



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Suzana Inkret

**BIOMIMETSKA PRIPREMA I SVOJSTVA KOMPOZITA
NANOČESTICE SREBRA/KALCIJEVI FOSFATI TE
KOMPOZITNIH PREVLAKA NA POVRŠINI TITANIJA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Dr. sc. Maja Dutour Sikirić

Zagreb, 2025



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Suzana Inkret

**BIOMIMETIC PREPARATION AND PROPERTIES OF
SILVER NANOPARTICLES/CALCIUM PHOSPHATES
COMPOSITES AND COMPOSITE COATINGS ON THE
TITANIUM SURFACE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Maja Dutour Sikirić, PhD

Zagreb, 2025



Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za biokoloide i površinsku kemiju, Zavoda za fizičku kemiju, Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Maje Dutour Sikirić u sklopu Poslijediplomskog studija kemije na Prirodoslovno–matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.



HRZZ
Croatian Science
Foundation

Rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-2018-01-1493 „Mehanizmi nastajanja kalcijevih fosfata na anorganskim nanomaterijalima. Biomimetski put priprave multifunkcionalnih nonokompozita za regeneraciju čvrstih tkiva, CaPBiomimNanocomp.“ i projektom razvoja karijera mladih doktora znanosti DOK-2021-02-5447 pod vodstvom dr. sc. Maje Dutour Sikirić te projektom mobilnosti MOBDOK2023-4472 pod vodstvom Suzane Inkret.

Zahvale

Veliko hvala mojoj mentorici Maji, koja je najveća inspiracija te bez čijih ideja, savjeta i podrške izrada ove disertacije ne bi bila moguća.

Svim članovima komisije veliko hvala, na brzim dogovorima i konstruktivnim komentarima i korisnim savjetima tijekom pisanja doktorske disertacije.

Želim zahvaliti svim sadašnjim i bivšim kolegicama iz laboratorija, Dariji, Ini, Vidi, Ljiljani, Luciji, Suzani, Ireni, Ani, Ljerki i Anji na vrlo korisnim savjetima i pomoći tijekom eksperimentalnog rada i pisanja, ali pored toga zbog svih druženja i proslava. Posebno hvala mojoj kolegici i cimerici Ani na svim razgovorima, na svim kavama, na svim sitnicama koje su rad na IRB-u uljepšale u svakom pogledu.

Veliko hvala svim suradnicima koji su mi uvelike pomogli prilikom eksperimentalnog rada, posebice kolegicama iz Laboratorija za elektronsku spinsku spektroskopiju te kolegama i kolegicama iz Zavoda za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada..

Za strpljenje i mentorstvo prilikom izrade antibakterijskih eksperimenata, veliko hvala dr. sc. Kruni Bojaniću koji je produbio moju ljubav prema mikrobiologiji i pomogao mi da shvatim da bakterije neće iskočiti iz agara.

Zahvaljujem se i dr. sc. Mariji Ćurlin s kojom je vrijeme na TEM-u prebrzo prošlo, ali sam neizmjereno zahvalna na strpljenju i pomoći.

Veliko hvala svim kolegama s posla koji su postali i puno više od toga, Ini, Luciji, Heleni, Ivani L., Renatu i Denisu, na svim druženjima koja su uljepšale nekad spore ili loše dane.

Veliko hvala mojoj obitelji, koja još od početka faksa navija za mene i uvijek je spremna pomoći na bilo koji način. Hvala na podršci, na bezuvjetnoj ljubavi i strpljenju. Mojoj Ivani i svim ostalim prijateljima, hvala na beskrajnoj potpori.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Kalcijevi fosfati.....	5
2.1.1. Vrste kalcijevih fosfata.....	5
2.1.2. Stabilnost različitih faza kalcijevih fosfata	12
2.1.3. Biomedicinska primjena kalcijevih fosfata	14
2.2. Biomimetski način pripreme kompozita	15
2.2.1. Biomineralizacija i osnovni principi taloženja	16
2.2.2. Biomaterijali	18
2.2.3. Biomimetska priprema kalcijevih fosfata.....	21
2.3. Nanočestice srebra	22
2.3.1. Infekcije povezane s implantatima i otpornost bakterija na antibiotike	23
2.3.2. Važnost oblika i veličine nanočestica za antibakterijsko djelovanje	24
2.3.3. Antimikrobno djelovanje nanočestica srebra.....	26
2.3.4. Nanočestice srebra u kompozitima	28
2.4. Albumin iz goveđeg seruma	29
2.5. Kitozan	30
2.6. Titanijski implantati i kompozitne prevlake	31
2.6.1. Obrada površine titanija.....	32
2.6.2. Funkcionalizacija površine titanija.....	35
2.6.3. Funkcionalizacija površine titanija kalcijevim fosfatima i njihovim kompozitima	37
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	40
3.1. Materijali	40
3.1.1. Materijali za sintezu i karakterizaciju nanočestica srebra	40
3.1.2. Materijali korišteni za pripravu taložnih sustava	40
3.1.3. Materijali za obradu i prevlačenje površine titanija	40
3.2. Eksperimentalni postupci.....	41
3.2.1. Sinteza nanočestica srebra različite površinske modifikacije.....	41
3.2.2. Stabilnost različito modificiranih nanočestica srebra u vodi i vodenoj otopini Na ₂ HPO ₄	41
3.2.3. Taloženje kalcijevih fosfata u kontrolnom sustavu	42

3.2.4. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti nanočestica srebra različite površinske modifikacije i biomakromolekula.....	42
3.2.5. Obrada površine pločica titanija	44
3.2.6. Priprema kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i biomakromolekula.....	44
3.3. Eksperimentalne metode	47
3.3.1. Dinamičko i elektroforetsko raspršivanje svjetla.....	47
3.3.2. UV-Vis spektroskopija.....	48
3.3.3. Atomska apsorpcijska spektrometrija	48
3.3.4. Spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom	49
3.3.5. Potenciometrija.....	49
3.3.6. Difrakcija rendgenskog zračenja	49
3.3.7. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom	50
3.3.8. Ramanova spektroskopija	51
3.3.9. Termogravimetrijska analiza	51
3.3.10. Brunauer-Emmet-Tellerova metoda određivanja specifične površine.....	52
3.3.11. Elektronska paramagnetska rezonancija	52
3.3.12. Pretražna elektronska mikroskopija s energijski razlučujućom rendgenskom spektroskopijom.....	53
3.3.13. Transmisijska elektronska mikroskopija	54
3.3.14. Mikroskopija atomskih sila	54
3.3.15. Optička profilometrija.....	55
3.3.16. Određivanje kontaktnog kuta i slobodne energije površine	55
3.4. Obrada podataka	57
3.4.1. Potenciometrija.....	57
3.4.2. Statistička obrada podataka.....	58
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	59
4.1. Karakterizacija nanočestica srebra različite površinske modifikacije, albumina iz goveđeg seruma i kitozana	59
4.1.1. Nanočestice srebra različite površinske modifikacije.....	59
4.1.2. Albumin iz goveđeg seruma	65
4.1.3. Kitozan	66
4.2. Biomimetska priprema kompozita kalcijevih fosfata i nanočestica srebra različite površinske modifikacije.....	68
4.2.1. Utjecaj nanočestica srebra različite površinske modifikacije na brzinu transformacije amorfne faze	68
4.2.2. Utjecaj nanočestica srebra različite površinske modifikacije na svojstva amorfne faze kalcijevih fosfata.....	70

4.2.3. Utjecaj nanočestica srebra različite površinske modifikacije na svojstva kristalne faze kalcijevih fosfata.....	74
4.3. Biomimetska priprema kompozita kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i biomolekula.....	82
4.3.1. Utjecaj biomakromolekula i nanočestica srebra različite površinske modifikacije na kinetiku taloženja kalcijevih fosfata.....	82
4.3.2. Utjecaj biomakromolekula i nanočestica srebra različite površinske modifikacije na svojstva amorfne faze kalcijevih fosfata.....	86
4.3.3. Utjecaj biomakromolekula i nanočestica srebra različite površinske modifikacije na svojstva kristalne faze kalcijevih fosfata.....	92
4.4. Biomimetska priprema kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije na modificiranoj površini titanija	102
4.4.1. Utjecaj kemijske obrade na svojstva površine titanija.....	103
4.4.2. Karakterizacija prevlaka kalcijevih fosfata na modificiranim površinama titanija	110
4.4.3. Karakterizacija prevlaka kalcijevih fosfata i nanočestica srebra različite površinske modifikacije na obrađenim površinama titanija	114
4.5. Biomimetska priprema kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i biomolekula na obrađenoj površini titanija	122
4.5.1. Karakterizacija prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i albumina iz goveđeg seruma na modificiranim površinama titanija.....	122
4.5.2. Karakterizacija prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i kitozana na obrađenim površinama titanija	131
§ 5. ZAKLJUČAK	141
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	144
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	146
§ 8. DODATAK.....	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

BIOMIMETSKA PRIPREMA I SVOJSTVA KOMPOZITA NANOČESTICE SREBRA/KALCIJEVI FOSFATI TE KOMPOZITNIH PREVLAKA NA POVRŠINI TITANIJA

Suzana Inkret
Institut Ruđer Bošković

Kompoziti kalcijevih fosfata i nanomaterijala s antimikrobnim svojstvima smatraju se učinkovitim alternativnim pristupom sprječavanju i liječenju infekcija uzrokovanih ugradnjom ortopedskih implantata. Nanočestice srebra posebno su zanimljive zbog njihove široke antibakterijske aktivnosti i male vjerojatnosti uzrokovanja otpornosti bakterija. Biomimetska priprava kompozita kalcijevi fosfati/nanočestice srebra, iako ekonomski i ekološki prihvatljiva metoda koja omogućava prevlačenje implantata kompleksnih oblika, nedovoljno je istražena. U ovom radu je stoga istražena priprema i svojstva kompozita kalcijevih fosfata i nanočestica srebra modificiranih različitim stabilizatorima (natrijev bis(2-etilheksil)sulfosukcinat, poli(vinilpirolidon) i trinatrijev citrat) te višekomponentnih kompozita kalcijevi fosfati/nanočestice srebra s albuminom iz goveđeg seruma i kitozanom. Karakterizacija je pokazala značajan utjecaj nanočestica srebra, albumina i kitozana na brzinu transformacije amorfne u kristalni kalcijev fosfat te na morfologiju amorfne i kristalne taloga kalcijevih fosfata. Pored prahova, biomimetski su pripremane višekomponentne kompozitne prevlake na različito obrađenim površinama titanija. Rezultati su pokazali da uniformnije prevlake nastaju na hrapavijoj površini te su svojstva vlaženja poboljšana prevlačenjem slojem kompozitnih prevlaka kalcijevi fosfati/nanočestice srebra i kompozitnih prevlaka s albuminom ili kitozanom.

(156 + XXVI stranica, 65 + 8 slika, 23 tablice, 299 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: biomakromolekule / kalcijevi fosfati / kompoziti / nanočestice srebra / obrada površine / taloženje / titanijevi implantati

Mentor: dr. sc. Maja Dutour Sikirić, zn. savj.

Rad prihvaćen: 10. rujna 2025.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Dominik Cinčić, redoviti profesor
2. prof. dr. sc. Davor Kovačević, redoviti profesor u trajnom izboru
3. Dr.sc. Jasminka Kontrec, viš znanstveni suradnik



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

BIOMIMETIC PREPARATION AND PROPERTIES OF SILVER NANOPARTICLES/CALCIUM PHOSPHATES COMPOSITES AND COMPOSITE COATINGS ON THE TITANIUM SURFACE

Suzana Inkret
Ruđer Bošković Institute

Composites of calcium phosphates and nanomaterials with antimicrobial properties are considered an effective approach for the prevention and treatment of infections caused by implantation. Silver nanoparticles are attracting attention due to their broad antibacterial activity and low potential to cause bacterial resistance. Although the biomimetic method for the preparation of calcium phosphates/silver nanoparticles composites is economical, ecological, and accepted as a “green” method of preparation that enables the coating of implants with complex shapes, it has not yet been fully explored. For this reason, the biomimetic preparation of calcium phosphates composites with silver nanoparticles modified with different stabilizers (sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate, poly(vinylpyrrolidone), and trisodium citrate) and of multicomponent calcium phosphates/silver nanoparticles composites with bovine serum albumin or chitosan was investigated in this work. The characterization showed a significant influence of silver nanoparticles, albumin and chitosan on the transformation of amorphous into crystalline precipitates and their morphology. In addition, calcium phosphates/silver nanoparticles composite coatings with/without albumin or chitosan were biomimetically prepared on differently etched titanium surfaces. The results showed a greater uniformity of the coatings on a rougher surface and an improvement in the wetting properties of the surfaces after coating.

(156 + XXVI pages, 65 + 8 figures, 23 tables, 299 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: biomacromolecules / calcium phosphates / composites / precipitation / silver nanoparticles / surface modification / titanium implants

Supervisor: Maja Dutour Sikirić, PhD, Scientific Advisor

Thesis accepted: 10th of September 2025

Reviewers:

Dr. Dominik Cinčić, Professor
Dr. Davor Kovačević, Professor
Dr. Jasminka Kontrec, Senior Research Associate

§ 1. UVOD

S obzirom na suvremeni način života i starenje populacije, sve je veća učestalost bolesti i ozljeda čvrstih tkiva, od kojih se veliki broj može uspješno liječiti samo implantacijom. To usmjerava istraživanja prema razvoju novih operativnih tehnika i naprednih multifunkcionalnih materijala, koji, uz to što mogu preuzeti sve funkcije tkiva koje zamjenjuju, imaju antibakterijska ili neka druga biološka svojstva.¹ Kako bi se materijal mogao uspješno koristiti kao biomaterijal za regeneraciju čvrstih tkiva, mora biti biokompatibilan (ne izaziva nikakav imunološki odgovor u tijelu), osteokonduktivan (podržava rast kosti na svojoj površini), osteoinduktivan (promovira vezanje i diferencijaciju stanica za izgradnju kostiju), netoksičan te multifunkcionalan. Različite vrste materijala poput metala i keramika koriste se u te svrhe. Metali se koriste zbog vrlo dobrih mehaničkih svojstava, no nemaju mogućnost oseintegracije, odnosno ne induciraju stvaranje mehanički čvrste veze između koštanog tkiva i implantata. Iz navedenog razloga koriste se u kombinaciji s drugim osteoinduktivnim materijalima.²

Među različitim dostupnim materijalima, kalcijevi fosfati (CaP), slabo topljive soli fosforne kiseline, privlače posebnu pažnju zbog svoje sličnosti s glavnom anorganskom komponentom kostiju, biološkim apatitom.³ Upravo zbog toga oni su biokompatibilni, bioaktivni, imaju osteokonduktivna i osteoinduktivna svojstva i nisu toksični, što im daje prednost pred drugim materijalima te ih čini izvrsnim materijalom za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva.⁴ Danas je poznato 12 nesupstituiranih spojeva kalcijevih fosfata, različitih omjera Ca/P, topljivosti i raspona pH-vrijednosti pri kojima su stabilni. Od njih, kalcijem deficijentni hidroksiapatit (CaDHA), amorfni kalcijev fosfat (ACP), β -trikalcijev fosfat (β -TCP) i hidroksiapatit (HA) su najzastupljeniji i koriste se u za pripremu koštanih i dentalnih implantata.⁵ Njihov nedostatak su loša mehanička svojstva, koja su vrlo važna za koštane implant materijale zbog biološke funkcije koju moraju preuzeti.

Kompoziti kalcijevih fosfata s anorganskim nanomaterijalima i/ili biomolekulama smatraju se mogućim načinom poboljšanja svojstava kalcijevih fosfata.⁴ Pri tome su od posebne važnosti nanomaterijali koji posjeduju antibakterijska svojstva. Usprkos razvoju operativnih tehnika i naprednih bioimplant materijala, veliki problem pri implantaciji i dalje predstavljaju bakterijske infekcije uzrokovane ugradnjom implantata, koje se mogu pojaviti i

do dvije godine nakon same implantacije.⁶ Takve infekcije uobičajeno se liječe antibioticima širokog spektra djelovanja, no njihova sustavna uporaba može dovesti do pojave otpornosti kod bakterija, a i vrlo često nisu dovoljno učinkoviti u liječenju infekcija koje uključuju nastanak biofilma. U slučaju neuspješne terapije antibioticima, ponavlja se operativni zahvat, što povećava rizike od pojave infekcija. Rješenjem toga problema smatraju se novi bioaktivni materijali za implantate antimikrobnih svojstava.^{6,7} U tu svrhu istražuju se i biokeramike u koje su ugrađeni antibiotici kako bi se omogućilo lokalno djelovanje antibiotika, ali i osiguralo kontinuirano otpuštanje kroz dulji vremenski period.⁸ Takvi materijali smatraju se poboljšanjem u odnosu na sustavnu primjenu antibiotika, no ne rješavaju problem pojave otpornosti kod bakterija.⁷ Kako bi se taj problem riješio, istražuju se materijali koji sadrže nanomaterijale antibakterijskog djelovanja. U tu svrhu veliku pažnju privlače nanočestice srebra (AgNP), s obzirom na to da srebro ima široko antibakterijsko djelovanje.⁹ Antibakterijska aktivnost srebra poznata je već dulje vrijeme. Danas se srebro koristi kao antimikrobno sredstvo u raznim industrijskim, medicinskim i kućnim primjenama.¹⁰ Nanočestice srebra zanimljive su jer smanjenje veličine čestica na nanometarsku skalu rezultira većom specifičnom površinom, pa tako i povećanjem antibakterijske aktivnosti.¹¹ Pored toga, mala veličina omogućuje im kontinuirano otpuštanje srebrnih iona kroz interakciju s kisikom i drugim molekulama iz okoline, čime se postiže kontinuirano antibakterijsko djelovanje kroz dulji vremenski period.¹² Dosad je istraživano dopiranje kalcijevih fosfata srebrnim ionima. Na taj način može se ugraditi ograničena količina srebra, što nanočestice srebra čini boljom alternativom za postizanje učinkovitog antibakterijskog djelovanja.^{6,11}

Kompoziti kalcijevih fosfata s biomolekulama privlače pažnju s obzirom na to da je i sama kost kompozit biološkog apatita i kolagena tipa I.¹³ Različiti biokompatibilni bioorganski spojevi, proteini i biološke makromolekule, koriste se za funkcionalizaciju kalcijevih fosfata i poboljšanje njihovih svojstava. Jedan od takvih spojeva je albumin iz goveđeg seruma (BSA), koji se često koristi kao modelni spoj za sustave dostave lijekova te povećanje bioaktivnosti kalcijevih fosfata.⁴ Pored toga, istražuje se funkcionalizacija kalcijevih fosfata kitozanom (Chi), polisaharidom antibakterijskih i antiviralnih svojstava, za koji je pokazano da omogućuje bolju adheziju stanica na kalcijeve fosfate.¹⁴

Različiti kompoziti kalcijevih fosfata mogu se koristiti za liječenje manjih defekata, gdje nisu izloženi većem mehaničkom opterećenju. Pri većim defektima, mehanička

opterećenja su veća i za njihovo liječenje potrebni su implantati dobrih mehaničkih svojstava, kakva posjeduju dosad korišteni implantati od titanija i njegovih legura. Kako bi se ujediniła izvrsna mehanička svojstva titanija te bioaktivna svojstva kalcijevih fosfata i njihovih različitih kompozita, pripremaju se kompozitne prevlake kalcijevih fosfata na površini titanija.² U tu svrhu, s ciljem pripreme bolje površine za adheziju stanica i kompozita, metalni implant materijali obrađuju se na različite načine s ciljem modifikacije površine.^{2,15} Dostupne su razne metode obrade površine poput pjeskarenja, obrade laserom¹⁶ i jetkanja kiselinom.^{15,17} Svaka metoda daje površinu specifičnih svojstava, ali može potencijalno umanjiti izvrsna mehanička svojstva materijala. Za uspješnu primjenu, vrlo je važno ukloniti i ujednačiti inertan sloj oksida s površine titanija, te pripremiti površinu idealne hrapavosti i veličine pora za adheziju stanica. Jetkanje kiselinom daje pore mikrometarske veličine na površini titanija, što se pokazalo idealnim za dobru adheziju prevlaka i stanica. Važno je odabrati metodu koja će omogućiti željeni biološki učinak uz najmanji utjecaj na mehanička svojstva materijala.¹⁵

Kompoziti kalcijevi fosfati/nanočestice srebra pripremani su dosad raznim metodama, kao što su sprej piroliza,¹⁸ pulsno lasersko nanošenje nanočestica srebra na prevlake kalcijevih fosfata,¹⁹ adsorpcija nanočestica srebra na prethodno pripravljene kalcijeve fosfate,²⁰ miješanje suspenzija kalcijevih fosfata i nanočestica srebra²¹ te taloženje pri visokim temperaturama.²² Osim toga, pripremane su i kompozitne prevlake kalcijevih fosfata i nanočestica srebra metodama poput magnetronskog rasprašivanja, rasprašivanja plazme i sol-gel metode.^{23–25} Navedene metode uključuju korištenje visokih temperatura te povišenih ili sniženih tlakova, što ograničava uporabu bioloških molekula u materijalima za prevlačenje, s obzirom na to da u takvim uvjetima dolazi do gubitka njihove aktivnosti. Pored toga, veličina i oblik implantata koji se mogu prevući tim metodama su ograničeni. Uzevši u obzir navedene čimbenike te težnju ekološki i energetski prihvatljivoj pripremi biomaterijala, istražuju se biomimetske metode pripreme pri fiziološkim temperaturama i tlakovima.²⁶

Biomimetska sinteza biomaterijala taloženjem omogućuje pripremu kompozitnih materijala i prevlaka na raznim površinama pri temperaturi, tlaku i pH vrijednosti bliskim fiziološkim. Takva metoda omogućuje ugrađivanje velikog broj različitih vrsta biomolekula u kompozite i kompozitne prevlake, što može dalje povećati njihovu bioaktivnost i općenito poboljšati svojstva. Biomimetska metoda omogućuje pripravu prevlaka na implantatima kompleksnih oblika, što je vrlo važno za širu primjenu u implantologiji.²⁷ Na temelju svega navedenog, očekivano je da će razvoj biomimetske metode priprave kompozita kalcijev

fosfati/nanočestice srebra imati velik značaj u pripravi novih biomaterijala za regeneraciju kostiju, s obzirom na to da podataka o taloženju kalcijevih fosfata u prisutnosti nanočestica srebra pri niskim temperaturama nema u dostupnoj literaturi.

Cilj je stoga ove disertacije istražiti utjecaj nanočestica srebra različite površinske modifikacije na taloženje kalcijevih fosfata i svojstva nastalih kompozita u svrhu razvoja biomimetskog pristupa njihovoj pripremi. Istraživanje je također usmjereno k određivanju utjecaja biomolekula, albumina iz goveđeg seruma i kitozana, na nastajanje i svojstva kompozita kalcijevi fosfati/nanočestice srebra. Dodatno, istražen je utjecaj različite kemijske obrade površine titanija na fizikalno-kemijska svojstva biomimetskih kompozitnih prevlaka kalcijevi fosfati/nanočestice srebra pripremljenih u prisustvu i bez albumina iz goveđeg seruma i kitozana. Postavljene su tri hipoteze:

- i) nanočestice srebra različite površinske modifikacije imaju različit utjecaj na taloženje i svojstva kalcijevih fosfata,
- ii) prisutnost albumin iz goveđeg seruma i kitozan tijekom nastajanja kompozita kalcijevi fosfati/nanočestice srebra utječe na fizikalno-kemijska svojstva nastalih kompozita,
- iii) različita kemijska obrada površine titanija uzrokuje promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima kompozitnih prevlaka kalcijevi fosfati/nanočestice srebra pripremljenih u prisustvu i bez albumina iz goveđeg seruma i kitozana.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kalcijevi fosfati

Kalcijevi fosfati (CaP) su soli fosforne kiseline, vrlo zastupljene u prirodi i organizmima, što ih čini važnim spojevima u istraživanjima i industrijskim procesima. Fosfatna skupina kalcijevih fosfata stabilizira njihovu strukturu, pa su CaP slabo topljivi u vodi, dobro topljivi u kiselinama i netopljivi u bazama. Čisti kalcijevi fosfati kristaliziraju kao prozirni kristali umjerene tvrdoće, dok su čisti prahovi bijele boje. U prirodi se pojavljuju u obliku više različitih spojeva različitih stupnjeva čistoće. Vrlo često su djelomično supstituirani drugim ionima poput željezovih, manganovih, magnezijevih, natrijevih i kalijevih umjesto kalcijevih te karbonatnih, arsenatnih ili vanadatnih umjesto fosfatnih iona. Pored toga, u kristalnoj rešetci prirodnih apatita ponekad su prisutni i hidroksidni, fluoridni, kloridni, bromidni ili karbonatni ioni, što mijenja njihova svojstva i strukturu.²⁸

2.1.1. Vrste kalcijevih fosfata

Danas je poznato je 12 nesupstituiranih faza kalcijevih ortofosfata (tablica 1) koje se razlikuju po omjeru Ca/P, koji određuje topljivost i pH raspon pri kojem su stabilni. Spojevi manjeg omjera Ca/P stabilniji su pri nižim pH te im je topljivost u vodi veća u odnosu na spojeve s većim omjerom Ca/P. Određivanje omjera Ca/P jedan je od načina identifikacije pojedine faze kalcijevih fosfata.²⁸

Od 12 navedenih faza kalcijevih fosfata kao materijali za implantate najvažniji su hidroksiapatit (HA), amorfni kalcijev fosfat (ACP), kalcijem deficiјentni hidroksiapatit (CaDHA) i β -trikalciјev fosfat (β -TCP) zbog njihove sličnosti biološkom apatitu, glavnoj anorganskoj komponenti kostiju.^{5,13} Biološki apatit najsličniji je CaDHA supstituiranom raznim ionima kao što su Na^+ , K^+ , Mg^{2+} i CO_3^{2-} te se u kostima pojavljuje u obliku malih kristalića nastalih u blagim, fiziološkim uvjetima. Pored biološkog apatita tj. karbonat apatita, glavne komponente kostiju su i kolagen tipa I i voda, pa se kosti smatraju organsko-anorganskim kompozitom. Uz kolagen, u kostima se nalaze i različiti nekolagenski proteini, ali oni zajedno čine samo 10 % proteinskog udjela kostiju, dok je ostatak kolagen.¹³

Tablica 1. Nesupstituirane faze kalcijevih ortofosfata i njihova glavna svojstva²⁸

Faza	Formula	Omjer Ca/P	Topljivost / g dm ⁻³ pri 25 °C	pH stabilnost *
Monokalcijev fosfat monohidrat (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	~ 18	0,0 - 2,0
Monokalcijev fosfat bezvodni (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5	~ 17	Stabilan iznad 100 °C
Dikalcijski fosfat dihidrat (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	~ 0,088	2,0 – 6,0
Dikalcijski fosfat bezvodni (DCPA)	CaHPO_4	1,0	~ 0,048	[1]
Oktakalcijev fosfat (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	~ 0,0081	5,5 - 7,0
α -trikalcijski fosfat (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	~ 0,0025	[2]
β -trikalcijski fosfat (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	~ 0,0005	[2]
Amorfni kalcijev fosfat (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$; $n = 3 - 4,5$	1,2 - 2,2	Nije točno izmjereno	~5,5 -7,0 [3]
Kalcijem deficijentni hidroksiapatit (CaDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, $0 < x < 1$	1,5 – 1,67	~ 0,0094	6,5 - 9,5
Hidroksiapatit (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	~ 0,0003	9,5 - 12
Oksiapatit (OA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1,67	~ 0,087	[2]
Tetralcijski fosfat (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0	~ 0,0007	[2]

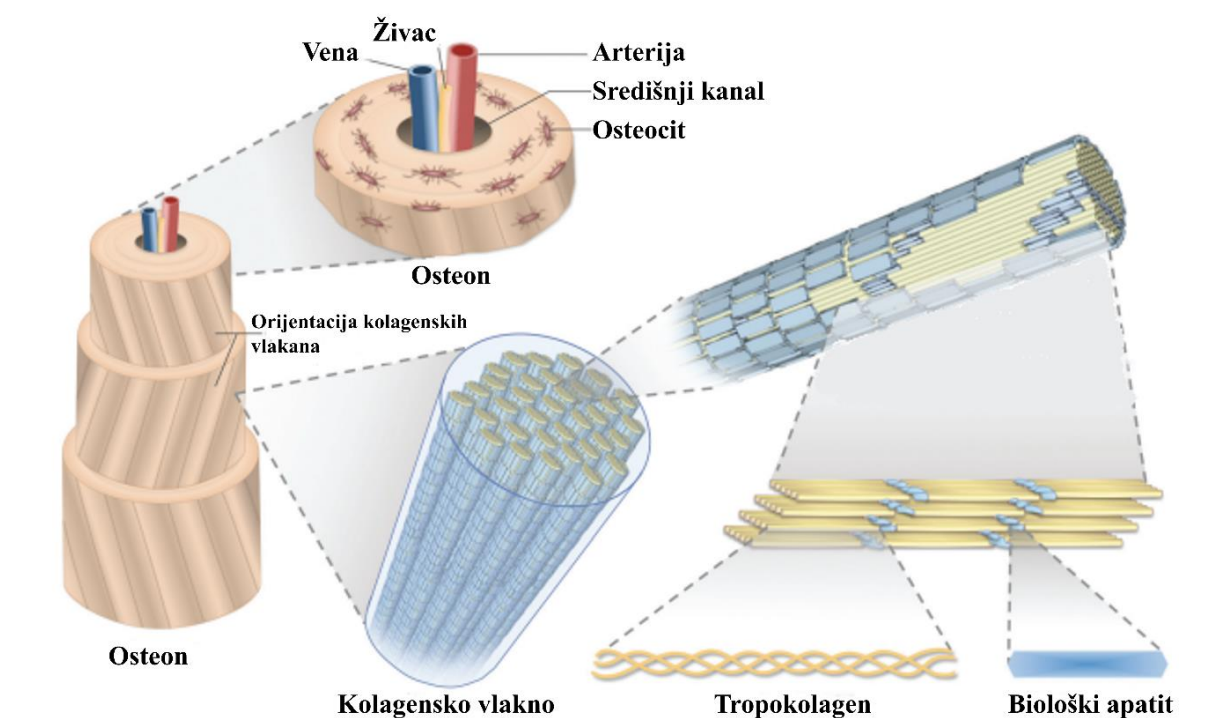
* Raspon pH vodene otopine pri kojim su spojevi stabilni pri 25 °C,

[1] stabilan pri temperaturama iznad 100 °C,

[2] spojevi se ne mogu istaložiti iz vodenih otopina,

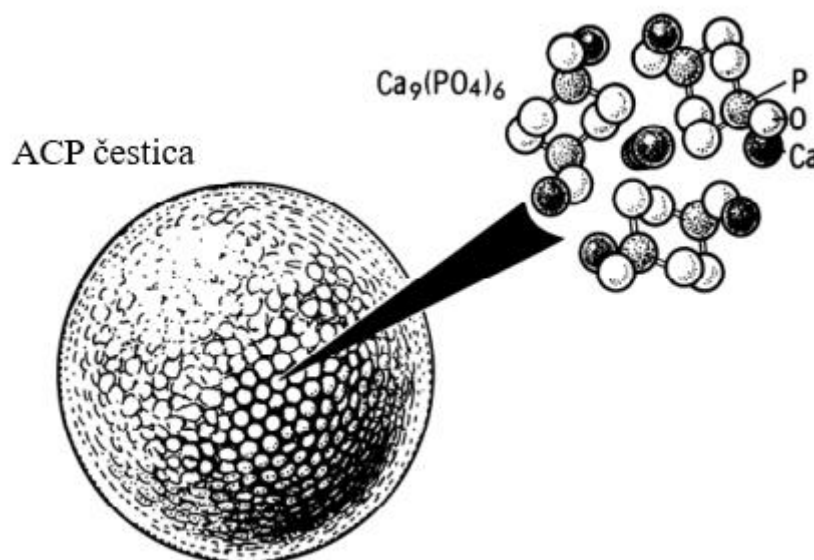
[3] metastabilan.

Kost ima vrlo složenu strukturu organiziranu u 7 do 12 hijerarhijskih razina, ovisno o izvoru (slika 1).^{13,29–31} Tijekom biomineralizacije kosti, nastajanje anorganskih kristala strogo je kontrolirano organskom matricom, koja upravlja brzinom rasta, dimenzijama, orijentacijom i oblikom kristala.³² Struktura i rast kostiju definirani su dugim fibrilima i vlaknima kolagena, dok stabilnost i rigidnost strukture osiguravaju kristali biološkog apatita.¹³ Takva kompleksna struktura kostiju rezultira velikom mehaničkom snagom i elastičnošću. Kost je dinamično tkivo, s obzirom na to da cijelo vrijeme prolazi kroz cikluse remodeliranja. Proces remodeliranja rezultat je resorptivne aktivnosti osteoklasta, stanica važnih u razgradnji kostiju, i osteoblasta, stanica važnih u sintezi kostiju. Do danas, repliciranje biomineralizacije nebiološkim metodama nije uspjelo. Realističniji pristup je razvoj bioinspiriranih procesa za dobivanje materijala modificiranih funkcija, koji se temelje na korištenju jeftinih i dostupnih polaznih materijala, kao što su razne faze kalcijevih fosfata, amorfni kalcijev fosfat, kalcijem deficitarni kalcijev fosfat, β -trikalcijev fosfat i hidroksiapatit.³²



Slika 1. Hijerarhijska građa kostiju (konstruirano prema ref. 31)

Od svih faza CaP-a, amorfni kalcijev fosfat je najnestabilnija i jedina amorfna faza. Sastav ACP-a je promjenjiv i ovisi o pH medija i koncentraciji ishodnih otopina reaktanata.²⁸ S obzirom na to da je ACP amorfna faza CaP-a, nema uređenu strukturu, ali kako nisu izolirane zasebne amorfne vrste za svaki CaP, smatra se da je ACP međuprodukt pri nastajanju drugih faza CaP-a. U istraživanjima je, pored prve amorfne faze, opažena i druga amorfna faza (ACP2) nešto drugačije morfologije, koja se ponekad javlja kao prijelazno stanje iz prve amorfne faze u prvu kristalnu.³³ Iako nemaju uređenje velikog dometa, smatra se da obje faze posjeduju uređenost kratkog dometa. Predložena strukturna jedinica je sferična čestica ACP-a koja se sastoji od nasumično raspoređenih sferičnih klastera sastava $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ tzv. Posnerovih klastera (slika 2).^{28,34,35}



Slika 2. Shematski prikaz sferične ACP čestice i njene strukture (konstruirano prema ref. 36)

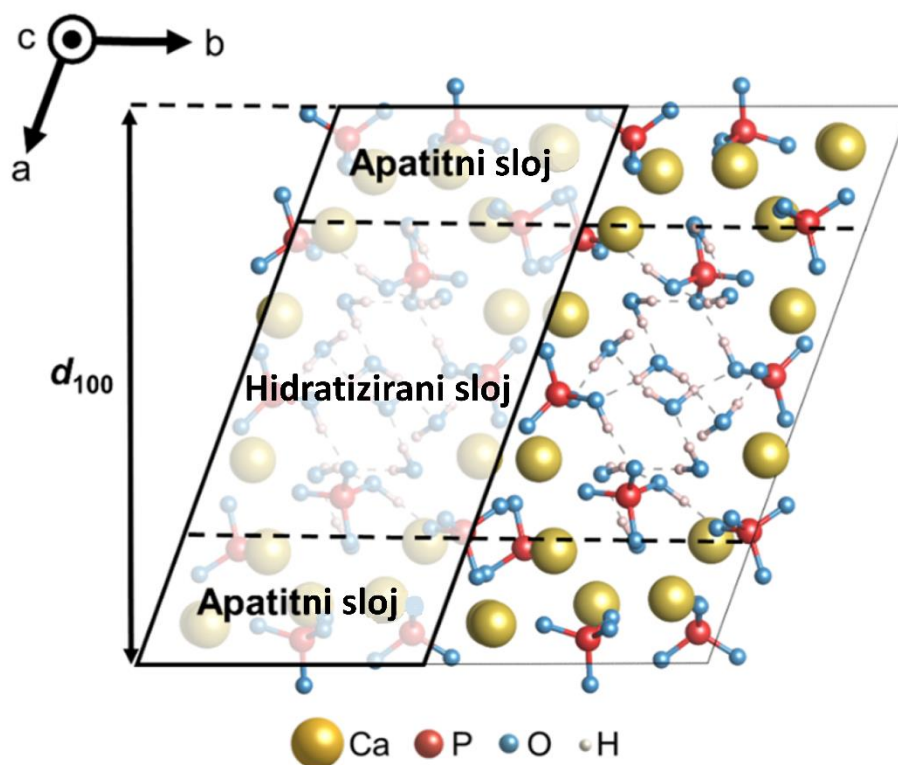
U uvjetima bliskim fiziološkim, ACP nastaje taloženjem iz otopine miješanjem koncentriranih otopina reaktanata, kalcijevih i fosfatnih iona.^{36,37} Njegova stabilnost ovisi o uvjetima pripreme poput koncentracije reaktanata, pH matičnice te prisutnosti aditiva koji mogu inhibirati ili promovirati transformaciju. ACP je nestabilan i transformira u dodiru s matičnicom, pa njegova priprema i izolacija iz reakcijske smjese mora biti brza. Starenjem u matičnici, ACP prelazi u termodinamički stabilnije kristalne faze, najčešće oktakalcijev fosfat (OCP), kalcijem deficijentni hidroksiapatit (CaDHA), hidroksiapatit (HA), kalcijev hidrogenfosfat dihidrat ili njihove smjese.^{28,34,38} Razni ioni prisutni u matičnici mogu utjecati

na stabilnost ACP-a, pa tako ioni magnezija, cinka, citratni i karbonatni ioni usporavaju transformaciju ACP-a u kristalnu fazu, bilo adsorpcijom na površini čestica, bilo ugradnjom u njegovu strukturu.³⁹

