

# Adherencia y biocompatibilidad *in vitro* de recubrimientos de fosfato de calcio-titanio de calcio obtenidos por magnetron *sputtering* para aplicaciones ortopédicas

## Adherence and *in vitro* biomedical properties of calcium phosphate-calcium titanate composite coatings for orthopedic application

Recibido: 01-03-2016 Aceptado: 31-05-2016

Johanna Esguerra Arce<sup>1</sup>  
Adriana Esguerra Arce<sup>2</sup>  
Yesid Aguilar Castro<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Colombiana, PhD© Universidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Materiales, TPMR e-mail johanna. Correo electrónico: esguerra@correounivalle.edu.co

<sup>2</sup> Colombiana, PhD© Universidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Materiales, TPMR.

<sup>3</sup> Colombiano, PhD Universidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Materiales, TPMR.

### Resumen

La hidroxiapatita se ha usado como recubrimientos en vástagos de prótesis de cadera por muchos años. Sin embargo, se ha observado que estos recubrimientos se desprenden llevando a la pérdida de la prótesis, debido a que sus propiedades mecánicas no cumplen los requerimientos de la aplicación. Ya que el titanato de calcio se ha propuesto como recubrimiento para aplicaciones biomédicas, por la biocompatibilidad y osteoconductividad mostrada en ensayos *in vitro*, en este trabajo se midió el efecto de agregar titanato de calcio a recubrimientos de fosfatos de calcio, obtenidos mediante magnetron *sputtering*, en su adherencia y módulo elástico, los cuales se evaluaron mediante ensayo de rayado según norma ASTM C1624-05 y nanoindentación, de acuerdo a la norma ASTM E2546-07, respectivamente. La biocompatibilidad *in vitro* de los recubrimientos se evaluó mediante ensayos de genotoxicidad y hemólisis, según norma ASTM F748-06. El recubrimiento de 100% fosfato de calcio (CP) estuvo compuesto de una mezcla de fosfato tricálcico y tetracálcico, al cual se le adicionó titanato de calcio (TC), mediante modificación de un blanco de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_x$  en porcentajes de 25, 50 y 75 en volumen. Para efectos comparativos, también se obtuvieron recubrimientos de 100% TC. Se encontró que la adherencia se incrementó al adicionar 25% de un material en el otro, y que fue máxima en el recubrimientos 50%-50%. Además, se encontró que los recubrimientos son no genotóxicos y, a lo sumo, levemente hemolíticos.

**Palabras clave:** biomateriales; recubrimientos; titanato de calcio; fosfato de calcio; magnetron *sputtering*; ensayo de adherencia.

## Abstract

Hydroxyapatite coatings have been used for many years in hip prosthesis stems. However, it has been observed that the coatings detaches leading to the loosening of the prosthesis due to their mechanical properties did not meet the requirements. Since calcium titanate has been proposed as a coating for biomedical applications due to its good *in vitro* biocompatibility and osteoconductivity, adherence and elastic modulus of calcium phosphate-calcium titanate composite coatings were assessed by means of scratch test (ASTM C1624-05) and nanoindentation test (ASTM E2546-07). *In vitro* biomedical properties such as genotoxicity and hemolysis were evaluated also (ASTM F748-06). 100% calcium phosphate (CP) coating was composed of a mixture of tricalcium and tetracalcium phosphate. Calcium titanate (CT) was added to the coatings, by modifying a  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_{x-x}$  target, in 25, 50 and 75 volume percentages. For comparison purposes, 100% TC coatings were also obtained. It was found that adherence increases as added 25% of one material of another rising a maximum value in 50-50 composite coating. Besides, the coatings were not genotoxic and not hemolytic.

**Keywords:** biomaterials; coatings; calcium titanate; calcium phosphate; magnetron sputtering; scratch test.

## Introducción

Cuando la cadera sufre un daño que resulta de malformaciones, artritis o fractura, las actividades comunes como caminar, pueden resultar dolorosas y difíciles. Una de las soluciones para resolver esto es la cirugía de remplazo de cadera, que consiste en sustituir las partes enfermas o lesionadas de la articulación por una prótesis que la sustituye o la complementa.

Las aleaciones de las que están elaborados los vástagos de las prótesis de cadera son materiales en general bioinertes, por lo que no alcanzan una plena adherencia con el tejido óseo circundante, llegando a desprenderse en algún momento. Una forma de mejorar su adherencia es la aplicación de recubrimientos osteoconductivos (Huracek et al., 1994; Andersen et al., 2015), compuestos, principalmente, de hidroxiapatita (Chandran et al., 2010; Goyenvallea et al., 2006). La superioridad de estos recubrimientos se ha observado a edades tempranas del implante, donde la formación de tejido óseo es mucho mayor que en vástagos sin recubrimiento. Sin embargo,

estos recubrimientos presentan algunos inconvenientes, ya que se desprenden o desgastan (Porter et al., 2004), disminuyendo la cantidad de hueso adherido al implante, llevando a pérdida de adherencia a largo plazo. Por tanto, el tiempo de vida de prótesis recubiertas iguala, pero no supera al de las prótesis cementadas, cuya duración está entre 12 y 16 años (Chandran et al., 2010).

