

Desarrollo de Recubrimiento a Base de un Composito HA-nAg a partir de una Síntesis totalmente Verde

Denisse A. Lozoya^a, Renata de Lima^{b,c}, Leonardo F. Fraceto^d, Tatiane Pasquôto^c, Mariana Guilger^c, A. Ledezma Pérez^e, Mercedes Bazaldua^a, Roberto Gómez^a, J. Chacón Nava^a y V. Orozco Carmona^{a*}.

^aCentro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMA), Miguel de Cervantes 120, 31109, Chihuahua, Chihuahua, México.

^bUniversidade de Sorocaba (UNISO), Departamento de Biotecnologia, Sorocaba, Sao Paulo, Brazil.

^cUniversidade Federal de Sao Carlos (UFSCar), Sorocaba, Sao Paulo, Brazil.

^dUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Engenharia Ambiental, Sorocaba, Sao Paulo, Brazil.

^eCentro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Blvd. Enrique Reyna, 140, 25250, Saltillo, Coahuila, México.

Resumen

En este estudio, se obtuvo hidroxiapatita biológica a partir de huesos bovinos mediante un proceso térmico. Después, se desarrollaron recubrimientos de hidroxiapatita biológica con un contenido de 0 y 1% de nanopartículas de plata sintetizadas por *Opuntia ficus* (nopal) sobre un sustrato de Ti6Al4V mediante la técnica de proyección térmica por plasma (APS); la eficiencia antibacteriana fue evaluada a través de la norma JIS Z2801:2000 "Prueba de productos antimicrobianos para eficiencia y actividad antimicrobiana" en las siguientes cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las pruebas de liberación de iones mostraron que el recubrimiento liberó iones de plata por debajo de 0.05 ppm; así como iones de calcio, potasio, magnesio y sodio (los cuales son promotores de células de crecimiento). Microscopia electrónica de barrido (MEB) mostró que las nanopartículas de plata estaban distribuidas homogéneamente sobre la superficie del recubrimiento. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS) mostró que la deposición de la hidroxiapatita ocurrió día a día, manteniendo una proporción de Ca/P entre 2.12 y 1.45. Las propiedades de biocompatibilidad fueron evaluadas utilizando *Allium cepa*, lymphocytes (sangre fresca) y células osteoblásticas de ratón (MC3T3) mediante el ensayo de *Allium cepa*, ensayo de electroforesis en gel de células individuales y Citometría de imagen Talí.

Palabras clave: Hidroxiapatita biológica, recubrimiento, nanopartículas de plata, proyección por plasma atmosférico, prueba antibacteriana, prueba citotóxica.

1. INTRODUCCIÓN

Las sales de fosfato de calcio (CaP) son el componente mineral más abundantes en huesos y dientes en vertebrados. En biomateriales, los huesos y algunos tejidos calcificados pueden considerarse compósitos anisotrópicos naturales dentro de una matriz proteica, materiales orgánicos y agua. La fase biomineral tiene un contenido aproximado del 65-70% de hueso (el cual puede contener uno o más tipos de fosfato de calcio), el agua constituye el 5-8%, y el resto del porcentaje corresponde a la fase orgánica, la cual es colágeno en su mayoría. Termodinámicamente, la hidroxiapatita (HA) es la sal de fosfato de calcio más estable dentro del fluido corporal humano, del mismo modo tiene la mayor similitud con la parte mineral del hueso. Naturalmente, la HA es carbonatada, esto quiere decir, deficiente en calcio, es por esto que la proporción Ca/P es menor a 1.67 (Mehdi Sadat-Shojai et al., 2013). HA se ha utilizado en recubrimientos para promover el enlace de prótesis a través de osteointegración (Sebastian Bauer et al., 2012).

Ha sido reportado que las infecciones relacionadas con implantes, juegan un rol muy importante como una de las complicaciones clínicas más comunes. La proporción de infecciones postoperatorias son 5% en casos primarios, 6% por casos en revisión y un 43% de revisión de casos previamente infectados (Yikai Chen et al., 2010). La patogénesis de la infección está relacionada con microorganismos que crecen en una bio-película, haciéndolo muy difícil de tratar (Daniela Ionita et al., 2011). Para reducir el riesgo de infección, es utilizada la profilaxis. Debido a la limitada irrigación sanguínea al hueso tisular, la distribución de un antibiótico sobre un