Rana istraživanja nastajanja i funkcije kostiju pokazala su da je glavna anorganska komponenta kostiju tzv. biološki apatit, vrlo sličan kalcijem deficijentnom hidroksiapatitu. CaDHA ima varijabilan sastav te ga karakterizira manjak kalcija praćen manjkom hidroksilnih skupina i protoniranjem nekih fosfatnih skupina u strukturi uz istovremeno nastajanje ionskih šupljina. U neke od ionskih šupljina čvrsto se vežu molekule vode. Manjkom navedenih iona gubi se stehiometrija, zbog čega je CaDHA obično supstituiran drugim ionima prisutnim u reakcijskoj smjesi prilikom pripreme.²⁸ Deficijencija kalcija utječe na mehanička i elastična svojstva, što je ona veća, tvrdoća i čvrstoća su manje.⁴⁰ Navedene strukturne značajke te mogućnosti raznih supstitucija čine CaDHA slabo kristalnim spojem s kristalima submikronske veličine te, iako stabilnijim od ACP-a, manje stabilnim od hidroksiapatita.²⁸ Priprema se najčešće taloženjem iz reakcijske smjese reaktanata kalcija i fosfata pri čemu kao prva faza najčešće nastaje ACP.^{41–43} Ovisno o eksperimentalnim uvjetima CaDHA može nastati preko jedne ili više prekursorskih faza. Pokazano je da pri pH vrijednostima većim od 9,5 nastaje samo preko ACP-a.⁴⁴ Pri nižim vrijednostima pH prekursorske faze slijede Ostwaldovo pravilo, tj. prvo nastaje termodinamički najnestabilnija faza, a zatim redom stabilnije termodinamički stabilnije faze.⁴⁵ Pored toga, pri fiziološkim uvjetima (pH 7,4 i 37 °C) CaDHA nastaje preko dikalcijevog fosfata dihidrata (DCPD) i OCP-a bez nastajanja ACP-a, što ukazuje na raznolikost mehanizama nastanka CaDHA koji ovise o eksperimentalnim uvjetima.⁴⁶

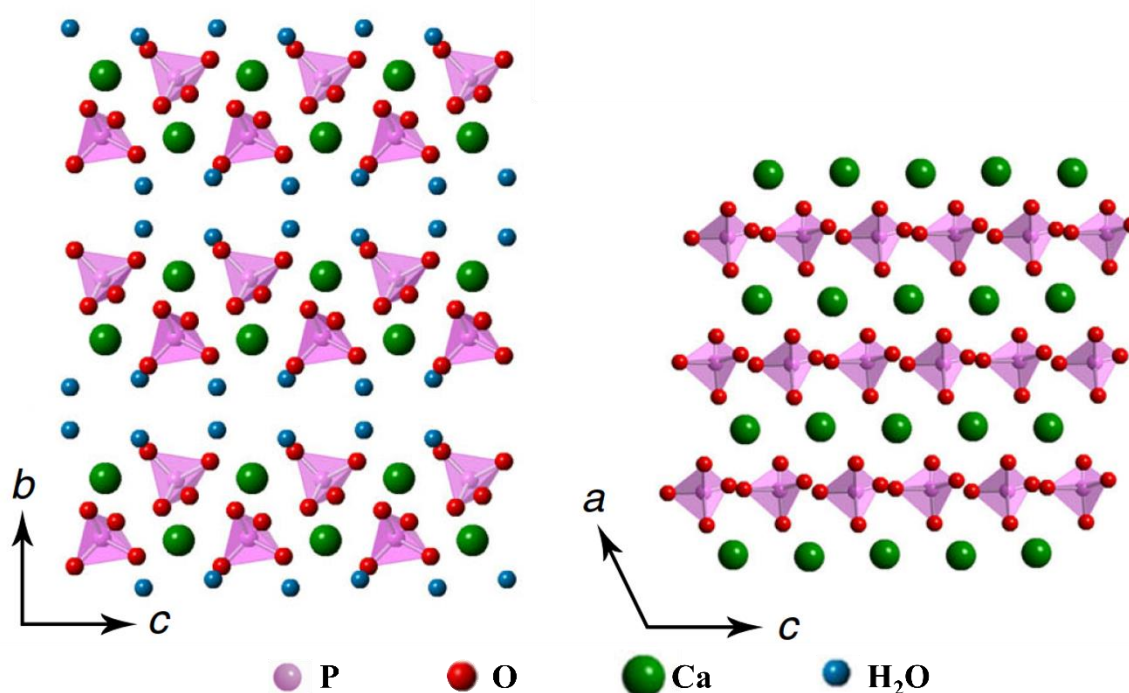
Oktakalcijev fosfat ili oktakalcijev bis(hidrogenfosfat) tetrakis(fosfat) pentahidrat slabo je topljiva faza CaP-a koja se najčešće javlja kao metastabilna faza prilikom pripreme termodinamički stabilnijih faza u vodenoj otopini.^{28,35} OCP kristalizira u triklinskom sustavu te ima slojevitú strukturu (slika 3). Slojevi kalcijevih i fosfatnih iona strukture slične hidroksiapatitu izmjenjuju se s hidratiziranim slojevima.^{28,47–49} Postoji nekoliko načina pripreme OCP-a, kao što su hidroliza DCPD-a, homogena kristalizacija iz otopine u rasponu pH 5,7–7,0 i pri povišenoj temperaturi te kontrolirano dodavanje otopine kalcija u otopinu fosfata pri pH 4,5 i povišenoj temperaturi pri čemu nastaje čisti OCP.⁵⁰ U odnosu na hidroksiapatit, OCP je nešto topljiviji, što je posljedica manjeg omjera Ca/P, koji uvjetuje uređenost kristalne strukture, stabilnost, a samim time i topljivost. S obzirom na sličnost s

hidroksiapatitom, a slijedom toga i CaDHA, iz OCP-a je moguće dobiti HA te CaDHA bilo *in situ* hidrolizom OCP-a ili otapanjem OCP-a praćenim taloženjem HA, na što utječe prisutnost raznih anorganskih i organskih vrsta.^{28,51}



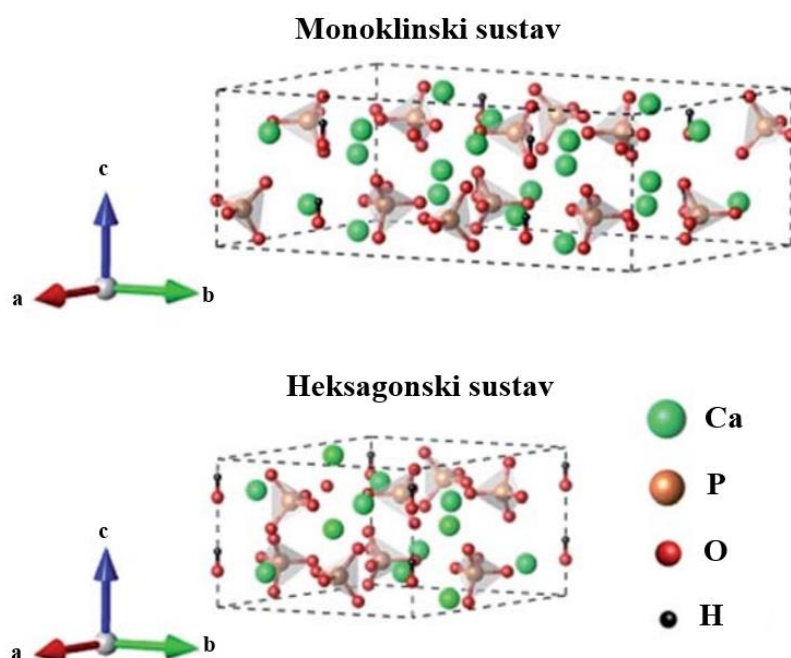
Slika 3. Kristalna struktura oktakalcijevog fosfata (OCP) duž osi *c* (konstruirano prema ref. 49)

Dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD) ili kalcijev hidrogenfosfat dihidrat poznatiji je kao mineral brušit. Prisutan je većinom u patološkim depozitima (zubni i mokraćni kamenac) te se smatra jednim od međuprodukata prilikom mineralizacije kostiju. Priprema se taloženjem iz otopina u kojima je omjer Ca/P oko 1 u pH rasponu od 2,0 do 6,5. Osim toga, može se pripremiti i reakcijom fosforne kiseline i različitih soli kalcija, kao što su kalcijev karbonat ili neki od ostalih kalcijevih fosfata, CaDHA, HA ili tetrakalcijev fosfat (TTCP).²⁸ Kristalizira u monoklinskom sustavu te ima slojevitú strukturu u kojoj se dvosloji kalcijevih i hidrogenfosfatnih iona izmjenjuju s dvoslojima molekula vode (slika 4).^{52,53} Pri povišenim temperaturama transformira se u bezvodni dikalcijev fosfat (DCPA), pri čemu dolazi do promjena u strukturi,⁵⁴ smanjenja volumena i topljivosti.⁵⁵ Ovisno o eksperimentalnim uvjetima može se i transformirati u CaDHA.⁵⁶



Slika 4. Kristalna struktura dikalcijevog fosfata dihidrata (DCPD) (preuzeto iz ref. 53)

Hidroksiapatit (HA) ili pentakalcijev hidroksid tris(ortofosfat) smatra se termodinamički najstabilnijom i najmanje topljivom fazom CaP-a. Ima uređenu kristalnu strukturu, a kristalizira u prostornoj skupini $P2_1/b$, kada se radi o stehiometrijskom HA, te u prostornoj skupini $P6_3/m$ kada HA nije stehiometrijski (slika 5).⁵⁷ Pri povišenim temperaturama monoklinski HA prelazi u heksagonski, dok pri sobnoj temperaturi heksagonski HA nije stabilan ako u strukturi nisu prisutni supstituenti.^{28,47,58} Hidroksiapatit je moguće pripremiti na različite načine koji uključuju reakcije u krutom stanju ili u otopini.⁵⁹ Jedan od čestih načina pripreme u vodenoj otopini miješanje je ekvimolarnih vodenih otopina Ca^{2+} i PO_4^{3-} pri pH otopine većem od 9, nakon čega nastali produkt stari u matičnici pri povišenoj temperaturi i u atmosferi bez prisutnosti ugljikovog dioksida. Nastali produkt se nakon starenja sinterira pri temperaturi 1000 °C.⁶⁰ Postupak se odvija u više koraka s obzirom na to da nastaje nekoliko međuprodukata koji uključuju ACP i CaDHA. Osim toga, HA se priprema reakcijama u krutom stanju, kao što je reakcija drugih CaP-a (DCPA, DCPD, OCP) s CaO, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ i CaCO_3 pri temperaturi 1200 °C.⁴⁷ Postoji još nekoliko načina pripreme u kojima nastaju kristalni HA različitih veličina: veliki kristali, mikro-kristali ili nanočestice.³⁵

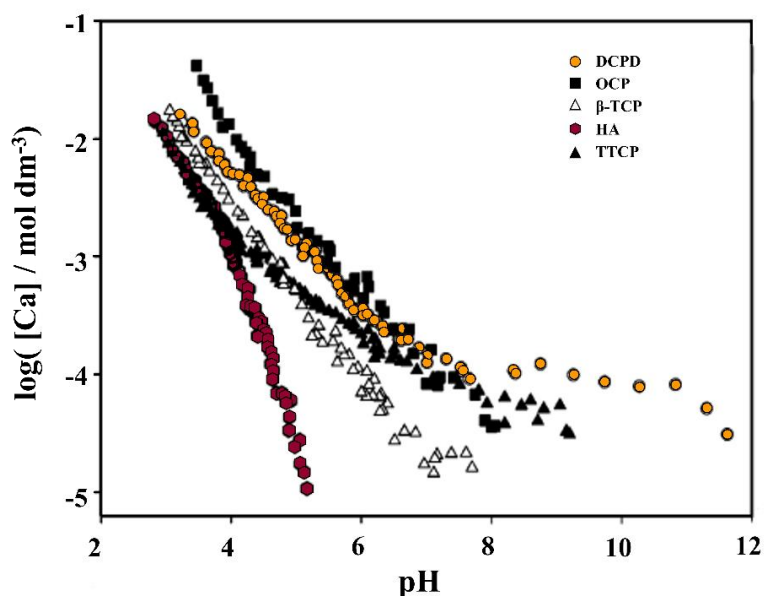


Slika 5. Različite kristalne strukture hidroksiapatita (konstruirano prema ref. 57)

2.1.2. Stabilnost različitih faza kalcijevih fosfata

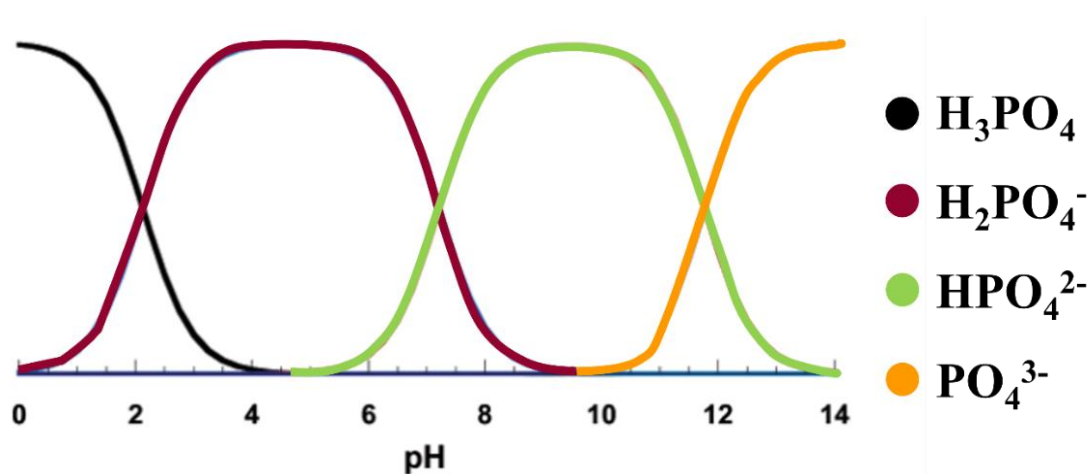
Stabilnost kalcijevih fosfata u vodenim otopinama prikazana je na dijagramu ovisnosti topljivosti o pH vrijednosti taložnog sustava pri stalnoj ionskoj jakosti. Iz navedenog dijagrama (slika 6) vidljivo je da je hidroksiapatit najmanje topljiva, odnosno najstabilnija forma. Slijede ga β -TCP, TTCP, OCP i DCPD. Dugo se smatralo da je pri pH vrijednosti nižoj od 4 DCPD najstabilnija forma. Korištenjem titracije u čvrstom stanju, određena je prava topljivost pojedinih CaP-a, pri čemu je utvrđeno da je pri $\text{pH} < 4$ najstabilnija faza hidroksiapatit, dok je topljivost tetrakalcijevog fosfata vrlo slična. Porastom pH vrijednosti, topljivost svih CaP-a pada, no najveći pad vidljiv je pri pH vrijednostima iznad 4 za hidroksiapatit. Iznad $\text{pH} = 4$, topljivost TTCP-a pada sporije zbog čega TTCP može biti postojan i pri višim pH.^{28,61} Koja će faza u danim eksperimentalnim uvjetima nastati ne ovisi samo o stabilnosti pojedine vrste, već i o kinetičkim čimbenicima. HA nastaje sporije nego OCP ili DCPD, pa oni vrlo često nastaju prije HA te se, ovisno o uvjetima, mogu transformirati u stabilnije faze. Iz navedenih razloga, a s obzirom na to da su suspenzije u kojima dolazi do taloženja CaP-a vrlo često prezasićene na više faza, konačni produkt rezultat je kinetičkih i termodinamičkih čimbenika. Tako DCPD nastaje kao konačni, kinetički

kontrolirani produkt pri niskim pH, iako pri tim uvjetima nije termodinamički najstabilnija faza.^{61,62}



Slika 6. Ovisnost topljivosti kalcijevih fosfata o pH pri 37 °C. Podaci su dobiveni titracijom u krutom stanju. DCPD – dikalcijev fosfat dihidrat, OCP – oktakalcijev fosfat, β -TCP – β -trikalcijev fosfat, HA – hidroksiapatit, TTCP – tetrakalcijev fosfat (konstruirano prema ref. 61).

Prilikom pripreme CaP-a, pH je važan jer o njemu ovisi koja će vrsta fosfatnog iona biti prisutna u taložnom sustavu. S obzirom na to da je fosforna kiselina troprotonska, disocira u tri stupnja. Svaka je vrsta stabilna u određenom području pH (slika 7). Navedeno je važno uzimati u obzir prilikom ciljane pripreme CaP-a.⁶³



Slika 7. Raspodjela ionskih vrsta fosforne kiseline u ovisnosti o pH (konstruirano prema referenci 63)

2.1.3. Biomedicinska primjena kalcijevih fosfata

Kalcijevi fosfati istražuju se dugi niz godina zbog svoje uloge u normalnoj i patološkoj biomineralizaciji te različitim industrijskim procesima.³ CaP su u biološkim sustavima prisutni u obliku supstituiranih spojeva.²⁸ Imaju izvrsnu biokompatibilnost, bioaktivni su, interagiraju s čvrstim tkivima u tijelu te sudjeluju u aktivnoj rekonstrukciji kostiju. Pomažu u stvaranju veze implantata i kosti, što omogućuje lakšu integraciju implantata u tijelo, odnosno potiču oseointegraciju. Pored toga, CaP imaju osteokonduktivna svojstva, odnosno omogućuju adheziju, migraciju i proliferaciju osteoblasta, stanica koje imaju važnu ulogu u gradnji i popravku kostiju. Uzevši u obzir veliku sličnost biološkom apatitu, CaP u organizmu ne izazivaju imunološki odgovor, s obzirom na to da ih organizam ne prepoznaje kao strani materijal.⁴ U medicinskim primjenama, pored monofaznih CaP-a, koriste se i višefazne biokeramike kalcijevih fosfata, pri čemu su komponente, odnosno dvije ili više faza CaP-a, pomiješane na mikrometarskoj razini tako da ih nije moguće odvojiti, ali zadržavaju svoj kemijski identitet.^{3,64,65} Na taj način dobivaju se biokeramike modificiranih svojstava, pri čemu svojstva ovise o količini pojedine faze CaP-a prisutne u formulaciji. Kombiniraju se različite faze, stabilnije s onima manje stabilnima, koje su ujedno i topljivije, kako bi se dobila biokeramika koju tijelo može lakše resorbirati.³

Kako se sama kost može smatrati organsko/anorganskim kompozitom, biomolekule se često koriste za pripremu kompozita ili funkcionalizaciju CaP-a. Navedeno uključuje pripremu različitih kompozita, prevlaka i tankih filmova na površini kalcijevih fosfata u svrhu dobivanja CaP-a poboljšanih svojstava za biomedicinsku primjenu.⁴ Na taj način pokušava se imitirati prirodna kost i njena izvrsna mehanička i bioaktivna svojstva.¹³ U tu svrhu koriste se razni proteini, polisaharidi, aminokiseline, te se istražuju razne biomolekule koje mogu doprinijeti poboljšanju svojstava CaP-a.²

Pored biomolekula, koriste se različiti ioni i nanomaterijali metala koji mogu poboljšati mehanička i biološka svojstva CaP-a.⁴ Za dopiranje su korišteni ioni magnezija, cinka, silicija, mangana i željeza za poboljšanje osteogenih svojstava CaP-a.⁶⁶ Pored toga, korištene su nanočestice magnezija i stroncija zbog poboljšanja resorpcije CaP-a u tijelu⁶⁷ te su istraživane nanostrukture kalcijevih fosfata s ugrađenim česticama selenija i srebra zbog poboljšanja antibakterijskog djelovanja.⁶⁸

Iako imaju izvrsna biokompatibilna svojstva, CaP imaju loša mehanička svojstva, što je dosad ograničavalo njihovu kliničku primjenu na dijelove tijela koji nemaju strukturalnu

zadaću, odnosno nisu izloženi opterećenju. S druge strane, dosad korišteni titanijski implantati posjeduju izvrsna mehanička svojstva, no sam metal, iako biokompatibilan, nije osteoinduktivan ni osteokonduktivan. Iz navedenih razloga, pripremaju se modificirani titanijski implantati prekriveni raznim prevlakama, tankim filmovima i slojevima. Kako je nastajanje apatita na površini implantata ključan korak u integraciji istog u tijelo,⁶⁹ vrlo dobar kandidat za pripremu prevlaka su kalcijevi fosfati, koji mehanički pogodnom materijalu daju bioaktivna svojstva. Na taj način osigurava se mehanička snaga potrebna implantatima koji se ugrađuju na mjestima izloženim opterećenju.²

2.2. Biomimetski način pripreme kompozita

Primjena mehanizama i metoda otkrivenih proučavanjem prirode i prirodnih procesa u dizajniranju i razvoju novih materijala te kemijskih spojeva, zajedničkim imenom naziva se biomimetika.⁷⁰ Biomimetika nije pojam usko povezan s kemijom ili znanostima o materijalima, već se može odnositi na razne moderne tehnološke procese. Usprkos velikim postignućima i otkrićima moderne znanosti i tehnologije, još uvijek nisu pripravljeni sintetski materijali svojstava jednakih onima čvrstih tkiva.^{70,71} To je i očekivano, uzevši u obzir da se u prirodi procesi, pa tako i biomineralizacija usavršavaju već milijunima godina. Tako je biomineralizacija vrlo kompleksan proces s najvažnijom značajkom biološke kontrole sastava, morfologije i svojstava. Biomineralizacija je proces taloženja anorganskih soli iz kompleksnih otopina unutar organske matrice. Tako nastaju biominerali u tijelu kao što su kosti, dentin, zubna caklina te patološki biominerali zubni karijes i mokraćni kamenci. Kosti i dentin sadrže ukupno 70,9 % anorganske tvari, dok manji udio pripada kolagenu i ostalim biomolekulama. Biološke molekule često služe kao matrica unutar koje se odvija strogo kontrolirana mineralizacija. Mehanizmi kontrole uključuju kontrolu topljivosti, nukleacije i rasta kristala, stvaranje specifičnih prostora za mineralizaciju, preferencijalnu nukleaciju i kontrolu mineralnog rasta organskim granicama.⁷¹ Kristalna struktura, kemijski sastav i većina kemijskih i fizikalnih svojstava biominerala su poznati, no fiziološki procesi koji upravljaju njihovim nastajanjem još uvijek nisu do kraja razlučeni, ali mnoga fizikalno-kemijska načela nukleacije i rasta kristala važna za biomineralizaciju razjašnjena su proučavanjem otopina sintetskih analoga biominerala.⁷¹ Biomimetskom sintezom smatra se proces dobivanja produkata kemijskim reakcijama koje oponašaju biološke procese korištenjem reakcijskih

uvjeta i reaktanata što sličnijih onima u biološkim sustavima. Pored toga, biomimetskim materijalima smatraju se materijali dobiveni različitim kemijskim procesima, ne nužno sličnim biološkim procesima, koji posjeduju svojstva bliska biološkim tkivima.⁷²

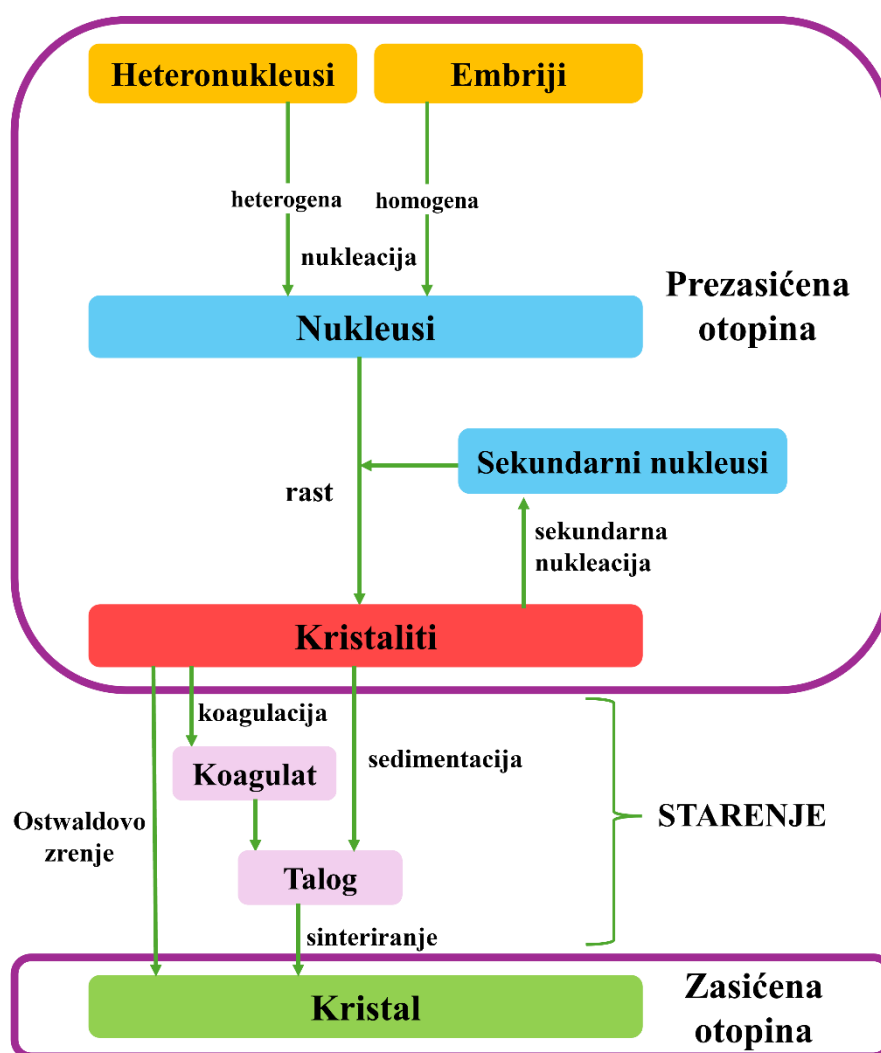
2.2.1. Biomineralizacija i osnovni principi taloženja

Kao što je već rečeno, biomineralizacija se može pojednostavljeno smatrati taloženjem čvrste faze iz otopine kompleksnog sastava u prisutnosti organske matrice. Taloženje je proces nastajanja nove faze iz roditeljske faze, pri čemu se u užem smislu taloženjem smatra nastajanje krute faze iz vodenih otopina. U slučaju nastanka kristalnog produkta, proces se naziva kristalizacija. Sam proces taloženja dijeli se u nekoliko faza, pri čemu je nukleacija prvi korak (slika 8).^{73,74} Nukleacija je proces nastajanja centara na kojima može doći do spontanog rasta, što je moguće samo u prezasićenoj otopini. Prije same nukleacije dolazi do kontinuiranog nastajanja i otapanja ionskih i molekulskih klastera. Klaster koji dosegne kritičnu veličinu, nakon koje slijedi kristalni rast, naziva se nukleus. Vrijeme od postizanja prezasićenja do nastanka nukleusa naziva se vremenom indukcije. Nukleacija može biti homogena i heterogena, pri čemu se homogena odvija pri velikim prezasićenjima i uključuje nastanak velikog broja čestica, dok se heterogena odvija na nečistoćama u otopini. Heterogena nukleacija je energetski povoljnija, pa do nje dolazi pri manjim prezasićenjima. Postoji nekoliko teorija nukleacije temeljenih na termodinamičkom, statističkom, mehanističkom i kinetičkom pristupu. Glavni problem proučavanja nukleacije je mala veličina nukleusa, nemogućnost predviđanja lokacije pojave prvih nukleusa u sustavu, a pored toga nukleusi su nestabilni te odmah po nastanku nastavljaju s rastom.^{71,75}

Kristalni rast rezultat je niza uzastopnih procesa u otopini i na površini kristala, kao što su transport iona ili molekula, reakcije na međupovršini i ugradnja u kristalnu rešetku. Razni čimbenici poput stupnja prezasićenja otopljene tvari, veličine kristala, dostupne površine kristala za rast i morfologije kristalnih ploha utječu na brzinu i mehanizam kristalnog rasta. Rast je kontroliran površinskim procesima pri malim prezasićenjima, dok je pri velikim prezasićenjima kontroliran transportom materijala kroz otopinu.⁷⁵

Nastali kristali u dodiru s matičnicom podložni su sekundarnim procesima kao što su Ostwaldovo zrenje, koagulacija i transformacija metastabilnih faza kojima nastaje termodinamički stabilan talog. Ostwaldovo zrenje proces je u kojem dolazi do otapanja manjih kristala i dijelova kristala koji imaju visoku energiju te taloženja viška otopljene tvari

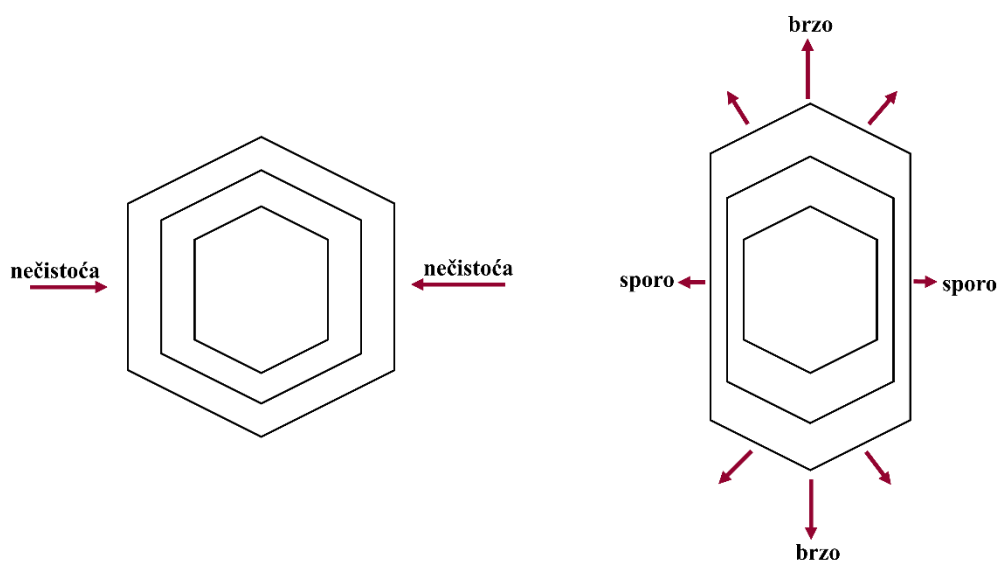
na dijelovima kristala manje energije. Na taj način nastaje termodinamički stabilniji talog. Agregacija je proces u kojem dolazi do smanjenja broja čestica zbog njihova spajanja u veće čestice, čemu slijedi taloženje agregata i prestanak rasta zbog smanjenja površine dostupne za rast. Do transformacije metastabilnih faza dolazi u taložnom procesu gdje može nastati nekoliko faza. Prvo nastaje najnestabilnija faza, ona najveće topljivosti, koja se zbog velike energije pretvara u stabilniju fazu te transformacija završava pretvorbom u termodinamički najstabilniju fazu.^{74,75}



Slika 8. Shema taložnih procesa (konstruirano prema ref. 74)

Na taloženje i kristalizaciju mogu utjecati razni aditivi, pri čemu dolazi do promjene ravnotežnog oblika kristala, promocije ili inhibicije nukleacije, kristalnog rasta, stabilizacije i

agregacije. Učinak pojedinog aditiva ovisi o njegovoj vrsti i koncentraciji, a istražuje se pri stalnim eksperimentalnim uvjetima kao što su koncentracija reaktanata, stupanj prezasićenja, temperatura i način miješanja.^{71,76} Aditivi se mogu ili ugraditi u kristalnu rešetku ili se adsorbirati na površinu kristala. Ugradnja aditiva u kristalnu rešetku može narušiti strukturu kristala i smanjiti brzinu njihova rasta. Adsorpcijom na površinu ploha kristala, aditivi utječu na brzinu rasta u smjeru okomitom na te plohe.⁷⁷ Pojedini aditivi, ovisno o njihovoj vrsti i koncentraciji, mogu promovirati ili inhibirati rast kristala te značajno utjecati na svojstva konačnog kristala.⁷⁶ Brzina rasta kristalnih ploha ovisi o intermolekulskom međudjelovanju, pa ako se aditiv selektivno adsorbira na određenu kristalnu plohu, ali ne i na ostale, ta će ploha biti veća u odnosu na onu nastalu bez prisutnosti aditiva (slika 9). Iz navedenog razloga, usporedbom morfologije kristala moguće je odrediti utjecaj pojedinog aditiva, s obzirom na to da je morfologija kristala definirana relativnim brzinama rasta pojedinih ploha.^{71,74–76,78}



Slika 9. Shematski prikaz promjene habitusa kristala uslijed selektivne adsorpcije aditiva na kristalne plohe (konstruirano prema ref. 78)

2.2.2. Biomaterijali

Materijali koji se koriste kao zamjene ili podrška za tkiva u medicinskim primjenama smatraju se biomaterijalima. Istraživanje biomaterijala usmjereno je k razvoju materijala fizikalnih svojstava, što sličnijih tkivu koje zamjenjuju, uz minimalnu moguću toksičnost. Pri tome je najveći izazov postizanje stabilne veze između implantata i okolnog tkiva, što je ključno za dugotrajan uspjeh biomaterijala.⁷⁹ Napredak u razumijevanju procesa nastajanja

kostiju i uloga stanica omogućio je razvoj biomaterijala naprednih svojstava, pri čemu se kronološki razlikuju 4 generacije. Prva generacija biomaterijala gotovo su inertni materijali čija je glavna značajka indukcija rasta tanke, fibrozne kapsule na njihovoj površini, koja odvaja normalno tkivo od implantata.^{79,80} U skupinu gotovo inertnih materijala spadaju metali i keramike, čija je uporaba vrlo raširena. Glavni im je cilj postizanje što manjeg imunološkog odgovora organizma domaćina, odnosno što veća biokompatibilnost.⁷⁹ Prva generacija materijala često dovodi do mehaničkih problema, s obzirom na to da ne dolazi do integracije implantata u tkivo domaćina.^{79,81}

Druga generacija biomaterijala usmjerena je na uvođenje bioaktivnih i osteoinduktivnih komponenti za kontrolirano djelovanje u fiziološkom okruženju. Istraživano je poboljšanje u nastanku čvrste veze implantata i kosti, odnosno osteoinduktivni materijali koji potiču diferencijaciju stanica u osteoblaste, stanica za gradnju kostiju. Ciljano je na stvaranje heterogenih mjesta nukleacije na površini implantata koja bi omogućila kristalizaciju biološki aktivnog karboniranog hidroksiapatita ekvivalentnog anorganskoj mineralnoj fazi kostiju. Takav sloj omogućava kolonizaciju površine implantata osteoblastima te njihovu proliferaciju i diferencijaciju. Rezultat kolonizacije je formiranje nove kosti koja ima čvrstu vezu s površinom implantata.⁸¹ Druga generacija biomaterijala primjenjuje se od 80-ih godina prošlog stoljeća u razne ortopedске svrhe. Tako se sintetski hidroksiapatit rutinski koristi za pripremu poroznih implantata, prahova i prevlaka na metalnim protezama za postizanje njihove bioaktivne fiksacije.⁶⁰ Takav materijal ima i dodatna osteokonduktivna svojstva, mogućnost dopreme iona i molekula do mjesta oštećenja kosti. Pored toga, korištene su staklokeramike i bioaktivna stakla kao implant materijali za manje kosti. Navedeni primjeri doveli su do pozitivnog odgovora tkiva, odnosno osteokondukcije, gdje je nova kost rasla duž prevlaka te se formirala stabilna veza implantat–kost.⁸¹ U toj generaciji materijala su nadalje razvijeni resorptivni materijali koji su u kliničkim istraživanjima pokazali kontrolirani kemijski raspad i resorpciju. Takvi materijali viđeni su kao rješenje nastanka stabilne veze implantat–kost, s obzirom na to da je ugradnjom implantata, stran materijal s vremenom zamijenjen regeneriranim tkivom.⁷⁹

Bioinertni, bioaktivni i resorptivni implantati prve i druge generacije biomaterijala ključni su za medicinske potrebe sve starije populacije, no nisu trajno rješenje. Takvi implantati imaju svoj rok trajanja te je ovisno o mjestu ugradnje potreban revizijski operacijski zahvat 10–25 godina nakon prve ugradnje.⁸² Navedeno usmjerava istraživanja na

biološke metode popravljanja i regeneracije tkiva. Iz navedenog razloga istražuju se i dizajniraju biomaterijali treće generacije koji ciljano stimuliraju stanične odgovore. Na taj način ujedinjuju se bioaktivni i resorptivni materijali, pri čemu se resorptivni modificiraju kako bi postali bioaktivni i obrnuto. Materijali treće generacije dizajniraju se s ciljem aktivacije gena koji stimuliraju regeneraciju živih tkiva. Istraživanja idu u dva smjera, inženjerstva tkiva i *in situ* inženjerstva tkiva. U inženjerstvu tkiva resorptivni materijali modificiraju se molekulama koje stimuliraju gene. Stanice rastu izvan tijela te diferencijacijom imitiraju prirodna tkiva. Takvi su konstrukti potom implantirani kao zamjena za oboljelo ili oštećeno tkivo. S vremenom dolazi do resorpcije ugrađenog materijala koji se zamjenjuje novim biološkim tkivom. *In situ* inženjerstvo tkiva uključuje korištenje biomaterijala u obliku prahova, mikročestica ili otopina za stimuliranje lokalnog zacjeljivanja tkiva. Bioaktivni materijali kontroliranom brzinom otpuštaju biološki aktivne tvari, poput faktora rasta, što aktivira stanice za rast i obnovu tkiva. Cilj novih pristupa u istraživanju biomaterijala jest dobivanje održivih implantata za koje nije potrebna ponovljena operacija, uz minimalno invazivan tretman i ekonomičnost u istraživanju i primjeni.⁸¹

Četvrta generacija biomaterijala naziva se i pametnim biomaterijalima; oni prate bioelektrične signale stanica te ih koriste za regeneraciju tkiva.⁸³ Bioelektrični signali pokazali su se vrlo važnim regulatorima ponašanja stanica, odnosno njihove proliferacije, apoptoze, migracije i orijentacije te diferencijacije.^{84,85} Pored toga, navedeni signali identificirani su u procesu regeneracije. Tako se u četvrtoj generaciji biomaterijala razvijaju elektronski sustavi koji kad su jednom integrirani u tijelo daju informacije važne u dijagnostici. Bioelektrični signali tijela mogu dati detaljne informacije o odgovoru tijela domaćina na vanjske podražaje. Na temelju tih informacija, umjetnim bioelektričnim signalima može se manipulirati ponašanje stanica te generirati željeni odgovor tijela domaćina.⁸³ Električnom stimulacijom poboljšava se regeneracija kostiju i živčanog sustava *in vivo*, a može se primijeniti preko supstrata ili medija. Razni elektrovodljivi polimeri, piezoelektrični i materijali bazirani na ugljiku, korišteni su kao elektroaktivni biomaterijali.^{83,86} U slučaju vodljivih polimera često je potreban vanjski izvor struje, dok za piezoelektrične materijale to nije potrebno. Zbog toga se sve više istražuju piezoelektrični materijali koji poboljšavaju aktivnosti osteoblasta. Cilj četvrte generacije materijala jest istraživanje komunikacije stanica u tijelu, na temelju kojeg se mogu prilagoditi terapije i konstruirati novi biomaterijali.⁸³

Biomaterijali svih generacija mogu se pripremati kao samostalna jedinka ili kao prevlake na površini već korištenih materijala za implantate. U slučaju pripreme prevlaka na površini implantata, za njihovu uspješnu primjenu potrebno je ispuniti nekoliko uvjeta. Prema raznim normama i smjernicama Međunarodne organizacije za normizaciju (ISO) značajke prevlaka koje se prate su debljina, sastav faza, kristalnost, mikrostrukture, poroznost, površinska tekstura i hrapavost. Navedene značajke utječu na mehanička svojstva prevlaka kao što je kohezija, snaga vezanja, Youngov modul, umaranje i podnošenje stresa.²

2.2.3. Biomimetska priprema kalcijevih fosfata

Budući da su kalcijevi fosfati glavna anorganska komponenta kostiju, biomimetska sinteza CaP-a istražuje se već dulje vrijeme. Pri tome su odabir eksperimentalnih uvjeta i ishodnih reaktanata od velike važnosti.⁷² Najjednostavniji način biomimetske sinteze jest miješanje vodenih otopina kalcijevih i fosfatnih iona. Na taj način dobivaju se CaP, vrlo različiti od biološkog apatita, što je očekivano s obzirom na razlike *in vitro* i *in vivo* kristalizacije. *In vivo* taloženje odvija se unutar organske matrice, što omogućuje strogu kontrolu procesa taloženja i svojstva nastalog biološkog apatita. U nastajanju čvrstih tkiva sudjeluju razni organski, anorganski i biološki spojevi koji mogu djelovati kao inhibitori, nukleatori ili čak kalupi za rast biološkog apatita.⁸⁷ Pri tome se koncentracije reaktanata, kao i pH, održavaju konstantnim metaboličkim procesima.

