



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**DESARROLLO DE RECUBRIMIENTOS MULTICAPA DE HIDROXIAPATITA
(HA)-Ag/TiO₂/TiN E HA-Ag/SiO₂/TiN OBTENIDOS MEDIANTE
PULVERIZACIÓN CATÓDICA MAGNETRÓN RF CON POTENCIAL
APLICACIÓN EN EL CAMPO BIOMÉDICO**

Julián Andrés Lenis Rodas

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería de Materiales

Medellín, Colombia

2020



Desarrollo de recubrimientos multicapa de Hidroxiapatita (HA)-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN obtenidos mediante pulverización catódica magnetrón RF con potencial aplicación en el campo biomédico

Julián Andrés Lenis Rodas

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ingeniería de Materiales

Asesores:

Maryory Astrid Gómez Botero - Ingeniera Metalúrgica, Doctora en técnicas Instrumentales de la Física
Francisco Javier Bolívar Osorio – Ingeniero Metalúrgico, Magíster en Ciencias Químicas, Doctor en Física de Materiales

Línea de Investigación: Biomateriales
Grupo de Investigación: Centro de Investigación, Innovación y Desarrollo de Materiales (CIDEMAT)

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería de Materiales
Medellín, Colombia

Centro de Investigación, Innovación y Desarrollo de Materiales – CIDEMAT

Sede de Investigación Universitaria – SIU

Universidad de Antioquia

Medellín, Colombia 2019

La presente tesis doctoral fue desarrollada en el Centro de Investigación, Innovación y Desarrollo de materiales (CIDEMAT) de la Universidad de Antioquia, en el marco del proyecto: “Desarrollo de recubrimientos multicapa de Hidroxiapatita (HA)-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN obtenidos mediante pulverización catódica magnetrón RF con potencial aplicación en el campo biomédico” N° 15-1-696 de 2015, financiado por el Departamento administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS).

El proceso de depósito de los recubrimientos que fueron objeto de estudio en este trabajo, se utilizó una cámara de Pulverización Catódica y Nitruración por Plasma, patentada bajo la resolución N° 13-192.338, que fue concedida a la Universidad de Antioquia y a los creadores: Gilberto Bejarano Gaitán, Francisco Javier Bolívar Osorio, Maryory Astrid Gómez Botero y Jaime Alberto Osorio Vélez.

Durante el periodo de estudio, se realizó una estancia de investigación en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la Universidad de Valencia, España, del 11 de febrero al 11 de agosto del año 2019. El objetivo principal de esta pasantía fue la realización de pruebas biológicas *in vitro* de los recubrimientos desarrollados, lo que estuvo a cargo del Doctor José Luís Gómez Ribelles.

AGRADECIMIENTOS

Durante la presente tesis, producto de mis estudios de Doctorado en Ingeniería de Materiales en la Universidad de Antioquia, estuvieron involucradas muchas personas y entidades que brindaron su apoyo durante los últimos 4 años:

A mi alma mater, Universidad de Antioquia, donde he realizado toda mi formación profesional desde el pregrado en Ingeniería de Materiales, maestría en Ingeniería de Materiales y donde actualmente me encuentro cerca de culminar estudios doctorales. Gracias también al grupo CIDEMAT por poner a mi servicio todas sus instalaciones y herramientas.

A COLCIENCIAS, por financiar mi proyecto de investigación doctoral 15-1-696 de 2015 y por la beca para realizar los estudios correspondientes en el programa de Doctorado en Ingeniería de Materiales. De igual manera, agradezco al programa Enlazamundos de la alcaldía de Medellín por el apoyo económico para la realización de la estancia académica internacional.

A mis directores de tesis, profesora Maryory Astrid Gómez y profesor Francisco Bolívar Osorio, gracias por guiarme en esta etapa de aprendizaje y formación profesional, gracias por todo el acompañamiento, asesoría y enseñanzas. También agradezco a todos los integrantes del grupo CIDEMAT, profesores Félix Echeverría, Gilberto Bejarano Gaitán, Franklin Jaramillo, Jorge Calderón y Juan Castaño y mis compañeros del posgrado, Marllory Isaza, Dayana Mesa, Leidy Toro, Aida Echavarría, Elbert Contreras, Hernán Mejía y Darling Perea.

Al centro de biomateriales de la Universidad Politécnica de Valencia, donde realicé mi pasantía doctoral, gracias a la profesora Patricia Rico, profesor José Luis Gómez Ribelles y Laura Sánchez. Gracias también al profesor Miguel Ángel Pacha Olivenza del departamento de ciencias biomédicas de la universidad de Badajoz.

A mi familia, en especial mis padres María y Luis, a mis hermanos Yuhan y Fabián y a mi novia Ana Maria, gracias por todo el apoyo y comprensión.

RESUMEN

Actualmente, la profilaxis antibiótica no es suficiente para el tratamiento de infecciones asociadas con materiales implantables. Por esta razón, es necesario desarrollar nuevas alternativas, complementarias a los métodos farmacéuticos tradicionales. El presente estudio tiene como objetivo responder a esta necesidad para el caso de cirugías de implantes. En él, fueron obtenidos recubrimientos multicapa biocompatibles y antibacteriales de Hidroxiapatita (HA)-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN sobre la aleación de Ti-6Al-4V, mediante la técnica de pulverización catódica magnetrón. Durante la caracterización de estos recubrimientos, se evaluó su composición química y de fases mediante las técnicas: espectroscopía de energía dispersiva de rayos X, espectroscopía micro-Raman y difracción de rayos X. El estudio estructural, topográfico y morfológico fue realizado por las técnicas: haz de iones focalizados, microscopía electrónica de barrido, de transmisión y de fuerza atómica. Las propiedades mecánicas fueron determinadas por nano indentación y micro rayado. Por último, la respuesta biológica *in vitro* fue evaluada mediante pruebas con células madre mesenquimales de ratón: citotoxicidad, adhesión y diferenciación; y ensayos de viabilidad y adhesión de bacterias de la cepa *Stapilococcus aureus*. Mediante el estudio composicional realizado, se comprobó el depósito de la fase HA, con relaciones Ca/P entre 1.67 y 1.76; vibraciones moleculares relacionadas con los grupos funcionales (PO₄)³⁻ e OH⁻, así como también, picos de difracción característicos de este compuesto. El estudio estructural de los recubrimientos evidenció la obtención de arquitecturas multicapa, con alta correlación a los diseños realizados previo al proceso de depósito de cada sistema. A nivel superficial, se observó una morfología de granos en todos los sistemas, con rugosidades entre 11 ± 0.6 nm y 27 ± 2.1 nm. Además, se obtuvo un aumento en la mojabilidad y la energía libre superficial del Ti-6Al-4V mediante el depósito de los recubrimientos de HA-Ag. Por otro lado, se obtuvieron valores entre 5.1 ± 0.3 GPa y 6.5 ± 0.7 GPa para la dureza y entre 110 ± 5 GPa y 130 ± 7 GPa para el módulo de elasticidad los recubrimientos multicapa desarrollados. Se encontró que el uso de las bicapas intermedias disminuye en aproximadamente un 35 % los esfuerzos residuales de la película de HA-Ag, mejorando su adhesión al sustrato en un 46 % y 84 %, respectivamente para la incorporación respectiva del TiO₂/TiN y SiO₂/TiN. Finalmente, las pruebas biológicas *in vitro* realizadas indicaron un carácter potencialmente no tóxico en los recubrimientos ante la línea celular utilizada.

Adicionalmente, se registró un efecto bactericida a bajas concentraciones de Ag (< 0.25 mg/L), lo que demuestra la obtención de un balance entre biocompatibilidad y propiedades antibacteriales, combinación altamente deseada en superficies de potencial aplicación en el campo biomédico.

LISTA DE PRODUCTOS

Los siguientes artículos y conferencias son los principales productos de la presente tesis doctoral:

ARTÍCULOS

I. *“Effect of thermal treatment on structure, phase and mechanical properties of hydroxyapatite thin films grown by RF magnetron sputtering”.*

J.A. Lenis, F.M. Hurtado, M.A. Gómez, F.J. Bolívar. Revista: Thin Solid Films, noviembre de 2018, **publicado**.

II. *“Multi-layer bactericidal silver - calcium phosphate coatings obtained by RF magnetron sputtering”.*

J.A. Lenis, L.J. Toro, F.J. Bolívar. Revista: Surface and Coatings Technology, marzo de 2019, **publicado**.

III. *“Development of multilayer Hydroxyapatite - Ag/TiN-Ti coatings deposited by radio frequency magnetron sputtering with potential application in the biomedical field”.*

J.A. Lenis, G. Bejarano, P. Rico, J.L. Gómez Ribelles, F.J. Bolívar. Revista: Surface and Coatings Technology, junio de 2019, **publicado**.

IV. *“Effect of deposition temperature and target-substrate distance on the structure, phases, mechanical and tribological properties of multi-layer HA-Ag coatings obtained by RF magnetron sputtering”.*

J.A. Lenis, M.A. Gómez, F.J. Bolívar. Revista: Surface and Coatings Technology, agosto de 2019, **publicado**.

V. *“Structure, morphology, adhesion and in vitro biological evaluation of antibacterial multi-layer HA-Ag/SiO₂/TiN/Ti coatings obtained by RF magnetron sputtering for biomedical applications*

J.A. Lenis, P. Rico, J.L. Gómez Ribelles, M.A. Pancha-Olivenza, M.L. González-Martín, F.J. Bolívar. Materials Science & Engineering C, julio de 2020, **publicado.**

VI. *“Structure, mechanical and biological evaluation of multi-layer HA-Ag/TiO₂/TiN coatings deposited by RF magnetron sputtering”.*

J.A. Lenis, Elbert Contreras Romero, M.A. Gómez, Miguel A. Pancha-Olivenza, P. Rico, J.L. Gómez Ribelles, F.J. Bolívar. **En construcción.**

VII. *“Development of multilayer Hydroxyapatite (HA)-Silicon (Si) deposited on Ti6Al4V by magnetron sputtering for biomedical applications: effect of roughness”.*

K. Pérez, J.A. Lenis, P. Rico, J.L. Gómez Ribelles, F.J. Bolívar. **En construcción.**

CONGRESOS

I. “*Microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite thin films grown by RF magnetron sputtering*”

J.A. Lenis, SMT³¹ International Conference on Surface Modification Technologies. Mons, Bélgica, del 5 al 7 de julio de 2017. **Ponencia oral.**

II. “*Evaluación biológica in vitro de recubrimientos de Hidroxiapatita-Plata obtenidos mediante pulverización catódica magnetron RF*”.

J.A. Lenis, IX CIM 2017, Congreso internacional de materiales. Barranquilla, Colombia, del 14 al 16 de noviembre de 2017. **Ponencia oral.**

III. “*in vitro evaluation of calcium phosphate thin films obtained by RF magnetron sputtering*”.

J.A. Lenis, XVI Simposio PECET: avances en la investigación de enfermedades tropicales. Medellín, Colombia, del 21 al 23 de marzo de 2018. **Ponencia oral.**

IV. “*Mechanical characterization and in vitro studies of silver - calcium phosphate thin films obtained by RF magnetron sputtering*”.

J.A. Lenis, 2018 MRS Spring Meeting and Exhibit. Phoenix, AZ, USA, del 2 al 6 de abril de 2018. **Ponencia oral.**

V. *“Effect of deposition temperature and target-substrate distance on the structure, phases, mechanical and tribological properties of multi-layer HA-Ag coatings obtained by RF magnetron sputtering” y “Development of multilayer Hydroxyapatite - Ag/TiN-Ti coatings deposited by radio frequency magnetron sputtering with potential application in the biomedical field”*.

J.A. Lenis, 46th International Conference on Metallurgical Coatings and Thin Films. San Diego, CA, USA, del 19 al 24 de mayo de 2019. **Ponencia oral y póster.**

VI. *“Desarrollo de recubrimientos multicapa de HA-Ag/SiO₂ obtenidos mediante pulverización catódica magnetrón RF con potencial aplicación en el campo biomédico” y “HA-Si”*.

J.A. Lenis, X CIM 2019, Congreso internacional de materiales. Bucaramanga, Colombia, del 23 al 25 de octubre de 2019. **Ponencia oral y póster.**

OTROS PRODUCTOS

I. *“Planificación a largo plazo para la construcción de una visión del futuro de Antioquia, proyecto Antioquia 2050, contrato interadministrativo N° 4600007904 Gobernación/ 0316 Instituto para el Desarrollo de Antioquia (IDEA) del 2017”*

J.A. Lenis, participante en el proyecto: Antioquia 2050 de la gobernación de Antioquia, en la temática de bienestar, salud y longevidad. Concurso por méritos, obtenido mediante la postulación del tema principal de la tesis: “modificación superficial de implantes quirúrgicos con un recubrimiento biocompatible y antibacterial con el fin de solucionar problemas asociados a infecciones bacteriales y el rechazo por falta de osteointegración”. **En proceso.**

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	22
2. Marco teórico y estado del arte	24
2.1. Implantes protésicos.....	24
2.2. Biomateriales	25
2.2.1. Células madre mesenquimales.....	26
2.3. Citotoxicidad.....	27
2.4. Infecciones bacterianas	28
2.4.1. <i>S. aureus</i>	28
2.5. Efecto bactericida de Ag.....	28
2.6. La técnica de pulverización catódica magnetrón como una herramienta para la modificación superficial de implantes	29
2.7. Recubrimientos de HA e HA-Ag obtenidos por pulverización catódica magnetrón	32
2.8. Uso de capas de anclaje para mejorar la adherencia al sustrato en recubrimientos de HA e HA-Ag	35
3. Planteamiento del problema.....	37
4. Hipótesis y objetivos.....	39
4.1. Hipótesis	39
4.2. Objetivo general.....	39
4.3. Objetivos específicos	39
5. Metodología experimental	40
5.1. Materiales y equipos	40
5.2. Obtención de los recubrimientos	41
5.2.1. Recubrimiento de HA-Ag.....	41
5.2.2. Capas de anclaje	42
5.2.3. Recubrimientos multicapa compuestos	43
5.3. Tratamiento térmico.....	44
5.4. Caracterización química, estructural, de fases y mecánica de los recubrimientos obtenidos.....	44
5.4.1. Composición química.....	45
5.4.2. Morfología y estructura en sección transversal	45
5.4.3. Rugosidad, mojabilidad y energía libre superficial	47

5.4.4.	Evaluación de fases presentes.....	48
5.4.5.	Dureza, módulo de elasticidad, adhesión y esfuerzos residuales	49
5.5.	Evaluación biológica <i>in vitro</i> de los recubrimientos.....	49
5.5.1.	Disolución de HA y liberación de Ag	50
5.5.2.	Citotoxicidad de Ag.....	50
5.5.3.	Citotoxicidad de los recubrimientos	51
5.5.4.	Adhesión celular.....	52
5.5.5.	Diferenciación celular.....	52
5.5.6.	Adhesión y viabilidad bacterial	53
5.6.	Análisis de imágenes.....	54
5.7.	Análisis estadístico.....	54
6.	Resultados	55
6.1.	Desarrollo de los recubrimientos multicapa	55
6.1.1.	Obtención del sistema multicapa de HA-Ag sobre Ti-6Al-4V	55
6.1.1.1.	Composición química: relación Ca/P y porcentaje atómico de Ag.....	55
6.1.1.2.	Espesor, estructura y fases	58
6.1.1.3.	Efecto del tratamiento térmico en la estructura de HA-Ag.....	64
6.1.2.	Obtención de los sistemas multicapa de HA-Ag/TiO ₂ /TiN y HA-Ag/SiO ₂ /TiN sobre Ti-6Al-4V.	67
6.1.2.1.	Composición química, morfología, estructura y fases	67
6.1.2.2.	Propiedades mecánicas.....	86
6.1.2.2.1.	Dureza y módulo de elasticidad	87
6.1.2.2.2.	Esfuerzos residuales	96
6.1.2.2.3.	Adhesión.....	98
6.1.3.	Evaluación biológica <i>in vitro</i> de los recubrimientos desarrollados.....	101
6.1.3.1.	Disolución de HA-Ag y estudio de liberación de Ag en medio de PBS 101	
6.1.3.2.	Biocompatibilidad de los recubrimientos.....	106
6.1.3.2.1.	Citotoxicidad de Ag	107
6.1.3.2.2.	Viabilidad celular	108
6.1.3.2.3.	Adhesión celular.....	110
6.1.3.2.4.	Diferenciación celular	115
6.1.3.3.	Evaluación antibacterial <i>in vitro</i> de los recubrimientos	119

6.1.3.3.1. Adhesión bacterial.....	119
6.1.3.3.2. Viabilidad bacterial	121
7. Discusión general.....	124
8. Conclusiones	130
9. Trabajo futuro	131
Referencias	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del proceso de pulverización catódica magnetrón. .	30
Figura 2. Esquema de las diferentes zonas de crecimiento de capas delgadas en función de la temperatura reducida T/T_f , adaptado de [45].	31
Figura 3. Equipo de pulverización catódica magnetrón de la Universidad de Antioquia. ...	41
Figura 4. Arquitectura diseñada del recubrimiento de HA-Ag.	42
Figura 5. Capas de anclaje utilizadas: (I) $TiO_2/TiN-Ti$ y (II) $SiO_2/TiN-Ti$.	43
Figura 6. Arquitectura de los recubrimientos multicapa compuestos desarrollados: (I) HA-Ag/ $TiO_2/TiN-Ti$ y (II) HA-Ag/ $SiO_2/TiN-Ti$.	43
Figura 7. Determinación del espesor de los recubrimientos de HA-Ag mediante perfilometría.	45
Figura 8. Secuencia metodológica utilizada para la obtención de las lamelas por FIB-FESEM.	47
Figura 9. Relación Ca/P (a) y porcentaje atómico de Ag (b), para los recubrimientos de HA-Ag en función de la distancia y temperatura de depósito.	57
Figura 10. Espesor de los recubrimientos de HA-Ag en función de la distancia y temperatura de depósito.	58
Figura 11. Estructura en sección transversal (SEM) de los recubrimientos de HA-Ag depositados a RT: a) 4 cm, b) 6 cm y c) 8 cm; y depositados a 200 °C: d) 4 cm, e) 6 cm y f) 8 cm.	59
Figura 12. Espectros micro-Raman de los recubrimientos de HA-Ag en función de la distancia y temperatura de depósito.	60
Figura 13. Difractogramas de los recubrimientos de HA-Ag en función de la distancia de depósito: a) RT y b) 200 °C.	62
Figura 14. Morfología superficial (SEM) y estructura en sección transversal FIB-FESEM, para el recubrimiento de HA-Ag obtenido a 4 cm de distancia: a) RT, b) 200 °C y c) 200 °C y tratado térmicamente a 400 °C por 2 h.	65

Figura 15. Difractograma del recubrimiento de HA-Ag obtenido a 4 cm: a) 200 °C y b) 200 °C y tratado térmicamente a 400 °C por 2 h.	66
Figura 16. Relación Ca/P y porcentaje atómico de Ag para el sistema de referencia de HA-Ag y los recubrimientos multicapa compuestos: HA-Ag/TiO ₂ /TiN e HA-Ag/SiO ₂ /TiN.	68
Figura 17. Rugosidad del sistema de referencia de HA-Ag y los recubrimientos multicapa compuestos: HA-Ag/TiO ₂ /TiN e HA-Ag/SiO ₂ /TiN.	70
Figura 18. Ángulo de contacto y energía libre superficial para el sistema de referencia de HA-Ag y los recubrimientos multicapa compuestos: HA-Ag/TiO ₂ /TiN e HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	71
Figura 19. Morfología superficial (FESEM) y estructura en sección transversal (SEM) para el sistema de referencia de HA-Ag (a) y los recubrimientos multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN (b) y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	73
Figura 20. Estructura en sección transversal (FIB-FESEM) para el sistema de referencia de HA-Ag (a) y los recubrimientos multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN (b) y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	74
Figura 21. Estructura en sección transversal del recubrimiento de referencia de HA-Ag obtenida mediante TEM.....	75
Figura 22. Estructura en sección transversal del recubrimiento de referencia de HA-Ag obtenida mediante HRTEM.	76
Figura 23. Estructura en sección transversal y composición química del recubrimiento de referencia de HA-Ag obtenida mediante STEM y EDS.	77
Figura 24. Estructura en sección transversal del recubrimiento de HA-Ag/TiO ₂ /TiN obtenida mediante TEM.....	78
Figura 25. Estructura en sección transversal y composición química del recubrimiento de HA-Ag/TiO ₂ /TiN obtenida mediante STEM y EDS.....	79
Figura 26. Estructura en sección transversal del recubrimiento de HA-Ag/SiO ₂ /TiN obtenida mediante TEM.....	80

Figura 27. Estructura en sección transversal del recubrimiento de HA-Ag/SiO ₂ /TiN obtenida mediante HRTEM.	81
Figura 28. Estructura en sección transversal y composición química del recubrimiento de HA-Ag/SiO ₂ /TiN obtenida mediante STEM y EDS.	82
Figura 29. Difractogramas para el sistema de referencia de HA-Ag y los recubrimientos multicapa compuestos: HA-Ag/TiO ₂ /TiN e HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	83
Figura 30. Espectros micro-Raman para las capas intermedias de: a) TiN, b) TiO ₂ /TiN y c) SiO ₂ /TiN.....	85
Figura 31. Espectros micro-Raman en el rango de: I) 200 a 1200 cm ⁻¹ y II) 3000 a 4000 cm ⁻¹ , para el recubrimiento de referencia de HA-Ag (a) y para los sistemas multicapa compuestos de: HA-Ag/TiO ₂ /TiN (b) y HA-Ag/SiO ₂ /TiN (c). I) Rango	86
Figura 32. Dureza y módulo de elasticidad para las capas intermedias utilizadas.	88
Figura 33. Curvas de carga vs descarga, a carga incremental, para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	89
Figura 34. Propiedades mecánicas: a) dureza y b) módulo de elasticidad, en función de la profundidad de indentación para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa de HA-Ag/TiO ₂ /TiN y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	91
Figura 35. Curvas de carga vs descarga a 3 mN, para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.	92
Figura 36. Porcentaje de recuperación elástica para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.	93
Figura 37. Dureza y módulo de elasticidad evaluadas a 3 mN de carga, para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	95

Figura 38. Resistencia elástica y resistencia a la deformación plástica para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	96
Figura 39. Esfuerzos residuales para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	97
Figura 40. Resultados del ensayo de micro rayado realizado sobre los recubrimientos de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	99
Figura 41. Análisis Raman realizado sobre las huellas de rayado obtenidas en los sistemas multicapa compuestos de: HA-Ag/TiO ₂ /TiN y HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	100
Figura 42. Imagen superficial (FESEM) y estructura en sección transversal (FIB-FESEM), para el recubrimiento de referencia de HA-Ag luego de haber sido inmerso en PBS por tiempos de 24 h, 48 h y 192 h.	102
Figura 43. Estudio composicional mediante EDS (3 kV) realizado a la muestra de HA-Ag luego de ser inmersa en PBS durante 192 h.	103
Figura 44. Concentración acumulativa de Ag liberada del recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN e HA-Ag/SiO ₂ /TiN, en función del tiempo.....	104
Figura 45. Velocidad de liberación de Ag en el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO ₂ /TiN e HA-Ag/SiO ₂ /TiN, en función del tiempo.....	106
Figura 46. Citotoxicidad de Ag ⁺ sobre las mMSCs mediante el ensayo MTT. Valores significativos como: ****p < 0.0001, ***p < 0.001.....	107
Figura 47. Imágenes ópticas de mMSCs expuestas a medio de cultivo con Ag, en diferentes concentraciones.	108
Figura 48. Viabilidad celular ante mMSCs de los recubrimientos desarrollados mediante el ensayo MTT. Valores significativos como: ****p < 0.0001, *p < 0.1.....	109

Figura 49. Imágenes de fluorescencia (10X), mostrando las mMSCs vivas teñidas con calcein-Am (verde) y células muertas teñidas con EthD-1 (magenta): a) Control vida, b) control muerte, c) Ti-6Al-4V, d) HA libre de Ag, e) HA-Ag, f) HA-Ag/TiO ₂ /TiN, g) HA-Ag/SiO ₂ /TiN.....	110
Figura 50. Imágenes de fluorescencia de mMSCs adheridas sobre la superficie de los diferentes recubrimientos desarrollados y del sustrato de Ti-6Al-4V a tiempos de 3 h y 24 h. Citoesqueleto (Actina) en color rojo; núcleo (Dapi) en color azul; adhesiones focales (Vinculina) en color verde.	111
Figura 51. Área de expansión celular (a) y circularidad (b) de mMSCs adheridas sobre el sustrato y los recubrimientos desarrollados. Valores significativos como: ****p < 0.0001, **p < 0.01, *p < 0.1.	113
Figura 52. Área de adhesiones focales (a) y número de adhesiones focales (b) de mMSCs sobre el sustrato y los recubrimientos desarrollados. Valores significativos como: ****p < 0.0001, ***p < 0.001, *p < 0.1.	115
Figura 53. a) Imágenes de fluorescencia mostrando la diferenciación de mMSCs sobre el sustrato de Ti-6Al-4V y los recubrimientos desarrollados, OPN (verde) y núcleos (azul), b) número de núcleos y c) cuantificación de la expresión de OPN. Valores significativos como: ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.1.	116
Figura 54. a) imágenes de fluorescencia mostrando la diferenciación de mMSCs sobre el sustrato de Ti-6Al-4V y los recubrimientos desarrollados, IBSP (verde) y núcleos (azul), b) número de núcleos y c) cuantificación de la expresión de IBSP. Valores significativos como: ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.1.	118
Figura 55. Adhesión de S. aureus sobre el sustrato y la superficie de los recubrimientos medida a diferentes tiempos: a) 1 h, b) 2 h y c) 4 h.	121
Figura 56. Resultados del ensayo Live/Dead realizado para las bacterias adheridas a la superficie del sustrato y los recubrimientos desarrollados: a) imágenes de fluorescencia de las S. Aureus, bacterias con una membrana comprometida consideradas muertas o moribundas están teñidas en rojo, mientras que las bacterias con una membrana intacta están teñidas en verde. b) viabilidad de las bacterias.	123

Figura 57. Esquematzación del proceso de pulverización y depósito de la HA: I) efecto de la distancia y II) efecto de la temperatura.	125
Figura 58. Representación esquemática de los recubrimientos de HA-Ag obtenidos a: I) RT y II) 200 °C.....	126
Figura 59. Representación esquemática del proceso de infiltración de HA-Ag con PBS y liberación de Ag ⁺	127
Figura 60. Representación esquemática del mecanismo bactericida de los iones Ag ⁺ , adaptado de [154]......	128

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación Ca/P para diferentes fosfatos de calcio, construida según [21,26,27].....	26
Tabla 2. Composición química del sustrato utilizado.....	40
Tabla 3. Anticuerpos usados para el ensayo de diferenciación celular.	53
Tabla 4. Tamaño del cristalito para los recubrimientos de HA-Ag obtenidos en función de la distancia y temperatura de depósito.	63
Tabla 5. Tamaño del cristalito para la HA en los sistemas de HA-Ag depositados sobre el sustrato y sobre las capas intermedias de óxido y nitruro.	84

1. Introducción

El uso de recubrimientos osteoconductivos y antibacteriales sobre materiales comúnmente usados en la manufactura de implantes protésicos ha emergido como un camino para evitar el rechazo de esos dispositivos en el cuerpo humano y prevenir infecciones bacteriales [1,2], debido a que al menos un 5 % de estas cirugías están sujetas a complicaciones asociadas con infecciones, que generalmente tienen graves consecuencias para la salud del paciente, llegando en algunos casos hasta la extracción del implante [3]. Por esta razón, actualmente se está investigando acerca de la modificación superficial del acero inoxidable y las aleaciones de titanio [4]. Por muchos años, las evaluaciones biológicas han mostrado buena respuesta en términos de adhesión, proliferación y diferenciación celular por parte de los fosfatos de calcio, particularmente en la Hidroxiapatita (HA), por lo que viene siendo ampliamente usada como componente para la fabricación de implantes [5,6], lo cual se debe principalmente a su gran similitud química con el mineral óseo [5,7]. Las propiedades mecánicas de este compuesto en volumen no son muy altas, por esta razón, la HA normalmente se usa para llenar pequeñas cavidades o como reemplazo protésico en zonas sometidas a bajas cargas [8,9]. Sin embargo, se ha encontrado que, al ser depositada sobre un sustrato metálico, éste puede proveer un buen soporte mecánico al sistema, ampliando su campo de aplicación en el campo biomédico.

Por otro lado, actualmente se están buscando elementos que actúen a nivel local para inhibir la adhesión bacterial y formación del biofilm, protegiendo el implante durante la cirugía y en las etapas posoperatorias. La plata (Ag) parece ser una opción prometedora al respecto, dado su amplio espectro antibacteriano ante cepas gram-negativas y gram-positivas, que se ha demostrado durante muchos años [10]. La estrategia elegida para combinar estas propiedades a nivel superficial ha sido incorporar nanopartículas de Ag en recubrimientos de HA. Entre las técnicas comúnmente usadas para ello, se ha encontrado que la pulverización catódica magnetron confiere a estas películas una alta homogeneidad, compactación y pureza [11,12]. Además, los más altos valores de adhesión entre la HA y la aleación de Ti-6Al-4V, por ejemplo, han sido obtenidos por esta técnica [13]. A través de la modificación superficial de esta aleación con un recubrimiento de HA-Ag, es posible inducir osteointegración y propiedades antibacteriales. Además, se puede mejorar la resistencia a la corrosión, dado que

estas películas usualmente actúan como capa barrera, que evita la posible migración de iones Al^{3+} y V^{2+} al medio, lo que puede generar citotoxicidad a largo plazo [14]. Adicionalmente, el uso de capas intermedias de transición entre el recubrimiento y el sustrato metálico, puede favorecer esta resistencia química y además, mejora la adhesión al sustrato, lo que ha sido relacionado con fenómenos de difusión entre elementos de las diferentes capas usadas durante el proceso de depósito o tratamientos térmicos posteriores [15,16].

En el presente trabajo se aprovecharon las propiedades osteoconductoras de HA y el carácter antibacterial de Ag, para desarrollar un novedoso sistema multicapa compuesto por 5 capas de HA y 4 capas intermedias de Ag depositado sobre Ti-6Al-4V usando un equipo semi-industrial de pulverización catódica magnetrón. Además, se evaluó el efecto de la incorporación de dos bicapas intermedias de (TiO_2/TiN) y (SiO_2/TiN), sobre la composición química, estructura, fases, propiedades mecánicas y biológicas *in vitro* de dicho sistema.

2. Marco teórico y estado del arte

2.1. Implantes protésicos

El envejecimiento de la población a nivel mundial, acompañado de los altos índices de accidentalidad en países sudamericanos como Colombia, aumentan la demanda de implantes protésicos. Con estos dispositivos se busca reemplazar tejido óseo perdido o deteriorado en los seres humanos como consecuencia de eventos traumatológicos o daños degenerativos, mejorando de esta manera su calidad de vida, dado que el hueso es un elemento fundamental en procesos de locomoción, soporte y protección de órganos. Con la edad, los constituyentes óseos dejan de renovarse y las fracturas se multiplican, dado que el hueso comienza a presentar elevados niveles de porosidad, que lo fragilizan. Los implantes protésicos deben cumplir con ciertos requerimientos mecánicos que están relacionados con la magnitud de carga a la que estará sometido el hueso durante su aplicación, esto comprende un amplio rango que va desde pequeños huesos del oído o de la estructura dental, hasta huesos del hombro, cadera o rodilla [5]. En los Estados Unidos se reportan más de 1 millón de reemplazos de cadera y rodilla anualmente, que generan costos cercanos superiores a los 25 millones de dólares [17]. Según el Registro Nacional Conjunto en el Reino Unido, el número de reemplazos de cadera y rodilla aumentó en un 19.47 % y 27.72 % respectivamente, durante la última década [18].

El primer requerimiento solicitado a los implantes protésicos fue tener una alta resistencia, por esta razón, estos dispositivos son usualmente fabricados de materiales metálicos, tales como: el acero inoxidable y aleaciones de titanio, que poseen buena respuesta tanto a tracción como a compresión. Además de las propiedades mecánicas, para estar en contacto con medio biológico, estos implantes no podrían liberar sustancias tóxicas. El desarrollo de las prótesis continuó con la incorporación de materiales osteoconductivos, es decir, que permitieran el desarrollo del tejido óseo en contacto con el dispositivo implantado, induciendo la migración y diferenciación de células en células óseas, estimulando la creación de nuevo tejido óseo. Para lograr esto, los estudios fueron enfocados en materiales cerámicos, debido a que muchos de estos presentan gran similitud química con el mineral óseo. Sin embargo, las propiedades mecánicas de éstos cuando son usados en volumen, son bajas, por lo cual, actualmente se

están utilizando para recubrir prótesis metálicas, generando sistemas compuestos con buena osteointegración y resistencia mecánica [5].

2.2. Biomateriales

Los biomateriales son materiales inertes, utilizados para ser incorporados o implantados dentro de un organismo vivo con el fin de reemplazar o restaurar alguna función, permaneciendo en contacto permanente o intermitente con fluidos corporales. La utilización de éstos en el campo biomédico ha incrementado en los últimos años con el desarrollo de nuevas formulaciones tecnológicas. Los biomateriales se clasifican de acuerdo a su respuesta con el tejido circundante en: bioinertes y biocativos. Los materiales bioinertes son aquellos que presentan una respuesta biológica mínima frente al ambiente fisiológico donde se encuentran. Allí se da una fijación mecánica caracterizada por la formación de una capa fibrosa delgada y no adherente, que desfavorece la unión biomaterial-hueso, ya que se producen micro movimientos, lo que puede desencadenar en la falla o rechazo del implante. Dentro de esta clasificación se encuentran las aleaciones de titanio, la alúmina y el polietileno de alta densidad [19]. En contraste, los materiales bioactivos son aquellos que tienen una respuesta biológica específica en la interacción del material, la cual influye en la formación de un enlace fuerte de éste con el tejido receptor. El tiempo de integración entre el tejido y el material bioactivo, depende de la naturaleza, composición y propiedades mecánicas de este último. Dentro de esta clasificación se encuentran los biovidrios y fosfatos de calcio como la HA [20,21].

La HA es un fosfato de calcio de fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}$ y estructura cristalina hexagonal. Este biomaterial constituye la fase mineral más importante de los tejidos duros de los vertebrados y desde principios del siglo XX se ha demostrado su similitud con el mineral óseo. Esto hace que actualmente, la HA natural o sintética, sea ampliamente utilizada en cirugía ósea o dental cuando es necesario un aporte de material [5]. Desde los años 80 la HA comenzó a utilizarse clínicamente para mejorar la osteointegración en implantes [22], desde entonces el número de estudios al respecto ha venido en constante aumento. En la literatura se ha reportado que la utilización de HA en implantes favorece el crecimiento del hueso y que no hay formación de tejido fibroso a su alrededor [23]. Este material es usado

frecuentemente en procesos de reconstrucción de cráneo y maxilofaciales, también para el tratamiento de fracturas óseas y reemplazo de articulaciones [24]. La HA se diferencia de otros fosfatos de calcio tales como: fosfato tricálcico, dicálcico, entre otros, por su relación Ca/P de 1.67, ver Tabla 1. Esta característica estequiométrica es muy importante, dado que cuando esta relación disminuye, la acidez y solubilidad aumentan. Por ejemplo, para valores Ca/P menores a 1, la acidez y solubilidad es extremadamente alta, por lo que estos materiales no son adecuados para implantes [25].

Tabla 1. Relación Ca/P para diferentes fosfatos de calcio, construida según [21,26,27].

Material	Fórmula molecular	Relación Ca/P
Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5
Fosfato dicálcico	CaHPO_4	1
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Fosfato tricálcico	α and β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
HA deficiente en calcio	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.5
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2

La evaluación de biocompatibilidad en materiales usados para la fabricación de implantes protésicos, es normalmente realizada sobre células madre mesenquimales, debido a que se busca, además de evaluar la viabilidad celular, proliferación y adhesión, determinar si las células tienden a diferenciarse hacia alguna línea celular específica.

2.2.1. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés), son células multipotenciales primitivas que poseen una morfología fibroblastoide. Las MSC pueden

diferenciarse *in vitro* o *in vivo*, en diversos tipos celulares tales como los osteocitos, fibroblastos, osteoblastos condrocitos, adipocitos, entre otras. Esto depende del estímulo que sea aplicado, que puede ser físico, químico o eléctrico. Este tipo celular posee un núcleo grande y redondo con un nucléolo prominente, rodeado de finas partículas de cromatina que delimitan y diferencian el núcleo claramente. Las MSC pueden ser aisladas principalmente de médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, páncreas, periostio, fluido amniótico, líquido sinovial, entre otras fuentes, de donde se han logrado establecer cultivos que han permitido estudiar sus propiedades funcionales y fenotípicas [28].

2.3. Citotoxicidad

La citotoxicidad es la capacidad intrínseca que puede poseer un agente químico (anticuerpo), para producir efectos adversos sobre un organismo celular determinado [29]. Dependiendo del agente o proceso que haya desencadenado la muerte o lisis de la célula, se diferencian tres tipos de muerte: i) apoptosis, que se refiere a la destrucción o muerte celular provocada por ella misma, que se genera con el fin de auto controlar su desarrollo y crecimiento. Este proceso es muy importante en los organismos, dado que hace posible la destrucción de células dañadas, evitando la aparición de enfermedades como el cáncer, que es generado como consecuencia de la replicación indiscriminada de una célula dañada; ii) necrosis, que en términos morfológicos se define como una hinchazón citoplasmática hasta la ruptura de la membrana celular; iii) autofagia, que es un mecanismo de supervivencia del organismo que le permite sobrevivir sin la energía proveniente del alimento, si ésta es excesiva, puede conducir a la muerte de la célula [30].

La citotoxicidad puede ser evaluada mediante diferentes métodos *in vitro*: i) exposición directa de las células sobre la superficie del material a evaluar y ii) exposición de las células a una solución que contenga las partículas a analizar, previamente extraídas de un material determinado. Uno de los ensayos más utilizados para realizar pruebas de citotoxicidad, es el método del MTT, que se basa en la reducción metabólica del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial

de las células tratadas. Este método proporciona una curva precisa de respuesta a cantidades pequeñas de células, obteniendo una alta reproducibilidad en las mediciones [31].

2.4. Infecciones bacterianas

Las infecciones son principalmente causadas por las bacterias: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* [32,33]. Se ha encontrado que la resistencia a la profilaxis antibiótica de estos patógenos incrementa cuando están en contacto con un material implantado, lo que en muchas ocasiones es debido a la falta de vascularización, que obstaculiza los antibióticos y las células del sistema inmune. Además, la interacción entre el biomaterial y el huésped, parece disminuir el mecanismo de defensa, facilitando la adhesión bacteriana en la prótesis y con ello la formación del biofilm, que es la principal causa de formación de infecciones microbianas [34].

2.4.1. *S. aureus*

La *S. aureus* es una bacteria gram positiva y constituye uno de los patógenos más asociados a infecciones en biomateriales implantables y dispositivos biomédicos [35]. Esta cepa se adhiere fácilmente a superficies metálicas y poliméricas, generando un biofilm que es protegido mediante una matriz hidratada de polisacáridos que evita la difusión de antibióticos para contrarrestar la infección. Esta matriz constituye una barrera fisicoquímica que aumenta la resistencia de dicho microorganismo [36].

2.5. Efecto bactericida de Ag

Estudios sobre el efecto bactericida de Ag han sido reportados desde comienzo de siglo e incluso, es fácil encontrar en la literatura artículos relacionados con ello a partir de 1985. Países como España, Italia, China y Estados Unidos han liderado este tipo de análisis, donde los principales resultados muestran una clara inhibición sobre la adhesión y proliferación de cepas bacterianas tanto gram positivas como gram negativas [37,38]. En cuanto al mecanismo bactericida de este elemento, se ha establecido lo siguiente: los iones Ag^+ son

altamente reactivos y se unen fácilmente a las proteínas bacterianas, alterando su estructura y causando la ruptura de la membrana. Además, eventualmente previenen la función del ADN asociado con la división y replicación bacteriana. Es importante relatar que la liberación de iones Ag^+ es favorecida cuando se tienen nano partículas de dicho elemento, dado que la relación entre el área superficial y el volumen es muy alta. Pero además de ser bactericida, la Ag puede causar citotoxicidad. Para ello, se han establecido niveles de concentración máximos en los cuales puede estar dicho elemento sin causar daño celular, algunos autores hablan de valores entre 1-2.5 mg/L [39], sin embargo, otros sugieren concentraciones de hasta 10 mg/L [40,41].

2.6. La técnica de pulverización catódica magnetrón como una herramienta para la modificación superficial de implantes

La pulverización catódica magnetrón es un proceso de depósito físico realizado bajo atmósfera controlada y un alto nivel de vacío, por el cual se pueden obtener recubrimientos metálicos y cerámicos con elevada pureza, uniformidad, espesores que van desde decenas de nanómetros hasta unas pocas micras y es posible depositar sistemas multicapa [42]. El proceso involucra tres etapas, ver Figura 1:

I) La ionización de un gas inerte, generalmente Ar, debido principalmente a su alto peso molecular. Los iones son generados mediante una descarga de plasma entre dos electrodos, un cátodo (blanco o material a pulverizar) y un ánodo (sustrato o material a recubrir), y la ionización se da como producto de colisiones inelásticas entre electrones libres y las moléculas de gas inerte.

II) La pulverización del cátodo generada por la colisión de átomos e iones de Ar sobre su superficie, que generan la eyección por transferencia de momento, de los átomos del blanco

III) El depósito de los átomos del blanco sobre la superficie del sustrato: una vez han sido eyectados los átomos del blanco, éstos siguen líneas de campo eléctrico generadas por la diferencia de potencial entre los dos electrodos, alcanzado finalmente la superficie del sustrato [43].

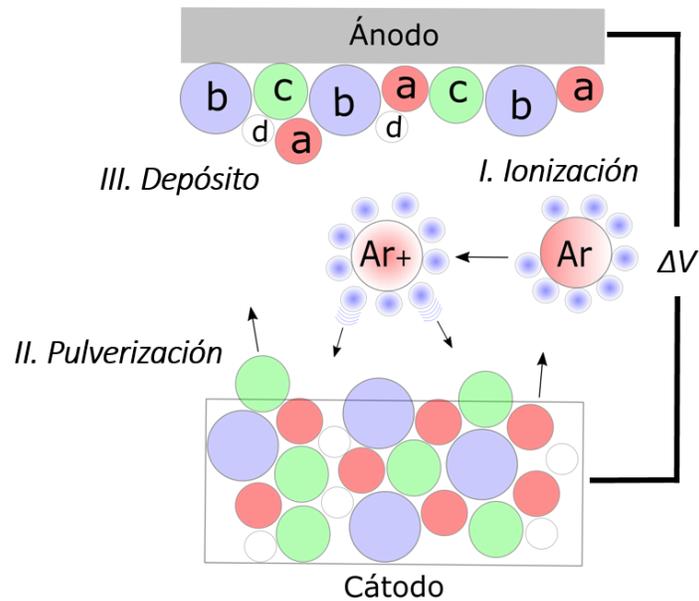


Figura 1. Representación esquemática del proceso de pulverización catódica magnetrón.