área infectada es pobre. Para reducir las infecciones se incrementa la concentración del antibiótico. Sin embargo, demasiado antibiótico en la sangre durante un largo periodo de tiempo produce intoxicación. Existen antibióticos orgánicos e inorgánicos; los antibióticos orgánicos forman una bio-película sobre la superficie del implante, incrementando la resistencia bacteriana al antibiótico. Por otro lado, los antibióticos inorgánicos son agentes antimicrobianos los cuales no inducen la resistencia bacteriana, por esto, son una opción excelente para tratamiento antimicrobiano local (Yikai Chen et al., 2010). Actualmente se han desarrollado estudios para mejorar las propiedades antibacterianas de los recubrimientos de HA mediante la adición de nanopartículas de plata (nAg) (Huiliang Cao et al., 2010). En estudios previos, hemos desarrollado recubrimientos de nAg y HA por proyección por plasma atmosférico (APS) utilizando componentes procesados por vía química (V. Orozco Carmona et al., 2014).

Hablar sobre biomateriales es hablar sobre materiales capaces de estar en contacto con tejido vivo durante un lapso de tiempo como parte del tejido, con el objetivo de completar el tejido o mejorar su funcionalidad (María Cristina Piña Barba, 2012). La ciencia de biomateriales involucra el estudio de características físicas, biológicas y químicas de los materiales, así como las respectivas evaluaciones y las interacciones entre el material y el cuerpo receptor (Buddy D. Ratner et al., 2004). La biocompatibilidad de los biomateriales se clasifica de acuerdo con la habilidad para inducir la muerte celular (citotoxicidad), promoción de cáncer (carcinogenicidad), daño genético (mutagénesis), etc. La biocompatibilidad de instrumentos médicos cubren ambas, compatibilidad y diseño (Quizhi Chen and George A. Thouas, 2014). Una de las características más importantes de los materiales utilizados para implantes es la presencia de porosidad o cavidades, lo que permite el crecimiento del tejido en el material (Sebastian Bauer et al., 2012).

En años recientes, las investigaciones se han enfocado en desarrollar síntesis de HA, incluyendo desechos alimenticios como precursor o la extracción de HA a partir de huesos de animales (Mehdi Sadat-Shojai et al., 2013). Existen ciertas diferencias entre la HA sintética y la HA natural o biológica, presentando esta última mejor actividad metabólica y una respuesta dinámica al ambiente más elevada. Por esto, es lógico pensar que la HA biológica es mejor como implante o como material para recubrimiento (M. Boutinguiza et al., 2011). Una de las razones por las que la HA biológica presenta un buen comportamiento es que esta no es estequiométrica debido a trazas de iones incorporados a la estructura del cristal, como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Si^{2+} y F^- (P. Kamalanathan et al., 2014).

Aspirando a prevenir costos en terapias o la remoción de implantes, es importante desarrollar recubrimientos con una excelente actividad antimicrobiana así como una buena oseointegración (Daniela Ionita et al., 2011). Para su aplicación se han utilizado diferentes métodos como pulverización catódica, intercambio iónico, sol-gel, proyección térmica por plasma, etc.

Existen algunos agentes inorgánicos antibacterianos, como la plata, y sus iones, conocido debido a sus buenos efectos inhibidores en un amplio espectro de bacterias (Yikai Chen et al., 2010). Por otro lado, el uso de plata fue limitado debido a la toxicidad de sus iones; sin embargo, la nanotecnología ha extendido las posibilidades de su uso al producir pequeñas partículas con extensas áreas superficiales, mejorando su eficiencia pero, más allá de eso, su toxicidad se ve reducida (Karla Chaloupka et al., 2010). Sin embargo, el como y que induce la citotoxicidad es un tema que aún no es bien entendido. Se ha sugerido que las nAg actúan como un caballo de Troya, consiguiendo introducirse en las células y liberando iones de plata las cuales dañan funciones intracelulares. No obstante, Kim et. al. ha argumentado que la citotoxicidad de las nAg es el resultado de un estrés oxidativo y es completamente independiente de la toxicidad de los iones de plata. Un mejor entendimiento en el tejido es crucial para la evaluación de citotoxicidad de las nAg (Huiliang Cao et al., 2010). El uso de métodos no tóxicos y ambientalmente amigables para la síntesis de nanopartículas es muy atractivo, especialmente si están destinadas a ser utilizadas en aplicaciones invasivas en el campo de la medicina. Para alcanzar esto, microorganismos, plantas y frutos tisulares, plantas vivientes, extracto de plantas y algunas algas marinas han sido utilizados. La síntesis biogénica es muy útil gracias a su bajo impacto ambiental, así como debido a la producción de nanopartículas químicamente libres de trazas (Abduz Zahir, et al., 2012).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La HA natural fue obtenida a partir de huesos de bovino mediante descomposición térmica. Los huesos de bovino fueron limpiados a mano y con agua, hervidos durante 8 horas a 90°C, después el hueso blando (tuétano/medula del hueso) fue retirado. Los huesos fueron tratados durante 8 horas a una solución de ácido fosfórico (H₃PO₄) manteniendo un pH de 2.4. Después, para la eliminación de agua, los huesos fueron calentados en un horno durante 2 horas a 250°C generando su fragilización. Seguido de esto, los huesos fueron molidos en un dispositivo con cuchillas hasta obtener polvos.