Ya que las prótesis recubiertas de hidroxiapatita han mostrado buenos resultados clínicos y con el fin de extender la vida útil de estos recubrimientos en el dispositivo, se han llevado a cabo muchos estudios. En estos se han variado los métodos de obtención (Hong et al., 2007; Bao et al., 2005), se han evaluado diferentes sustratos (Dinda et al., 2009; Liu et al., 2002) y diferentes capas semilla (Nelea, et al., 2000; Zhen-jun, et al., 2006). La hidroxiapatita se ha combinado con diferentes materiales (Silva et al., 2001; Harle et al., 2006) y se han producido recubrimientos en forma de multicapas (Ozeki et al., 2007). Todos con resultados prometedores, pero aún sin aplicación en prótesis comerciales.

En las primeras etapas de la nucleación de apatita en aleaciones de titanio se ha observado la formación de una capa amorfa de titanato de calcio (TC) (Webster et al., 2003). Por lo que este material ha ganado atención para ser usado como recubrimiento en aleaciones biomédicas para la activación de la osteogénesis (Ohtsu et al., 2008). Algunos estudios realizados han demostrado que los recubrimientos de TC son biocompatibles (Park et al., 2011), protegen contra la corrosión (Tang et al., 2013), son adherentes (Stanishevsky et al., 2007) y osteoconductivos (Wiff et al., 2007).

Por otro lado, entre los fosfatos de calcio, el fosfato tricálcico (TCP-  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y el fosfato tetracálcico (TTCP-  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ) presentan buena osteoconductividad y una solubilidad media si se comparan con la hidroxiapatita (HA) (Ozeki et al., 2007). El TCP ha sido empleado como componente de cementos óseos (Grandia et al., 2011). El TTCP mezclado con un material más estable puede formar un material de estructura porosa que, a largo plazo, incremente la osteoconductividad del material compuesto.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es llevar a cabo la evaluación de adherencia y biocompatibilidad de recubrimientos compuestos de TCP, TTCP y TC crecidos sobre sustratos de acero AISI 304 previa deposición de una capa semilla de titanio, utilizando la técnica de magnetron *sputtering*, para ser aplicados sobre vástagos de prótesis de cadera.

## Detalles Experimentales

### Obtención de los Recubrimientos

Los recubrimientos de fosfato de calcio (CP) – titanato de calcio (TC) se obtuvieron a partir de blancos de hidroxiapatita (HA) y de titanato de calcio (TC) mediante R. F. magnetron *sputtering*, como se explicó en otro artículo (Esguerra et al., 2016). La proporción de materiales en los blancos fue 100%HA-0%TC, 75%HA-25%TC, 50%HA-50%TC, 25%HA-75%TC y 0%HA- 100%TC en volumen, obteniéndose los respectivos recubrimientos 100%CP-0%TC, 75%CP25%TC, 50%CP-50%TC, 25%CP-75%TC y 0%CP- 100%TC. La Tabla 1 muestra la codificación de los recubrimientos y su composición. Como puede verse, el recubrimiento 100CP-0TC consta de una mezcla de  $\beta$ -TCP y TTCP deficiente de oxígeno ( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}_x$ ); el recubrimiento 0CP-100TC consta de 100% titanato de calcio; y los recubrimientos de mezcla constan de  $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}_x$  y TC, en sus respectivas proporciones.

**Tabla 1.** Codificación y composición de los recubrimientos (% en volumen)

| Codificación de los Recubrimientos | Componentes de los Recubrimientos                                                    |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 100CP-0TC                          | 100% ( $2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2+4\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}_x$ )         |
| 75CP-25TC                          | 75% ( $2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2+4\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}_x$ ) - 25% TC |
| 50CP-50 TC                         | 50% ( $2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2+4\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}_x$ ) - 50% TC |
| 25CP-75 TC                         | 25% ( $2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2+4\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}_x$ ) - 75% TC |
| 0CP-100 TC                         | 100% TC                                                                              |

**Fuente:** los autores.

### Adherencia

La adhesión se evaluó con un ensayo de rayado siguiendo la norma ASTM C1624-05, en un equipo *Scratch Test Microtest MTR2*, aplicando una carga creciente de 0 a 40 N en una longitud de huella de 2.6 mm. Por otro lado, para correlacionar con la adherencia, se llevó a cabo la evaluación del módulo elástico de los recubrimientos mediante nanoindentación en un nanoindentador *Hysitron Ubil* siguiendo la norma ASTM E2546-07, a una profundidad menor al 10% del espesor total del recubrimiento. Además, con el fin de conocer la interfaz recubrimiento-sustrato, se llevó a cabo un estudio de perfil de profundidad mediante XPS del recubrimiento 100CP-0TC, en un equipo SAGE HR100 (SPECS) con fuente monocromática (Al K $\alpha$  1486.6 eV), midiendo perfiles composicionales en profundidad y espectros de alta resolución.