La composición química y de fases, así como la estructura y propiedades mecánicas de las películas depositadas por pulverización catódica magnetrón pueden ser controladas mediante los parámetros de proceso: temperatura, presión, potencia aplicada al blanco, distancia blanco-sustrato y el voltaje bias, que es un voltaje usualmente aplicado al sustrato para aumentar la energía de llegada en los átomos del blanco, mejorando principalmente la adhesión del recubrimiento y además, se utilizada para generar una limpieza iónica de los sustratos previo al inicio del proceso de depósito, lo que remueve óxidos y residuos orgánicos de la superficie del sustrato [44]. Un modelo que relaciona la estructura de los recubrimientos con la temperatura reducida utilizada durante el depósito (T/T_f), que es la relación entre la temperatura del sustrato y la temperatura de fusión del material del blanco, fue propuesto por Thornton. En la Figura 2 se muestra las diferentes zonas de crecimiento de capas delgadas obtenidas por pulverización catódica magnetrón.

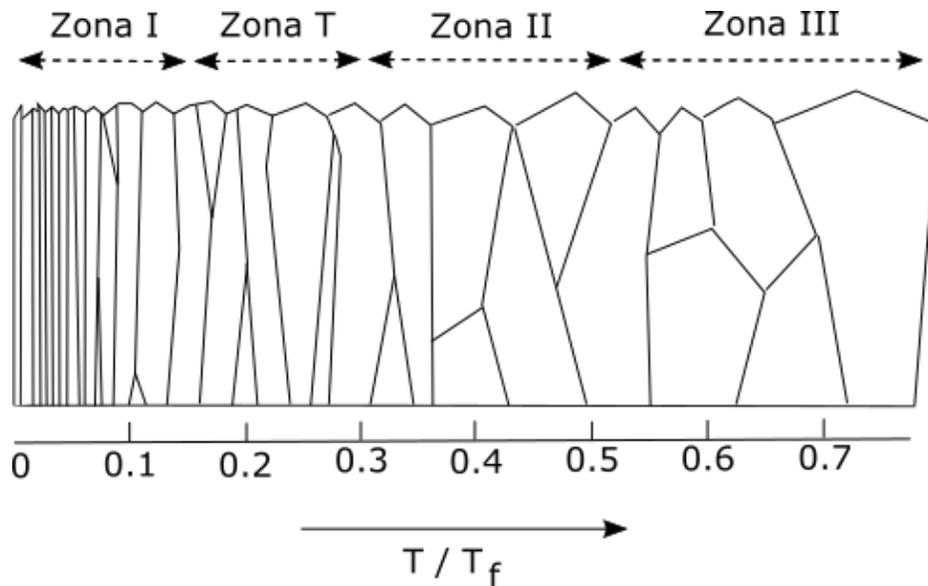


Figura 2. Esquema de las diferentes zonas de crecimiento de capas delgadas en función de la temperatura reducida T/T_f , adaptado de [45].

-La zona I es cuando la relación $T/T_f < 0.1$: cuando la temperatura de depósito es baja, los átomos quedan atrapados en el punto de llegada a la superficie, ya que no poseen la energía necesaria para difundirse. Por tal razón, se genera una alta densidad de nucleación debido a que la coalescencia y crecimiento de granos se encuentra inhibido.

-La zona de transición (zona T) es cuando la relación T/T_f está entre 0.1 y 0.3: en la región de transición puede existir cierta difusión superficial. Allí, la formación de la película comienza con el desarrollo de una estructura de granos muy finos, que refleja la densidad inicial de núcleos, debido a la inmovilidad de las fronteras de grano

-La zona II es cuando la relación T/T_f está entre 0.3 y 0.5: para esta región de temperaturas, el crecimiento de la película está determinado completamente por la migración a lo largo de las fronteras intergranulares. Por este motivo, se da un crecimiento cristalino a partir de los granos formados inicialmente sobre la superficie. El tamaño de estos granos es mayor debido a los fenómenos de coalescencia entre núcleos. La estructura obtenida es de tipo columnar, densa, formada por granos micro cristalinos, cuyo diámetro medio aumenta proporcional a la temperatura reducida

-La zona III es cuando la relación $T/T_f > 0.5$: en esta última región, la estructura está dominada por fenómenos de difusión interna y recristalización, que se generan por la segregación de impurezas hacia la superficie de los granos. Dichas impurezas intervienen negativamente en el crecimiento de los cristales y dan lugar a fenómenos de nucleación secundaria. Por esta razón, la morfología de las capas evoluciona desde granos de tipo columnar (a temperaturas bajas) y de tipo equiaxial (a temperaturas altas), acercándose a lo que ocurre en un material masivo [45].

2.7. Recubrimientos de HA e HA-Ag obtenidos por pulverización catódica magnetrón

Entre las principales técnicas para el depósito de HA están: plasma spray, sol-gel, depósito electroquímico, depósito electroforético y pulverización catódica magnetrón [11,12,46,47]. La más usada es plasma spray, debido a su versatilidad y bajo costo. Sin embargo, dicha técnica presenta algunas limitaciones. Por ejemplo, se ha encontrado que los recubrimientos de HA poseen baja adhesión al sustrato y el control sobre la composición química durante el proceso de depósito es muy difícil. Además, las altas temperaturas alcanzadas pueden generar la descomposición de elementos del recubrimiento [48–54]. En contraste, la técnica de pulverización catódica magnetrón confiere a las películas de HA un gran control composicional, gran similitud química al blanco, elevada pureza y buena adhesión al sustrato [55–58]. Esta última propiedad puede ser hasta un 70 % mayor a la registrada por otras técnicas de depósito de HA, lo que está relacionado con fenómenos de difusión atómica en la interfaz entre el recubrimiento y el sustrato durante el proceso de depósito que genera enlaces muy fuertes [13]. Otra razón se basa en el bajo espesor de película obtenida (que es hasta 100 veces menor que en plasma spray y sol-gel, por ejemplo), debido a que con la reducción en el espesor, se disminuye también la cantidad de defectos que pueden generar fallas adhesivas en los recubrimientos [59]. Otra característica importante es que el proceso de depósito por pulverización catódica puede ser realizado desde la temperatura ambiente.

Diversos estudios se han realizado acerca de la producción de recubrimientos de HA sobre sustratos metálicos con potencial aplicación en el campo biomédico. En ellos, se han obtenido diferentes propiedades en función de los parámetros involucrados en el proceso de depósito,

permitiendo obtener películas con espesores que van desde 20 hasta 900 nm [60]. En cuanto a la temperatura del sustrato, se ha encontrado una gran influencia sobre el crecimiento de la película y la estructura que ésta adopte [61]. Aunque debido a la alta temperatura de fusión de la HA (>1500 °C) [62], la temperatura reducida durante el proceso de depósito es generalmente baja, debido principalmente a que los equipos de pulverización no operan a temperaturas muy elevadas, lo que genera la obtención preferencial de recubrimientos densos y sin estructura columnar. Sin embargo, han sido reportados cambios estructurales en recubrimientos de HA mediante la aplicación de tratamientos térmicos pos-depósito [12,63,64], que tienen como finalidad mejorar su cristalinidad, dado que han encontrado que la velocidad de disolución en medio biológico de dicho compuesto disminuye con el aumento en la cristalinidad [65]. No obstante, estos tratamientos pueden generar fallas adhesivas debido a las diferencias del coeficiente de expansión térmica entre el recubrimiento de HA y el sustrato, de Ti-6Al-4V por ejemplo, que poseen valores respectivos de $11.5 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ y $8.50 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ [15]; la presión de trabajo y el tipo de gas utilizado durante el proceso de pulverización también son factores importantes, debido a que pueden afectar la pureza y composición química de los recubrimientos, generada por cambios en la movilidad de los átomos dentro de la cámara de pulverización. A.Y. Fedotkin *et al.* [66] obtuvieron recubrimientos de HA con relaciones Ca/P entre 1.77 y 1.93, utilizando diferentes gases para la pulverización: Ar, Kr y Xe. A. R. Boyd *et al.* [49] depositaron recubrimientos de HA a dos presiones de trabajo diferentes, obteniendo alteraciones en la relación Ca/P, que disminuyó desde 3.38 a 1.82 con el aumento de la presión de 1 a 2 Pa. Con respecto a esto, actualmente hay una controversia, dado que investigadores a nivel mundial reportan la obtención películas de HA con relaciones Ca/P variables en un amplio rango que va desde 1.5 hasta 3.8 [60,67], cuando el valor estequiométrico de dicho compuesto es de 1.67 y bajo norma es aceptada hasta en 1.76 [68,69]. Se ha encontrado también que la aplicación del voltaje bias aumenta la relación Ca/P, debido a que los átomos de fósforo no alcanzan a llegar hasta la superficie del sustrato debido a la presencia de iones de oxígeno cargados negativamente, fenómeno conocido como resputtering del fósforo [60]. A.A. Ivanova *et al.* [70] reportan un aumento en la relación Ca/P de recubrimientos de HA de 1.58 a 2.16, para voltajes bias respectivos de -50V y -100V. Este parámetro además, puede aumentar la energía de llegada de los átomos a la superficie del sustrato, densificando los recubrimientos y mejorando su adherencia

[60,70]; la densidad de potencia aplicada al blanco de HA influye también sobre la composición química de los recubrimientos, dado que, en materiales compuestos como la HA, no todos los elementos son eyectados del blanco con la misma facilidad, por esta razón, se debe aplicar una energía lo suficientemente alta para garantizar que todos los elementos van a estar presentes en la película. Normalmente, son aplicadas altas densidades de potencia, que van de 3 a 8 W/cm² [6,49]. Sin embargo, puede haber una limitación en cuanto a ello a la hora de trabajar con blancos de grandes dimensiones. El control efectivo de todos los parámetros descritos anteriormente resulta bastante complejo, es por esto que el desarrollo de recubrimientos de HA sobre sustratos metálicos aún se encuentra en proceso.

Con el desarrollo de los recubrimientos de HA por pulverización catódica magnetrón, ha despertado un interés por su modificación estructural con diferentes elementos que permitan mejorar sus propiedades mecánicas, potenciar su respuesta biológica e inducir propiedades antibacteriales. A. Vladescu *et al.* [55] incrementaron la dureza (H) y módulo de elasticidad (E), en un recubrimiento de HA mediante el dopaje con partículas de SiC. La incorporación de este último elemento en la HA, favoreció también su resistencia a la corrosión y bioactividad, de acuerdo a los autores del reporte [71]. De manera similar, E.S. Thian *et al.* [72] obtuvieron un aumento en la difusión celular y producción de matriz extracelular *in vitro* de recubrimientos de HA mediante su dopaje con Si. Por otro lado, con el fin de proteger la superficie de la HA ante una posible colonización bacteriana, pero sin afectar su biocompatibilidad, están siendo investigados diferentes elementos antibacteriales, uno de éstos es Ag, que resulta bastante atractivo dado que posee un amplio espectro antibacterial [10]. Recubrimientos de este tipo han sido obtenidos principalmente mediante un proceso de co-depósito, que involucra la eyección simultánea de elementos de HA, como el Ca, P, O e H y, por otro lado, Ag, que puede ser incorporada mediante el uso de un blanco híbrido o utilizando dos blancos independientes, pulverizados simultáneamente. W. Chen *et al.* [12] obtuvieron un recubrimiento de HA con un 2 % en peso de Ag utilizando esta metodología, la película presentó buenas propiedades antibacteriales frente a las cepas *S. aureus* y *S. epidermidis* sin causar citotoxicidad sobre la línea celular de osteoblasto.

El control sobre la composición química de estos sistemas no ha sido logrado completamente, I.Y. Grubova *et al.* [73] reportan valores de Ca/P entre 1.5 y 1.55 para recubrimientos de HA

dopados con Ag entre 0.13 y 0.36 % en peso. M. A. Surmeneva *et al.* [54] obtuvieron un recubrimiento tricapa de HA (1 μm) - nano partículas de Ag (1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) – CaP amorfo (de 150 nm y 1 μm). Las capas de HA y CaP fueron depositadas por pulverización catódica magnetrón, mientras que la Ag fue sintetizada en solución y posteriormente obtenida sobre la HA mediante depósito electroforético. La evaluación antibacterial de los recubrimientos estuvo fuertemente influenciada por el espesor de la capa final de CaP, dado que la liberación de Ag al medio se da a través de ésta. Los resultados indicaron que con un espesor de 150 nm para el CaP había un efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa *E. coli*. Se encontró además que un tercio de la cantidad de Ag inicial es liberada después de 3 días de inmersión en fluido biológico simulado. En este tipo de sistemas puede ocurrir una liberación continua de pequeñas cantidades de iones Ag^+ que actúan como agentes antibacteriales sobre la superficie del recubrimiento [74].

2.8. Uso de capas de anclaje para mejorar la adherencia al sustrato en recubrimientos de HA e HA-Ag

El éxito a largo de plazo de todo recubrimiento depende en gran medida de su estabilidad química, pero también de la fuerza de unión entre éste y el sustrato o soporte donde fue depositado. Por esta razón, se han estudiado diferentes capas intermedias de anclaje entre la HA y aleaciones de Ti. E. Mohseni *et al.* [9] incrementaron en un 44.5 % la adherencia entre un recubrimiento de HA obtenido por pulverización catódica magnetrón y un sustrato de Ti-6Al-4V, mediante la incorporación de una capa intermedia de TiN. Este nitruro, al igual que la HA, es biocompatible y por otro lado, posee una alta estabilidad química, que lo hace óptimo para este tipo de aplicación [16]. A. Vladescu *et al.* [75] evaluaron el efecto de la incorporación de diferentes capas intermedias de TiC, NbC y ZrC, sobre las propiedades mecánicas y biológicas de un recubrimiento de HA dopado con Ti depositado sobre Ti-6Al-4V. Los resultados obtenidos revelaron que la adhesión entre el sustrato y el recubrimiento de HA-Ti fue mejorada y no se afectaron las propiedades biomédicas requeridas tales como la alta resistencia a la corrosión, altos niveles de proliferación de células osteoblásticas y buenos niveles de expresión génica. En otro estudio, D.A. Hamdi *et al.* [76] obtuvieron un aumento en la adhesión de un recubrimiento de HA sobre un sustrato de Ti-6Al-4V, mediante

la incorporación de una bicapa intermedia de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ obtenida por pulverización catódica magnetrón. Este comportamiento fue asociado a la similitud estructural entre las capas de óxido y el sustrato, así como también entre sus coeficientes de expansión térmica. Por otro lado, en un recubrimiento de HA obtenido sobre Ti-6Al-4V por depósito electroforético, A. Araghi *et al.* [77] reportan un aumento en la adherencia mayor al 100 % tras la incorporación de una capa de TiO_2 , que fue asociado a la difusión de elementos en la interfaz entre el óxido y la HA.

En cuanto a los sistemas de HA-Ag obtenidos por pulverización catódica magnetrón, no se han encontrado estudios acerca del uso de capas intermedias que tengan como finalidad mejorar la fuerza de unión del recubrimiento al sustrato

3. Planteamiento del problema

La combinación entre osteointegración y propiedades antibacteriales en recubrimientos de HA-Ag obtenidos por pulverización catódica magnetrón, los hace muy atractivos para un uso potencial en implantes quirúrgicos. Sin embargo, el desarrollo de este tipo de sistemas actualmente se encuentra en curso, dado que no existe una parametrización definida que permita controlar la composición química, estructura y cristalinidad de HA. Adicionalmente, la incorporación de Ag, que puede realizarse de manera simultánea con la HA mediante un codepósito [12,78,79], presenta algunas limitaciones asociadas a la diferencia en la tasa de pulverización entre ambos materiales. Para solucionar esto, se han reportado procesos de síntesis previos, que involucran la obtención de nano partículas de Ag por técnicas como: sol gel, ping/drying y depósito electroforético [54,80]. Sin embargo, una nueva y versátil alternativa al uso combinado de técnicas es la obtención de sistemas multicapa de HA-Ag en un solo paso por pulverización catódica magnetrón, con lo que se pueden reducir los tiempos de proceso en comparación con la última metodología descrita y, además, hay un mayor control sobre la pulverización de cada elemento a diferencia del también mencionado, proceso de co-depósito. Con el depósito multicapa es posible también modificar la arquitectura de los recubrimientos con el fin de controlar la liberación de Ag hacia el medio, que es de suma importancia dado que dicho elemento puede causar citotoxicidad a partir de ciertas concentraciones. En cuanto a ello, es necesario resaltar que hay una divergencia en la literatura con respecto a estos valores citotóxicos, encontrando reportes que van desde 2.5 mg/L hasta 10 mg/L de Ag [40,81].

Por otro lado, las diferencias químicas producto de la naturaleza disímil de los recubrimientos cerámicos de HA y los sustratos metálicos, suponen un gran reto en cuanto a la adhesión de estos sistemas, dado que ello puede afectar ampliamente su aplicación, siendo una de las principales causas de falla en los implantes recubiertos, lo que genera una disminución en la calidad de vida de los pacientes, aumenta las estancias hospitalarias y el riesgo en cuanto a la necesidad de requerir nuevas intervenciones quirúrgicas. En la literatura se han reportado los mayores valores de adhesión en este tipo de sistemas mediante la técnica de pulverización catódica magnetrón, sobre algunas otras tales como: plasma spray, sol gel, electrodeposición [13]. No obstante, el mejoramiento en la adhesión siempre será un objetivo en este tipo de

recubrimientos. En cuanto a ello, se han encontrado buenos resultados mediante la incorporación de capas intermedias de TiN/Ti [9] y de TiO₂/TiN [82], entre la HA y el Ti-6Al-4V. Sin embargo, falta información acerca de los mecanismos y fenómenos involucrados en ello, así como el estudio riguroso de la interfaz generada entre la HA y las diferentes capas, como también su influencia sobre la estructura de HA y su respuesta biológica. En cuanto al recubrimiento de HA-Ag, no se han encontrado reportes relacionados con la incorporación de capas intermedias entre este recubrimiento y sustratos metálicos.

4. Hipótesis y objetivos

4.1. Hipótesis

“Es posible obtener sistemas multicapa de HA-Ag sobre Ti-6Al-4V con un adecuado control composicional y mejorar su adhesión mediante la incorporación de capas intermedias de TiO₂/TiN y SiO₂/TiN obtenidas por pulverización catódica magnetrón”.

4.2. Objetivo general

Desarrollar sistemas multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN sobre Ti-6Al-4V mediante pulverización catódica magnetrón RF con potencial aplicación en tornillos y microplacas utilizadas en implantes quirúrgicos.

4.3. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones de depósito para un sistema de HA-Ag sobre un sustrato de Ti-6Al-4V que permitan obtener recubrimientos con buena integridad superficial.
- Obtener capas intermedias de anclaje de TiO₂/TiN y SiO₂/TiN que permitan mejorar la adherencia de los recubrimientos de HA-Ag sobre Ti-6Al-4V.
- Caracterizar las propiedades químicas, mecánicas y la morfología de los recubrimientos obtenidos.
- Determinar el mecanismo de liberación de Ag mediante ensayos en medio biológico simulado.
- Evaluar la biocompatibilidad y las propiedades antibacteriales de los recubrimientos más promisorios mediante pruebas *in vitro*.

5. Metodología experimental

5.1. Materiales y equipos

Los recubrimientos fueron depositados sobre un sustrato de Ti-6Al-4V, cuya composición química, obtenida por espectrometría de emisión óptica usando un equipo ARL Optimix WDXRF (Bruker Q8 Magellan), se presenta en la Tabla 2. El tamaño de las muestras fue de 10×10×3 mm³, su preparación involucró un proceso de pulido mecánico utilizando la secuencia de lijas N° 100, 240, 320, 400, 600, 1000, 1500 y finalmente un paño con suspensión de alúmina de 5 µm hasta obtener un acabado tipo espejo. Con el fin de eliminar impurezas y contaminantes orgánicos, los sustratos fueron inmersos en una solución 3:1 de acetona-etanol e introducidos en un equipo de ultrasonido (60 Hz, Intertek CD-4800) durante 15 min.

Tabla 2. Composición química del sustrato utilizado.

Muestra	Elemento								
	Si	Ni	Mo	Fe	Ti	Al	V	W	Cu
Ti-6Al-4V	0.031	0.191	0.013	0.068	90.26	5.02	4.49	0.079	0.023

Para la obtención de los recubrimientos se utilizó un blanco de HA, con relación Ca/P de 1.67, así como también blancos de Ag, Ti y Si, con una pureza del 99.9 % y geometría rectangular, con 500×100×6 mm³. Estos fueron suministrados por la empresa FERGTEC.

El proceso de depósito fue realizado en un equipo de pulverización catódica magnetrón, diseñada, fabricada y patentada (patente N°13-192.338, febrero de 2016) por la Universidad de Antioquia y creadores del centro de Investigación, Innovación y Desarrollo de Materiales (CIDEMAT). Este equipo cuenta tanto con fuentes de radio frecuencia (RF) (13.46 MHz, SEREM), como fuentes de corriente directa (DC) (ADL, MARIS). En la Figura 3 se presenta el equipo descrito.



Figura 3. Equipo de pulverización catódica magnetrón de la Universidad de Antioquia.

5.2. Obtención de los recubrimientos

Antes de iniciar el proceso de depósito de los recubrimientos, se realizó una limpieza iónica con Ar^+ sobre los sustratos, utilizando un voltaje de -700 V , durante 50 min. Posteriormente la cámara de pulverización fue llevada hasta una presión de 0.05 Pa (background) y después de la inclusión de argón (99 % de pureza), se alcanzó una presión de trabajo de 0.5 Pa .

5.2.1. Recubrimiento de HA-Ag

Durante el proceso de depósito, realizado a la presión de trabajo, se aplicó una potencia de 600 W (RF) al blanco de HA y 20 W (DC) al blanco de Ag. Además, se polarizó el porta muestras con un voltaje bias de -20 V . Por otro lado, buscando optimizar las propiedades superficiales de este recubrimiento, se realizó la variación en los parámetros de proceso: distancia blanco-sustrato (4 cm , 6 cm y 8 cm), y la temperatura de depósito entre temperatura ambiente (RT) y $200\text{ }^\circ\text{C}$. La arquitectura del recubrimiento desarrollado consistió en 5 capas de HA con 4 capas intermedias de Ag, obtenidas mediante la rotación del porta muestras en 180° para el depósito de cada elemento. El tiempo de depósito de HA fue de 300 min, que fue seleccionado con base en un trabajo previo [83]. Mientras que el tiempo de depósito de Ag fue de 12 min. La Figura 4 muestra la configuración esquemática del sistema

desarrollado. Por otro lado, se realizó el depósito de un recubrimiento de HA libre de Ag con propósitos comparativos, principalmente en la evaluación mecánica y biológica.

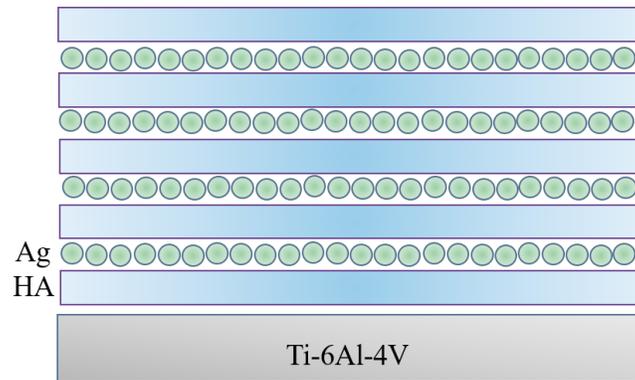


Figura 4. Arquitectura diseñada del recubrimiento de HA-Ag.

5.2.2. Capas de anclaje

Con el fin de mejorar la adhesión entre los recubrimientos y el sustrato, se utilizó inicialmente una delgada capa de Ti, depositada durante 10 min a 12 rpm, a la presión de trabajo, temperatura de 250 °C y distancia blanco-sustrato de 8 cm. Para ello se aplicó una potencia de 1.2 kW (DC) al blanco de Ti y se polarizaron los sustratos con un voltaje Bias de -70 V. Posteriormente, se realizó el depósito de una capa de TiN durante 60 min a 12 rpm y se utilizó una mezcla de Ar + N₂ 2:1. La presión de trabajo, la potencia aplicada al blanco de Ti, el voltaje bias y la distancia blanco-sustrato, no fueron modificados con relación al recubrimiento anterior. Las condiciones de depósito de esta bicapa fueron seleccionadas teniendo en cuenta un trabajo previo realizado en el grupo de investigación CIDEMAT [82,84]. Sobre esta bicapa, se realizó el depósito de una capa de TiO₂ y una capa de SiO₂, bajo ensayos independientes. Para ello, se utilizó una mezcla de Ar + O₂ 3:1, se aplicó nuevamente una potencia de 1.2 kW (DC) al blanco de Ti durante la obtención del TiO₂ y 600 W (DC) al blanco de Si, durante la obtención del SiO₂. El tiempo de depósito de ambas capas fue de 90 min y los parámetros de presión, temperatura, distancia y voltaje bias no se modificaron con relación a la obtención de la bicapa TiN-Ti. La Figura 5 muestra la arquitectura de las capas de anclaje utilizadas.

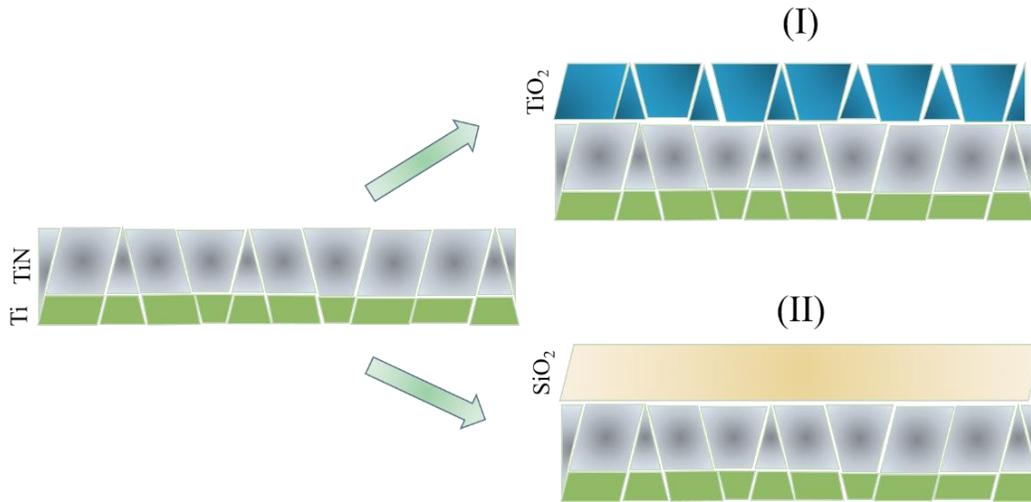


Figura 5. Capas de anclaje utilizadas: (I) $\text{TiO}_2/\text{TiN-Ti}$ y (II) $\text{SiO}_2/\text{TiN-Ti}$.

5.2.3. Recubrimientos multicapa compuestos

Los recubrimientos multicapa de HA-Ag/ TiO_2/TiN e HA-Ag/ SiO_2/TiN fueron depositados usando la parametrización descrita en el apartado anterior, en la Figura 6 se presenta la configuración de dichos recubrimientos.

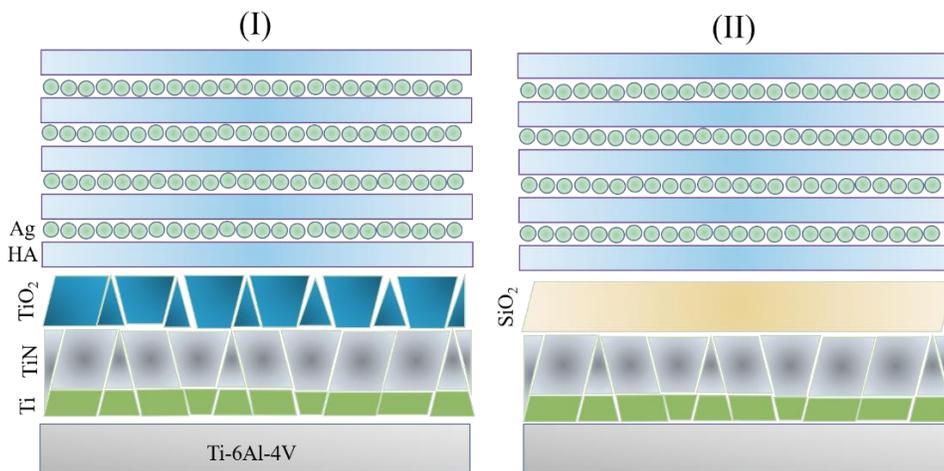


Figura 6. Arquitectura de los recubrimientos multicapa compuestos desarrollados: (I) HA-Ag/ $\text{TiO}_2/\text{TiN-Ti}$ y (II) HA-Ag/ $\text{SiO}_2/\text{TiN-Ti}$.

5.3. Tratamiento térmico

El recubrimiento de HA-Ag depositado directamente sobre el Ti-6Al-4V fue sometido a un tratamiento térmico a 400 °C durante 2 h, a una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 2°/min, usando un horno Nabertherm P330 oven. Esto fue realizado con el fin de evaluar el efecto de la temperatura en la cristalinidad del recubrimiento, dado que los recubrimientos de fosfato de calcio obtenidos por pulverización catódica magnetrón son generalmente de baja cristalinidad, lo que favorece su disolución en medio biológico. Además, con dicho tratamiento se evaluó la posible difusión de Ag incorporada en las capas intermedias del recubrimiento. Los parámetros de temperatura y tiempo fueron seleccionados de acuerdo a un trabajo previo y algunos reportes de la literatura [12,83].

5.4. Caracterización química, estructural, de fases y mecánica de los recubrimientos obtenidos

Durante el desarrollo inicial del recubrimiento de HA-Ag, el espesor de las películas fue medido por perfilometría, usando un perfilometro Bruker DektakXT equipado con una punta de silicio. Para ello, se realizó un barrido a lo largo de 100 µm en una zona de la muestra previamente tratada, que fue cubierta con cinta termo resistente durante el proceso de depósito con la finalidad de obtener un escalón medible después de su remoción, ver la Figura 7. Por otro lado, el espesor de los recubrimientos multicapa compuestos fue determinado directamente mediante la visualización estructural de las películas por técnicas microscópicas.

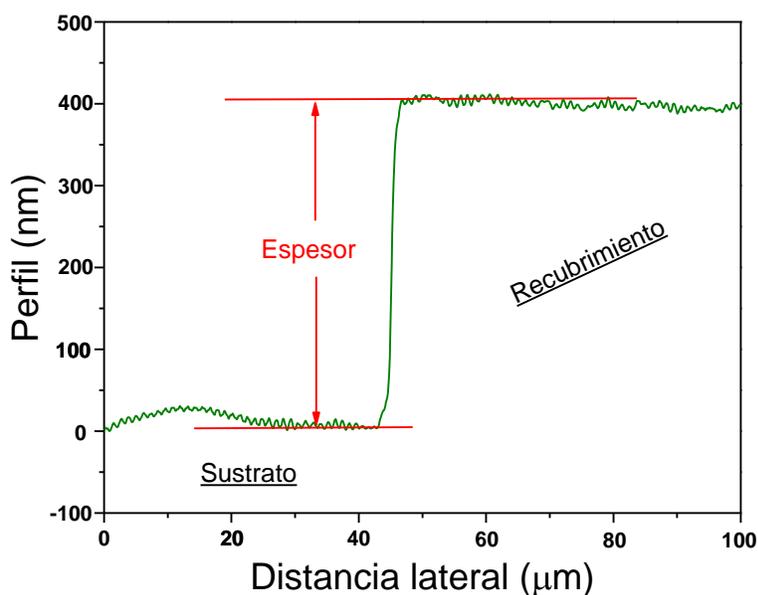


Figura 7. Determinación del espesor de los recubrimientos de HA-Ag mediante perfilometría.

5.4.1. Composición química

La composición química de los recubrimientos de HA-Ag en la fase inicial, durante la cual se evaluó el efecto de los parámetros distancia y temperatura de depósito sobre diferentes propiedades de las películas, fue determinada sobre un área de $35 \times 35 \mu\text{m}^2$, mediante la técnica de espectroscopía de dispersión de energía (EDS), usando un equipo Jeol (JSM-6490LVTM, 20 kV). El uso de esta misma técnica, permitió conocer la composición química en los recubrimientos multicapa compuestos durante la fase final del desarrollo de la investigación, realizando exploraciones sobre la sección transversal de las películas usando un equipo JEOL (JEM-2100F, 200 kV).

5.4.2. Morfología y estructura en sección transversal

La morfología superficial de los recubrimientos desarrollados fue observada mediante microscopía electrónica de emisión de campo (FESEM), usando un equipo ZEISS Gemini-SEM500, operado a 2 kV. En cuanto a la estructura en sección transversal, ésta fue analizada

inicialmente por SEM (Jeol- JSM-6490LVTM, 20 kV). Sin embargo, mediante dicha técnica no fue posible observar claramente la arquitectura multicapa de los recubrimientos desarrollados, por lo cual, el estudio estructural fue profundizado mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión TEM (JEOL-JEM-2100F, 200 kV). Para ello, se obtuvo una lamela representativa de cada sistema realizando un corte de $5 \times 5 \times 2 \mu\text{m}^3$ sobre la superficie de las películas, que fue obtenida mediante la técnica de haz de iones focalizados (FIB) usando un equipo ZEISS AURIGA Compact dual beam system, 30 kV, 500 pA.

En la Figura 8 se presenta la secuencia metodológica implementada para la obtención de las lamelas. Allí se observa inicialmente, una doble trinchera realizada sobre la superficie del recubrimiento, cuyo plano en común corresponde a la zona de obtención de la lamela. Posteriormente, las imágenes FESEM muestran el corte realizado con iones de Galio y el traslado de la lamela hasta una rejilla de TEM, previamente introducida dentro del equipo FIB y donde fue soldada. En este punto, se realizó un nuevo proceso de pulido iónico con el fin de reducir el espesor de la lamela hasta por lo menos 100 nm. En las dos últimas imágenes se observa la vista transversal y superficial de la lamela en su estado final, donde las zonas claras observadas a 5 kV indican que el espesor es adecuado para obtener la transmisión de electrones.

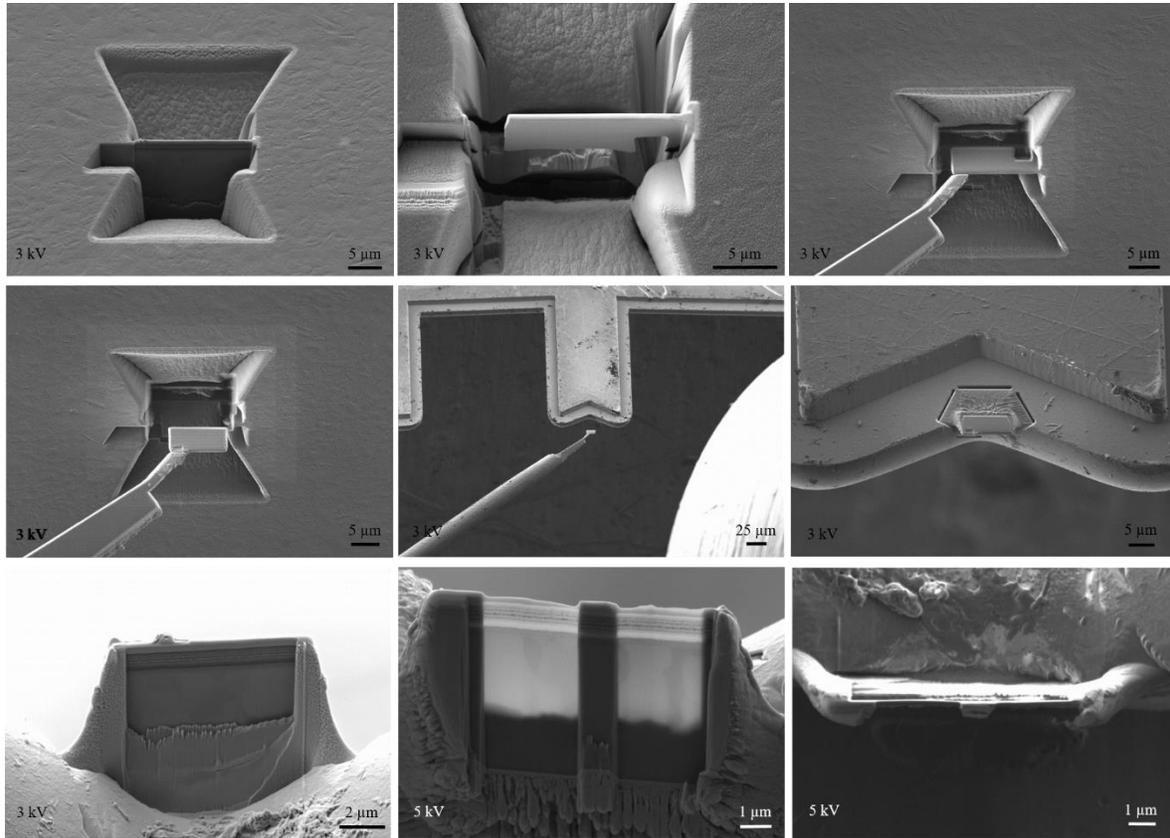


Figura 8. Secuencia metodológica utilizada para la obtención de las lamelas por FIB-FESEM.

5.4.3. Rugosidad, mojabilidad y energía libre superficial

La rugosidad de los recubrimientos fue medida por triplicado mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) sobre un área de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, usando un equipo MFP-3D Infinity, Oxford Instrument Asylum, operado en modo de corriente alterna a una frecuencia de resonancia de 73.52 kHz. Por otro lado, la mojabilidad superficial fue determinada en un goniómetro (Ramé-Hast), usando una gota de agua de $3 \mu\text{L}$ y la energía libre superficial se calculó mediante el método de Neumann [85], que se basa en la ecuación 1:

$$\cos \theta = 2 \left(\frac{\gamma_s}{\gamma_L} \right)^{0.5} \exp [-\beta(\gamma_L - \gamma_s)^2] - 1 \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde γ_s es la energía libre superficial del recubrimiento, γ_L es la energía libre superficial del agua (72.8 mJ/m^2), $\beta=0.0001247 \text{ m}^2/\text{mJ}$ y Θ es el ángulo de contacto con agua.

5.4.4. Evaluación de fases presentes

Inicialmente se realizó un análisis por espectroscopía micro-Raman, usando un equipo Horiba Jobinyvon (Labram HR), con un láser de He-Ne de 633 nm, operado a 17 mW de potencia. Los barridos fueron realizados en rangos de longitud de onda entre 200 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} , donde se identificaron vibraciones del grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$ de HA, así como también bandas asociadas a los enlaces Ti-O, Ti-N y Si-O, de las capas intermedias utilizadas. En adición, se realizó un barrido entre 3000 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} , donde se encontró la vibración del grupo OH^- de HA.

Adicionalmente, los recubrimientos fueron analizados mediante difracción de rayos X, usando un difractómetro Panlitycal X'pert pro MPD en modo reflexión, con radiación $\text{Cu } \alpha$, $\lambda=1.540598 \text{ \AA}$, 45 Kv, 40 mA. La evaluación fue realizada a una velocidad de $0.7^\circ/\text{min}$ y un tamaño de paso de 0.0131° (2Θ). Adicionalmente, se calculó la anchura a media altura (FWHM, por sus siglas en inglés) del pico de mayor intensidad en la HA, usando un ajuste Gaussiano, mediante el software X'pert high score. El tamaño del cristalito para cada recubrimiento fue determinado mediante la ecuación de Scherrer [86], ecuación 2:

$$\beta = \left(\frac{k \times \lambda}{FWHM \times \cos \Theta} \right) \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde β es el tamaño del cristalito, k es el factor de forma del cristal, λ es la longitud de onda de la radiación usada y FWHM es la anchura a media altura del pico de interés y Θ es el ángulo determinado.

5.4.5. Dureza, módulo de elasticidad, adhesión y esfuerzos residuales

Las propiedades mecánicas de los recubrimientos fueron evaluadas mediante nano indentación y micro rayado; los valores de H y E se determinaron usando un nano indentador Agilent G200 con una punta de diamante XP Berkovich con un radio de curvatura de 20 ± 5 nm. Inicialmente se evaluó la influencia de la carga (desde 1.5 mN hasta 25 mN), sobre H, E y la profundidad de penetración en los recubrimientos, buscando obtener una carga donde no hubiese influencia del sustrato sobre las propiedades mecánicas de la película. Posteriormente, se realizaron 9 indentaciones a 3 mN sobre todos los recubrimientos y se determinaron estas propiedades mecánicas usando el método de Oliver y Pharr [87]. La adhesión de los recubrimientos se evaluó mediante un equipo de nano indentación MTS's XP System Corporation, con una punta de diamante de geometría cónica con 10 μ m de diámetro. Mediante este ensayo, realizado por triplicado, se logró obtener la carga crítica (L_C) relacionada con la falla adhesiva de los recubrimientos. Durante la medición, fue aplicada una carga progresiva hasta 500 mN, a una velocidad de 3.21 mN/s, a lo largo de una distancia de 2000 μ m.

Para determinar los esfuerzos residuales se utilizaron sustratos de Si tipo-N, con orientación preferencial a lo largo del plano (100) y con un tamaño de $20 \times 3 \times 0.5$ mm³, que fueron recubiertos con los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN y el cambio en el radio de curvatura de los recubrimientos fue medido con el fin de calcular los esfuerzos residuales generados durante la formación de la película mediante el uso de la ecuación de Stoney [88]. Para ello, se utilizó el perfilómetro Bruker DektakXT. La distancia evaluada en cada muestra fue de 25 mm y las mediciones fueron realizadas por triplicado.

5.5. Evaluación biológica *in vitro* de los recubrimientos

Durante los ensayos biológicos *in vitro* tanto con células como con bacterias, las muestras recubiertas y el sustrato fueron esterilizadas con radiación ultra violeta en una cabina con flujo laminar durante 1 h previo a cada cultivo.

5.5.1. Disolución de HA y liberación de Ag

Se realizó un ensayo de disolución de HA-Ag en medio de tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) a 37 °C, durante un tiempo de 192 h. Para el análisis, fue evaluada la superficie y sección transversal de los recubrimientos con tiempos de inmersión de 24 h, 72 h y 192 h, mediante el equipo dual beam de FIB-FESEM, descrito anteriormente. Adicionalmente, se realizó un mapeo composicional sobre la muestra con mayor tiempo de inmersión, mediante EDS.

El ensayo de liberación de Ag⁺ fue realizado tanto para el sistema de referencia de HA-Ag, como para los recubrimientos multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN. El estudio fue realizado por triplicado mediante la inmersión de muestras recubiertas en PBS a 37 °C, tomando alícuotas de 10 ml de la solución a tiempos de 24 h, 72 h, 192 h, 360 h, 528 h y 720 h de exposición, que fueron reemplazados con solución limpia de PBS para cada tiempo de evaluación. La cuantificación de Ag⁺ en mg/L fue realizada usando un espectrofotómetro de absorción atómica (Thermo Electron Corporation S4), usando una lámpara de Ag.

5.5.2. Citotoxicidad de Ag

Teniendo en cuenta las concentraciones de Ag⁺ registradas durante el ensayo de liberación de dicho elemento en medio de PBS y algunos reportes de la literatura [40,89], se prepararon soluciones de medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, por sus siglas en inglés), con alto contenido de glucosa, 10 % de suero fetal de bovino, 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina) y solución de AgCl, buscando obtener concentraciones de Ag en el medio, desde 0.06 mg/L hasta 14.64 mg/L, y evaluar su efecto sobre células madre mesenquimales de ratón (mMSCs, por sus siglas en inglés), RIKEN Cell Bank, Japón. El estudio fue realizado mediante el ensayo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) Cell Proliferation Kit I, Roche. Inicialmente, fueron sembradas las células con densidad de 10.000/cm², en placas de cultivo p-96 multi-well, a 37 °C y 5 % CO₂, durante 24 h. Posteriormente, el medio fue removido y reemplazado por medio de cultivo que contenía Ag en diferentes concentraciones. Allí se dejó durante 72 h, tiempo a partir del cual, se añadió el reactivo MTT y se incubó nuevamente la placa durante 4 h. El control

citotóxico fue tratado con dimetilsulfóxido al 20 % (DMSO, por sus siglas en inglés) y para el control vida (100 % de viabilidad), se utilizó medio de cultivo limpio (sin Ag). Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Precisely, 1420 Multilabel Counter, VICTOR3).