Tablica 2. Koncentracije pojedinih iona u krvnoj plazmi, otopini fosfatnog pufera (PBS), Hankovoj balansiranoj otopini soli (HBSS) i simuliranoj tjelesnoj tekućini (SBF)^{88,89}

	<i>c</i> / mmol dm ⁻³							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Krvna plazma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
PBS	157,0	7,3	/	/	139,7	/	11,8	/
HBSS	142,0	5,8	0,8	1,3	144,8	4,2	0,8	0,8
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

S druge strane, pri *in vitro* kristalizaciji uobičajeno dolazi do postupnog smanjivanja koncentracija iona i pH-vrijednosti. To se može izbjeći korištenjem tehnika taloženja uz

održavanje stalnog sastava reaktanata i pufera, te dodatkom biomakromolekula u taložni sustav. Daljnje približavanje fiziološkim uvjetima postiže se taloženjem u medijima koji su svojim sastavom slični biološkim tekućinama (krvnom serumu, urinu, slini ili limfi) (tablica 2). Primjer je Hankova balansirana otopina soli (HBSS), koja sadrži fosfatne i kalcijeve ione zajedno s ostalim anorganskim ionima i glukozom.⁷² Pored toga, koristi se otopina fosfatnog pufera (PBS) koja sadrži anorganske soli poput KCl, KH_2PO_4 , NaCl i NaH_2PO_4 .⁹⁰ Najčešće se koristi simulirana tjelesna tekućina (SBF), metastabilna otopina koja sadrži ione u koncentracijama jednakim onima u ljudskoj krvnoj plazmi i čiji je pH 7,4.⁸⁸

Uz dobro definirane uvjete pripreme, biomimetska metoda zapravo je vrlo jednostavna, ekonomična i ekološki prihvatljiva metoda pripreme različitih CaP, njihovih kompozita ili kompozitnih prevlaka. Ne koriste se visoke temperature, visoki ili niski tlakovi ni atmosfere inertnih plinova. Priprema se odvija pri sobnoj temperaturi ili temperaturi tijela, pri atmosferskom tlaku i u sustavu koji je izložen djelovanju plinova iz zraka.⁹¹ Biomimetska priprava privlači veliku pažnju pri sintezi kompozita s biomakromolekulama, jer blagi uvjeti osiguravaju zadržavanje bioaktivnosti takvih spojeva. Nadalje, biomimetskom pripremom moguće je pripremiti kompozitne prevlake na vrlo različitim topologijama površina.^{27,91} To je posebno važno za izradu personaliziranih implantanata, koji se izrađuju tehnologijom 3D ispisivanja, jer omogućuje tretman pacijenata s kompleksnim defektima kostiju.⁹² Biomimetska metoda priprave je od posebne važnosti za prevlačenje 3D implantata bioaktivnim i antibakterijskim prevlakama,⁴ što umanjuje rizik od pojave infekcija.²⁷

2.3. Nanočestice srebra

Srebro je mekani, bijeli prijelazni metal koji se koristi u razne svrhe posljednjih 7000 godina. Uporaba u kovanju novčića te raznog kuhinjskog pribora bila je učestala zbog njegove otpornosti na koroziju, ali i zbog antimikrobnog djelovanja, što je i glavni razlog današnje uporabe i istraživanja srebra u medicinske svrhe.⁹³ Srebro je nespecifičan biocidni agens, djeluje na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, gljivice i viruse. Moguće ga je primijeniti u odgovarajućim dozama koje nisu toksične za stanice sisavaca.⁹⁴⁻⁹⁶ Ima široko antibakterijsko djelovanje zahvaljujući različitim mehanizmima djelovanja. Može se vezati na tiolne i amino skupine u proteinima, peptidoglikansku stijenku stanice, plazmatsku membranu i fosfatne skupine u DNA. Navedeno uzrokuje poremećaj rada stanice te slijedom toga i apoptozu.⁹⁷⁻⁹⁹ Srebro se koristi u zavojima za rane te kao prevlaka za medicinske uređaje za

sprječavanje nastajanja bakterijskog biofilma.¹⁰⁰ Nanočestice srebra imaju velik potencijal u ortopediji gdje su vrlo učestale infekcije povezane s implantatima (eng. *implant associated infections*, IAI).¹⁰

2.3.1. Infekcije povezane s implantatima i otpornost bakterija na antibiotike

U današnje vrijeme, zbog starenja stanovništva i ubrzanog načina života, raste učestalost bolesti i ozljeda čvrstih tkiva, posebice kostiju. Vrlo često jedino je rješenje implantacija dijela ili cijele kosti, što sa sobom nosi dug oporavak¹⁰¹ i rizik od pojave infekcija.⁶ To je i jedan od najvećih problema implantacije, jer se infekcije mogu pojaviti i do dvije godine nakon same operacije.⁶ Vjerojatnost pojave infekcije ovisi o lokaciji implantata u tijelu. Infekcije povezane s implantatima najčešće se liječe sustavnom terapijom antibioticima. Pri IAI dolazi do kolonizacije površine implantata bakterijama i nastanka biofilma.^{7,11} Bakterijski biofilm je fiksirana mikrobna zajednica povezana unutar izvanstanične polimerne supstance.¹⁰² Karakterizira ga ireverzibilna adhezija na površinu, vrlo često medicinskih instrumenata i implantata, kao i kanalizirana struktura. Takva građa omogućuje dobru kontrolu ispuštanja plinova i nutrijenata te bolju otpornost na djelovanje antimikrobnih agensa.^{102,103} Po sazrijevanju biofilma, dolazi do širenja infekcije na okolna tkiva. Navedeno dodatno otežava tretman,⁷ pa je u nekim slučajevima potrebna i ponovna operacija kako bi se inficirani implantat zamijenio. To sa sobom nosi još veće rizike od pojave infekcija.⁶ Pored otpornosti biofilma na antibiotike, neke bakterije su i same u planktonskom obliku otporne na antibiotike, kao što je MRSA (*multiple drug-resistant Staphylococcus aureus*), te njihov broj svakodnevno raste.¹¹ Zato se istražuju alternativni antimikrobni pristupi liječenju. Kao jedno od mogućih rješenja, istražuju se inovativni materijali antimikrobnih svojstava. Pripremani su materijali s raznim antibioticima, metalnim ionima i metalnim nanočesticama, gdje se srebro ističe zbog svog već poznatog, antimikrobnog djelovanja.¹⁰ Pri primjeni nanočestica srebra javlja se opasnost postizanja citotoksičnih koncentracija. Stanice sisavaca mogu razgraditi metalne nanočestice putem fagocitoze, a zatim i djelovanja lizosoma. Na taj način, za razliku od bakterijskih stanica, mogu smanjiti toksičnost nanočestica.¹¹

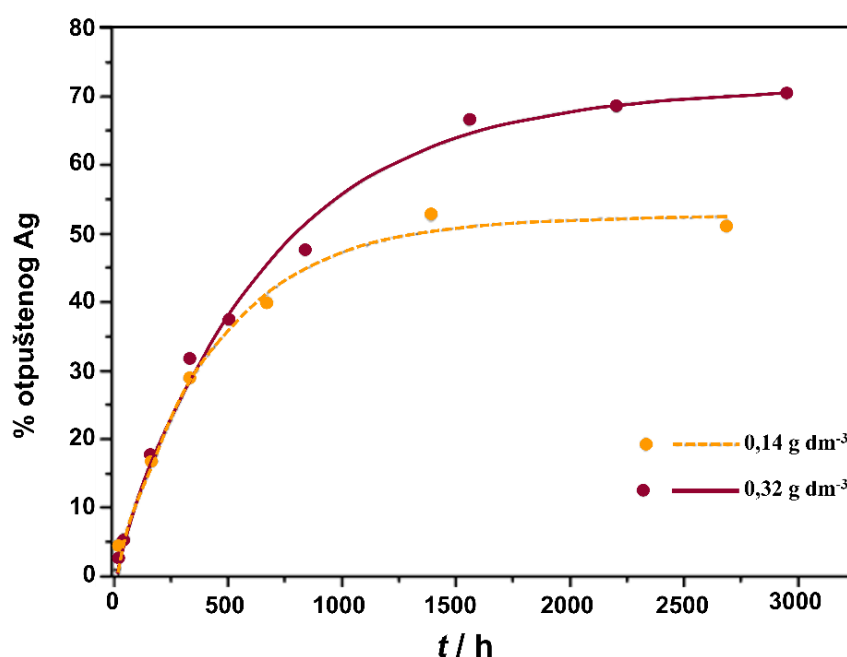
2.3.2. *Važnost oblika i veličine nanočestica za antibakterijsko djelovanje*

Iako je srebro otporno na koroziju, s njegove površine se postupno otpuštaju ioni, što je i uzrok njegovih antimikrobnih svojstava. Razni se materijali stoga prevlače slojem srebra kako bi se postigla antibakterijska svojstva, a zadržala ekonomičnost proizvodnje s obzirom na visoku cijenu srebra.⁹³ Medicinski uređaji prevlače se srebrom raznim metodama: elektrolitičkim nanošenjem nanočestica,¹⁰⁴ elektroforetskim nanošenjem nanočestica¹⁰⁵ ili prevlačenjem raznim kompozitima polimera i nanočestica srebra.¹⁰⁶ Nedostatak tih metoda je pojava korozije na mjestu dodira srebra s neplemenitim materijalom. Kako je ionsko srebro ono koje ima antibakterijsko djelovanje, u dezinfekcijske svrhe već se dulji niz godina koriste srebrove soli, poput srebrovog nitrata. Primjenom srebrovog nitrata postiže se velika lokalna koncentracija iona srebra, što ubija bakterije, ali i oštećuje okolna tkiva. S druge strane, slabo topljive soli srebra, čija se topljivost smanjuje u nizu $\text{AgCl} > \text{AgBr} > \text{AgI} > \text{Ag}_2\text{S}$, sporo otpuštaju ione. Zato se srebrov klorid koristi kao antibakterijski aditiv u proizvodima za čišćenje.⁹³

Nanočestice srebra također otpuštaju Ag^+ , no njihovo otpuštanje, pa tako i antibakterijsko djelovanje, kontrolirano je veličinom i oblikom nanočestice, načinom dostave, stabilizatorom te ugradnjom nanočestica u razne kompozite.¹⁰⁷ Iz navedenih razloga, antibakterijsko djelovanje nanočestica lakše je modificirati i prilagoditi potrebama, u odnosu na makromaterijal ili same ione srebra. Stoga ne čudi da se intenzivno istražuju već gotovo cijelo stoljeće.^{93,108} Najčešće se pripremaju redukcijom ionskog srebra koristeći glukozu, trinitrijev citrat, etilen glikol ili natrijev borhidrid u prisustvu stabilizatora kako bi se spriječila agregacija nanočestica. Sinteze se jako razlikuju te svojstva konačnih AgNP-a znatno ovise o uvjetima pripreme; otapalu, stabilizatoru, reducentu. Do sada su pripremljene AgNP različitih oblika, sferičnog,^{109,110} bipiramidalnog,¹¹¹ u obliku diska,¹¹² žice,¹¹³ kocki,¹¹⁴ prizmi,¹¹⁵ prstenova,¹¹⁶ pločica¹¹⁷ i oktaedara.¹¹⁴ Na morfologiju čestica može utjecati prisutnost nečistoća, aditiva ili izlaganje svjetlosti, pa tako sferične čestice djelovanjem svjetlosti mogu transformirati u prizmatske.¹¹⁸ Nestabilizirane nanočestice podložnije su različitim promjenama i agregaciji od stabiliziranih, stoga se pri sintezi koriste različiti stabilizatori poput poli(vinilpirolidona) ili drugih polimera. Nanočestice srebra pripremaju se i u plinskoj fazi te se tako dobivaju nefunkcionalizirane AgNP koje nije moguće dispergirati u vodi.¹⁰⁹ U biomedicinske svrhe, AgNP su istraživane za ciljanu dostavu lijekova s obzirom na to da omogućuju veću učinkovitost i prodiranje lijeka prema željenom organu te tijekom

dostave štite lijek od raznih nespecifičnih reakcija. Međutim, srebro je toksično za stanice sisavaca zbog čega je važna funkcionalizacija površine kako bi se zadržala povoljna svojstva, a minimiziralo negativno djelovanje AgNP-a na organizam.^{93,108}

Nanočestice srebra, kao i metalno srebro, otpuštaju ione srebra sa svoje površine vrlo sporom oksidacijom. Kinetika otpuštanja ovisi o veličini, površinskoj funkcionalizaciji, temperaturi i sastavu medija. Kako nanočestice imaju veliku specifičnu površinu, otpuštanje iona je brže u odnosu na makro-srebro.^{12,93} Količina otpuštenog srebra ovisi o raznim čimbenicima, pri čemu je važan utjecaj koncentracije gdje porastom početne koncentracije srebra dolazi do otpuštanja većeg udjela srebra u jednakom vremenskom intervalu (slika 10).¹² S druge strane, kinetika otpuštanja iona srebra razlikuje se u kompleksnijim medijima zbog prisustva protuiona s kojima Ag^+ može istaložiti u obliku netopljive soli, ili proteina i biomolekula s kojima može kompleksirati.¹¹⁹ U približno anaerobnim uvjetima, gotovo i ne dolazi do oksidacije, a posljedično ni otpuštanja iona srebra.⁹⁸



Slika 10. Otpuštanje iona srebra iz citratom stabiliziranih nanočestica srebra pri 37 °C i dvije različite koncentracije nanočestica srebra (kontruirano prema ref. 12)

Sigurno je da veličina nanočestica ima važnu ulogu u razini toksičnosti prema mikroorganizmima. Dugo vrijeme istraživanja su rezultirala kontradiktornim zaključcima o povezanosti veličine nanočestica i njihove toksičnosti. Navedeno je najvećim dijelom bilo

posljedica različitih uvjeta u kojima su se istraživanja provodila. Stoga su provedena istraživanja u standardiziranim uvjetima kako bi se moglo usporediti djelovanje nanočestica različitih veličina. Pri jednakoj količini srebra, manje nanočestice, prosječnog promjera oko 10 nm, imale su veću toksičnost za stanice, ali i bakterije, u odnosu na veće nanočestice prosječnog promjera oko 90 nm.^{110,120,121} S druge strane, u nekim istraživanjima s većim nanočesticama, dobiveno je vrlo dobro antibakterijsko djelovanje AgNP-a, zbog čega je moguće zaključiti da više čimbenika utječe na baktericidnost AgNP-a te ona ne ovisi samo o prolasku AgNP-a kroz bakterijsku membranu.¹²²

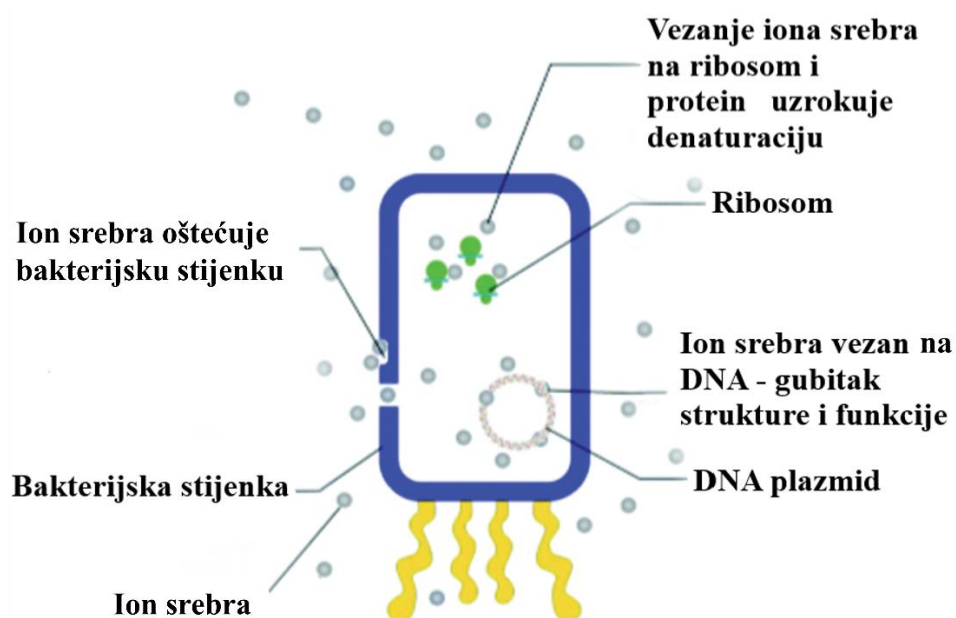
Pored veličine, oblik je također važna karakteristika nanočestica koja utječe na njihovo antimikrobno djelovanje. Antibakterijski učinak ovisi o dobrom prijanjanju nanočestica na bakterijsku membranu, stoga su istraživane nanočestice srebra različitih oblika.¹⁰⁷ Pokazano je da nanomaterijali srebra kockastog oblika imaju najbolje antibakterijsko djelovanje, slijedi ga antibakterijsko djelovanje sferičnih nanočestica dok je djelovanje najmanje izraženo kod nanožica.¹²³ Nadalje, ustanovljeno je da osim samog oblika pripremljenih nanomaterijala srebra, antibakterijsko djelovanje ovisi i o oštini rubova. Tako je u jednom istraživanju pripremljeno više različitih nanomaterijala srebra trokutastog i heksagonalnog oblika oštih i tupih rubova. Za oba oblika dobiveno je bolje antibakterijsko djelovanje s nanomaterijalima oštih rubova,¹²⁴ što je objašnjeno većom gustoćom naboja na ostrim u odnosu na tupe rubove.¹²⁵

2.3.3. Antimikrobno djelovanje nanočestica srebra

Način djelovanja nanočestica srebra dugo je proučavan, ali još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. *In vitro* istraživanja pokazala su da srebro otpušta ione srebra sa svoje površine, koji su biološki aktivni i vežu se na razne strukture bakterijske stanice. Kako je ion srebra Lewisova kiselina i ima veliki afinitet prema sumporu i dušiku,⁹⁷ tiolne i amino skupine proteina podložne su međudjelovanju, kao i peptidoglikanska stijenka stanice, plazmatska membrana i fosfatne skupine u DNA.^{98,99} Ovisno o mjestu vezanja iona srebra, pretpostavljeno je nekoliko načina djelovanja (slika 11).

Vezanje iona na bakterijsku stijenku uzrokuje oštećenje vanjskih slojeva bakterijske stanice, što dovodi do gubitka sadržaja stanice te do pojave defekata u strukturi.¹²⁶ Kako Gram-pozitivne bakterije imaju deblju staničnu stijenku, potrebna je veća koncentracija iona srebra za postizanje jednakog učinka kao kod Gram-negativnih bakterija.¹²⁷ Pozitivno nabijeni

ioni srebra vežu se i prolaze kroz negativno nabijenu stijenku i membranu bakterijske stanice.¹²² Vezanjem iona na bakterijski DNA onemogućuje se replikacija, dok se vezanjem na SH skupine proteina onemogućuje nekoliko važnih staničnih funkcija poput respiracije i permeabilnosti.⁹⁹ Važan način, koji je u sinergiji s vezanjem iona na SH skupine, jest proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta, koje su vrlo toksične za stanicu.¹²⁸ U početku se smatralo da je proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta glavni način djelovanja iona srebra, no u istraživanjima u aerobnim i anaerobnim uvjetima utvrđena je jednaka toksičnost srebra prema bakterijama, tako da se pored proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta, jednako važnim smatra inaktivacija proteina vezanjem na tiolnu skupinu.^{98,99}



Slika 11. Shematski prikaz različitih načina antibakterijskog djelovanja iona srebra (konstruirano prema ref. 99)

Djelovanje nanočestica uglavnom se temelji na djelovanju otpuštenih iona srebra, s obzirom na to da će nanočestice veće od 10 nm teško proći bakterijsku membranu.¹²⁹ Dodatan čimbenik koji utječe na prolazak su negativno nabijeni stabilizatori nanočestica zbog elektrostatskog odbijanja s negativno nabijenom membranom bakterije.¹²² Djelovanje većih nanočestica ovisi o unosu u stanicu, gdje direktno inaktiviraju proteine i DNA. Pored toga, dolazi do oksidacije nanočestica do iona koji djeluju već ranije spomenutim mehanizmima.⁹⁸

Velik broj istraživanja pokazao je da je koncentracijski raspon u kojem je srebro toksično i inhibira rast bakterija između 0,1 i 20 mg dm⁻³.⁹³ Pokazalo se također da, iako

AgNP djeluje na planktonske bakterije, ne djeluje na njihov biofilm.¹³⁰ Ioni srebra su toksični za eukariotske stanice u koncentracijama od 1 do 10 mg dm⁻³, dok su nanočestice srebra toksične u koncentracijama između 10 i 100 mg dm⁻³.^{9,131}

2.3.4. Nanočestice srebra u kompozitima

Nanočestice srebra vrlo često se koriste u pripravi kompozita u inženjerstvu koštanog tkiva iz nekoliko razloga. Prvi i najvažniji su antibakterijska svojstva srebra te puno manja poznata otpornost bakterija na djelovanje srebra.⁹⁹ Istražuju se razni kompoziti nanosrebra i standardnih materijala korištenih u ortopediji, kao što su cementi bazirani na polimetilmetakrilatu, koji se koriste za učvršćivanje umjetnih zglobova,¹²⁷ te hidroksiapatit i ostali kalcijevi fosfati, koji su najkorišteniji u dentalnoj i koštanoj implantologiji.³⁵ Navedeni kompoziti zamišljeni su kao multifunkcionalan materijal jer bi postojećem materijalu, koji ima svoju konkretnu primjenu, proširili funkciju antibakterijskim djelovanjem. Osim toga, istraživani bioaktivni kompoziti mogu poboljšati ili ubrzati procese koji slijede nakon implantacije u tijelo. Navedeno uključuje zarastanje kostiju i općenito oporavak pacijenta, ali u isto vrijeme i sprječavanje pojave infekcije antibakterijskim djelovanjem srebra.^{4,127,132} Nanočestice srebra su citotoksične, zbog čega se u organizmu ne mogu koristiti bez funkcionalizacije površine ili ugradnje u razne kompozite, što ublažuje ili maskira toksičnost za stanice.^{6,10}

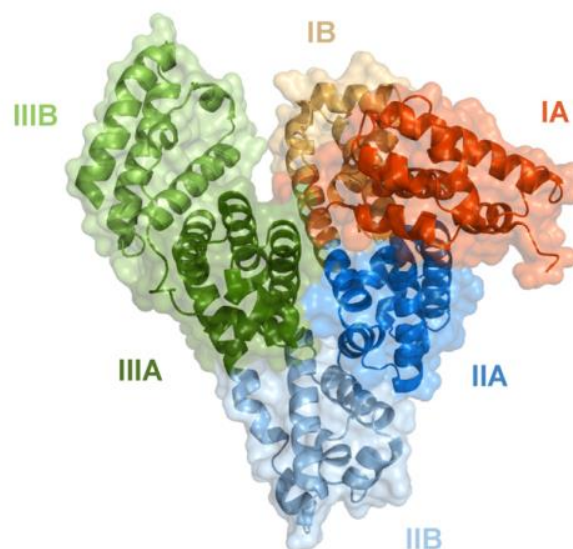
Različiti kompoziti kalcijevih fosfata i nanočestica srebra pripremani su za primjenu u implantologiji, pa je tako jedna od tehnika sprej piroliza pri kojoj su prekursorske otopine raspršene u zagrijanu cijev, atomizirane i podvrgnute pirolizi pri 550 °C.¹⁸ Nadalje, kompoziti CaP/AgNP pripremani su naknadnim ugrađivanjem AgNP-a u hidroksiapatit dispergiranjem praha HA u suspenziji AgNP-a pri povišenoj temperaturi,²⁰ a osim toga AgNP su ugrađivane u smjesu HA i β -TCP-a miješanjem pri povišenoj temperaturi.²¹ Kompozit AgNP i HA pripreman je i koprecipitacijom u prisustvu AgNP-a pri 150 °C u autoklavu.²² Navedenim metodama pripremljeni su kompoziti dobrih antimikrobnih svojstava pogodnih za ciljanu dostavu lijekova. Da bi se pripremili biomaterijali treće generacije, potrebno bi bilo ugraditi biomolekule u kompozite CaP/AgNP. Navedene metode koriste povišene temperature i uvjete pripreme koji nisu bliski fiziološkim, što onemogućuje ugradnju biomolekula. Iz navedenog razloga, istražuju se metode koje bi bile što sličnije biomineralizaciji u tijelu, kao što je biomimetski način pripreme. Takav način omogućuje ugradnju raznih biomolekula u

bioaktivne kompozite s antibakterijskim svojstvima.¹³³ Biomimetskim načinom pripremani su kompoziti kalcijevih fosfata i različitih aditiva kao što su kitozan i hijaluronska kiselina¹³⁴ i albumin iz goveđeg seruma.¹³⁵ Dobiveni kompoziti imaju dobro definiranu nanostrukturu te svojstva koja potencijalno poboljšavaju njihovu bioučinkovitost.¹³³ Istraživanja biomimetske pripreme kompozita kalcijevih fosfata i srebra, potencijalno vrlo važna u pripremi inovativnih biomimetskih kompozita s antibakterijskim svojstvima, prema dostupnoj literaturi, nisu provedena.

2.4. Albumin iz goveđeg seruma

Albumin iz seruma jedan je od najzastupljenijih proteina u plazmi sisavaca. Zbog više dostupnih mjesta vezanja, veže razne ligande, što ga čini multifunkcionalnim. Služi kao rezervoar dušikovog oksida, koji se u tijelu koristi kao signalna molekula, i za prijenos raznih metabolita, lijekova, nutrijenata i drugih molekula.¹³⁶ Pored toga, albumin je važan protein u kontroli razina Ca^{2+} i Mg^{2+} iona u krvi sisavaca. Oblik molekule je srololik, a struktura se sastoji od 3 helikalne domene od kojih svaka ima 2 poddomene te vanjskog mjesta za vezanja liganda (slika 12). Sličnost BSA ljudskom albuminu iz seruma je velika, uzevši u obzir da je oko 76 % aminokiselinske sekvence jednako ljudskom, što je vrlo važno s obzirom na to da albumini iz različitih organizama mogu biti alergeni u ljudskom organizmu, ovisno o sličnosti sekvence. Eksperimentalno je određeno da sličnost sekvence jednaka ili veća od 67 % ne izaziva imunološki odgovor u organizmu.¹³⁶ Iz navedenih razloga BSA je vrlo dobar kandidat u raznim kliničkim, farmaceutskim i biokemijskim primjenama te se BSA istražuje za ciljanu dostavu lijekova, ali i vrlo često kao modelni protein za različite druge primjene.^{137,138}

Ranija istraživanja ugradnje BSA u kompozite kalcijevih fosfata pokazala su da u prisutnosti BSA u taložnom sustavu nastaje CaP manje kristalnosti nego onaj pripremljen bez BSA. Tako dobiveni CaP sličniji su mineralnom dijelu kostiju od onih pripremljenih bez BSA.^{139,140} Nadalje, utvrđeno je da BSA, prisutan u dovoljno velikom masenom udjelu, može poboljšati kompresivnu snagu CaP-a.¹⁴¹ Navedeni rezultati potiču daljnja istraživanja primjene BSA u pripremi kompozita kalcijevih fosfata i drugih anorganskih ili bioloških spojeva.



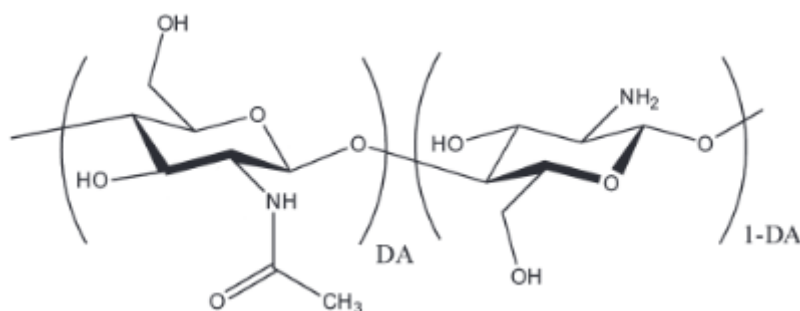
Slika 12. Struktura molekule albumina iz goveđeg seruma. I, II i III označuju različite domene, a A i B poddomene (preuzeto uz dozvolu iz ref. 136)

2.5. Kitozan

Kitozan (Chi) je djelomično deacetiliran derivat hitina, jednog od najzastupljenijih prirodnih polisaharida. Zbog male topljivosti, hitin se najčešće prevodi u kitozan, kopolimer glukozamina i *N*-acetilglukozamina¹⁴² odnosno β -(1-4)-2-acetoamido-2-detoksi-D-glukan (slika 13).¹⁴³ Kitozan je, s obzirom na svoje podrijetlo, biokompatibilan, biorazgradiv, netoksičan te posjeduje hidratantna i antimikrobna svojstva. Zbog svoje higroskopne prirode, uvijek sadrži određenu količinu vode.^{142,143} Slično kao i hitin, kitozan je netopljiv u vodi i bazičnim otopinama, no topljiv je u razrijeđenim kiselinama ako je male relativne molekulske mase. Kitozan velike relativne molekulske mase gotovo je netopljiv u razrijeđenim kiselinama. Njegove otopine velike su viskoznosti, zbog čega se samo kitozan male relativne molekulske mase koristi u medicinske primjene.¹⁴³

Antibakterijska i antifungalna aktivnost kitozana povezana je s molekulskom masom, stupnjem deacetilacije, pH, stupnjem supstitucije, položaju supstituenta u glukozaminskoj jedinici, duljini te vrsti ciljanog organizma.^{14,143} Poznata su dva mehanizma antibakterijskog djelovanja kitozana. Kitozan velike molekulske mase adsorbira se na staničnu stijenk, što uzrokuje njeno pucanje i gubitak sadržaja stanice. Kitozan male molekulske mase prodire u žive stanice, što rezultira inhibicijom raznih enzima, proteina i općenito rada stanica.¹⁴⁴

Istraživanja antibakterijske aktivnosti kitozana potvrdila su da kitozan male molekulske mase ima vrlo dobru antibakterijsku aktivnost,¹⁴³ prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, a nije toksičan za stanice sisavaca.^{14,143} Zbog navedenih svojstava kitozan ima široku primjenu u biomedicini, farmaciji i biotehnologiji. Istražuju se i kompoziti kalcijevih fosfata i kitozana za kod kojih je ustanovljeno da kalcijevi fosfati poboljšavaju prijanjanje stanica na kitozan i omogućuju bolje proliferaciju stanica.⁴



Slika 13. Struktura kitozana pri čemu DA označuje stupanj deacetilacije (preuzeto iz ref. 142)

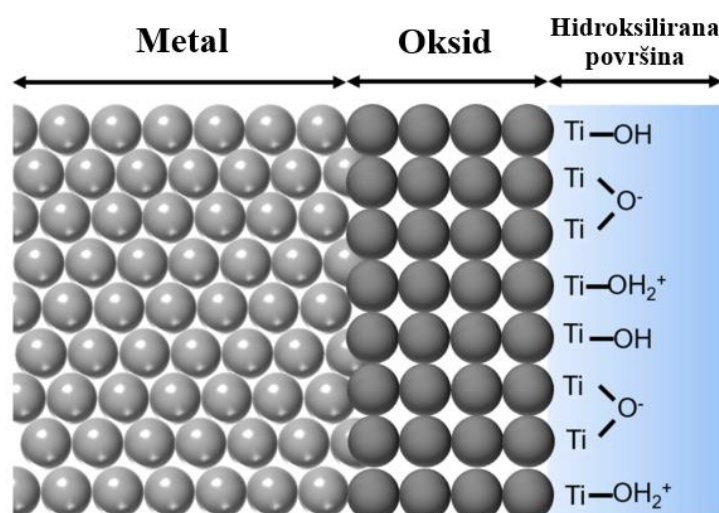
2.6. Titanijski implantati i kompozitne prevlake

Svake godine proizvodi se oko 1000 tona biomaterijala za ortopedske i dentalne implantate baziranih na titaniju.¹⁴⁵ Titanij je biokompatibilan, lagani materijal odlične otpornosti na koroziju i vrlo dobrih mehaničkih svojstava. U dodiru s kisikom iz zraka prevlači se slojem TiO_2 koji ga čini inertnim.^{2,146} Navedena svojstva vrlo su važna za primjenu u umjetnim zglobovima kao što su kukovi ili umjetnim korijenima zuba, gdje je važna mehanička stabilnost i biokompatibilnost. Bioinertnost titanija često se ističe kao njihova prednost za primjenu u implantologiji, jer nemaju negativan utjecaj na stanice. S druge strane, zbog toga ne nastaje mehanički stabilna veza između implantata i koštanog tkiva, što je vrlo važan korak u prihvatanju implantata i oporavku pacijenta nakon implantacije.^{2,79} U zadnjih 20 godina učestalost neuspjele integracije dentalnih i ortopedskih implantata je 5–10 %.¹⁴⁷ Prije oseointegracije implantata odvija se kompleksni imunološki odgovor koji započinje odmah po ugradnji implantata u tijelo. Površina implantata se u roku od nekoliko minuta prevlači slojem molekula vode, proteina i raznih iona, poput fosfatnih i Ca^{2+} , te dolazi do otpuštanja citokina i raznih proteina iz stanica oštećenih prilikom operacije što je zapravo odgovor domaćina na prisutnost stranog objekta. Kako bi se spriječila kronična upala, imunološki sustav mora doći

u ravnotežu te oseointegracija započinje diferencijacijom osteoblasta i osteocita koji pomažu u nastajanju nove kosti. Diferencijacija osteoblasta i osteocita započinje ranim upalnim procesom. Ako ne dođe do diferencijacije, dolazi do stvaranja i proliferacije fibrozne kapsule oko implantata koja sprječava kontakt implantata i koštanog tkiva.^{148,149} Adsorpcija spojeva na površinu može biti vođena hidrofobnim međudjelovanjem, elektrostatskim privlačenjem, Van der Waalsovima silama, zbog čega su značajke površine poput hrapavosti, stupnja vlaženja i naboja površine implantata, vrlo važne.¹⁵⁰ Oseointegracija se zapravo dijeli u tri važna koraka, pri čemu je prvi osteokondukcija, u kojem dolazi do migracije i diferencijacije osteogenih stanica (osteoblasta i osteocita) na površinu implantata, dok je drugi korak nastajanje nove kosti na površini implantata, što je vrlo slično nastajanju cementnog sloja koštanog tkiva. Zadnji korak, koji je ujedno i najsporiji, uključuje remodeliranje novonastalog sloja kosti.¹⁵¹ Iz navedenog razloga istražuju se razne modifikacije i načini funkcionalizacije površine implantata kako bi se osiguralo prihvaćanje i zarastanje implantata u tijelu.