El polvo fue calcinado a 800°C durante 6 horas y después fue caracterizado. Para analizar la cristalinidad, se requirió de un difractómetro de rayos x (DRX) PANalytical X'Pert Pro, con una radiación Cu K α ($\lambda=1.5406$ Å) por encima del ángulo de Bragg dentro de un rango de 5 a 80°. Espectroscopia de infrarrojo (FTIR) fue utilizada para caracterizar los polvos, haciendo uso de un Perkin Elmer Spectrum 6X con una resolución de 4 cm⁻¹ en un rango de frecuencia de 4000–400 cm⁻¹. La morfología de la superficie fue estudiada en un microscopio electrónico de barrido (MEB) HITACHI SU3500 equipado con espectroscopio de energía dispersiva de rayos X (EDX). También se determinó la relación molar Ca/P por medio de EDX y por espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) Thermo Scientific iCAP 600 series. La distribución de tamaño de partícula (PSD) fue determinada en condiciones acuosas utilizando un granulómetro laser Malven MASTERSIZER 2000.

Nanopartículas de plata obtenidas mediante biosíntesis haciendo uso de extracto de nopal (*Opuntia ficus*), fueron utilizadas para crear recubrimientos con propiedades antibacterianas.

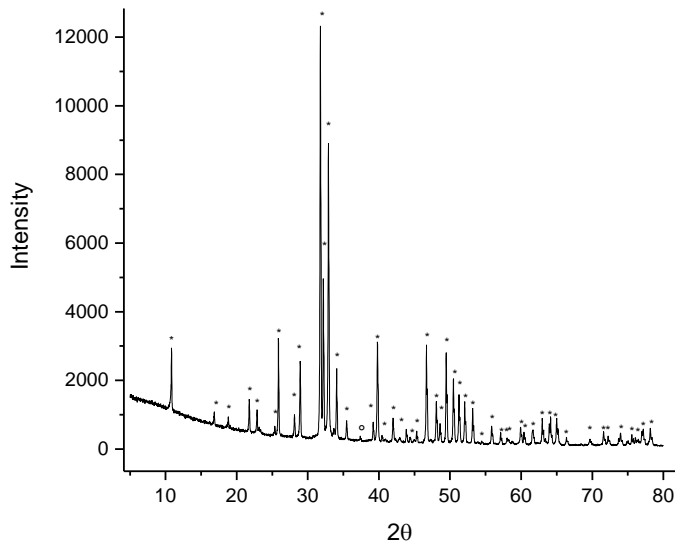
El recubrimiento fue desarrollado utilizando un equipo de proyección térmica por plasma (APS) (PRAXAIR Surface Technologies 3710) con los siguientes parámetros de operación: 600 A, gas primario de 55 psi (Ar), gas secundario de 110 psi (He) y una distancia de aplicación de 50 mm (V. Orozco Carmona et al., 2014). La morfología de los recubrimientos fue caracterizada en MEB. A su vez, estos fueron expuestos a una solución de fluido corporal simulado (SBF), para analizar la deposición de apatita. Liberación de iones fue analizada por ICP-OES.

Las pruebas de biocompatibilidad fueron desarrolladas mediante el ensayo de *Allium cepa*, el ensayo de electroforesis en gel de células individuales con *lymphocytes* (sangre fresca) y osteoblastos (ATCC: MC3T3). Citometría de imagen Talí fue realizada con *lymphocytes*.

Las pruebas antimicrobianas se efectuaron en base a la norma JIS Z 2800:2001. Esta norma menciona que “el valor de la actividad antimicrobiana, no deben de ser menores a 2.0 que sea considerado eficiente desde el punto de vista de propiedades antimicrobianas”. Para un mejor entendimiento se realizó una conversión, por lo que, el valor de 2.0 es equivalente a 99% de eficiencia antibacteriana.

3. RESULTADOS

El análisis de DRX (Fig. 1) mostró la presencia de HA como resultado después del proceso térmico, de acuerdo con la carta cristalográfica 00-074-0565 proporcionado por el ICDD. El patrón también revela una presencia minoritaria de CaO indexado con la carta 00-075-026.