5.5.3. Citotoxicidad de los recubrimientos

Las mMSCs fueron cultivadas en medio de cultivo celular de DMEM a 37 °C y atmósfera con 5 % CO₂ hasta alcanzar confluencia, que fue lograda a un tiempo aproximado de 8 días. La viabilidad celular fue evaluada en modo contacto y no contacto, respectivamente mediante los ensayos de Live/Dead (Viability/Cytotoxicity kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) y MTT. En todos los experimentos, que fueron realizados por triplicado, la densidad de siembra fue de 10.000 células/cm². Para el primer análisis, las características distintivas de células vivas fueron determinadas mediante la actividad de esterasa intracelular usando la tinción con Calcein AM (Invitrogen), que generó un color verde fluorescente. Mientras que, para las células muertas, la pérdida de integridad de la membrana plasmática fue observada mediante la tinción con Ethidium homodimer-1 (EthD-1) (Life Technologies), generando un color rojo fluorescente. Las células fueron sembradas sobre la superficie de los recubrimientos y del sustrato de Ti-6Al-4V en DMEM. La incubación fue realizada a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂ durante 72 h. El control citotóxico fue tratado nuevamente con DMSO al 20 %. Después del tiempo de incubación, se adicionó una mezcla de Calcein AM y EthD-1 en cada sistema, que fue incubado nuevamente por 4 h. Finalmente, las muestras fueron observadas usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i). Por otro lado, el ensayo MTT fue realizado para evaluar la citocompatibilidad en modo de no contacto de los diferentes recubrimientos, que fueron incubados bajo condiciones de cultivo por 72 h. Después de este tiempo, el medio fue removido y llevado hasta platos de cultivo con células previamente sembradas, realizando una nueva incubación a 37 °C y 5 % CO₂ por 72 h. Posteriormente el reactivo MTT fue añadido a cada muestra y se siguió con el protocolo descrito en el apartado anterior (5.5.2). Para el control vida, se utilizó medio de cultivo limpio (no expuesto a los recubrimientos).

5.5.4. Adhesión celular

La adhesión de mMSCs sobre la superficie de los recubrimientos y del sustrato fue evaluada a tiempos de 3 h y 24 h. Las células fueron sembradas a una densidad de 5.000/cm², sobre la superficie de los materiales en medio de cultivo con DMEM a 37 °C y 5 % CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de adhesión, el medio de cultivo fue eliminado y las células fueron lavadas con Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Invitrogen), y se fijaron en solución de formalina 4 % (Sigma) a 4 °C durante 1 h. Luego, las células fueron lavadas con DPBS y se permeabilizaron con DPBS + Tritón X100 (Sigma) al 0.5 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Con el fin de reducir la señal de fondo, las muestras fueron incubadas en solución de bloqueo con DPBS + Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma) al 2 %. Durante 1 h. Posteriormente, fue eliminado este medio y se añadió el anticuerpo primario de anti-vinculina (Sigma), para la tinción de las adhesiones focales, con una dilución de 1:400 en solución de bloqueo por 1 h a 37 °C y 5 % CO₂. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron lavadas con DPBS + Tritón X100 al 0.1 %, tres veces durante 5 min y se añadió el anticuerpo secundario, que consistió en una mezcla de Alexa Fluor 555 α -mouse (Invitrogen) y Alexa Fluor 488 Phalloidina (Invitrogen), para la tinción del cito esqueleto, diluidos respectivamente a 1:700 y 1:100 en solución de bloqueo por 1 h a 37 °C y 5 % CO₂. Finalmente, las muestras fueron nuevamente lavadas con DPBS + Tritón X100 al 0.1 %, tres veces durante 5 min y se añadió Vectashield que contenía DAPI (Vector laboratories), utilizado para la tinción de los núcleos. Todas las muestras fueron observadas en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i.

5.5.5. Diferenciación celular

Las mMSCs fueron sembradas en medio de DMEM sobre platos de cultivo a 37 °C y 5 % CO₂, durante 48 h hasta alcanzar confluencia. Posteriormente fueron sembradas sobre los diferentes materiales a una densidad de 20.000 células/cm². Durante el ensayo, que duró 15 días, las células fueron estimuladas con medio de diferenciación osteogénica (DMEM + 10 % FBS + 1 % penicilina/estreptomicina + ácido ascórbico 50 μ g/L + β -glicerofosfato 10 mM + dexametasona 0.1 μ M. Transcurrido el tiempo de evaluación, se realizó una inmuno-tinción

similar a la descrita en el apartado anterior (5.5.4). Pero esta vez usando los anticuerpos descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos usados para el ensayo de diferenciación celular.

Diferenciación osteogénica	Anticuerpos	
	Primario	Secundario
Osteopontina (OPN)	OPN anti mouse, Santa Cruz, Biotechnology, 1:200.	Alexa Fluor 555 α -mouse, 1:700 + Alexa Fluor 488 Phalloidina, 1:100.
IBSP	IBSP anti rabbit, 1:200.	Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit, 1:700 (Live Technologies) + Alexa Fluor 488 Phalloidina, 1:100.

5.5.6. Adhesión y viabilidad bacterial

La cepa bacterial usada para el ensayo de adhesión y viabilidad bacteriana fue *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (*S. aureus*) Spanish Type Culture Collection (CECT). Desde el stock congelado, se inocularon placas de agar sangre, que fueron posteriormente incubadas a 37 °C con el fin de obtener los cultivos. De allí fueron inoculados 10 h a 37 °C varios tubos de 4 mL de caldo de soja Trypticase (TSB, por sus siglas en inglés) (BBL, Becton Dickinson, USA). Luego, se usaron 25 mL de este precultivo para inocular recipientes tipo “flasks” de 50 mL de TSB a 37 °C por 14 h. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación (5 min, 20 rpm, 1000 g) (Sorval TC6, Dulon, USA), y lavadas tres veces con PBS (Ph: 7.4) preconditionado a 37 °C. Posteriormente, fueron resuspendidas en PBS a una concentración de 3×10^8 bacterias/mL. Finalmente, la suspensión con bacterias fue puesta en contacto con la superficie de los recubrimientos y del sustrato de Ti-6Al-4V por tiempos de 1 h, 2 h y 4 h, bajo ensayos independientes. Una vez transcurrido el tiempo de evaluación, los microorganismos adheridos fueron sometidos a etiquetado fluorescente, usando el kit de tinción Live/Dead BacLight L-7012 (Invitrogen SA, Spain), y contados bajo fluorescencia usando un equipo Olympus FluoView FV500 Confocal laser Scanner.

5.6. Análisis de imágenes

La adquisición de imágenes durante los ensayos biológicos *in vitro* con células fue realizada a magnificaciones de 10X y 40X, (n=20). Estas imágenes fueron tratadas mediante el software Fiji-Image J, a 8 bits en escala de grises y posteriormente segmentadas usando el Weeding Segmentation con el fin de obtener una máscara binaria. De esta manera se cuantificaron, mediante análisis de partículas, los núcleos por imagen, las adhesiones focales y las expresiones de OPN e IBSP. Por otro lado, la cuantificación de bacterias se realizó con 10 imágenes por muestra a 100X, que fueron analizadas mediante el software NIS Elements Br (Nikon Instrument Inc., NY, USA).

5.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se muestran como la media \pm desviación estándar (SD). Los resultados de viabilidad (MTT), adhesión y proliferación celular, así como también adhesión bacteriana, se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional, por comparaciones múltiples (Tukey's) usando el software GraphPad Prims 6 XML.

6. Resultados

6.1. Desarrollo de los recubrimientos multicapa

Durante el desarrollo de los sistemas de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN, fueron definidos inicialmente los parámetros de proceso que permitieran controlar las propiedades superficiales del recubrimiento de HA-Ag, principalmente su composición química y cristalinidad. Posteriormente, se realizó el depósito de dicho sistema sobre capas de TiO₂/TiN y SiO₂/TiN, que tenían como objetivo principal mejorar la adherencia de la película de HA-Ag al sustrato de Ti-6Al-4V. De igual manera, se evaluó el efecto de estas capas intermedias sobre las características químicas, la estructura, propiedades mecánicas y el comportamiento biológico *in vitro* del recubrimiento de HA-Ag.

6.1.1. Obtención del sistema multicapa de HA-Ag sobre Ti-6Al-4V

Mediante la variación de la distancia y temperatura de depósito, se obtuvieron diferentes recubrimientos de HA-Ag, cuya composición química, espesor, estructura y fases, fueron evaluadas. Con esto, se buscó entender el efecto de dichos parámetros de proceso sobre las propiedades superficiales del recubrimiento y definir la parametrización de mayor control composicional, especialmente relacionada con la obtención de una relación Ca/P cercana al valor estequiométrico de HA (1.67). Una vez definido ello, se evaluó el efecto de un tratamiento térmico pos-depósito sobre la estructura y fases de dicho recubrimiento.

6.1.1.1. Composición química: relación Ca/P y porcentaje atómico de Ag

La Figura 9a muestra la relación Ca/P de los recubrimientos depositados a RT y 200 °C, en función de la distancia blanco-sustrato. Allí es observado un incremento en la relación Ca/P a medida que la distancia de depósito aumenta. Esto podría estar relacionado con un incremento en las colisiones inelásticas dentro de la cámara de depósito, lo que genera pérdidas energéticas y puede afectar en mayor medida la llegada del (PO₄)³⁻ a la superficie del sustrato debido a la repulsión electrostática de aniones generada por la polarización del porta muestras con el voltaje bias. A.A. Ivanova *et al.* [67] reportaron variaciones en la

relación Ca/P de recubrimientos de HA en un rango de 1.53-1.70 obtenido mediante el aumento en la distancia al centro del porta muestras desde 1.5 hasta 7 cm. En adición, B. Feddes *et al.* [90] han encontrado alteraciones en dicha relación estequiométrica atribuidas a la re-pulverización del fósforo, durante el proceso de depósito, por iones de oxígeno cargados negativamente. En un estudio previo ha sido evaluado el efecto del voltaje bias sobre la composición química de recubrimientos de HA obtenidos a una distancia y temperatura fija [83], donde se encontró un incremento en la relación Ca/P a medida que el voltaje aumentó. Un comportamiento similar fue obtenido por M.A. Surmeneva *et al.* [91], quienes obtuvieron relaciones Ca/P de 1.98, 2.55 y 2.88 en recubrimientos de HA depositados a 0, -50 y -100 V, respectivamente.

Por otro lado, en el gráfico se observa una pequeña reducción en la relación Ca/P para las muestras obtenidas a 200 °C en comparación con aquellas depositadas a RT. Esto podría indicar que el incremento en la temperatura generó una mayor excitación del $(\text{PO}_4)^{3-}$ o que el efecto del voltaje bias fue reducido cuando los recubrimientos fueron depositados a 200 °C, posiblemente por la pasivación del titanio a esta temperatura, lo que genera cambios en la carga superficial del sustrato. V. Nelea *et al.* [8] encontraron trazas de TiO_2 en la interfaz entre un sustrato de Ti-4Al-2.5Fe y un recubrimiento de HA depositado a 550 °C mediante pulverización catódica magnetrón. En resumen, fueron obtenidas relaciones Ca/P desde 1.74 hasta 1.84, que son levemente superiores al valor estequiométrico de HA (1.67), a través de la modificación de la distancia y temperatura de depósito. No obstante, el recubrimiento obtenido a 4 cm de distancia y 200 °C presentó el mayor control sobre esta característica química, obteniendo un valor muy cercano a 1.66.

La Figura 9b muestra el contenido atómico de Ag en los recubrimientos. Allí, son apreciados valores entre 3 y 4.5 %. Aunque las variaciones registradas están en un rango estrecho, es posible apreciar una tendencia a disminuir el porcentaje atómico de Ag como función del aumento de la distancia, lo que podría indicar nuevamente la desaceleración sufrida en los átomos eyectados desde el blanco a medida que la distancia al sustrato incrementa. El control del contenido de Ag en recubrimientos para implantes es muy importante, dado que dicho elemento puede causar citotoxicidad a partir de ciertas concentraciones. Algunos autores han encontrado efectos citotóxicos en niveles de hasta 2.5 mg/L [39]. Sin embargo, en un estudio

previo, se encontraron concentraciones acumulativas de Ag menores a 0.1 mg/L a lo largo de 15 días de inmersión en solución de PBS, para recubrimientos de fosfato de calcio con un 4.2 % atómico de Ag [92].

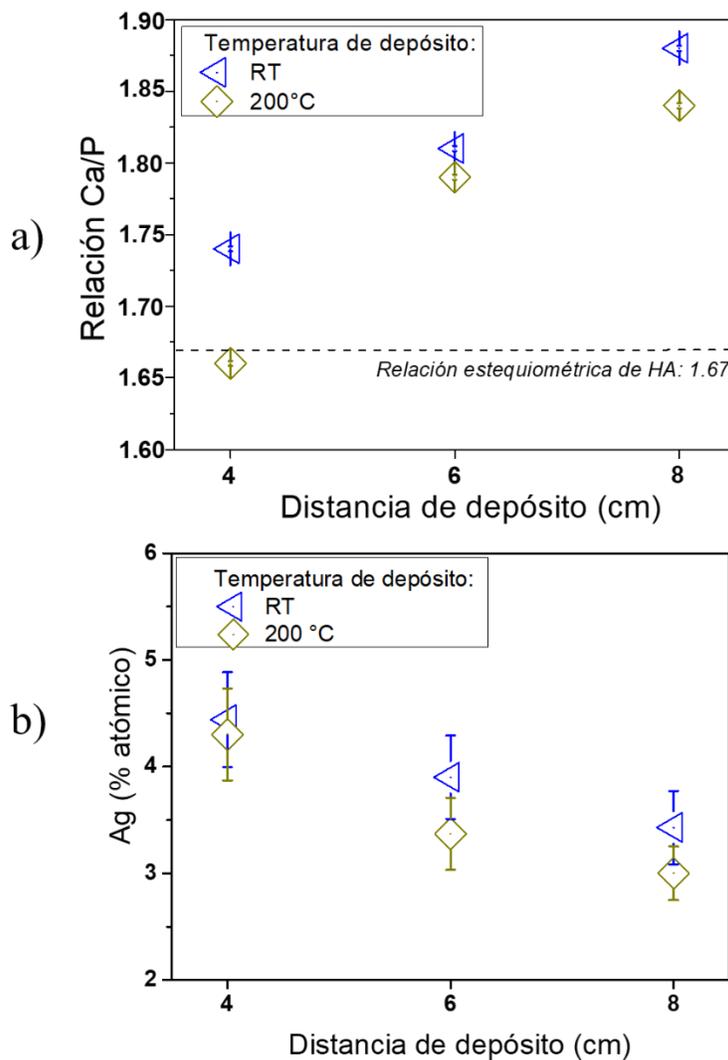


Figura 9. Relación Ca/P (a) y porcentaje atómico de Ag (b), para los recubrimientos de HA-Ag en función de la distancia y temperatura de depósito.

6.1.1.2. Espesor, estructura y fases

En la Figura 10 se muestra el espesor medido por perfilometría para los recubrimientos obtenidos en función de la distancia y temperatura. Allí se puede observar una disminución del espesor a medida que la distancia incrementa desde 4 hasta 8 cm. Estos resultados confirman la desaceleración sufrida por los elementos que constituyen el recubrimiento a medida que la distancia entre el blanco y el porta-muestras incrementa, disminuyendo la eficiencia del proceso de depósito. Además, el aumento de la temperatura de depósito desde RT hasta 200 °C generó una disminución del espesor en las muestras obtenidas a las diferentes distancias evaluadas. Esta densificación podría estar relacionada con el aumento en la energía de llegada de los átomos hasta la superficie del sustrato mediante la excitación térmica a 200 °C, así como también la difusión y coalescencia de granos de HA durante la formación del recubrimiento a esta temperatura [93].

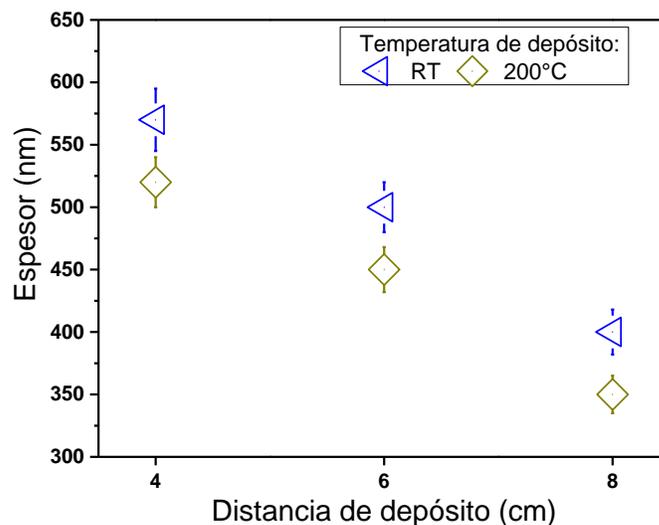


Figura 10. Espesor de los recubrimientos de HA-Ag en función de la distancia y temperatura de depósito.

Con el fin de observar la estructura de los recubrimientos depositados, se realizó la fractura dúctil en las muestras y en la Figura 11 se muestran las imágenes SEM de la zona de falla, donde se aprecia la vista en sección transversal de los sistemas depositados a diferentes

distancias y temperaturas. Allí se observan principalmente películas con una estructura densa y compacta, y aunque en la mayoría de casos la sección de fractura no reveló la presencia de las capas de HA y Ag, en la Figura 11a y d, correspondiente a los recubrimientos obtenidos a 4 cm de distancia y RT y 200 °C, respectivamente, pueden ser apreciadas las interfaces generadas como producto de la formación del recubrimiento multicapa.

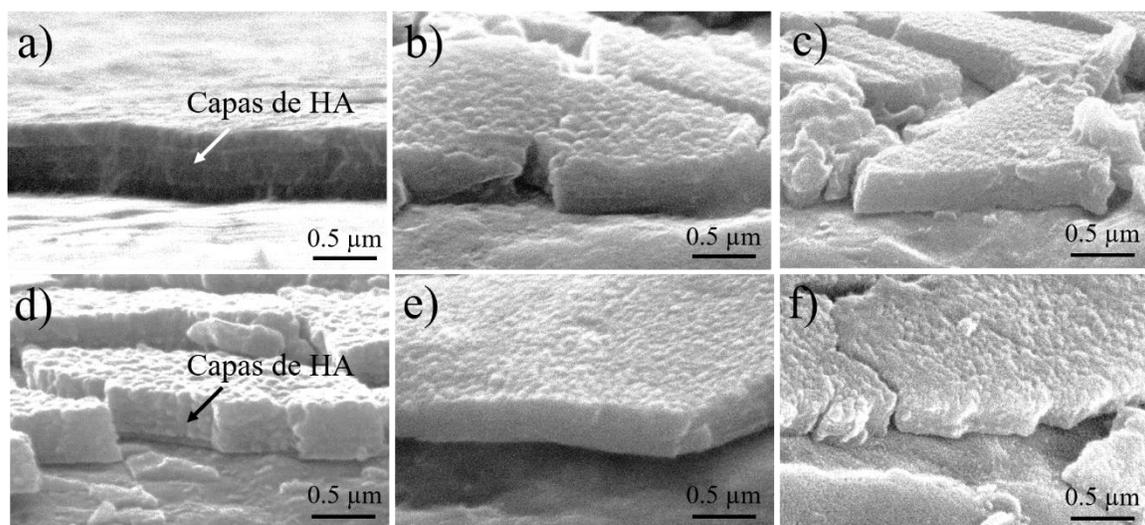


Figura 11. Estructura en sección transversal (SEM) de los recubrimientos de HA-Ag depositados a RT: a) 4 cm, b) 6 cm y c) 8 cm; y depositados a 200 °C: d) 4 cm, e) 6 cm y f) 8 cm.

La Figura 12 muestra los espectros micro-Raman obtenidos para los recubrimientos multicapa de HA-Ag en función de la distancia y temperatura de depósito. En la figura 12a, correspondiente a los recubrimientos obtenidos a RT, se observan principalmente bandas de vibración características del grupo fosfato (PO_4)³⁻ y leves insinuaciones de la banda asociada al grupo OH⁻. Por otro lado, para los recubrimientos obtenidos a 200 °C, no se observan grandes diferencias en las bandas relacionadas con el (PO_4)³⁻, pero se aprecian en detalle las bandas de vibración del OH⁻, cerca de los 3570 cm⁻¹ [86]. En la literatura, se ha atribuido la presencia de esta banda a la formación de la estructura de apatita en recubrimientos y muestras de HA [94,95], esto indica que se obtuvo un mayor control composicional en los recubrimientos depositados a 200 °C. Con respecto a las bandas del grupo (PO_4)³⁻, se

observan cuatro modos de vibración característicos con dos bandas relacionadas a la vibración en flexión del enlace O-P-O, observados a longitudes de onda cercanas a los 470 cm^{-1} (ν_2) y 600 cm^{-1} (ν_4), mientras que, cerca de los 960 cm^{-1} y 1050 cm^{-1} son apreciadas otras dos bandas, en este caso, relacionadas con la vibración en tensión del enlace P-O (ν_1 y ν_3 , respectivamente) [26]. Es importante resaltar que estas dos últimas vibraciones son características de HA, y ayudan a diferenciar este compuesto de los otros fosfatos de calcio, por ejemplo: del fosfato tricálcico, que presenta una banda doble degenerada para el modo vibracional ν_1 y donde el modo vibracional ν_3 no es activo en dispersión Raman [96].

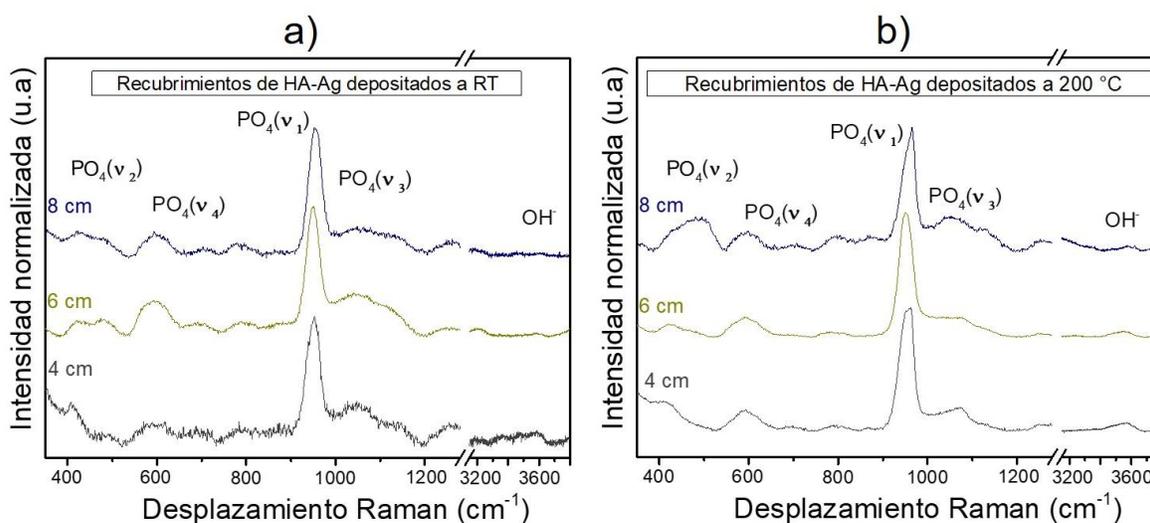


Figura 12. Espectros micro-Raman de los recubrimientos de HA-Ag en función de la distancia y temperatura de depósito: a) RT y b) 200 °C.

La Figura 13 muestra los difractogramas obtenidos para los recubrimientos de HA-Ag en función de la distancia blanco-sustrato y la temperatura de depósito. Los planos de difracción encontrados fueron comparados con la base de datos ASTM card N°. 9-432 de HA y son presentados en los gráficos mediante líneas interrumpidas verticales. Para las muestras depositadas a RT, los difractogramas son presentados en la Figura 13a, allí se observa que el sistema depositado a 8 cm fue amorfo, pero con la disminución en la distancia de depósito, la cristalinidad de los recubrimientos fue favorecida, observando un pico de difracción a lo

largo del plano (112) de HA para el recubrimiento obtenido a 6 cm de distancia, mientras que a 4 cm fue observado un aumento en la intensidad de dicho plano y se aprecia un segundo plano de difracción a lo largo del plano (002) de HA. Los picos anchos que se observan en los difractogramas podrían indicar que los recubrimientos obtenidos son nanocristalinos. El crecimiento preferencial obtenido ha sido encontrado por varios autores para la HA cuando se usa como recubrimiento [78,97,98].

El comportamiento encontrado indica que, al aumentar la distancia, la energía con la cual los átomos eyectados del blanco alcanzan la superficie del sustrato disminuye, lo que desfavorece un crecimiento ordenado en el recubrimiento. En adición, los resultados del análisis DRX de los recubrimientos obtenidos a 200 °C se muestran en la Figura 13b. Allí se observan nuevamente picos anchos y además se aprecia que, con el incremento en la temperatura de depósito la cristalinidad de todas las muestras obtenidas aumentó, siendo mucho más evidente para los recubrimientos obtenidos a 6 y 8 cm, éste último pasó de ser amorfo a presentar cierto grado de cristalinidad. También puede ser apreciado que el crecimiento preferencial no fue afectado con la temperatura.

Los resultados obtenidos durante este análisis fueron muy promisorios, ya que revelan una excelente opción para mejorar la cristalinidad en recubrimientos de HA, donde normalmente son utilizados tratamientos térmicos pos-depósito [6,8,49]. W. Chen *et al.* [12] reportan un cambio en la estructura de HA de amorfa a cristalina después de realizar un tratamiento térmico pos-depósito a 400 °C durante 4 horas. Mientras que, 600 °C a lo largo de 5 horas fueron necesarios para alcanzar esta transformación en un reporte similar [99]. Sin embargo, este tipo de procesos puede ocasionar fallas estructurales en los recubrimientos, por ejemplo: la formación de grietas y delaminación, generadas como consecuencia de las diferencias entre los coeficientes de expansión térmica del recubrimiento y el sustrato [15].

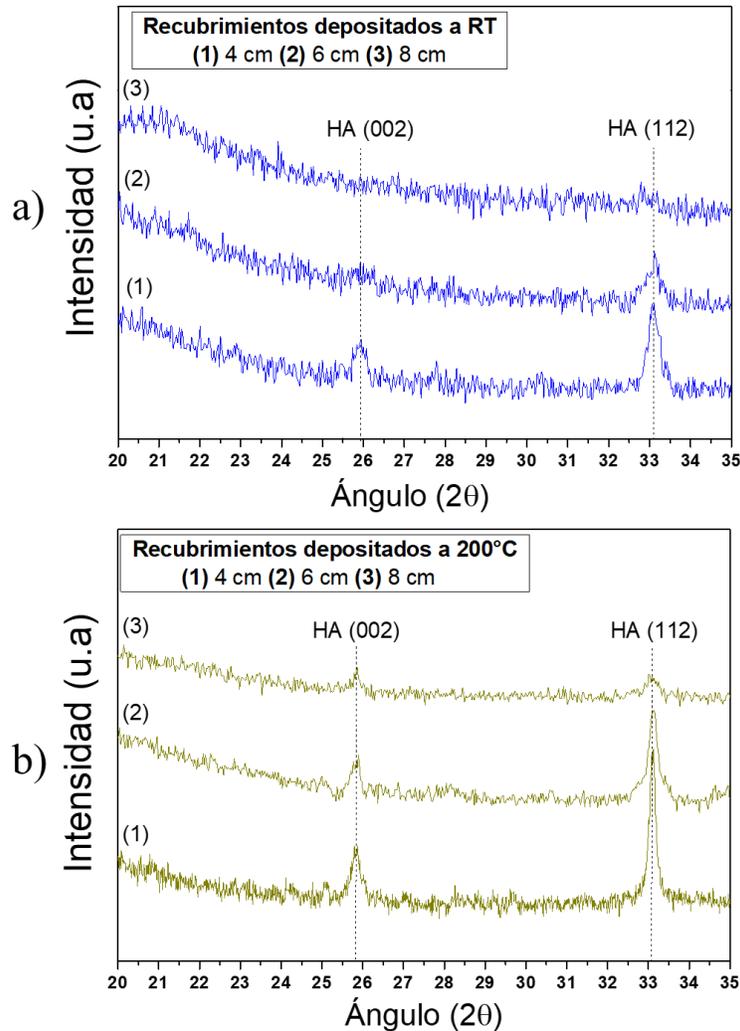


Figura 13. Difractogramas de los recubrimientos de HA-Ag en función de la distancia de depósito:
a) RT y b) 200 °C.

En la Tabla 4 se muestra el tamaño de cristalito para cada sistema, que fue determinado mediante el FWHM usando la ecuación de Scherrer, basado en el ensanchamiento físico del plano de crecimiento preferencial (112) de HA en los recubrimientos obtenidos [70]. Los resultados confirman la formación de recubrimientos nanocristalinos, normalmente obtenidos para películas de HA por pulverización catódica magnetrón [8,100]. A RT, una disminución del 33 % en el tamaño del cristalito fue observada con el incremento en la distancia desde 4 cm hasta 6 cm, mientras que a 8 cm el recubrimiento fue amorfo. A 200 °C, se aprecia nuevamente una tendencia a la disminución en el tamaño del cristalito como

función del aumento en la distancia, con una reducción del 32 % para el aumento en la distancia desde 4 cm hasta 8 cm. Por otro lado, aumentos en el tamaño del cristalito del 13 % y 72 % fueron registrados para los sistemas depositados a 4 cm y 6 cm en función del aumento en la temperatura desde RT hasta 200 °C. Mientras que, con este incremento en la temperatura de depósito, un cambio en la estructura de amorfa a nanocristalina fue observado para el recubrimiento obtenido a 8 cm de distancia. Además de los parámetros de distancia y temperatura de depósito, se ha encontrado que la aplicación del voltaje bias puede disminuir el tamaño del cristalito en recubrimientos de HA debido a los aumentos en el bombardeo del sustrato, que provocan una supresión del crecimiento del cristalito [101].

Tabla 4. Tamaño del cristalito para los recubrimientos de HA-Ag obtenidos en función de la distancia y temperatura de depósito.

Distancia de depósito (cm)	<i>Tamaño del cristalito (nm)</i>	
	Temperatura de depósito	
	RT	200 °C
4	26.22	29.38
6	17.64	30.24
8	Recubrimiento amorfo	19.79

Basado en los resultados obtenidos hasta este punto, el recubrimiento multicapa de HA-Ag depositado a 4 cm de distancia y temperatura de 200 °C fue seleccionado como el sistema de mayor control en términos de composición química, estructura y fases, haciendo de este sistema, un recubrimiento promisorio para ser incorporado como multicapa final de los recubrimientos compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN, donde la respuesta biológica, está estrechamente ligada a la superficie de contacto con el medio.

6.1.1.3. Efecto del tratamiento térmico en la estructura de HA-Ag

La Figura 14 muestra la vista superficial y en sección transversal del recubrimiento de HA-Ag obtenido a 4 cm y RT (A), 200 °C (B) y 200 °C tratado térmicamente a 400 °C durante 2 horas (C). En la Figura 14a, se observa una morfología de granos a nivel superficial, mientras que, en sección transversal, el corte realizado mediante FIB y posteriormente visualizado en FESEM, permite observar en gran detalle la estructura multicapa del sistema depositado, compuesto por 5 capas de HA y 4 capas intermedias de Ag, cuyas interfaces fueron apreciadas en la Figura 11a. Las capas de Ag, de espesor cercano a los 20 nm, cada una, son muy uniformes a lo largo del corte realizado.

Para la Figura 14b, se observa nuevamente a nivel superficial una morfología de granos, esta vez, de mayor tamaño, debido a que el recubrimiento fue obtenido a 200 °C, lo que podía haber generado la unión o coalescencia de granos durante el proceso de depósito. La vista en sección transversal de este sistema muestra una alteración en la uniformidad de las capas de Ag, lo que indica que, durante la obtención de este recubrimiento, la Ag difunde hacia las capas adyacentes de HA, sin embargo, la estructura densa de esta última, impide el fenómeno de difusión en largo alcance, por lo cual, el recubrimiento obtenido a 4 cm y 200 °C aún conserva una estructura multicapa y no se observa la presencia de este último elemento a nivel superficial. En la Figura 14c, la estructura del recubrimiento muestra nuevamente capas de Ag no uniformes y no se observa la presencia de este elemento a nivel superficial.

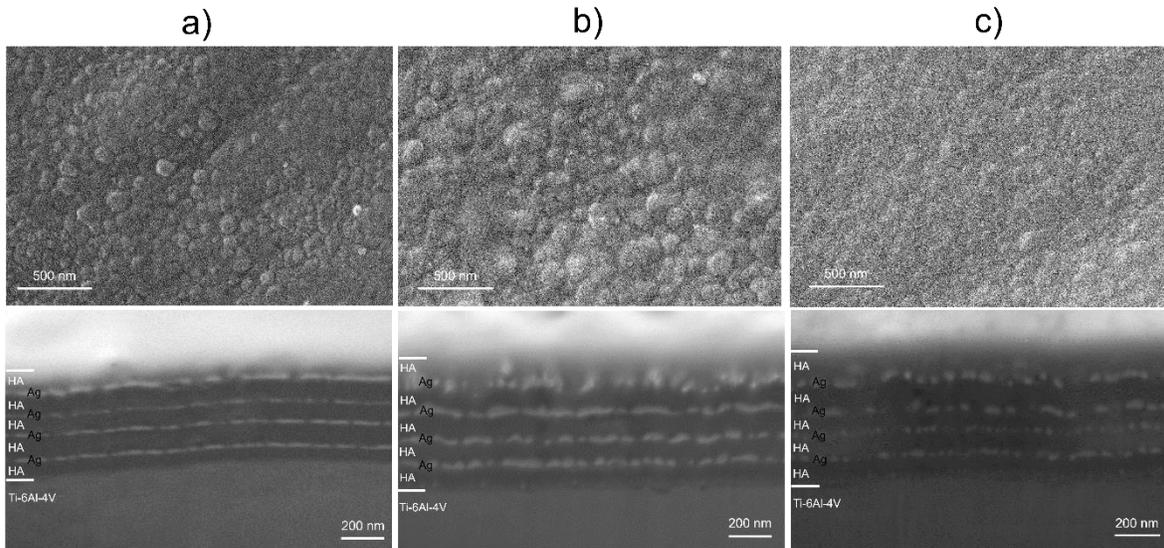


Figura 14. Morfología superficial (SEM) y estructura en sección transversal FIB-FESEM, para el recubrimiento de HA-Ag obtenido a 4 cm de distancia: a) RT, b) 200 °C y c) 200 °C y tratado térmicamente a 400 °C por 2 h.

En la Figura 15 se presenta los difractogramas del recubrimiento de HA-Ag depositado a 4 cm y 200 °C (a), y de este mismo sistema tratado térmicamente a 400 °C (b). Allí se observa que con el tratamiento térmico hay un aumento en la cristalinidad de HA, que es evidenciado tanto por el incremento en la intensidad del pico relacionado con el plano (002) de este compuesto como también por la insinuación de un tercer pico de difracción cercano a los 32.7° 2 θ y que estaría relacionado con el plano (211) de HA. Este comportamiento se debe a que, con la temperatura, los átomos que fueron depositados inicialmente y no lograron organizarse bajo arreglos cristalinos, difunden hacia los cristales de HA ya formados, se adhieren y se da el crecimiento del cristal. El uso de tratamientos térmicos para mejorar la cristalinidad de HA, ha sido reportado por otros autores para temperaturas iguales o superiores a la utilizada en el presente estudio [12,99,102]. Mejorar la cristalinidad en estos recubrimientos es muy importante, teniendo en cuenta que la HA requiere de un adecuado grado de cristalinidad para su aplicación en implantes, ya que el incremento en la cristalinidad del recubrimiento disminuye su velocidad de disolución en medio biológico [65]. Sin embargo, teniendo en cuenta que la Ag no logra difundir fácilmente a través de la estructura densa de HA, su liberación al medio en forma de nanopartícula o ion, dependerá de la

disolución o infiltración de HA en medio biológico, por lo cual, un recubrimiento de HA altamente cristalino podría disminuir, para este caso, el posible potencial bactericida del recubrimiento multicapa de HA-Ag.

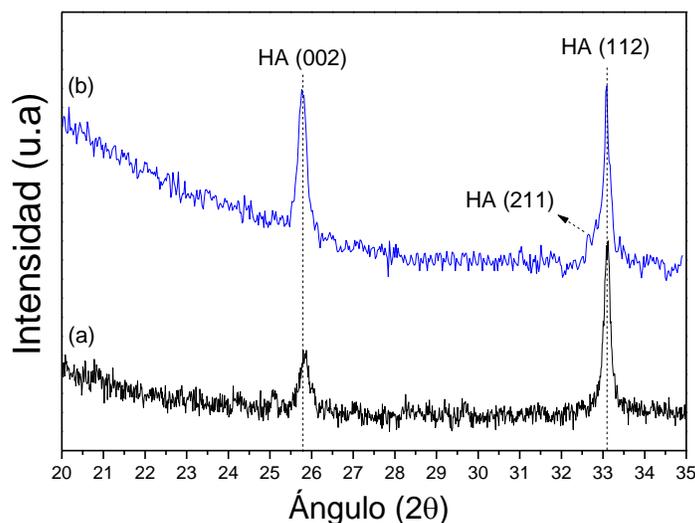


Figura 15. Difractograma del recubrimiento de HA-Ag obtenido a 4 cm: a) 200 °C y b) 200 °C y tratado térmicamente a 400 °C por 2 h.

Los resultados obtenidos para el sistema de HA-Ag obtenido a 4 cm en términos de cristalinidad, muestran una clara dependencia de esta característica estructural con la temperatura. Sin embargo, es posible que, con el tratamiento térmico se generen fallas estructurales en los recubrimientos como se explicó en el apartado anterior, y que pueden ser potenciadas a la hora de tener el sistema multicapa con los recubrimientos de óxido y nitruro. Además, ya fue obtenido un aumento en la cristalinidad del recubrimiento al inducir temperatura al proceso de depósito, pasando de RT a 200 °C, ver Figura 13. Por lo cual, se considera que el sistema HA-Ag obtenido a 4 cm y 200 °C podría presentar un grado de cristalinidad adecuado para la aplicación deseada, ya que se busca una velocidad media de disolución de HA o de su infiltración con el medio biológico, que no permita una liberación muy rápida de Ag, pero que tampoco impida su liberación durante un tiempo muy prolongado. Teniendo en cuenta todo lo anterior, se decide no realizar tratamiento térmico pos-depósito a los sistemas multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN.

6.1.2. Obtención de los sistemas multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN sobre Ti-6Al-4V.

Los recubrimientos multicapa de HA-Ag depositados sobre las capas intermedias de TiO₂/TiN y SiO₂/TiN, fueron obtenidos a una distancia blanco-sustrato de 4 cm y una temperatura de depósito de 200 °C, dado que, bajo estas condiciones se obtuvieron recubrimientos con gran control en la composición química (relación Ca/P cercana a 1.67) y la mayor cristalinidad. El estudio inicial de estos sistemas, involucró su análisis composicional, topográfico (morfología, rugosidad y mojabilidad), estructural y de fases. La evaluación de dichas propiedades y características, también fue realizada sobre el sistema de referencia de HA-Ag depositado sobre la aleación de Ti-6Al-4V y sin capas intermedias.

6.1.2.1. Composición química, morfología, estructura y fases

La Figura 16 muestra la relación Ca/P y el porcentaje atómico de Ag para los recubrimientos multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN en comparación con el sistema de referencia de HA-Ag. La relación Ca/P presenta un incremento en los recubrimientos de HA-Ag depositados sobre las capas intermedias en comparación con el sistema obtenido sobre la aleación de Ti-6Al-4V, obteniendo valores de 1.76 y 1.72 para los sistemas HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN, respectivamente. Este comportamiento indica un efecto del tipo de superficie sobre la llegada de los átomos desde el blanco en pulverización. Alteraciones en la composición química de recubrimientos de HA depositados por pulverización catódica magnetrón han sido ampliamente reportadas en la literatura, encontrando, por ejemplo, variaciones en la relación Ca/P desde 1.5 hasta 3.8 [54,60], donde se ha observado un efecto del cambio en la carga superficial del sustrato, mediante la polarización con un voltaje negativo, sobre la generación del fenómeno conocido como resputtering del fósforo, que fue considerado también en el apartado 6.1.1.1. En el gráfico también se presentan las relaciones Ti/N, Ti/O₂ y Si/O₂ correspondientes a las capas de anclaje utilizadas. En cuanto al nitruro de titanio, la relación N/Ti obtenida fue de 1.15, que es levemente superior a la relación estequiométrica de dicho compuesto. En contraste, relaciones levemente subestoequiométricas fueron obtenidas para las capas de óxidos, con valores de 1.65 y 1.9 para el

O_2/Ti y O_2/Si , respectivamente. Estos resultados indican que hubo un buen control sobre la composición química de estas capas intermedias.

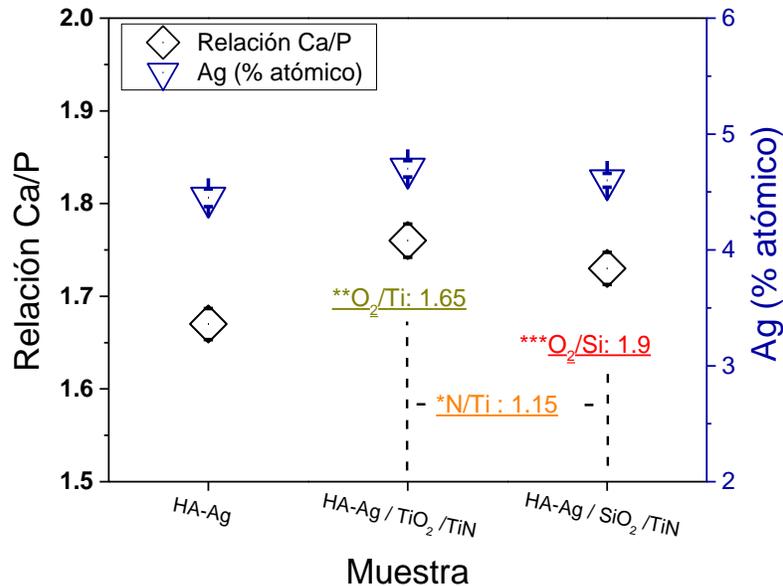


Figura 16. Relación Ca/P y porcentaje atómico de Ag para el sistema de referencia de HA-Ag y los recubrimientos multicapa compuestos: HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN.

