad de partículas [5]. Usualmente las técnicas más empleadas para la deposición de biomateriales han sido la proyección por plasma y HVOF (combustión de alta velocidad), pero de la proyección oxiacetilénica de baja velocidad para biomateriales, no se han reportados muchas investigaciones.

Los recubrimientos de hidroxiapatita le confieren a la superficie de los implantes metálicos una buena interacción con los tejidos y fluidos corporales, hace las veces de barrera física contra la emisión de iones metálicos provenientes del sustrato, y al mismo tiempo favorece la unión directa entre implante-hueso [6]. Los implantes biomédicos recubiertos con HA deben satisfacer requerimientos muy específicos para garantizar una adecuada biocompatibilidad y bioactividad, así como, un comportamiento estable a lo largo de su vida útil, para lo cual se requiere que el recubrimiento tenga un alto grado de cristalinidad, buena adherencia al sustrato y una óptima porosidad [7].

Las condiciones a las que estará sometido el recubrimiento al momento de ser implantado en los seres vivos son simuladas a través de ensayos *in vitro*, que permiten determinar de manera preliminar si éstos son aptos para ser usados como biomaterial [8]. La estructura de la capa de hidroxiapatita depositada determina el comportamiento del recubrimiento en el fluido, es decir, recubrimientos con alto porcentaje de componentes amorfos tendrá una mayor disolución en tiempos cortos que un recubrimiento altamente cristalino [9]. Las fases secundarias son de naturaleza altamente bioreabsorbibles lo que puede debilitar seriamente y poner en peligro la funcionalidad de un

sistema de implantes [10]. En los recubrimientos de hidroxiapatita depositados por proyección térmica, la fases secundarias producidas por su fusión y posterior enfriamiento rápido tienen diferente velocidad de disolución en un fluido corporal o en fluido fisiológico simulado, lo que permite clasificarlas de acuerdo su estabilidad, siendo la hidroxiapatita mucho más estable que el fosfato tricálcico ( $\beta$ ), el cual a su vez es más estable que el fosfato tricálcico ( $\alpha$ ) y éste más estable que fosfato tetracálcico, que a su vez es mucho más estable que la apatita amorfa (la estabilidad de la hidroxiapatita >>fosfato tricálcico ( $\beta$ )> fosfato tricálcico ( $\alpha$ )> fosfato tetracálcico>> apatita amorfa) [11]. La disolución de estas fases en las etapas tempranas promueve por un lado la formación de una capa de apatita similar a la del hueso sobre el recubrimiento, pero disminuye la estabilidad a largo plazo del recubrimiento de HA en ambientes biológicos [12].

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Síntesis de hidroxiapatita

La hidroxiapatita utilizada para la elaboración de los recubrimientos fue sintetizada por el método de precipitación [13]. Partiendo de nitrato de calcio tetrahidratado  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y fosfato hidrogenado de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , método desarrollado por Echavarría et al [14]. El precipitado obtenido fue calcinado a 850 °C y posteriormente molido en un molino centrífugo de bolas de circona S-1000 RETSCH y tamizado para seleccionar la fracción correspondiente a -200 +325 (pasante por la malla N°200 Ty y retenido en la malla N° 325 Ty). La composición química y las fases presentes en los polvos obtenidos fueron determinadas mediante Fluorescencia de Rayos X por Longitud de Onda Dispersiva (FRX-WD) usando un espectrómetro Thermo Scientific ARL OPTIM'X y mediante Difracción de Rayos X utilizando un difractor marca Rigaku-Miniflex con una fuente de radiación de cobre ( $\text{CuK}\alpha$ ,  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), operado a 40kV y 30 mA. Los picos de difracción fueron detectados en un rango de  $2\theta$  entre 3 y 60°, con un paso de 0,5 grados por minuto.

Por su parte, la distribución del tamaño de partícula de los polvos obtenidos fue determinada mediante difracción láser utilizando un equipo Master Sizer 2000.