*Fig. 1. Patrón de difracción de HA obtenido a partir de huesos de bovino calcinados a 800°C *HA °CaO*

El espectro de FTIR de los polvos se presenta en la Fig. 2, exhibiendo los picos de OH^- , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} . Estos resultados demuestran que la HA fue carbonatada, por lo tanto, es menos estequiométrica y más similar a la composición del hueso humano.

De acuerdo a la fórmula química, la relación molar Ca/P es aproximadamente de 1.67; sin embargo, al ser HA obtenida a partir de huesos de bovino es lógico pensar que la relación molar está un poco por debajo de la relación estequiométrica, debido a los iones de CO_3^{2-} . Esto fue demostrado analizando los polvos mediante ICP-OES, y se obtuvo que la relación molar Ca/P es de 1.65; el porcentaje de los elementos presentes en el polvo adicionales a Ca y P también fueron analizado: 0.049% K, 0.534% Mg, 0.821% Na, 0.013% Si. La presencia de estos iones es muy importante, debido a que estos tienen un rol biológico de acuerdo con P. Kamalanathan et al., (2014), Shih-Ching Wu et al., (2013), P.N. Lim et al., (2016), T.A. Grünewald et al., (2015).

Los polvos poseen una distribución de tamaño de partícula promedio de 119.75 μm , y este tamaño de partícula es adecuado para ser aplicado en el proceso de APS, por lo tanto, recubrimientos de nAg/HA fueron desarrollados satisfactoriamente.

La morfología de la superficie del recubrimiento fue observada por MEB. Fig. 3 presenta que el recubrimiento tiene textura, microfracturas y una buena dispersión de nanopartículas de plata, incluso cuando hay una tendencia a la aglomeración. Para determinar las propiedades de oseointegración, los recubrimientos fueron sumergidos en una solución SBF a diferentes tiempos (1, 3, 12, y 24 h, 3, 7, 14 y 30 días) y analizados en MEB, resultando que la apatita se formó sobre el recubrimiento y exhibió una mayor concentración de formación de apatita en áreas de fracturas (Fig. 4). De acuerdo a E. Hatzistavrou et al., (2010), el crecimiento rápido de la apatita sobre la superficie de las muestras puede ser atribuido a la presencia de una fase de CaO en la HA natural.

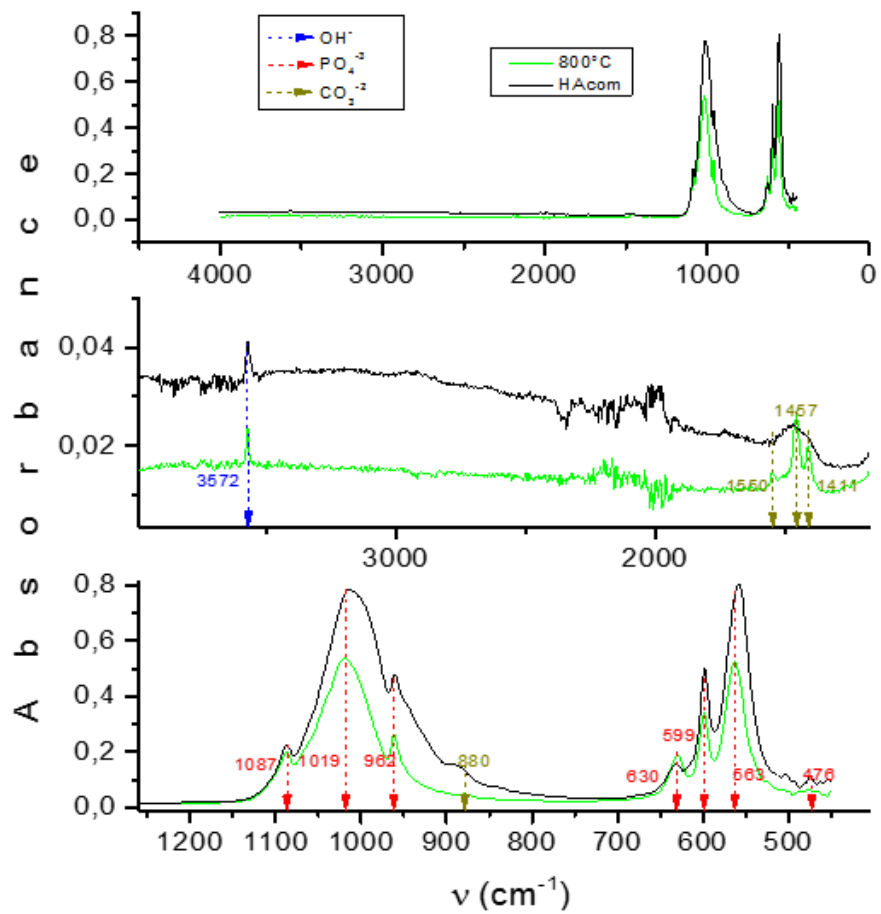


Fig. 2. Espectro FTIR obtenidas a partir de huesos de bovino calcinados a 800°C.