### Genotoxicidad

Para las pruebas de genotoxicidad se utilizaron osteoblastos humanos crio-preservados NHOst-Osteoblast OGM (Lonza Group), cuya densidad de sembrado recomendada es de 5000 células/cm<sup>2</sup> (de acuerdo al protocolo de Lonza). Para su cultivo se utilizó medio basal para células osteoblásticas con suplementos de crecimiento celular, tales como suero fetal bovino, ácido ascórbico y sulfato de gentamicina, BulleKit®. El cultivo celular se llevó a cabo en recipientes para cultivo de 25 y 75cm<sup>2</sup> (Corning®), en una incubadora humidificada a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, por 8 semanas, renovando el medio de cultivo cada 3-4 días.

Para la prueba, además de las muestras de estudio, se empleó titanio como control negativo (por triplicado), por su ampliamente referenciada biocompatibilidad (Mc Entire, et al., 2015) y 4NQO, como control positivo, la cual es una solución estándar que provee el kit.

Para poner en contacto las células con las muestras de estudio, estas fueron esterilizadas, así como las tres muestras de titanio. Estas se ubicaron en pozos de cultivo y luego se añadieron 55000 células a cada pozo con medio de cultivo (1.0 mL en volumen total por pozo). Se siguió el mismo procedimiento del cultivo celular por 16 días, haciendo cambio de medio cada 4 días.

La evaluación de la genotoxicidad se realizó haciendo uso del kit SOS-Chromo Test®. La prueba empleó una cepa PQ37 mutante de *E-coli* que se colocó en contacto con el medio de cultivo que estuvo a su vez en contacto con los materiales de prueba y los osteoblastos. Si el material se disuelve o forma productos de corrosión que sean genotóxicos, esto se ve reflejado en las bacterias, así, como una cantidad masiva de daños en el ADN se disparan como respuesta, pues son mecanismos de emergencia, que se caracterizan por tener niveles superiores de proteínas implicadas en reparación y recombinación del ADN. Si la cantidad de lesiones que hay en la *E-coli* es muy superior a lo normal, se induce la respuesta SOS (es decir, la inducción de los genes SOS que están implicados en la reparación del ADN). A nivel molecular la respuesta SOS consiste en la inducción de la expresión de una serie de genes, la mayor parte de ellos implicados en reparación de daños en el ADN. Esta respuesta se relaciona con el gen  $\beta$ -gal responsable de la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Por tanto, el grado en que la célula está tratando de reparar el daño del ADN usando el complejo de genes ya mencionado,

está directamente ligado a la cantidad producida de  $\beta$ -galactosidasa, que se mide por medio de una reacción de esta enzima con un cromógeno azul.

La actividad genotóxica se midió graficando la absorbancia (medida en un lector de Elisa a 615 nm) en función del orden de la dilución. La pendiente de la porción lineal de esta gráfica es el potencial del material para inducir daño en el ADN (o SOSIP del inglés SOS induction potential). SOSIP con valores cercanos a cero indican materiales no genotóxicos.

### Hemólisis

La prueba de hemólisis busca medir la destrucción de eritrocitos que resulta en la liberación de hemoglobina hacia el plasma, y se llevó a cabo siguiendo la norma ASTM F756-08. Para ello se obtuvo sangre humana de tres personas sanas no fumadoras. Como control negativo se utilizó polietileno (PE) y como control positivo acero D3. Una mezcla preparada apropiadamente con esta sangre se puso en contacto con las muestras de estudio y se determinó un % de hemólisis. Para un valor menor a 2 se dice que el material es no hemolítico, entre 2 y 5 es parcialmente hemolítico, y mayor a 5 es hemolítico.

## Resultados y Discusión

### Adherencia

Durante el paso del indentador con carga creciente a lo largo del recubrimiento se obtuvieron los datos de desplazamiento, carga tangencial, carga normal y de coeficiente de fricción (o de dragado). La Figura 1 muestra las curvas correspondientes al coeficiente de dragado en función de la carga normal. Después del ensayo las huellas de rayado se inspeccionaron mediante microscopía óptica, y los modos de falla encontrados se correlacionaron con las curvas *coeficiente de dragado – carga normal*. La identificación de las cargas cohesiva y adhesiva se hizo a partir de esta correlación.

Los modos de falla de los recubrimientos se muestran esquemáticamente en la Figura 2. Todos los recubrimientos exhibieron grietas semicirculares transversales, astillamiento y desprendimiento (Holmberg et al., 2003). Las grietas semicirculares transversales están relacionadas con el fallo cohesivo, por lo que la carga a la que empiezan a aparecer se denomina carga cohesiva y se designa  $L_{C1}$ . El astillamiento sin desprendimiento del material se ilustra con los rombos grises y es también un fallo cohesivo, ya que el recubrimiento se astilla, pero no

se desprende por completo del sustrato. El astillamiento con desprendimiento de recubrimiento, ilustrado con los rombos negros, se relaciona con el fallo adhesivo entre el recubrimiento y el sustrato. La carga a la que este sucede se denomina  $L_{C2}$ .