## 2.2. Preparación del sustrato

Discos de 19 mm de diámetro y 6 mm de espesor, fabricados en Ti6Al4V fueron utilizados como sustrato en la elaboración de los recubrimientos de hidroxiapatita. Previo a la elaboración de los recubrimientos, los sustratos fueron preparados superficialmente con chorro abrasivo de partículas de corindón para proporcionar la rugosidad requerida para la adhesión del recubrimiento y posteriormente fueron limpiados en alcohol utilizando un baño de ultrasonido con el fin de eliminar residuos que puedan estar presentes en su superficie. La rugosidad superficial promedio (Ra) de los sustratos después de ser preparados fue 4  $\mu\text{m}$  y fue medida con un equipo MITUTOYO SJ-201.

## 2.3. Obtención de los recubrimientos de hidroxiapatita

La hidroxiapatita se depositó sobre el sustrato de Ti6Al4V mediante proyección térmica por combustión oxiacetilénica de baja velocidad, con una antorcha TERODYN 2000, provista de un roto-jet que suministra dos chorros de aire con una presión de 205 kPa, que convergen a una distancia de 3,5 cm de la boquilla. La llama utilizada para calentar las partículas de HA fue producida a partir de una mezcla de 32,7 l/min de oxígeno y 21,8 l/min acetileno, el flujo de polvos alimentados a la antorcha fue de 4,5 g/min, la temperatura de precalentamiento del sustrato fue aproximadamente 200°C y la distancia de proyección fue de 7,5 cm.

## 2.4. Análisis de fases de los recubrimientos

Las fases presentes en los recubrimientos elaborados fueron determinadas mediante Difracción de Rayos X, utilizando un equipo Panalytical referencia X'pert PRO MPD con fuente de radiación de cobre ( $\text{CuK}\alpha$ ,  $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$ ), y potencia de 1,8 kW. Los picos de difracción fueron detectados en el rango  $2\theta$  entre 10° y 60°, con un paso de 0,02 grados por minuto.

## 2.5. Ensayos *in vitro*

La evaluación del desempeño de los recubrimientos de hidroxiapatita en fluido fisiológico que simula al plasma humano fue realizada mediante un proceso de

incubación a 37 °C durante 3, 7, 15 y 30 días, utilizando una celda que permite la exposición al fluido fisiológico de un área de 3,14 cm<sup>2</sup> de la superficie del recubrimiento. La solución empleada como fluido fisiológico se preparó en 500 mL de agua adicionando NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl 1M, y NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> (tris(hidroximetil)aminometano), ver Tabla 1.

**Tabla 1.** Concentración iónica (mM) del fluido fisiológico utilizado y del plasma humano

Ion	PlasmaHumano	SBF
Na <sup>+</sup>	142,0	142,0
K <sup>+</sup>	5,0	5,0
Mg <sup>2+</sup>	1,5	1,5
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2,5
Cl <sup>-</sup>	103,0	147,8
HCO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	27,0	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0	1,0
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5	0,5

El proceso de incubación fue llevado a cabo en un equipo HEIDOLPH, con agitación orbital a 187 rpm controlada por el sistema UNIMAX 1010. Una vez finalizado cada ensayo el fluido fisiológico simulado utilizado para evaluar cada muestra fue analizado mediante espectrofotometría para determinar la concentración de iones de fosfato y de calcio. Por su parte, los recubrimientos fueron lavados con agua desionizada y secados a 50 °C. La superficie de cada uno de los recubrimientos fue evaluada antes y después de las pruebas *in vitro*, mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), utilizando un equipo JEOL JSM 6490 LV, que posee una sonda de análisis químico por Barrido de Energía Dispersiva.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Caracterización de los polvos

Los resultados del análisis químico realizado mediante Fluorescencia de Rayos X por longitud de onda dispersiva son mostrados en la Tabla 2. De acuerdo con éstos resultados se pudo establecer que el material sintetizado está constituido en un 57,47% en peso de CaO y 42,52% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y según el diagrama de fases del sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, la hidroxiapatita se forma a una composición química invariante de 57 % de CaO y

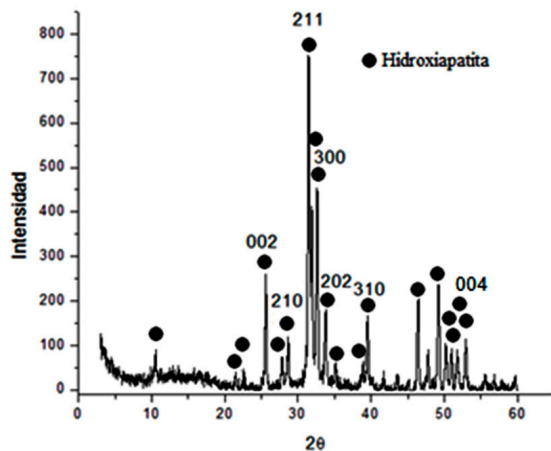
un porcentaje restante de  $P_2O_5$ , por lo que el material sintetizado tiene los componentes y los porcentajes adecuados para la formación de la hidroxiapatita [12].