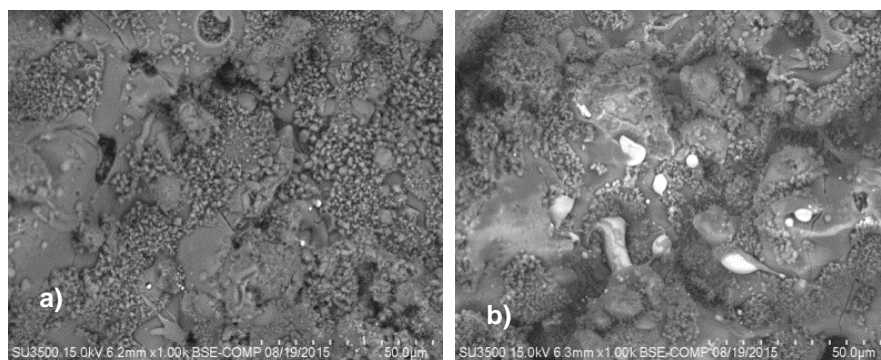


Fig. 3 a), b), Micrografías en MEB de recubrimientos HA/nAg mostrando partículas de plata.

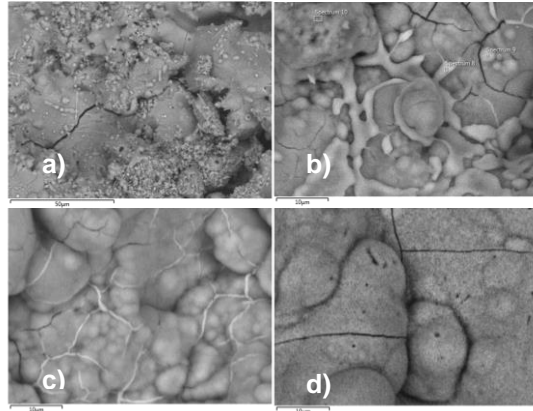


Fig. 4 Micrografías en MEB del recubrimiento de HA/nAg expuesto a SBF a) 1h, b) 12h, c) 24 h, d) 30 días

En sección transversal se puede observar que el espesor promedio del recubrimiento fue de $217.33 \mu\text{m}$ (Fig. 5). Un mapeo elemental (Fig. 6) expone que el Ca y el P están concentrados casi en el mismo lugar, y en donde hay deficiencia de Ca-P existe presencia de Mg; tanto nAg como HA se encuentran presentes en toda la superficie del recubrimiento.