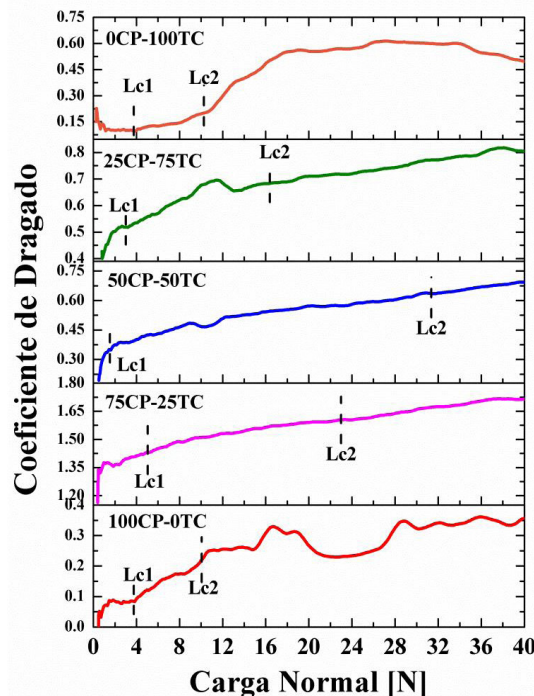


Figura 1. Coeficiente de dragado en función de la carga normal en el ensayo de rayado  
Fuente: los autores.

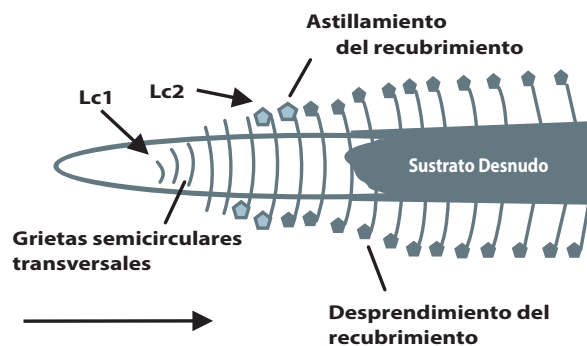
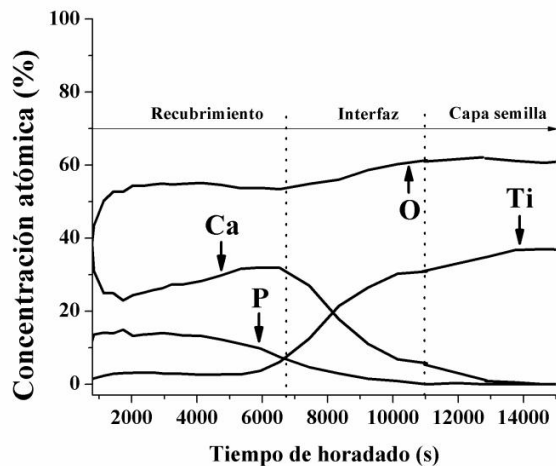


Figura 2. Esquema de los modos de falla de los recubrimientos sometidos al ensayo de rayado  
Fuente: los autores.

La Figura 3 muestra el perfil de composición del recubrimiento 100CP-0TC obtenido mediante XPS, donde se observa un gradiente composicional entre la capa semilla y el recubrimiento. Esta interfaz está compuesta de una mezcla de Ti, O, P y Ca, que se hace más rica en Ti a medida que se acerca a la capa semilla. La presencia de esta interfaz



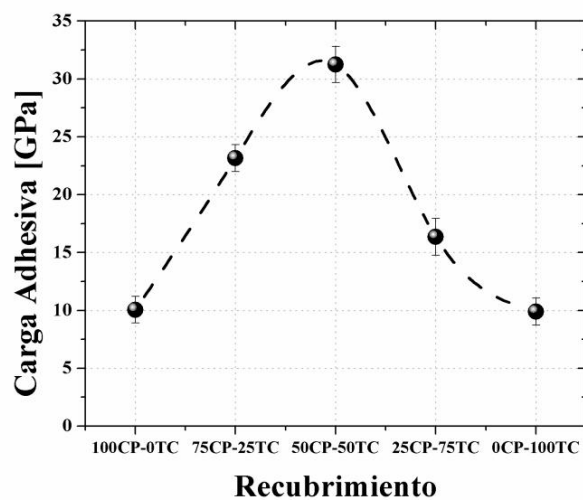
favorece el anclaje entre ambos materiales, mejorando la adherencia. La formación de esta interfaz se ve favorecida por la temperatura de deposición, que permite la difusión de átomos de P y Ca en el Ti-O de la capa semilla.