**Tabla 2.** Composición química de la hidroxiapatita sintetizada

Elemento	Porcentaje en peso	Moles	Relación Ca/P
Ca	41,06	1,0244	1,71
P	18,55	0,5990	
O	40,36	--	--

La relación molar de Ca/P de la hidroxiapatita utilizada como biomaterial varía entre 1,4 y 2,0 siendo 1,67 el valor óptimo [2], el cual es muy cercano a la relación obtenida para el material sintetizado (1,71), lo que indica que el material utilizado para la elaboración de los recubrimientos corresponde a hidroxiapatita con una pureza superior al 97%.

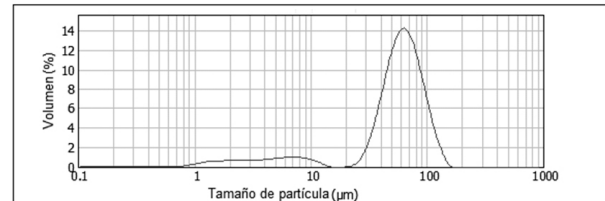
El análisis de fases realizado a partir del espectro de difracción de rayos X obtenido para el material sintetizado indica que éste es altamente cristalino y la única fase presente es la hidroxiapatita, cuyo principal plano de cristalización es el (211) tal y como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Espectro de difracción de rayos X obtenido para el material sintetizado

Los resultados del análisis granulométrico realizado al polvo de hidroxiapatita después de molido y tamizado indican que tiene un  $d_{10} = 5 \mu\text{m}$  y  $d_{90} = 70 \mu\text{m}$ , con un ligero pico entre 700 nm y 15  $\mu\text{m}$  y un gran pico entre 20 y 110  $\mu\text{m}$ . Las partículas más finas correspondientes al pico cuya distribución de tamaño varía entre 700

nm y 15  $\mu\text{m}$  pueden promover su empaquetamiento, dificultando su fluidez durante la proyección térmica realizada con la antorcha TERODYN 2000. En la Figura 2 se muestra el diagrama de distribución de frecuencias obtenido en el análisis granulométrico realizado mediante difracción láser.

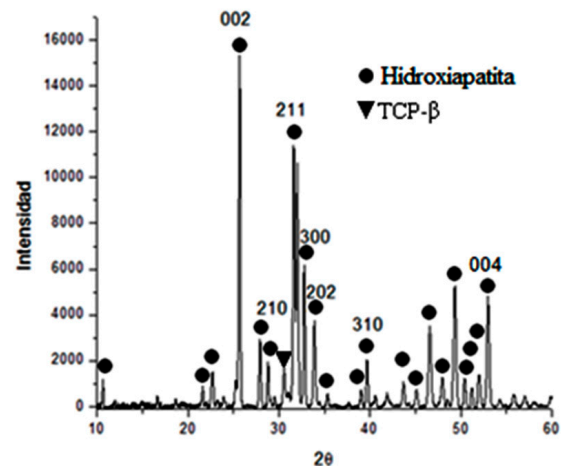


**Figura 2.** Distribución de tamaño de partícula de los polvos de HA

### 3.2. Resultados de la caracterización de los recubrimientos

#### 3.2.1. Análisis de fases

El espectro de difracción de rayos X de los recubrimientos elaborados presentan los mismos picos de la hidroxiapatita que habían sido detectados en los polvos de partida, sin embargo, el principal plano de difracción de esta fase en el recubrimiento fue el (002), mientras que en los polvos de hidroxiapatita sintetizada fue el (211). Adicionalmente, en el ángulo  $2\theta$  igual a 31,0 se observa el pico principal del fosfato tricálcico beta (TCP- $\beta$ ), que corresponde al plano (210). En la Figura 3 se presenta el espectro de difracción de rayos X del recubrimiento de hidroxiapatita antes de ser expuesto a los ensayos *in vitro*.