2.6.1. Obrada površine titanija

Titanij i njegove legure već se dugo primjenjuju u biomedicini zbog svoje izvrsne biokompatibilnosti, otpornosti na koroziju i bioinertnosti. Izlaganjem titanija kisiku iz zraka nastaje tanak sloj titanijevog oksida, uglavnom TiO_2 , dok u kontaktu s vodom nastaju i TiO , $\text{TiO}(\text{OH})$ i Ti_2O_3 . Ti_2O_3 se brzo pretvara u $\text{TiO}(\text{OH})$ koji se zatim brzo pretvara u TiO_2 , nakon reakcije s molekulama vode (slika 14).^{146,151}



Slika 14. Shematski prikaz hidrosiliranja površine titanija i stvaranja površinskog naboja u dodiru s vodenim otopinama. (konstruirano prema ref. 146)

Sloj oksida na implantatu vrlo se razlikuje od sastava okolnog tkiva, zbog čega vrlo teško i sporo dolazi do kontakta stanica s implantatom i početka oseointegracije.¹⁵² S druge strane, sloj oksida važan je za očuvanje svojstava otpornosti na koroziju, no vrlo često je to sloj neujednačene debljine i nedovoljne hrapavosti. Iz navedenog razloga dolazi samo do mehaničke oseointegracije, pri čemu izostaje nastanak kemijske veze između implantata i okolnog tkiva.^{151,153} Pored toga, djelovanjem raznih spojeva u tijelu, može doći do uklanjanja inaktivacijskog sloja implantata, što može dovesti do pojave raznih upala. Kako razgradnja uvijek započinje od površine, otpornost na koroziju, otpornost na trošenje i biokompatibilnost titanija i legura titanija ovise o svojstvima površine, zbog čega se ona vrlo često obrađuje i modificira, kako bi se poboljšala njezina svojstva.¹⁵²

Nadalje, jedan od važnih razloga za obradu površine titanija leži u razumijevanju tipičnog procesa proizvodnje titanija, pri čemu se koriste razna sredstva za hlađenje i lubrikanti, koji mogu kontaminirati površinu ili dovesti do oksidacije titanija.¹⁵⁴ Na titaniju se prilikom proizvodnje primjenjuju velike sile, zbog čega može potencijalno doći do plastične deformacije. Proizvodnim procesom dobiva se titanij koji je potencijalno oksidiran, kontaminiran, plastično deformiran, s neujednačenim površinskim slojem loše definiranog sastava. Površina titanija se stoga obrađuje kako bi se bolje definirao sastav površinskog sloja, kako bi on bio uniformniji te boljih svojstava za adheziju stanica i drugih spojeva.^{151,154}

Postoje dvije glavne vrste obrade površine, mehanička i kemijska obrada. Mehanička obrada uključuje tretman, oblikovanje ili uklanjanje površine materijala korištenjem fizikalnih sila primijenjenih od strane drugog čvrstog materijala.^{151,154} Mehaničke metode dijele se na one kojima se površina materijala uklanja rezanjem ili abrazivnim postupcima i metode deformacije materijala bombardiranjem česticama. Čestice TiO_2 , Al_2O_3 ili SiO_2 velike brzine obično se koriste u svrhu bombardiranja površine titanija.¹⁵⁴ Poliranje se koristi kao završni proces za proizvodnju željene topografije površine. Poliranjem mekih metala, kao što je čist titanij, može doći do ugradnje čestica materijala za poliranje u površinu. Obično se poliranje koristi kao zadnji korak grublje obrade, te se daljnjom kemijskom ili elektrokemijskom obradom definiraju konačna svojstva površine. Pored poliranja, koristi se bombardiranje površine tvrdim česticama velikim brzinama, pri čemu čestice uzrokuju lokalnu plastičnu deformaciju i uklanjaju dio materijala površine. U biomedicinske svrhe, ta metoda se koristi za povećanje hrapavosti površine implantata. Ovisno o vrsti korištenih čestica dobiva se ili nepravilna površina oštih bridova i izbočina ili zaglađenija nepravilna površina. Čestice vrlo

često zaostaju ugrađene u površinu titanija, zbog čega se i nakon te mehaničke obrade titanij obrađuje kemijski.¹⁵⁴

Kemijska obrada uključuje metode poput čišćenja otapalom, jetkanja kiselinom, jetkanja bazom, inaktivacije dušičnom kiselinom, temperaturnog tretmana i tretmana vodikovim peroksidom.^{151,155} Čišćenje otapalom koristi se za uklanjanje ulja i masnoća te kontaminacija nakon proizvodnje, pri čemu ne dolazi do promjene u oksidnom sloju na površini titanija. Izbor otapala vrlo je važan za uklanjanje kontaminacija, no otapalo također može biti kontaminacija koja ima negativan učinak za daljnje korištenje površina.¹⁵⁴ Jetkanjem se uklanja sloj površine koji uključuje oksidni sloj te dio metala koji se nalazi ispod njega s ciljem dobivanja uniformnije površine. Pored toga koristi se za povećanje hrapavosti površine titanijskih implantata.^{151,152} Jetkanje površine titanija ograničeno je na korištenje nekoliko kiselina, s obzirom na to da su titanijski oksidi kemijski stabilne vrste. Vrlo često se koristi vodena smjesa dušične kiseline (10–30 % volumnog udjela) i fluorovodične kiseline (1–3 % volumnog udjela) u destiliranoj vodi u omjerima $\text{HNO}_3 : \text{HF} = 10 : 1$.¹⁵⁴ Pored toga otopina fluorovodične kiseline koristi se samostalno¹⁵⁶ ili u smjesi $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$.¹⁵⁷ Također se često koristi smjesa vodenih otopina klorovodične i sumporne kiseline u različitim koncentracijama i omjerima.^{17,158} Jetkanje kiselinama temelji se na reakciji vodikovih iona i TiO_2 pri čemu dolazi do nastanka topljive soli titanija i oslobađanja vodika, koji može ostati zarobljen u sloju oksida.^{152,154}

Topografija površine titanija jetkane različitim kiselinama ovisi o početnom stanju površine i o količini materijala uklonjenog jetkanjem.¹⁵⁹ Pa se tako „blagim“ metodama jetkanja većinom sačuvaju glavne značajke topografije. Površina obrađena „agresivnijim“ metodama, prilikom kojih dolazi do uklanjanja znatne količine materijala, ima oštre rubove i velike nepravilnosti.¹⁵⁴ Hrapavost nastala jetkanjem kiselinom na površini titanija u rasponu je od 0,1 do nekoliko mikrometara te na površini zaostaje tanak sloj oksida ($< 10 \text{ nm}$), za koji se pokazalo da vrlo sporo raste, između 3 i 6 nm, tijekom 400 dana na zraku.¹⁵⁴ Više istraživanja pokazalo je da površina titanija jetkana kiselinom ima bolju biokompatibilnost, omogućava bolju diferencijaciju stanica i posljedično bolju oseointegraciju.^{151,154,156,159}

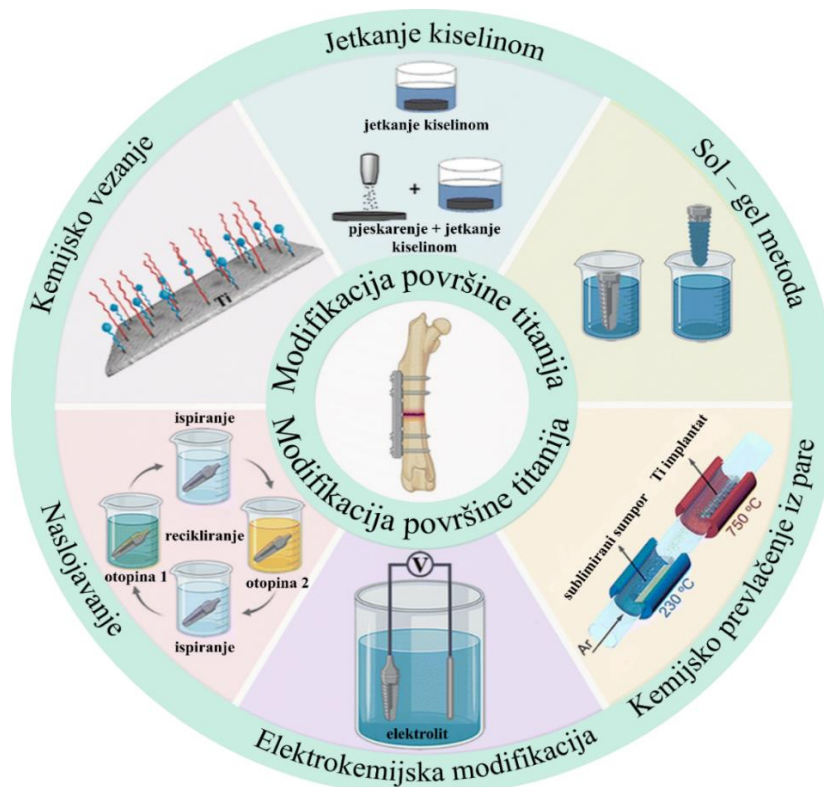
Pored jetkanja kiselinom, titanij se može tretirati s vodenim otopinama natrijevog ili kalijevog hidroksida velike koncentracije, pri čemu se na površini stvara sloj gela titanata alkalijskih metala nepravilne topografije i velike poroznosti na submikrometarskoj skali.¹⁶⁰ Temperaturnim tretmanom moguće je modificirati sastav i strukturu površinskih slojeva,¹⁵² a

kombinacijom jetkanja kiselinama i bazama dobiva se površinski sloj još veće poroznosti.¹⁵¹ Pored toga koristi se pasivacija oksidirajućom kiselinom kao što je koncentrirana nitrarna ili fosforna kiselina, što rezultira očuvanom topografijom površine i stvaranjem dodatnog tankog sloja oksida.^{17,151} Elektrokemijski tretmani, poput elektropoliranja i anodne oksidacije također se koriste u pripremi površine titanijevih implantata, no obično kao predtretmani za druge načine obrade površine.¹⁵⁴ U novije vrijeme za modifikaciju površine koristi se laserska obrada pri čemu se fokusiranom laserskom zrakom velikog intenziteta tali površinski sloj titanija te nastaje sloj TiO₂ veće tvrdoće, otpornosti na trošenje i otpornosti na koroziju. Osim toga, laser se koristi za dodavanje aditiva površinskom sloju, odnosno stvaranje funkcionalnih legura na površini titanija koje daju veću tvrdoću površini i otpornije su na trošenje.^{152,159}

2.6.2. Funkcionalizacija površine titanija

Pored obrade same površine titanija, u novije vrijeme proučava se i funkcionalizacija površine prevlakama koje bi bile što sličnije strukturi i sastavu kosti da bi se postigla što bolja oseointegracija implantata (slika 15). Cilj je pripremiti multifunkcionalne prevlake koje uz osteokonduktivna i osteoinduktivna, imaju i antibakterijska svojstva. Takve prevlake sadrže bioaktivne molekule i/ili antibakterijske spojeve, koji se mogu otpuštati kontinuirano u duljem vremenskom periodu.

Do sada su istražene prevlake s ugrađenim čimbenicima rasta kostiju, proteinima važnim u morfogenetici kostiju, čimbenicima rasta fibroblasta i sl.^{151,161} Novije strategije u funkcionalizaciji površine titanija su prevlačenje površine monoslojem ili višestrukim slojem prevlake s proteinima izvanstaničnog matriksa, peptidima, peptidomimeticima i biopolimerima.¹⁶² U takvim prevlakama proteini se imobiliziraju na tri načina, fizikalnom adsorpcijom, fizikalnim zarobljavanjem i kovalentnim vezanjem. Kovalentnim vezanjem dodatno se stabiliziraju bioprevlake zbog čega se tim načinom pripremaju obično prevlake peptida. Iako one imaju poboljšana biološka svojstva, stabilnost bioaktivnih spojeva je mala, a cijena pripreme velika, što ograničava njihovu primjenu. Općenito, navedene vrste prevlaka omogućuju puno bolji kontakt implantat–kost u odnosu na neprevučene površine titanijskog implantata.¹⁵¹



Slika 15. Različiti načini modifikacije površine titanijskih implantata (konstruirano prema ref. 168)

Razni anorganski aditivi kao što su ugljične nanotubice¹⁶³, metalni ioni¹⁶⁴ i filmovi te anorganski polimeri,¹⁶⁵ dodavani su na površinu titanija u svrhu poboljšanja ugradnje implantata i antibakterijskog djelovanja. Pored toga, površina titanija je modificirana *in situ* stvaranjem nanotubica TiO_2 u jednaku svrhu.¹⁶⁶ Za pripremu prevlaka korištene su metode raspršivanja plazme, pripreme prevlaka metalnih iona uranjanjem u plazmu, kemijsko prevlačenje metalima iz plinovitoga stanja i sol-gel metoda.^{167,168} Priprema metalnih prevlaka uranjanjem u plazmu korištena je za dobivanje filmova titanijevog oksida, filmova hidrogeniranog amorfnog ugljika dopiranog dušikom te filmova Si-N koji su pospješili međudjelovanje materijala i krvi. Navedeni filmovi u istraživanjima su pokazali antitrombotsko djelovanje.¹⁶⁹ Tom metodom također su pripremane metalne prevlake kombinacije magnezija i srebra koje su pokazale puno bolje antibakterijsko djelovanje u odnosu na sam titanij.¹⁷⁰ Priprema prevlaka uranjanjem u plazmu omogućuje ugradnju različitih elemenata na površinu supstrata. Pored toga omogućuje preciznu kontrolu koncentracije i rasporeda ugrađenih iona.¹⁶⁷ Kemijskim prevlačenjem spojeva iz plinovitog stanja pripremane su razne prevlake poput nanožica TiO_2 dopiranih silicijem, koje su poboljšale hidrofilnost površine.¹⁷¹ Nadalje, tom metodom pripremane su nanoprevlake

grafitnih i TiO_2 materijala pri čemu su prevlake pokazale jaku dobru antibakterijsku učinkovitost.¹⁷² Kemijsko prevlačenje iz plinovitog stanja može dati prevlake vrlo dobrih svojstava, no nije učestala metoda pripreme obzirom da koristi visoke temperature, a deponiranje spojeva tim načinom je vrlo sporo. Osim toga metoda koristi toksične izvore plinova te potencijalni plinoviti nusprodukti mogu biti štetni u daljnjem procesu implantacije.¹⁶⁷ Sol-gel i elektrokemijske metode koriste se za pripremu raznovrsnih oksidnih filmova, kao što su filmovi TiO_2 koji poboljšavaju površinsku tvrdoću, otpornost na trošenje i otpornost na koroziju. Pored toga, sol-gel metodom pripremane su prevlake TiO_2 i Ag koje nisu pokazale citotoksičnost, a pospješile su svojstvo otpornosti na koroziju.¹⁷³

2.6.3. Funkcionalizacija površine titanija kalcijevim fosfatima i njihovim kompozitima

Razni kalcijevi fosfati nanoseni su na površinu titanija, jer se kombinacijom biokompatibilnosti i mehaničke snage titanija te bioaktivnosti kalcijevih fosfata dobivaju materijali uspješniji u oseointegraciji. Pored toga, pripremane su i prevlake kalcijevih fosfata i nanočestica srebra na površini titanija kako bi se postiglo i antibakterijsko djelovanje. Razne metode korištene su za pripremu takvih prevlaka, pri čemu se one dijele u dvije veće skupine, fizikalne i kemijske metode. Fizikalne metode označuju modifikaciju strukture površine te u tu skupinu spadaju raspršivanje plazmom i fizikalno deponiranje iz pare. Kemijskim metodama modifikacije mijenjaju se kemijska svojstva površine, a za implantate najčešće se koriste sol-gel metoda i elektrokemijska depozicija.^{167,174}

Raspršivanje plazmom tehnika je termalnog raspršivanja uz plazmu kao termalni izvor. Prevlake kalcijevih fosfata vrlo se često pripremaju tom metodom jer uvjeti pripreme mogu modulirati sastav, kristalnost i nastajanje pora mikrometarskih veličina u prevlakama.^{167,174} Osim prevlaka kalcijevih fosfata, tom metodom pripremane su i prevlake kompozita kalcijevih fosfata i srebra. Za dobivanje kompozitnih prevlaka, prah srebra i kalcijevih fosfata mljeven je te je konačna mješavina korištena za raspršivanje plazmom.²⁵ Metoda je vrlo ekonomična i jednostavna, no s obzirom na to da se koriste visoke temperature ne može se koristiti za ugradnju biomakromolekula.^{167,174}

Fizikalna depozicija iz pare način je fizikalne pripreme prevlake koji uključuje sublimaciju spoja u vakuumu te njegovu depoziciju na vodljivi supstrat. Fizikalnom depozicijom iz pare smatra se svako vakuumsko isparavanje, platiranje ionima ili rasprašivanje.¹⁶⁷ Od tih metoda, najkorištenije je magnetronsko rasprašivanje koje omogućuje

pripremu prevlaka u više slojeva, pri čemu slojevi ne moraju imati isti sastav. Navedeno omogućuje kombiniranje raznovrsnih spojeva različitih svojstava, što daje multifunkcionalnost prevlakama.^{167,175} Magnetronsko rasprašivanje temelji se na korištenju radiofrekventnog električnog polja za ubrzanje iona prema meti. Atomi i molekule deponiraju se rasprašivanjem pri čemu nastaje uniforman sloj kontrolirane debljine.^{168,175} Tom metodom pripremane su troslojne prevlake kalcijevih fosfata, aluminiyevog oksida i titaniyevog dioksida na površini implantata od legure titanija, aluminija i vanadija. Dobivene su prevlake biokompatibilne, zbog prisutnosti CaP-a, dok su Al_2O_3 i TiO_2 utjecali na poboljšanu otpornost na koroziju.¹⁷⁶ Magnetronskim rasprašenjem pripremljene su i višeslojne prevlake kalcijevih fosfata i srebra na površini titanija. Prevlake su pripremljene naizmjeničnim rasprašenjem slojeva kalcijevih fosfata i srebra pri povišenoj temperaturi i sniženom tlaku uz dodatno termalno obrađivanje po naslojavanju. Dobivene prevlake pokazale su dobro antibakterijsko djelovanje i netoksičnost za osteoblaste.²³ Fizikalna depozicija iz pare, iako vrlo raširena tehnika, ima nekoliko ograničenja, a najvažnije je nastanak prevlaka slabo vezanih za površinu supstrata. Tako pripremljene prevlake imaju ograničenu uporabu s obzirom na to da u „ekstremnijim“ uvjetima može doći do njihovog otkidanja sa supstrata.¹⁶⁷

Sol-gel metoda učestala je metoda pripreme oksidnih slojeva na implantatima, odnosno njihove kemijske modifikacije. Temelji se na pripremi prevlaka iz sol i gel faze, pri čemu na svojstva prevlake značajno utječu pH i početni reaktanti.¹⁶⁷ Tom metodom pripremljene su prevlake kalcijevih fosfata dopirane ionima srebra na pasiviranoj površini titanija. Dobivene prevlake pokazale su smanjenu adheziju bakterija na površinu u odnosu na neprevučenu površinu titanija.²⁴ Nakon naslojavanja kalcijevih fosfata na površinu titanija, u literaturi su korišteni mnogi tretmani nakon nanošenja za induciranje kristalizacije ili rekristalizacije, poboljšanje vezanja nekih spojeva i isparavanje zarobljenog otapala. Tretmani obično uključuju izlaganje povišenim temperaturama pri čemu primjerice amorfní kalcijev fosfat i druge ne-apatitne faze prelaze u hidroksiapatit, što povećava kristalnost i otpornost na koroziju.^{177–180} Iako je sol-gel metoda široko raširena, sol-gel prevlake rijetko se pripremaju u industrijskim procesima zbog dugotrajne pripreme i potrebe za sinteriranjem nakon pripreme.¹⁷⁴

Druga vrlo raširena metoda kemijske pripreme prevlaka je elektrokemijska priprema, koja se smatra blagom metodom. Takvim načinom pripremani su apatitni slojevi kalcijevih fosfata na površini titanija iz pomiješanih ishodnih otopina kalcijevih i fosfatnih iona.

Dobivene prevlake poboljšale su otpornost na koroziju titanija.¹⁸¹ Pored toga, elektrokemijskom depozicijom pripremljene su prevlake kalcijevih fosfata i nanočestica srebra, no tim je načinom pripremljen prvo sloj kalcijevih fosfata, na koji je potom adsorbiran sloj nanočestica srebra. Navedene prevlake utječu na poboljšanje antibakterijskog djelovanja temeljenog na kontaktu bakterije sa slojem nanočestica srebra.¹⁸²

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Materijali za sintezu i karakterizaciju nanočestica srebra

Za sintezu nanočestica srebra stabiliziranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), trinatrijevim citratom (cit-AgNP) i poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) korištene su kemikalije analitičke čistoće srebrov nitrat (AgNO_3), trinatrijev citrat dihidrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), poli(vinilpirolidon) (PVP), natrijev bis(2-etilheksil)sulfosukcinat (AOT), D-glukoza, amonijak i natrijev hidroksid proizvođača Sigma Aldrich. Za određivanje koncentracije srebra u suspenzijama nanočestica srebra korištena je nitratna kiselina (Suprapur®, Merck) i standardna otopina srebra (Merck, Darmstadt, Njemačka).

3.1.2. Materijali korišteni za pripravu taložnih sustava

Za taloženje su korištene kemikalije analitičke čistoće kalcijev klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), klorovodična kiselina, natrijev hidroksid, albumin iz goveđeg seruma (BSA) i kitozan (Chi) proizvođača Sigma Aldrich.

3.1.3. Materijali za obradu i prevlačenje površine titanija

Pločice titanija veličine $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$, debljine 0,5 mm, 99,6 %-tne čistoće, nabavljene su od HMW Hauner GmbH & Co.KG, Njemačka.

Za obradu pločica korištena je klorovodična kiselina proizvođača Gram-mol i sumporna kiselina proizvođača Fisher Chemical.

Za prevlačenje obrađenih pločica različitim kompozitima korištene su sintetizirane nanočestice srebra različitih površinskih modifikacija (AOT-AgNP, cit-AgNP, PVP-AgNP) te kemikalije analitičke čistoće: kalcijev klorid dihidrat, natrijev hidrogenfosfat, klorovodična kiselina, natrijev hidroksid, albumin iz goveđeg seruma i kitozan proizvođača Sigma Aldrich.

3.2. Eksperimentalni postupci

3.2.1. *Sinteza nanočestica srebra različite površinske modifikacije*

Nanočestice srebra modificirane natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom pripremljene su prema protokolu Vinković Vrček i sur.^{183,184}. U okruglu tikvicu dodano je 173 cm³ vodene otopine AOT-a koncentracije $5,18 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ uz jako miješanje na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. U vodenu otopinu AOT-a je zatim dodano 2,22 cm³ vodene otopine AgNO₃ koncentracije $90 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³ i 0,133 cm³ vodene otopine 35 %-tnog NH₃, te 4 cm³ vodene otopine D-glukoze koncentracije 0,5 mol dm⁻³ brzinom 1 kap/s. Na kraju je dodano 0,6 cm³ vodene otopine NaOH koncentracije 1 mol dm⁻³. Dobivena reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj miješalici 0,5 h zaštićena od svjetla. Po završetku reakcije suspenzija je centrifugirana dva puta: prvi puta na 5500 rpm 20 min, a drugi puta na 6000 rpm 15 min. Suvišak reaktanata uklonjen je odvajanjem supernatanta, čime je zaostala suspenzija AOT-AgNP, koja je čuvana zaštićena od svjetla na 4 °C za daljnje eksperimente.

Nanočestice srebra stabilizirane poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) pripremljene su također prema protokolu Vrček i sur.¹⁸³ na sličan način kao i AOT-AgNP pri temperaturi od 40 °C koristeći 0,193 dm³ 0,31 %-tne vodene otopine PVP-a.

Nanočestice srebra stabilizirane citratom (cit-AgNP) sintetizirane su prema protokolu Munro i sur.^{185,186} Vodena otopina AgNO₃ koncentracije 1,01 mol dm⁻³ zagrijana je do vrenja uz miješanje na magnetskoj miješalici nakon čega je dodano 2,27 cm³ 1 %-tne vodene otopine trinatrijevog citrata dihidrata (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) te je reakcijska smjesa miješana na magnetskoj miješalici 3 h pri 100 °C. Suspenzija citratnih nanočestica odvojena je centrifugiranjem i čuvana na jednak način kao i AOT-AgNP.

3.2.2. *Stabilnost različito modificiranih nanočestica srebra u vodi i vodenoj otopini Na₂HPO₄*

Stabilnost različito modificiranih nanočestica srebra ispitivana je mjerenjem veličine čestica i zeta potencijala u destiliranoj i deioniziranoj vodi provodnosti 0,055 μS cm⁻¹ (miliQ voda) i vodenoj otopini Na₂HPO₄ koncentracije $8 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³ koja je korištena za pripremu taložnih sustava. U tu svrhu pripremljene su suspenzije različito modificiranih AgNP-a (AOT-AgNP, PVP-AgNP i cit-AgNP) koncentracije 50 mg dm⁻³, dvostruko veće od najvećih

korištenih za pripremu taložnih sustava. Veličina čestica i zeta potencijal mjereni su tijekom 24 h dinamičkim i elektroforetskim raspršenjem svjetla (DLS i ELS).

3.2.3. Taloženje kalcijevih fosfata u kontrolnom sustavu

Ishodne vodene otopine $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i Na_2HPO_4 koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ pripremljene su otapanjem točne odvage kemikalija (prethodno sušenih 1,5 h pri 85°C u sušioniku) u miliQ vodi. pH pripremljene vodene otopine Na_2HPO_4 podešen je na 7,4 korištenjem koncentrirane vodene otopine HCl . Radne vodene otopine $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i Na_2HPO_4 koncentracije $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pripremane su razrjeđivanjem odgovarajućih ishodnih vodenih otopina, pri čemu je pH radne vodene otopine Na_2HPO_4 podešen na 7,4.

Za ispitivanje utjecaja aditiva na taloženje kalcijevih fosfata pripremljen je kontrolni sustav bez aditiva, u kojem je praćeno taloženje kalcijevih fosfata. Kontrolni sustav pripremljen je brzim miješanjem 200 cm^3 radnih vodenih otopina $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i Na_2HPO_4 u termostatiranom reaktoru pri 25°C bez dodatnog miješanja. Taloženje CaP -a praćeno je potenciometrijski, pri čemu je amorfni talog odvajanje nakon 10 minuta taloženja, a kristalni talog nakon 60 minuta taloženja. Dobiveni talog filtriran je s pomoću filter papira s veličinom pora $0,45 \mu\text{m}$, zatim ispran nekoliko puta vodom, jednom etanolom te je čuvan u eksikatoru za daljnje analize.

3.2.4. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti nanočestica srebra različite površinske modifikacije i biomakromolekula

Kako bi se ispitaio utjecaj različito modificiranih nanočestica srebra, biomakromolekula te njihovih kombinacija na taloženje kalcijevih fosfata, pripremljeni su taložni sustavi na sličan način kao i kontrolni sustavi. Radna vodena otopina $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pripremljena je jednako kao i za kontrolne sustave, dok je radna vodena otopina Na_2HPO_4 sadržavala različite aditive, nanočestice srebra, biomakromolekule i njihove kombinacije (tablica 3). Radnoj vodenoj otopini Na_2HPO_4 je nakon dodatka aditiva pH namješten na 7,4 vodenim otopinama HCl (1 mol dm^{-3}) i NaOH (1 mol dm^{-3}).

Uz taložne sustave s jednim aditivom, pripremani su i taložni sustavi s kombinacijom aditiva, AgNP -a i biomakromolekula, pri čemu je u navedenim sustavima koncentracija

AgNP bila 10 mg dm^{-3} (tablica 3). Korištene koncentracije Chi manje su u odnosu na BSA zbog puno manje topljivosti Chi te su već u ranijim istraživanjima dobiveni slični efekti.¹⁸⁷

Tablica 3. Koncentracije različitih aditiva dodanih u taložni sustav s kalcijevim fosfatima te oznake konačnih produkata taložnih sustava. Kao aditivi korištene su nanočestice srebra stabilizirane natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatijskim citratom (cit-AgNP), BSA – albumin iz goveđeg seruma, Chi – kitozan.

AgNP	γ (AgNP) / mg dm^{-3}	γ (BSA) / mg dm^{-3}	γ (Chi) / mg dm^{-3}	Oznaka
bez AgNP	/	25	/	CaP/BSA
	/	50	/	
	/	100	/	
	/	/	5	CaP/Chi
	/	/	10	
	/	/	25	
AOT-AgNP	5	/	/	CaP/AOT-AgNP
	10	/	/	
	25	/	/	
	10	25	/	CaP/AOT-AgNP/BSA
	10	50	/	
	10	100	/	
	10	/	5	CaP/AOT-AgNP/Chi
	10	/	10	
	10	/	25	
PVP-AgNP	5	/	/	CaP/PVP-AgNP
	10	/	/	
	25	/	/	
	10	25	/	CaP/PVP-AgNP/BSA
	10	50	/	
	10	100	/	
	10	/	5	CaP/PVP-AgNP/Chi
	10	/	10	
	10	/	25	
cit-AgNP	5	/	/	CaP/cit-AgNP
	10	/	/	
	25	/	/	
	10	25	/	CaP/cit-AgNP/BSA
	10	50	/	
	10	100	/	
	10	/	5	CaP/cit-AgNP/Chi
	10	/	10	
	10	/	25	

Dobiveni talozi CaP/AgNP odvojeni su na jednak način kao u kontrolnom sustavu. Talozi CaP/BSA i CaP/AgNP/BSA odvojeni su slično kao i u kontrolnom sustavu, pri čemu su

amorfni talozi odvojeni nakon 15 minuta taloženja, a kristalni talog nakon 80 minuta taloženja. Kristalni talozi CaP/Chi i CaP/AgNP/Chi odvojeni su slično kao i u kontrolnom sustavu, no nakon 120 minuta taloženja za sve kompozite osim za najveću koncentraciju Chi u kompozitu CaP/PVP-AgNP/Chi gdje su odvajani nakon 17 sati. Amorfni talozi CaP/Chi i CaP/AgNP/Chi nisu odvajani zbog nedovoljne količine nastalog taloga. Nastali talozi isprani su vodom i etanolom te su sušeni i pohranjeni u eksikatoru, zaštićeni od svjetla.

3.2.5. Obrada površine pločica titanija

Titanijeve pločice jetkane su kiselinama radi modifikacije površine za pripremu kompozitnih prevlaka. Prije jetkanja, pločice titanija očišćene su prema protokolu Wen i sur.¹⁸⁸ 20 minuta u acetonu, zatim 20 minuta u 96 %-tnom etanolu te dva puta po 20 minuta u miliQ vodi. Za svaki korak korištena je ultrazvučna kupelj.

Nakon čišćenja, pločice su jetkane prema dva različita protokola:

1. jetkanje s HCl (prema Wang i sur.¹⁵): pločice su uronjene u 20 %-tnu vodenu otopinu klorovodične kiseline na 1 h pri sobnoj temperaturi. Nakon jetkanja, isprane su dva puta po 20 minuta miliQ vodom u ultrazvučnoj kupelji.
2. Jetkanje smjesom H₂SO₄ i HCl (prema Lu i sur.¹⁷): pripremljena je smjesa 98 %-tne vodene otopine sumporne kiseline, 36,5 %-tne vodene otopine klorovodične kiseline i miliQ vode u omjeru 1 : 1 : 1. Pločice titanija jetkane su tom smjesom 1 h pri 60 °C, a zatim isprane dva puta po 20 minuta miliQ vodom u ultrazvučnoj kupelji.

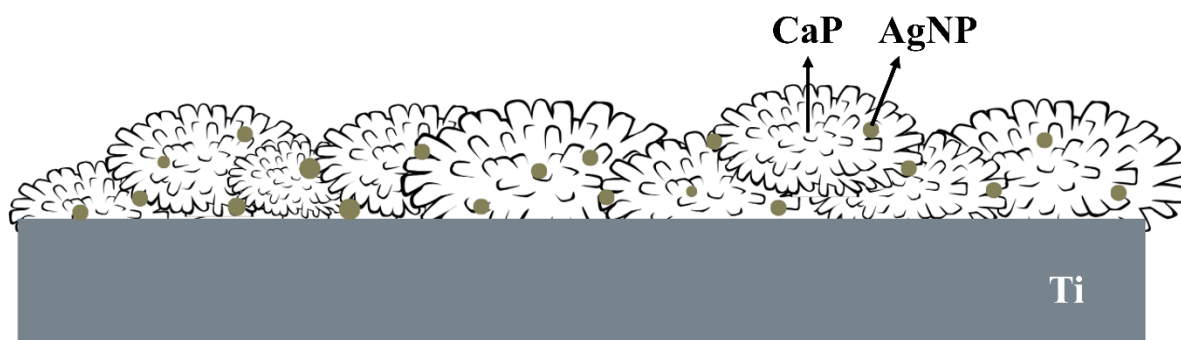
3.2.6. Priprema kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i biomakromolekula

Za pripremu prevlaka kalcijevih fosfata na obrađenoj površini titanija, korištene su neposredno pripremljene suspenzija amornog kalcijevog fosfata i metastabilna kalcificirajuća vodena otopina. Površine titanija prevučene su slojem kalcijevih fosfata prema protokolu Dutour Sikirić i sur.¹⁸⁹ Metastabilna vodena otopina kalcijevih fosfata pripremljena je miješanjem vodene otopine CaCl₂·2H₂O koncentracije 5,6·10⁻³ mol dm⁻³ i vodene otopine Na₂HPO₄ koncentracije 4,0·10⁻³ mol dm⁻³, pri čemu je prije miješanja vodenoj otopini Na₂HPO₄ podešen pH na 7,4 s pomoću HCl (1 mol dm⁻³). Navedena otopina bistra je i stabilna do 14 dana. Pored toga, pripremljena je suspenzija amornog kalcijevog fosfata (ACP) brzim miješanjem vodene otopine CaCl₂·2H₂O koncentracije 20·10⁻³ mol dm⁻³ i

vodene otopine Na_2HPO_4 koncentracije $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pri čemu je prije miješanja vodenoj otopini Na_2HPO_4 podešen pH na 7,4.

Pločice titanija, neobrađene, obrađene vodenom otopinom klorovodične kiseline i smjesom vodenih otopina HCl i H_2SO_4 , postavljene su na dno jažica mikrotitarskih ploča s 24 jažice. Pločice su zatim bile izložene 3 cm^3 svježe pripremljene suspenzije amornog kalcijevog fosfata tijekom 7 minuta. Nakon 7 minuta, suspenzija amornog kalcijevog fosfata je aspirirana te je postupak ponovljen 3 puta kako bi se pripremio uniformni sloj adsorbiranog amornog kalcijevog fosfata. Pločice titanija su potom uronjene u metastabilnu kalcificirajuću vodenu otopinu 48 h pri 25°C , nakon čega su isprane miliQ vodom i osušene u eksikatoru. Opisanim načinom pripremljene su kontrolne prevlake kalcijevih fosfata na površinama titanija.

Priprema kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata i različito modificiranih nanočestica srebra na obrađenoj površini titanija (slika 16) slijedila je jednak postupak kao za kontrolne prevlake, uz dodatak suspenzija različitih nanočestica srebra u vodenu otopinu Na_2HPO_4 prije pripreme suspenzije amornog kalcijevog fosfata. Suspenzija amornog kalcijevog fosfata pripremljena je uz dodatak AOT-AgNP-a, PVP-AgNP-a i cit-AgNP-a u koncentraciji 20 mg dm^{-3} .



Slika 16. Shematski prikaz kompozita kalcijevih fosfata (CaP) i nanočestica srebra (AgNP) na površini titanija

Kako bi se odredio utjecaj biomakromolekula na pripravu prevlaka, BSA i kitozan su adsorbirani na površine pločica izlaganjem pločica vodenoj otopini BSA koncentracije 100 mg dm^{-3} ili vodenoj otopini kitozana koncentracije 25 mg dm^{-3} tijekom 24 h pri 25°C . Tako pripremljene pločice prevučene su prevlakama kalcijevih fosfata i kompozitnim prevlakama nanočestice srebra/kalcijevi fosfati prethodno opisanim postupkom. Svi

pripremljeni uzorci, kombinacije različitih aditiva na različito obrađenim površinama titanija prikazani su u tablici 4. Prevučene pločice isprane su miliQ vodom, čuvane u eksikatoru zaštićene od svjetla za daljnje analize.

Tablica 4. Sastav prevlaka pripremljenih na površini titanija jetkanoj 20 %-tnim HCl-om 1 h pri sobnoj temperaturi (T_{HCl}) i površini titanija jetkanoj smjesom $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$). CaP – kalcijevi fosfati, AOT-AgNP – nanočestice srebra stabilizirane natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom, PVP-AgNP – nanočestice srebra stabilizirane poli(vinilpirolidonom), i cit-AgNP – nanočestice srebra stabilizirane trionatrijevim citratom, BSA – albumin iz goveđeg seruma i Chi – kitozan.

Vrsta površine	Vrsta AgNP	Dodana biomakromolekula	Oznaka prevlake
/	/	/	CaP
T_{HCl}	/	/	CaP
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	/	/	CaP
T_{HCl}	/	BSA	CaP/BSA
T_{HCl}	/	Chi	CaP/Chi
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	/	BSA	CaP/BSA
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	/	Chi	CaP/Chi
T_{HCl}	AOT-AgNP	/	CaP/AOT-AgNP
T_{HCl}	PVP-AgNP	/	CaP/PVP-AgNP
T_{HCl}	cit-AgNP	/	CaP/cit-AgNP
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	AOT-AgNP	/	CaP/AOT-AgNP
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	PVP-AgNP	/	CaP/PVP-AgNP
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	cit-AgNP	/	CaP/cit-AgNP
T_{HCl}	AOT-AgNP	BSA	CaP/AOT-AgNP/BSA
T_{HCl}	PVP-AgNP	BSA	CaP/PVP-AgNP/BSA
T_{HCl}	cit-AgNP	BSA	CaP/cit-AgNP/BSA
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	AOT-AgNP	BSA	CaP/AOT-AgNP/BSA
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	PVP-AgNP	BSA	CaP/PVP-AgNP/BSA
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	cit-AgNP	BSA	CaP/cit-AgNP/BSA
T_{HCl}	AOT-AgNP	Chi	CaP/AOT-AgNP/Chi
T_{HCl}	PVP-AgNP	Chi	CaP/PVP-AgNP/Chi
T_{HCl}	cit-AgNP	Chi	CaP/cit-AgNP/Chi
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	AOT-AgNP	Chi	CaP/AOT-AgNP/Chi
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	PVP-AgNP	Chi	CaP/PVP-AgNP/Chi
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	cit-AgNP	Chi	CaP/cit-AgNP/Chi

3.3. Eksperimentalne metode

3.3.1. Dinamičko i elektroforetsko raspršivanje svjetla

Dinamičko raspršenje svjetla (DLS) koristi se za određivanje veličine čestica u koloidnim suspenzijama. Eksperimentalna je metoda zasnovana na mjerenju vremenske autokorelacijske funkcije intenziteta svjetlosti raspršene na razrijeđenoj suspenziji čestica.¹⁹⁰ Usmjeravanjem monokromatskog svjetla na čestice u suspenziji, dolazi do raspršenja svjetlosti zbog njihovog nasumičnog gibanja, tzv. Brownovog gibanja. Gibanje čestica uzrokuje fluktuacije u raspršenom svjetlu tijekom vremena. Na temelju promjena u intenzitetu raspršene svjetlosti, konstruira se autokorelacijska funkciju pomoću koje se može izračunati translacijski difuzni koeficijent (D), veličina koja se određuje DLS-om. Hidrodinamički promjer čestice povezan je preko Einstein-Stokesove jednadžbe s translacijskim difuzijskim koeficijentom što omogućuje računanje veličine čestica iz DLS mjerenja.¹⁹¹

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_h} \quad (1)$$

pri čemu k_B označuje Boltzmannovu konstantu, T apsolutnu temperaturu, η dinamičku viskoznost i d_h hidrodinamički promjer.

Zeta potencijal je elektrokinetički potencijal na kliznoj ravnini koloidne čestice koja se kreće u električnom polju. Zeta potencijal mjeri se elektroforetskim raspršenjem svjetlosti (ELS).¹⁹¹

Raspodjela veličine i zeta potencijala nanočestica srebra, BSA i Chi u otopini Na_2HPO_4 mjerene su dinamičkim odnosno elektroforetskim raspršenjem svjetla koristeći fotonsko korelacijski spektrofotometar s „zelenim“ laserom valne duljine 532 nm (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Intenzitet raspršenog svjetla detektiran je pri kutu 173° za DLS mjerenja. Kako se ne bi precijenila veličina zbog raspršenja na većim česticama, hidrodinamički promjer određen je kao vrijednost maksimuma raspodjele veličine po volumenu. Zeta potencijal izračunat je iz izmjerene elektroforetske mobilnosti korištenjem Henryjeve jednadžbe i aproksimacije po Smoluchowskom. Za određivanje veličine čestica uzorci su mjereni 6 puta, dok su za određivanje zeta potencijala mjereni 3 puta. Obrada podataka provedena je s pomoću Zetasizer Software 8.02 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Mjerenja su provedena pri temperaturi $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

3.3.2. UV-Vis spektroskopija

UV-Vis spektroskopija korištena je za potvrdu nastanka nanočestica srebra. Pod utjecajem UV-Vis zračenja, dolazi do pojave oscilacija u materijalu kao posljedica međudjelovanja površinskih elektrona i elektromagnetskog zračenja. Prilikom totalne unutarnje refleksije, pri rezonantnoj frekvenciji nanočestice, površinski elektroni apsorbiraju svjetlost te dolazi do njihovog kolektivnog pobuđivanja. Iz navedenog razloga dolazi do naglog povećanja apsorpcije pri karakterističnoj rezonantnoj valnoj duljini, tzv. površinske plazmonske rezonancije (engl. *surface plasmon resonance*, SPR). Valna duljina SPR-a ovisi o vrsti nanočestice, veličini, obliku i gustoći materijala.¹⁹²

UV-Vis spektri vodenih suspenzija nanočestica srebra snimljeni su na Carry 60 UV-Vis spektrofotometru (Agilent, Santa Clara, CA, SAD). Prisutnost maksimuma površinske plazmonske rezonancije korištena je kao potvrda nastanka nanočestica srebra.