**Figura 3.** Perfil de composición del recubrimiento 100CP-0TC  
Fuente: los autores.

La Figura 4 muestra el comportamiento de la carga adhesiva de los recubrimientos con la adición de TC. Al igual que en el caso de la carga cohesiva, los recubrimientos 100CP-0TC y 0CP-100TC presentan valores similares de adherencia, alrededor de 10N. Pese a que los valores de adherencia obtenidos mediante ensayo de rayado son muy variables y dependen de factores extrínsecos tales como la velocidad de carga aplicada, la velocidad de rayado, el radio del indentador, el desgaste del indentador; y de factores intrínsecos, como las propiedades del sustrato (dureza, módulo elástico), las propiedades del recubrimiento (espesor, dureza, módulo elástico, esfuerzos residuales, rugosidad superficial) y el coeficiente de fricción (Bull et al., 2006), se hizo una comparación de los valores obtenidos para los recubrimientos 100-0 con la literatura: se encontró que la adherencia del recubrimiento 100CP-0TC es superior al reportado por Candidato Jr., et al (2015) de 3,3 N para recubrimientos de fosfatos de calcio de alrededor de 60  $\mu\text{m}$  de espesor, obtenidos mediante plasma spray; y superior también al valor reportado por Surmeneva et al (2015) de 5.85 N para un recubrimiento de HA de 690 nm de espesor depositado por R. F. magnetron sputtering. Hasta este momento, y hasta donde los autores pudieron encontrar, no hay referencias de ensayo de rayado sobre recubrimientos de titanato de calcio, excepto uno reportado por Stanishevsky et al (2007) pero usando cargas por debajo de 1N, por lo que no es comparable.

Con respecto a los recubrimientos de mezcla, se observa que hay un incremento de la adherencia a medida que se adiciona un material en el otro. Al adicionar 25% de CP al recubrimiento de TC, la carga adhesiva se incrementa a un valor de 16.4 N. Al adicionar 25 y 50% de TC al recubrimiento de CP, la carga adhesiva se incrementa a valores de 23.1 y 31.2 N, respectivamente. Un resultado similar fue encontrado por K. De-Jung et al (2012) que al adicionar  $\text{ZrO}_2$  a hidroxiapatita en proporciones 75HA-25 $\text{ZrO}_2$  y 50HA-50 $\text{ZrO}_2$ , obtuvieron cargas de adherencia de 17.5 y 30 N, lo cual atribuyen a esfuerzos residuales bajos a medida que se incrementa el contenido de  $\text{ZrO}_2$  entre el recubrimiento y el sustrato.



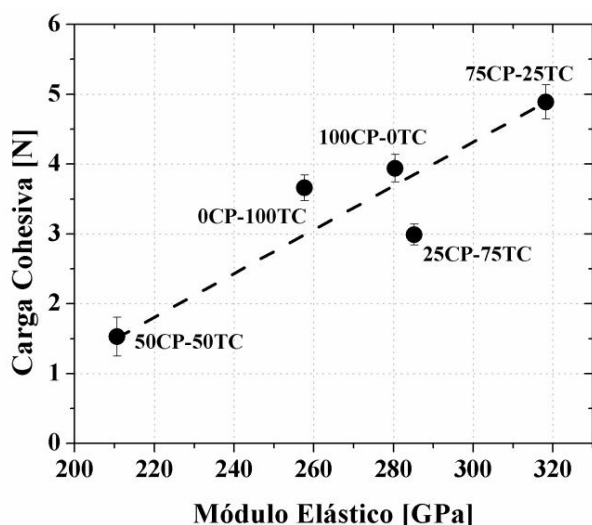
**Figura 4.** Carga adhesiva de los recubrimientos CP-TC  
Fuente: los autores.

En la Figura 5 se hace una correlación de  $L_{C1}$  con el módulo elástico de los recubrimientos; se da una mayor carga cohesiva a medida que se incrementa el módulo elástico de los recubrimientos. Esto es coherente con la literatura (Núñez et al., 2012), ya que el módulo elástico es una medida de las fuerzas cohesivas dentro de un material: entre más altas son estas fuerzas cohesivas, más carga se debe aplicar para que aparezca la primera grieta del material.

### Genotoxicidad

La Figura 6 muestra la genotoxicidad de los recubrimientos CP-TC, del acero AISI 304 y de los controles positivo (4NQO, como menciona el protocolo) y negativo (Ti grado 2). La literatura reporta que el titanio es no genotóxico (Velasco-Ortega, et al., 2010) y que el AISI

304 y 316L tienen cierta tendencia a ser genotóxicos *in vivo* a largo plazo (Martín-Cameána, et al., 2015). El valor máximo de genotoxicidad mostrado en la gráfica es menor que los mostrados por Kubásek et al (2016), lo que indica, siguiendo su razonamiento, que ninguno de los materiales en estudio induce daño significativo al ADN, es decir, no son genotóxicos en condiciones *in vitro*. El resultado del recubrimiento 100CP-0TC está también en concordancia con la comunidad científica, que reporta que estos fosfatos de calcio son no genotóxicos *in vitro* (Quan, et al., 2013). Del recubrimiento 0CP-100TC no hay reportes, hasta donde bien saben los autores de esta caracterización.