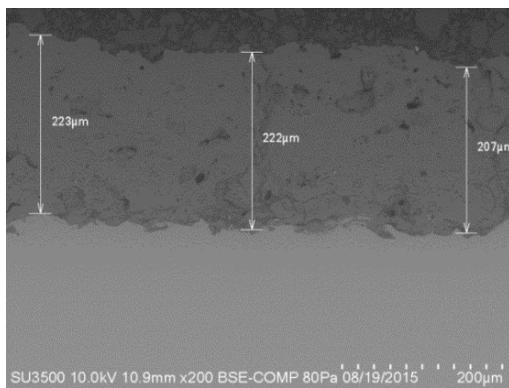


Fig. 6 Mapeo elemental del recubrimiento de HA/nAg

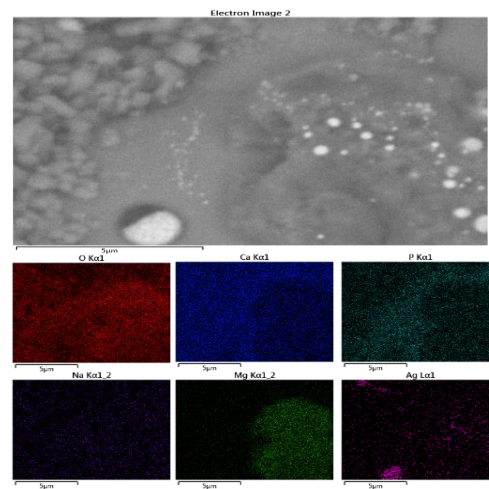


Fig. 5. Mapeo elemental del recubrimiento de HA/nAg

El ensayo de Allium cepa fue realizado tanto en el recubrimiento de HA/nAg como en el de HA, este último como control y su principal objetivo fue el de ser capaz de observar el efecto de la HA sobre las células. El resultado mostró que el recubrimiento de HA estimula la división celular, esto confirma los múltiples estudios que exhiben que la HA es un excelente material promotor de crecimiento de células. El recubrimiento de nAg presenta un decremento en el índice mitótico (MI), el cual indica que si existe una ligera alteración en el crecimiento celular debido a la presencia de nAg pero, no fue significativa (Fig. 7); el índice de alteración (AI) muestra que no existe una notoria diferencia entre ambos tipos de recubrimientos, esto quiere decir, que las células no sufren ningún daño relacionado a las nanopartículas de plata, más allá del que sufren por ellas mismas. La prueba de electroforesis en gel por células individuales fue evaluada con las dos líneas de células previamente mencionadas: *linfocitos* (la cual fue obtenida de sangre fresca por voluntarios) y osteoblastos (ACTCC: MC3T3). En ambos casos se exhibió daño celular y la migración de ADN ocurrió pero no es significativa comparado con el control negativo y el recubrimiento con HA (Fig. 8).

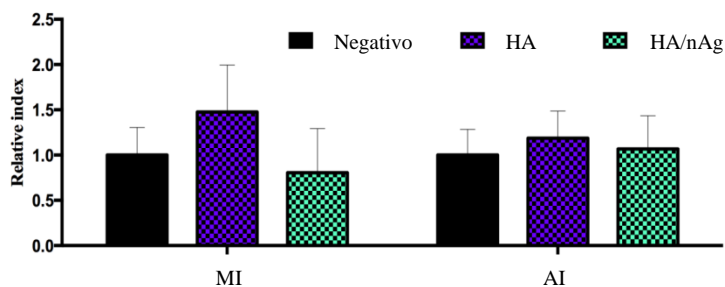


Fig. 8 Resultados del ensayo de Allium cepa

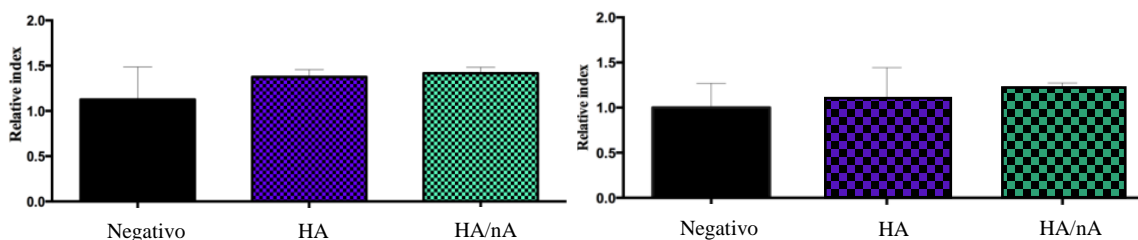


Fig. 7 Resultados del ensayo de electroforesis en gel de células individuales

Fig. 9 presenta los resultados de la citometría de imagen Talí realizada con *linfocitos*. Se puede apreciar el incremento en el crecimiento de células, y es más notable en los recubrimientos de HA/nAg que en los de HA. A su vez, existe apoptosis, en cual en ambos casos es mayor que la del negativo, esto ocurre porque la apoptosis (muerte natural de las células) es activada cuando existe un incremento en las células vivas y así el sistema puede estar en equilibrio. Por otro lado, la necrosis es menor, incluso menor que el negativo, esto indica que los recubrimientos no promueven el daño irreparable en células, así que, los recubrimientos no son agentes nocivos.

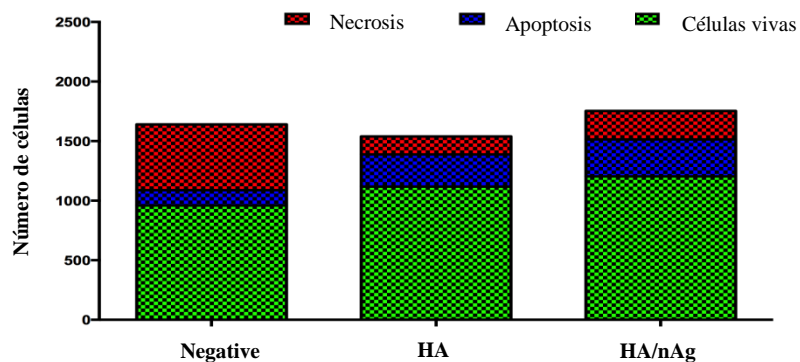


Fig. 9 Muestra los resultados de la citometría de imagen Talí

Para realizar la prueba antimicrobiana, 250,000 unidades formadoras de colonias (CFU) estuvieron en contacto con cada recubrimiento. La norma JIS Z 2800:2001 establece que el valor antimicrobiano muestra la diferencia en el valor logarítmico en el recuento de células viables entre el producto antimicrobiano y los productos no tratados después de la inoculación y la incubación de la bacteria. Este valor es calculado como se muestra a continuación. (Eq. 1):