3.3.3. Atomska apsorpcijska spektrometrija

Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS) analitička je tehnika koja omogućava vrlo precizno kvantitativno određivanje količine pojedinog elementa u uzorku. Metodom se željeni elementi pobuđuju u ekscitirano stanje, koje je nestabilno, pa brzo dolazi do relaksacije odnosno emisije apsorbirane energije. Emitira se zračenje nekoliko specifičnih valnih duljina (spektralne linije) karakterističnih za pojedini element, što omogućuje određivanje pojedinog elementa. Mjerenjem intenziteta spektralnih linija određuje se koncentracija elementa u uzorku.¹⁹³

Atomska apsorpcijska spektrometrija korištena je za određivanje koncentracije srebra u suspenzijama sintetiziranih nanočestica srebra. U tu svrhu korišten je atomski apsorpcijski spektrometar s grafitnom peći (GFAAS) (Perkin Elmer AAnalyst 600, Perkin Elmer, Shelton, SAD) sa Zeemanovom pozadinskom korekcijom. Uzorci su otopljeni u 10 %-tnoj (v/v) nitratnoj kiselini prije određivanja koncentracije. Za kalibraciju je korištena standardna otopina srebra (1000 mg dm^{-3} u 5 %-tnoj otopini HNO_3) proizvođača Merck (Darmstadt, Njemačka).

3.3.4. Spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom

Spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) rutinski se koristi u različitim istraživačkim poljima za kvantitativno određivanje koncentracije elemenata u uzorku. Osjetljivost metode je na razini nižoj od ppm (*parts per million*). Induktivno spregnuta plazma kao atomizator i ionizator omogućuje idealno uvođenje uzorka za masenu spektrometriju što omogućuje vrlo veliku osjetljivost instrumenta.¹⁹⁴

Spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom korištena je za određivanje koncentracije pripremljenih suspenzija nanočestica srebra. U tu svrhu korišten je maseni spektrometar ICP-QQQ 8900 (Agilent, USA) uz korištenje standardne otopina za kalibraciju. U uzorke je dodan unutarnji standard otopine srebra ($1,000 \pm 0,002 \text{ g dm}^{-3}$). Za određivanje sadržaja srebra, uzorci su otopljeni u 2%-tnoj (v/v) otopini nitratne kiseline. Kvaliteta mjerenja osigurana je simultanom analizom kontrolnih uzoraka ultračiste vode i uzoraka unutarnje kontrole.

3.3.5. Potenciometrija

Taloženje kalcijevih fosfata u kontrolnim sustavima bez aditiva i taložnim sustavima s aditivima (različito modificiranim srebrnim nanočesticama: AOT-AgNP, PVP-AgNP i cit-AgNP, BSA i Chi) moguće je pratiti potenciometrijski jer transformacija ACP u kristalni kalcijev fosfat uzrokuje snižavanje pH taložnog sustava.¹⁹⁵ U tu svrhu korištena je staklena kombinirana elektroda tvrtke Sentek Ltd. (Brentford, Ujedinjeno Kraljevstvo) i pH-metar (Metrohm, Herisau, Švicarska). pH-metar je kalibriran prije svakog korištenja puferkim otopinama pH vrijednosti 4, 7 i 9, proizvođača Merck. pH vrijednosti taložnih sustava mjerene su svaku minutu.

3.3.6. Difrakcija rendgenskog zračenja

Difrakcija rendgenskog zračenja (engl. *X-Ray Diffraction*, XRD) analitička je tehnika određivanja kristalne strukture, kemijskog sastava i fizičkih svojstava materijala. Polikristalni uzorak može se sastojati od više istovrsnih ili raznovrsnih kristala različitog smjera orijentacije. Difraktogram praha prikazuje položaj, širinu te relativni intenzitet difrakcijskih

maksimuma, što daje informaciju o međuplošnom razmaku, kristalnom sastavu te mogućoj supstituciji atoma.¹⁹⁶

Kako bi se odredio sastav praškastih uzoraka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra i biomakromolekula snimljeni su difraktogrami s pomoću instrumenta Panalytical Aeris Research Edition (Malvern Panalytical, Malvern, Worcestershire, UK) u Bragg-Brentano geometriji koristeći $\text{CuK}\alpha$ zračenje. Difraktogrami su snimljeni u rasponu od 5° do $70^\circ 2\theta$ s korakom $0,02^\circ$ te brzinom snimanja 1° min^{-1} .

3.3.7. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) jedna je od najčešće primjenjivanih spektroskopskih tehnika za karakterizaciju materijala. FTIR spektar sastoji se od vibracijskih vrpce funkcijskih skupina prisutnih u uzorku koje se pojavljuju pri karakterističnim valnim brojevima. Na temelju dijela spektra između $1500\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ pod nazivom „otisak prsta“ moguće je identificirati spoj ako je FTIR spektar navedenog spoja već pohranjen u bazi podataka.¹⁹⁷

Pored identifikacije materijala na temelju vibracija funkcijskih skupina, FTIR se pokazao kao jednostavna tehnika razlikovanja amorfnih i različitih kristalnih faza pojedinog materijala na temelju matematičke manipulacije spektara, odnosno derivacija. Derivacije spektara prvog i drugog reda omogućuju preciznije određivanje spektralnih linija karakterističnih za amorfno ili pojedino kristalno stanje kalcijevih fosfata. Derivacija spektra prvog reda omogućuje preciznije određivanje položaja vrpce, dok derivacija drugog reda omogućuje detaljniju analizu spektara s obzirom da su povećanjem stupnja derivacije razlike u spektrima vidljivije.¹⁹⁸

Spektri dobivenih taloga snimljeni su FTIR spektrometrom opremljenim s ATR (attenuated total reflection) modulom (Tensor I, Bruker, Ettlingen, Njemačka). Spektri su snimljeni u rasponu $4000\text{--}450 \text{ cm}^{-1}$ s rezolucijom 1 cm^{-1} i prosječnim brojem od 16 snimaka.

Prva i druga derivacija FTIR spektara u području $1200\text{--}450 \text{ cm}^{-1}$ dobivene su slijedeći proceduru prema Uskoković i sur.¹⁹⁸ koristeći Origin Pro 2021b programu. Točnije FTIR spektri su derivirani u navedenom rasponu te je dobiveni spektar prve i druge derivacije zaglađen metodom prema Lowessu s korakom 0,01.¹⁹⁸

3.3.8. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija karakterizacijska je metoda komplementarna FTIR spektroskopiji kojom se određuje sastav uzorka na temelju karakterističnih vibracija pojedinih funkcijskih skupina. Temelji se na neelastičnom raspršenju upadnog zračenja pri čemu dolazi do apsorpcije i pobuđivanja pojedinih veza te relaksacije istih u različito vibracijsko stanje u odnosu na početno. Takvim neelastičnim raspršenjem dobiva se Ramanov spektar iz kojeg je na temelju vrpce karakterističnih za pojedine funkcionalne skupine moguće odrediti sastav analiziranog uzorka. U Ramanovoj spektroskopiji izraženije su vibracije koje su gotovo nevidljive ili slabo izražene u FTIR spektru.^{197,199} Ramanova spektroskopija koristi se za analizu raznovrsnih materijala, od prahova do čvrstih površina. Obzirom da laser služi kao izvor zračenja, tehnika se može primijeniti na malo područje na površini uzorka. Jedna od širih primjena Ramanove spektroskopije uključuje fenomen površinski pojačane Ramanove spektroskopije (SERS). Temelji se na pojačanju signala u Ramanovom spektru kao posljedica prisustva pojedinih metala poput srebra, bakra i zlata. Navedeno omogućuje značajno povećanje omjera signal/šum te lakšu asignaciju svih prisutnih vibracijskih vrpce.¹⁹⁹

Ramanovom spektroskopijom analizirane su prevlake kompozita kalcijevih fosfata i nanočestica srebra bez i s albuminom iz goveđeg seruma i kitozanom. Za snimanje Raman spektara korišten je Horiba LabRam Odyssey Nano Raman spektrometar (Horiba Scientific, Kyoto, Japan) s optičkim mikroskopom i Nd-YAG laserom valne duljine 532 nm. Uzorci su vizualizirani objektivom s 50 kx uvećanjem, a spektri su snimljeni koristeći snagu lasera 6,11 mW, vrijeme akumulacije 10 s i 10 akumulacija. Spektroskop je prije korištenja kalibriran Si signalom pri 520 cm⁻¹.

3.3.9. Termogravimetrijska analiza

Termalne analize vrlo su česte u karakterizaciji materijala jer omogućuju određivanje promjena u materijalu uslijed povećanja temperature u rasponu od interesa. Termogravimetrijska analiza (TGA) služi za određivanje fizikalno-kemijskih promjena u uzorku praćenjem promjene mase uslijed povećanja temperature unutar unaprijed određenog raspona temperature.²⁰⁰

Termogravimetrijska analiza kristalnih kompozita provedena je koristeći STA 449 F5 Jupiter termalni analizator (Netzsch, Bayern, Njemačka) i termalnu vagu Mettler TG 50

(Mettler Toledo Corp., Zürich, Švicarska) opremljenu TC 10 TA procesorom. Mjerenja su provedena u struji zraka s brzinom zagrijavanja 10 K min^{-1} .

3.3.10. Brunauer-Emmet-Tellerova metoda određivanja specifične površine

Brunauer-Emmet-Tellerovom (BET) metodom određuje se specifična površina čvrstog ili poroznog materijala. Specifična površina uzorka određuje se mjerenjem adsorpcije plina uz konstantnu temperaturu. Iz adsorpcijske izoterme, određuje se volumen plina u trenutku kad je nastao monosloj, što omogućuje izračun specifične površine uzorka. Brunauer-Emmett-Tellerova metoda matematički je opis adsorpcije u kojem adsorbat nije ograničen na adsorpciju do monosloja, nego je moguća i daljnja adsorpcija, te se može primijeniti za porozne i neporozne uzorke zbog čega se često upotrebljava za istraživanje raznih vrsta krutih materijala.²⁰¹

Specifična površina prahova kompozita određena je višestrukom Brunauer-Emmett-Tellerovom (BET) metodom (Gemini 2380, Micromeritics Norcross, GA, SAD) koristeći dušik kao adsorbat.

3.3.11. Elektronska paramagnetska rezonancija

Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) ili elektronska spinska rezonancija (ESR) metoda je karakterizacije uzoraka koja daje specifične opise elektronske strukture. Temelji se na međudjelovanju magnetskih dipola ili induciranih magnetskih dipola, ako uzorak nema nesparenih elektrona, s primijenjenim magnetskim poljem i elektromagnetskim zračenjem. EPR spektri daju informaciju o centru s nesparenim elektronom i njegovom međudjelovanju s okolinom te su vrlo karakteristični za pojedini element. Na izgled spektara utječu različita međudjelovanja poput elektronskog Zeemanovog međudjelovanja ili hiperfinog međudjelovanja elektrona i jezgre te ako se radi o uzorku u čvrstom stanju važno je uzeti u obzir i anizotropiju. U slučaju prisutnosti više nesparenih elektrona ili više induciranih dipola, analiza spektara postaje kompleksna tako da se za karakterizaciju uzorka uzimaju fenomenološki parametri R - i S - vrijednosti koje omogućuju uspoređivanje dvaju ili više uzoraka, odnosno uočavanje promjena između njih.²⁰²

Mjerenja elektronske paramagnetske rezonancije provedena su koristeći Bruker Magnettech ESR5000 EPR spektrometar u rasponu frekvencija rendgenskih zraka i

rezonantnom mikrovalnom frekvencijom 9,4 GHz. Magnetsko polje modulirano je pri 100 kHz uz 0,1 mT amplitudu između maksimuma. Temperatura je kontrolirana s pomoću varijabilnog upravljača za tekući dušik (TCH04). Za kalibraciju i kontrolu osi magnetskog polja korišteni su standardi za polje Mn^{2+} u ZnS (Bruker modul E8000137). Svi eksperimenti provedeni su na sobnoj temperaturi. U svrhu dobivanja paramagnetskih centara, svi uzorci ozračeni su u prisutnosti zraka na sobnoj temperaturi gamma zračenjem panoramskog Co-60 izvora zračenja u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta Ruđer Bošković.²⁰³ Ukupna doza zračenja iznosila je 25 kGy, što se smatra zlatnim standardom sterilizacije biomaterijala za regeneraciju kostiju, medicinskih uređaja i ostalih zdravstvenih proizvoda.^{204,205} Slobodni radikali inducirani zračenjem korišteni su kao molekularne probe za EPR analizu uzoraka kompozita.

3.3.12. Pretražna elektronska mikroskopija s energijski razlučujućom rendgenskom spektroskopijom

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) metoda je vizualizacije morfologije materijala. Tehnika se temelji na kretanju finog fokusiranog snopa elektrona po uzorku. Snop elektrona linijski pretražuje odabranu površinu te kontaktom zrake elektrona s uzorkom dolazi do emisije elektrona (sekundarnih ili povratno raspršenih). Emitirani elektroni iz svake analizirane točke linije daju signal u detektoru, koji se računalnom pretvorbom pretvara u pseudo-trodimenzijsku sliku.²⁰⁶

Energijski razlučujuća rendgenska spektroskopija (EDX) analitička je tehnika karakterizacije uzorka. Temelji se na specifičnoj emisiji rendgenskih zraka koje su karakteristične za svaki pojedini element. Emisija rendgenskog zračenja stimulira se visokoenergetskim snopom elektrona, pri čemu kontaktom snopa elektrona i uzorka dolazi do pobuđivanja elektrona iz unutarnje ljuske atoma uzorka. Visokoenergetski snop elektrona izbacuje elektron iz ljuske stvarajući šupljinu. Navedena šupljina popuni se elektronom iz vanjske ljuske, a zbog razlike u energiji pojedinih ljuski, dolazi do emisije rendgenskog zračenja. EDX-om se mjeri valna duljina rendgenskih zraka koje zatim daju informaciju o sastavu uzorka.¹⁹⁷

Za vizualizaciju kristalnog taloga korišten je pretražni elektronski mikroskop s emisijom polja (FE-SEM; JEOL JSM-7000 F mikroskop, JEOL, Tokio, Japan). Za SEM

analizu mala količina suhog praha stavljena je na držač na ugljičnu ljepljivu traku te je višak praha uklonjen u laganoj struji dušika.

Za vizualizaciju i karakterizaciju prevlaka na pločici titanija korišten je Zeiss Crossbeam XB350 pretražni elektronski mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka). Za kvalitativnu analizu sastava korištena je energetska disperzivna spektroskopija. Uzorci su analizirani korištenjem napon za ubrzanje od 15 kV. Provedena su ukupno tri mjerenja za mapiranje sastava titanija, kalcija, fosfora, srebra, kisika i dušika.

3.3.13. Transmisijaska elektronska mikroskopija

Transmisijaska elektronska mikroskopija (TEM) analitička je tehnika za vizualizaciju materijala visokom razlučivosti koja se temelji na prolasku snopa elektrona kroz uzorak. Mikroskopska slika dobiva se na temelju međudjelovanja elektrona iz struje i elektronskog oblaka elemenata u uzorku, pri čemu je osjetljivost tehnike vrlo velika tako da može razlikovati komponente na nanometarskoj skali.¹⁹⁷

TEM-om su analizirane nanočestice srebra u svrhu određivanja oblika i raspodjele veličine. Raspodjela veličine AgNP određena je s pomoću programa za analizu slika Image J (besplatno dostupan na <http://imagej.nih.gov/ij/>). Za svaku vrstu AgNP izmjereno je barem 30 čestica. Pored toga analizirani su amorfn talozi kalcijevih fosfata i kompozita kalcijevih fosfata, nanočestica srebra pripremljeni bez i u prisustvu albumina iz goveđeg seruma i kitozana, zbog određivanja morfologije kompozita.

Za dobivanje TEM slika korišten je transmisijski elektronski mikroskop JEOL JEM 1010 (JEOL, Tokio, Japan) pri 80 kV. Uzorci su pripremljeni dokapavanjem suspenzije na bakrenu mrežicu, prekrivenu šupljom Formvar membranom. Višak suspenzije uklonjen je filtrirnim papirom, te su mrežice s uzorcima isprane dva puta miliQ vodom.

3.3.14. Mikroskopija atomskih sila

Mikroskopija atomskih sila (AFM) nedestruktivna je tehnika karakterizacije materijala, ponajprije svojstava površine s pomoću probe koja služi za kontaktno ili beskontaktno pretraživanje površine i određivanje njene topografije. Nanometarska proba služi za pretraživanje površine malim pomacima kako bi se dobila preciznost rezultata na nanometarskoj skali.¹⁹⁷

Mikroskopija atomskih sila korištena je za vizualizaciju topografije površine i mjerenje hrapavosti neobrađenih titanijevih pločica i obrađenih titanijevih pločica. U tu svrhu korišten je mikroskop atomskih sila NX20 (Park Systems, Republika Koreja) u beskontaktnom načinu rada, koristeći beskontaktnu polugu PPP-NCHR (Park Systems, Republika Koreja). Svaki uzorak mjeren je tri puta na različitoj lokaciji pri sobnoj temperaturi i tlaku. Na svakoj lokaciji mjerena je površina $50\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ }\mu\text{m}$ brzinom pretraživanja između 0,05 i 0,1 Hz uz rezoluciju slike (512×512) piksela. Dobiveni podaci obrađeni su u Gwyddion programu dostupnom u otvorenom pristupu.

3.3.15. Optička profilometrija

Optička profilometrija tehnika je karakterizacije površine uzorka koja se temelji na beskontaktnom pretraživanju površine korištenjem svjetla. Temelji se na različitim načelima kao što su interferencija, refleksija i stvaranje sjena kako bi se precizno vizualizirala 3D topografija površine. Velika prednost metode je nedestruktivnost, visoka rezolucija, široka primjena, te najvažnije precizna kvantitativna analiza hrapavosti i teksture površine. Pored toga omogućuje mjerenje hrapavosti uzorka na većoj skali u odnosu na AFM, ovisno o korištenom objektivu prilikom mjerenja.²⁰⁷

Optičkom profilometrijom analizirane su različito obrađene površine titanija bez i s prevlakama kalcijevih fosfata i nanočestica srebra te biomolekula. Za određivanje topografije uzoraka na većoj skali u odnosu na AFM korišten je Leica DCM 3D optički sustav za površinsku metrologiju (Leica Microsystems, Wetzlar, Njemačka). Za analizu uzoraka korišten je objektiv s povećanjem 20 x, a dobiveni podaci obrađeni su u Gwyddion programu dostupnom u otvorenom pristupu. Prosječna površinska hrapavost određena je kao prosječna vrijednost hrapavosti dobivene za tri odvojene lokacije na uzorku.

3.3.16. Određivanje kontaktnog kuta i slobodne energije površine

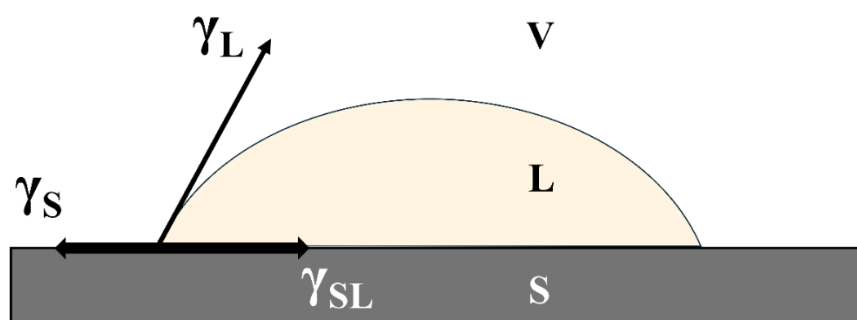
Kontaktni kut primarno je svojstvo koje opisuje vlaženje površine iz kojeg se određuje njezina relativna hidrofilnost/hidrofobnost. Definira se kao kut (C_a) na granici faza tekuće-kruto i specifičan je za svaku kombinaciju tekuće-kruto (slika 17). Vrijednosti kontaktnog kuta manje od 90° ukazuju na dobro vlaženje površine kapljevnom, dok veće vrijednosti

ukazuju suprotno. Pri kontaktnom kutu 0° dolazi do potpunog vlaženja površine, dok kutovi veći od 150° ukazuju na to da se površina uopće ne vlaži.²⁰⁸

Oblik kapljice određen je površinskom napetosti te se ona oblikuje tako da ukupna slobodna energija površine bude minimalna vlažeći tako manji ili veći dio površine, ovisno o svojstvima kapljevine i površine. Kontaktni kut opisan je Youngovom jednačbom:

$$\gamma_L \cos\theta = \gamma_S - \gamma_{SL} \quad (2)$$

pri čemu su γ_L i γ_S napetosti na granicama faza tekućina/plin i krutina/plin, a γ_{SL} napetost na granici faza krutina/tekućina.²⁰⁸



Slika 17. Shematski prikaz kontaktni kut te površinskih napetosti na granicama pojedinih faza. S- čvrsta faza, L- tekuća faza, V – plinska faza (konstruirano prema ref. 207).

Mjerenjem kontaktnog kuta barem dviju kapljevina poznate površinske napetosti moguće je odrediti slobodnu energiju površine koja je karakteristična za svaku površinu. Postoji nekoliko načina računanja slobodne energije površine, no najčešće se koristi OWRK (Owens, Wendt, Rabel i Kaelble) teorija:^{209,210}

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} - 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \quad (3)$$

pri čemu je γ_{SL} napetost na granicama faza krutina/tekućina, γ_S i γ_L napetosti na granicama faza krutina/plin i tekućina/plina, a γ^d i γ^p disperzna i polarna komponenta pojedine napetosti. Uvrštavanjem Youngove jednačbe u jednačbu 3 dobiva se veza između kontaktnog kuta i različitih komponenti površinske napetosti:^{208–210}

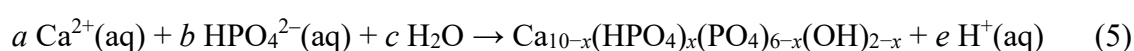
$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2\sqrt{\gamma_S^d\gamma_L^d} - 2\sqrt{\gamma_S^p\gamma_L^p}. \quad (4)$$

Kontaktni kut i slobodna energija površine određivani su za neobrađene i obrađene površine titanija bez i s kompozitnim prevlakama kalcijevih fosfata, nanočestica srebra i biomolekula. Za određivanje vlaženja navedenih površina provedena su mjerenja kontaktnog kuta na granici faza tekuće-kruće korištenjem Drop Shape Analyzer-DSA25 goniometara (Krüss GmbH, Hamburg, Njemačka). Na temelju izmjerenih vrijednosti kontaktnih kutova vode i diiodometana na istraživanim površinama izračunata je slobodna energija površine i njezine polarne te disperzne komponente primjenom OWRK teorije. Sva mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi u 4 ponavljanja.

3.4. Obrada podataka

3.4.1. Potenciometrija

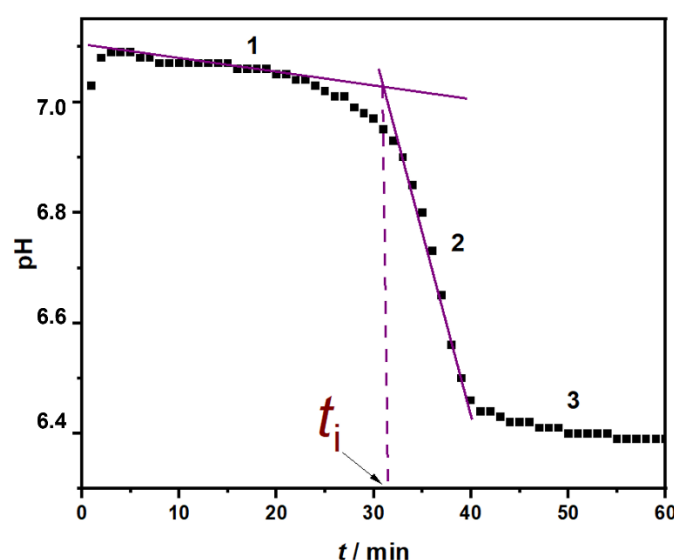
Potenciometrijskim praćenjem taloženja kalcijevih fosfata u prisustvu različitih aditiva u vremenu, određen je utjecaj pojedinog aditiva na mehanizam i kinetiku taloženja kalcijevih fosfata. Do promjene pH vrijednosti taložnog sustava dolazi zbog nastajanja i transformacije CaP kako prikazuje jednadžba:^{195,211,212}



što omogućuje semi-kvantitativno praćenje taložnog procesa i dobivanje prvih informacija o mehanizmu taloženja.

Dobivena potenciometrijska krivulja, odnosno krivulja ovisnosti pH taložnog sustava o vremenu obično se sastoji od tri dijela. Prvi je karakteriziran blagim ili zanemarivim padom pH vrijednosti što je povezano s nastankom ACP-a. Drugi dio krivulje odnosi se na nagli pad pH vrijednosti uzrokovan sekundarnim taloženjem kristalne faze na amorfnoj te transformacijom amorfne u kristalnu fazu. Treći dio krivulje uključuje blagi ili zanemariv pad pH vrijednosti povezan s rastom kristala iz otopine i daljom faznom transformacijom u stabilniju kristalnu fazu. Kako mehanizam i kinetika taloženja ovise o pH sustava, koncentraciji reaktanata, temperaturi, ali i prisutnosti različitih aditiva, moguće je

potenciometrijski pratiti utjecaj različitih čimbenika. Različite brzine promjene pH u 1. i 2. stadiju omogućavaju određivanje vremena indukcije nastajanja kristalne faze (t_i). To je vrijeme proteklo od početka primarnog taloženja amornog CaP-a do početka sekundarnog taloženja kristalnog CaP-a, a određuje se iz presjecišta tangenata na 1. i 2. dio krivulje taloženja (slika 18). Primarno taloženje očituje se zamućenjem otopine te do njega dolazi odmah nakon brzog miješanja otopina reaktanata, dok se sekundarno taloženje očituje promjenom morfologije taloga i padom u pH vrijednosti reakcijske smjese.^{195,212,213}



Slika 18. Potenciometrijsko određivanje vremena indukcije sekundarnog taloženja (t_i)

3.4.2. Statistička obrada podataka

Određivanje analitičke nesigurnosti omogućuje određivanje statističke značajnosti pojedinih razlika u ponovljenim mjerenja ili rezultata dobivenih različitim metodama. Za određivanje statistički značajnih razlika u hrapavostima različito obrađenih površina titanijskih određeni AFM-om i optičkom profilometrijom na jednakoj površini korištena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA).²¹⁴ Također je analizirana razlika u rezultatima za različite veličine mjerenog uzorka.

Statistička analiza provedena je u programu Origin 9.0, korištenjem dvosmjerne ANOVA koju je slijedilo uspoređivanje srednjih vrijednosti prema Tukeyu s razinom značajnosti 0,05.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

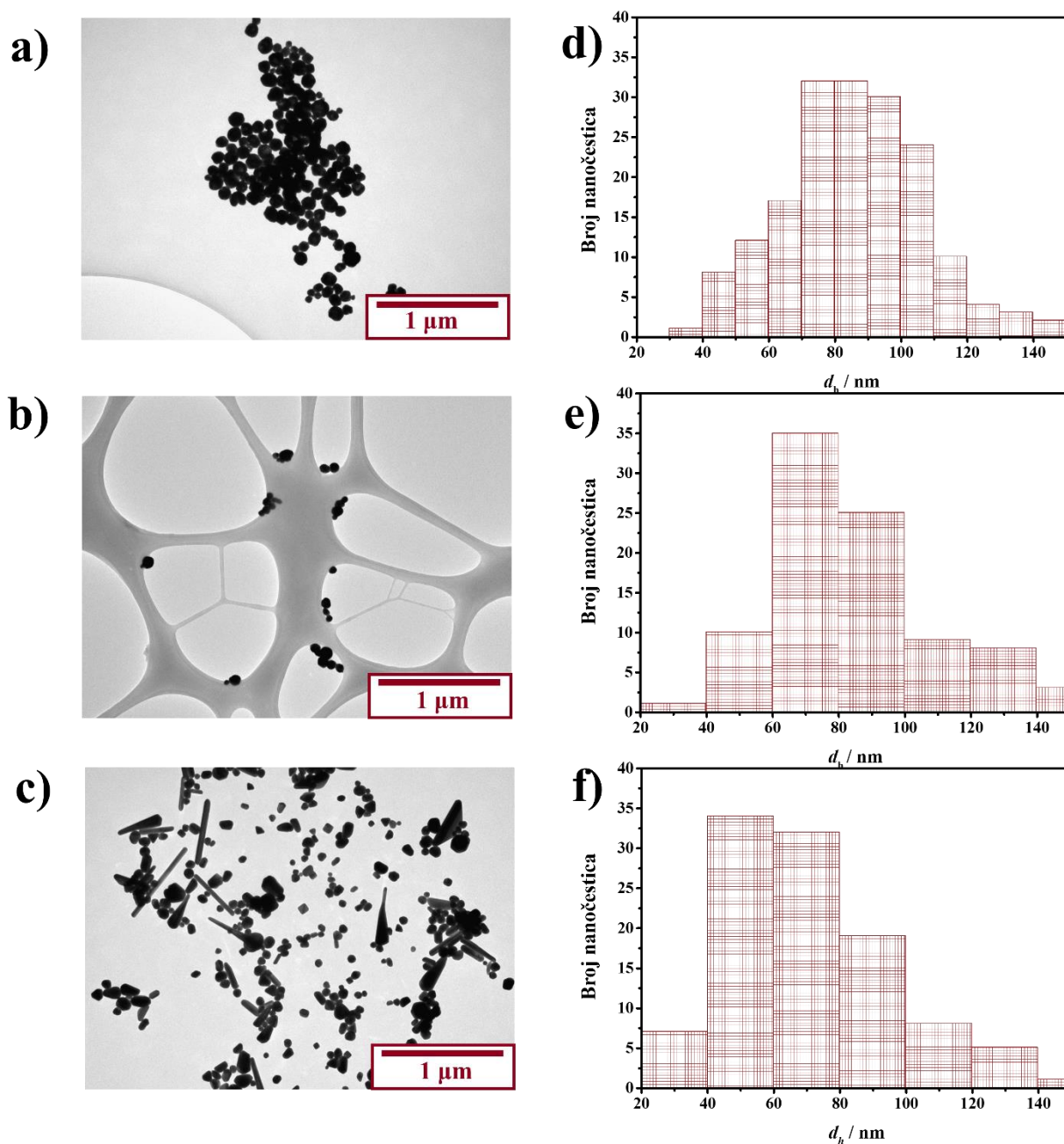
4.1. Karakterizacija nanočestica srebra različite površinske modifikacije, albumina iz goveđeg seruma i kitozana

Kako bi se preciznije odredio utjecaj nanočestica srebra (AgNP), albumina iz goveđeg seruma (BSA) i kitozana (Chi) na nastajanje kalcijevih fosfata (CaP), provedena je njihova karakterizacija nizom metoda. Određena je morfologija, veličina i stabilnost AgNP u mediju korištenom u taložnim eksperimentima, dok su BSA i Chi karakterizirani kako bi se potvrdio sastav korištenih prahova.

4.1.1. Nanočestice srebra različite površinske modifikacije

Morfologija i veličina sintetiziranih nanočestica promatrana je TEM-om. Dobivene nanočestice srebra modificirane natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT) i poli(vinilpirolidonom) (PVP) imale su oblik nepravilnih poliedara (slika 19 a), b)). Nanočestice srebra stabilizirane trinatrijevim citratom nastale su u obliku sferičnih, trokutastih i štapićastih nanočestica što je u skladu s prethodnim istraživanjima¹⁸⁶ (slika 19 c)). Na temelju TEM mikrofografija određena je raspodjela veličine pojedinih nanočestica. Različito modificirane nanočestice srebra imale su sličnu prosječnu veličinu, pri čemu je ona iznosila $86,0 \pm 21,7$ nm za AOT-AgNP, $85,2 \pm 26,1$ nm za PVP-AgNP i $76,4 \pm 36,9$ nm za cit-AgNP, te sličnu raspodjelu veličine (slika 19 d), e), f)).

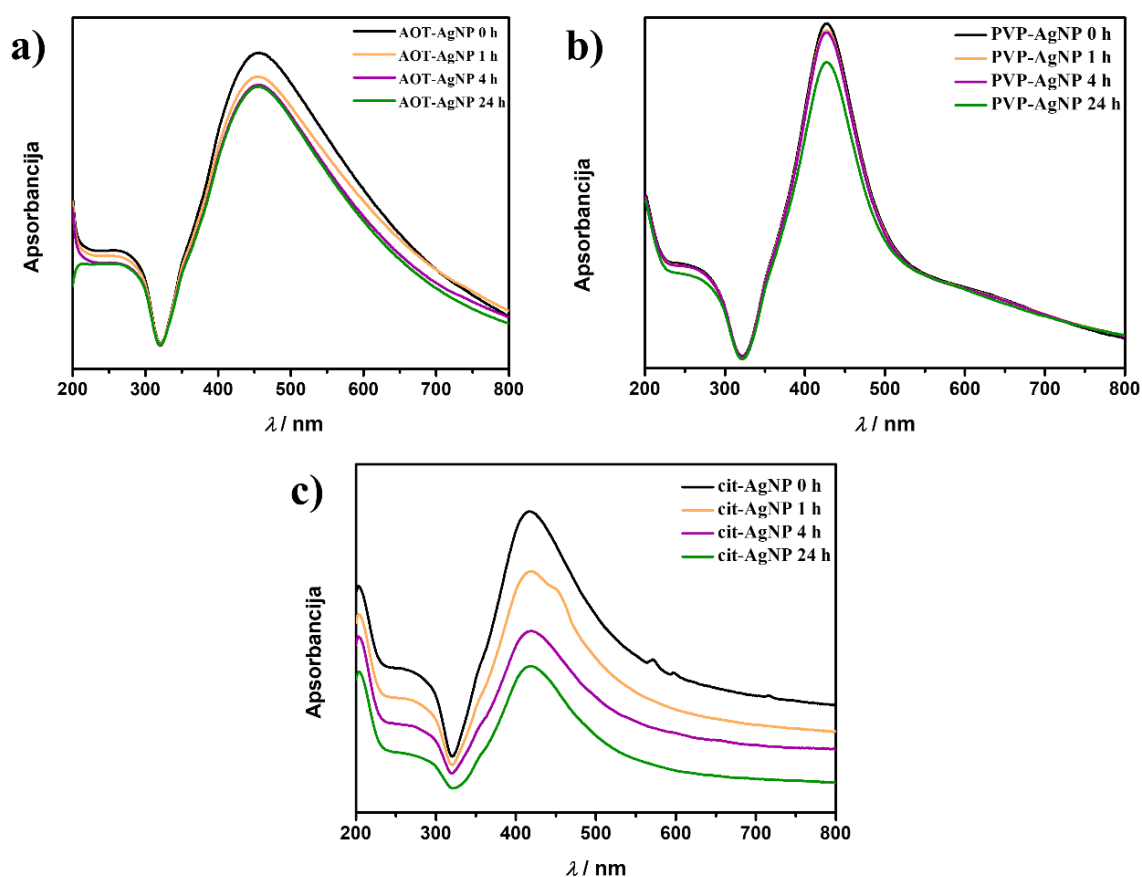
U UV-Vis spektrima (slika 20) opaženi su SPR maksimumi pri 450 nm za AOT-AgNP, 435 nm za PVP-AgNP i 433 nm za cit-AgNP čime je potvrđen nastanak nanočestica.²¹⁵ Širina vrpce SPR maksimuma malo se razlikovala ovisno o vrsti nanočestica. Međutim, položaj i širina vrpce u slučaju AOT-AgNP-a i PVP-AgNP-a nisu se mijenjali tijekom 24 h što je ukazalo na njihovu stabilnost. Intenzitet SPR maksimuma cit-AgNP-a smanjivao se tijekom 24 sata, što ukazuje na moguću agregaciju nanočestica.



Slika 19. TEM mikrografije (a, b, c) i raspodjele veličine (d, e, f) nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (a, d), poli(vinilpirolidonom) (b, e) i trinatrijevim citratom (c, f)

Stabilnost pripremljenih AgNP-a u otopini natrijevog hidrogenfosfata, koja se koristila za pripremu taložnih sustava, određena je praćenjem veličine čestica i zeta potencijala tijekom 24 sata, vremena relevantnog za taložne eksperimente. Stabilnost je određivana u otopini natrijevog hidrogenfosfata koncentracije $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. U suspenzijama AOT-AgNP-a i PVP-AgNP-a (tablica 5) detektirana je jedna populacija čestica, prosječnog hidrodinamičnog

promjera $84,8 \pm 0,8$ nm u slučaju AOT-AgNP-a i $89,9 \pm 1,0$ nm u slučaju PVP-AgNP-a. Za razliku od toga, u suspenziji cit-AgNP-a detektirane su dvije populacije čestica, prosječnog hidrodinamičkog promjera $15,9 \pm 2,0$ nm i $59,7 \pm 3,7$ nm. Hidrodinamički promjeri svih istraživanih nanočestica tijekom 24 sata nisu se značajno promijenili. Zeta potencijal svih istraživanih nanočestica bio je negativan, a njegova vrijednost ovisila je o primijenjenom stabilizatoru. Niti vrijednosti zeta potencijala nisu se značajnije promijenile tijekom 24 sata, osim u slučaju cit-AgNP-a. To ukazuje na dobru stabilnost nanočestica u otopini natrijevog hidrogenfosfata, koja je vjerojatno posljedica njihovog relativno velikog negativnog zeta potencijala.



Slika 20. UV-Vis spektri različito modificiranih nanočestica srebra suspendiranih u miliQ vodi snimljeni tijekom 24 h. **a)** AOT-AgNP – nanočestice srebra modificirane natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom; **b)** PVP-AgNP – nanočestice srebra modificirane poli(vinilpirolidonom); **c)** cit-AgNP – nanočestice srebra modificirane trinatrijevim citratom.