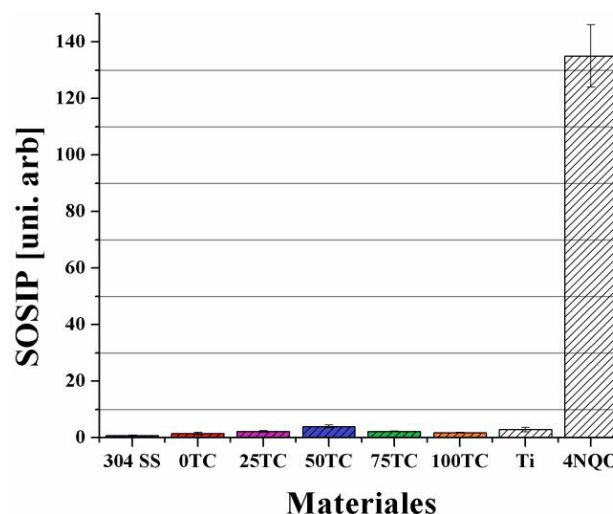
**Figura 5.** Relación entre carga cohesiva de los recubrimientos y su módulo elástico  
Fuente: los autores.

Cuando se adiciona un material a otro para formar un compuesto, como en este caso, pero uno de los dos presenta genotoxicidad, se observa que la genotoxicidad del compuesto tiende a aumentar al incrementar la proporción de material genotóxico (Quan et al., 2013), sin embargo, aquí el valor de genotoxicidad se mantiene casi constante y de valor semejante al de 100CP y 100TC, ya que ambos son no genotóxicos (*in vitro*) y con valores de genotoxicidad similares.

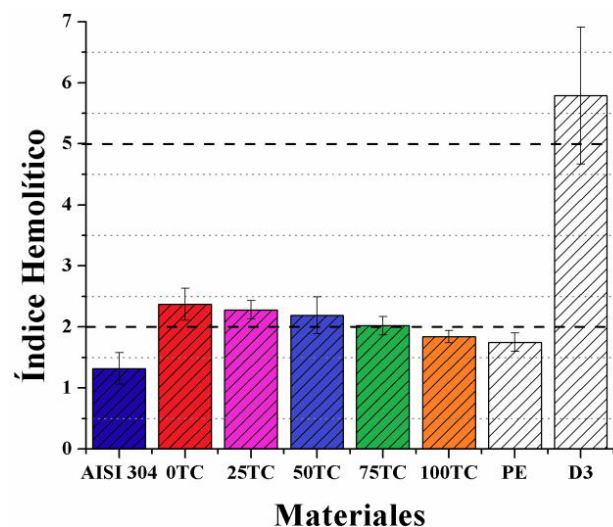
## Hemólisis

La Figura 7 muestra el índice hemolítico de los recubrimientos, el sustrato, el control negativo (polietileno, PE) y del control positivo (acero D3) después del ensayo de hemólisis. El control negativo presentó un índice hemolítico de 1.75 y el control positivo un valor de 5.79, lo que significa que el PE es no-hemolítico y el acero D3 es hemolítico, como se esperaba. El acero inoxidable AISI 304

es no-hemolítico, de hecho presenta un índice hemolítico menor que los recubrimientos. En los recubrimientos se ve que a medida que se agrega titanato de calcio, estos se hacen menos hemolíticos, siendo el recubrimiento 100CP-0TC levemente hemolítico y el recubrimiento 0CP-100TC no-hemolítico. Esto se puede explicar por la mayor solubilidad de los fosfatos de calcio con respecto al titanato de calcio (Ozeki, et al., 2007).



**Figura 6.** Genotoxicidad para cada material expresada como SOSIP  
Fuente: los autores.



**Figura 7.** Índice hemolítico para cada material  
Fuente: los autores.

## Conclusiones

Se llevó a cabo exitosamente la evaluación de adherencia, genotoxicidad y hemólisis *in vitro* de recubrimientos de fosfato de calcio – titanato de calcio, obtenidos mediante magnetrón sputtering.

Con respecto a los modos de falla en la evaluación de adherencia mediante ensayo de rayado, se encontró que todos los recubrimientos exhiben grietas semicirculares transversales, astillamiento y desprendimiento. Se corroboró que a mayor módulo elástico de los recubrimientos se obtiene mayor carga cohesiva de los mismos.

El valor de adherencia del recubrimiento 100CP-0TC es superior al reportado por otros autores para recubrimientos de fosfatos de calcio. El valor de adherencia del recubrimiento 0CP-100TC fue aproximadamente de 10N. Con respecto a los recubrimientos de mezcla se encontró que la adherencia incrementa al adicionar un material en el otro y es máxima en el recubrimiento 50CP-50TC. Además, todos los recubrimientos mostraron ser no genotóxicos y, a lo sumo, parcialmente hemolíticos *in vitro*. Por tanto, se recomienda su evaluación de biocompatibilidad *in vivo*, para ser usados como recubrimientos para vástagos de prótesis de cadera.

## Agradecimientos

Los autores dan sus sinceros agradecimientos al profesor Óscar Gutiérrez del Grupo de Farmacología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle por su apoyo en la realización de las pruebas de biocompatibilidad *in vitro*.