Además de la composición química, las características superficiales tales como la rugosidad, mojabilidad y morfología son muy importantes en recubrimientos de uso potencial en implantes ya que éstas pueden tener un rol crítico en procesos de adhesión celular [23,103]. La Figura 17 muestra los resultados del estudio de rugosidad realizado por AFM sobre los recubrimientos desarrollados. Inicialmente, se observan las imágenes tridimensionales de la superficie de cada uno de los sistemas, allí se observa, para el sistema de referencia de HA-Ag, una morfología de granos bastante uniforme a lo largo del área de evaluación. Los sistemas multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN también presentan una morfología de granos, observados sobre islas localizadas en diferentes regiones del área de evaluación y que son más evidentes para el caso del recubrimiento de HA-Ag depositado sobre el SiO₂/TiN. Por otro lado, los valores de rugosidad en raíz cuadrática media (RMS, por sus siglas en inglés), son presentados en el gráfico, donde las líneas interrumpidas horizontales indican los valores de rugosidad de las capas intermedias utilizadas y del sustrato

de Ti-6Al-4V con acabado tipo espejo, que presentó el menor valor (3.9 ± 0.5 nm), seguido por la capa de TiN con 8.6 ± 0.6 nm y para los sistemas de TiO₂/TiN y SiO₂/TiN fueron registrados valores de 11.5 ± 0.8 nm y 20.7 ± 1.2 nm, respectivamente. La rugosidad del sistema de referencia y de los recubrimientos multicapa compuestos está influenciada por la superficie donde cada uno de los recubrimientos fue depositado, obteniendo el menor valor para el recubrimiento de HA-Ag sobre el sustrato, seguido del sistema HA-Ag/TiO₂/TiN y el mayor valor de rugosidad fue obtenido para el sistema de HA-Ag/SiO₂/TiN. El aumento en la rugosidad podría ser favorable para la respuesta biológica de este tipo de superficies, en términos de adhesión, proliferación y diferenciación celular [23]. D. Deligianni *et al.* [104] reportaron incrementos en la adhesión y proliferación celular cuando la rugosidad del Ti-6Al-4V fue aumentada desde 0.32 μ m hasta 0.87 μ m. Estas superficies rugosas favorecen el atrapamiento de proteínas tales como la fibrina y la adhesión de células osteogénicas de acuerdo con A. Zareidoost *et al.* [105]. En cuanto a los recubrimientos de HA obtenidos por pulverización catódica magnetrón, valores similares a los obtenidos en el presente estudio han sido reportados por M.A. Surmeneva *et al.*[101], quienes depositaron HA sobre un sustrato de magnesio AZ31, obteniendo valores RMS entre 29.5 nm y 38.5 nm.

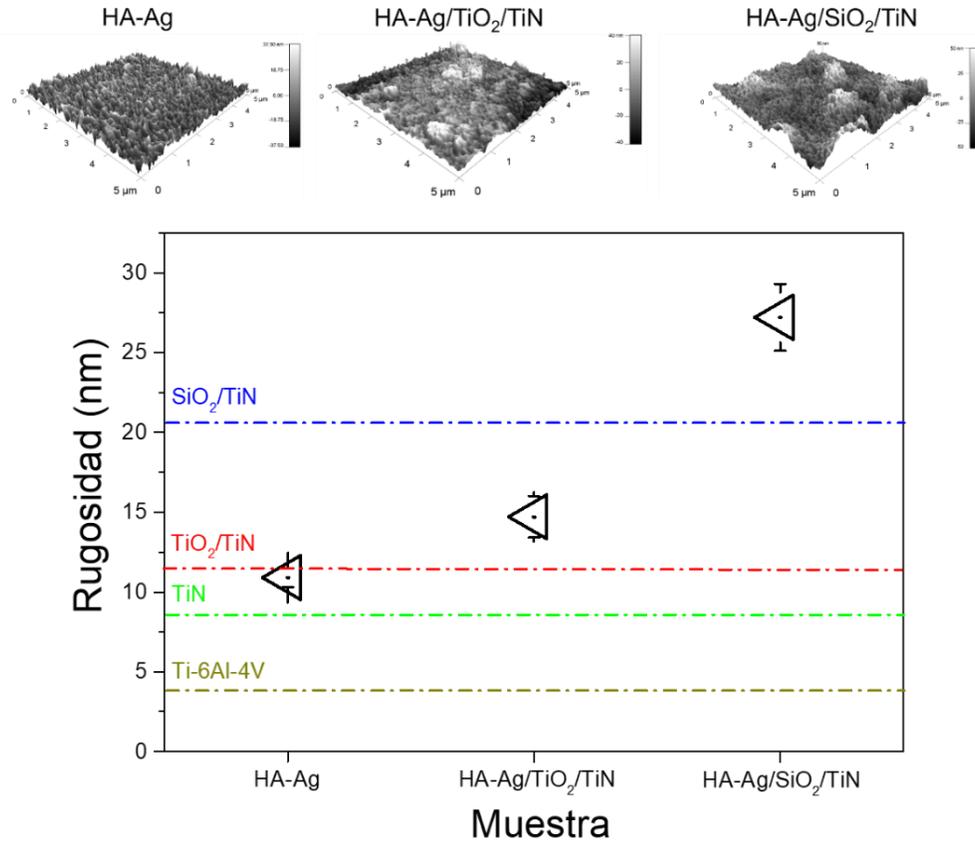


Figura 17. Rugosidad del sistema de referencia de HA-Ag y los recubrimientos multicapa compuestos: HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN.

La Figura 18 presenta el ángulo de contacto y la energía libre superficial del sustrato de Ti-6Al-4V y de los recubrimientos desarrollados. Allí se observa que tanto los recubrimientos de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN, como el de referencia y el sustrato presentan un carácter hidrofílico, de acuerdo a la referencia [89], dado que el ángulo de contacto es menor de 90°. Sin embargo, en el gráfico se aprecia que el sustrato está muy cerca de dicho valor, mientras que los recubrimientos presentan mayor afinidad con el agua, obteniendo valores entre $69 \pm 3.1^\circ$ y $55 \pm 3.6^\circ$. La disminución en el ángulo de contacto podría estar relacionada con la presencia de aniones electronegativos tales como el $(\text{PO}_4)^{3-}$ y el OH^- en la HA, los cuales tienden a atraer fuertemente iones H^+ de las moléculas de agua [106]. C.G García *et al.* [107] disminuyeron el ángulo de contacto desde 89° hasta 45° en membranas de Etilacrilamina mediante un proceso de hidroxilación. Las superficies hidrofílicas tienden a

presentar una buena respuesta biológica en términos de adhesión y proliferación celular [12,108]. Adicionalmente, la energía libre superficial fue aumentada con el depósito de los diferentes sistemas en comparación con el Ti-6Al-4V.

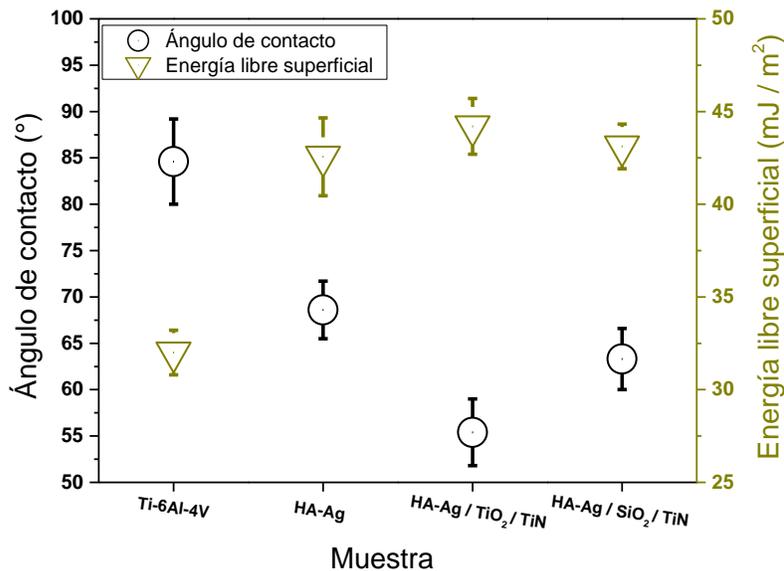


Figura 18. Ángulo de contacto y energía libre superficial para el sistema de referencia de HA-Ag y los recubrimientos multicapa compuestos: HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN.

La Figura 19 muestra la vista superficial y en sección transversal del recubrimiento de referencia de HA-Ag depositado a 4 cm y 200 °C (a) y de los recubrimientos multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN (b) HA-Ag/SiO₂/TiN (c). En la Figura 19a se observa una morfología de granos a nivel superficial, con tamaño de 134 ± 30 nm y estructura densa similar a la presentada en la Figura 11d para este mismo recubrimiento. El recubrimiento de HA-Ag depositado sobre la capa de TiO₂ también presenta una morfología de granos, con un tamaño de 153 ± 43 nm, que es un poco mayor al obtenido en el sistema de referencia. Adicionalmente, la estructura en sección transversal revela la presencia de las capas intermedias de TiO₂/TiN, perfectamente unidas tanto al sustrato metálico como a la capa superior de HA-Ag, que posee nuevamente una estructura densa y homogénea. En cuanto a la capa de anclaje, la fractura generada no permite observar la interfaz entre los recubrimientos de TiN y TiO₂, que poseen un crecimiento columnar sostenido a lo largo de

aproximadamente 400 nm de espesor, Figura 19b. Es importante resaltar que el crecimiento columnar observado es característico en recubrimientos de TiN depositados por pulverización catódica magnetrón, que han sido reportados por otros autores en la literatura [9,109], y que pudo haber influenciado el crecimiento de la capa adyacente de TiO₂. Durante el crecimiento de un recubrimiento de TiAlTaN sobre un sistema multicapa de TiAlN/Ta, E. Contreras Romero *et al.* [110] encontraron una fuerte influencia de la estructura del sistema multicapa sobre el crecimiento del recubrimiento cuaternario, que además de conservar la estructura columnar del sistema base, dio continuidad a las columnas preexistentes.

Por último, en la Figura 19c se observan nuevamente granos a nivel superficial, con un tamaño de 113 ± 23 nm, que es inferior al valor promedio registrado tanto para el sistema de referencia, como para el recubrimiento multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN. Este resultado indica que el crecimiento del recubrimiento de HA-Ag fue influenciado por la superficie donde creció, comportamiento similar al registrado por la capa de TiO₂ en la Figura 19b. Pero esta vez, evidenciado a nivel superficial mediante la diferencia en el tamaño de grano. Una posible hipótesis de este fenómeno estaría relacionada con que el recubrimiento de SiO₂ haya presentado un menor tamaño de grano en comparación con el TiO₂, induciendo a la obtención de granos más finos de HA. Esto también podría relacionarse a una posible menor cristalinidad en la capa de SiO₂, altamente densa y sin una estructura definida en comparación con el TiO₂ columnar.

Por otro lado, al relacionar el tamaño de grano con la rugosidad, se observa que el sistema que presentó los granos más pequeños fue el de mayor rugosidad, este comportamiento podría deberse a que durante el ensayo en AFM, la rugosidad medida estuvo influenciada por las islas formadas a nivel superficial, que no son observadas en FESEM dado el alcance de la técnica. Adicionalmente, el área de evaluación mediante esta última técnica fue menor. La sección transversal del sistema multicapa compuesto de HA-Ag/SiO₂/TiN revela, además, la capa columnar de TiN y el recubrimiento multicapa de HA-Ag, que no presenta variaciones en comparación con el sistema de referencia. Estudios acerca del crecimiento en recubrimientos de HA-Ag depositados por pulverización catódica magnetrón, sobre materiales cerámicos tales como nitruros u óxidos, no han sido encontrados en la literatura, ya que en muchos trabajos el proceso de depósito es realizado directamente sobre sustratos

metálicos. S.J. Ding *et al.* [111] informaron cambios en el crecimiento de recubrimientos de HA como consecuencia de la modificación en la estructura del sustrato mediante un proceso de limpieza por pulverización, en inglés (sputter cleaning), usualmente implementada para eliminar impurezas a nivel superficial mediante un bombardeo iónico de alta energía. En adición, A. Ivanova *et al.* [78] reportan un crecimiento columnar en recubrimientos nanocristalinos de HA-Ag depositados sobre Ti-6Al-4V.

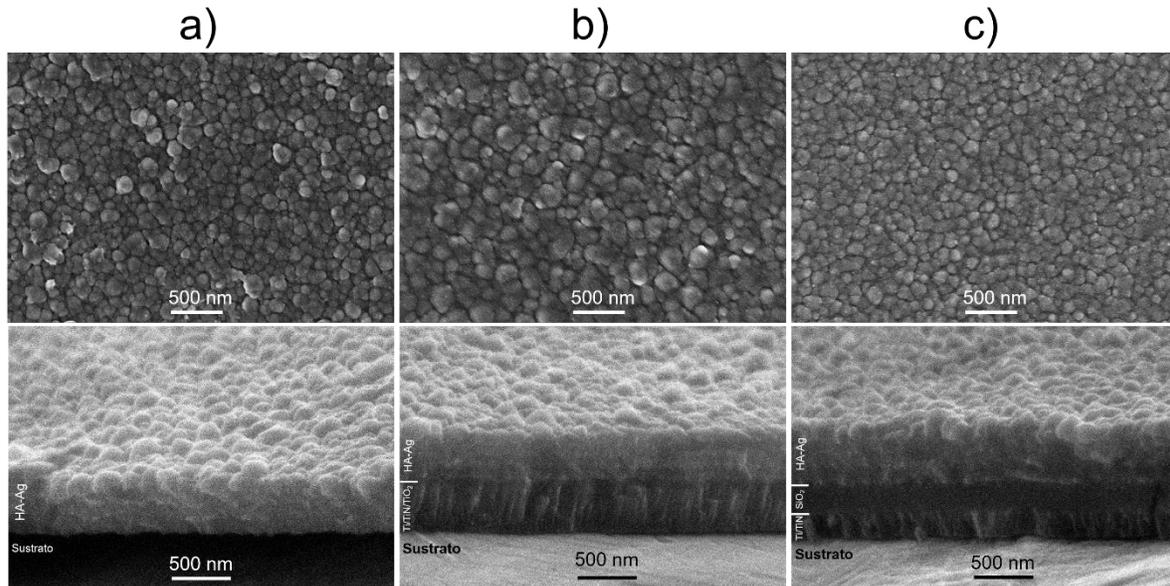


Figura 19. Morfología superficial (FESEM) y estructura en sección transversal (SEM) para el sistema de referencia de HA-Ag (a) y los recubrimientos multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN (b) y HA-Ag/SiO₂/TiN.

La Figura 20 muestra la vista en sección transversal del recubrimiento de referencia de HA-Ag (a) y de los sistemas multicapa: HA-Ag/TiO₂/TiN (b) y HA-Ag/SiO₂/TiN (c), que fue obtenida mediante el corte FIB de cada uno de los recubrimientos y su posterior visualización en FESEM. Este proceso fue realizado con el fin de observar en detalle la presencia de cada una de las capas en los recubrimientos obtenidos, que mediante el SEM convencional no fueron detectadas debido al espesor nanométrico de éstas y la baja resolución alcanzada en el equipo. En la Figura 20b se observa en detalle la capa de anclaje utilizada de TiN, con aproximadamente 130 nm de espesor, que inicia posterior a una capa de Ti de aproximadamente 90 nm, esta bicapa fue de espesor constante para los dos sistemas

multicapa con TiO_2/TiN y SiO_2/TiN . Posteriormente, se observan tanto el recubrimiento de TiO_2 con un espesor cercano a los 100 nm, como el sistema multicapa de HA-Ag, de aproximadamente 650 nm. En la imagen se observa una alta irregularidad en las capas de Ag, que es mayor a la observada en el sistema de referencia y que indica que hubo una mayor difusión de Ag hacia las capas adyacentes de HA. Esta difusión posiblemente fue dada en los minutos posteriores al proceso de depósito de cada una de las capas de Ag. En la Figura 20c se observa nuevamente la bicapa de TiN-Ti y posterior, una capa de SiO_2 de aproximadamente 170 nm. Para mejorar la adhesión entre un recubrimiento y sustrato determinado, las capas intermedias utilizadas deben ser de bajo espesor, dado que, con el aumento de éste, los esfuerzos residuales pueden incrementar, al igual que el número de defectos a escala micro o nanométrica. Para ello, son normalmente utilizadas capas de anclaje de espesor menor a los 200 nm, de acuerdo a la literatura [9,110]. Por último, para el recubrimiento multicapa de HA-Ag depositado sobre el SiO_2 , se observan capas de Ag un poco más uniformes a las observadas en los otros dos sistemas. Es importante resaltar que tanto las muestras de TiO_2/TiN , SiO_2/TiN y el sustrato de Ti-6Al-4V fueron recubiertas al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones con la HA-Ag, por lo cual los fenómenos difusivos que presentó la Ag en cada uno de los casos, son ajenos a la parametrización utilizada y podrían estar relacionados con la estructura de HA crecida sobre las diferentes superficies.

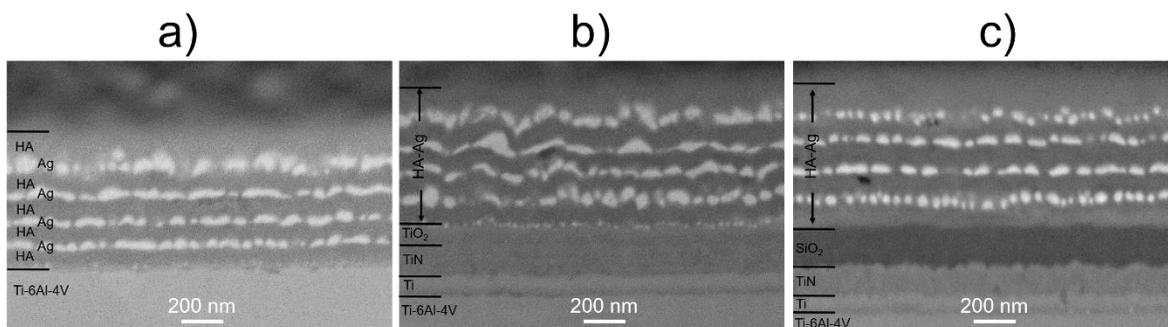


Figura 20. Estructura en sección transversal (FIB-FESEM) para el sistema de referencia de HA-Ag (a) y los recubrimientos multicapa compuestos de HA-Ag/ TiO_2/TiN (b) y HA-Ag/ SiO_2/TiN .

La Figura 21 presenta la estructura en sección transversal del recubrimiento de HA-Ag vista mediante TEM. Allí se observan las interfaces generadas entre el sustrato de Ti-6Al-4V y la primera capa de HA, así como también entre esta última y las capas de Ag. La imagen correspondiente a la zona I, permite observar una buena unión entre la HA y el sustrato. Además, se aprecia que el recubrimiento de HA, en los primeros 30 nm no es homogéneo, lo que posiblemente esté asociado a la difusión de elementos desde el sustrato. En la parte superior de dicha imagen, también se observa la unión entre la primera bicapa de HA-Ag. La zona II muestra en detalle las capas número 2 y 3 de Ag, incorporadas entre capas de HA. En la imagen se observa que, aunque la Ag no presenta una buena uniformidad, producto de la difusión inducida por la temperatura, la HA no adopta un crecimiento irregular. Esto indica que la difusión de Ag se da al inicio del crecimiento de HA, dado que, posteriormente, dicho compuesto es lo suficientemente denso como para impedir la difusión de Ag a través de su estructura. La imagen de la zona III apoya esta hipótesis, ya que se observa la capa superficial de HA, altamente uniforme, mientras que la última capa de Ag presenta una alta irregularidad.

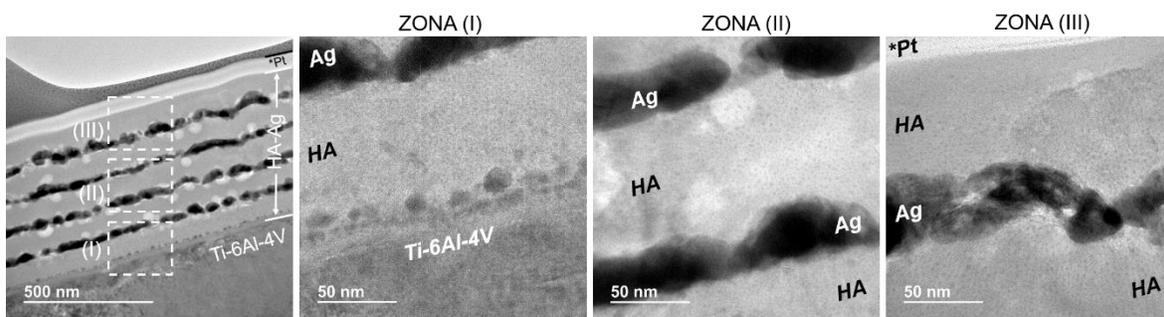


Figura 21. Estructura en sección transversal del recubrimiento de referencia de HA-Ag obtenida mediante TEM.

La Figura 22 presenta la estructura del recubrimiento de HA-Ag en TEM de alta resolución (HRTEM). La imagen de la izquierda muestra una de las bicapas de HA-Ag, donde se observan pequeños precipitados, con tamaño de aproximadamente 3 nm, inmersos en la fase cristalina de HA. Esta fase presenta dos planos de crecimiento preferencial, lo que se debe a

su carácter policristalino. La imagen del medio muestra una de las capas de Ag, con un arreglo cristalino definido, donde se determinó la distancia interplanar mediante el software Gatan Digital Micrograph®, obteniendo un valor de 0.14 nm, que es característico del plano (220) de dicho elemento [29]. De igual manera, fueron identificados para la HA los planos de crecimiento preferencial (002) y (112) con distancia interplanar de 0.34 nm y 0.27 nm, respectivamente, imagen de la derecha [56,100], que fueron identificados también mediante DRX en las Figuras 13 y 15.

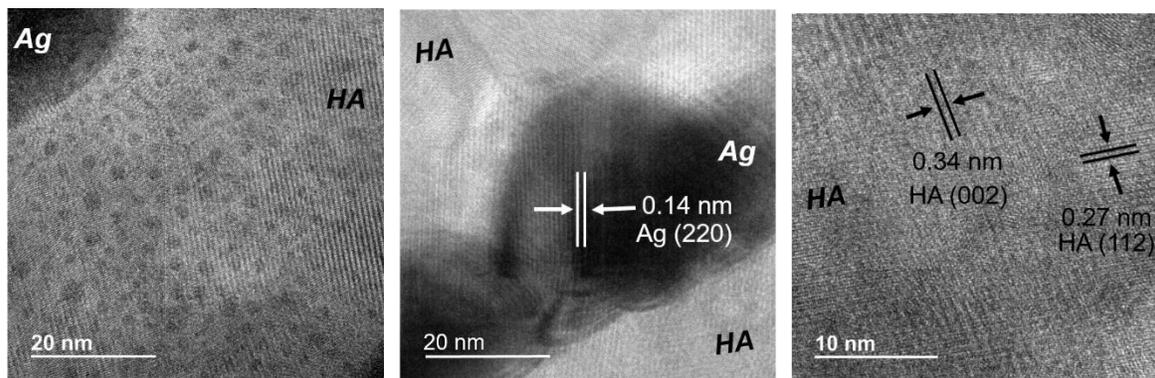
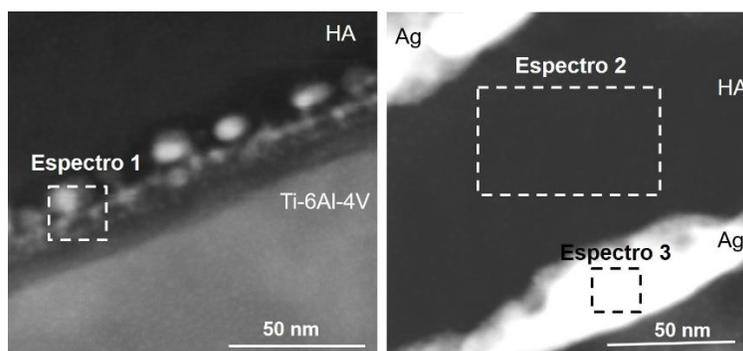


Figura 22. Estructura en sección transversal del recubrimiento de referencia de HA-Ag obtenida mediante HRTEM.

La Figura 23 muestra los resultados del análisis estructural y composicional realizado por STEM y EDS sobre el recubrimiento de HA-Ag. En la interfaz entre el Ti-6Al-4V y la primera capa de HA (espectro 1), fueron identificados tanto elementos del recubrimiento de HA (Ca, P y O), como también del sustrato (Ti y Al), indicando que hubo difusión de estos dos últimos elementos hacia la primera capa de HA, generando la interfaz de transición que ya había sido observada en TEM. Adicionalmente, el Ti del sustrato podría haberse oxidado como producto de la alta temperatura durante el proceso de depósito [8]. En el espectro 2, correspondiente a una de las capas de HA, no se observa la presencia de Ag, lo que confirma la hipótesis establecida acerca de la no difusión de dicho elemento a través de la capa de HA. Por último, el espectro 3, realizado sobre una de las capas irregulares de Ag, muestra la presencia predominante de Ag, pero también se encontraron elementos del recubrimiento de

HA, tales como Ca, P y O, lo que indica que hubo difusión de Ag de corto alcance (aproximadamente 20 nm), durante los primeros minutos de crecimiento de la HA, donde su estructura no era lo suficientemente densa y compacta como para impedir el paso de Ag.



Espectro	N°	% Atómico					
		Ca	P	O	Ag	Ti	Al
1		26,5	7,0	49,8	---	10,2	6,5
2		30,9	18,4	50,7	---	---	---
3		12,2	4,1	33,2	50,5	---	---

Figura 23. Estructura en sección transversal y composición química del recubrimiento de referencia de HA-Ag obtenida mediante STEM y EDS.

La Figura 24 presenta la estructura en sección transversal del recubrimiento de HA-Ag/TiO₂/TiN vista mediante TEM a diferentes aumentos. Allí se observan en detalle todas las interfaces generadas en el recubrimiento multicapa, donde es posible apreciar una buena unión entre las diferentes capas intermedias utilizadas (TiO₂/TiN-Ti), y entre estas mismas con el sustrato y con el primer recubrimiento de HA. Se aprecia también en detalle, la estructura columnar del recubrimiento de TiN, que ya había sido observada en análisis microscópicos previos a menor resolución. Por otro lado, en la interfaz (TiO₂/HA), se observa claramente una zona de transición, posiblemente generada por la difusión de elementos entre estas dos capas durante el proceso de depósito. Adicionalmente, se aprecia que el recubrimiento multicapa de HA-Ag presenta un espesor similar al observado en la Figura 21, correspondiente al sistema de referencia, lo que indica que la tasa de depósito para dicho recubrimiento no fue afectada con el cambio de superficie donde éste creció. Por último,

capas irregulares de Ag son nuevamente observadas, indicando nuevamente fenómenos de difusión en un corto alcance.

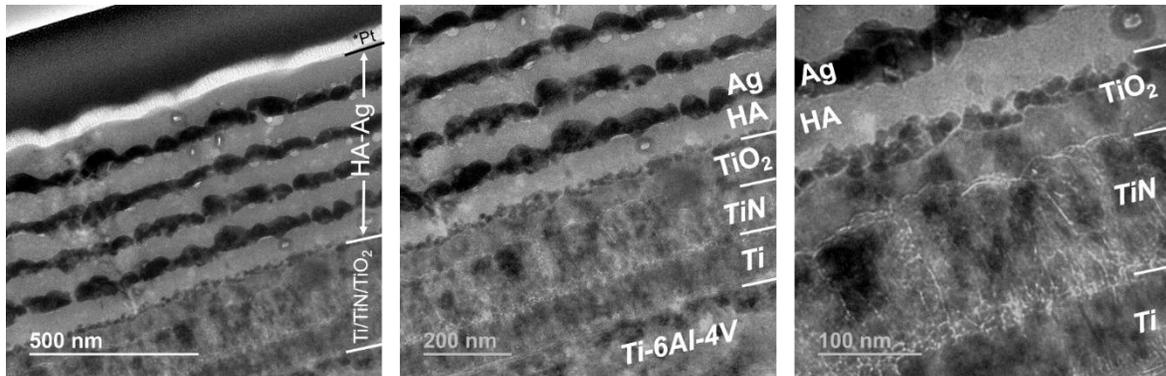
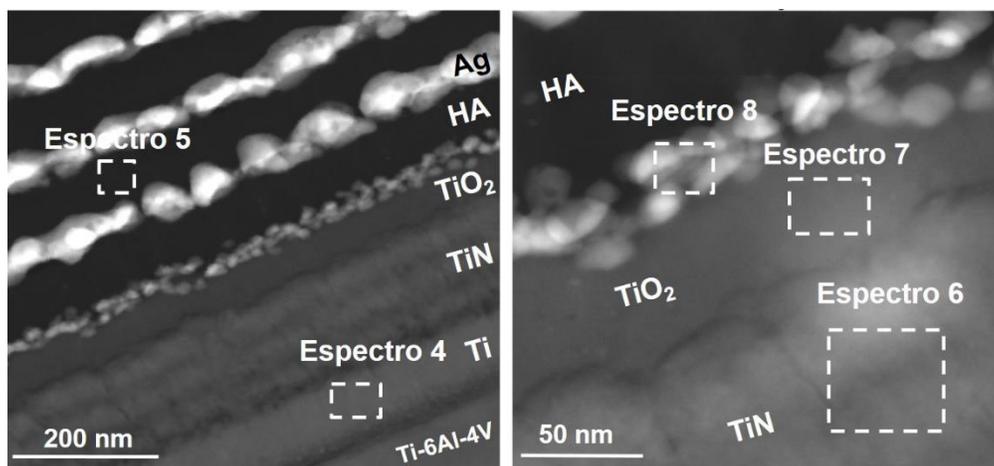


Figura 24. Estructura en sección transversal del recubrimiento de HA-Ag/TiO₂/TiN obtenida mediante TEM.

La Figura 25 presenta los resultados del análisis estructural y composicional realizado por STEM y EDS sobre el recubrimiento de HA-Ag/TiO₂/TiN. El espectro 4 hace referencia a la capa inicial de Ti, donde se cuantificó un 97.1 % atómico de dicho elemento y trazas de oxígeno del 2.9 % atómico. Para HA, el espectro 5 confirma la presencia de Ca, P, O y no se encontraron trazas de Ag. En la capa de TiN fueron identificados los elementos Ti y N, espectro 6, y se observó a nivel estructural una buena unión entre las columnas del TiN y la capa de TiO₂, en la cual, el espectro 7 confirma la presencia de Ti y O. Por último, en el análisis de la interfaz entre la primera capa de HA y el TiO₂, espectro 8, se encontraron los elementos Ca, P, O y Ti, indicando, al igual que en el sistema de referencia, la difusión de elementos desde y hacia la HA, durante los primeros minutos de crecimiento de la película.



Espectro N°	% Atómico					
	Ca	P	O	Ag	Ti	N
4	---	---	2,9	---	97,1	---
5	30,0	17,1	52,9	---	---	---
6	---	---	---	---	46,4	53,6
7	---	---	62,4	---	37,6	---
8	26,8	18,6	46,4	---	10,2	---

Figura 25. Estructura en sección transversal y composición química del recubrimiento de HA-Ag/TiO₂/TiN obtenida mediante STEM y EDS.

La Figura 26 muestra la estructura en sección trasversal del recubrimiento de HA-Ag/SiO₂/TiN vista mediante TEM. Allí se observan en detalle todas las capas del recubrimiento, cuyas interfaces fueron magnificadas y divididas en 3 zonas de interés. La imagen correspondiente a la zona I, permite apreciar una muy buena unión entre el sustrato y la bicapa TiN-Ti, y entre esta última y la capa de SiO₂, que posee una estructura densa y compacta y donde se observan algunos precipitados que fueron estudiados posteriormente en HRTEM. En la zona II se observa una región de transición (aproximadamente 15 nm), en la interfaz entre el SiO₂ y la primera capa de HA, indicando que, al igual que en los dos sistemas anteriores (HA-Ag y HA-Ag/TiO₂/TiN), se da la difusión entre la HA y la superficie sobre la cual es depositada, durante los primeros minutos del proceso. En esta misma zona, se aprecia la primera capa de Ag y su unión a la HA, es importante resaltar que el corte realizado y la magnificación en este punto, muestran como la Ag crece a partir de una superficie muy

uniforme de HA, sin embargo, debido a la temperatura de depósito (200 °C), la Ag difunde en corto alcance y por ello, la parte superior de dicha capa presenta una forma ovalada. Para la zona III, correspondiente a la última capa de HA, se aprecia nuevamente su estructura, altamente densa y con pequeños precipitados. Esta zona también muestra la interfaz entre dicha capa y el recubrimiento protector de Pt, depositado durante la obtención de la lamela en FIB.

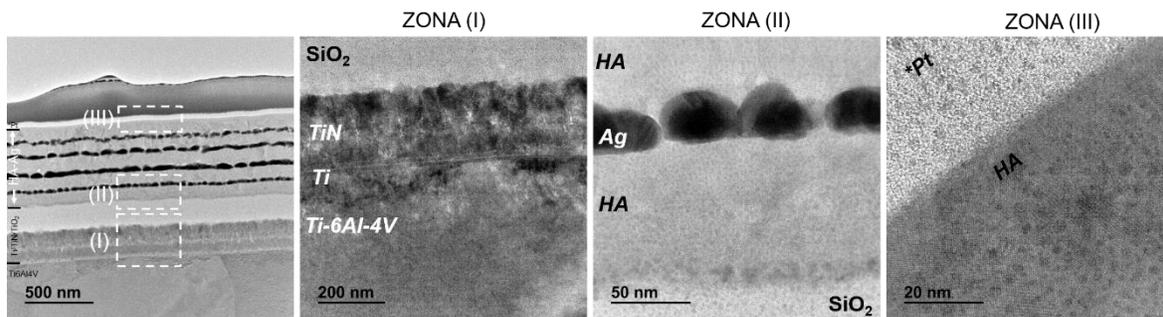


Figura 26. Estructura en sección transversal del recubrimiento de HA-Ag/SiO₂/TiN obtenida mediante TEM.

La Figura 27 muestra la estructura de la capa superficial de HA (a) y la capa intermedia de SiO₂ (b) del recubrimiento de HA-Ag/SiO₂/TiN en HRTEM. Para la HA, en la Figura 27a se observa, al igual que en sistema de referencia, una matriz cristalina con pequeños precipitados, de tamaño inferior a 4 nm. El cálculo de la distancia interplanar permitió identificar los dos planos de crecimiento preferencial del recubrimiento, que fueron a lo largo de las direcciones (112) y (002) de HA. Para la capa de SiO₂, en la Figura 27b se observa que este recubrimiento posee una estructura amorfa con precipitados cristalinos, con un tamaño de hasta 5 nm, donde se calculó una distancia interplanar de 0.19 nm, posiblemente asociada con el plano (220) del Si. Esto indicaría el crecimiento de nanocristales de Si durante la formación del recubrimiento de SiO₂.

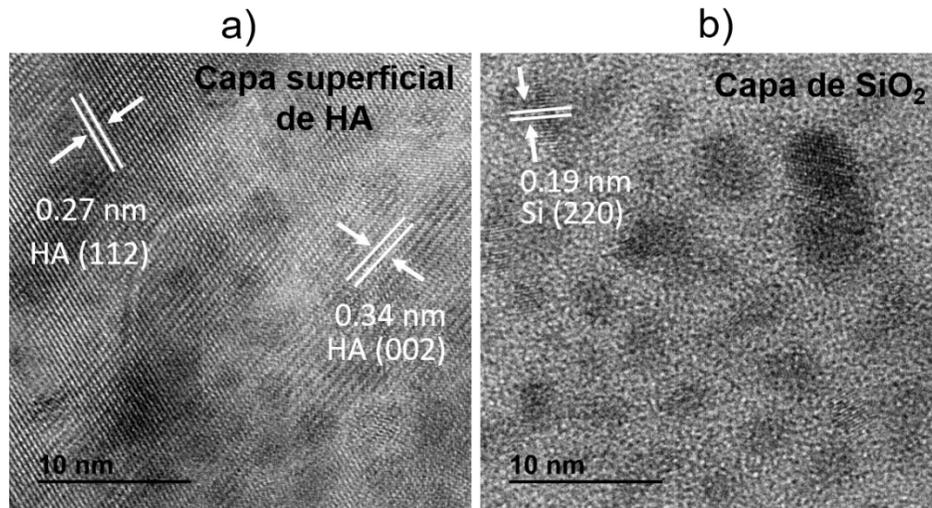
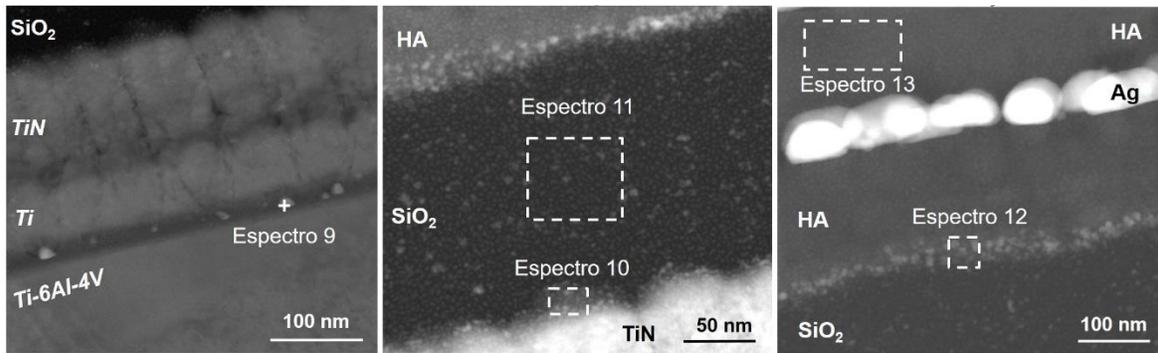


Figura 27. Estructura en sección transversal del recubrimiento de HA-Ag/SiO₂/TiN obtenida mediante HRTEM.

La Figura 28 presenta los resultados del análisis estructural y composicional por STEM y EDS sobre el recubrimiento de HA-Ag/SiO₂/TiN. La imagen de la izquierda corresponde a la unión entre el sustrato y las primeras capas del recubrimiento. Se observan allí algunos granos en la interfaz entre el Ti-6Al-4V y la capa inicial de Ti, que de acuerdo al espectro 9, podrían indicar la formación de un óxido de titanio como un efecto de la temperatura de depósito utilizada. En la imagen del medio, se presenta la interfaz entre el TiN y el SiO₂, que es una zona de transición de unos pocos nanómetros de espesor (aproximadamente 20 nm), en el sentido de las columnas generadas por el recubrimiento de TiN. El espectro 10 indica que dicha zona contiene elementos tanto de la capa de TiN como de la capa de SiO₂, con una estequiometría levemente alterada. El espectro 11 muestra la composición química de la capa de SiO₂ y en la imagen de la derecha, el espectro 12 indica la composición en la interfaz entre este recubrimiento y la capa inicial de HA, marcada nuevamente por una zona de transición, que contiene los elementos Ca, P, O y Si. Por último, el espectro 13 indica que, nuevamente no se dio la difusión de Ag a través de la estructura de HA, encontrando tan solo elementos constituyentes de este último compuesto.



Espectro N°	% Atómico								
	Ca	P	O	Ag	Ti	N	Si	Al	V
9	---	---	12,3	---	79,8	---	---	4,8	3,1
10	---	---	32,2	---	24,1	26,2	17,5	---	---
11	---	---	65,5	---	---	---	34,5	---	---
12	15,9	6,5	63,1	---	---	---	14,5	---	---
13	27,9	16,2	55,9	---	---	---	---	---	---

Figura 28. Estructura en sección transversal y composición química del recubrimiento de HA-Ag/SiO₂/TiN obtenida mediante STEM y EDS.

La Figura 29 muestra los difractogramas de los sistemas multicapa compuestos y del sistema de referencia de HA-Ag entre 20° y 68° 2θ, donde se aprecia una gran relación con el análisis HRTEM, encontrando los planos (002) y (112) de HA y el plano (220) de Ag. En la figura se observa que el crecimiento preferencial de HA a lo largo de plano (112) no fue alterado con el cambio de superficie donde HA fue depositada. Adicionalmente, los picos anchos que se aprecian en los sistemas multicapa con el TiO₂/TiN y SiO₂/TiN, indican que estos, al igual que el recubrimiento de referencia de HA-Ag, son nanocristalinos, [70]. En cuanto a la cristalinidad de estos recubrimientos, hay una disminución en los picos relacionados con los planos (002) y (112) de HA, para el sistema HA-Ag/TiO₂/TiN con relación al sistema de referencia, mientras que la mayor intensidad fue registrada para el recubrimiento de HA-Ag depositado sobre el SiO₂/TiN, donde se insinúa, además, un tercer pico posiblemente asociado con el plano (211) de HA. Estos resultados indican que el crecimiento de HA fue influenciado por la superficie y estructura de las capas intermedias de TiO₂ y SiO₂, dado que los parámetros de proceso usados durante el depósito de HA en todos los sistemas fueron constantes. Por otro lado, en los difractogramas también se observan dos picos relacionados con los planos (200) y (220) de Ag y picos de Ti asociados al sustrato.

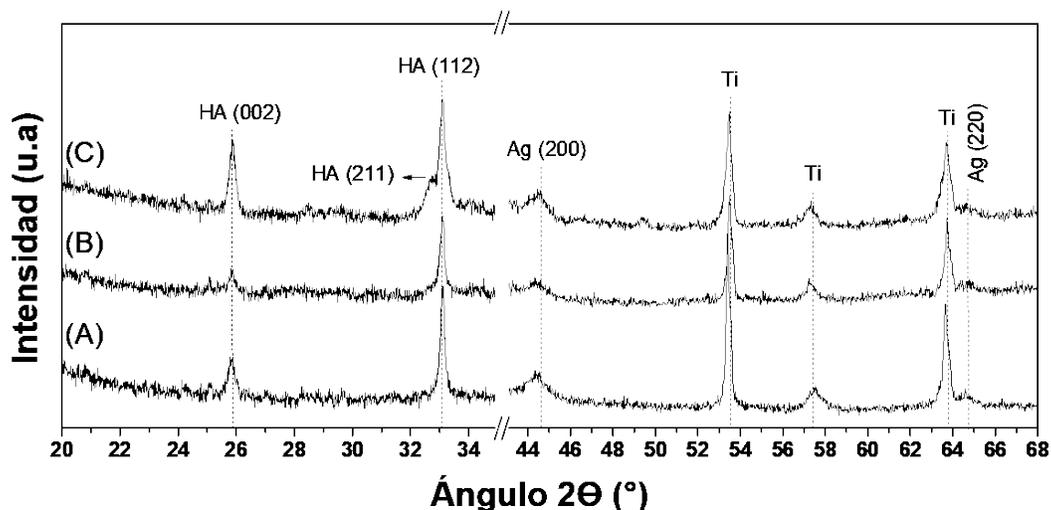


Figura 29. Difractogramas para el sistema de referencia de HA-Ag (A), y los recubrimientos multicapa compuestos: HA-Ag/TiO₂/TiN (B) e HA-Ag/SiO₂/TiN (C).