Tablica 5. Hidrodinamički promjer (d_h) i zeta potencijal (ζ) nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) dispergiranih u vodenoj otopini natrijevog hidrogenfosfata ($c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 50 \text{ mg dm}^{-3}$, $\text{pH}=7,4$) pri 25°C

0 h					
Uzorak	Populacija I		Populacija II		ζ / mV
	d_h / nm	vol. %	d_h / nm	vol. %	
AOT-AgNP	$84,8 \pm 0,8$	100			$-59,9 \pm 2,5$
PVP-AgNP	$89,9 \pm 1,0$	100			$-24,5 \pm 1,6$
cit-AgNP	$15,9 \pm 2,0$	$59,7 \pm 3,7$	$64,4 \pm 2,6$	$40,3 \pm 3,7$	$-40,2 \pm 1,4$
24 h					
Uzorak	Populacija I		Populacija II		ζ / mV
	d_h / nm	vol. %	d_h / nm	vol. %	
AOT-AgNP	$96,1 \pm 4,8$	100			$-61,1 \pm 3,3$
PVP-AgNP	$96,2 \pm 1,3$	100			$-17,8 \pm 0,6$
cit-AgNP	$15,8 \pm 2,7$	$42,1 \pm 31,2$	$56,8 \pm 5,6$	$57,9 \pm 35,9$	$-33,0 \pm 1,1$

Stabilnost AgNP istražena je u vodenoj otopini natrijevog hidrogenfosfata u prisustvu albumina iz goveđeg seruma te kitozana praćenjem veličine i zeta potencijala tijekom 24 h. Raspodjela veličine čestica BSA u otopini natrijevog hidrogenfosfata je monomodalna, a prosječni d_h iznosio je 6,6 nm. Zeta potencijal otopine BSA iznosio je -8,4 mV. U suspenzijama svih triju nanočestica srebra u prisustvu BSA detektirana je jedna populacija čestica međusobno sličnih prosječnih d_h (tablica 6), $101,7 \pm 1,1 \text{ nm}$ za AOT-AgNP, $100,6 \pm 1,3 \text{ nm}$ za PVP-AgNP i $103,2 \pm 4,3 \text{ nm}$. Tijekom 24 h nije došlo do značajne promjene hidrodinamičkog promjera ni jedne vrste nanočestica. U odnosu na veličine AgNP-a bez BSA, prosječne veličine nešto su veće što može biti posljedica adsorpcije BSA na nanočestice. S druge strane, opažene su razlike u zeta potencijalu, pri čemu su PVP-AgNP imale najmanje negativan zeta potencijal. Izmjereni zeta potencijal manji je u odnosu na zeta potencijal bez prisustva BSA, što također ukazuje na adsorpciju BSA na nanočestice. Prisutnost makromolekula može utjecati na agregaciju nanočestica, obzirom da makromolekule sterički i/ili elektrostatski stabiliziraju nanočestice uslijed adsorpcije na površinu.²¹⁶ Navedeno je slučaj kod BSA, koji se prema rezultatima stabilnosti, adsorbirao na površinu AgNP-a te dodatno stabilizirao nanočestice i smanjio njihovu agregaciju.

Raspodjela veličine čestica kitozana u vodenoj otopini natrijevog hidrogenfosfata je monomodalna, a prosječni d_h iznosi 91,5 nm. Prosječni zeta potencijal Chi u otopini natrijevog hidrogenfosfata iznosio je 4,1 mV. Suspenzije AOT-AgNP i cit-AgNP u natrijevom hidrogenfosfatu imaju monomodalne raspodjele veličine u prisustvu Chi (tablica 7) s prosječnim d_h 154,5 nm za AOT-AgNP i 136,4 nm za cit-AgNP. Zeta potencijal navedenih suspenzija blizak je nuli što se značajno razlikuje u odnosu na suspenzije AgNP-a bez Chi. Navedeno ukazuje na adsorpciju Chi na površinu AgNP-a. Suspenzija PVP-AgNP-a u otopini natrijevog hidrogenfosfata i u prisustvu Chi ima trimodalnu raspodjelu veličine. Za lakše raspoznavanje definirane su populacije veličina kao skupine čestica bliskih veličina koje teže određenoj srednjoj vrijednosti veličine čestica. Dominantna populacija prosječnog je hidrodinamičkog promjera 1120,8 nm s volumnim udjelom 57,0 %. Pored toga opažena je i populacija manjih čestica prosječnog d_h 161,7 nm te većih čestica prosječnog d_h 4385,3 nm. Veći stupanj agregacije opažen kod PVP-AgNP-a može biti posljedica male vrijednosti zeta potencijala tih nanočestica. Zeta potencijal PVP-AgNP-a je gotovo jednak nuli, što ukazuje da adsorpcija kitozana na površinu nanočestica utječe na značajno smanjenje njihove elektrostatske stabilizacije.

Tablica 6. Hidrodinamički promjer (d_h) i zeta potencijal (ζ) nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) dispergiranih u vodenoj otopini natrijevog hidrogenfosfata uz dodatak albumina iz goveđeg seruma (BSA) ($c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 50 \text{ mg dm}^{-3}$, $\gamma(\text{BSA}) = 200 \text{ mg dm}^{-3}$, $\text{pH}=7,4$) pri 25 °C

Uzorak	0 h			24 h		
	d_h / nm	vol. %	ζ / mV	d_h / nm	vol. %	ζ / mV
Otopina BSA	$6,6 \pm 0,2$	100	$-8,4 \pm 2,9$	$6,6 \pm 0,1$	100	$-0,3 \pm 3,7$
Suspenzije AgNP s BSA						
AOT-AgNP	$101,7 \pm 1,1$	100	$-25,1 \pm 3,7$	$99,4 \pm 0,9$	100	$-22,7 \pm 1,9$
PVP-AgNP	$100,6 \pm 1,3$	100	$-16,0 \pm 1,4$	$99,0 \pm 0,5$	100	$-13,7 \pm 0,7$
cit-AgNP	$103,2 \pm 4,3$	100	$-28,7 \pm 1,7$	$101,3 \pm 3,5$	100	$-28,5 \pm 1,5$

Nakon 24 h opažene su bimodalne raspodjele za sve nanočestice srebra u prisustvu Chi. U suspenziji AOT-AgNP-a prisutni su jednaki udjeli čestica manjeg hidrodinamičkog promjera 123,5 nm te većih čestica prosječnog d_h 4529 nm. U suspenziji PVP-AgNP-a dominantna je populacija većih čestica prosječnog d_h 4495,7 nm, dok su manje zastupljene čestice manjeg prosječnog d_h 113,8 nm. Dominantna populacija u suspenziji cit-AgNP-a su manje čestice prosječnog d_h 121,8 nm, dok je još prisutna populacija prosječnog d_h 4537,5 nm. Prisutnost

populacija AgNP-a prosječnog d_h oko 4500 nm ukazuje na značajnu agregaciju, pri čemu je najveći njihov udio detektiran u suspenzijama PVP-AgNP-a, a najmanji u suspenzijama cit-AgNP-a.

Tablica 7. Hidrodinamički promjer (d_h) i zeta potencijal (ζ) nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) dispergiranih u vodenoj otopini natrijevog hidrogenfosfata uz dodatak kitozana (Chi). ($c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 50 \text{ mg dm}^{-3}$, $\gamma(\text{Chi}) = 50 \text{ mg dm}^{-3}$, pH=7,4) pri 25 °C

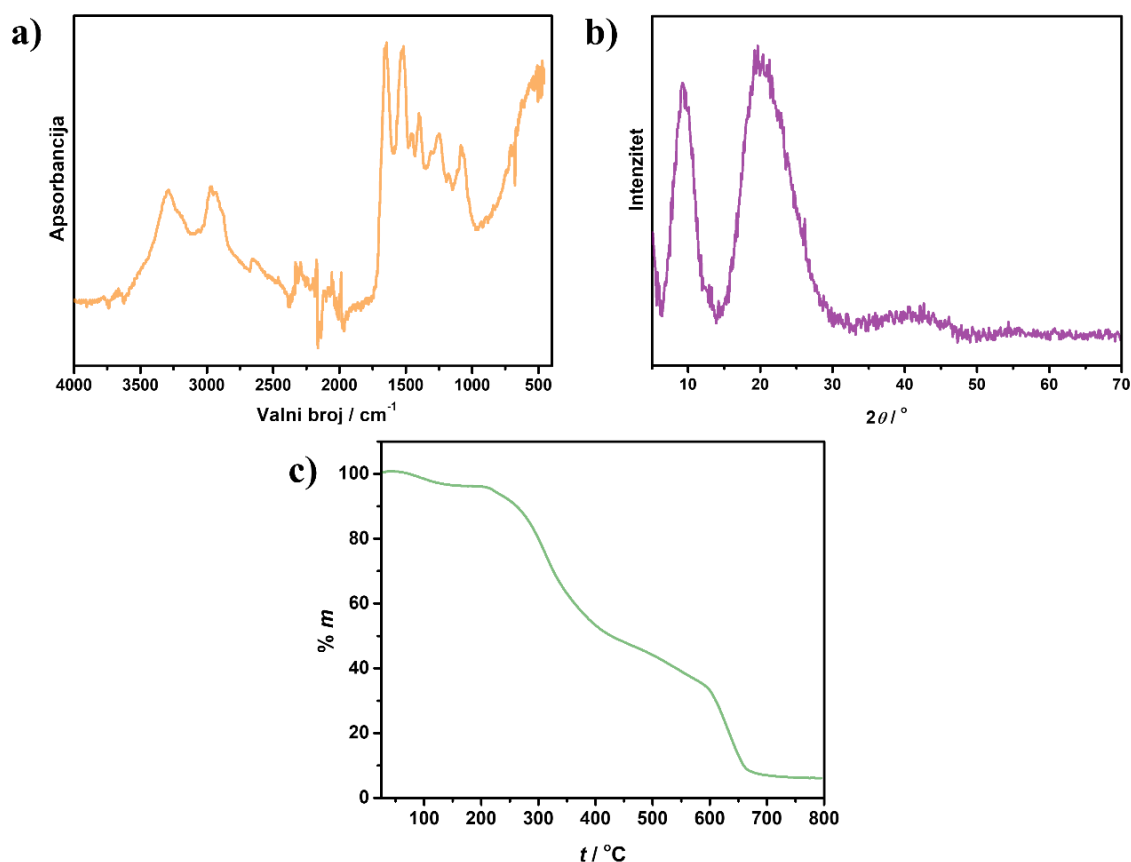
Uzorak	0 h						ζ / mV
	Populacija I		Populacija II		Populacija III		
	d_h / nm	vol. %	d_h / nm	vol. %	d_h / nm	vol. %	
Otopina Chi	91,5 ± 14,2	100					4,1 ± 1,5
Suspenzije AgNP s Chi							
AOT-AgNP	154,5 ± 2,4	100					2,7 ± 2,7
PVP-AgNP	161,7 ± 12,0	26,0 ±	1120,8 ±	27,0 ±	4385,3 ±	17,1 ±	0,0 ± 2,1
		2,2	38,6	3,5	161,1	1,8	
cit-AgNP	136,4 ± 2,5	100					2,0 ± 2,4
24 h							
AOT-AgNP	123,5 ± 2,1	50,0 ±			4529,0 ±	50,0 ±	4,1 ± 2,2
		1,9			129,8	3,7	
PVP-AgNP	113,8 ± 3,3	22,0 ±			4495,7 ±	76,5 ±	2,5 ± 1,9
		3,5			285,6	7,3	
cit-AgNP	121,8 ± 2,7	68,5 ±			4537,5 ±	31,5 ±	3,5 ± 2,7
		6,7			140,9	3,0	

Prosječne veličine manjih čestica smanjuju se nakon 24 sata što ukazuje na potencijalno otapanje nanočestica. S druge strane, prosječni d_h AgNP-a u vodenoj otopini natrijevog hidrogenfosfata u prisustvu Chi veći su od prosječnih d_h AgNP-a u suspenzijama bez Chi. Navedeno ukazuje na promjenu solvacijske sfere nakon adsorpcije kitozana. Zeta potencijal AgNP-a u vodenoj otopini natrijevog hidrogenfosfata u prisustvu Chi nakon 24 sata gotovo je nepromijenjen te je blizak nuli. Vrlo je sličan zeta potencijalu samog kitozana, što dodatno ukazuje na adsorpciju kitozana na AgNP. Prethodna istraživanja su pokazala da se kitozan može adsorbirati na površinu nanočestica i na taj način ih elektrostatski stabilizirati te poboljšati njihovu bioaktivnost.²¹⁷ Kako su rezultati stabilnosti pokazali agregaciju i blago

otapanje svih AgNP-a nakon 24 sata, količina adsorbiranog kitozana je premala za ostvarivanje dodatne stabilizacije.

4.1.2. Albumin iz govedeg seruma

FTIR spektar BSA (slika 21 a)) sadrži vrpce karakteristične za vibracije veza N-H, C=O i C-N amidnih skupina te veze O-H u vodi (tablica 8).^{218–220} U difraktogramu praha (slika 21 b)) prisutna su dva široka difrakcijska maksimuma pri 2θ 8,88° i 20,44°. Termogravimetrijska krivulja (slika 21 c)) ukazuje na potpunu razgradnju BSA do 714 °C što je u skladu s prethodnim istraživanjima.²²¹ Razgradnja BSA odvija se u 4 koraka, pri čemu je u prvom koraku opažen gubitak od 3,5 % u temperaturnom rasponu 75–150 °C koji odgovara gubitku adsorbirane vode. Nadalje dolazi do gubitaka mase u 3 koraka u temperaturnim rasponima: 210–430 °C, 430–600 °C i 600–675 °C s ukupnim gubitkom mase u tri koraka od 88 % što odgovara literaturnim podacima.²²²



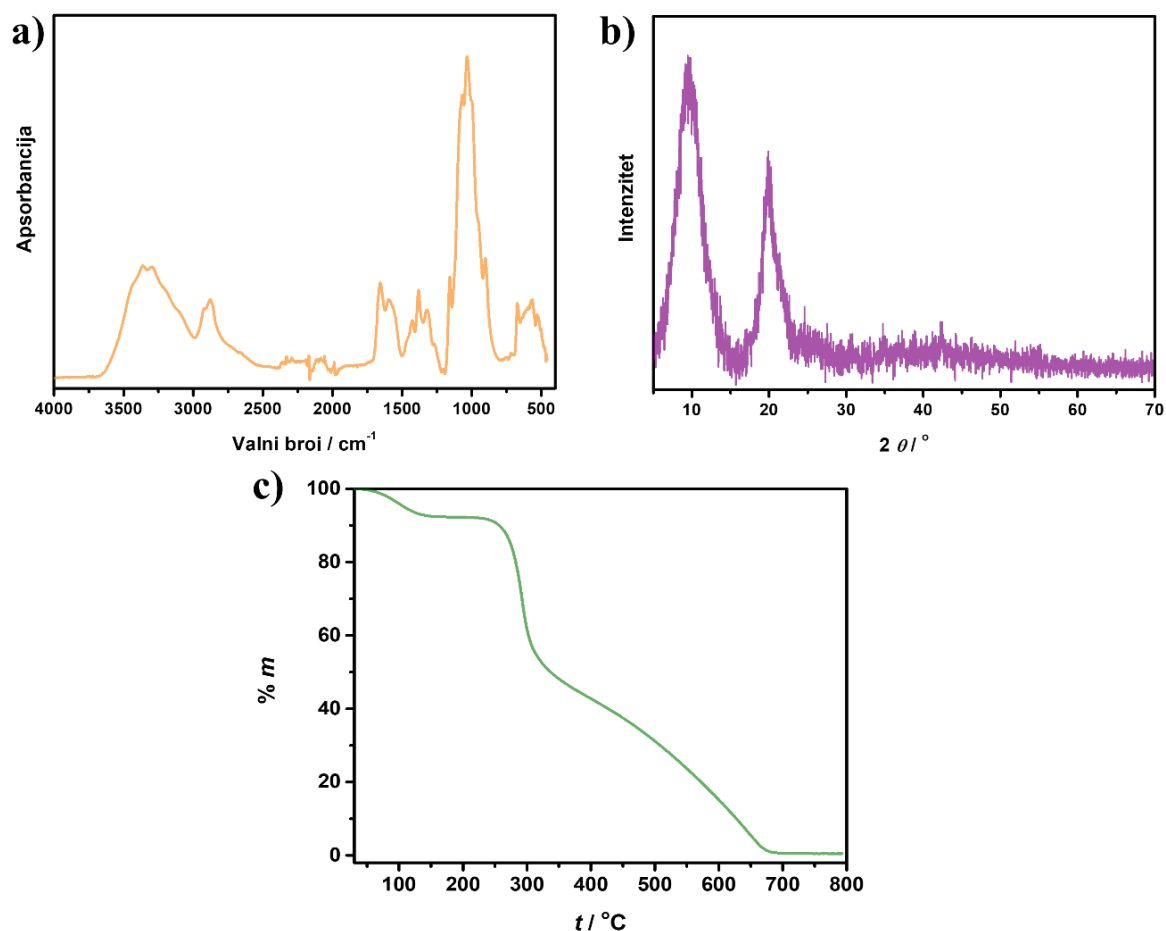
Slika 21. a) Spektar infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom, b) difraktogram praha i c) termogravimetrijska krivulja albumina iz govedeg seruma

Tablica 8. Asignacija vrpce spektra infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom praha albumina iz goveđeg seruma^{218–220}

Valni broj / cm ⁻¹	Asignacija
3611-2690	O-H istezanje (H ₂ O)
3287	N-H istezanje amida A
2944	amid B, N-H istezanje slobodnog NH ₃ ⁺ iona
1642	C=O istezanje amida I
1513	amid II, C-N istezanje i N-H savijanje
1453	amid II, C-N istezanje i N-H savijanje
1386	CH ₂ savijanje
1247	amid III, C-N istezanje i N-H savijanje
699	amid V, NH savijanje

4.1.3. Kitozan

FTIR spektar (slika 22 a)) kitozana sadrži vrpce vibracija veza N-H, C=O i C-N amidne skupine, veza C-H, CH₂ i CH₃ skupina, veze C-O u C-OH i CH₂OH te veze O-H u vodi. Navedene vrpce karakteristične za kitozan^{223–225} assignirane su u tablici 9. Nadalje, u difraktogramu praha (slika 22 b)) pojavljuju se dva difrakcijska maksimuma pri 2θ 9,6° i 20,0° što je u skladu s literaturnim podacima.¹⁴² Termogram kitozana (slika 22 c)) pokazuje potpunu razgradnju kitozana na 700 °C. Razgradnja se odvija u nekoliko koraka. Prvi korak karakteriziran je malim gubitkom mase zbog gubitka vode te je izračunat postotak vode u ukupnoj masi kitozana 7,5 %. U drugom i trećem koraku, koji se odvijaju u temperaturnim rasponima 235–331 °C i 331–684 °C, dolazi do gotovo 90 %-tnog gubitka mase zbog razgradnje glavnih lanaca kitozana. Prema literaturnim podacima u drugom (sporijem koraku) dolazi do oksidacije kitozana i razgradnje oksidiranog kitozana.^{226,227}



Slika 22. a) Spektar infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom, b) difraktogram praha i c) termogravimetrijska krivulja kitozana.

Tablica 9. Asignacija vrpce spektra infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom praha kitozana^{223–225}

Valni broj / cm^{-1}	Asignacija
3683-2532	O-H istezanje (H_2O)
3357	N-H istezanje amida A
2922	C-H istezanje u $-\text{CH}_2$
2873	C-H istezanje u $-\text{CH}_3$
2328	amid B, N-H istezanje slobodnog iona NH_3^+
1648	C=O istezanje amida I
1584	vibracije protonirane amino skupine
1419	savijanje $-\text{CH}_3$
1377	savijanje $-\text{CH}_2$
1307	amid III, C-N istezanje i N-H savijanje
1148	asimetrična vibracija C-O
1025	vibracija C-O u COH, COC i CH_2OH
897	vibracija saharidne strukture kitozana
663	amid V, NH savijanje

4.2. Biomimetska priprema kompozita kalcijevih fosfata i nanočestica srebra različite površinske modifikacije

Kompozite kalcijevih fosfata i nanočestica srebra moguće je pripremiti različitim metodama (sprej piroliza,¹⁸ miješanje praha kalcijevih fosfata i suspenzije AgNP-a pri povišenoj temperaturi,²⁰ koprecipitacija kalcijevih fosfata i AgNP-a pri povišenoj temperaturi²²). Biomimetska metoda privlači pažnju kao inovativna, zelena i ekonomična metoda pripreme kompozita. Uz to, ona omogućuje ugradnju biomolekula u kompozite, s obzirom na blage uvjete u kojima se odvija. Kako se radi o metodi mokre kemije, moguće ju je koristiti i za prevlačenje implantata različitih kompleksnih oblika. Usprkos tim prednostima, do sada nije istražena priprava kompozita CaP/AgNP biomimetskim putem.

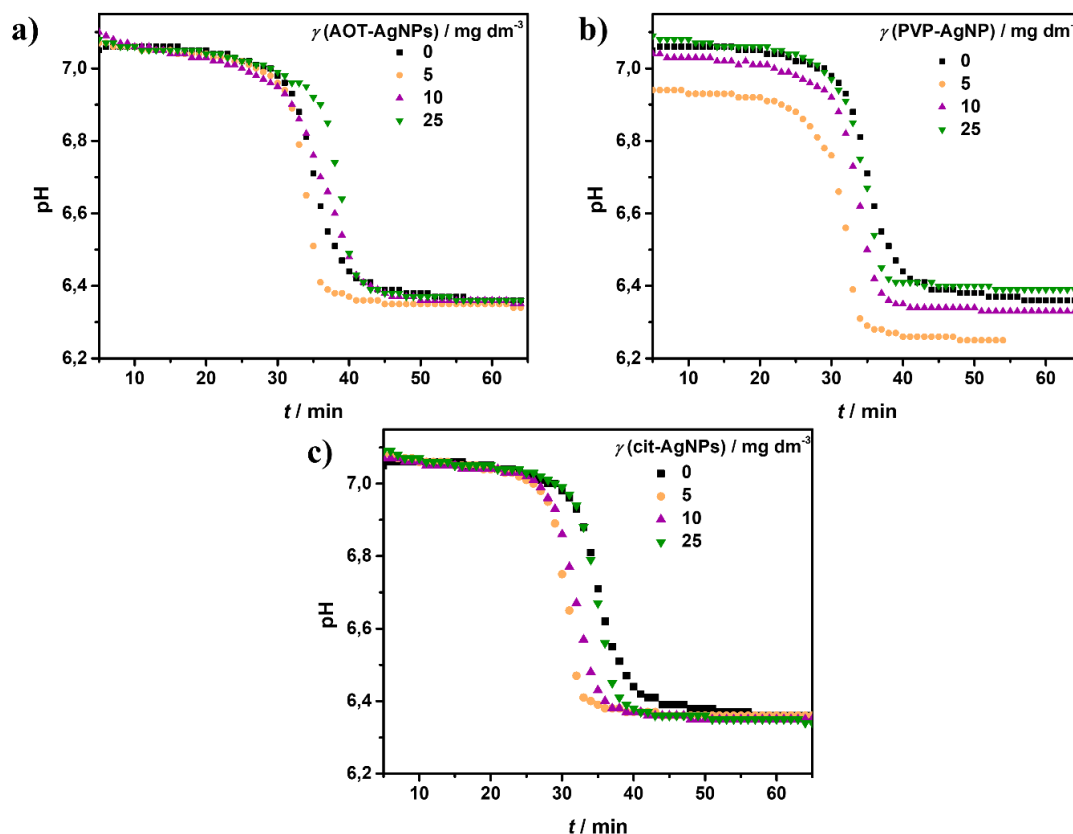
U ovom poglavlju istražen je utjecaj nanočestica srebra različite površinske modifikacije na taloženje i svojstva kalcijevih fosfata te utjecaj biomolekula albumina iz govedeg seruma i kitozana na taloženje i svojstva kalcijevih fosfata.

4.2.1. Utjecaj nanočestica srebra različite površinske modifikacije na brzinu transformacije amorfne faze

Utjecaj nanočestica srebra različite površinske modifikacije na taloženje kalcijevih fosfata praćen je potencijometrijski, pri čemu je prvo pripremljen kontrolni sustav u koji nisu dodane AgNP. Potencijometrijsko praćenje moguće je zbog promjene pH tijekom taloženja CaP.^{195,211,212} U rasponu pH od 4,5 do 9,5, gdje su HPO_4^{2-} i H_2PO_4^- dominantne fosfatne vrste (slika 7), nastajanje CaP opisano je ranije navedenom jednačinom (5).²²⁸

Promjene u pH vrijednosti tijekom taloženja odgovaraju različitim fazama u procesu taloženja, što omogućuje njegovo semikvantitativno praćenje. Reprezentativne krivulje ovisnosti pH o vremenu proteklom od početka taloženja, za različite korištene koncentracije istraživanih nanočestica srebra, prikazane su na slika 23. Dobivene krivulje sigmoidalnog su oblika i odražavaju tri faze taloženja. U prvoj fazi dolazi do blagog pada pH vrijednosti, što odgovara nastajanju ACP-a reakcijom supstitucije liganada u kojoj dolazi do zamjene molekula vode u solvacijskoj sferi Ca^{2+} iona s djelomično protoniranim fosfatnim ionima.²²⁹ U drugoj fazi dolazi do naglog pada pH koji je povezan sa sekundarnim taloženjem kristalne faze CaP na već nastalom ACP-u i s transformacijom ACP-a u kristalni CaP. Treću fazu karakterizira blag pad pH koji je povezan s rastom i faznom transformacijom nastale kristalne

faze CaP.^{195,212,213,228–231} Prikazane reprezentativne krivulje imaju sličan sigmoidalan oblik što pokazuje da AgNP nisu utjecale na mehanizam nastajanja kalcijevih fosfata. To je u skladu s prijašnjim istraživanjima, koja su pokazala da aditivi poput malih iona,^{230,232} liposoma,¹⁸⁷ polielektrolita,¹⁹⁵ titanatnih nanomaterijala^{233,234} ne utječu na mehanizam nastajanja CaP.



Slika 23. Reprezentativne krivulje ovisnosti pH o vremenu dobivene za kontrolni sustav ($\gamma(\text{AgNP}) = 0 \text{ mg dm}^{-3}$) i u taložnim sustavima s različitim koncentracijama nanočestica srebra modificiranih **a)** natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), **b)** poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i **c)** trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Iz krivulja ovisnosti pH o vremenu proteklom od početka taloženja (slika 23) određeno je i vrijeme indukcije (t_i) za nastajanje kristalne faze CaP prema metodi opisanoj na slici 18. Vrijeme indukcije za nastajanje kristalne faze označuje vrijeme proteklo od početka taloženja, do početka sekundarnog taloženja.¹⁹⁵ Općenito, vrijeme indukcije odražava stabilnost ACP-a, odnosno što je veće, to je ACP stabilniji u danim eksperimentalnim uvjetima.^{195,232} Prosječno vrijeme indukcije nastajanja kristalne faze iznosilo je $30,8 \pm 2,0 \text{ min}$ u kontrolnom sustavu. Za sve AgNP vrijeme indukcije blago se povećavalo porastom koncentracije AgNP-a (tablica

10). Sve koncentracije AOT-AgNP-a i PVP-AgNP-a te dvije veće koncentracije cit-AgNP-a inhibirale su sekundarno taloženje CaP-a, pri čemu je inhibicija najizraženija u prisutnosti najveće koncentracije AOT-AgNP-a. S druge strane, sekundarno taloženje bilo je promovirano u prisutnosti najmanje koncentracije cit-AgNP-a. Stupanj inhibicije razlikuje se za pojedinu vrstu nanočestica srebra pri čemu se inhibicija smanjuje u nizu: AOT-AgNP > PVP-AgNP > cit-AgNP što ukazuje na blag utjecaj površinske modifikacije nanočestica srebra na sekundarno taloženje CaP. Prijašnja istraživanja pokazala su da citrat ima inhibitorni utjecaj na sekundarno taloženje, odnosno da stabilizira ACP, no u tom istraživanju korišten je otopljeni citrat, dok je u ovom istraživanju citrat bio vezan na površinu nanočestica srebra.²³²

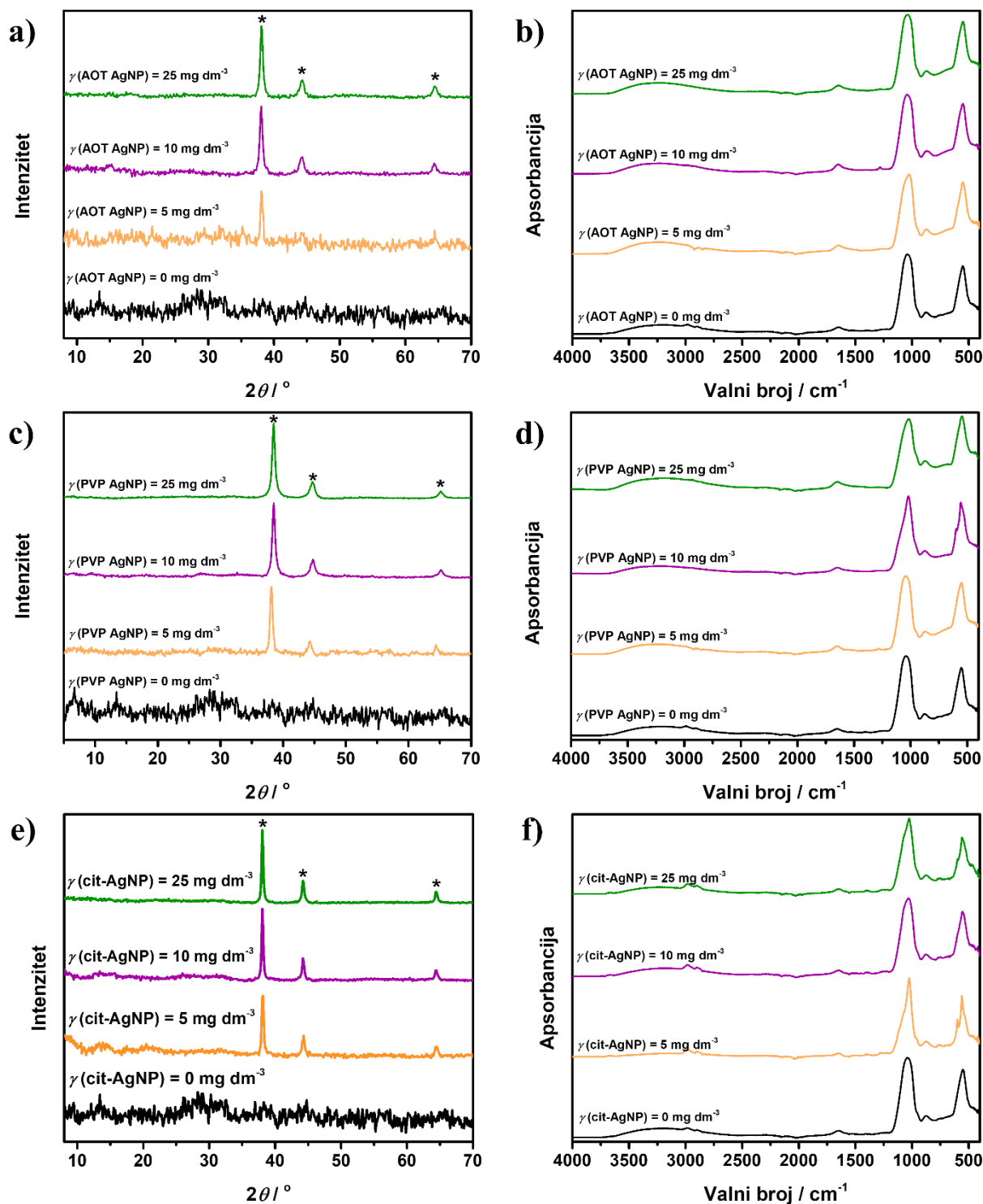
Tablica 10. Prosječna vremena indukcije (t_i) sekundarnog taloženja kalcijevih fosfata ($n = 3$) dobivena iz pH-krivulja (slika 23) sa standardnom devijacijom, određena u kontrolnom sustavu i sustavima s različitim koncentracijama nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etihleksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Vrsta AgNP	$\gamma (\text{AgNP}) / \text{mg dm}^{-3}$			
	0	5	10	25
	t_i / min			
bez AgNP	$30,8 \pm 2,0$			
PVP-AgNP		$31,2 \pm 2,6$	$33,0 \pm 2,7$	$36,5 \pm 0,8$
PVP-AgNP		$28,9 \pm 0,7$	$31,6 \pm 1,8$	$31,5 \pm 0,6$
cit-AgNP		$26,8 \pm 1,2$	$28,8 \pm 1,4$	$32,1 \pm 1,4$

4.2.2. Utjecaj nanočestica srebra različite površinske modifikacije na svojstva amorfne faze kalcijevih fosfata

Pored utjecaja pojedinih koncentracija različitih nanočestica srebra na mehanizam i kinetiku taloženja CaP, istraživao je utjecaj na svojstva ACP/AgNP s pomoću transmisijske elektronske mikroskopije, difrakcije rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku i infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom.

Difraktogrami prahova dobivenih nakon 10 minuta reakcije taloženja u kontrolnom sustavu bez prisustva AgNP-a i taložnim sustavima u prisustvu različitih koncentracija nanočestica srebra različite površinske modifikacije prikazani su na slici 24. U difraktogramu praha kontrolnog sustava prisutan je širok amorfni maksimum malog intenziteta u rasponu 2θ od $25,0^\circ$ do $33,5^\circ$ karakterističan za ACP.^{18,235,236}



Slika 24. Difraktogrami praha i spektri infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom taloga dobivenih nakon 10 minuta u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima s različitim koncentracijama nanočestica srebra modificiranih **a)**, **b)** natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), **c)**, **d)** poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i **e)**, **f)** trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Difrakcijski maksimumi označeni * odgovaraju maksimumima srebra prema JCPDS br. 04-0783.

U svim difraktogramima opaženi su maksimumi pri 2θ 38,1°, 44,2° i 64,5° koji pripadaju difrakciji na (111), (200) i (220) kristalnim ravninama srebra (JCPDS br.04-0783) te zbog njihovog velikog intenziteta, maksimum amornog kalcijevog fosfata nije vidljiv. On je vidljiv samo u difraktogramu dobivenom za najmanju koncentraciju cit-AgNP-a.

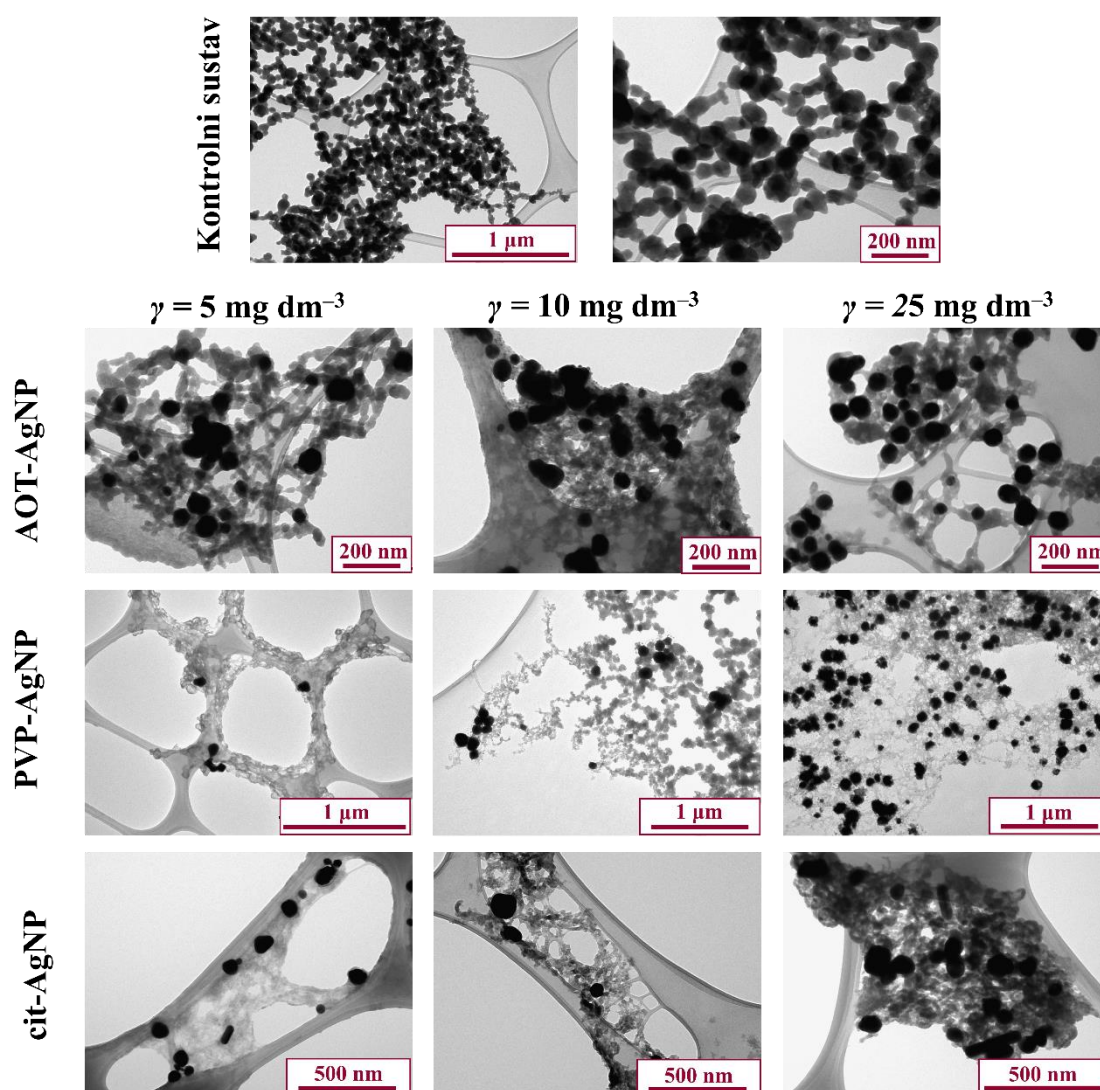
Spektar infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom taloga amornog kalcijevog fosfata dobivenog u kontrolnom sustavu bez prisustva AgNP-a (slika 24) potvrdio je nastanak ACP-a u kontrolnom i svim taložnim sustavima dobivenim u prisustvu različitih koncentracija AgNP-a. U FTIR spektru kontrolnog sustava prisutne su vibracijske vrpce karakteristične za fosfatnu skupinu pri 1024 cm⁻¹ koja odgovara asimetričnom istezanju PO₄³⁻ (ν_3), pri 875 cm⁻¹ (skupina HPO₄²⁻) i 553 cm⁻¹ karakteristična za istezanje PO₄³⁻ (ν_4). Pored toga prisutne su vrpce vibracije veza u vodi, široka vrpca u rasponu 3677–2789 cm⁻¹ i vrpca pri 1651 cm⁻¹.^{236,237} Izostanak hiperfine strukture vrpca fosfatnih skupina pri 1024 cm⁻¹ i 553 cm⁻¹ karakterističan je za amorfnu fazu.^{198,236,237} Navedena struktura blago je vidljiva u FTIR spektru CaP/cit-AgNP pri najmanjoj koncentraciji cit-AgNP što je potencijalno posljedica brze transformacije ACP-a, zbog čega je izolacija bila otežana.