## Referencias bibliográficas

- Andersen, M. R.; Petersen, M. M. (2015). Adaptive bone remodeling of the femoral bone after tumor resection arthroplasty with an uncemented proximally hydroxyapatite-coated stem. *Journal of Clinical Densitometry*, Article impress Available online 3 April.
- ASTM C1624 – 05 (Reapproved 2010). (2005). *Standard Test Method for Adhesion Strength and Mechanical Failure Modes of Ceramic Coatings by Quantitative Single Point Scratch Testing*, West Conshohocken, PA, American Society for Testing and Materials.
- ASTM E2546 – 07.(2007). *Standard Practice for Instrumented Indentation Testing*, West Conshohocken, PA, American Society for Testing and Materials.
- ASTM F756-08.(2008). *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*, West

Conshohocken, PA, American Society for Testing and Materials. .

- Bao, Q.; Chen, C.; Wang, D.; Ji, Q.; Lei, T. (2005). Pulsed laser deposition and its current research status in preparing hydroxyapatite thin films. *Applied Surface Science* 252: 1538–1544.
- Bull, S. J.; Berasetegui, E. G. (2006). Capítulo 7: *An overview of the potential of quantitative coating adhesion measurement by scratch testing*. En S. K. Sinha, editor. *Scratching of Materials and Applications*. Tribology and Interface Engineering Series, 51. USA: Elsevier; 136-165.
- Candidato Jr., P. Sokołowski, P.; Pawłowski, L.; Denoirjean, A. (2015). Preliminary study of hydroxyapatite coatings synthesis using solution precursor plasma spraying. *Surface & Coatings Technology*, 277 : 242–250.
- Chandran, P.; Azzabi, M.; Miles, J.; Andrews, M.; Bradley, J.(2010). Furlong hydroxyapatite-coated hip prosthesis vs the Charnley cemented hip prosthesis. *The Journal of Arthroplasty*, 25: 52 – 57.
- De-Jun, K.; Dan, L.; Yong-Zhong, W.; Chao-Zheng, Z. (2012). Mechanical properties of hydroxyapatite-zirconia coatings prepared by magnetron sputtering. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 22: 104-110.
- Dinda, G. P.; Shin, J.; Mazumder, J. (2009). Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films on Ti-6Al-4V: Effect of heat treatment on structure and properties. *Acta Biomaterialia*, 5: 1821–1830.
- Esguerra Arce, J.; Esguerra Arce, A.; Aguilar, Y.; Yate, L.; Moya, S.; Rincón, C.; Gutiérrez, O. (2016). Calcium phosphate-calcium titanate composite coatings for orthopedic applications, *Ceramics International*, 42: 10322-10331.
- Grandia, G.; Heitz, C.; Dos Santos, L. A.; Silva, M. L.; Sant’ana Filho, M.; Miranda Pagnocelli, R.; Nascimento Silva, D. (2011). Comparative histomorphometric analysis between  $\alpha$ -TCP cement and  $\beta$ -TCP/HA granules in the bone