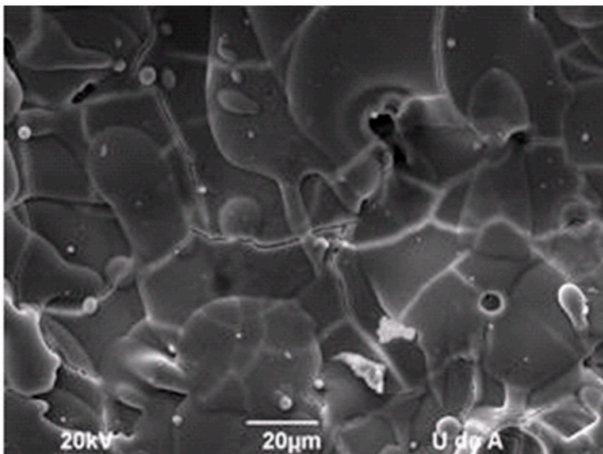
**Figura 3.** Espectro de difracción del recubrimiento elaborado mediante proyección térmica por combustión oxiacetilénica



El incremento en la intensidad del pico de difracción correspondiente al plano (002) se debe a que durante la solidificación de la hidroxiapatita depositada por proyección térmica por combustión oxiacetilénica, esta fase creció con una orientación preferencial en la dirección [001]. Esto se corrobora con el intenso pico observado al plano (004) que se interpreta como el segundo orden de difracción del plano (002), además de la aparición del fosfato tricálcico  $\beta$ . Efectos similares habían sido identificados previamente por otros autores [11, 15].

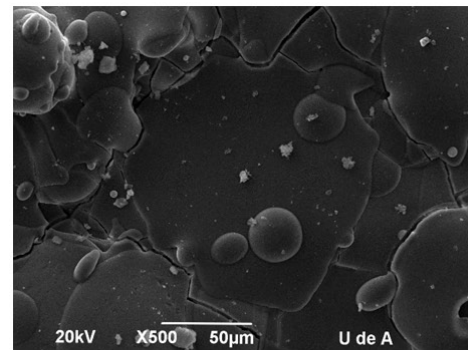
### 3.2.2. Características superficiales de los recubrimientos

Los resultados del análisis realizado mediante microscopía electrónica de barrido indican que la superficie de los recubrimientos está constituida por partículas aplanadas en forma de salpicaduras, con algunos pequeños poros en su interior o entre ellas, así mismo son evidentes algunas grietas producidas por el enfriamiento rápido de las partículas fundidas. En la Figura 4 se muestra la superficie del recubrimiento de hidroxiapatita.

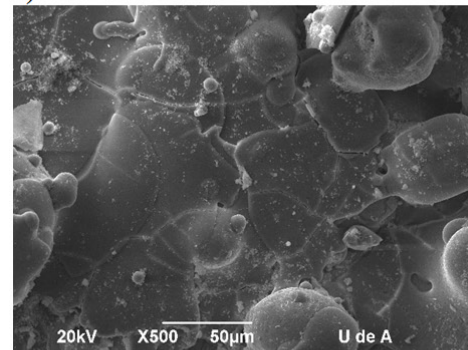


**Figura 4.** Estructura superficial del recubrimiento de hidroxiapatita 1250X

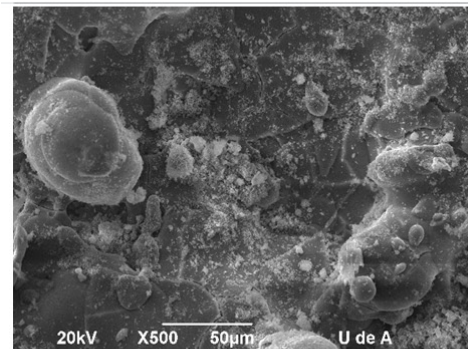
A partir de los 3 días de exposición de la superficie de los recubrimientos al fluido fisiológico simulado fue evidente la formación de precipitados, los cuales fueron aumentando en tamaño y cantidad con el tiempo de exposición. En la Figura 5 se muestra la evolución en el tiempo de éstos precipitados.