La Tabla 5 presenta los valores para el tamaño del cristalito de los recubrimientos desarrollados en comparación con el sistema de referencia, donde los resultados indican nuevamente la obtención de recubrimientos nanocristalinos. A partir del sistema de HA-Ag depositado sobre el sustrato, se observa una leve disminución del 3 % en el tamaño del cristalito para el recubrimiento obtenido sobre la capa de TiO₂, mientras que un aumento del 9 % fue registrado para el sistema depositado sobre la capa de SiO₂. En la literatura se ha encontrado que la disminución o el aumento en el tamaño del cristalito podría estar relacionado con la polarización del sustrato. A.A. Ivanova *et al.* [70] obtuvieron un cambio de nanocristalino (tamaño del cristalito de 26 nm), hasta amorfo en un recubrimiento de HA después de la polarización del sustrato con un voltaje de -50V. De la misma manera, M.A. Surmeneva *et al.* [101] reportan una disminución en el tamaño del cristalito desde 30 nm hasta 15 nm para un recubrimiento de HA depositado a 0V y -50V, respectivamente. Esto podría indicar que el comportamiento registrado en el presente estudio está de nuevo relacionado con cambios en la carga superficial del Ti-6Al-4V mediante el depósito de las diferentes capas intermedias utilizadas, ya que estos recubrimientos tienen menor electronegatividad y podrían actuar como capa barrera, disminuyendo el efecto de la polarización del porta muestras con el voltaje bias de -20V durante el proceso de depósito,

lo que podría describir el efecto encontrado para el caso del sistema HA-Ag/SiO₂/TiN. Sin embargo, el sistema HA-Ag/TiO₂/TiN no presentó este mismo comportamiento. Por otro lado, es importante resaltar que los valores obtenidos para el tamaño del cristalito en los recubrimientos obtenidos, así como también del sistema de referencia, son mayores a los valores reportados en algunos trabajos similares con HA [8,100].

Tabla 5. Tamaño del cristalito para la HA en los sistemas de HA-Ag depositados sobre el sustrato y sobre las capas intermedias de óxido y nitruro.

Recubrimiento de HA-Ag depositado sobre	Tamaño del cristalito (nm)
Ti-6Al-4V	29.38
TiO ₂ /TiN	28.71
SiO ₂ /TiN	31.91

La Figura 30 muestra los espectros Raman de las capas intermedias utilizadas para la obtención de los sistemas multicapas compuestos. En el espectro (a) correspondiente a la capa de TiN son observadas las siguientes bandas: I) dispersión en el rango acústico, con bandas centradas cerca de 220 cm⁻¹ (transversal acústica, TA) y 330 cm⁻¹ (longitudinal acústica, LA), que son generadas por la vibración de iones de Ti; II) dispersión en el rango óptico, con una banda centrada en 570 cm⁻¹ (longitudinal óptica, LO), relacionada con vibraciones de iones de nitrógeno [78]. El espectro (b) corresponde a la bicapa de TiO₂/TiN, donde se observan vibraciones características de la fase anatasa del TiO₂, cuya banda principal se presenta a 150 cm⁻¹ (E_{g1}), mientras que otras bandas relacionadas, se encontraron entre los 500 cm⁻¹ y 650 cm⁻¹ (A_{1g}, B_{1g(2d)} y E_{g3}) [112]. Adicionalmente, las bandas asociadas con el TiN (TA y LA), fueron apreciadas a longitudes de onda similares que en el espectro (a), mientras que la banda de TiN (LO), no se observa en detalle debido a la sobre posición con las bandas de TiO₂ que están en dicha región de longitud de onda. Por último, en el espectro (c), correspondiente a la capa de SiO₂/TiN, se observan vibraciones asociadas con el óxido de silicio amorfo, con una banda cerca a los 470 cm⁻¹ asociada con la vibración en flexión del Si-O-Si [113]. Adicionalmente, algunas bandas del TiN pueden ser apreciadas, principalmente TiN (TA y LA).

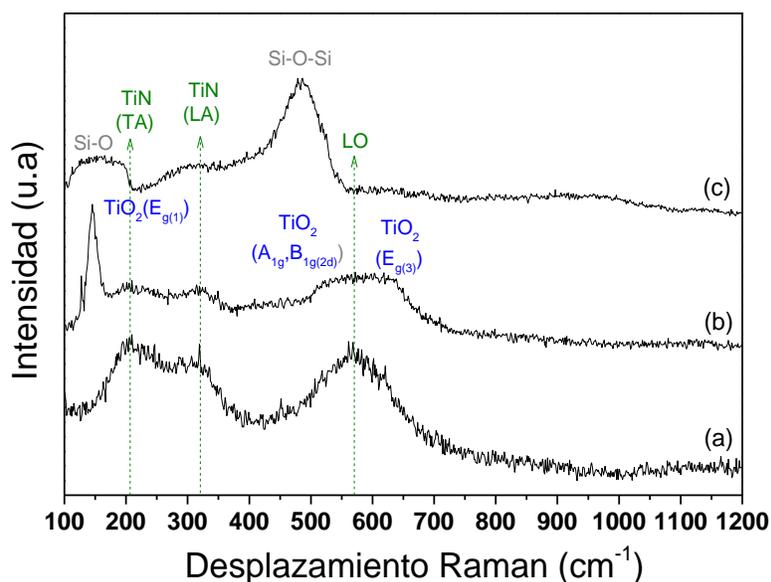


Figura 30. Espectros micro-Raman para las capas intermedias de: a) TiN, b) TiO₂/TiN y c) SiO₂/TiN.

La Figura 31 presenta los espectros micro-Raman de los sistemas multicapa compuestos en comparación con el recubrimiento de referencia (espectro a). en el gráfico de la Figura 31(I), se observan principalmente, al igual que en la Figura 12, bandas características del grupo (PO₄)³⁻, con la banda principal no degenerada, a una longitud de onda de 960 cm⁻¹, característica de HA [96], mientras que otras bandas relacionadas con este grupo funcional fueron encontradas cerca a los 460 cm⁻¹, 590 cm⁻¹ y 1050 cm⁻¹. Adicionalmente, bandas relacionadas con las vibraciones (TA) y (LA) del TiN son apreciadas en los espectros B y C, entre 220 cm⁻¹ y 300 cm⁻¹, mientras que la vibración TiN (LO), al igual que las vibraciones relacionadas con el TiO₂ y el SiO₂, fueron sobrepuestas con bandas del (PO₄)³⁻ que emiten a longitudes de onda cercana. Por otro lado, la Figura 31(II) presenta la vibración del grupo OH⁻ que fue encontrado en todos los sistemas multicapa, incluyendo el recubrimiento de referencia. Estos resultados indican que la composición de los recubrimientos no fue afectada en gran medida con el cambio de superficie donde cada uno de los sistemas multicapa de HA-Ag creció.

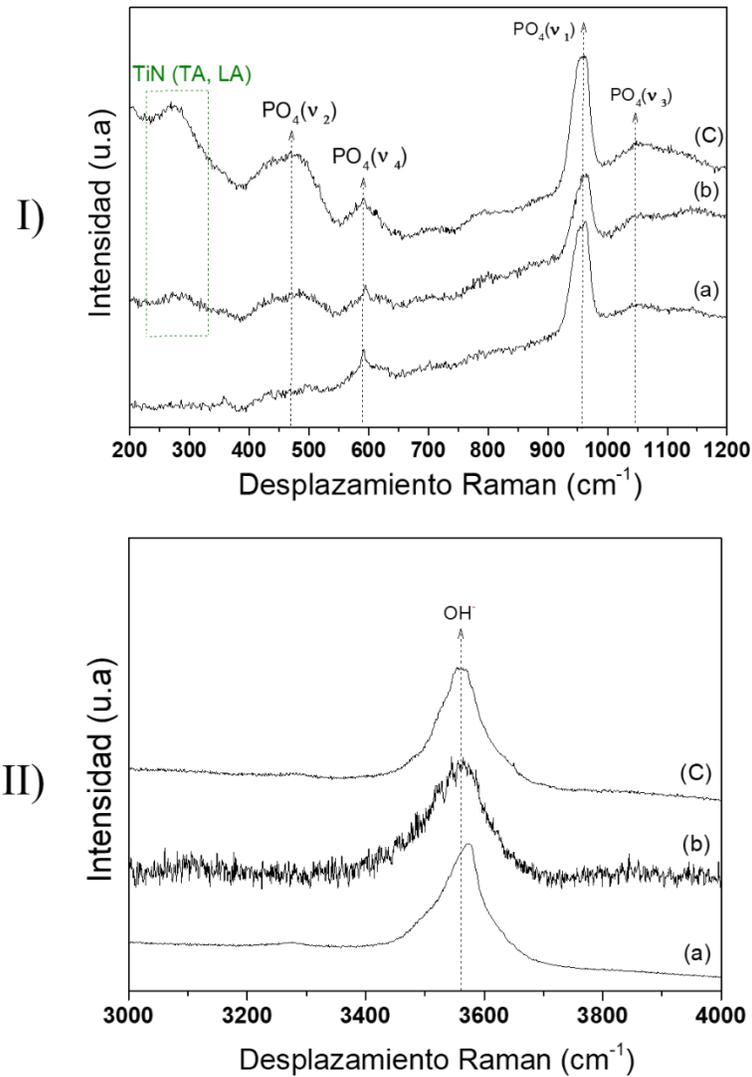


Figura 31. Espectros micro-Raman en el rango de: I) 200 a 1200 cm^{-1} y II) 3000 a 4000 cm^{-1} , para el recubrimiento de referencia de HA-Ag (a) y para los sistemas multicapa compuestos de: HA-Ag/TiO₂/TiN (b) y HA-Ag/SiO₂/TiN (c).

6.1.2.2. Propiedades mecánicas

Inicialmente, se realizó un ensayo de nano indentación sobre el sustrato de Ti-6Al-4V y las capas intermedias de TiO₂/TiN y SiO₂/TiN, con el fin de conocer los valores de H y E en las superficies donde sería depositado el recubrimiento de HA-Ag. Una vez depositado dicho sistema sobre las capas intermedias, se realizó un barrido exploratorio en nano indentación a

diferentes cargas, buscando un rango de trabajo donde la influencia de dichas capas intermedias o del sustrato, fueran mínimas sobre los valores de H y E en el recubrimiento de HA-Ag. A partir de este punto, se incorporó al estudio y con fines comparativos, un recubrimiento de HA libre de Ag, buscando complementar el análisis con la evaluación del efecto de la incorporación de capas de Ag en la estructura de la HA. Finalmente, se determinó la resistencia elástica, a la deformación plástica y el porcentaje de recuperación de los sistemas de HA-Ag/TiO₂/TiN, HA-Ag/SiO₂/TiN, HA-Ag e HA libre de Ag, así como también se evaluaron sus esfuerzos residuales y la adhesión al sustrato.

6.1.2.2.1. Dureza y módulo de elasticidad

La Figura 32 muestra los valores de H y E del sustrato de Ti-6Al-4V y de las capas intermedias utilizadas en la obtención de los sistemas multicapa. El menor valor de H fue registrado para el sustrato con 4.7 ± 0.2 GPa. A partir de allí, las capas y bicapas intermedias utilizadas presentaron aumentos del 246 %, 305 %, 378 % respectivamente para el SiO₂/TiN, TiO₂/TiN y TiN, donde se obtuvo el mayor valor de H (17.8 ± 1.5 GPa), que es similar al reportado por otros autores [84,114]. Mientras que el TiO₂ y SiO₂ como monocapa presentan valores en H de aproximadamente 12 GPa y 9 GPa, respectivamente [82,115–117]. Dichos valores son levemente inferiores a los obtenidos para las bicapas depositadas, lo que podría indicar que el TiN influyó en las medidas de H para los recubrimientos bicapa, siendo mayor su efecto en el sistema con TiO₂, cuyo espesor fue menor que el de la capa de SiO₂. Un comportamiento similar fue registrado para el E, donde el Ti-6Al-4V presentó un valor de 137 ± 3.1 GPa, y a partir de este sustrato, fue obtenido un aumento del 36 % para el sistema de SiO₂/TiN, mientras que aumentos cercanos al 50 % fueron registrados para los sistemas de TiN y TiO₂/TiN, sin diferencias significativas.

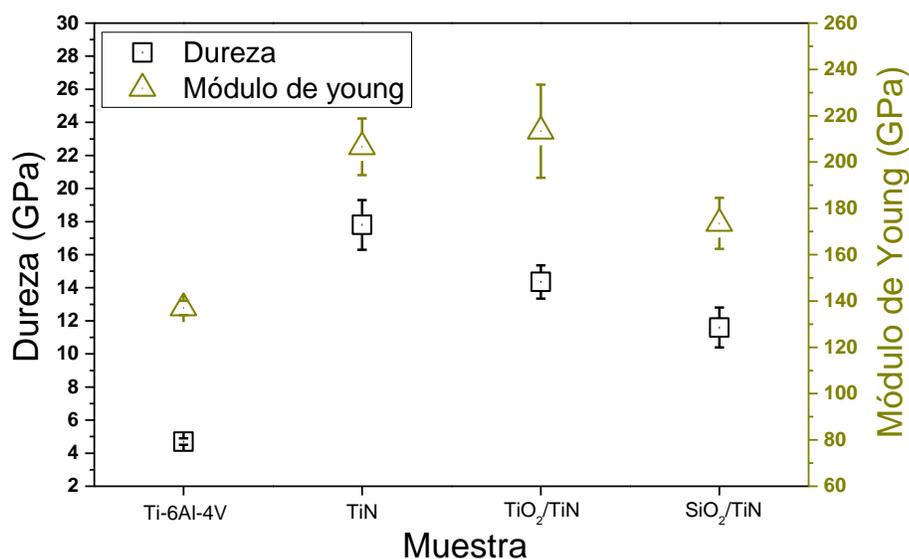


Figura 32. Dureza y módulo de elasticidad para las capas intermedias utilizadas.

La Figura 33 muestra las curvas de carga vs descarga de los sistemas multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN, HA-Ag/SiO₂/TiN, del sistema de referencia HA-Ag y también de un recubrimiento de HA libre de Ag, implementado a partir de este punto con el fin de estudiar el efecto de la incorporación de capas de Ag en la estructura de HA sobre las propiedades mecánicas de este sistema multicapa. El gráfico presenta 5 ciclos de carga y descarga para cada recubrimiento, realizados a carga incremental de 1.5 mN (I), 3.1 mN (II), 6.2 mN (III), 12.4 mN (IV) y 25 mN (V). Allí se aprecia un comportamiento elastoplástico en todos los recubrimientos, donde la profundidad alcanzada en cada indentación y la recuperación elástica, están relacionadas directamente con los valores de H y E de cada material, que fueron calculados posteriormente mediante el método de Oliver y Pharr [87].

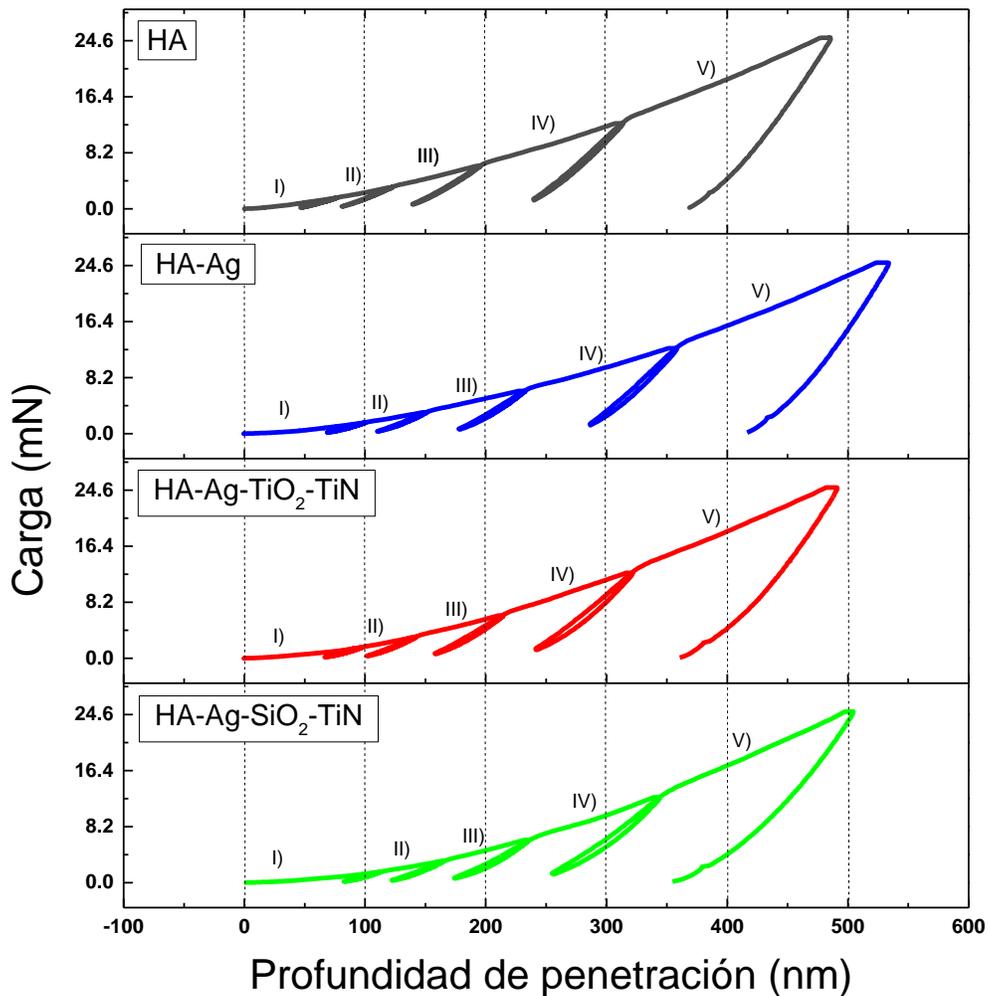


Figura 33. Curvas de carga vs descarga, a carga incremental, para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN.

La Figura 34 muestra los valores de H y E para todos los recubrimientos, determinados a partir de las curvas de carga vs descarga de la Figura 33. El estudio combinado de estas propiedades mecánicas es muy importante, debido a que, mientras la H tiene alta influencia sobre la resistencia al desgaste de una superficie, el E y la tenacidad influyen en la abrasión, el impacto y el desgaste erosivo [118]. En la Figura 34a se presentan los perfiles de H en

función de la profundidad de indentación. Allí se observa un comportamiento decreciente en esta propiedad tanto para el recubrimiento de HA libre de Ag como para el sistema HA-Ag. Mediante la primera carga aplicada de 1.5 mN, se obtuvo un valor de aproximadamente 10.5 GPa en H para el recubrimiento de HA libre de Ag, mientras que a esta misma carga fue registrado un valor de $H=5.9$ GPa para el recubrimiento de HA-Ag. Esto indica que la incorporación de capas de Ag en la estructura de la HA disminuye considerablemente su dureza, por ser la Ag un metal blando. Con el aumento en la carga, la profundidad de indentación fue mayor y con ello, el efecto del sustrato de Ti-6Al-4V sobre la medida de H en los recubrimientos. Basado en la literatura, el valor de H en un recubrimiento sin efecto del sustrato debe ser determinado a una profundidad de indentación del 10 al 15 % del espesor de la película [119–121]. Sin embargo, la evaluación de H en un recubrimiento compuesto por múltiples capas de diferente dureza, como lo son la HA y la Ag, resulta bastante compleja, debido a que no hay un control preciso sobre el efecto inducido por cada una de éstas sobre la medida mecánica.

Los valores de H determinados para los sistemas de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN en función de la profundidad, indican que estos recubrimientos se comportan como un material compuesto, donde cada una de las capas tiene influencia sobre la respuesta mecánica. De acuerdo con los resultados obtenidos, el efecto predominante está relacionado con las capas de Ag. Sin embargo, el comportamiento registrado para estos dos últimos sistemas evidenció también la influencia de las bicapas intermedias sobre el valor de H en los recubrimientos, por lo cual, dicha propiedad mecánica no presentó un comportamiento decreciente durante las primeras tres cargas aplicadas. Por el contrario, los valores promedio de H exhibieron un leve aumento. Adicionalmente, el gráfico indica que los mayores valores de H fueron obtenidos para el recubrimiento depositado sobre la superficie más dura (TiO₂/TiN, de acuerdo a la Figura 32). Finalmente, a partir de los 6.2 mN de carga, donde la profundidad de indentación fue mayor a los 200 nm, el sustrato comienza a tener efecto sobre la medida de H, al igual que en los recubrimientos de HA libre de Ag e HA-Ag. Con respecto a los valores de E en función de la profundidad de indentación, se observaron comportamientos similares a los registrados para la medida de H, en todos los recubrimientos, Figura 34b.

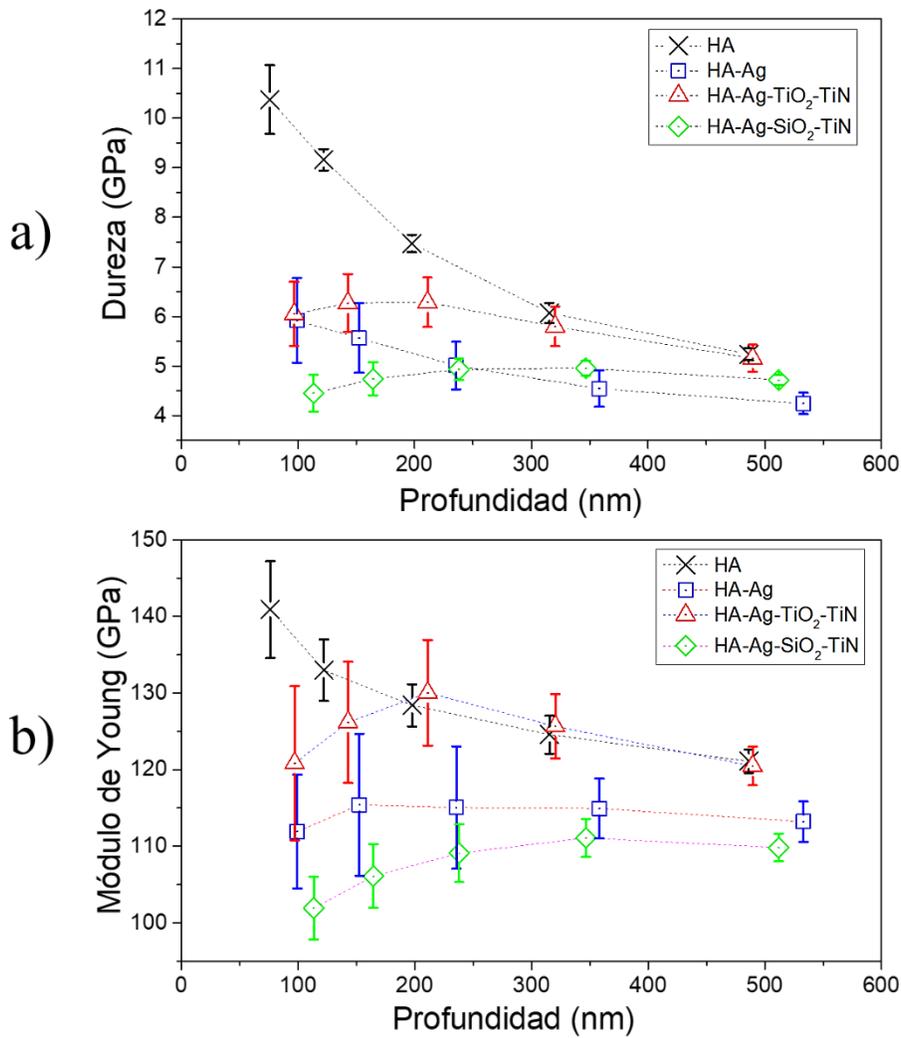


Figura 34. Propiedades mecánicas: a) dureza y b) módulo de elasticidad, en función de la profundidad de indentación para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN.

Teniendo en cuenta los comportamientos observados en la Figura 34 para cada uno de los sistemas, se realizaron de nuevo ensayos de nano indentación a una carga constante de 3.1 mN, donde las propiedades mecánicas de los recubrimientos, principalmente de los sistemas multicapa, fueron muy similares. La Figura 35 presenta las curvas de carga vs descarga para todos los sistemas desarrollados. La máxima profundidad de indentación fue obtenida para el sistema de HA-Ag/SiO₂/TiN con 157 nm, seguido de los recubrimientos de HA-Ag e HA-Ag/TiO₂/TiN con 146 nm y 139 nm, respectivamente. Mientras que la mayor resistencia a la

deformación fue registrada para el sistema de HA libre de Ag, que posee el mayor valor de H. El área bajo la curva de carga, presenta la energía total aplicada a lo largo de la indentación, en contraste, el área bajo la curva de descarga está relacionada con la energía elástica. Por último, el área entre las dos curvas presenta la energía total disipada (asociada con la deformación plástica) por el recubrimiento durante el ensayo. Con base en esto, se determinó el porcentaje de recuperación elástica de todos los recubrimientos y los resultados se presenta en la Figura 36. Allí se observa que el sistema con menor recuperación elástica es el de HA libre de Ag, seguido por los recubrimientos de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag, que presentaron valores similares y, por último, el sistema HA-Ag/SiO₂/TiN, que obtuvo el mayor valor. Estos resultados podrían indicar que la inclusión de capas blandas de Ag en la estructura de HA favorece la recuperación elástica del material. En algunos reportes de la literatura se ha evidenciado el mejoramiento en los porcentajes de recuperación de recubrimientos multicapa en comparación con sistemas monocapa [110].

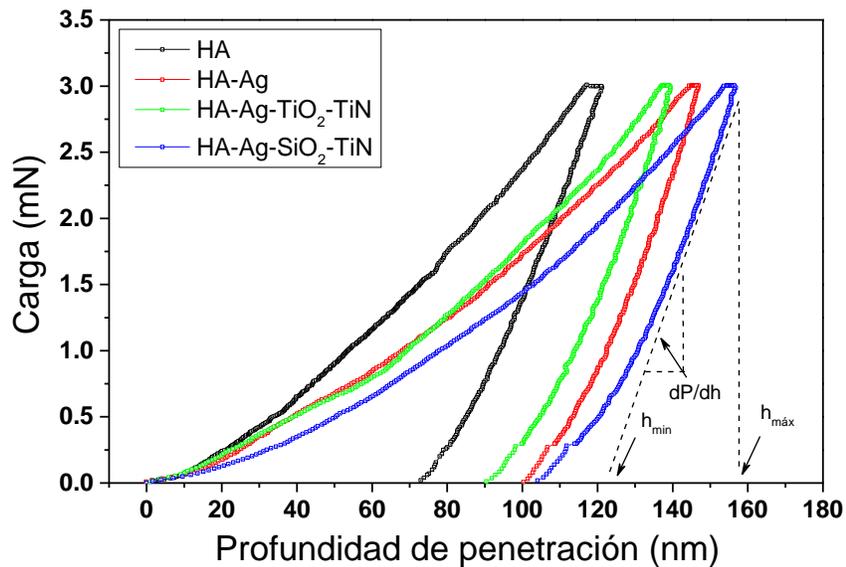


Figura 35. Curvas de carga vs descarga a 3 mN, para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN.

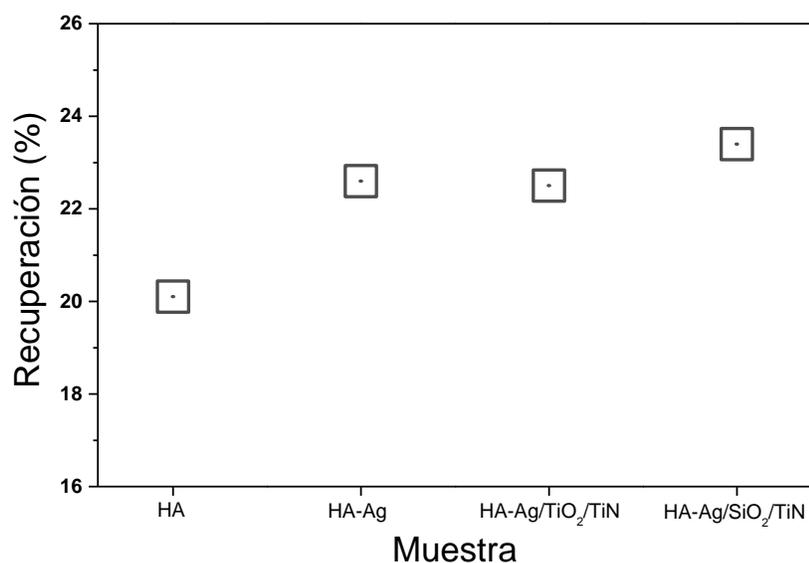


Figura 36. Porcentaje de recuperación elástica para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN.

La Respuesta en nano indentación de películas delgadas es sensible a factores tales como: la rugosidad superficial, textura, tamaño de grano. Sin embargo, se ha encontrado una fuerte dependencia entre las propiedades mecánicas como H y E, con la nucleación de defectos y las características de deformación plástica del recubrimiento, que son función del espesor y la microestructura [122]. La Figura 37 presenta los valores de H y E obtenidos nuevamente mediante el método de Oliver y Pharr para los recubrimientos desarrollados con base en las curvas de carga vs descarga de la Figura 35. Se observa que tanto la H como el E de los recubrimientos presentan un comportamiento similar. Los mayores valores para ambas propiedades mecánicas fueron registrados para el sistema de HA libre de Ag, con $H=9.1 \pm 0.4$ GPa y $E=137 \pm 4$ GPa, que son similares a los reportados por V.F. Pichugin *et al.* [61] para recubrimientos puros de HA. El efecto de la incorporación de capas de Ag en la estructura de HA, claramente afecta las propiedades mecánicas del recubrimiento, disminuyendo en un 30 % el valor de H y 13 % el valor de E. Por otro lado, partiendo de los valores registrados para el recubrimiento de referencia de HA-Ag ($H=6.3 \pm 0.7$ GPa y $E=121$

± 7 GPa), se observa un resultado muy similar para el sistema de HA-Ag depositado sobre el TiO_2/TiN , donde no se aprecian diferencias significativas. Sin embargo, los valores promedio de H y E presentan un leve aumento del 2 % y 4 % respectivamente. Para el sistema de HA-Ag/ SiO_2/TiN se aprecia una reducción en las propiedades mecánicas con relación al sistema de referencia de HA-Ag, obteniendo valores de $H=5.1 \pm 0.3$ GPa y $E=110 \pm 5$, que corresponden respectivamente a un 19 % y 10 % menos. Este es un comportamiento un poco atípico, dado que dicho sistema además de ser el de mayor grado de cristalinidad, presentó el menor tamaño de grano y con base en la relación de Hall Pech, mediante la disminución en el tamaño de grano por debajo de $1 \mu\text{m}$, debe haber un notable aumento en el valor de H en los recubrimientos dado que se genera el aumento del área de los límites de grano, desacelerando el deslizamiento de las dislocaciones [73,123]. Sin embargo, Los resultados obtenidos indican que los valores de H y E en los recubrimientos multicapa de HA-Ag/ TiO_2/TiN e HA-Ag/ SiO_2/TiN , corresponden a una medida representativa de todo el sistema compuesto y no sólo de la película de HA-Ag.

Estudios mecánicos de sistemas multicapa de HA-Ag no han sido reportados en la literatura. Sin embargo, hemos observado que los valores de H y E obtenidos en el presente estudio son similares o superiores a los obtenidos para recubrimientos de HA por otros autores. M.A. Surmeneva *et al.* [101] reportaron valores entre 3 y 4.9 GPa para H y entre 78 y 79 GPa para E, en recubrimientos de HA con 700 nm de espesor depositados sobre un sustrato de magnesio AZ31. En otro reporte, los mismos autores obtuvieron valores de 7 GPa y 124 GPa para H y E, respectivamente, en un recubrimiento de HA con 690 nm de espesor depositado sobre titanio [124].

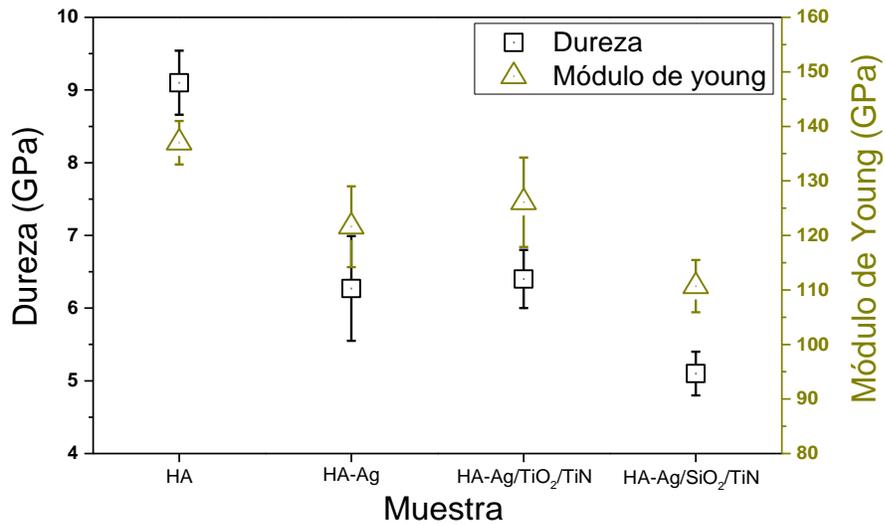


Figura 37. Dureza y módulo de elasticidad evaluadas a 3 mN de carga, para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN.

Con el fin de extender el análisis mecánico de los recubrimientos, fueron calculados los parámetros de resistencia elástica (H/E^*) y resistencia a la deformación plástica (H^3/E^{*2}). Los resultados son presentados en la Figura 38. Allí se aprecian nuevamente los mayores valores para el recubrimiento de HA libre de Ag y un comportamiento similar al observado en la figura anterior, para los sistemas multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN, con relación al recubrimiento de referencia de HA-Ag. Una reducción del 23 % y 60 % para H/E^* y H^3/E^{*2} , respectivamente, fue registrada al incorporar capas de Ag en la estructura de HA. Por otro lado, el sistema multicapa depositado sobre el TiO₂/TiN presentó valores similares a los registrados en el recubrimiento de referencia, mientras que para el sistema de HA-Ag/SiO₂/TiN se obtuvo una disminución del 11 % y 38 % respectivamente para H/E^* y H^3/E^{*2} . Los resultados indican que tanto la inclusión de Ag en la HA, como la incorporación de capas intermedias entre la HA-Ag y el Ti-6Al-4V, afectan en mayor medida el parámetro de resistencia a la deformación plástica de los recubrimientos, relacionada directamente con el valor de H en las superficies. El estudio de estas propiedades es fundamental en recubrimientos para implantes, dado que el éxito a largo plazo en estos dispositivos puede

ser afectado, por ejemplo: el mejoramiento en las relaciones H/E^* y H^3/E^{*2} de estas superficies puede ofrecer grandes ventajas relacionadas con la durabilidad y menor potencial de daño superficial [118]. Valores inferiores a los registrados en el presente estudio han sido reportados en la literatura. R.V. Chernozem *et al.* [125] depositaron un recubrimiento de HA-TiO₂ con valores entre 1.8×10^{-2} y 2.5×10^{-2} para H/E^* y entre 4.0×10^{-4} y 9.0×10^{-4} para H^3/E^{*2} . De manera similar, I.Y. Grubova *et al.* [73] obtuvieron valores de 3×10^{-2} and 2.4×10^{-3} GPa, respectivamente para H/E^* y H^3/E^{*2} en recubrimientos codepositados de HA-Ag.

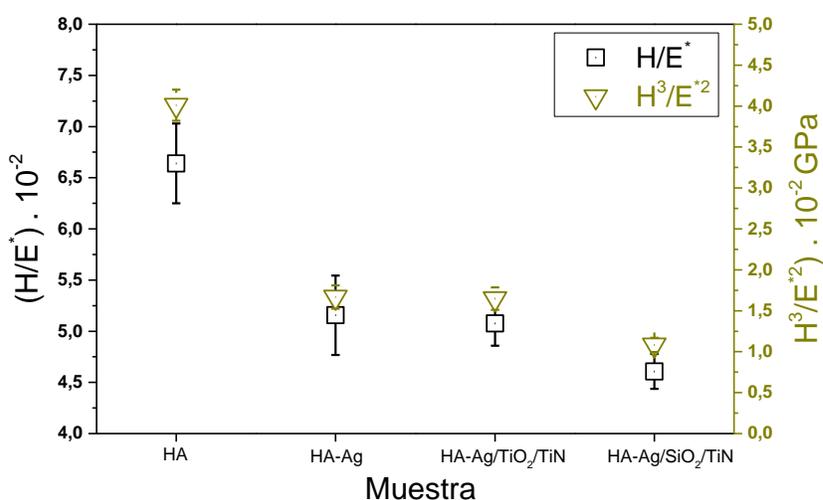


Figura 38. Resistencia elástica y resistencia a la deformación plástica para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN.

6.1.2.2.2. Esfuerzos residuales

Los esfuerzos residuales de los recubrimientos multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN, HA-Ag/SiO₂/TiN, del sistema de referencia de HA-Ag y del recubrimiento de HA libre de Ag son presentados en la Figura 39. Allí se observa una reducción del 34 % en los esfuerzos residuales compresivos en la película de HA tras la incorporación de las múltiples capas de Ag. De igual manera, la incorporación de las capas intermedias de TiO₂/TiN y SiO₂/TiN entre el recubrimiento multicapa de HA-Ag y el sustrato, disminuyeron los esfuerzos residuales de

dicho sistema de referencia en aproximadamente un 30 %. Estos resultados indican que hubo una mejor afinidad tanto entre el recubrimiento de HA-Ag y las capas intermedias utilizadas, como entre éstas y el Ti-6Al-4V. Esta afinidad podría estar relacionada, para el caso del sistema de HA-Ag/TiO₂/TiN, con la disminución entre las diferencias de los coeficientes de expansión térmica de HA y el sustrato de Ti-6Al-4V ($11.5 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ y $8.50 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$, respectivamente), mediante la incorporación del TiN con un valor de $9.35 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ [15,126], y el TiO₂ que se encuentra en el rango de $9.4\text{-}11.8 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ [127]. Esto causa una mayor disipación de energía durante la formación del recubrimiento. Por otro lado, el resultado obtenido para el sistema con SiO₂, que presentó el menor valor, no podría estar relacionado con la disminución en la diferencia de los coeficientes de expansión térmica, dado que dicho compuesto presenta un valor entre $0.55\text{-}0.75 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ [128], que es mucho menor al de las otras capas utilizadas y el sustrato. Esto indica que, el comportamiento obtenido se debe principalmente a la buena afinidad química que hay entre el SiO₂ y la HA. Disminuir los esfuerzos residuales en películas delgadas es muy importante dado que los esfuerzos compresivos producen esfuerzos de tensión normales al plano del recubrimiento, que actúan sobre cualquier defecto preexistente para promover la delaminación de la película [129].

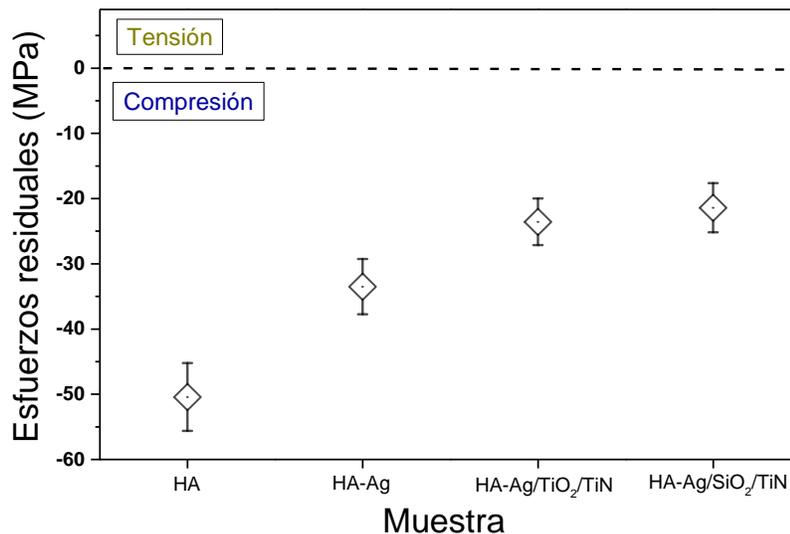


Figura 39. Esfuerzos residuales para el recubrimiento de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN.

6.1.2.2.3. Adhesión

La Figura 40 muestra los resultados del ensayo de micro rayado realizado sobre la superficie de los sistemas desarrollados. Allí se observan tanto las imágenes de las huellas de rayado generadas sobre cada recubrimiento, como también un gráfico correspondiente, donde están los registros de fricción y la carga normal aplicada en función de la distancia de rayado, por medio de la cual se encontraron los valores de carga crítica (L_C), que de acuerdo a la norma ASTM C1624-5 [130] está relacionada con la falla adhesiva de los recubrimientos, que es interpretada como un cambio abrupto en los registros del coeficiente de fricción generado por el cambio de la superficie en contacto con la punta durante la evaluación mecánica, en este caso una transición de recubrimiento a sustrato. El esfuerzo mecánico inducido desde la superficie por la punta de diamante, se trasmite hasta la interfaz entre la película y el sustrato, y si la fuerza de unión allí es menor que la magnitud del esfuerzo cortante, se genera la falla adhesiva del recubrimiento.

Para el sistema de HA libre de Ag, fue obtenido un valor L_C de 96 mN, que fue aumentado en un 18 % mediante la incorporación de las capas de Ag, presentando un valor L_C de 114 mN. Este comportamiento podría estar relacionado con la disipación de energía por parte de las capas de Ag, que disminuyen la magnitud el esfuerzo que alcanza la interfaz entre la primera película de HA, del sistema HA-Ag, y el sustrato. A su vez, la adhesión entre el sistema de referencia de HA-Ag y el Ti-6Al-4V fue aumentada en un 46 % y 84 % mediante la incorporación respectiva de las capas de TiO_2/TiN y SiO_2/TiN , que estaría relacionado con la disminución en los esfuerzos residuales registrados en los sistemas multicapa.

Estos esfuerzos pueden reducir la cohesión y adhesión de los recubrimientos, lo que se evidencia al ejercer una carga mecánica sobre ellos [130]. Y.C. Yang *et al.* [131] reportan la disminución en la fuerza de unión de un recubrimiento de HA depositado sobre Ti-6Al-4V mediante plasma-sprayed como función del incremento en los esfuerzos residuales compresivos, que fueron generados mediante el incremento en la temperatura de depósito debido a las diferencias entre los coeficientes de expansión térmica del recubrimiento y el sustrato. En cuanto a recubrimientos obtenidos por pulverización catódica magnetrón, W. Boonrawd *et al.* [132] reportaron un valor L_C de 130.2 mN en un recubrimiento de HA sobre un sustrato de titanio, mientras que en un sistema similar, A. Quirama *et al.* [82] obtuvieron

un valor L_C de 49 mN, que fue incrementado hasta 130 mN mediante la incorporación de una bicapa intermedia de TiO_2/TiN entre el recubrimiento de HA y un sustrato de Ti-6Al-4V. Estos valores son menores a los obtenidos para los recubrimientos multicapa compuestos desarrollados, al igual que para el recubrimiento de HA-Ag e HA libre de Ag.