Detaljnija analiza dobivenih FTIR spektara provedena je korištenjem prve i druge derivacije spektara (slika D1). Prva derivacija omogućila je točnije određivanje pozicije maksimuma vrpce, no nije otkrila značajne razlike. Analizom druge derivacije FTIR spektara opažen je pomak maksimuma vrpce karakteristične za asimetrično istezanje PO₄³⁻ od 25 cm⁻¹ prema većim valnim duljinama u spektru taloga kompozita dobivenih uz dvije najveće koncentracije AOT-AgNP-a i s najmanjom koncentracijom PVP-AgNP-a, što je ukazalo na različit utjecaj tih dviju nanočestica. Navedene spektralne karakteristike uočene u drugoj derivaciji FTIR spektara u rasponu valnih brojeva 1150–1030 cm⁻¹ i 650–575 cm⁻¹, ukazuju na početak transformacije ACP-a, što je u skladu s ranijim istraživanjima transformacije ACP-a u HA.¹⁹⁸

TEM mikrografije (slika 25) potvrdile su da su u kontrolnom sustavu nastali lančasti agregati malih sferičnih čestica tipičnih za ACP.^{195,235} Prosječne veličina sferičnih čestica bila je 75,6 ± 19,2 nm. Prisutnost AgNP-a utjecala je na promjenu morfologije ACP-a ovisno o koncentraciji i vrsti AgNP-a u taložnom sustavu. Lančasti agregati sferičnih čestica ACP-a opaženi su samo pri najmanjoj koncentraciji AOT-AgNP-a, a faza nalik gelu pri svim koncentracijama. Takva morfologija opažena je u prijašnjim istraživanjima nastanka ACP-a u različitim uvjetima.^{212,238–240} Pri svim koncentracijama PVP-AgNP-a opaženi su lančasti

agregati sferičnih čestica ACP-a prosječne veličine $67,6 \pm 16,2$ nm slični onima u kontrolnom sustavu. Faza nalik gelu nastala je samo pri najvećoj istraženoj koncentraciji PVP-AgNP-a. TEM mikrografijama ACP-a dobivenih u prisustvu cit-AgNP-a utvrđena je prisutnost faze nalik gelu pri svim ispitivanim koncentracijama cit-AgNP-a. S povećanjem koncentracije cit-AgNP-a granularna morfologija faze nalik gelu postaje izraženija.

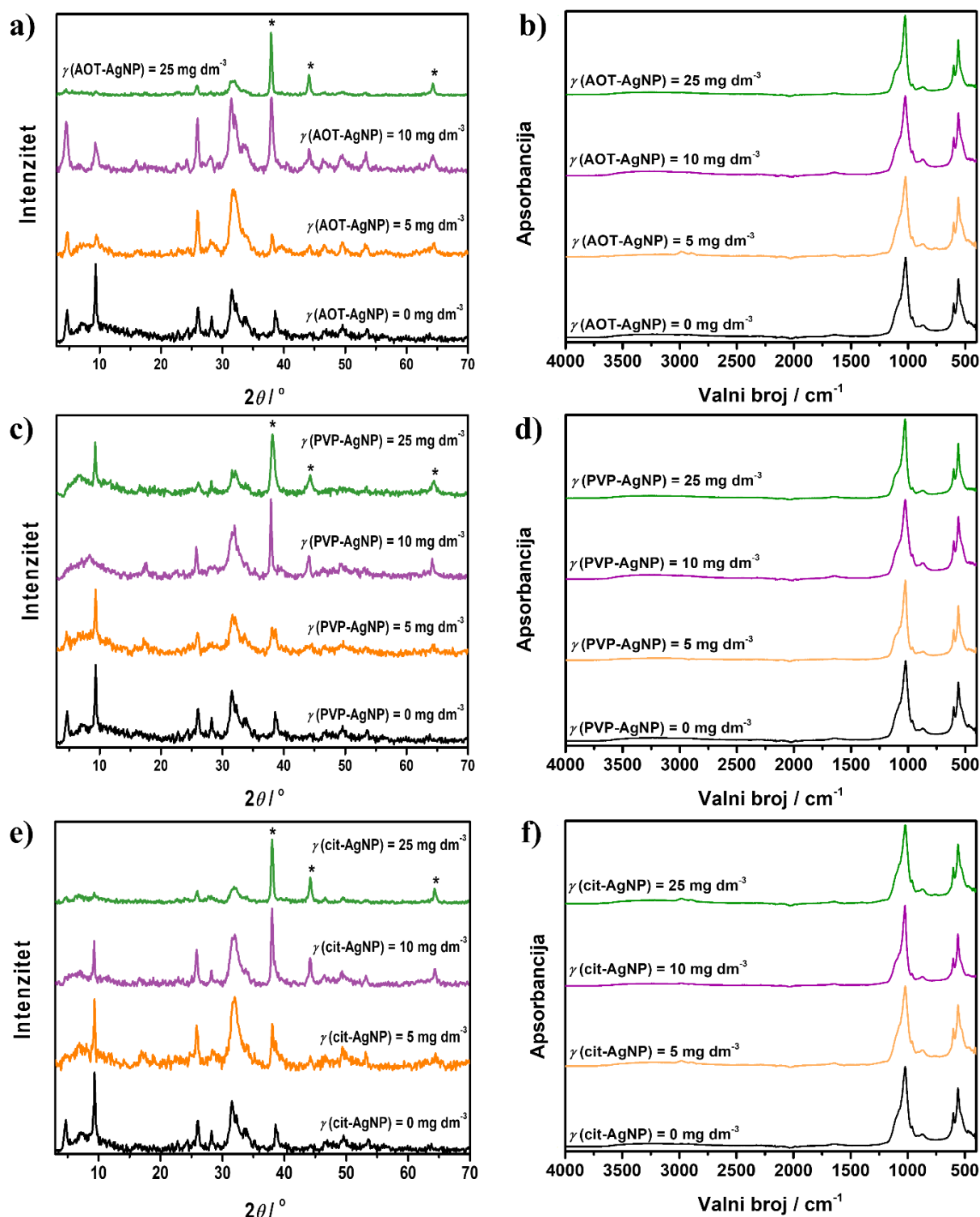
U svim nastalim kompozitima, nanočestice su bile raspoređene jednoliko kroz nastali talog. Štoviše, detektirane su uglavnom pojedinačne čestice AgNP-a. Navedeno je ukazalo na potencijal dobivanja materijala gdje su nanočestice jednoliko raspoređene u kompozitu, što je dosad bio velik nedostatak pripreme CaP/AgNP kompozita.²⁴¹



Slika 25. TEM mikrografije taloga dobivenih nakon 10 minuta u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima s različitim koncentracijama nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

4.2.3. Utjecaj nanočestica srebra različite površinske modifikacije na svojstva kristalne faze kalcijevih fosfata

Kako bi se odredio sastav i svojstva kristalne faze kalcijevih fosfata nastale u prisutnosti AgNP detaljno je karakteriziran talog nastao nakon 60 minuta. Difraktogram praha dobivenog u kontrolnom sustavu (slika 26) ukazao je na nastajanje smjese CaP-a. Dva difrakcijska maksimuma pri malim kutovima, 2θ $4,7^\circ$ i $9,3^\circ$, odgovaraju difrakciji na (100) i (200) ravninama OCP-a (JCPDS br. 26-1056). Pored toga, opaženi maksimumi velikog intenziteta pri 2θ $26,0^\circ$ i $31,8^\circ$ te nekoliko maksimuma manjeg intenziteta pri 2θ $28,1^\circ$, $39,3^\circ$, $46,4^\circ$, $49,6^\circ$ i $53,3^\circ$ karakteristični su za apatitnu fazu. Oblik i širina apatitnih maksimuma ukazuju na nastanak slabo kristalnog kalcijem deficijentnog hidroksiapatita (CaDHA).^{236,242} Difraktogrami praha kristalnih kompozita dobivenih u prisustvu različito modificiranih nanočestica srebra (slika 26 a), c), e)) pored apatitnih maksimuma sadrže i maksimume karakteristične za nanočestice srebra pri 2θ $38,0^\circ$, $44,3^\circ$ i $64,4^\circ$ koji odgovaraju difrakciji na (111), (200) i (220) kristalnim ravninama srebra (JCPDS br.04-0783). Intenziteti navedenih maksimuma povećavaju se s povećanjem koncentracije srebra, što ukazuje na potencijalan zaostatak nanočestica srebra, koje nisu u kompozitima, u talogu. Pored toga u difraktogramima su uočeni maksimumi pri 2θ oko $4,7^\circ$ i $9,5^\circ$, no njihov intenzitet ovisio je o vrsti i koncentraciji korištenih AgNP-a. Pri najvećoj koncentraciji AOT-AgNP-a i srednjoj koncentraciji (10 mg dm^{-3}) PVP-AgNP-a nisu uočeni navedeni maksimumi, što je ukazivalo na moguću promjenu u količini nastalog OCP-a te potencijalnu inhibiciju nastajanja OCP-a. Prethodna istraživanja nastajanja CaP-a pokazala su da aditivi mogu utjecati na sastav nastalog taloga na dva načina. U taložnim sustavima u kojima se može istaložiti više faza, aditiv se može učinkovito adsorbirati na nukleus neke faze, što rezultira inhibicijom njezinog nastanka. Druga mogućnost je da aditiv djeluje kao učinkoviti heteronukleus za nastajanje jedne od faza, čime se promovira njen nastanak, a indirektno inhibira nastanak drugih faza.^{76,243}



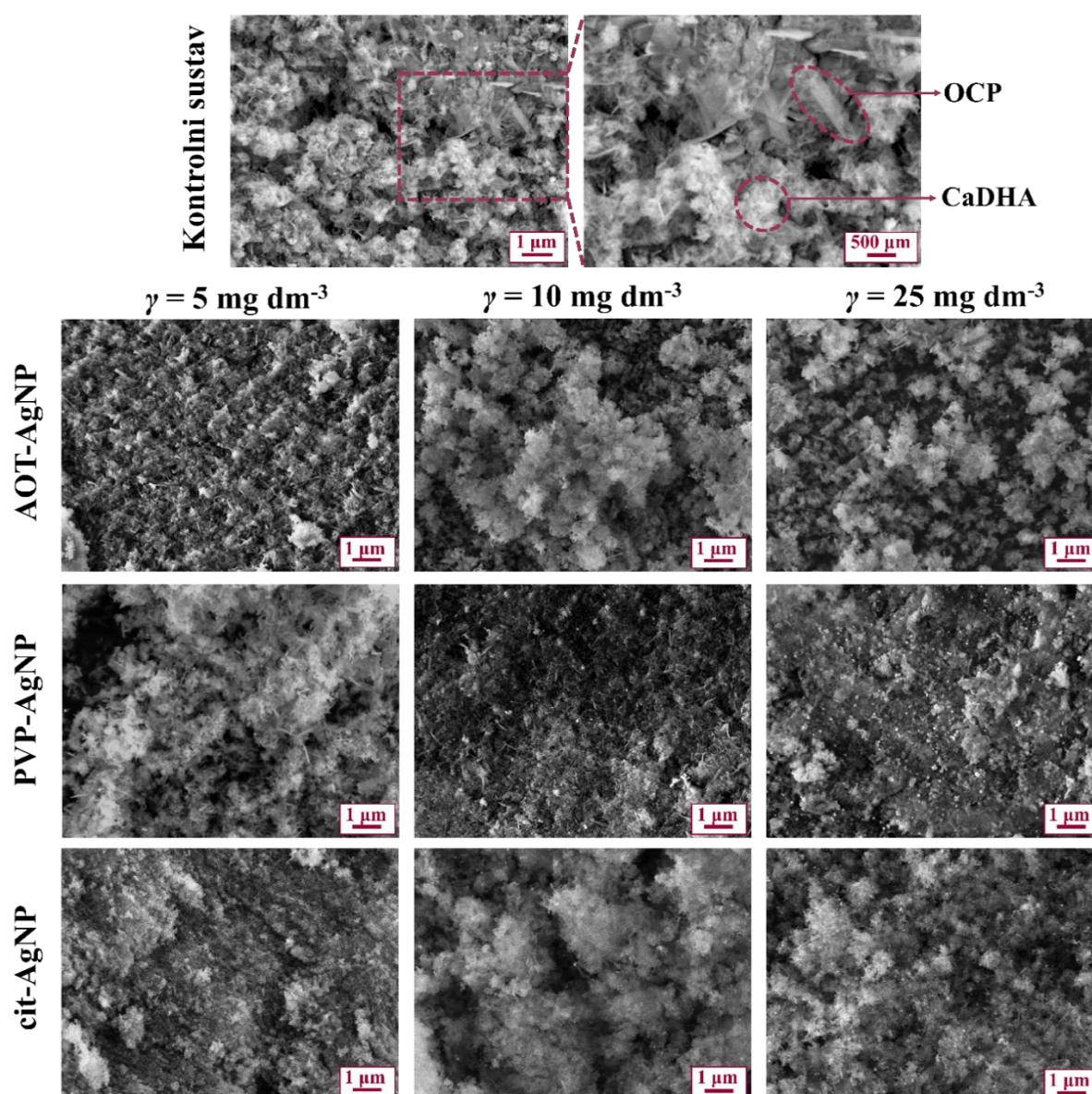
Slika 26. Difraktogrami i FTIR spektri taloga dobivenih nakon 60 minuta u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima s različitim koncentracijama nanočestica srebra modificiranih **a)**, **b)** natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), **c)**, **d)** poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i **e)**, **f)** trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Difrakcijski maksimumi označeni * odgovaraju maksimumima srebra prema JCPDS br. 04-0783.

U FTIR spektru (slika 26 b), d), f)) taloga nastalog u kontrolnom sustavu opažene su vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine: pri 1303 cm^{-1} (savijanje HPO_4^{2-}), 1091 cm^{-1} (ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje PO_4^{3-}), 1020 cm^{-1} (ν_{3c} trostruko degenerirano simetrično istezanje PO_4^{3-}), 912 cm^{-1} i 869 cm^{-1} (istezanje HPO_4^{2-}), 597 cm^{-1} (ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje PO_4^{3-}) i 560 cm^{-1} (ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje PO_4^{3-}). Pored toga, uočene su vrpce vode, široka vrpca u rasponu $3627\text{--}2884\text{ cm}^{-1}$ i vrpca pri 1637 cm^{-1} .^{244–246} Iako postoji velika sličnost između FTIR spektara apatita i OCP-a, smatra se da vrpce pri valnim brojevima oko 1195 cm^{-1} i 916 cm^{-1} , koje odgovaraju vibracijama HPO_4^{2-} u OCP-u, mogu koristiti za razlikovanje CaDHA i OCP-a.²⁴⁶ U spektru taloga nastalog u kontrolnom sustavu opažena je samo vrpca pri 912 cm^{-1} , ali ne i vrpca pri 1195 cm^{-1} . Također, nije opažena niti hiperfina struktura vrpce u području $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ karakteristična za OCP.^{246,247} To ukazuje da je OCP prisutan u maloj količini u nastalom talogu.

Analiza prve derivacije FTIR spektara (slika D2) u području karakterističnom za vibracije fosfatne grupe ($1200\text{--}450\text{ cm}^{-1}$), pokazala je da nema značajnijih promjena u položaju vrpce. Međutim, druga derivacija FTIR spektara u području $1005\text{--}975\text{ cm}^{-1}$ ukazuje na promjenu oblika vrpce pri najvećoj istraživanoj koncentraciji AOT-AgNP i PVP-AgNP te pri 10 mg dm^{-3} cit-AgNP. Navedeno može ukazivati na prisutnost različitih vrsta kalcijevih fosfata u navedenim kompozitima.

Pretražnom elektronskom mikroskopijom taloga dobivenih u kontrolnom sustavu i onih dobivenih u taložnim sustavima u prisustvu različitih AgNP-a potvrđen je nastanak različitih faza CaP-a (slika 27). Uočene su dvije različite morfologije, sferični agregati tankih listićavih kristala karakterističnih za kalcijem deficijentni hidroksiapatit²³⁵ i pločasti kristali karakteristični za oktakalcijev fosfat.^{76,195} Pojedinačne nanočestice srebra ugrađene su i adsorbirane na površini kristalnih agregata kalcijem deficijentnog hidroksiapatita. Promjene u morfologiji oktakalcijevog fosfata teško su uočljive obzirom da je većina pločica kristala oktakalcijevog fosfata orijentirana s najvećom plohom okomitom na podlogu. Uspoređujući oktakalcijev fosfat u taložnim sustavima s AgNP u odnosu na kontrolni sustav, dobiveni kristali oktakalcijevog fosfata manji su i manje razvijeni. Navedeno je upućivalo da porast koncentracije AgNP-a inhibira nastanak oktakalcijevog fosfata prilikom taloženja. U prisutnosti svih koncentracija AOT-AgNP-a sferični agregati kalcijem deficijentnog hidroksiapatita uočeni su kao dominantna morfologija. Nadalje, pri najmanjoj koncentraciji

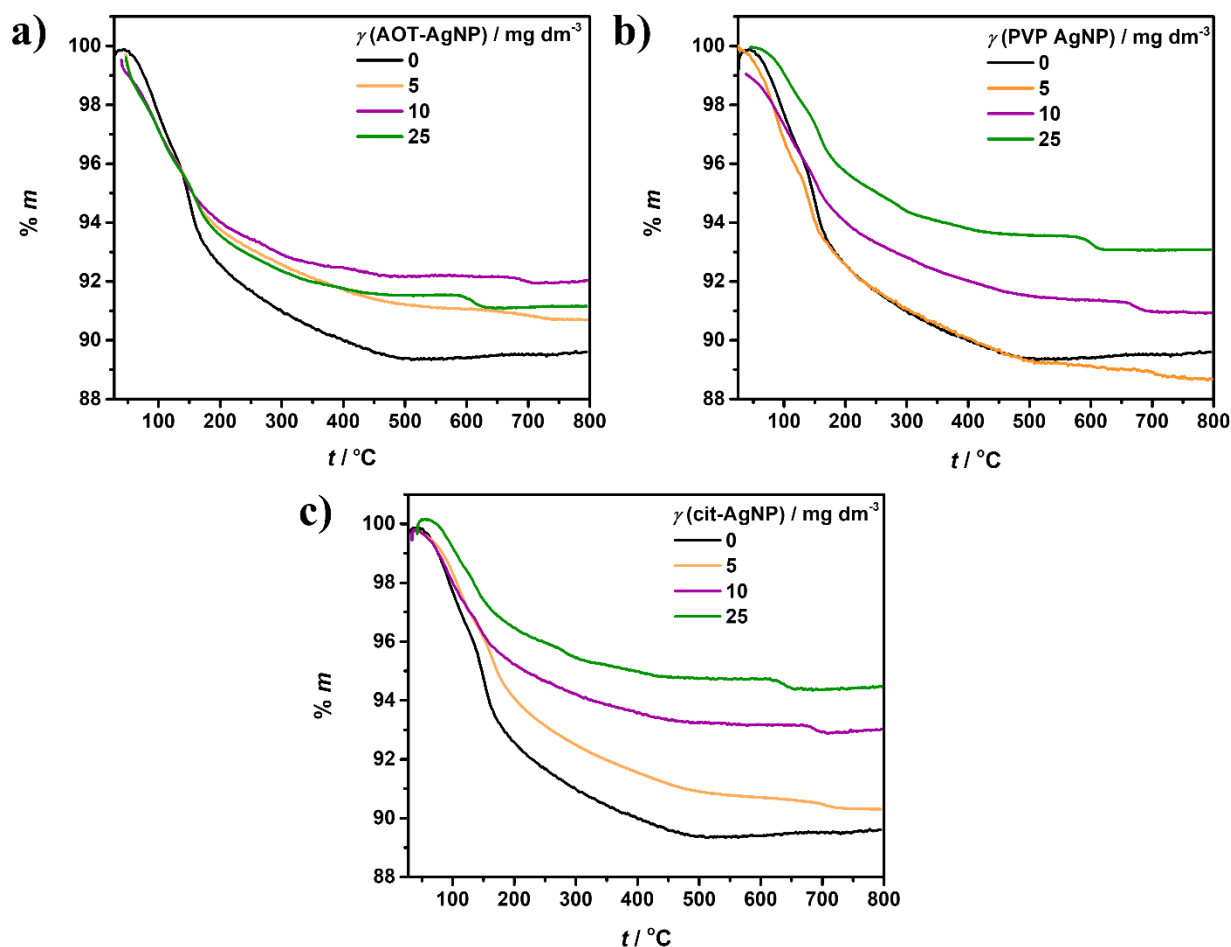
PVP-AgNP-a dobivena morfologija slična je onoj u kontrolnom sustavu, dok su porastom koncentracije PVP-AgNP-a opaženi manji kristali kalcijem deficijentnog hidroksiapatita i gusto pakirani sferični agregati. U taložnim sustavima u prisutnosti najniže koncentracije cit-AgNP-a nastali su sferični agregati s gušće pakiranim kristalima kalcijem deficijentnog hidroksiapatita. Povećanjem koncentracije cit-AgNP-a uočeni su pojedinačni sferični agregati, čija je prosječna veličina pri najvećoj koncentraciji cit-AgNP-a bila manja u usporedbi s kontrolnim sustavom.



Slika 27. SEM mikrografije taloga dobivenih nakon 60 minuta u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima s različitim koncentracijama nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Za ove materijale provedena je termogravimetrijska analiza. Termogram taloga nastalog u kontrolnom sustavu (slika 28) pokazuje da se termalna razgradnja kristalnog taloga odvija u 4 koraka. U prvom koraku, pri temperaturama 50–140 °C, došlo je do gubitka 4,5 % ukupne mase. U drugom koraku došlo je do gubitka mase od 3 % u rasponu temperatura 140–170 °C, a u trećem 4,6 % u rasponu temperatura 170–500 °C. Prethodna istraživanja su pokazala da se termalna razgradnja CaDHA odvija u dva koraka. U prvom koraku, pri temperaturama do 130 °C, gubi se adsorbirana voda. Gubitak mase pri višim temperaturama može se pripisati razgradnji CaDHA.^{233,248–250} U slučaju OCP-a, gubitak adsorbirane vode opažen je pri temperaturama do 125 °C.²⁵¹ Gubitak kristalizirane vode opaža se pri temperaturama 300–350 °C, dok se gubitak kemijski vezane vode opaža pri temperaturama do 400 °C. Pri temperaturama iznad 400 °C, opažen je mali kontinuirani gubitak mase koji odgovara daljnjem gubitku vode i razgradnji.^{252,253}

Prijašnja istraživanja termalnog raspada AgNP-a pokazala su dominantni gubitak mase u temperaturnom rasponu 200–500 °C. Navedeni gubitak mase pripisan je gubitku vode i organskih komponenata, poput stabilizatora. Točan temperaturni raspon raspada ovisi o vrsti AgNP, dok je pri nižim i višim temperaturama opažen mali ili nikakav gubitak mase.^{254,255} Oblik termograma kompozita CaP/AgNP sličan je obliku krivulje dobivene za kontrolni sustav, tako da nije bilo moguće razaznati gubitke mase karakteristične za AgNP i stabilizatore (slika D3). Porastom koncentracije AgNP-a smanjio se ukupni gubitak mase kompozita. To opažanje potvrdilo je prisustvo AgNP-a u analiziranom talogu. Nadalje, uočen je gubitak mase pri temperaturama iznad 600 °C koji nije bio prisutan u termogramu kontrolnog sustava. Temperatura, pri kojoj je gubitak počeo, se smanjila porastom koncentracije AgNP-a. Opaženi gubitak mase već je ranije uočen kod kristalnih apatitnih CaP-a pri 630 °C.²⁵⁶ Dobivene razlike u termalnim svojstvima taloga kontrolnog sustava i u prisutnosti AgNP-a u skladu su sa zaključcima ranijih istraživanja, koja su pokazala da AgNP prisutne na površini β -TCP-a utječu na njegovu termalnu stabilnost.²⁵⁷



Slika 28. Termogravimetrijske krivulje taloga dobivenih nakon 60 minuta u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima s različitim koncentracijama nanočestica srebra modificiranih: **a)** natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), **b)** poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i **c)** trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Brunauer-Emmett-Tellerovom (BET) metodom određena je specifična površina (SSA) kristalnih taloga dobivenih u kontrolnom sustavu i u prisustvu različitih koncentracija AgNP-a (tablica 11). Uočen je trend smanjenja specifične površine porastom koncentracije AOT-AgNP-a i cit-AgNP-a. U slučaju AOT-AgNP-a svi nastali talozi imali su veću SSA od taloga nastalog u kontrolnom sustavu. Smanjenje SSA taloga porastom koncentracije cit-AgNP bilo je izraženije, te je talog nastao pri najvećoj koncentraciji cit-AgNP imao manju SSA od taloga nastalog u kontrolnom sustavu. U slučaju kompozita CaP/PVP-AgNP uočeno je smanjenje SSA porastom koncentracije AgNP s 5 mg dm^{-3} na 25 mg dm^{-3} . Zanimljivo je da je pri 10 mg dm^{-3} PVP-AgNP-a SSA kristalnih kompozitnih taloga znatno manja u odnosu na SSA taloga za druge dvije koncentracije PVP-AgNP-a.

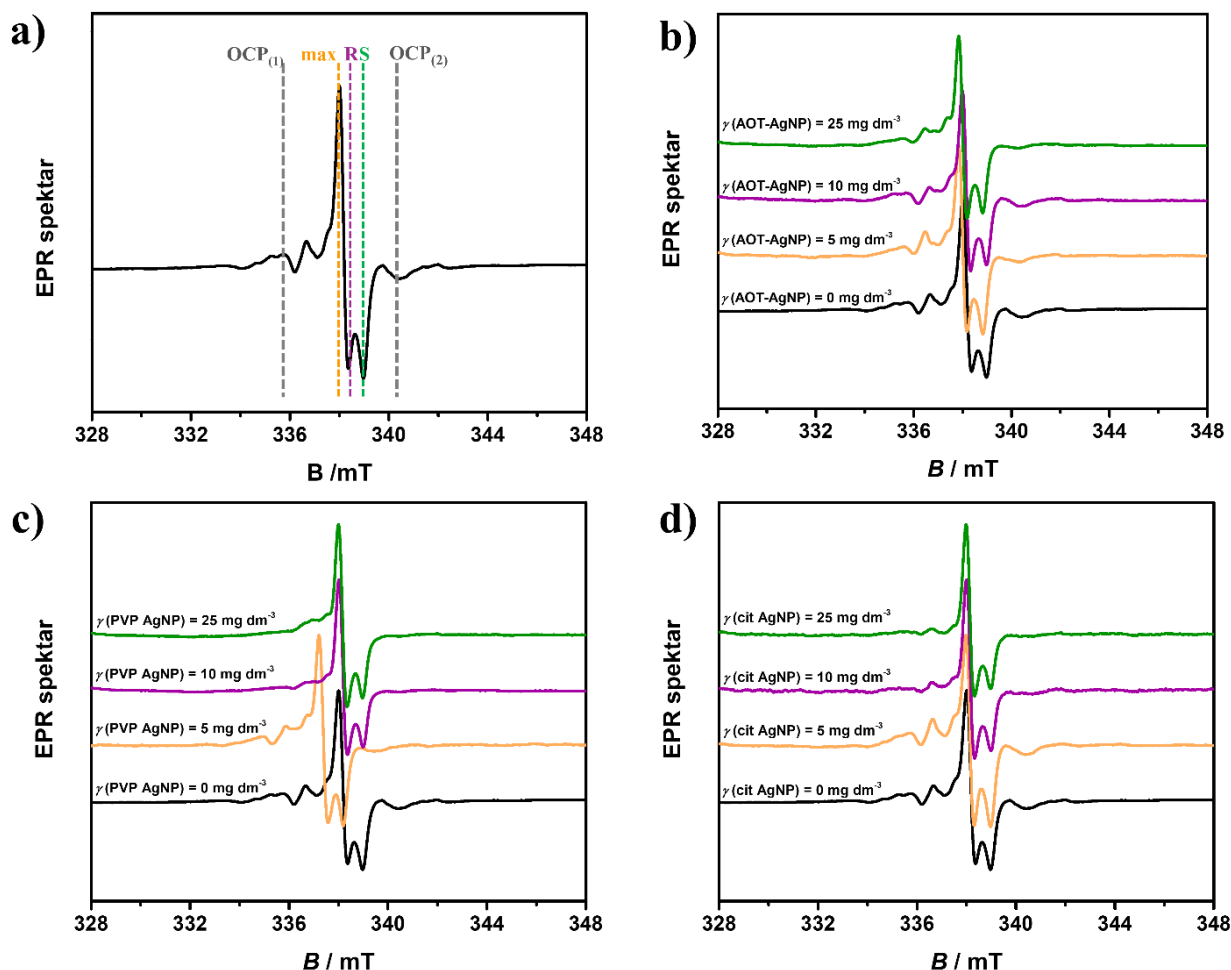
Tablica 11. Specifična površina (SSA) taloga dobivenih nakon 60 minuta u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima s različitim koncentracijama nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

γ (AgNP) mg dm^{-3}	SSA / $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$			
	bez AgNP	AOT-AgNP	PVP-AgNP	cit-AgNP
0	73,9 ± 0,2			
5		86,4 ± 1,4	86,7 ± 0,8	82,6 ± 1,2
10		84,5 ± 0,7	49,8 ± 1,3	72,9 ± 0,5
25		83,3 ± 2,4	80,1 ± 1,3	66,2 ± 0,2

U svrhu preciznijeg određivanja utjecaja AgNP-a na sastav dobivenih taloga i lokalno uređenje, provedena je karakterizacija elektronskom paramagnetskom rezonancijom (slika 29). Analiza EPR spektara pokazala se kompleksnom jer su korišteni spektri praha, koji sadrže manje informacija od spektara monokristala. Dodatno, dobiveni spektri sadrže više spektralnih komponenti u različitim omjerima. Pri analizi spektara, posebna pažnja posvećena je određivanju g -vrijednosti. Prilagodba za dobivanje g -vrijednosti nije korištena jer je nepouzdana za kompozitne signale. Umjesto toga, promatrane su promjene oblika linije kao posljedice promjena u lokalnom uređenju, te su korišteni fenomenološki parametri R - i S -vrijednosti (slika 29).^{258–260} Razlike u dobivenim R - i S -vrijednostima ukazuju na promjene kemijskog sastava uzoraka, razlike u orijentaciji mikrokristalita u različitim domenama i relativnih doprinosa izotropnih, aksijalnih ili ortorompskih spektralnih komponenti radikala (CO_2^- , CO_3^- , CO_3^{3-} , NO_3^{2-} , ...).

EPR spektar kontrolnog uzorka ukazuje na prisutnost mnogih paramagnetskih centara u različitim omjerima (slika 29). Prema dostupnim literaturnim podacima,^{261–264} dio spektralnih komponenti može se pripisati ozračenom oktakalcijevom fosfatu, zbog prisustva dvije vrste dušikovih radikala (NO_3^{2-}) i stabilnog radikala CO_2^- . Te dvije spektralne linije (označene kao $\text{OCP}_{(1)}$ and $\text{OCP}_{(2)}$, slika 29) nisu opažene u EPR spektru kalcijem deficitarnog hidroksiapatita.^{233,234} Također, u EPR spektru kontrolnog uzorka pri manjem magnetskom polju opažen je signal kojem odgovara g -vrijednost oko 2,0115, vjerojatno od radikala CO_3^- povezanog s uhvaćenom vodom^{265,266} i drugog tipa stabilnog radikala CO_2^- . Kako su spektri praha dvaju radikala CO_2^- gotovo identični, direktna identifikacija nije moguća. Na temelju

EPR spektra je stoga moguće zaključiti da je nastala smjesa oktakalcijeveg fosfata i kalcijem deficitnog hidroksiapatita, što je u skladu s PXRD i FTIR karakterizacijom.



Slika 29. EPR spektri taloga dobivenog nakon 60 minuta **a)** u kontrolnom sustavu s definiranim *R*- i *S*-fenomenološkim parametrima te $OCP_{(1)}$ i $OCP_{(2)}$ spektralnim linijama te EPR spektri taloga dobivenih nakon 60 minuta u taložnim sustavima s različitim koncentracijama nanočestica srebra modificiranih **b)** natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), **c)** poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i **d)** trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

EPR spektri taloga dobivenih u prisustvu AgNP-a ukazali su na suptilne razlike u obliku spektralnih linija. *R*- i *S*- vrijednosti eksperimentalnih spektara taloga kompozita (tablica 12) mijenjaju se s promjenom koncentracije pojedinih AgNP-a zbog različitog omjera radikala koji potječu od oktakalcijeveg fosfata i kalcijem deficitnog hidroksiapatita. Za AOT-AgNP i PVP-AgNP relativne promjene fenomenoloških parametara (ΔR i ΔS), u usporedbi s kontrolnim sustavom, najmanje su pri koncentraciji AgNP-a 10 mg dm^{-3} u prisutnosti

AOT-AgNP-a i PVP-AgNP-a, dok su za cit-AgNP najmanje pri 25 mg dm^{-3} , što je pripisano utjecaju stabilizatora, citrata. Najveće promjene R - i S - vrijednosti, oko 62–65 % i 29–34 %, uočene su pri koncentraciji 5 mg dm^{-3} svih proučavanih AgNP-a. Nadalje, uočeno je smanjenje intenziteta signala $\text{OCP}_{(1)}$ i $\text{OCP}_{(2)}$ s porastom koncentracije AgNP-a. Iz navedenih razlika zaključeno je da povećanje koncentracije AgNP-a rezultira smanjenjem udjela oktakalcijevog fosfata u smjesi, što je u skladu s rezultatima ostalih metoda karakterizacije.

Tablica 12. R - i S - vrijednosti ozračenih prahova taloga dobivenih nakon 60 minuta u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima s različitim koncentracijama nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom $\text{pH}=7,4$ i 25°C . $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

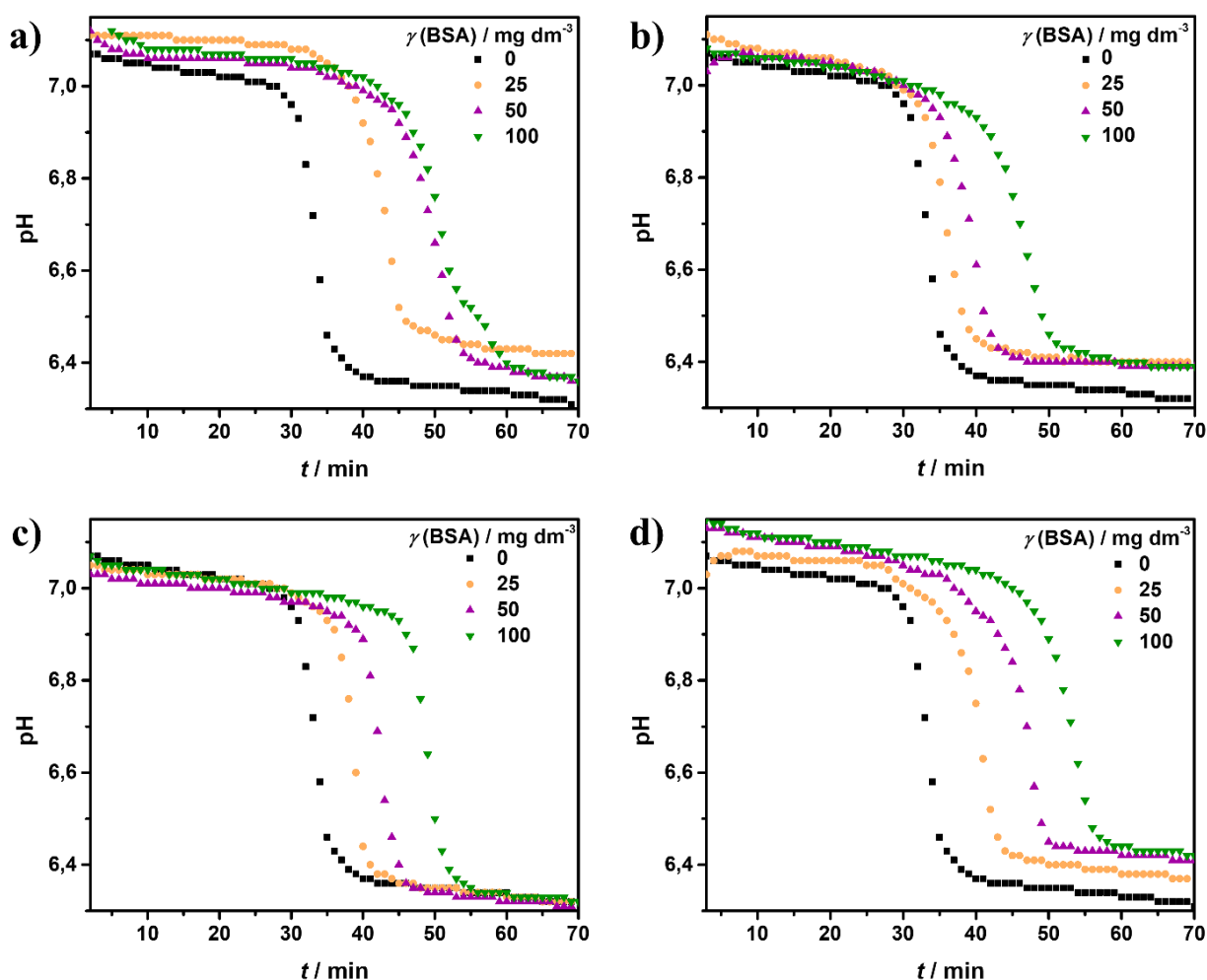
Uzorak	$\gamma (\text{AgNP}) / \text{mg dm}^{-3}$	R	S
Kontrolni uzorak	0	0,536	0,443
AOT-AgNP	5	0,698	0,719
	10	0,643	0,589
	25	0,662	0,615
	5	0,692	0,720
PVP-AgNP	10	0,577	0,508
	25	0,643	0,567
	5	0,719	0,729
Cit-AgNP	10	0,611	0,542
	25	0,549	0,482

4.3. Biomimetska priprema kompozita kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i biomolekula

4.3.1. Utjecaj biomakromolekula i nanočestica srebra različite površinske modifikacije na kinetiku taloženja kalcijevih fosfata

Utjecaj albumina iz goveđeg seruma i kitozana na kinetiku taloženja i transformaciju kalcijevih fosfata je također praćen potencijometrijski. U prvom koraku određen je utjecaj samih biomakromolekula na taloženje CaP-a, kako bi se mogao razlučiti utjecaj pojedinih aditiva prilikom pripreme kompozita CaP/AgNP/biomakromolekula. U tu svrhu pripremljeni su taložni sustavi u prisutnosti različitih koncentracija BSA i Chi, bez dodatka AgNP-a.