$$R = \log \frac{B}{A} - \log \frac{C}{A} = \log \frac{B}{C} \quad (\text{Eq. 1})$$

Dónde: R es el valor de la actividad antimicrobiana, A es el promedio del número de células viables de bacterias inmediatamente después de la inoculación sobre la pieza de prueba sin tratar; B es el promedio del número de células viables de bacterias sobre la pieza de prueba antimicrobiana después de 24 h. La fig. 10 muestra que las tres bacterias presentaron una actividad mínima cuando estuvieron en contacto con el recubrimiento por 24 h, todos los valores de actividad antimicrobiana están por encima de 2.0, esto quiere decir, que el recubrimiento posee por lo menos un 99% de eficiencia antibacterial (Tabla 1).

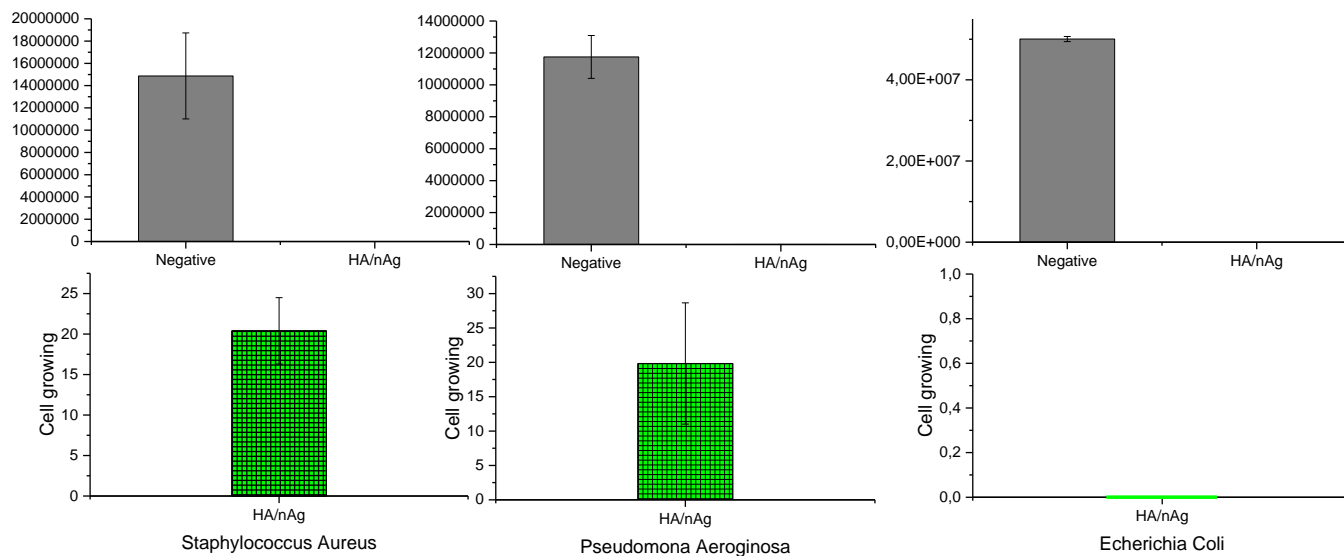


Fig. 10 Crecimiento celular después de 24 horas de contacto. Control vs. HA/nAg.

Tabla 1 Valores de la eficiencia y la actividad antimicrobiana del recubrimiento de HA/nAg

	Actividad Antimicrobiana	Porcentaje de eficiencia HA/nAg
<i>Staphylococcus Aureus</i>	5,6	99,99%
<i>Escherichia Coli</i>	8	99,99%
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	5,8	99,99%

4. CONCLUSIONES

Hidroxiapatita natural fue extraída satisfactoriamente a partir de hueso de bovino utilizando un proceso térmico, el cual es más higiénico comparado con procesos industriales y requiere de menor cantidad de materia prima. Los resultados de la caracterización mostraron que la hidroxiapatita posee rastros de iones que son necesarios para el crecimiento celular, sugiriendo que tiene una mejor bioactividad y biocompatibilidad.