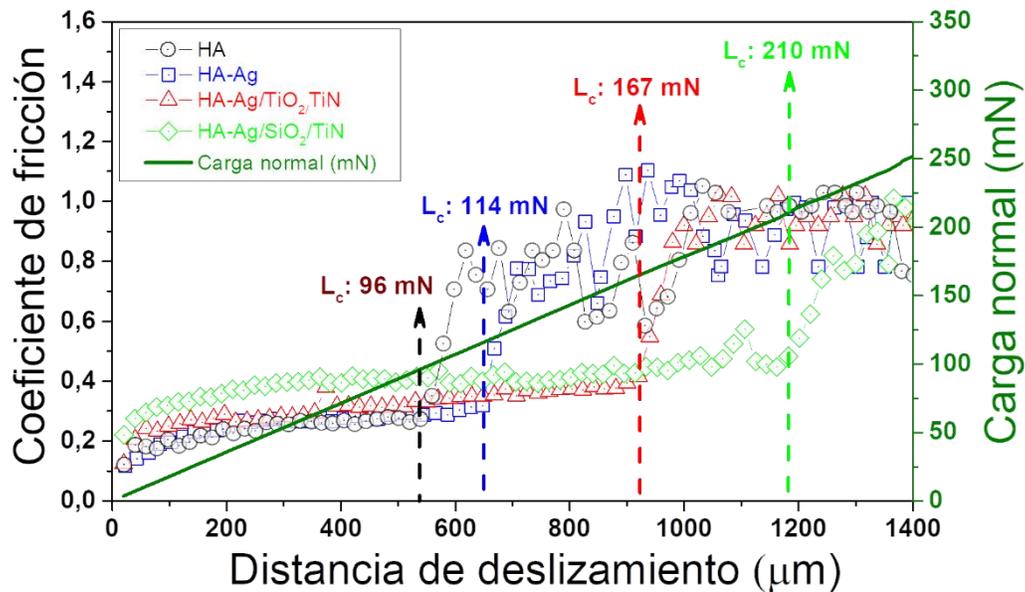
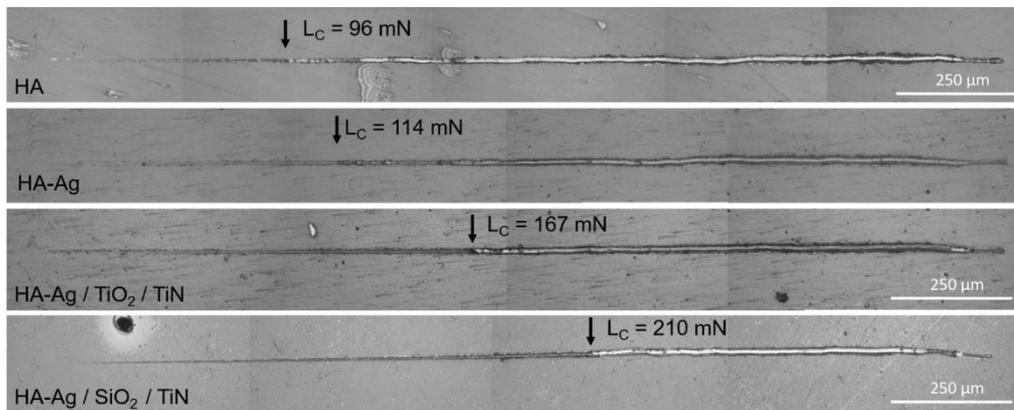


Figura 40. Resultados del ensayo de micro rayado realizado sobre los recubrimientos de HA libre de Ag, el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/ TiO_2/TiN y HA-Ag/ SiO_2/TiN .

Se realizó un análisis mediante espectroscopía micro-Raman sobre la huella de rayado antes y después del punto de falla. La Figura 41 muestra las imágenes de la zona de falla para los sistemas HA-Ag/TiO₂/TiN (Figura 41a) e HA-Ag/SiO₂/TiN (Figura 41b), y los espectros correspondientes. En ambos casos se observan bandas relacionadas con el grupo (PO₄)³⁻, lo que confirma que antes de generarse la falla, la punta estaba en contacto con el recubrimiento de HA-Ag, indicando que la fuerza de unión entre dicho recubrimiento y las capas intermedias utilizadas (TiO₂/TiN y SiO₂/TiN), fue mayor que entre estas capas y el sustrato. Este resultado comprueba que las capas intermedias utilizadas favorecen el anclaje mecánico entre la HA-Ag y el Ti-6Al-4V, lo que posiblemente está relacionado con los fenómenos de difusión encontrados mediante el análisis estructural donde se evidenció buena afinidad química entre la HA y los elementos constituyentes de las capas intermedias.

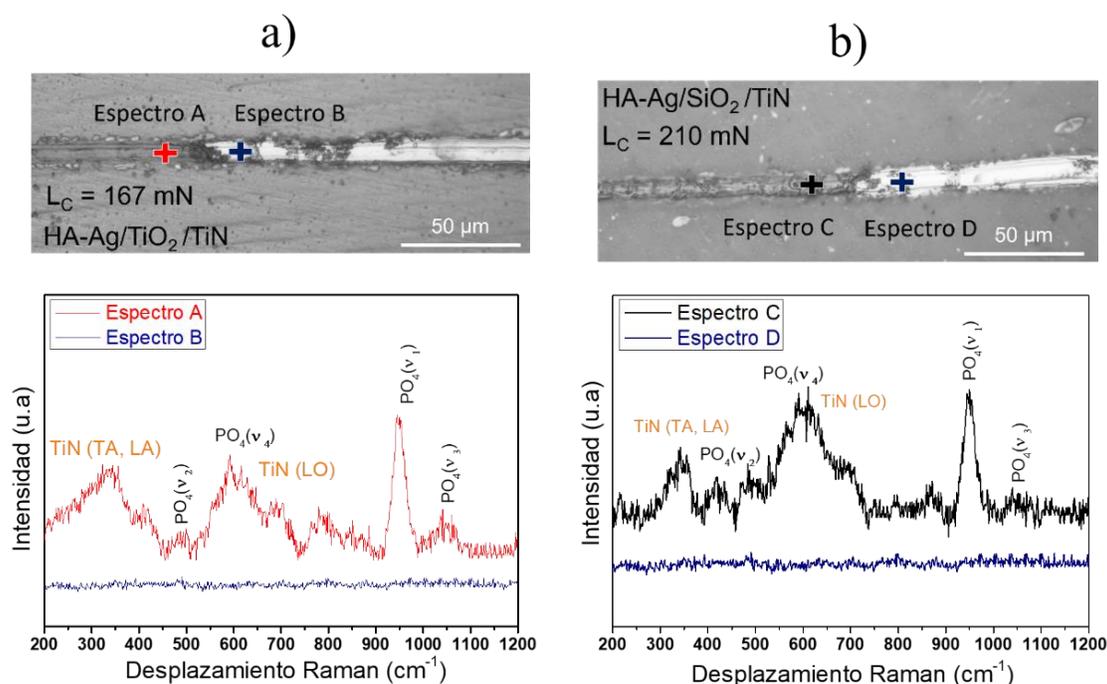


Figura 41. Análisis Raman realizado sobre las huellas de rayado obtenidas en los sistemas multicapa compuestos de: HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN.

6.1.3. Evaluación biológica *in vitro* de los recubrimientos desarrollados

Durante el estudio biológico de los recubrimientos, se evaluó inicialmente la estabilidad de la HA-Ag en medio de PBS a lo largo de 192 h. Además, se realizó un ensayo de liberación de Ag en los sistemas multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN, HA-Ag/SiO₂/TiN e HA-Ag durante 920 h utilizando este mismo medio. La finalidad de esta prueba era conocer la concentración acumulativa de Ag en función del tiempo y su tasa de liberación en los recubrimientos. Posteriormente, se evaluó la biocompatibilidad y propiedades antibacteriales de los sistemas desarrollados, utilizando nuevamente el recubrimiento de HA libre de Ag con fines comparativos, ya que la obtención de un análisis completo en la respuesta celular o bacteriana de una muestra, requiere del uso de controles que permitan conocer la influencia de todos los elementos que conforman el sistema de estudio.

6.1.3.1. Disolución de HA-Ag y estudio de liberación de Ag en medio de PBS

La evaluación biológica de los recubrimientos inició con el estudio de disolución de HA-Ag en medio biológico simulado. La Figura 42 presenta la imagen superficial y en sección transversal del sistema de referencia de HA-Ag para tiempos de inmersión en PBS de 24 h, 72 h y 192 h. A nivel superficial, se observa que la morfología de granos comienza a perderse como producto de la disolución del recubrimiento. Por otro lado, la sección transversal revela modificaciones en la estructura del recubrimiento de HA-Ag, encontrando zonas con capas de Ag interrumpidas a las 24 h de inmersión. Este efecto fue potenciado con el tiempo, dado que, la cantidad de espacios a las 72 h y 192 h de inmersión, principalmente a lo largo de la última capa de Ag, incrementaron. Este comportamiento estuvo acompañado de un aumento en la porosidad de las capas de HA, lo que indica que hubo infiltración de la solución de PBS a través de la estructura del recubrimiento, acelerando la disolución de las capas internas de HA y posiblemente induciendo la liberación de Ag⁺ por contacto de las capas de Ag⁰ con el medio.

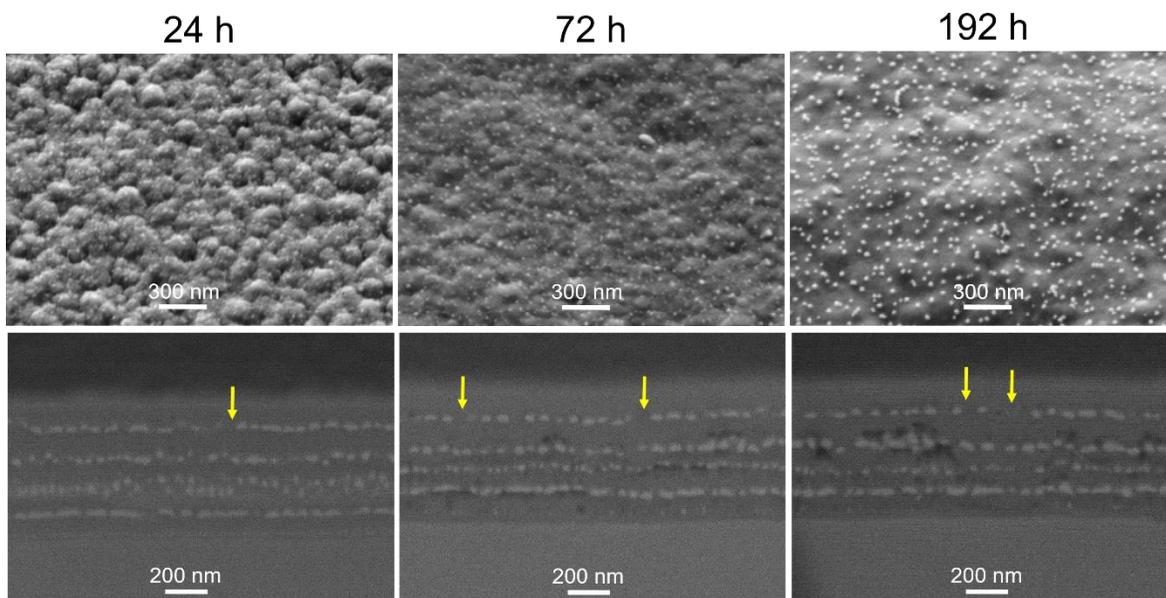


Figura 42. Imagen superficial (FESEM) y estructura en sección transversal (FIB-FESEM), para el recubrimiento de referencia de HA-Ag luego de haber sido inmerso en PBS por tiempos de 24, 72 y 192 h.

En la Figura 43 se presenta un análisis composicional realizado por EDS sobre la muestra de HA-Ag que fue inmersa en solución de PBS durante 192 h. Allí se observa inicialmente la zona de evaluación con los mapas de composición para cada uno de los elementos detectados, que además fueron cuantificados. La presencia de elementos tales como Ca, P y O, relacionados con la HA, es bastante notoria. A su vez, la Ag también fue confirmada. Sin embargo, el resultado indica que dicho elemento está uniformemente distribuido a lo largo de la superficie y no en las zonas puntuales. Esto se debe a que el volumen de interacción de la muestra durante el análisis composicional es superior a los 100 nm, por lo que hay influencia de varias capas de Ag en la medición. Es importante resaltar que dicha evaluación fue realizada a tan solo 3 kV, sin embargo, es un voltaje alto para los espesores nanométricos de las capas estudiadas. Por último, fueron también identificados elementos tales como Na y Cl en bajas cantidades, que fueron inducidos por del medio de PBS utilizado.

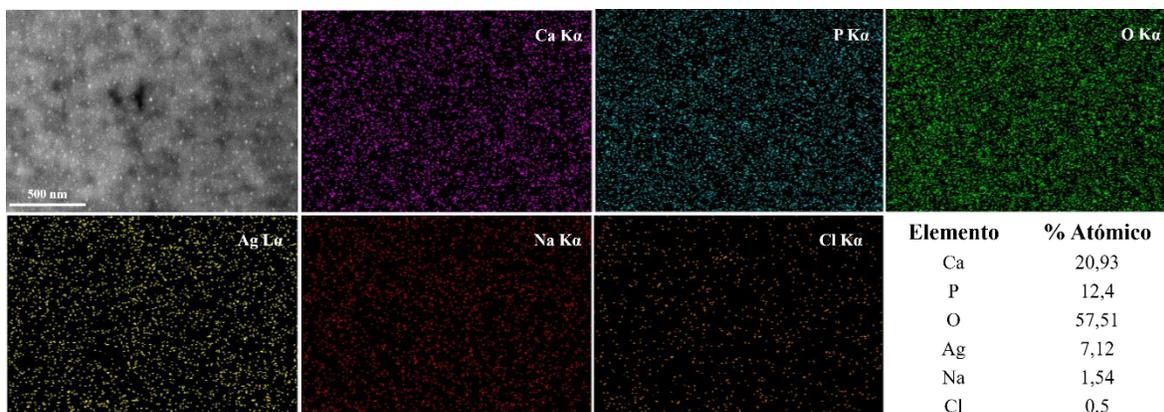


Figura 43. Estudio composicional mediante EDS (3 kV) realizado a la muestra de HA-Ag luego de ser inmersa en PBS durante 192 h.

Para cuantificar la Ag liberada al medio durante la inmersión de los recubrimientos en medio biológico, fue realizado un nuevo ensayo de inmersión a lo largo de 30 días, sacando alícuotas de solución a tiempos determinados, para ser analizadas por espectroscopía de absorción atómica, con el fin de conocer la concentración de Ag en cada punto. La Figura 44 presenta los valores obtenidos para el sistema de referencia de HA-Ag y los recubrimientos multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN y HA-Ag/SiO₂/TiN. Allí se observa un comportamiento creciente en la concentración acumulativa de Ag en función del tiempo para todos los sistemas, indicando una liberación continua de este elemento desde el recubrimiento hacia el medio.

Los valores obtenidos para los sistemas de HA-Ag/TiO₂/TiN y el recubrimiento de referencia de HA-Ag, son muy similares para cada tiempo de medición. Sin embargo, el sistema HA-Ag depositado sobre SiO₂/TiN, muestra diferencias significativas desde el tiempo inicial de 24 h, que se mantienen a lo largo del ensayo, alcanzando una reducción cercana al 50 % en la última medición a las 720 h de evaluación, con respecto al sistema de referencia. La liberación de Ag estaría relacionada con la cristalinidad de los recubrimientos, dado que su liberación al medio está influenciada por la disolución o infiltración de HA. Por esta razón, los menores valores de concentración de Ag, relacionados con una menor liberación al medio de este elemento, fueron obtenidos para el recubrimiento multicapa compuesto de HA-Ag/SiO₂/TiN, que presentó el mayor grado de cristalinidad. Los valores registrados durante

el ensayo, con un máximo cercano a los 0.21 mg Ag/L, son mucho menores que los reportados en la literatura para la liberación de este elemento, donde han sido obtenidos valores de hasta 1.4 mg/L para tiempos de evaluación similares a los del presente estudio [133]. Es importante resaltar que, con base en la geometría y arquitectura del sistema, que incorpora 4 capas de Ag con aproximadamente 64 mm² de área y 30 nm de espesor, se estima que la concentración máxima de dicho elemento sería de aproximadamente 1.28 mg/L, que se lograría sólo mediante la disolución completa del recubrimiento.

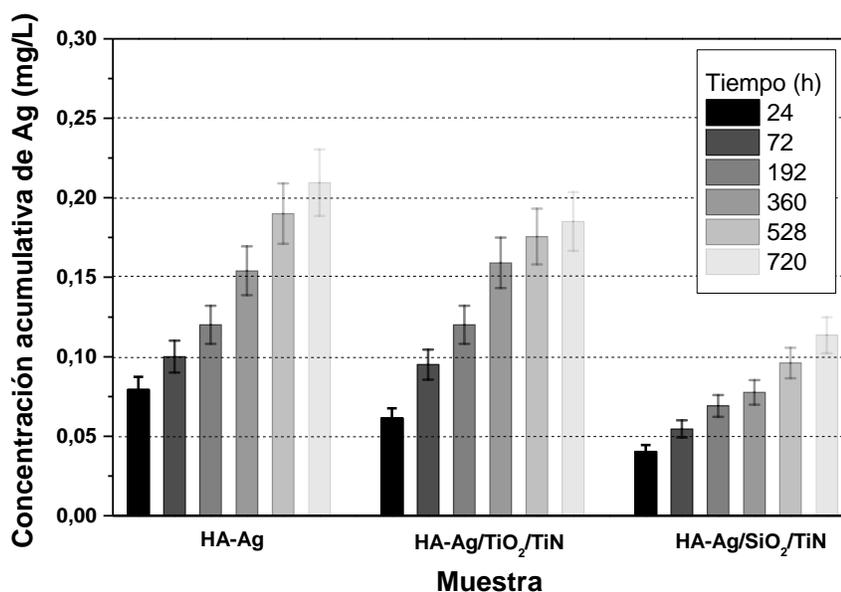


Figura 44. Concentración acumulativa de Ag liberada del recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN, en función del tiempo.

Con base en la Figura 44 y con el fin de profundizar el análisis de liberación de Ag al medio, se calcularon las pendientes en cada punto y se determinó la velocidad de liberación de Ag en cada sistema a partir de las 72 h de inmersión en PBS, los resultados se presentan en la Figura 45. Se observa una tendencia decreciente en la velocidad de liberación de Ag al medio en los tres recubrimientos, con el máximo valor registrado durante la medida inicial a las 72 h de inmersión, donde el sistema de HA-Ag/TiO₂/TiN presentó el valor más alto, seguido del sistema de referencia y el valor más bajo fue obtenido para el recubrimiento de HA-

Ag/SiO₂/TiN. Para el tiempo de 192 h hay una reducción significativa en velocidad de liberación de Ag, siendo mucho más evidente en el recubrimiento de HA-Ag/TiO₂/TiN, que obtuvo el mayor valor inicial. A partir de este punto, se observan algunas fluctuaciones en un bajo rango y finalmente, se aprecian valores de liberación similares para los tres sistemas.

El comportamiento obtenido es similar al perfil de liberación descrito anteriormente por varios autores de la literatura. Pero muchos factores podrían estar relacionados con el mecanismo de liberación de Ag en solución biológica, promoviendo una liberación lenta o rápida. Uno de éstos es la arquitectura del recubrimiento, que puede favorecer o desfavorecer la liberación de Ag de acuerdo con la configuración utilizada para la incorporación de este elemento en el recubrimiento, teniendo en cuenta que tanto la estructura como el espesor de las capas de HA podrían tener influencia sobre esta liberación, dado que las películas densas de HA pueden controlar la difusión de Ag, lo que podría mejorarse induciendo porosidad en dichas capas, generando espacios para la movilidad de Ag hasta un nivel superficial. Otro aspecto importante y que ha sido mencionado con anterioridad, es la cristalinidad de la HA, que además de afectar la disolución, también influye sobre su infiltración en medio biológico.

Teniendo en cuenta lo anterior, se plantean dos hipótesis: I) la difusión de nano partículas de Ag al medio de PBS depende de la disolución en el tiempo de las múltiples capas de HA. II) mediante la infiltración de las capas de HA con el fluido biológico, se genera una liberación de Ag⁺ hacia la superficie del recubrimiento. Estos iones tienen un diámetro muy pequeño, cercano a los 0.25 nm, lo que facilita su movilidad a través de las capas de HA, que constituyen un medio húmedo al estar infiltradas con el fluido biológico. Ambos mecanismos podrían implicar una liberación de Ag prolongada, que puede garantizar una mayor durabilidad del efecto antibacteriano de los recubrimientos.

Para fines bactericidas, los investigadores han establecido que un perfil ideal de liberación de Ag debería proporcionar una liberación rápida al comienzo de la exposición al medio, lo que protege el recubrimiento de la adhesión bacterial en las 6 primeras horas, seguido por una liberación lenta y prolongada, ya que las infecciones pueden aparecer años e incluso décadas después de un procedimiento de implantación [134,135]. Con base en la Agencia Norteamericana de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), se permite una exposición máxima diaria de Ag por ingestión oral de 0.167 mg/L y

vía parental de 0.014 mg/L. Además, D.E. Marx *et al.* [136] indican que la Ag puede eliminarse mediante excreción de orina en cantidades de hasta 0.002 mg/día.

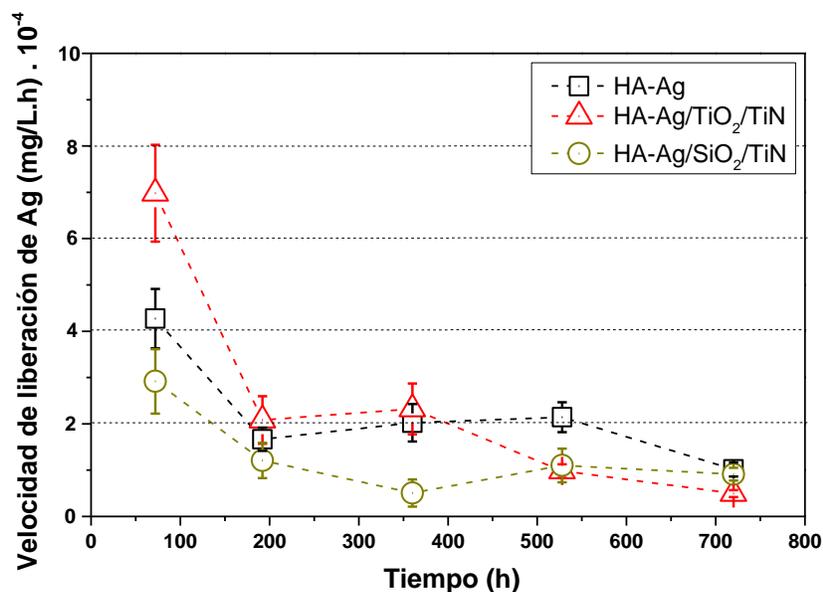


Figura 45. Velocidad de liberación de Ag en el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN, en función del tiempo.

6.1.3.2. Biocompatibilidad de los recubrimientos

Se realizó inicialmente un ensayo de citotoxicidad de Ag⁺, a diferentes concentraciones, sobre la línea mMSCs utilizada para las pruebas de biocompatibilidad. El objetivo de esto, era conocer los niveles máximos de Ag⁺ tolerados por dichas células. El rango de concentraciones de dicho elemento fue establecido de acuerdo a los resultados presentados en el apartado anterior y algunos reportes de la literatura. Posteriormente, se evaluó la respuesta celular de los sistemas multicapa desarrollados y los controles respectivos, en términos de citotoxicidad, adhesión y diferenciación de mMSCs.

6.1.3.2.1. Citotoxicidad de Ag

Basado en los resultados anteriores, se realizó un ensayo de citotoxicidad de Ag, a diferentes concentraciones, sobre células madre mesenquimales de ratón (mMSCs, pos sus siglas en inglés), utilizadas durante la evaluación biológica *in vitro* de los recubrimientos. Los valores máximos de concentración de Ag, fueron establecidos según algunos reportes de la literatura, donde no hay actualmente un consenso sobre el rango tóxico de dicho elemento, encontrando valores que van desde 2.5 hasta 10 mg/L [33,39,137]. La Figura 46 muestra los resultados de la prueba MTT, donde se presenta la viabilidad celular en función del aumento en la concentración de Ag en el medio de cultivo celular y que fue comparado con un control de medio libre de Ag. Puede observarse que hasta una concentración de 0.48 mg/L de Ag, dicho elemento no afecta la viabilidad de las células. Sin embargo, a 0.96 mg/L la viabilidad baja hasta un 84 %, que aún es alta, pero indica afectación, y a partir de este punto, se registran valores inferiores al 40 %, alcanzando un 1 % de viabilidad a la concentración de 14.64 mg/L. Estos resultados muestran el efecto citotóxico de los iones de Ag^+ , altamente reactivos, que penetran fácilmente la membrana de las células, causando su muerte.

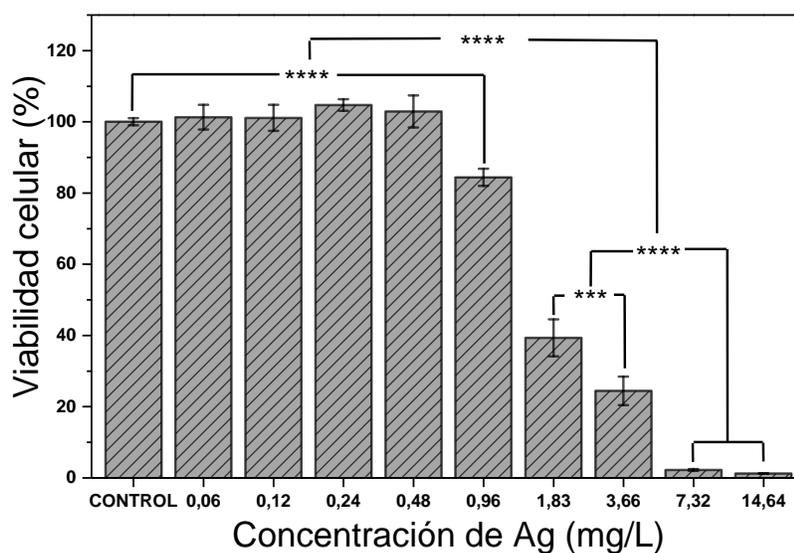


Figura 46. Citotoxicidad de Ag^+ sobre las mMSCs mediante el ensayo MTT. Valores significativos como: **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$.

En la Figura 47 se presentan las imágenes de las células expuestas al medio de cultivo con diferentes concentraciones de Ag, donde se aprecia una gran relación con los resultados del ensayo MTT, observando que, las células expuestas al medio con Ag a bajas concentraciones (de hasta 0.96 mg/L), presentan una morfología similar que en el blanco libre de Ag. Posteriormente, a 1.83 mg/L se observan algunas células muertas, que aumentan proporcional a la concentración de Ag⁺ en el medio.

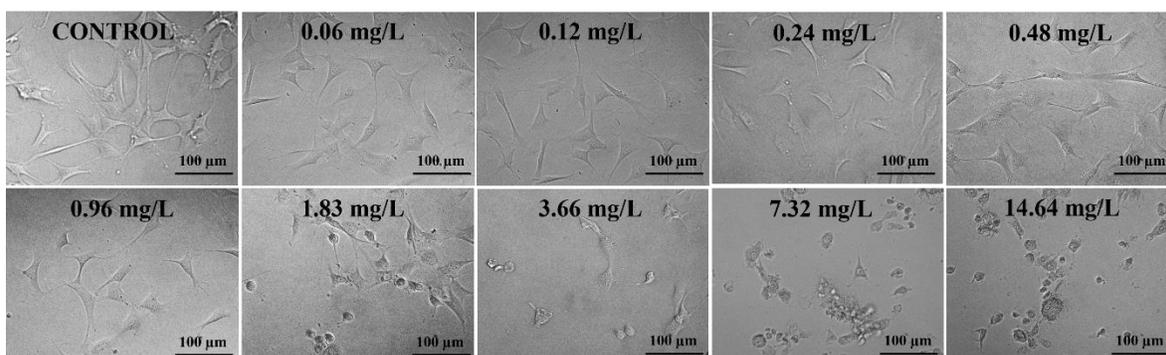


Figura 47. Imágenes ópticas de mMSCs expuestas a medio de cultivo con Ag, en diferentes concentraciones.

6.1.3.2.2. Viabilidad celular

La viabilidad celular de los recubrimientos de HA libre de Ag, HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos, fue determinada mediante dos técnicas, correspondientes a los modos: no contacto mediante MTT y modo contacto por Live/DeadTM. La Figura 48 muestra los resultados correspondientes a esta primera técnica, donde se evaluó la actividad metabólica de mMSCs expuestas al medio con elementos disueltos de los recubrimientos. Allí se observa que la viabilidad de las células fue disminuida desde un 95 % en el sistema libre de Ag, hasta aproximadamente un 78 % para el sistema de referencia de HA-Ag y el recubrimiento de HA-Ag/TiO₂/TiN. Mientras que el recubrimiento de HA-Ag/SiO₂/TiN presentó un valor de viabilidad del 101 %. El comportamiento obtenido se debe a que la liberación de Ag⁺ de este último sistema fue menor en comparación con los otros dos recubrimientos, lo que fue observado en la Figura 45, que se encuentra relacionado con que

la HA-Ag depositada sobre el SiO₂ obtuvo una mayor cristalinidad, lo que dificultó la liberación de Ag⁺ al medio durante el ensayo biológico, favoreciendo la actividad metabólica de mMSCs expuestas al medio que contiene elementos disueltos del recubrimiento.

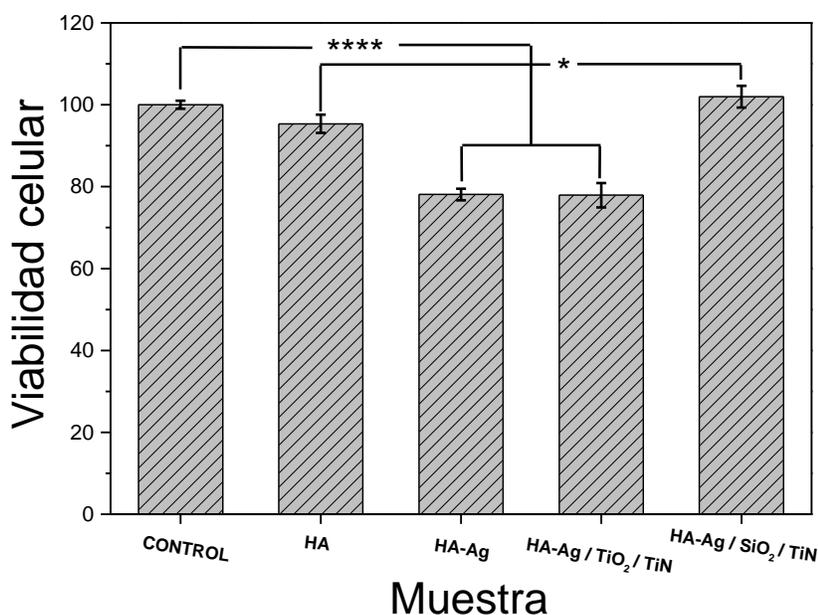


Figura 48. Viabilidad celular ante mMSCs de los recubrimientos desarrollados mediante el ensayo MTT. Valores significativos como: **** $p < 0.0001$, * $p < 0.1$.

En la Figura 49 se presentan los resultados del ensayo de viabilidad celular de los recubrimientos en modo contacto por el ensayo Live/DeadTM. Allí se observan las imágenes respectivas para los controles: control celular (alta actividad de esterasa intracelular, tinción verde fluorescente) Figura 49a y muerte celular (pérdida de la integridad de la membrana plasmática, tinción magenta fluorescente) Figura 49b. Adicionalmente, las Figuras 49c y d presentan las imágenes obtenidas para los blancos de Ti-6Al-4V e HA libre de Ag, respectivamente. En contraste, las imágenes de las células sembradas sobre el recubrimiento de referencia de HA-Ag y los sistemas multicapa compuestos de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN, son apreciadas en las Figuras 49e-f. En las imágenes correspondientes al sustrato y los recubrimientos, se observa principalmente una tinción verde fluorescente,

indicando que la actividad de la esterasa intracelular de mMSCs no fue afectada por el contacto con la superficie de los recubrimientos y el Ti-6Al-4V. Sin embargo, se observan algunas células en color magenta tanto sobre el recubrimiento de referencia de HA-Ag, como también en el sistema depositado sobre el TiO₂, lo que está en conformidad con la prueba de MTT, donde estos dos sistemas presentaron una viabilidad celular inferior que los otros recubrimientos y el sustrato. Los resultados obtenidos a lo largo de la evaluación de citotoxicidad de los recubrimientos desarrollados indican que éstos son potencialmente no tóxicos ante mMSCs, dado que la cantidad de Ag⁺ liberada al medio a través de la estructura de HA o mediante su disolución, no fue suficiente para alcanzar concentraciones citotóxicas.

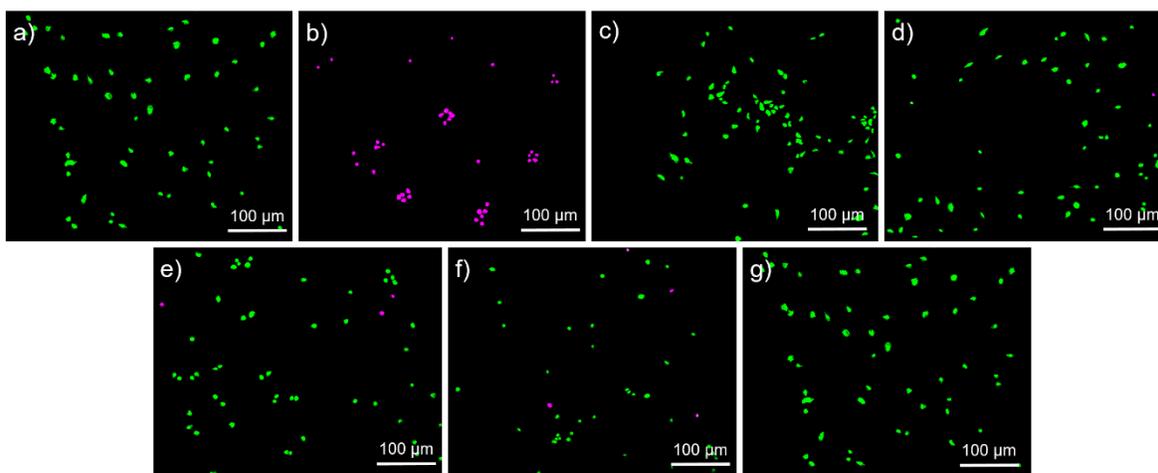


Figura 49. Imágenes de fluorescencia (10X), mostrando las mMSCs vivas teñidas con calcein-Am (verde) y células muertas teñidas con EthD-1 (magenta): a) Control vida, b) control muerte, c) Ti-6Al-4V, d) HA libre de Ag, e) HA-Ag, f) HA-Ag/TiO₂/TiN, g) HA-Ag/SiO₂/TiN.

6.1.3.2.3. Adhesión celular

La Figura 50 presenta las imágenes de mMSCs adheridas a la superficie del sustrato (control 1), del recubrimiento de HA libre de Ag (control 2), del sistema de referencia de HA-Ag y los recubrimientos multicapa compuestos a tiempos de 3 h y 24 h. Allí se observan detalles tales como: el núcleo, la morfología y las adhesiones focales, que fueron observados mediante la detección de proteínas tales como:

-Actina, que es la proteína de la cual está compuesto el citoesqueleto de la célula, lo que permite observar en gran detalle su morfología.

-Vinculina, es una proteína secretada durante el proceso de adhesión de la célula sobre una superficie determinada.

Los resultados obtenidos indican que hubo un apropiado desarrollo del citoesqueleto de las células cultivadas tanto en las superficies de control como sobre los recubrimientos de HA-Ag. Además, se aprecia que, con el aumento del tiempo, las células presentan una morfología más extendida y un aumento en las adhesiones focales.

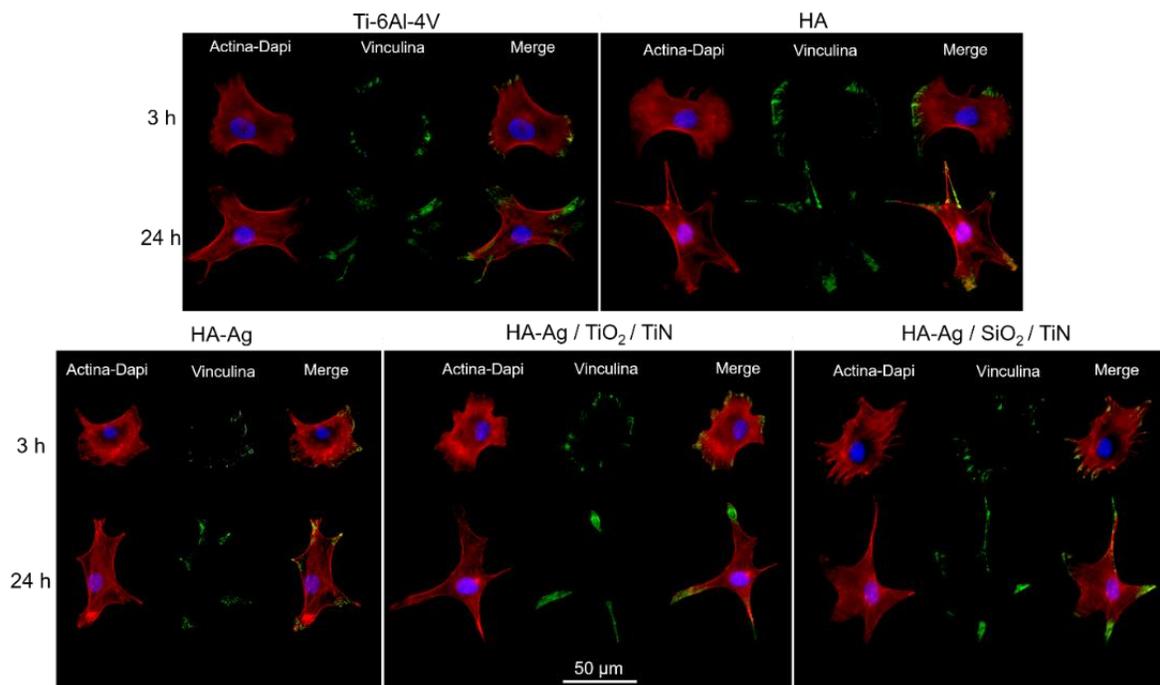


Figura 50. Imágenes de fluorescencia de mMSCs adheridas sobre la superficie de los diferentes recubrimientos desarrollados y del sustrato de Ti-6Al-4V a tiempos de 3 h y 24 h. Citoesqueleto (Actina) en color rojo; núcleo (Dapi) en color azul; adhesiones focales (Vinculina) en color verde.

Mediante el software de análisis de imagen (Image J), se realizó una máscara binaria de las células adheridas en cada sistema con el fin de cuantificar el área de expansión, la circularidad, área de adhesiones focales y número de adhesiones focales. En la Figura 51 se

presentan los resultados para el área de expansión y la circularidad de mMSCs en función del tiempo. En la Figura 51a se observa que el área de las células adheridas sobre el sustrato y el recubrimiento de HA libre de Ag, es mayor que el área media sobre la superficie del recubrimiento de referencia de HA-Ag y del sistema HA-Ag/TiO₂/TiN. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos controles y el recubrimiento de HA-Ag depositado sobre el SiO₂ para los dos tiempos de evaluación. Esto puede deberse a que la cantidad de Ag liberada de este último sistema fue menor en comparación con los otros dos recubrimientos que incorporan Ag.

Basado en estos resultados se observa que la Ag afecta levemente el crecimiento de mMSCs, disminuyendo en aproximadamente un 20 % su área de expansión en comparación con los controles de Ti-6Al-4V e HA libre de Ag, lo que está asociado al contacto directo entre las células y los iones Ag⁺ liberados. En cuanto a la circularidad de las células, mediante la Figura 51b se observa que a 3h no hay diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN y los controles utilizados. Sin embargo, el recubrimiento de referencia de HA-Ag si presenta diferencias con respecto al sustrato y al sistema de HA libre de Ag. Por otro lado, el gráfico permite apreciar una gran disminución (mayor a un 50 %), en la circularidad de mMSCs entre las 3 h y las 24 h de adhesión para todas las muestras evaluadas, lo que indica que el proceso de adhesión de las células mejoró con el tiempo de contacto entre éstas y las diferentes superficies, obteniendo células más extendidas y morfologías poco circulares.

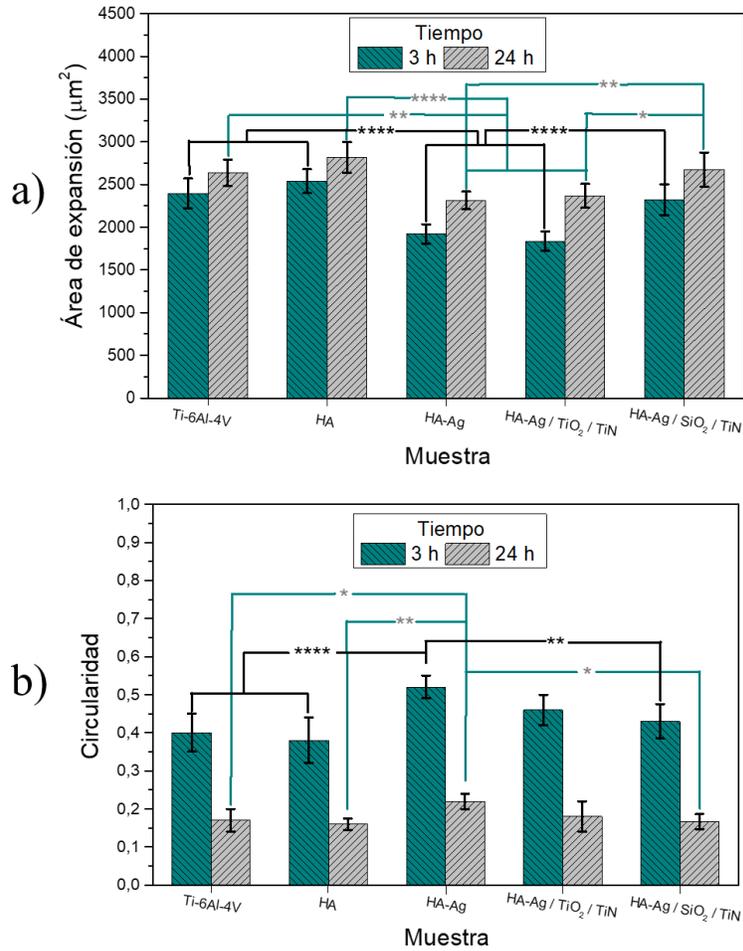


Figura 51. Área de expansión celular (a) y circularidad (b) de mMSCs adheridas sobre el sustrato y los recubrimientos desarrollados. Valores significativos como: **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$.

Los resultados obtenidos para los parámetros de área de adhesiones y su número son presentados en la Figura 52. Allí se observa, inicialmente, el área total de las adhesiones focales de cada sistema en función del tiempo de adhesión, que mostró un gran aumento con el incremento en el tiempo de 3 h a 24 h (Figura 52a). En comparación con los dos controles utilizados, las mayores diferencias fueron registradas nuevamente para el recubrimiento de referencia de HA-Ag, que presentó los valores más bajos para este parámetro; mientras que el mejor resultado fue evidenciado para el sistema multicapa compuesto de HA-Ag/SiO₂/TiN, indicando que allí fueron detectados los mayores niveles de la proteína

vinculina en las células sembradas. Este resultado está en conformidad a los resultados obtenidos previamente. Por último, se observó un comportamiento similar para el número de adhesiones focales, Figura 52b. La formación y establecimiento de estas adhesiones focales es un proceso muy importante para contribuir a la adhesión de mMSCs sobre la superficie de los biomateriales usados, allí se inicia un proceso de agrupación de integrinas y posteriormente, se generan enlaces estables entre las proteínas de la matriz extracelular y el citoesqueleto de la célula [138].