- repair of rat calvaria. *Materials Research*, 14(1): 11-16.
- Goyenvallea, E.; Aguad, E.; Nguyen, J. M.; Passuti, N.; Guehenec, L. L.; Layrolle, P.; Daculsi, G. (2006). Osteointegration of femoral stem prostheses with a bilayered calcium phosphate coating. *Biomaterials* 27: 1119–1128.
- Harle, J.; Kim, H. W.; Mordan, N.; Knowles, J. C.; Salih, V. (2006). Initial responses of human osteoblasts to sol-gel modified titanium with hydroxyapatite and titania composition. *Acta Biomaterialia*, 2: 547–556.
- Holmberg, K.; Laukkanen, A.; Ronkainen, H.; Wallin, K.; Varjus, S. A. (2003). Model for stresses, crack generation and fracture toughness calculation in scratched TiN-coated steel surfaces. *Wear* 254: 278–291
- Hong, Z.; Luan, L.; Paik, S. B.; Deng, B.; Ellis, D. E.; Ketterson, J. B.; Mello, A.; Eon, J. G.; Terra, J.; Rossi, A. (2007). Crystalline hydroxyapatite thin films produced at room temperature - An opposing radio frequency magnetron sputtering approach. *Thin Solid Films*, 515: 6773–6780.
- Huracek, J.; Spirig, P. (1994). The effect of hydroxyapatite coating on the fixation of hip prostheses. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 113 : 72 – 77.
- Kubásek, J.; Vojtěch, D.; Jablonská, E.; Pospíšilová, I.; Lipov, J.; Ruml, T. (2016). Structure, mechanical characteristics and *in vitro* degradation, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of novel biodegradable Zn-Mg alloys. *Materials Science and Engineering C*, 58: 24–35.
- Liu, D. M.; Yang, Q.; Troczynski, T. (2002). Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates. *Biomaterials*, 23: 691–698.
- Martín-Cameána, A.; Jos, A.; Mellado-García, P.; Iglesias-Linares, A.; Solano, E.; Cameán, A. M. (2015). *In vitro* and *in vivo* evidence of the cytotoxic and genotoxic effects of metal ions released by orthodontic appliances: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40: 86–113.
- Mcentire, B. J.; Bal, B. S.; Rahaman, M. N.; Chevalier, J.; Pezzoti, G. (2015). Ceramics and ceramics coatings in orthopedics. *Journal of the European Ceramic Society*, 35: 4327-4369.
- Nelea, V.; Ristoscu, V.; Chiritescu, C.; Ghica, C.; Mihailescu, I. N.; Pelletier, H.; Mille, P.; Cornet, A. (2000). Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films on Ti-5Al-2.5Fe substrates with and without buffer layers. *Applied Surface Science*, 168: 127-131.
- Núñez, C.; Roca, A.; Jorba, J. (2012). *Comportamiento mecánico de los materiales*. Volumen 1: Conceptos fundamentales. 2ª ed. Barcelona: Publicaciones Universidad de Barcelona.
- Ohtsu, N.; Abe, C.; Ashino, T.; Semboshi, S.; Wagatsuma, K. (2008). Calcium-hydroxide slurry processing for bioactive calcium-titanate coating on titanium. *Surface & Coatings Technology*, 202: 5110–5115.
- Ozeki, K.; Janurudin, J. M.; Aoki, H.; Fukui, H. (2007). Photocatalytic hydroxyapatite/titanium dioxide multilayer thin film deposited onto glass using an rf magnetron sputtering technique. *Applied Surface Science*, 253: 3397–3401.
- Park, J. W.; Tustusmi, Y.; Lee, C. S.; Park, C. H.; Kim, Y. J.; Jang, J. H.; Khang, D.; Im, Y. M.; Doi, H.; Nomura, N.; Hanawa, T. (2011). Surface structures and osteoblast response of hydrothermally produced CaTiO<sub>3</sub> thin film on Ti-13Nb-13Zr alloy. *Applied Surface Science*, 257: 7856–7863.
- Porter, A. E.; Taak, P.; Hobbs, L. W.; Coathup, M. J.; Blunn, G. W.; Spector, M. (2004). Bone bonding to hydroxyapatite and titanium surfaces on femoral stems retrieved from human subjects at autopsy. *Biomaterials*, 25: 5199–5208.
- Protocolo de Lonza. (2016). Recuperado de [http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_ManualsProductInstructions\\_TechSheet\\_-](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_TechSheet_-)



- Human\_Osteoblast\_Cell\_System\_NHOst.pdf
- Quan, R.; Tang, Y. ; Huang, Z.; Xu, J.; Wu, X.; Yang, D. (2013). Study on the genotoxicity of HA/ZrO<sub>2</sub> composite particles *in vitro*. *Materials Science and Engineering C*, 33: 1332–1338.
- Silva, C. C.; Thomazini, D.; Pinheiro, A. G.; Aranha, N.; Figueiró, S. D.; Góes, J. C.; Sombra, A. S. (2011). Collagen–hydroxyapatite films: piezoelectric properties. *Materials Science and Engineering*, B86 : 210–218.
- Stanishevsky, A. V.; Holliday, S. (2007). Mechanical properties of sol–gel calcium titanate bioceramic coatings on titanium. *Surface & Coatings Technology*, 202: 1236–1241
- Surmeneva, M. A.; Mukhametkaliyev, T. M.; Tyurin, A. I.; Teresov, A. D.; Koval, N. N.; Pirozhkova, T. S.; Shuvarin, I. A.; Shuklinov, A. V.; Zhigachev, A. O.; Oehr, C.; Surmenev, R. A. (2015). Effect of silicate doping on the structure and mechanical properties of thin nanostructured RF magnetron sputter-deposited hydroxyapatite films. *Surface & Coatings Technology*, 275: 176–184.
- Tang, H.; Wang, F. (2013). Synthesis and properties of CaTiO<sub>3</sub>-containing coating on AZ31 magnesium alloy by micro-arc oxidation. *Materials Letters*, 93: 427–430.
- Velasco-Ortega, E.; Jos, A.; Cameán, A. M.; Pato-Mourelo, J.; Segura-Egea, J. J. (2010). *In vitro* evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of a commercial titanium alloy for dental implantology. *Mutation Research*, 702: 17–23.
- Webster, T. J.; Ergun, C.; Doremus, R. H.; Lanford, W. A. (2003). Increased osteoblast adhesion on titanium-coated hydroxylapatite that forms CaTiO<sub>3</sub>. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: Applied Biomaterials*, 67A: 975–980.
- Wiff, J. P.; Fuenzalida, V. M.; Arias, J. L.; Fernandez, M. S. (2007). Hydrothermal–electrochemical CaTiO<sub>3</sub> coatings as precursor of a biomimetic calcium phosphate layer. *Materials Letters*, 61: 2739–2743.
- Zhen-Jun, W.; Li-Ping, H.; Zong-Zhang, C. (2006). Fabrication and characterization of hydroxyapatite/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> biocomposite coating on titanium. *Trans. Nonferrous Met. SOC. China* 16: 259-266.