Aplicando la mezcla de polvo de HA/nAg mediante proyección térmica por plasma permitió la proyección de ambos polvos como si fuera uno; los recubrimientos de HA/nAg tuvieron un buen desempeño en todas las pruebas de desempeño analizadas en el presente estudio, exhibiendo que 1% de nanopartículas de platas es suficiente para inhibir el crecimiento de bacterias, sin dañar células del cuerpo.

Este estudio es el comienzo de una serie de investigaciones acerca la producción y la optimización de biomateriales obtenidos mediante métodos menos dañinos (verdes).

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CONACYT por el apoyo financiero y a las agencias de financiamiento Brasileñas.: FAPESP, CNPq, CAPES y FUNDUNESP. Se agradece la asistencia técnica de Adán Borunda, Arturo Hernández, Karla Campos, Wilber Antunez, Carlos Santillán, Silvia Miranda, Ernesto Guerrero, Luis de la Torre, Manuel Román, Daniel Lardizábal.

6. REFERENCIAS

- A. Abduz Zahir, A. A. (2012). Evaluation of different extracts and synthesised silver nanoparticles from leaves of *Euphorbia prostrata* against *Haemaphysalis bispinosa* and *Hippobosca maculata*. *Veterinary Parasitology*(187), 511-520.
- Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons. (2004). En *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- Daniela Ionita, Mihaela Grecu, Camelia Ungureanu, Ioana Demetrescu. (2011). Modifying the TiAlZr biomaterial surface with coating, for a better anticorrosive and antibacterial performance. *Applied Surface Science*, 257, 9164– 9168.
- E. Hatzistravrou, X. Chatzistravrou, L. Papadopoulou, N. Kantiranis, E. Kontonasaki, A.R. Boccaccini, K.M. Paraskevopoulos, (2010). Characterisation of the bioactive behaviour of sol-gel hydroxyapatite-CaO and Hydroxyapatite -CaO-bioactive glass composites. *Materials Science and Engineering C*, (30), 497-502.
- Huiliang Cao, Xuanyong Liu, Fanhao Meng, Paul K. Chu. (2010). Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials*, 32, 693-705.
- Karla Chaloupka, Yogeshkumar Malam, Alexander M. Seifalian. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 28(11).
- M. Boutinguiza, J. P. (2011). Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering C*. (32), 478-486.
- María Cristina Piña Barba. (s.f.). *Los Biomateriales y sus Aplicaciones*. Recuperado el 3 de Febrero de 2012, de http://www.difusioncultural.uam.mx/casadeltiempo/28_iv_feb_2010/casa_del_tiempo_eIV_num28_55_58.pdf
- Mehdi Sadat-Shojai, M.-T. K.-K. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*(9), 7591-7621.
- P. Kamalanathan, S. Ramesh, L.T. Bang, A. Niakan, C.Y. Tan, J. Purbolaksono, Hari Chandran, W.D. Teng. (2014). Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as calcium precursor. *Ceramics International*, 40, 16349-16359.
- P.N. Kim, R.N. Lam, Y.F. Zheng, E.S. Thian (2016). Magnesium-calcium/hydroxyapatite (Mg-Ca/HA)

- composites with enhanced bone differentiation properties for orthopedic applications. *Materials Letters*, 172, 193-197.
- Sebastian Bauer, Patrik Schmuki, Klaus von der Mark, Jung Park. (2012). Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science*, 58, 261–326.
- Shih-Ching Wu, H.-K. T.-C.-K.-P.-F. (2013). A hydrothermal synthesis of eggshell and fruit waste extract to produce nanosized hydroxyapatite. *Ceramics International*(39), 8183-8188.
- T.A. Grünewald, H. Rennhofer, B. Hesse, M. Burghammer, S.E. Stanzl-Tschegg, M. Cotte, J.F. Löffler, A.M. Weinberg, H.C. Lichtenegger. (2016). Magnesium from bioresorbable implants: Distribution and impact on the nano- and mineral structure of bone. *Biomaterials*, 76, 250-260.
- V. Orozco Carmona, C. M.-V. (2014). Effect of Silver Nanoparticles in a Hydroxyapatite Coating applied by Atmospheric Plasma Spray. *International Journal of electrochemical science*(9), 7471 - 7494.
- Yikai Chen, Xuebin Zheng, Youtao Xie, Heng Ji, Chuanxian Ding, Huiwu Li, Kerong Dai. (2010). Silver release from silver-containing hydroxyapatite coatings. *Surface & Coatings Technology*, 205, 1892–1896.