El análisis conjunto de los parámetros anteriormente presentados para las mMSCs indica que la adhesión de dichas células a la superficie de los materiales evaluados está influenciada principalmente por la presencia de Ag^+ , liberada mediante la infiltración de las capas de HA, lo que afecta en cierta medida el adecuado desarrollo del citoesqueleto y la adhesión de las células sobre los recubrimientos. Por esta razón, los valores registrados en los sistemas que incorporan dicho elemento presentaron leves diferencias respecto a los blancos usados. Por otro lado, características superficiales tales como la rugosidad, podría haber contribuido también a la respuesta de adhesión celular, dado que el mayor valor de RMS fue obtenido para el recubrimiento multicapa de HA-Ag/SiO₂/TiN, que obtuvo los mejores resultados durante la prueba biológica en comparación con el otro sistema multicapa depositado sobre el TiO₂/TiN y el recubrimiento de referencia de HA-Ag. Todo esto, sumado a la menor liberación de Ag que fue evidenciada en dicha muestra. De acuerdo a la literatura, las células tienden a ensancharse principalmente sobre superficies rugosas e hidrofílicas, obteniendo una mayor adhesión y distribución [139,140]. En el presente trabajo no se observó una clara tendencia en cuanto a la mojabilidad de los recubrimientos multicapa y la adhesión de mMSCs. Sin embargo, los valores registrados, que estuvieron entre 55° y 70°, son similares a los obtenidos por otros autores con buenos resultados en cuanto a adhesión y proliferación celular [141,142].

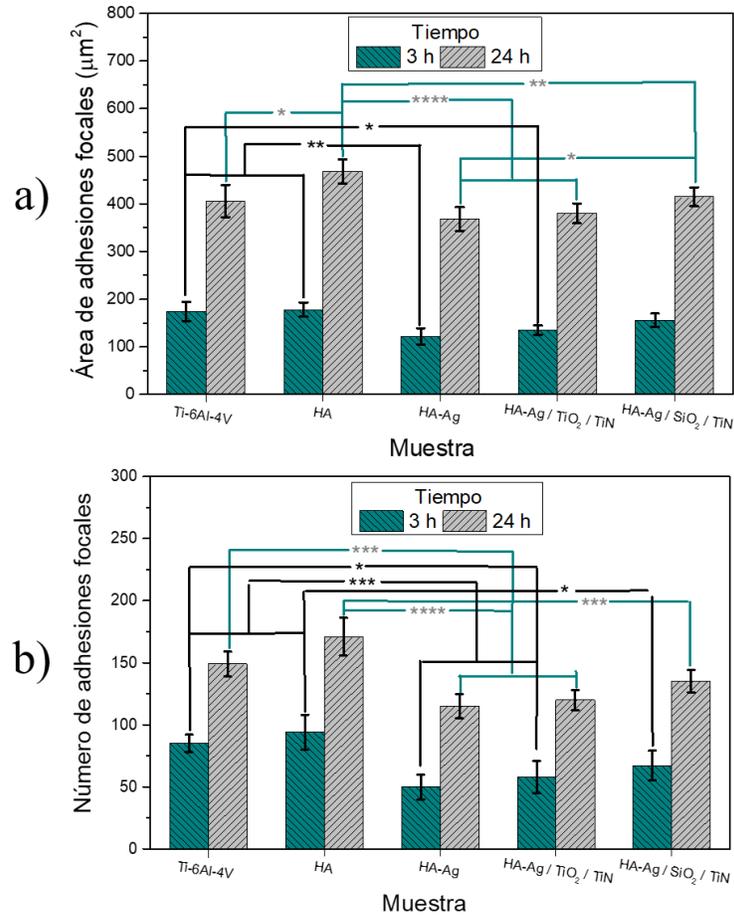


Figura 52. Área de adhesiones focales (a) y número de adhesiones focales (b) de mMSCs sobre el sustrato y los recubrimientos desarrollados. Valores significativos como: ****p < 0.0001, ***p < 0.001, *p < 0.1.

6.1.3.2.4. Diferenciación celular

La Figura 53 muestra los resultados del estudio de diferenciación celular realizado para las mMSCs cultivadas sobre la superficie del sustrato y los recubrimientos desarrollados, mediante el uso de osteopontina (OPN) como marcador de osteogénesis, el cual promueve el fenotipo osteoblástico y su expresión produce una proteína adhesiva secretada que es fundamental en la adhesión, migración y supervivencia celular. En la Figura 53a se observa tanto el núcleo de las células (en color azul), como también, la tinción generada por la OPN detectada en cada muestra (en color verde), que fue cuantificada y el resultado se presenta en la Figura 53b. Allí se observa que con relación al control de Ti-6Al-4V utilizado, el

recubrimiento de HA libre de Ag y el sistema multicapa de HA-Ag/SiO₂/TiN, no presentan diferencias estadísticamente significativas. En contraste, se evidenció una disminución en la expresión de OPN para los descubrimientos de HA-Ag e HA-Ag/TiO₂/TiN. Este comportamiento indica nuevamente que la función celular depende fuertemente de la presencia de Ag en la superficie de los recubrimientos. Por último, la Figura 53c, que muestra el número de células presentes sobre cada superficie después de los 15 días de evaluación, evidencia que la superficie de HA no sólo induce la diferenciación si no también la proliferación y viabilidad celular, encontrando una mayor cantidad de células allí, en comparación con el control de Ti-6Al-4V. En cuanto a los recubrimientos que incorporan Ag, se observa una reducción cercana al 30 % en la cantidad de mMSC con respecto a la HA libre de Ag, lo que indica que, a largo plazo, la proliferación celular se ve afectada por la liberación prolongada de Ag a la superficie de los recubrimientos.

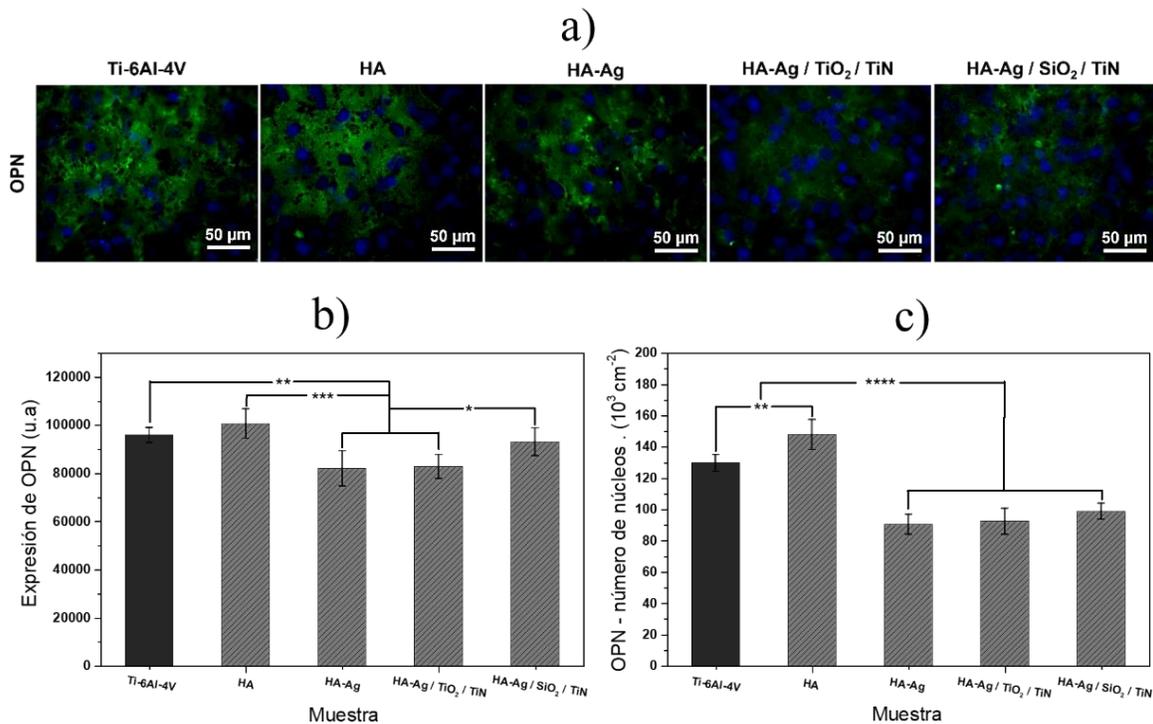


Figura 53. a) Imágenes de fluorescencia mostrando la diferenciación de mMSCs sobre el sustrato de Ti-6Al-4V y los recubrimientos desarrollados, OPN (verde) y núcleos (azul), b) número de núcleos y c) cuantificación de la expresión de OPN. Valores significativos como: **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$.

Para el segundo marcador utilizado, de Integrin binding sialoprotein (IBSP), los resultados de diferenciación celular se presentan en la Figura 54. Esta proteína se encuentra presente en la matriz ósea y se caracteriza por unirse a la HA del hueso, favoreciendo la mineralización temprana de las células. En la Figura 54a se observan los núcleos de mMSC (en color azul) y la tinción generada por la IBSP que fue detectada en cada muestra (color verde). Además, su expresión fue cuantificada y el resultado se observa en la Figura 54b. Para este caso, la HA libre de Ag no mostró diferencias estadísticamente significativas con el control de Ti-6Al-4V; mientras que leves diferencias fueron encontradas con el recubrimiento de HA-Ag/SiO₂/TiN, que obtuvo la mayor expresión de IBSP con relación a los otros sistemas que incorporan Ag. La Figura 54c muestra nuevamente una reducción en el número de núcleos de los sistemas con Ag en relación a los controles utilizados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio ante los dos marcadores evaluados, indican que las superficies de los recubrimientos inducen la diferenciación de mMSCs hacia células de hueso, observando buenos niveles de tinción para las dos proteínas de OPN e IBSP, después del cultivo realizado a lo largo de 15 días, en comparación con los controles de HA libre de Ag y el sustrato. Además, para este ensayo, al igual que en las pruebas de viabilidad y adhesión celular, se observa que la Ag no afecta en gran medida la respuesta celular de los recubrimientos, debido a que la cantidad de dicho elemento presente a nivel superficial y su velocidad de liberación no es muy alta.

Estudios de diferenciación celular en sistemas multicapa de HA-Ag no han sido aún reportados en la literatura. Sin embargo, la influencia de Ag en la diferenciación de algunos tipos celulares viene siendo estudiada durante los últimos años. C. Sengstock *et al.* [81] evaluaron el efecto de nano partículas de Ag (80 nm de diámetro) en la viabilidad y diferenciación de células mesenquimales humanas, encontrando efectos citotóxicos para concentraciones de nano partículas de Ag ≥ 20 mg/L y Ag⁺ ≥ 1.5 mg/L. Mientras que a bajas concentraciones, tanto de nano partículas de Ag ≤ 10 mg/L, como de Ag⁺ ≤ 1 mg/L, no se observó citotoxicidad. Sin embargo, para estos valores subtóxicos, la capacidad de diferenciación osteogénica disminuye con el aumento en la concentración de nano partículas de Ag, obteniendo reducciones cercanas al 50 %, 72 % y 82 %, respecto al control sin Ag, para concentraciones 10 mg/L, 5 mg/L y 2.5 mg/L, respectivamente. Este efecto inhibitorio

fue confirmado por la disminución en la secreción de biomarcadores específicos como la adiponectina y osteocalcina, que podría estar relacionado con una reducción en la actividad mitocondrial y en la formación de lípidos [143]. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas respecto al control, para concentraciones de Ag^+ entre 1 mg/L y 0.25 mg/L. En otro estudio, A.M. Echavarría *et al.* [89], reportan una disminución en la expresión del marcador de diferenciación celular de OPN, en recubrimientos TaN dopados con nano partículas de Ag. El efecto fue encontrado a medida que aumentó la cantidad de Ag a nivel superficial. Las nano partículas de Ag ejercen múltiples efectos sobre la fisiología celular y la transducción de señales, lo que puede inducir a alteraciones en la expresión génica.

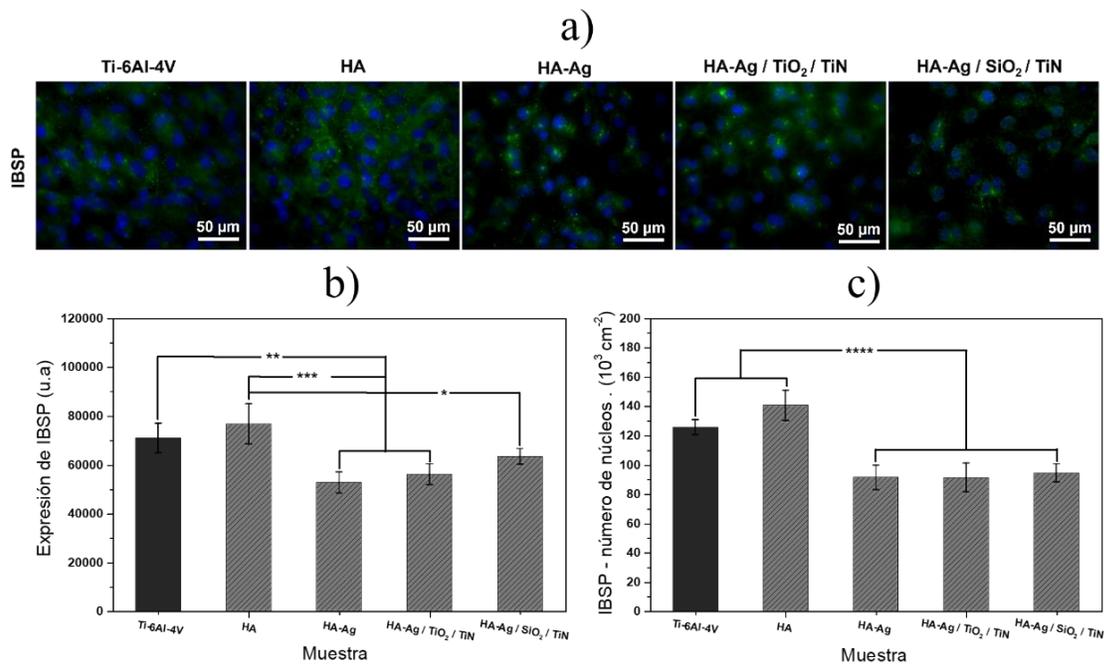


Figura 54. a) imágenes de fluorescencia mostrando la diferenciación de mMSCs sobre el sustrato de Ti-6Al-4V y los recubrimientos desarrollados, IBSP (verde) y núcleos (azul), b) número de núcleos y c) cuantificación de la expresión de IBSP. Valores significativos como: **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$.

6.1.3.3. Evaluación antibacterial *in vitro* de los recubrimientos

La respuesta antibacterial de los sistemas multicapa desarrollados y los controles respectivos, fue evaluada en términos de adhesión y viabilidad de la cepa *S. aureus* a tiempos de 1 h, 2 h y 4 h. A continuación, se presentan los resultados obtenidos:

6.1.3.3.1. Adhesión bacterial

En la Figura 55 se presentan los resultados del ensayo de adhesión de la cepa de *S. aureus* sobre la superficie del sustrato y de los recubrimientos desarrollados en función del tiempo. En la Figura 55a se observa que a 1 h de evaluación hay una disminución en la cantidad de bacterias adheridas sobre los recubrimientos en comparación con el control de Ti-6Al-4V. Además, se observan diferencias estadísticamente significativas entre el sistema multicapa de HA-Ag/TiO₂/TiN y el recubrimiento de HA libre de Ag, que son atribuidas principalmente a la presencia de este último elemento a nivel superficial en forma iónica, dado que dicho sistema presentó la más rápida velocidad de liberación de Ag para tiempos bajos de disolución, según la Figura 45.

Para el tiempo de 2 h (Figura 55b), el comportamiento se mantiene, obteniendo la mayor adhesión de bacterias sobre el control, seguido de los recubrimientos de HA libre de Ag e HA-Ag/SiO₂/TiN. Este último sistema, aunque incorpora Ag en su estructura, presentó la menor velocidad de liberación de dicho elemento para tiempos bajos de inmersión en medio biológico y la similitud en los resultados de adhesión de bacterias en comparación con el recubrimiento de HA libre de Ag, podría deberse más a características topográficas que a la química superficial, dado que dicho recubrimiento fue el que presentó la mayor rugosidad.

Por último, la Figura 55c presenta los resultados de adhesión a 4 h. Allí se observa, con respecto al control, una disminución cercana al 20 % en la adhesión de *S. aureus* sobre la superficie del recubrimiento de HA libre de Ag y el sistema multicapa de HA-Ag/SiO₂/TiN, mientras que la reducción fue mayor en los recubrimientos de HA-Ag e HA-Ag/TiO₂/TiN, con disminuciones aproximadas del 35 % y 40 %, respectivamente. La adhesión de microorganismos es un proceso complejo, relacionado con propiedades físico-químicas, tales como: la mojabilidad, rugosidad y química superficial [144]. Además, también depende de

la naturaleza de la cepa bacteriana [145]. En la literatura se ha reportado que, a partir de ciertas concentraciones de metales como Ag, Ni y Cu, se puede dar la inhibición al crecimiento y metabolismo bacteriano. Este proceso está asociado principalmente a dos mecanismos, que pueden actuar independientemente o en conjunto: i) el efecto bactericida, que es un proceso irreversible y letal; ii) el efecto bacteriostático, donde el crecimiento del microorganismo es inhibido, aunque este proceso es reversible [146].

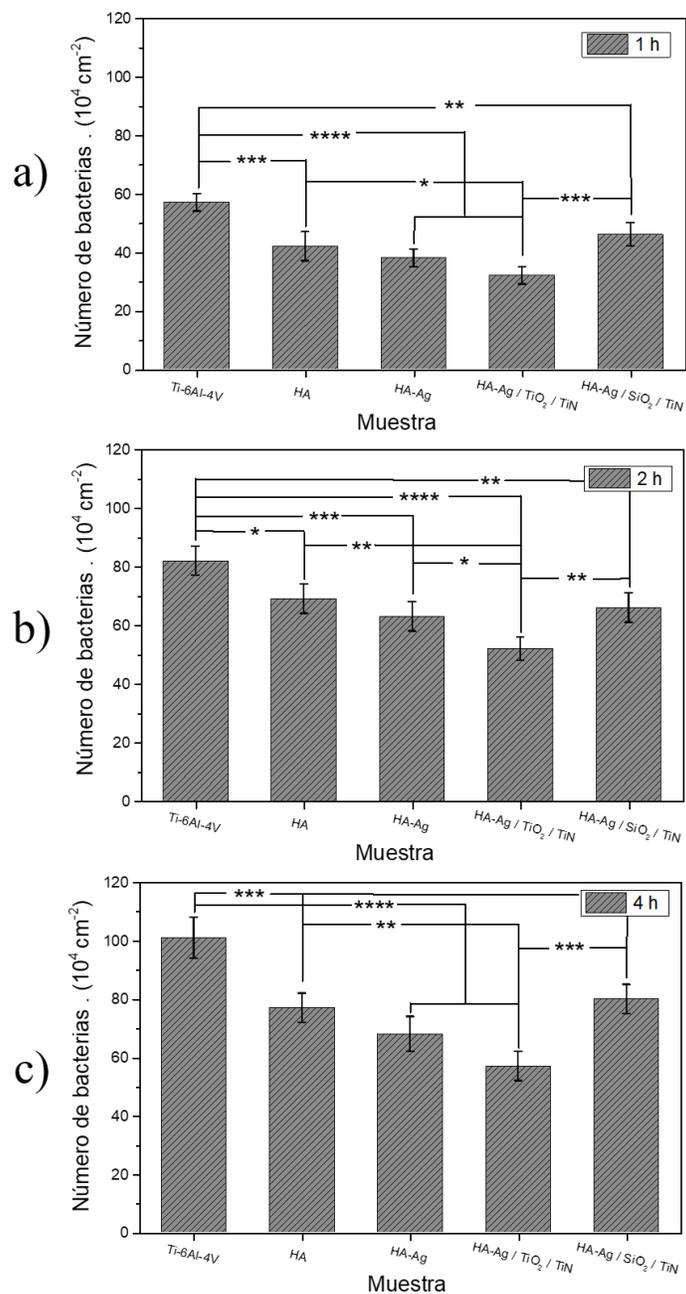


Figura 55. Adhesión de *S. aureus* sobre el sustrato y la superficie de los recubrimientos medida a diferentes tiempos: a) 1 h, b) 2 h y c) 4 h.

6.1.3.3.2. Viabilidad bacterial

La Figura 56 presenta los resultados del ensayo Live/Dead™ realizado para las bacterias adheridas a la superficie de los diferentes materiales evaluados. En la Figura 56a se observan en color verde fluorescente las bacterias que presentaban una membrana celular intacta al finalizar cada tiempo de evaluación. Mientras que, aquellas cuya membrana fue dañada durante el ensayo son apreciadas en color rojo fluorescente. Para el control de Ti-6Al-4V y el recubrimiento de HA, no se observan bacterias muertas durante el ensayo, esto se debe a que dichas superficies no poseen elementos bactericidas, por lo que las bacterias adheridas allí proliferan fácilmente.

Sobre los recubrimientos de HA-Ag e HA-Ag/TiO₂/TiN se observa una gran población de bacterias muertas desde la primera hora de contacto, que aumentó con el tiempo y para las 4 h no se aprecian bacterias vivas sobre la superficie de cada material. Finalmente, las imágenes del sistema multicapa de HA-Ag/SiO₂/TiN, evidencian un efecto bactericida mucho más lento en comparación con los otros dos sistemas que incorporan Ag, encontrando para 1 h de evaluación, una gran población de bacterias vivas, que disminuyó lentamente para las 2 h y 4 h de contacto. Este resultado indica que parte de las bacterias adheridas cuantificadas en la Figura 55 ya se encontraban muertas a diferencia del recubrimiento de HA libre de Ag, que presentó valores de adhesión similares, pero donde no hubo población de bacterias muertas.

La cuantificación de las bacterias vivas y muertas en cada sistema y tiempo de evaluación se presenta en la Figura 56b. Allí se corrobora que la superficie del control y el recubrimiento de HA libre de Ag no poseen efecto bactericida. Mientras que los sistemas que incorporan Ag en su estructura si presentaron este efecto, siendo mucho más evidente para los recubrimientos de HA-Ag e HA-Ag/TiO₂/TiN que presentaron una reducción cercana al 50 % de la población bacteriana a tan solo 1 h de contacto, alcanzando cerca de un 100 % de muerte a las 4 h. Por otro lado, el sistema de HA-Ag/SiO₂/TiN presentó un efecto bactericida más leve, siendo evidente desde las 2 h de contacto con cerca de un 30 % de muerte bacteriana, que aumentó hasta un 40 % para las 4 h de evaluación.

La acción bactericida de Ag incorporada en recubrimientos ha sido evaluada frente diferentes cepas bacterianas, obteniendo buenos resultados para concentraciones y velocidades de liberación mayores a las obtenidas en el presente estudio [39,147]. M.A. Ur Rehman *et al.* [148] reportan un efecto bactericida a 24 h de un recubrimiento de Ag-Si ante las cepas de *E. coli* y *S. carnosus*. K. Jamuna-thevi *et al.* [149] reportan un significativo efecto antibacterial en recubrimientos de Ag-TiO₂ medido a 24 h, con una reducción cercana al 99 % de la sepa *S. aureus*, que fue obtenida a una concentración máxima de 0.122 mg Ag/L.

El efecto bactericida de Ag ante la cepa *S. aureus* también ha sido encontrado por los autores de diferentes reportes [39,89,150]. Las propiedades antibacteriales de dicho elemento dependen tanto de sus dimensiones como de su forma; en la literatura ha sido encontrado que la alta relación superficie/volumen de nano partículas de Ag pueden desencadenar la liberación de Ag⁺ altamente reactivos. Estos iones pueden unirse al ADN y proteínas de las bacterias, afectando su división y replicación. Adicionalmente, las nano partículas de Ag causan la ruptura de la membrana celular, induciendo la formación de complejos irreversibles tales como el sulfhidrilo o histidilo, que afectan las enzimas respiratorias, causando la muerte bacterial [74,89]. Teniendo en cuenta esto, junto con los resultados obtenidos, se sugiere que la respuesta antibacterial observada podría ser interpretada de acuerdo con los mecanismos previamente descritos.

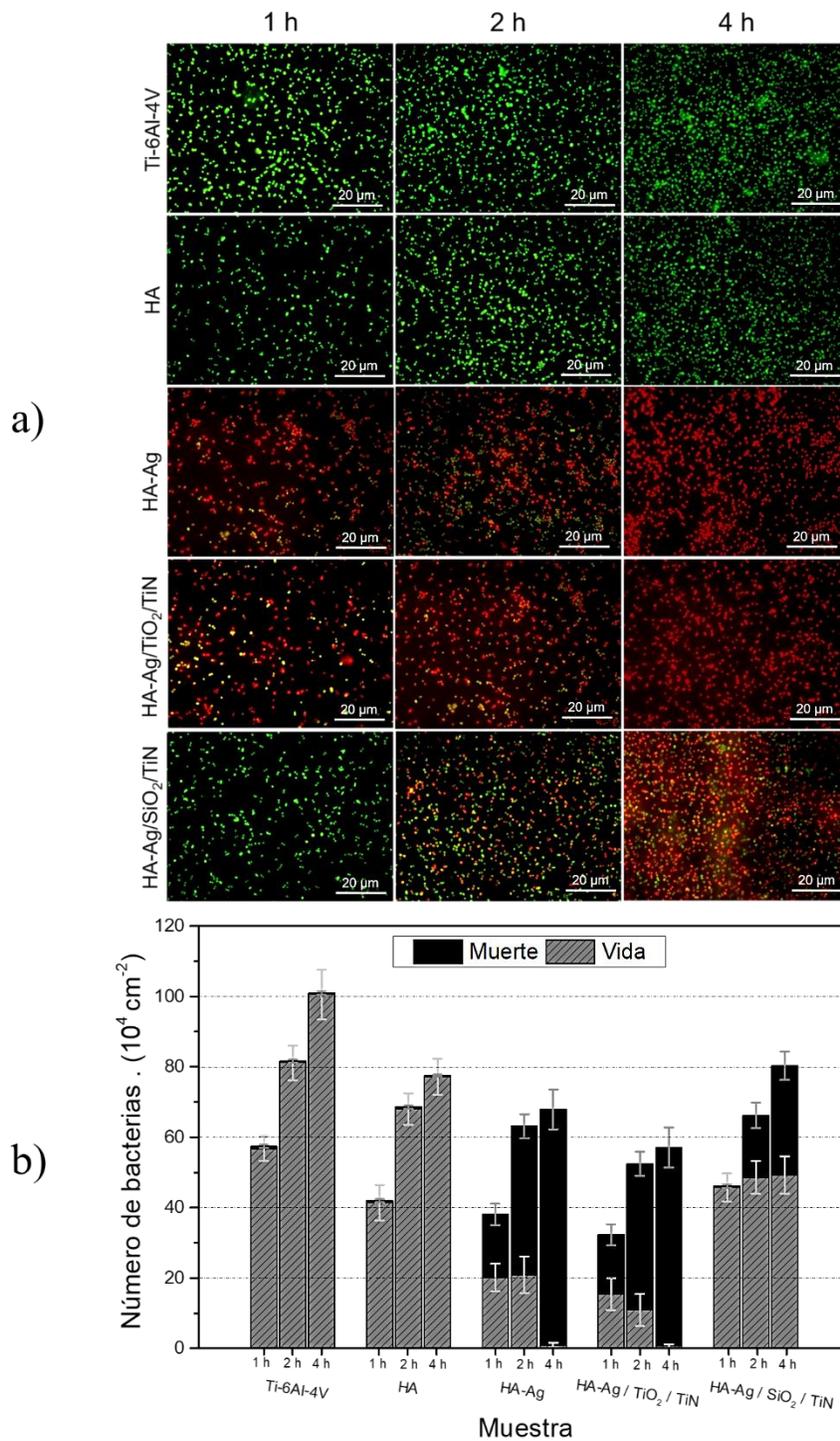


Figura 56. Resultados del ensayo Live/Dead realizado para las bacterias adheridas a la superficie del sustrato y los recubrimientos desarrollados: a) imágenes de fluorescencia de las *S. Aureus*, bacterias con una membrana comprometida consideradas muertas o moribundas están teñidas en rojo, mientras que las bacterias con una membrana intacta están teñidas en verde. b) viabilidad de las bacterias.

7. Discusión general

Durante el desarrollo inicial de la investigación, se observó claramente la influencia de los parámetros de proceso de distancia y temperatura de depósito sobre las propiedades y características superficiales de un recubrimiento de HA-Ag, que fue obtenido en un solo paso mediante la técnica de pulverización catódica magnetrón. El crecimiento de esta película sobre la aleación de Ti-6Al-4V involucra fenómenos físicos complejos. Sin embargo, se han establecido algunas hipótesis basadas en los resultados obtenidos durante la caracterización química y estructural del recubrimiento, por esta razón, en la Figura 57 se esquematiza el proceso pulverización y depósito de la HA y la influencia de que tienen ambos parámetros sobre ello:

I) La polarización de los sustratos con el voltaje Bias induce la repulsión preferencial del anión $(\text{PO}_4)^{3-}$, este efecto es potenciado al aumentar la distancia entre el blanco y el sustrato, dado que, la energía con que llegan los elementos eyectados hasta la superficie de la aleación de Ti disminuye, como consecuencia de un mayor número de colisiones inelásticas durante el trayecto. Esto genera un aumento en la relación estequiométrica Ca/P de los recubrimientos y una disminución en su espesor y cristalinidad.

II) A 200 °C se puede dar una excitación térmica en los elementos eyectados del blanco de HA, lo genera una mayor energía de llegada hasta la superficie del sustrato. Además, a esta temperatura el Ti-6Al-4V puede pasivarse, ocasionando una disminución en el efecto del voltaje Bias. Estos efectos inducen la formación de recubrimientos más cristalinos, densos y con mayor control en la relación Ca/P.

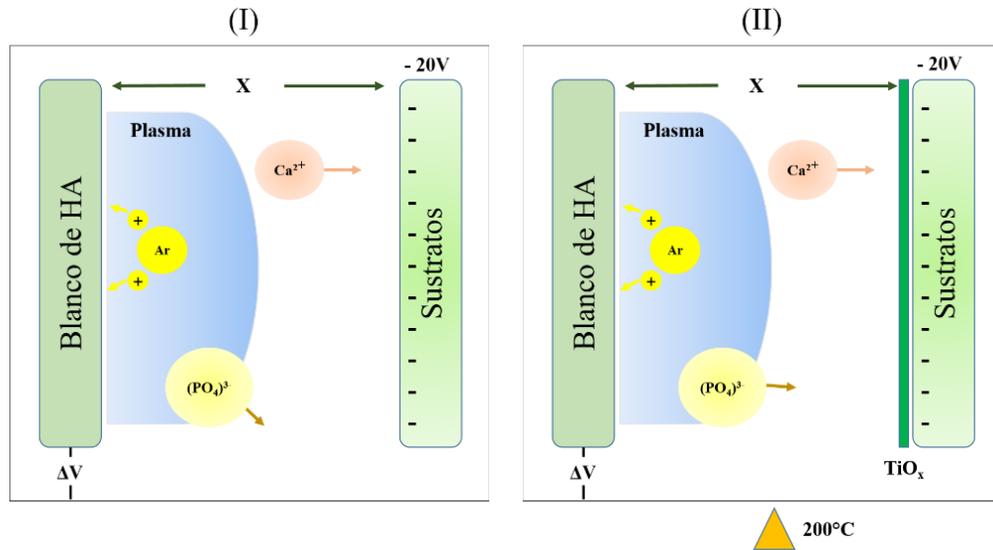


Figura 57. Esquematación del proceso de pulverización y depósito de la HA: I) efecto de la distancia y II) efecto de la temperatura.

Adicionalmente, con el aumento en la temperatura de depósito, se observó una alteración estructural en el recubrimiento de HA-Ag, que fue evidenciada mediante la vista en sección transversal de la película por FESEM. Allí se encontró un cambio de uniforme a irregular en las capas de Ag depositadas respectivamente a RT y 200 °C, ver la representación esquemática de la Figura 58. Este comportamiento está relacionado con la difusión de Ag hacia las capas adyacentes de HA, generada por efecto de la temperatura, pero que es interrumpida debido a la alta densidad de la HA.

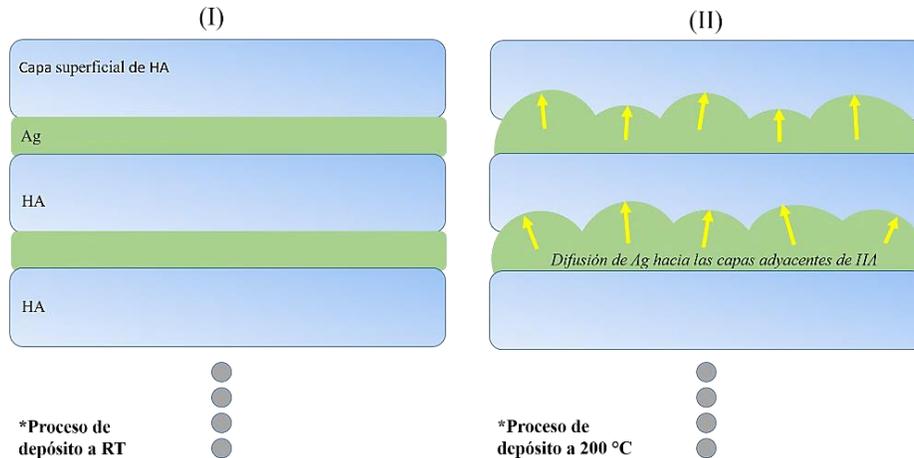


Figura 58. Representación esquemática de los recubrimientos de HA-Ag obtenidos a: I) RT y II) 200 °C.

El depósito del recubrimiento de HA-Ag sobre las bicapas de TiO_2/TiN y SiO_2/TiN fue realizado eficazmente y la arquitectura obtenida, que fue observada mediante técnicas microscópicas, presentó gran correlación con los diseños realizados previo al proceso de depósito de cada sistema. La caracterización de estos recubrimientos multicapa evidenció cambios en las propiedades generales de la película de HA-Ag como función del tipo de superficie donde fue depositada. Esto se debe a que el crecimiento de recubrimientos por pulverización catódica magnetrón está influenciado por la morfología y estructura del sustrato o capa de soporte. Adicionalmente, la atracción electrostática generada por el Ti-6Al-4V es modificada mediante la formación de capas cerámicas aislantes de nitruro y óxido sobre él, lo que altera principalmente la composición química del recubrimiento.

En cuanto a las propiedades mecánicas, se observó que la incorporación de capas intermedias de Ag en la estructura de la HA, disminuye ampliamente su dureza y módulo de elasticidad. Además, la evaluación de éstas propiedades en los sistemas multicapa de HA-Ag/ TiO_2/TiN e HA-Ag/ SiO_2/TiN , indicó que el mayor efecto tanto en H como en E, está asociado con las propiedades mecánicas de la capa de HA-Ag y en menor medida, a la influencia de las bicapas intermedias usadas. Por otro lado, tanto el TiO_2/TiN como el SiO_2/TiN indujeron aumentos considerables en la adhesión de la HA-Ag al sustrato de Ti-6Al-4V, siendo mayor para esta última bicapa. Estos resultados están relacionados con la formación de interfaces

fuerentes entre el sustrato y las capas intermedias, así como entre estas últimas y la HA, que fueron generadas mediante la difusión de elementos por afinidad química.

Durante el ensayo de inmersión del sistema de referencia de HA-Ag en solución de PBS, se observó una disolución lenta del recubrimiento, evidenciada a nivel superficial mediante la pérdida progresiva en la morfología granular hacia superficies más suaves. Por otro lado, la vista en sección transversal evidenció una infiltración de líquido en la estructura del recubrimiento, encontrando algunos poros en las capas internas de HA. Además, se encontraron discontinuidades en las capas de Ag, lo cual estaría asociado a la liberación de Ag^+ de las capas de Ag^0 por contacto con el fluido biológico infiltrado, ver ilustración de la Figura 59.

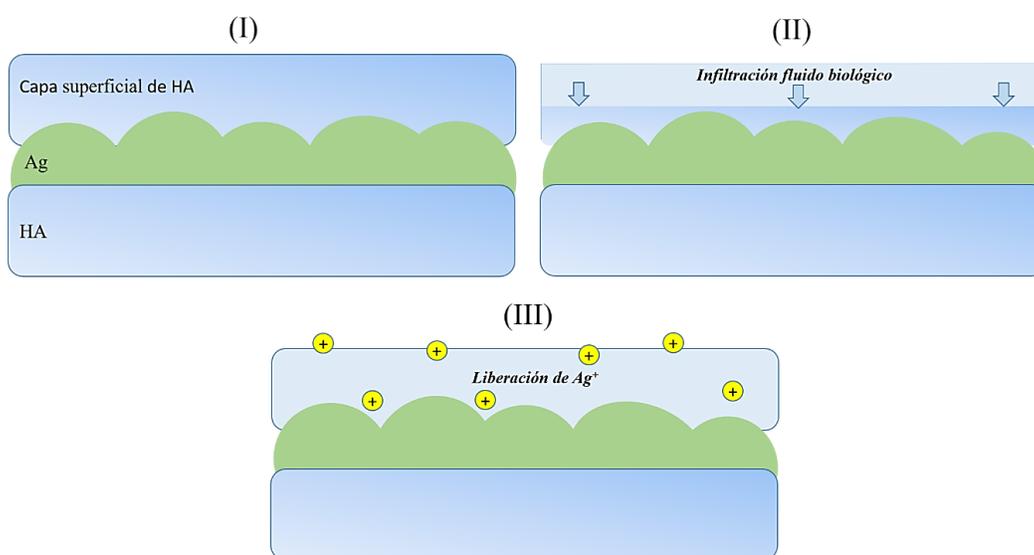


Figura 59. Representación esquemática del proceso de infiltración de HA-Ag con PBS y liberación de Ag^+ .

La respuesta biológica *in vitro* de los recubrimientos estuvo bastante influenciada por el efecto de la liberación de Ag^+ al medio; en cuanto a los ensayos celulares, se observó que el recubrimiento de mayor cristalinidad (HA-Ag/ SiO_2 / TiN), presentó la menor afectación con respecto a los controles usados sin Ag. Esto indica claramente que la infiltración y disolución de la HA en este caso es menor y por ello, la liberación de iones Ag^+ se reduce en

comparación con los otros dos sistemas evaluados; mediante el ensayo antibacterial se confirma esta hipótesis, ya que en este sistema hubo un menor efecto antibacterial con respecto al recubrimiento de HA-Ag e HA-Ag/TiO₂/TiN. El mecanismo bactericida de los iones Ag⁺ se presenta de manera esquemática en la Figura 60. De acuerdo a la literatura, las nanopartículas de Ag por su elevada área superficial tienen a liberar grandes cantidades de Ag⁺, que son altamente reactivos y pueden romper la pared celular. Además, interactúan con las enzimas respiratorias, generando especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), los radicales OH[•] y O₂^{•-}, que inducen estrés oxidativo y daño a las proteínas y ácidos nucleicos [151,152]. El efecto bactericida obtenido sobre la cepa *S. aureus* (gram positiva), de membrana celular gruesa, podría ser potenciado en cepas gram negativas, debido a que éstas poseen una pared celular más delgada, lo que facilitaría la permeabilización de los iones Ag⁺.

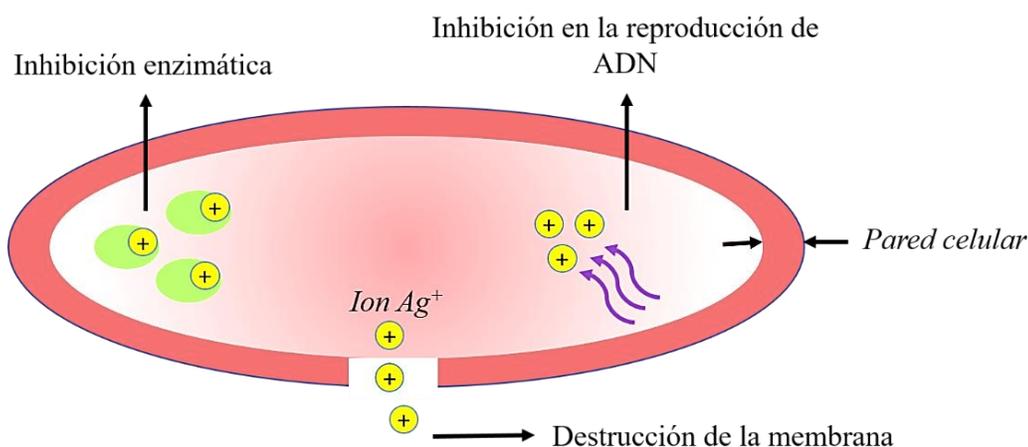


Figura 60. Representación esquemática del mecanismo bactericida de los iones Ag⁺, adaptado de [153].

Los resultados obtenidos indican que los recubrimientos desarrollados tienen potencial aplicación en implantes quirúrgicos, dado que mostraron buena biocompatibilidad y propiedades antibacteriales. Además, se observa que el uso de éstos, puede abarcar un amplio rango de aplicaciones en dicho campo, que van desde altos requerimientos bactericidas,

logrados por ejemplo con los sistemas HA-Ag e HA-Ag/TiO₂/TiN y sin afectar en gran medida la viabilidad, adhesión y diferenciación celular, hasta requerimientos bactericidas menores con buena respuesta celular, que pueden ser obtenidos con el recubrimiento de HA-Ag/SiO₂/TiN.

8. Conclusiones

La modificación en los parámetros de proceso de distancia blanco-sustrato y temperatura de depósito, permitió obtener un recubrimiento multicapa de HA-Ag con aproximadamente 530 nm de espesor y un gran control composicional (relación Ca/P de 1.66 y un 4.5 % atómico de Ag); la formación de la fase HA fue confirmada mediante difracción de rayos X y espectroscopía micro-Raman, donde se observaron respectivamente, picos y vibraciones características de dicho compuesto.

Se obtuvieron recubrimientos de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN con arquitectura multicapa sobre Ti-6Al-4V. Allí, se encontró un leve efecto de las bicapas sobre la composición química de la HA-Ag, generando variaciones en la relación Ca/P entre 1.72 y 1.76. Además, la cristalinidad del recubrimiento de HA-Ag, fue disminuida con la incorporación del TiO₂/TiN y mejorada con el SiO₂/TiN. En cuanto a las propiedades mecánicas, los recubrimientos de HA-Ag e HA-Ag/TiO₂/TiN presentaron valores aproximados de H= 6.3 GPa y E=122 GPa. Mientras que una disminución cercana al 19 % en H y 12 % en E, fue registrada para el sistema de HA-Ag/SiO₂/TiN. Por último, el uso de las bicapas de TiO₂/TiN y SiO₂/TiN disminuyó en aproximadamente un 35 % los esfuerzos residuales del recubrimiento de HA-Ag, mejorando su adherencia al sustrato en un 46 % y 84 %, respectivamente.

Se plantea como posible mecanismo de liberación de Ag al medio, la formación de iones Ag⁺ como producto de la infiltración del fluido biológico en las capas de HA; los resultados indican que este proceso depende en gran medida de la cristalinidad de la HA. En cuanto a la respuesta biológica, los recubrimientos desarrollados presentaron buenos resultados en términos de viabilidad, adhesión y diferenciación de mMSCs. Además, se obtuvo un efecto bactericida a bajas concentraciones de Ag (<0.1 mg/L) sobre la cepa *S. aureus*. Lo anterior indica la obtención de un balance ampliamente deseado en superficies de potencial aplicación en el campo biomédico, especialmente en prótesis tales como microplacas y tornillos de fijación.

9. Trabajo futuro

- Realizar mediciones de H y E en sección transversal para los recubrimientos multicapa, con el fin de conocer las propiedades mecánicas de cada una de las capas por separado.
- Realizar ensayos de disolución de HA-Ag/TiO₂/TiN e HA-Ag/SiO₂/TiN en medio de PBS.
- Realizar ensayos electroquímicos en los recubrimientos con el fin de conocer su resistencia a la corrosión.
- Escalar los recubrimientos multicapa desarrollados a implantes protésicos tales como tornillos y microplacas. Posteriormente, evaluar sus propiedades mecánicas y respuesta biológica en un modelo animal mediante ensayos *in vivo*.