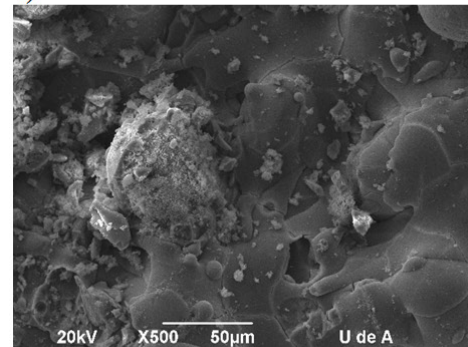
a)



b)



c)



d)

**Figura 5.** Evolución de la formación de precipitados en la superficie de los recubrimientos

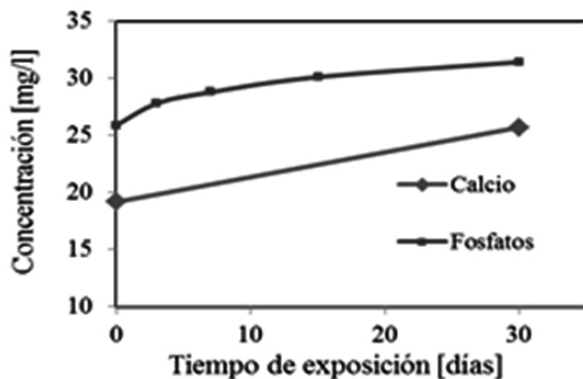
(a) 3 días de exposición, (b) 7 días de exposición,  
(c) 15 días de exposición, (d) 30 días de exposición.

Los resultados del análisis químico elemental realizado mediante barrido de energía dispersiva a los precipitados producidos sobre la superficie de los recubrimientos indican que en un principio estos cristales están constituidos principalmente por oxígeno, seguido de calcio y fósforo, pero a medida que transcurre el tiempo la cantidad de estos dos últimos elementos en los precipitados aumenta. Ver Tabla 3.

**Tabla 3.** Análisis químico de los precipitados producidos sobre la superficie de los recubrimientos

Tiempo de exposición	% en peso			Relación molar Ca/P
	Ca	P	O	
3 días	26,6	15,1	58,3	1,37
30 días	41,0	18,5	40,5	1,70

Por su parte, el resultado del análisis realizado al fluido fisiológico simulado evidencia un enriquecimiento de iones de calcio y fosfato a medida que aumenta el tiempo de exposición, lo que indica que el recubrimiento experimentó una disolución y que los cristales de calcio y fósforo producidos en su superficie fueron formados a partir del recubrimiento y no por precipitación de iones presentes en el fluido [16, 17]. Ver Figura 6.



**Figura 6.** Evolución de la concentración de iones de calcio y fosfato en el fluido fisiológico simulado

#### 4. CONCLUSIONES

- Se sintetizó hidroxiapatita por el método de precipitación y calcinación a 850 °C, con posterior molienda y tamizado. El material obtenido es de alta pureza y cristalinidad y tiene una distribución granulométrica con  $d_{10} = 5 \mu\text{m}$  y  $d_{90} = 70 \mu\text{m}$ . La hidroxiapatita sintetizada fue utilizada para elaborar

recubrimientos mediante proyección térmica por combustión oxiacetilénica, sin que fuera evidente la transformación de esta fase o la aparición de nuevos compuestos.

- Durante la exposición de la superficie de los recubrimientos al fluido fisiológico simulado en condiciones *in vitro*, se exhibió una competencia entre el mecanismo de solubilización de la capa de hidroxiapatita y el de precipitación de cristales ricos en calcio y fósforo, que fueron aumentando en cantidad y tamaño con el tiempo. Así mismo, la relación molar Ca/P de los precipitados fue aumentando desde 1,37 a los 3 días de exposición, hasta 1,7 a los 30 días.
- La concentración de iones de calcio y de fosfato en el fluido fisiológico simulado aumenta durante el tiempo de exposición, lo que indica que los cristales generados sobre la superficie del recubrimiento son producto de la disolución de la capa de hidroxiapatita y no de la precipitación del fluido.
- La disolución del recubrimiento de hidroxiapatita y la formación de precipitados ricos en calcio y fosfato en su superficie con una relación molar que tiende a ser similar a la del recubrimiento indican que tanto la capa, como los cristales formados tienen una buena bioactividad, lo que permite considerarlo como un biomaterial; no obstante al momento se adelantan estudios para determinar si tiene las características necesarias de un recubrimiento en el que se busca que tenga una buena adherencia al sustrato para evitar el aflojamiento del implante en el hueso y también se espera analizar la respuesta al exponerse a cultivos celulares.