Referencias

- [1] Z. Li, K. Aik Khor, Preparation and Properties of Coatings and Thin Films on Metal Implants, in: R.B.T.-E. of B.E. Narayan (Ed.), *Encycl. Biomed. Eng.*, Elsevier, Oxford, 2019: pp. 203–212. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11025-6>.
- [2] H. Chouirfa, H. Bouloussa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications, *Acta Biomater.* 83 (2019) 37–54. doi:[10.1016/j.actbio.2018.10.036](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.036).
- [3] J.J. Contreras, M. Sepúlveda, The molecular basis of infections associated to orthopedic implants., *Rev. Chil. Infectología Órgano Of. La Soc. Chil. Infectología.* 31 (2014) 309–22. doi:[10.4067/S0716-10182014000300010](https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000300010).
- [4] Y. Oshida, 11 - Surface Modifications, in: Y.B.T.-B. and B. of T.M. (Second E. Oshida (Ed.), *Biosci. Bioeng. Titan. Mater.*, Elsevier, Oxford, 2013: pp. 341–456. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62625-7.00011-X>.
- [5] H. Melero, J. Fernández, J.M. Guilemany, Recubrimientos bioactivos: Hidroxiapatita y titania, *Biomecánica.* 19 (2011) 35–48. <http://hdl.handle.net/2099/12325>.
- [6] K. Ozeki, T. Yuhta, Y. Fukui, H. Aoki, Phase composition of sputtered films from a hydroxyapatite target, *Surf. Coat. Technol.* 160 (2002) 54–61.
- [7] A. Echavarría, Una perspectiva de los biomateriales vista desde un diseño específico: la prótesis total de cadera, *Rev. Fac. Ing.* 30 (2003) 95–108.
- [8] V. Nelea, C. Morosanu, M. Iliescu, I.N. Mihailescu, Microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite thin films grown by RF magnetron sputtering, *Surf. Coatings Technol.* 173 (2003) 315–322. doi:[10.1016/S0257-8972\(03\)00729-1](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(03)00729-1).
- [9] E. Mohseni, E. Zalnezhad, A.R. Bushroa, A.M. Hamouda, B.T. Goh, G.H. Yoon, Ti/TiN/HA Coating on Ti-6Al-4V for Biomedical Applications, *Ceram. Int.* 41 (2015) 14447–14457. doi:[10.1016/j.ceramint.2015.07.081](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.07.081).
- [10] C.S. Ciobanu, S.L. Iconaru, P. Le Coustumer, L.V. Constantin, D. Predoi, Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria, *Nanoscale Res. Lett.* 7 (2012) 1–9.
- [11] G.A. Fielding, M. Roy, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Antibacterial and biological

characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings, *Acta Biomater.* 8 (2012) 3144–3152. doi:10.1016/j.actbio.2012.04.004.

- [12] W. Chen, Y. Liu, H.S. Courtney, M. Bettenga, C.M. Agrawal, J.D. Bumgardner, J.L. Ong, In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating., *Biomaterials.* 27 (2006) 5512–7. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.07.003.
- [13] E. Mohseni, E. Zalnezhad, a. R. Bushroa, Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant: A review paper, *Int. J. Adhes. Adhes.* 48 (2014) 238–257. doi:10.1016/j.ijadhadh.2013.09.030.
- [14] A. Sargeant, T. Goswami, Hip implants – Paper VI – Ion concentrations, *Mater. Des.* 28 (2007) 155–171. doi:https://doi.org/10.1016/j.matdes.2005.05.018.
- [15] J. Qi, Y. Yang, M. Zhou, Z. Chen, K. Chen, Effect of transition layer on the performance of hydroxyapatite / titanium nitride coating developed on Ti-6Al-4V alloy by magnetron sputtering, *Ceram. Int.* 45 (2019) 4863–4869. doi:10.1016/j.ceramint.2018.11.183.
- [16] S. Ghasemi, A. Shanaghi, P.K. Chu, Nano mechanical and wear properties of multi-layer Ti/TiN coatings deposited on Al 7075 by high-vacuum magnetron sputtering, *Thin Solid Films.* 638 (2017) 96–104. doi:10.1016/j.tsf.2017.07.049.
- [17] R. Agarwal, A.J. García, Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 94 (2015) 53–62. doi:10.1016/j.addr.2009.11.009.
- [18] H. Melero, J. Fernández, S. Dosta, J.M. Guilemany, Caracterización de nuevos recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad, *Cerámica y Vidr.* 50.2 (2011) 59–64.
- [19] P.I. Branemark, B.O. Hansson, R. Adell, U. Breine, J. Lindstrom, O. Hallen, A. Ohman, Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period., *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.* 16 (1977) 1–132.
- [20] W. Cao, L.L. Hench, Bioactive materials, *Ceram. Int.* 22 (1996) 493–507. doi:https://doi.org/10.1016/0272-8842(95)00126-3.
- [21] R.B.H.D.L. Heimann, *Bioceramic Coatings for Medical implants*, Wiley-VCH, 2013. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

- [22] J. Gallo, K. Langova, V. Havranek, I. Cechova, Poor survival of ABG I hip prosthesis in younger patients., *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 152 (2008) 163–168. doi:10.5507/bp.2008.027.
- [23] S.R. Paital, N.B. Dahotre, Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies, *Mater. Sci. Eng. R Reports.* 66 (2009) 1–70. doi:10.1016/j.mser.2009.05.001.
- [24] S. Best, A.E. Porter, E.S. Thian, J. Huang, Bioceramics: Past, Present and for the Future, *J. Eur. Ceram. Soc.* 28 (2008) 1319–1327. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001.
- [25] M. Vallet-Regí, J. Gonzalez-Calbet, Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues, *Prog. Solid State Chem.* 32 (2004) 1–31. doi:10.1016/j.progsolidstchem.2004.07.001.
- [26] S. Koutsopoulos, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals : A review study on the analytical methods, *J Biomed Mater Res.* (2002) 31–34. doi:10.1002/jbm.10280.
- [27] a. R. Boyd, C. O’Kane, B.J. Meenan, Control of calcium phosphate thin film stoichiometry using multi-target sputter deposition, *Surf. Coatings Technol.* 233 (2013) 131–139. doi:10.1016/j.surfcoat.2013.04.017.
- [28] J.A. Arévalo Romero, V.M. Pardo, D.M. Paéz Guerrero, Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas., *Nova.* 5 (2007) 177. doi:10.22490/24629448.387.
- [29] A.M.S. Warren C. Young, Richard G. Budynas, *Roark’s Formulas for Stress and Strain*, in: Eighth Edi, The McGraw-Hill Companies, Inc., 2012.
- [30] A. Aghbali, F. Moradi Abbasabadi, A. Delazar, S. Vosough Hosseini, F. Zare Shahneh, B. Baradaran, M. Janani, Induction of Apoptosis and Cytotoxic Activities of Iranian Orthodox Black Tea Extract (BTE) Using in vitro Models, *Adv. Pharm. Bull.* 4 (2014) 255–260. doi:10.5681/apb.2014.037.
- [31] G. Thrivikraman, G. Madras, B. Basu, In vitro/In vivo assessment and mechanisms of toxicity of bioceramic materials and its wear particulates, *RSC Adv.* 4 (2014) 12763. doi:10.1039/c3ra44483j.
- [32] P. Gómez Cardero, E.C. Rodríguez Merchán, Infección prótesis de rodilla, in: E.C. Rodríguez Merchán (Ed.), *Prótesis Articulares Nuevas Perspect.*, Panamericana, Madrid, 2006: pp. 184–190.

- [33] I. Noda, F. Miyaji, Y. Ando, H. Miyamoto, T. Shimazaki, Y. Yonekura, M. Miyazaki, M. Mawatari, T. Hotokebuchi, Next Generation Antibacterial Hydroxyapatite Coating: Antibacterial Activity of Ag Ions in Serum, *Bioceram. Dev. Appl.* 1 (2010) 1–3. doi:10.4303/bda/D101102.
- [34] M.T.H. Mendoza, El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia, *NOVA.* 2 (2004) 1–108.
- [35] T. Lamagni, S. Elgohari, P. Harrington, Trends in surgical site infections following orthopaedic surgery, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 28 (2015) 125–132. doi:10.1097/QCO.000000000000143.
- [36] D.O.M.D. FRANKLIN L, Staphylococcus Aureus Infections, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 520–532.
- [37] Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 662–668. doi:10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3.
- [38] P. Lalueza, M. Monzón, M. Arruebo, J. Santamaría, Bactericidal effects of different silver-containing materials, *Mater. Res. Bull.* 46 (2011) 2070–2076. doi:10.1016/j.materresbull.2011.06.041.
- [39] A. Peetsch, C. Greulich, D. Braun, C. Stroetges, H. Rehage, B. Siebers, M. Köller, M. Epple, Silver-doped calcium phosphate nanoparticles: Synthesis, characterization, and toxic effects toward mammalian and prokaryotic cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 102 (2013) 724–729. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.09.040.
- [40] A.A. Yanovska, A.S. Stanislavov, L.B. Sukhodub, V.N. Kuznetsov, V.Y. Iliashenko, S.N. Danilchenko, L.F. Sukhodub, Silver-doped hydroxyapatite coatings formed on Ti-6Al-4V substrates and their characterization, *Mater. Sci. Eng. C.* 36 (2014) 215–220. doi:10.1016/j.msec.2013.12.011.
- [41] S. Bose, H. Beyenal, A. Bandyopadhyay, L.G. Zirkle, Antimicrobial particulate silver coatings on stainless steel implants for fracture management, *Mater. Sci. Eng. C.* 32 (2012) 1112–1120. doi:10.1016/j.msec.2012.02.020.
- [42] A. Rockett, *Semiconductor Manufacturing Handbook: Physical Vapor Deposition*, Access

Eng. (2005) 505–572. doi:10.1007/978-0-387-68650-9_11.

- [43] D.M. Mattox, *Physical Sputtering and Sputter Deposition (Sputtering)*, 2010. doi:10.1016/B978-0-8155-2037-5.00007-1.
- [44] H. Geng, *PHYSICAL VAPOR DEPOSITION*, *Semicond. Manuf. Handb.* (2005). http://accessengineeringlibrary.com/browse/semiconductor-manufacturing-handbook/p2000ccd499713_1001.
- [45] J.M. Albella, *Láminas delgadas y recubrimientos - Preparación, propiedades y aplicaciones*, *Cons. Super. Investig. Científicas.* 1 (2003).
- [46] Y. Yan, X. Zhang, Y. Huang, Q. Ding, X. Pang, Antibacterial and bioactivity of silver substituted hydroxyapatite/TiO₂ nanotube composite coatings on titanium, *Appl. Surf. Sci.* 314 (2014) 348–357. doi:10.1016/j.apsusc.2014.07.027.
- [47] Ž. Radovanović, B. Jokić, D. Veljović, S. Dimitrijević, V. Kojić, R. Petrović, D. Janačković, Antimicrobial activity and biocompatibility of Ag⁺ and Cu²⁺ doped biphasic hydroxyapatite/ α -tri hydroxyapatitecalcium phosphate obtained from hydrothermally synthesized Ag⁺ and Cu²⁺ doped hydroxyapatite, *Appl. Surf. Sci.* 307 (2014) 513–519. doi:10.1016/j.apsusc.2014.04.066.
- [48] K. Lee, Y.H. Jeong, W.A. Brantley, H.C. Choe, Surface characteristics of hydroxyapatite films deposited on anodized titanium by an electrochemical method, *Thin Solid Films.* 546 (2013) 185–188. doi:10.1016/j.tsf.2013.04.077.
- [49] A.R. Boyd, H. Duffy, R. Mccann, M.L. Cairns, B.J. Meenan, The Influence of argon gas pressure on co-sputtered calcium phosphate thin films, *Beam Interact. with Mater. Atoms.* 258 (2007) 421–428. doi:10.1016/j.nimb.2007.02.072.
- [50] A.R. Boyd, L. Rutledge, L.D. Randolph, B.J. Meenan, Strontium-substituted hydroxyapatite coatings deposited via a co-deposition sputter technique, *Mater. Sci. Eng. C.* 46 (2015) 290–300. doi:10.1016/j.msec.2014.10.046.
- [51] K. De Groot, R. Geesink, C. Klein, P. Serekian, Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite., *J. Biomed. Mater. Res.* 21 (1987) 1375–81. doi:10.1002/jbm.820211203.
- [52] S. Inthong, T. Tunkasiri, S. Eitssayeam, K. Pengpat, G. Rujijanagul, Physical properties and bioactivity of nanocrystalline hydroxyapatite synthesized by a co-precipitation route, *Ceram. Int.* 39 (2013) S533–S536. doi:10.1016/j.ceramint.2012.10.129.

- [53] R. Palanivelu, S. Kalainathan, A. Ruban Kumar, Characterization studies on plasma sprayed (AT/HA) bi-layered nano ceramics coating on biomedical commercially pure titanium dental implant, *Ceram. Int.* 40 (2014) 7745–7751. doi:10.1016/j.ceramint.2013.12.116.
- [54] M.A. Surmeneva, A.A. Sharonova, S. Chernousova, O. Prymak, K. Loza, M.S. Tkachev, I.A. Shulepov, M. Epple, R.A. Surmenev, Incorporation of silver nanoparticles into magnetron-sputtered calcium phosphate layers on titanium as an antibacterial coating, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 156 (2017) 104–113.
- [55] A. Vladescu, I. Birlik, V. Braic, M. Toparli, E. Celik, F. Ak Azem, Enhancement of the mechanical properties of hydroxyapatite by SiC addition., *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 40 (2014) 362–368. doi:10.1016/j.jmbbm.2014.08.025.
- [56] M.A. Surmeneva, R.A. Surmenev, Y.A. Nikonova, I.I. Selezneva, A.A. Ivanova, V.I. Putlyaev, O. Prymak, M. Epple, Fabrication , ultra-structure characterization and in vitro studies of RF magnetron sputter deposited nano-hydroxyapatite thin films for biomedical applications, *Appl. Surf. Sci.* 317 (2014) 172–180. doi:10.1016/j.apsusc.2014.08.104.
- [57] M.A. Surmeneva, T.M. Mukhametkaliyev, H. Khakbaz, R.A. Surmenev, M.B. Kannan, Ultrathin film coating of hydroxyapatite (HA) on a magnesium – calcium alloy using RF magnetron sputtering for bioimplant applications, *Mater. Lett.* 152 (2015) 280–282.
- [58] T. Yamaguchi, Y. Tanaka, A. Ide-Ektessabi, Fabrication of hydroxyapatite thin films for biomedical applications using RF magnetron sputtering, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* 249 (2006) 723–725. doi:10.1016/j.nimb.2006.03.126.
- [59] K. de Groot, J.G. Wolke, J. a Jansen, Calcium phosphate coatings for medical implants., *Proc. Inst. Mech. Eng. H.* 212 (1998) 137–147. doi:10.1243/0954411981533917.
- [60] R.A. Surmenev, M.A. Surmeneva, K.E. Evdokimov, V.F. Pichugin, T. Peitsch, M. Epple, The influence of the deposition parameters on the properties of an rf-magnetron-deposited nanostructured calcium phosphate coating and a possible growth mechanism, *Surf. Coatings Technol.* 205 (2011) 3600–3606. doi:10.1016/j.surfcoat.2010.12.039.
- [61] V.F. Pichugin, R.A. Surmenev, E. V. Shesterikov, M.A. Ryabtseva, E. V. Eshenko, S.I. Tverdokhlebov, O. Prymak, M. Epple, The preparation of calcium phosphate coatings on titanium and nickel-titanium by rf-magnetron-sputtered deposition: Composition, structure and micromechanical properties, *Surf. Coatings Technol.* 202 (2008) 3913–3920.

doi:10.1016/j.surfcoat.2008.01.038.

- [62] A. Villani, A. Millán, G. González, Caracterización físico-química y cerámica de hidroxiapatitas producidas por distintos métodos de síntesis: Parte II: Efectos del tratamiento térmico TT - Physico-chemical and ceramic characterization of Hydroxyapatite obtained by different synthesis meth, *Rev. La Fac. Ing. Univ. Cent. Venez.* 30 (2015) 201–210. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-40652015000100020&lang=pt.
- [63] Y. Yang, J.D. Bumgardner, R. Cavin, D.L. Carnes, J.. Ong, Osteoblast Precursor Cell Attachment on Heat-treated Calcium Phosphate Coatings, *J. Dent. Res.* 82 (2003) 449–453. doi:10.1177/154405910308200609.
- [64] K. Vandijk, H. Schaeken, J. Wolke, J. Jansen, Influence of annealing temperature on RF magnetron sputtered calcium phosphate coatings, *Biomaterials.* 17 (1996) 405–410. doi:10.1016/0142-9612(96)89656-6.
- [65] K. Ozeki, T. Yuhta, H. Aoki, I. Nishimura, Y. Fukui, Crystal chemistry of hydroxyapatite deposited on titanium by sputtering technique, *Biomed. Mater. Eng.* 10 (2000) 221–227. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033635868&partnerID=40&md5=42941a64a2b4ad2e0216f526a350a0dd>.
- [66] A.Y. Fedotkin, A.I. Kozelskaya, S.I. Tverdokhlebov, Effect of working gas on the deposition rate of CaP coatings formed by radio frequency magnetron sputtering of a hydroxyapatite target, *J. Phys. Conf. Ser.* 1313 (2019) 012018. doi:10.1088/1742-6596/1313/1/012018.
- [67] A.A. Ivanova, M.A. Surmeneva, R.A. Surmenev, D. Depla, Influence of deposition conditions on the composition, texture and microstructure of RF-magnetron sputter-deposited hydroxyapatite thin films, *Thin Solid Films.* 591 (2015) 368–374. doi:10.1016/j.tsf.2015.03.058.
- [68] ASTM, Standard Specification for Composition of Hydroxylapatite for Surgical Implants 1, 03 (2016) 2014–2016. doi:10.1520/F1185-03R14.2.
- [69] ISO, INTERNATIONAL STANDARD: implants for surgery — Hydroxyapatite, 2008 (2008).
- [70] A.A. Ivanova, M.A. Surmeneva, I.Y. Grubova, A.A. Sharonova, V.F. Pichugin, M. V. Chaikina, V. Buck, O. Prymak, M. Epple, R.A. Surmenev, Influence of the substrate bias on

the stoichiometry and structure of RF-magnetron sputter-deposited silver-containing calcium phosphate coatings, *Materwiss. Werksttech.* 44 (2013) 218–225. doi:10.1002/mawe.201300101.

- [71] F.A. Azem, A. Kiss, I. Birlik, V. Braic, C. Luculescu, A. Vladescu, The corrosion and bioactivity behavior of SiC doped hydroxyapatite for dental applications, *Ceram. Int.* 40 (2014) 15881–15887. doi:10.1016/j.ceramint.2014.07.116.
- [72] E.S. Thian, J. Huang, S.M. Best, Z.H. Barber, W. Bonfield, Magnetron co-sputtered silicon-containing hydroxyapatite thin films - An in vitro study, *Biomaterials.* 26 (2005) 2947–2956. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.058.
- [73] I.Y. Grubova, M.A. Surmeneva, A.A. Ivanova, K. Kravchuk, O. Prymak, M. Epple, V. Buck, R.A. Surmenev, The effect of patterned titanium substrates on the properties of silver-doped hydroxyapatite coatings, *Surf. Coatings Technol.* 276 (2015) 595–601. doi:10.1016/j.surfcoat.2015.06.010.
- [74] S. Chernousova, M. Epple, Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52 (2013) 1636–1653. doi:10.1002/anie.201205923.
- [75] A. Vladescu, V. Pruna, S. Kulesza, V. Braic, I. Titorencu, M. Bramowicz, A. Gozdziejewska, A. Parau, C.M. Cotrut, I. Pana, M. Dinu, M. Braic, Influence of Ti, Zr or Nb carbide adhesion layers on the adhesion, corrosion resistance and cell proliferation of titania doped hydroxyapatite to the Ti6Al4V alloy substrate, utilizable for orthopaedic implants, *Ceram. Int.* 45 (2019) 1710–1723. doi:10.1016/j.ceramint.2018.10.053.
- [76] D.A. Hamdi, Z.T. Jiang, K. No, M.M. Rahman, P.C. Lee, L.N.T. Truc, J. Kim, M. Altarawneh, L. Thair, T.A.J. Jumaa, B.Z. Dlugogorski, Biocompatibility study of multi-layered hydroxyapatite coatings synthesized on Ti-6Al-4V alloys by RF magnetron sputtering for prosthetic-orthopaedic implant applications, *Appl. Surf. Sci.* 463 (2019) 292–299. doi:10.1016/j.apsusc.2018.08.157.
- [77] A. Araghi, M.J. Hadianfard, Fabrication and characterization of functionally graded hydroxyapatite/TiO₂ multilayer coating on Ti-6Al-4V titanium alloy for biomedical applications, *Ceram. Int.* 41 (2015) 12668–12679. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.06.098.
- [78] A.A. Ivanova, M.A. Surmeneva, A.I. Tyurin, T.S. Pirozhkova, I.A. Shuvarin, O. Prymak, M. Epple, M. V. Chaikina, R.A. Surmenev, Fabrication and physico-mechanical properties of thin

magnetron sputter deposited silver-containing hydroxyapatite films, *Appl. Surf. Sci.* 360 (2016) 929–935. doi:10.1016/j.apsusc.2015.11.087.

- [79] D.A.Y. Agyapong, H. Zeng, I. Acquah, Y. Liu, Structural and physical properties of magnetron co-sputtered silver containing hydroxyapatite coatings on titanium substrates, *Integr. Ferroelectr.* 163 (2015) 64–72. doi:10.1080/10584587.2015.1040334.
- [80] A.A. Ivanova, R.A. Surmenev, M.A. Surmeneva, T. Mukhametkaliyev, K. Loza, O. Prymak, M. Epple, Hybrid biocomposite with a tunable antibacterial activity and bioactivity based on RF magnetron sputter deposited coating and silver nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 329 (2015) 212–218. doi:10.1016/j.apsusc.2014.12.153.
- [81] C. Sengstock, J. Diendorf, M. Epple, T. a Schildhauer, M. Köller, Effect of silver nanoparticles on human mesenchymal stem cell differentiation., *Beilstein J. Nanotechnol.* 5 (2014) 2058–69. doi:10.3762/bjnano.5.214.
- [82] A. Quirama, A.M. Echavarría, J.M. Meza, J. Osorio, G. Bejarano G, Improvement of the mechanical behavior of the calcium phosphate coatings deposited onto Ti6Al4V alloy using an intermediate TiN/TiO₂ bilayer, *Vacuum.* 146 (2017) 22–30. doi:https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2017.09.024.
- [83] J.A. Lenis, F.M. Hurtado, M.A. Gómez, F.J. Bolívar, Effect of thermal treatment on structure , phase and mechanical properties of hydroxyapatite thin films grown by RF magnetron sputtering, *Thin Solid Films.* 669 (2019) 571–578. doi:10.1016/j.tsf.2018.11.045.
- [84] E. Contreras, Y. Galindez, M.A. Rodas, G. Bejarano, M.A. Gómez, CrVN/TiN nanoscale multilayer coatings deposited by DC unbalanced magnetron sputtering, *Surf. Coatings Technol.* 332 (2017) 214–222. doi:10.1016/j.surfcoat.2017.07.086.
- [85] M. Żenkiewicz, Methods for the Calculation of Surface Free Energy of Solids, *J. Achiev. Mater. Manuf. Eng.* 24 (2007) 137.
- [86] A.M. Sofronia, R. Baies, E.M. Anghel, C.A. Marinescu, S. Tanasescu, Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C.* 43 (2014) 153–163. doi:10.1016/j.msec.2014.07.023.
- [87] W.C. Oliver, G.M. Phar, An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments, *J. Mater. Res.* 7 (1992) 1564–1583. doi:DOI: 10.1557/JMR.1992.1564.

- [88] S. Shiri, P. Ashtijoo, A. Odeshi, Q. Yang, Evaluation of Stoney equation for determining the internal stress of DLC thin films using an optical profiler, *Surf. Coatings Technol.* 308 (2016) 98–100. doi:10.1016/J.SURFCOAT.2016.07.098.
- [89] A.M. Echavarría, P. Rico, J.L. Gómez Ribelles, M.A. Pacha-Olivenza, M.C. Fernández-Calderón, G. Bejarano-G, Development of a Ta/TaN/TaN_x(Ag)_y/Ta₂N nanocomposite coating system and bio-response study for biomedical applications, *Vacuum.* 145 (2017) 55–67. doi:10.1016/j.vacuum.2017.08.020.
- [90] B. Feddes, J.G.C. Wolke, J.A. Jansen, A.M. Vredenberg, Radio frequency magnetron sputtering deposition of calcium phosphate coatings: The effect of resputtering on the coating composition, *J. Appl. Phys.* 93 (2003) 9503–9507. doi:10.1063/1.1576894.
- [91] M.A. Surmeneva, A. Kovtun, A. Peetsch, S.N. Goroja, A.A. Sharonova, V.F. Pichugin, I.Y. Grubova, A.A. Ivanova, A.D. Teresov, N.N. Koval, V. Buck, A. Wittmar, M. Ulbricht, O. Prymak, M. Epple, R.A. Surmenev, Preparation of a silicate-containing hydroxyapatite-based coating by magnetron sputtering: Structure and osteoblast-like MG63 cells in vitro study, *RSC Adv.* 3 (2013) 11240–11246. doi:10.1039/c3ra40446c.
- [92] J.A. Lenis, L.J. Toro, F.J. Bolívar, Multi-layer bactericidal silver - calcium phosphate coatings obtained by RF magnetron sputtering, *Surf. Coat. Technol.* 367 (2019) 203–211. doi:10.1016/j.surfcoat.2019.03.038.
- [93] E. Champion, Sintering of calcium phosphate bioceramics, *Acta Biomater.* 9 (2013) 5855–5875. doi:10.1016/j.actbio.2012.11.029.
- [94] A. Antonakos, E. Liarokapis, T. Leventouri, Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites, *J. Biomed. Mater. Res.* 28 (2007) 3043–3054. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.02.028.
- [95] A. Michelot, S. Sarda, C. Audin, E. Deydier, E. Manoury, R. Poli, C. Rey, Spectroscopic characterisation of hydroxyapatite and nanocrystalline apatite with grafted aminopropyltriethoxysilane: nature of silane--surface interaction, *J. Mater. Sci.* 50 (2015) 5746–5757. doi:10.1007/s10853-015-9122-x.
- [96] R. Cuscó, F. Guitián, S. de Aza, L. Artús, S. de Aza, L. Artús, Differentiation between hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate by means of μ -Raman spectroscopy, *J. Eur. Ceram. Soc.* 18 (1998) 1301–1305. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2219(98)00057-0.
- [97] I. Grubova, T. Priamushko, E. Chudinova, M. Surmeneva, O. Korneva, M. Epple, O. Prymak,

- I. Shulepov, R. Surmenev, Formation and Characterization of Crystalline Hydroxyapatite Coating with the (002) Texture, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 116 (2016) 1–5. doi:10.1088/1757-899X/116/1/012016.
- [98] Y. Wang, X. Liu, T. Fan, Z. Tan, Z. Zhou, D. He, In vitro evaluation of hydroxyapatite coatings with (002) crystallographic texture deposited by micro-plasma spraying, *Mater. Sci. Eng. C* 75 (2017) 596–601. doi:10.1016/j.msec.2017.02.119.
- [99] J. Qi, Z. Chen, W. Han, D. He, Y. Yang, Q. Wang, Effect of deposition parameters and heat-treatment on the microstructure, mechanical and electrochemical properties of hydroxyapatite/titanium coating deposited on Ti6Al4V by RF-magnetron sputtering, *Mater. Res. Express* 4 (2017) 1–13. doi:10.1088/2053-1591/aa8a7e.
- [100] M.A. Surmeneva, M. V. Chaikina, V.I. Zaikovskiy, V.F. Pichugin, V. Buck, O. Prymak, M. Epple, R. a. Surmenev, The structure of an rf-magnetron sputter-deposited silicate-containing hydroxyapatite-based coating investigated by high-resolution techniques, *Surf. Coatings Technol.* 218 (2013) 39–46. doi:10.1016/j.surfcoat.2012.12.023.
- [101] M.A. Surmeneva, A.I. Tyurin, T.M. Mukhametkaliyev, T.S. Pirozhkova, I.A. Shuvarin, M.S. Syrtanov, R.A. Surmenev, Enhancement of the mechanical properties of AZ31 magnesium alloy via nanostructured hydroxyapatite thin films fabricated via radio-frequency magnetron sputtering, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 46 (2015) 127–136. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.02.025.
- [102] Y. Yonggang, J.G.C. Wolke, L. Yubao, J.A. Jansen, The influence of discharge power and heat treatment on calcium phosphate coatings prepared by RF magnetron sputtering deposition, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 1061–1069. doi:10.1007/s10856-007-0119-0.
- [103] A.R.A. Sagari, Ca-P-O thin film preparation, modification and characterisation, Ph.D thesis, University of Jyväskylä, 2011. https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/37195/Arcot_Rajashekar-Ananda-2011.pdf?sequence=1.
- [104] D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, Y. Missirlis, Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption., *Biomaterials* 22 (2001) 1241–51. doi:10.1016/S0142-9612(00)00274-X.

- [105] A. Zareidoost, M. Yousefpour, B. Ghaseme, A. Amanzadeh, The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 1479–1488. doi:10.1007/s10856-012-4611-9.
- [106] E.S. Thian, J. Huang, Z.H. Barber, S.M. Best, W. Bonfield, Surface modification of magnetron-sputtered hydroxyapatite thin films via silicon substitution for orthopaedic and dental applications, *Surf. Coatings Technol.* 205 (2011) 3472–3477. doi:10.1016/j.surfcoat.2010.12.012.
- [107] C.G. García, L.L. Ferrus, D. Moratal, M.M. Pradas, M.S. Sánchez, Poly(L-lactide) substrates with tailored surface chemistry by plasma copolymerisation of acrylic monomers, *Plasma Process. Polym.* 6 (2009) 190–198. doi:10.1002/ppap.200800112.
- [108] M. Surmeneva, C. Kleinhans, G. Vacun, P. Kluger, V. Schönhaar, M. Müller, S.B. Hein, A. Wittmar, M. Ulbricht, O. Prymak, C. Oehr, O. Surmenev, Nano-hydroxyapatite coated metal ceramic composite of iron tricalcium Phosphate : improving the surface wettability, adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells in vitro, *Colloids Surfaces / B Biointerfaces.* 135 (2015) 386–393. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.07.057.
- [109] M. Polok, M. Adamiak, Structure and properties of wear resistance PVD coatings deposited onto X37CrMoV5-1 type hot work steel, *Mater. Process. Technol.* 165 (2005) 843–849. doi:10.1016/j.jmatprotec.2005.02.164.
- [110] E. Contreras Romero, J. Cortínez Osorio, R. Talamantes Soto, A. Hurtado Macías, M. Gómez Botero, Microstructure, mechanical and tribological performance of nanostructured TiAlTaN-(TiAlN/TaN)_n coatings: Understanding the effect of quaternary/multilayer volume fraction, *Surf. Coatings Technol.* 377 (2019) 124875. doi:10.1016/j.surfcoat.2019.07.086.
- [111] S.J. Ding, C.P. Ju, J.H.C. Lin, Characterization of hydroxyapatite and titanium coatings sputtered on Ti-6Al-4V substrate, *J. Biomed. Mater. Res.* 44 (1999) 266–279. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19990305)44:3<266::AID-JBM5>3.0.CO;2-4.
- [112] L. Stagi, C.M. Carbonaro, R. Corpino, D. Chiriu, P.C. Ricci, Light induced TiO₂ phase transformation: Correlation with luminescent surface defects, *Phys. Status Solidi Basic Res.* 252 (2015) 124–129. doi:10.1002/pssb.201400080.
- [113] X. Chatzistavrou, O. Tsigkou, H.D. Amin, K.M. Paraskevopoulos, V. Salih, A.R. Boccaccini, Sol-gel based fabrication and characterization of new bioactive glass-ceramic composites for dental applications, *J. Eur. Ceram. Soc.* 32 (2012) 3051–3061.

doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2012.04.037.

- [114] V. Chawla, R. Jayaganthan, R. Chandra, Microstructural characteristics and mechanical properties of magnetron sputtered nanocrystalline TiN films on glass substrate, *Bull. Mater. Sci.* 32 (2009) 117–123. doi:10.1007/s12034-009-0018-8.
- [115] D. Kaczmarek, J. Domaradzki, D. Wojcieszak, E. Prociow, M. Mazur, F. Placido, S. Lapp, Hardness of nanocrystalline TiO₂ thin films, *J. Nano Res.* 18–19 (2012) 195–200. doi:10.4028/www.scientific.net/JNanoR.18-19.195.
- [116] G. Bolelli, V. Cannillo, R. Gadov, A. Killinger, L. Lusvarghi, J. Rauch, Properties of High Velocity Suspension Flame Sprayed (HVSFS) TiO₂ coatings, *Surf. Coatings Technol.* 203 (2009) 1722–1732. doi:10.1016/j.surfcoat.2009.01.006.
- [117] U. Beck, D.T. Smith, G. Reiners, S.J. Dapkunas, Structural Studies of Hyper-Thin SiO₂ and Si₃N₄ Coatings on Polymers, *Thin Solid Films.* 332 (1998) 164–171.
- [118] A. Leyland, A. Matthews, On the significance of the H / E ratio in wear control: a nanocomposite coating approach to optimised tribological behaviour, *Wear.* 246 (2000) 1–11.
- [119] R. Snyders, E. Bousser, D. Music, J. Jensen, S. Hocquet, J.M. Schneider, Influence of the chemical composition on the phase constitution and the elastic properties of RF-sputtered hydroxyapatite coatings, *Plasma Process. Polym.* 5 (2008) 168–174. doi:10.1002/ppap.200700112.
- [120] S.J. Bull, Interface engineering and graded films: Structure and characterization, *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* 19 (2001) 1404–1414. doi:10.1116/1.1355359.
- [121] Y.Z. Cao, Y.C. Liang, S. Dong, T. Sun, B. Wang, Effects of the substrate on the determination of thin film mechanical properties by nanoindentation, *Key Eng. Mater.* 315–316 (2006) 766–769.
- [122] A. Gouldstone, H.J. Koh, K.Y. Zeng, A.E. Giannakopoulos, S. Suresh, Discrete and continuous deformation during nanoindentation of thin films, *Acta Mater.* 48 (2000) 2277–2295. doi:10.1016/S1359-6454(00)00009-4.
- [123] S. Dasgupta, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Effect of grain size on mechanical, surface and biological properties of microwave sintered hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C.* 33 (2013) 2846–2854. doi:10.1016/j.msec.2013.03.004.

- [124] M.A. Surmeneva, R.A. Surmenev, A.I. Tyurin, T.M. Mukhametkaliyev, A.D. Teresov, N.N. Koval, T.S. Pirozhkova, I.A. Shuvarin, C. Oehr, Comparative study of the radio-frequency magnetron sputter deposited CaP films fabricated onto acid-etched or pulsed electron beam-treated titanium, *Thin Solid Films*. 571 (2014) 218–224. doi:10.1016/j.tsf.2014.10.049.
- [125] R. V. Chernozem, M.A. Surmeneva, B. Krause, T. Baumbach, V.P. Ignatov, A.I. Tyurin, K. Loza, M. Epple, R.A. Surmenev, Hybrid biocomposites based on titania nanotubes and a hydroxyapatite coating deposited by RF-magnetron sputtering: Surface topography, structure, and mechanical properties, *Appl. Surf. Sci.* 426 (2017) 229–237. doi:10.1016/j.apsusc.2017.07.199.
- [126] W.. Perdok, J. Christoffersen, J. Arends, The thermal lattice expansion of calcium hydroxyapatite, *J. Cryst. Growth*. 80 (1987) 149–154.
- [127] S.S. Jiang, K.F. Zhang, Study on controlling thermal expansion coefficient of ZrO₂-TiO₂ ceramic die for superplastic blow-forming high accuracy Ti-6Al-4V component, *Mater. Des.* 30 (2009) 3904–3907. doi:10.1016/j.matdes.2009.03.023.
- [128] H. Tada, A.E. Kumpel, R.E. Lathrop, J.B. Slanina, P. Nieva, P. Zavracky, I.N. Miaoulis, P.Y. Wong, Thermal expansion coefficient of polycrystalline silicon and silicon dioxide thin films at high temperatures, *J. Appl. Phys.* 87 (2000) 4189–4193. doi:10.1063/1.373050.
- [129] A.G. Evans, G.B. Crumley, R.E. Demaray, On the mechanical behavior of brittle coatings and layers, *Oxid. Met.* 20 (1983) 193–216. doi:https://doi.org/10.1007/BF00656841.
- [130] ASTM C1624-05, Standard Test Method for Adhesion Strength and Mechanical Failure Modes of, *Astm.* 05 (2015) 1–29. doi:10.1520/C1624-05R15.Scope.
- [131] Y.C. Yang, E. Chang, Influence of residual stress on bonding strength and fracture of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on Ti-6Al-4V substrate, *Biomaterials*. 22 (2001) 1827–1836.
- [132] W. Boonrawd, M. Hamdi, A. Shukor, T.C. Yong, Radio Frequency Magnetron Sputtering HA / Ti Coatings Deposited Using Double-Layered Target: Phase Composition and Film Adherence of Heat-Treated Coatings, in: *11th Asia Pacific Ind. Eng. Manag. Syst. Conf.*, 2010: pp. 7–10.
- [133] Y. Chen, X. Zheng, Y. Xie, H. Ji, C. Ding, H. Li, K. Dai, Silver release from silver-containing hydroxyapatite coatings, *Surf. Coatings Technol.* 205 (2010) 1892–1896. doi:10.1016/j.surfcoat.2010.08.073.

- [134] L. Actis, L. Gaviria, T. Guda, J.L. Ong, Antimicrobial surfaces for craniofacial implants: state of the art., *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 39 (2013) 43–54. doi:10.5125/jkaoms.2013.39.2.43.
- [135] J. Parvizi, T. Gehrke, Periprosthetic Joint Infection: current concept, *Indian J. Orthop.* 47 (2013) 10–17.
- [136] D.E. Marx, D.J. Barillo, Silver in medicine: The basic science, *Burns.* 40 (2014) S9–S18. doi:10.1016/j.burns.2014.09.010.
- [137] A.A. Yanovska, A.S. Stanislavov, L.B. Sukhodub, V.N. Kuznetsov, V.Y. Illiashenko, S.N. Danilchenko, L.F. Sukhodub, Silver-doped hydroxyapatite coatings formed on Ti – 6Al – 4V substrates and their characterization, *Mater. Sci. Eng. C.* 36 (2014) 215–220. doi:10.1016/j.msec.2013.12.011.
- [138] M. Salmerón-Sánchez, P. Rico, D. Moratal, T.T. Lee, J.E. Schwarzbauer, A.J. García, Role of material-driven fibronectin fibrillogenesis in cell differentiation, *Biomaterials.* 32 (2011) 2099–2105. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.057.
- [139] S.A. Redey, M. Nardin, D. Bernache-Assolant, C. Rey, P. Delannoy, L. Sedel, P.J. Marie, Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy., *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2000) 353–364.
- [140] S. Spriano, M. Bosetti, M. Bronzoni, E. Verne, G. Maina, V. Bergo, M. Cannas, Surface properties and cell response of low metal ion release Ti-6Al-7Nb alloy after multi-step chemical and thermal treatments., *Biomaterials.* 26 (2005) 1219–1229. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.04.026.
- [141] E.A. Vogler, Water and the acute biological response to surfaces, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 10 (1999) 1015–1045. doi:10.1163/156856299X00667.
- [142] J.Y. Lim, X. Liu, E.A. Vogler, H.J. Donahue, Systematic variation in osteoblast adhesion and phenotype with substratum surface characteristics, *J. Biomed. Mater. Res.* 68A (2004) 504–512. doi:10.1002/jbm.a.20087.
- [143] Y. Kohl, E. Gorjup, A. Katsen-Globa, C. Büchel, H. Von Briesen, H. Thielecke, Effect of gold nanoparticles on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *J. Nanoparticle Res.* 13 (2011) 6789–6803. doi:10.1007/s11051-011-0587-5.
- [144] K.S. Yao, D.Y. Wang, C.Y. Chang, K.W. Weng, L.Y. Yang, S.J. Lee, T.C. Cheng, C.C.

- Hwang, Photocatalytic disinfection of phytopathogenic bacteria by dye-sensitized TiO₂ thin film activated by visible light, *Surf. Coatings Technol.* 202 (2007) 1329–1332. doi:10.1016/j.surfcoat.2007.07.102.
- [145] R.J. Gibbons, L. Cohen, D.I. Hay, Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors, *Infect. Immun.* 52 (1986) 555–561.
- [146] J.T. Seil, T.J. Webster, Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature, *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012) 2767–2781. doi:10.2147/IJN.S24805.
- [147] J.M. Sahuquillo Arce, A. Iranzo Tatay, M. Llácer Luna, Y. Sanchis Boix, J. Guitán Deltell, E. González Barberá, J. Beltrán Heras, M. Gobernado Serrano, Estudio in vitro de las propiedades antimicrobianas de una espuma de poliuretano que libera iones de plata, *Cir. Esp.* 89 (2011) 532–538. doi:10.1016/j.ciresp.2011.02.015.
- [148] M.A. Ur Rehman, S. Ferraris, W.H. Goldmann, S. Perero, F.E. Bastan, Q. Nawaz, G.G. Di Confiengo, M. Ferraris, A.R. Boccaccini, Antibacterial and Bioactive Coatings Based on Radio Frequency Co-Sputtering of Silver Nanocluster-Silica Coatings on PEEK/Bioactive Glass Layers Obtained by Electrophoretic Deposition, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9 (2017) 32489–32497. doi:10.1021/acsami.7b08646.
- [149] K. Jamuna-thevi, S.A. Bakar, S. Ibrahim, N. Shahab, M.R.M. Toff, Quantification of silver ion release, in vitro cytotoxicity and antibacterial properties of nanostructured Ag doped TiO₂ coatings on stainless steel deposited by RF magnetron sputtering, *Vacuum.* 86 (2011) 235–241. doi:10.1016/j.vacuum.2011.06.011.
- [150] M. Badea, M. Braic, a. Kiss, M. Moga, E. Pozna, I. Pana, a. Vladescu, Influence of Ag content on the antibacterial properties of SiC doped hydroxyapatite coatings, *Ceram. Int.* 42 (2016) 1801–1811. doi:10.1016/j.ceramint.2015.09.143.
- [151] C. Liao, Y. Li, S.C. Tjong, Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). doi:10.3390/ijms20020449.
- [152] V. De Matteis, M.A. Malvindi, A. Galeone, V. Brunetti, E. De Luca, S. Kote, P. Kshirsagar, S. Sabella, G. Bardi, P.P. Pompa, Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: The role of Ag⁺ ion release in the cytosol, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11 (2015) 731–739. doi:10.1016/j.nano.2014.11.002.
- [153] T. Tashi, N. Vishal Gupta, V.B. Mbuya, Silver nanoparticles: Synthesis, mechanism of

antimicrobial action, characterization, medical applications, and toxicity effects, *J. Chem. Pharm. Res.* 8 (2016) 526–537.