#### AGRADECIMIENTOS

Al CODI, U de A, por la financiación de esta investigación con el proyecto Menor Cuantía: MC09-1-02.

Al grupo de Bioprocesos, U de A, por prestar el equipo para realizar los ensayos *in vitro*, en el cual se pudo controlar temperatura y agitación del fluido fisiológico, y por la lectura de la concentración de Ca y P de cada una de las soluciones a las que se expuso el recubrimiento.

**REFERENCIAS**

- [1] Lara, L., Comportamiento electroquímico en Ringer's de recubrimientos de HAP obtenidos por electrodeposición sobre acero inoxidable 316 LVM anodizado. *Scientia et Technica*. 36, pp. 273-278, 2007.
- [2] Deucyne, G., Van Raemdonck, J., Structural analysis of hydroxyapatite on titanium, *Biomaterials*, 7, 97, 1986.
- [3] Van Raemdonck, W., et al. Calcium phosphate ceramics. *Metal and Ceramic Biomaterials*, 2, 143, 1984.
- [4] Adams, L., Aliya, D., Properties and selection: Nonferrous alloys and special-purpose materials, En: *ASM Metals Handbook ASM International*, Vol. 210, pp. 1770-1782, 1990.
- [5] Dorfman, M., *Thermal Spray Basics*. *Advanced materials and processes*, 160, pp. 47-49, 2002.
- [6] AZOM. Hydroxyapatite – Synthesis of Hydroxyapatite Powders. Available: <http://www.azom.com/Details.asp?ArticleID=1519>. [Citado el 5 de diciembre de 2009].
- [7] ASTM F1609 – 08 Standard Specification for Calcium Phosphate Coatings for Implantable Materials
- [8] Kweh, S. Khor, K. and Cheang, P., An in vitro investigation of plasma sprayed hydroxyapatite (HA) coatings produced with flame-spheroidized feedstock. *Biomaterials*, 23, pp. 775-785, 2002.
- [9] Whitehead, R., Lucas, L., Lacefield, W., The effect of dissolution on plasma sprayed hydroxyapatite coatings on titanium, *Clin Mater*, 12, pp. 31-96, 1993.
- [10] Weng, Jie. et al. Formation and characteristics of the apatite layer on plasma-sprayed hydroxyapatite coatings in simulated body fluid, *Biomaterials*, 18, pp. 1027-1035, 1997.
- [11] Zhao, Q., He, D., Zhao, L., Li, X., In-vitro study of microplasma sprayed hydroxyapatite coatings in hanks balanced salt solution, *Materials and Manufacturing Processes*, pp. 175-180, 2011.
- [12] Méndez, M., Desarrollo de porosidad en hidroxiapatita y recubrimientos cerámicos para uso ortopédico [Phd Tesis]. México: Instituto Politécnico Nacional de México, 2006.
- [13] García, C., Paucar, C. y Gaviria, J., Estudio de algunos parámetros que determinan la síntesis de hidroxiapatita por la ruta de precipitación'. *Revista Dyna*, 148, pp. 9-15, 2006.
- [14] Echavarría, A. y De La Calle, F., Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas, *Revista EIA*, 5, pp. 109-118, 2006.
- [15] Gaona, M., Recubrimientos biocompatibles obtenidos por proyección térmica y estudio *in vitro* de la función osteoblástica. [Tesis de doctorado]. Barcelona: Universidad de Barcelona, 2007.
- [16] Paz, A., Martín, Y., Pazos, L.M., Parodi, M.B., Ybarra, G.O., González, J.E., Obtención de recubrimientos de hidroxiapatita sobre titanio mediante el método biomimético, *Revista de Metalurgia*, 47 (2), pp. 138-146, 2011.
- [17] Zhang, Q., Chen, J., Feng, J., Cao, Y., Deng, C. and Zhang, X., Dissolution and mineralization behaviors of HA coatings, *Biomaterials*, 24, pp. 4741-4748, 2003.