Krivulje ovisnosti pH o vremenu reakcije (slika 30 a), slika 31 a)) sličnog su sigmoidalnog oblika, što ukazuje na nepromijenjen mehanizam taloženja.²²⁹ S druge strane, pH-krivulje i vremena indukcije određena iz pH-krivulja (tablica 13) ukazuju na to da BSA inhibira sekundarno taloženje CaP-a. Štoviše, vrijeme indukcije se povećava porastom koncentracije BSA, što pokazuje da BSA stabilizira ACP. Vremena indukcije, određena iz pH-krivulja dobivenih u prisutnosti Chi, ukazuju na značajnu inhibiciju sekundarnog taloženja u prisutnosti svih koncentracija Chi. Vremena indukcije produljuju se porastom koncentracije, što ukazuje na to da Chi stabilizira ACP.



Slika 30. Reprezentativne krivulje ovisnosti pH o vremenu, dobivene za kontrolni sustav i za taložne sustave s različitim koncentracijama albumina iz goveđeg seruma (BSA) **a)** bez ili u prisutnosti nanočestica srebra ($\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$) modificiranih **b)** natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), **c)** poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i **d)** trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

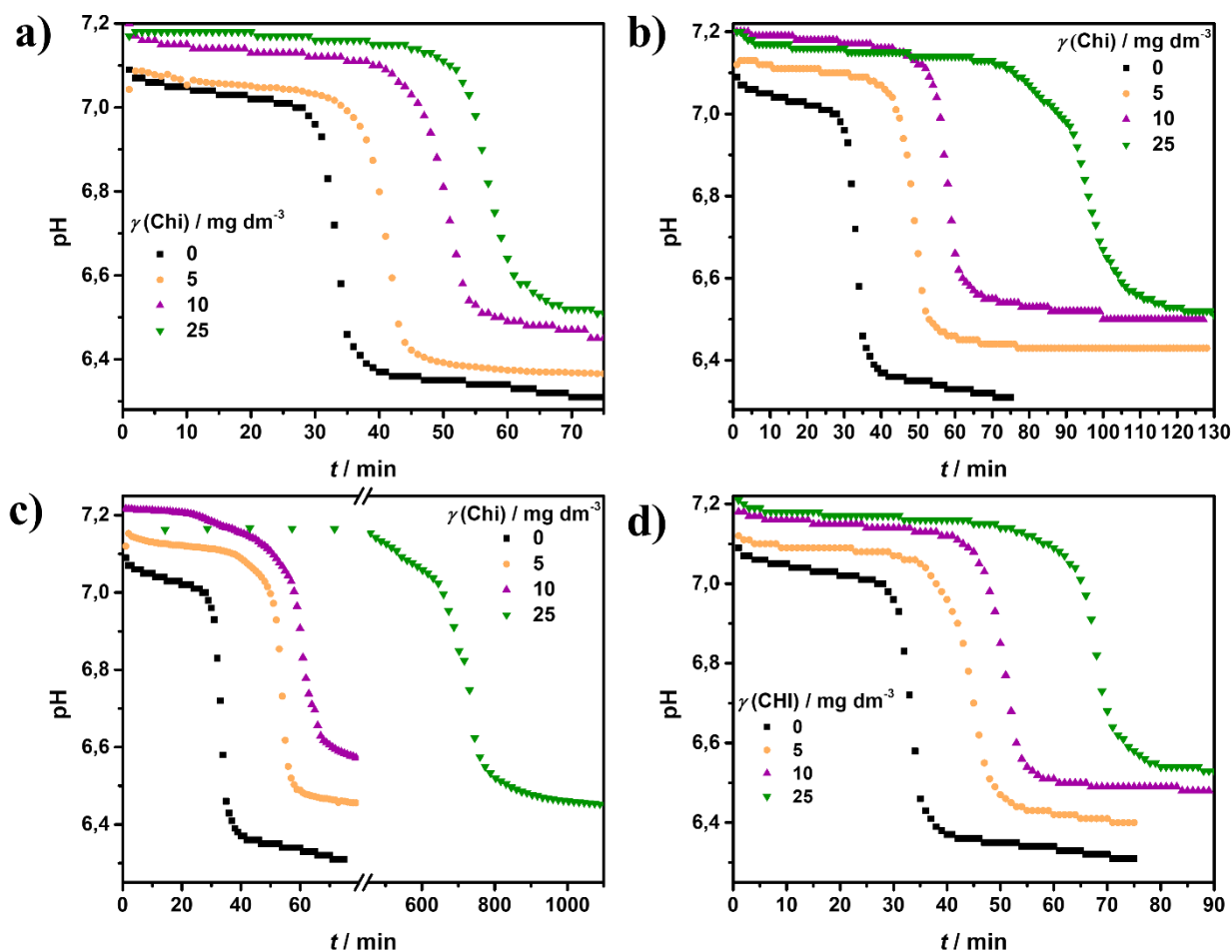
Inhibicija sekundarnog taloženja opažena je i u taložnim sustavima u prisutnosti različitih koncentracija BSA ili Chi te stalne koncentracije AgNP-a (slika 30, slika 31). U ranijim istraživanjima pokazalo se da ugradnja 0,5 % srebra i 0,7 % silicija u hidroksiapatit daje antimikrobna svojstva, a ne utječe na proliferaciju osteoblasta.^{267,268} Iz navedenog razloga, u taložnim eksperimentima korištena je stalna koncentracija AgNP-a 10 mg dm^{-3} . U navedenim taložnim sustavima, nepromijenjen oblik pH–krivulja ukazuje na to da nije došlo do promjene mehanizma taloženja CaP-a u prisutnosti svih promatranih koncentracija BSA. S druge strane, u prisutnosti AOT-AgNP-a, pri najvećoj koncentraciji Chi, i PVP-AgNP-a, pri svim koncentracijama Chi, pH-krivulje imaju promijenjen oblik. U navedenim potenciometrijskim krivuljama opažen je još jedan korak taloženja, između nastajanja ACP-a i sekundarnog taloženja. U tom koraku taloženja dolazi do manje promjene pH nego prilikom sekundarnog taloženja, što odgovara nastajanju druge faze amorfnog kalcijevog fosfata (ACP2).^{33,212,269} Nastajanje ACP2 faze primijećeno je prilikom nastajanja CaP-a u prisutnosti surfaktanata²¹² i nekih aminokiselina.²⁶⁰ ACP2 ne pojavljuje se prilikom taloženja u prisutnosti samih AgNP-a ni u prisutnosti BSA, što znači da samo kombinacija određenih koncentracija kitozana i određenih vrsta AgNP-a pogoduje njezinom nastanku.

Tablica 13. Prosječna vremena indukcije (t_i) sekundarnog taloženja kalcijevih fosfata ($n = 3$) dobivena iz pH-krivulja (slika 30) sa standardnom devijacijom, određena u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima s različitim koncentracijama albumina iz goveđeg seruma (BSA) bez ili u prisutnosti nanočestica srebra ($\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$) modificiranih natrijevim bis(2-etihleksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Vrsta AgNP	$\gamma(\text{BSA}) / \text{mg dm}^{-3}$			
	0	25	50	100
	t_i / min			
bez AgNP	$30,8 \pm 2,0$	$37,5 \pm 1,5$	$41,0 \pm 1,6$	$45,2 \pm 1,7$
AOT-AgNP	$33,0 \pm 2,7$	$35,4 \pm 1,3$	$40,9 \pm 0,8$	$44,6 \pm 2,2$
PVP-AgNP	$31,6 \pm 1,8$	$35,1 \pm 0,6$	$43,6 \pm 1,3$	$43,6 \pm 1,6$
cit-AgNP	$28,8 \pm 1,3$	$35,3 \pm 0,9$	$39,7 \pm 0,1$	$44,6 \pm 1,8$

Nije uočena značajna razlika u vremenima indukcije sekundarnog taloženja, dobivenih u taložnim sustavima s različitim AgNP (tablica 13), u odnosu na taložne sustave koji su sadržavali samo BSA. To pokazuje da BSA ima dominantnu ulogu u inhibiciji sekundarnog

taloženja CaP. S druge strane, vremena indukcije u sustavima s AgNP i Chi (tablica 14) bila su duža od onih u sustavima koji su sadržavali samo Chi. Razlike su najizraženije za najveću koncentraciju Chi. Pri svim istraženim koncentracijama Chi vremena indukcije rasla su u nizu cit-AgNP < AOT-AgNP < PVP-AgNP. Navedeno ukazuje na to da brzina transformacije ACP-a u prisutnosti Chi ovisi i o vrsti AgNP-a, suprotno onome što je primijećeno za BSA. Takva razlika u ponašanju može biti posljedica različite stabilnosti AgNP-a u prisutnosti tih dviju biomakromolekula. Detaljnije, AgNP pokazuju manju stabilnost u prisustvu Chi, dok su stabilne u prisustvu BSA (tablica 6, tablica 7). Navedeno ukazuje na to da agregati AgNP-a potencijalno jače inhibiraju transformaciju CaP-a.



Slika 31. Reprezentativne krivulje ovisnosti pH o vremenu dobivene za kontrolni sustav i za taložne sustave s različitim koncentracijama kitozana (Chi) **a)** bez ili u prisutnosti nanočestica srebra modificiranih **b)** natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), **c)** poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i **d)** trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i pri 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$.

Chi se pokazao kao učinkovitiji inhibitor od BSA, s obzirom na to da se njegov inhibitory učinak opaža pri nižim koncentracijama. Takva razlika u ponašanja može se pripisati razlici u strukturi tih dviju biomakromolekula. Molekula BSA ima rigidnu, kompaktnu, srcoliku strukturu,¹³⁶ dok je Chi fleksibilan, linearan polisaharid.¹⁴³ Chi se zato može lakše adsorbirati na površinu čestica ACP-a i time spriječiti transport konstitutivnih iona, ali i sekundarnu nukleaciju, slično onome što je pokazano za polielektrolite.¹⁹⁵

Tablica 14. Prosječna vremena indukcije (t_i) sekundarnog taloženja kalcijevih fosfata ($n = 3$) dobivena iz pH-krivulja (slika 31), sa standardnom devijacijom, određena u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima s različitim koncentracijama kitozana (Chi) bez ili u prisutnosti nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etihleksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$.

Vrsta AgNP	$\gamma(\text{Chi}) / \text{mg dm}^{-3}$			
	0	5	10	25
	t_i / min			
bez AgNP	$30,8 \pm 2,0$	$34,2 \pm 1,7$	$46,0 \pm 2,4$	$52,4 \pm 1,2$
AOT-AgNP	$33,0 \pm 2,7$	$42,9 \pm 0,4$	$50,6 \pm 0,4$	$81,1 \pm 6,1$
PVP-AgNP	$31,6 \pm 1,8$	$47,9 \pm 1,0$	$52,4 \pm 0,9$	$675,3 \pm 78,5$
cit-AgNP	$28,8 \pm 1,3$	$38,6 \pm 2,1$	$45,7 \pm 1,3$	$60,6 \pm 0,3$

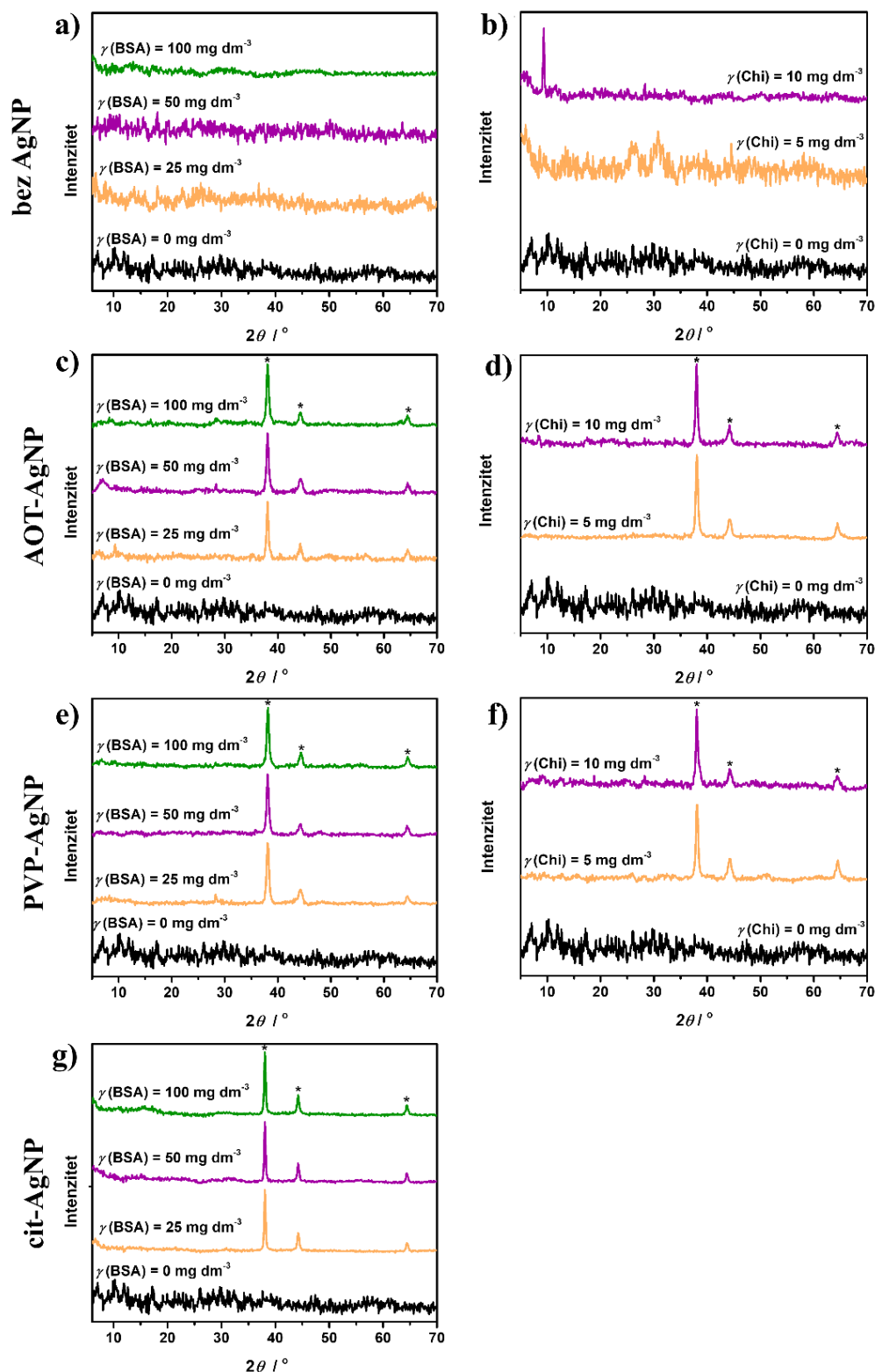
4.3.2. Utjecaj biomakromolekula i nanočestica srebra različite površinske modifikacije na svojstva amorfne faze kalcijevih fosfata

Kako bi se odredila svojstva kompozita ACP/AgNP/biomakromolekula talozi su karakterizirani PXRD-om i FTIR-om, a morfologija im je određena TEM-om. U slučaju CaP/AgNP/BSA talozi su odvojeni nakon 15 minuta. S obzirom na različita vremena indukcije pojedinih taložnih sustava s AgNP i Chi, CaP/AgNP/Chi talozi su izolirani u vremenima koja su odgovarala završetku prvog koraka taloženja. U kontrolnom sustavu talog je izoliran nakon 10 minuta od početka taloženja, u sustavima koji su sadržavali dvije manje koncentracije Chi bez AgNP-a nakon 25 minuta, dok je u prisutnosti najveće koncentracije Chi i PVP-AgNP-a amorfn talog izoliran nakon 1 h od početka taloženja. Količina taloga izoliranog iz sustava s najvećom koncentracijom Chi bez i sa svim AgNP te iz sustava sa svim koncentracijama Chi i cit-AgNP-a bila je premala za PXRD i FTIR analize, pa su navedeni

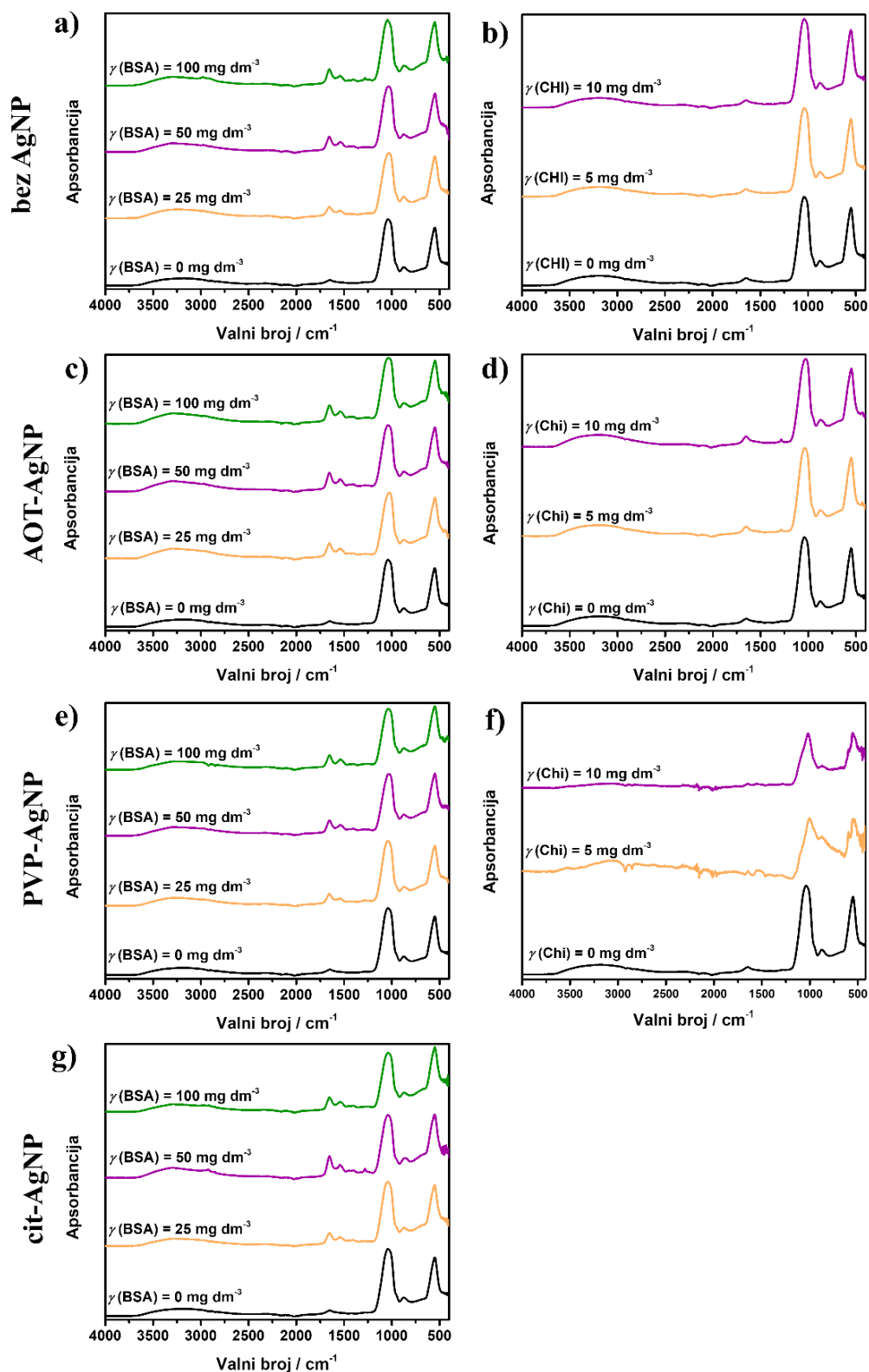
talozi analizirani samo TEM-om. Mala količina taloga nastala u taložnim sustavima s Chi ukazuje na to da Chi inhibira ne samo transformaciju ACP-a, već i njegovo nastajanje.

Difraktogrami praha (slika 32) nastalog u kontrolnom sustavu i u prisutnosti svih koncentracija BSA bez dodatka AgNP-a sadrže širok maksimum malog intenziteta u području 2θ 27° – 35° karakterističan za ACP.^{34,235} Takav maksimum opažen je u difraktogramu praha dobivenom u prisutnosti najmanje koncentracije Chi (slika 32). U prisutnosti različitih AgNP-a i svih koncentracija obiju biomakromolekula, difraktogrami praha sadrže tri izražena difrakcijska maksimuma pri 2θ $38,1^{\circ}$, $44,3^{\circ}$ i $64,5^{\circ}$ koji odgovaraju difrakciji na (111), (200) i (220) kristalnim ravninama srebra (JCPDS br. 04-0783). Slično kao i u prisutnosti samo AgNP-a, u prisutnosti AgNP-a i biomakromolekula maksimumi difrakcija na ravninama ACP-a u difraktogramima praha nisu vidljivi zbog velikog intenziteta maksimuma difrakcija na kristalnim ravninama AgNP-a. Pored toga, u difraktogramu praha taloga dobivenog u prisutnosti 10 mg dm^{-3} Chi opažen je maksimum pri 2θ $9,4^{\circ}$ koji odgovara difrakciji na (200) kristalnoj ravnini OCP-a (JCPDS br. 074-1301). Navedeno ukazuje na početak transformacije ACP-a, no kako ostali maksimumi karakteristični za bilo koju kristalnu fazu CaP-a nisu prisutni, to je moguća posljedica transformacije taloga nakon izdvajanja iz matičnice.

FTIR spektri (slika 33) amorfnih taloga potvrđuju nastanak ACP-a u sustavima pri svim istraženim koncentracijama BSA i Chi bez i s AgNP. U svim spektrima opažene su vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine, asimetrično istezanje PO_4^{3-} (ν_3) pri 1035 cm^{-1} , vibracija HPO_4^{2-} skupine pri 870 cm^{-1} i savijanje PO_4^{3-} (ν_4) pri 550 cm^{-1} .^{236,237} Izostanak hiperfine strukture vrpce istezanja i savijanja (ν_3 i ν_4) potvrdio je nastanak amorfne faze kalcijevih fosfata.^{198,236} Nadalje, opažene su vrpce vibracije vode u rasponu 3650 – 2750 cm^{-1} i pri 1650 cm^{-1} . U FTIR spektrima CaP/AgNP/BSA taloga uočene su karakteristične vibracijske vrpce BSA pri 2980 cm^{-1} (amid B, istezanje N–H), 1650 cm^{-1} (amid I, istezanje C=O), 1540 cm^{-1} (amid II, istezanje C–N i savijanje N–H), 1450 cm^{-1} (CH_2), 1400 cm^{-1} (CH_2 savijanje) i 1270 cm^{-1} (amid III, istezanje C–N i savijanje N–H).^{219,220} Očekivano, povećanjem koncentracije BSA, povećavao se i intenzitet vrpce BSA u FTIR spektrima. Vrpce karakteristične za kitozan nije bilo moguće jednoznačno asignirati, obzirom da se pojavljuju pri jednakim valnim brojevima (tablica 9) kao i vibracije fosfatne skupine.



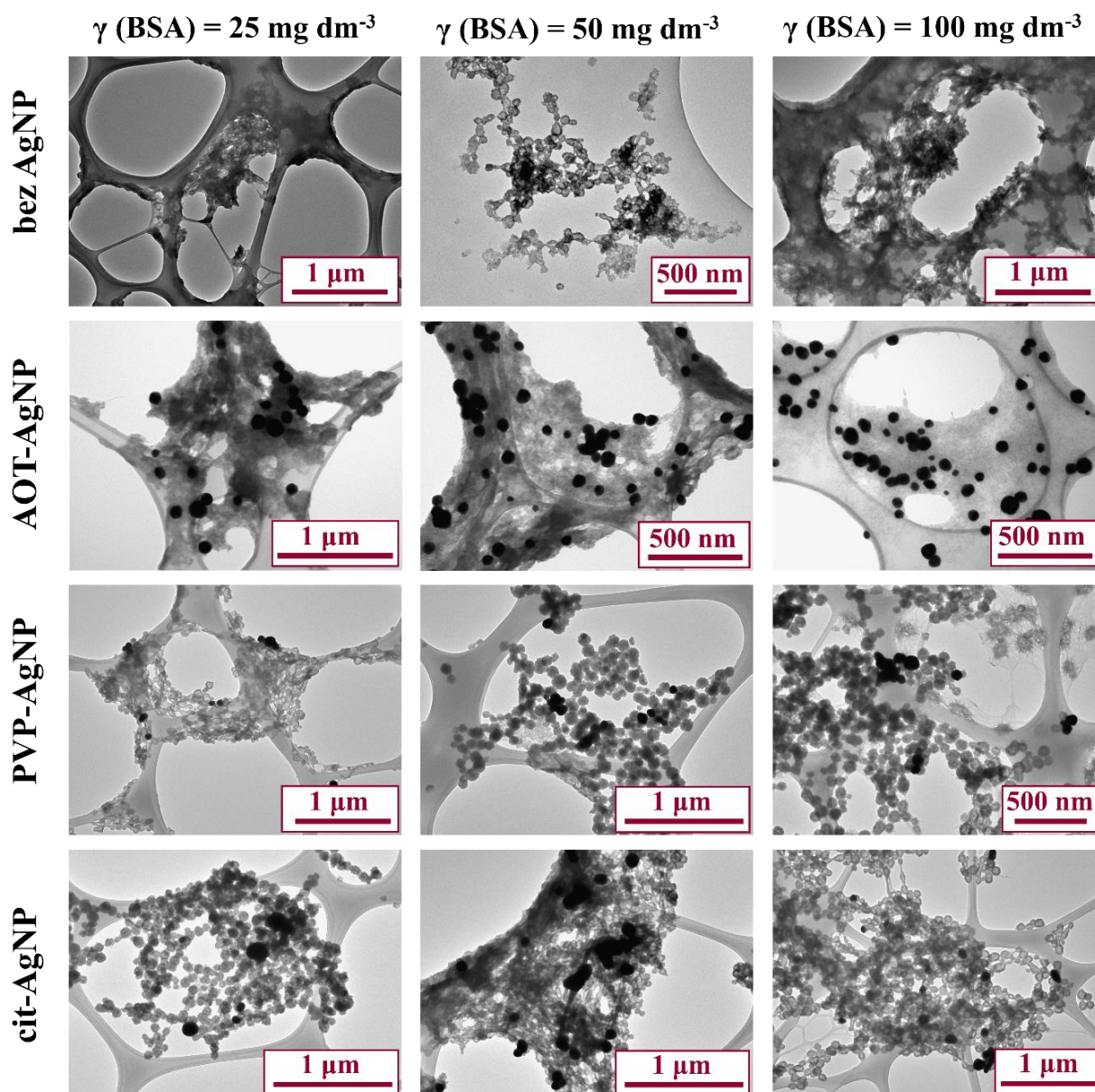
Slika 32. Difraktogrami praha amorfnih taloga dobivenih u kontrolnom sustavu i u prisutnosti različitih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) (a, c, e, g), kitozana (b, d, f) bez (a, b) ili u prisutnosti (c-g) nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$. Difrakcijski maksimumi označeni * odgovaraju maksimumima srebra prema JCPDS br. 04-0783.



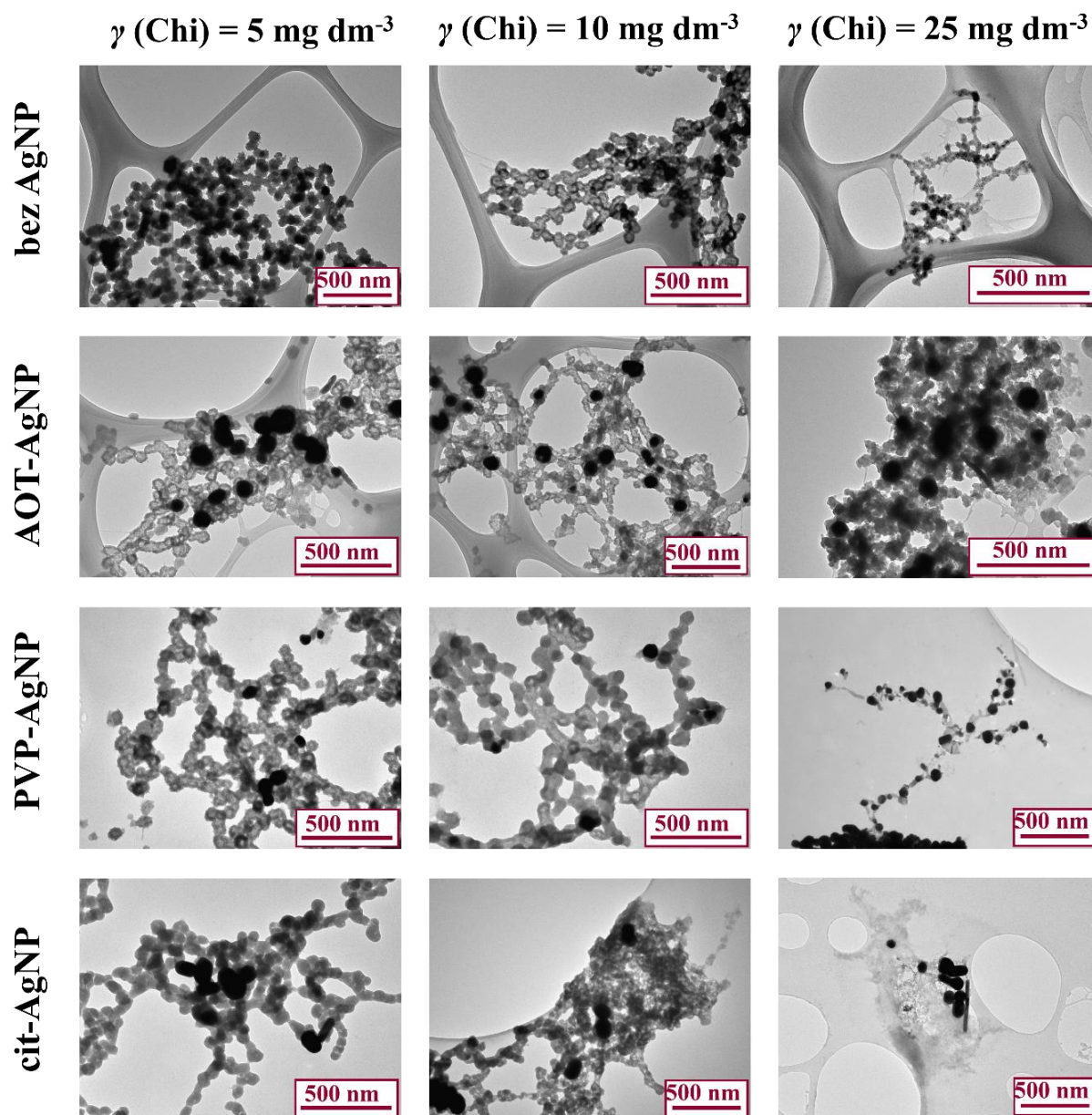
Slika 33. FTIR spektri amorfnih produkata dobivenih u kontrolnom sustavu i u prisustvu različitih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) (a, c, e, g) kitozana (Chi) (b, d, f) bez (a, b) ili u prisutnosti nanočestica srebra (c-g) modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$.

Iz TEM mikrografija dobivenih amorfnih taloga CaP/BSA, CaP/AgNP/BSA (slika 34) te CaP/Chi i CaP/AgNP/Chi (slika 35) vidljivo je da biomakromolekule imaju veliki utjecaj na morfologiju ACP-a. U kontrolnom sustavu, kako je prethodno opisano, bez prisutnosti BSA, Chi i AgNP, ACP je istaložio u obliku lančastih agregata sferičnih čestica ACP-a prosječne veličine 79 ± 20 nm. U prisutnosti BSA, pri svim koncentracijama, nastala je faza nalik gelu. Pri koncentraciji BSA 50 mg dm^{-3} uočene su i manje sferične čestice ACP-a, prosječne veličine 53 ± 10 nm, agregirane u lančaste strukture. U taložnim sustavima koji su sadržavali samo Chi, primijećena je postupna promjena morfologije nastalog ACP-a iz lančastih agregata sferičnih čestica u fazu nalik gelu. Pri najmanjoj istraženoj koncentraciji Chi prosječna veličina sferičnih čestica ACP-a (64 ± 12 nm) manja je u odnosu na kontrolni sustav. Povećanje koncentracije Chi na 10 mg dm^{-3} rezultiralo je daljnjim smanjenjem veličina sferičnih čestica (47 ± 11 nm). Smanjenje veličine sferičnih čestica ACP-a moguće je objasniti adsorpcijom biomakromolekula na nastajuće ACP čestice, čime se sprječava transport iona konstituenata, a time i daljnji rast čestica.

Različito stabilizirane AgNP u prisustvu biomakromolekula imale su različiti utjecaj na morfologiju ACP-a. U prisutnosti AOT-AgNP-a, pri svim koncentracijama BSA, nastala je faza nalik gelu. Za razliku od toga, u prisustvu cit-AgNP-a, pri svim koncentracijama BSA, nastali su lančasti agregati sferičnih čestica, a najviše faze nalik gelu nastalo je pri koncentraciji BSA 50 mg dm^{-3} . S druge strane, u prisustvu PVP-AgNP-a nije došlo do znatne promjene u morfologiji jer su pri svim koncentracijama BSA nastali lančasti agregati sferičnih čestica ACP-a. U usporedbi s rezultatima dobivenim u taložnim sustavima sa samo AgNP (poglavlje 4.2.2.), čini se da BSA promovira nastanak faze nalik gelu. Nadalje, u prisutnosti AOT-AgNP i dviju najmanjih koncentracija Chi opažene su nepravilne sferične čestice ACP-a, dok je u prisustvu najveće koncentracije Chi opažena samo faza nalik gelu. Sličan trend opažen je i u prisustvu cit-AgNP-a. S druge strane, u prisustvu PVP-AgNP-a i Chi morfologija nije znatno promijenjena u odnosu na kontrolni sustav. Opažene su sferične čestice ACP-a, slične veličine kao i u kontrolnom sustavu i mala količina faze nalik gelu. Kitozan u taložnim sustavima inhibira nastanak faze nalik gelu, iako same nanočestice srebra promoviraju nastanak iste. Nadalje, na TEM mikrografijama opaženo je da su nanočestice srebra ravnomjerno raspoređene u amorfnom talogu, iako su istraživanja stabilnosti AgNP-a u prisustvu Chi pokazala agregaciju AgNP-a. Navedeno ukazuje na to da kalcijevi fosfati dodatno stabiliziraju AgNP.



Slika 34. TEM mikrografije taloga dobivenih nakon 15 minuta u prisutnosti različitih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) bez ili u prisutnosti nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$.



Slika 35. TEM mikrografije amorfnih taloga dobivenih u prisustvu različitih koncentracija kitozana (Chi) bez ili u prisutnosti nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$.

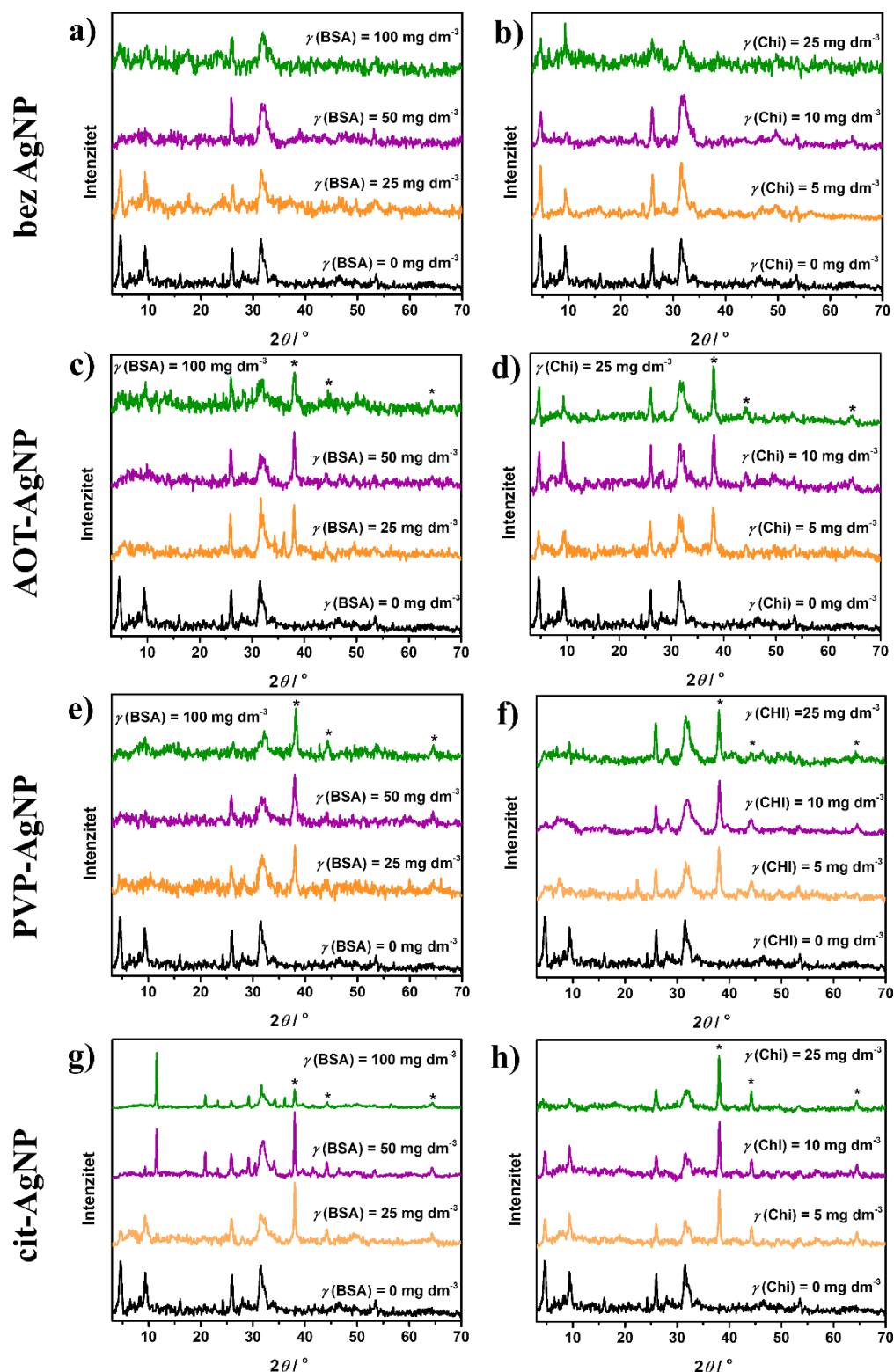
4.3.3. Utjecaj biomakromolekula i nanočestica srebra različite površinske modifikacije na svojstva kristalne faze kalcijevih fosfata

Iz pH-krivulja (slika 30) vidljivo je da je u taložnim sustavima s BSA te BSA i AgNP nakon 60 minuta završena transformacija amorfnog u kristalni talog. S druge strane, s obzirom na značajno različita vremena indukcije u istraživanim taložnim sustavim s Chi te Chi i AgNP,

kristalni talozi izolirani su nakon 130 minuta u sustavu koji je sadržavao najveću koncentraciju Chi te AOT-AgNP i cit-AgNP, te nakon 1100 minuta u sustavu koji je sadržavao najveću koncentraciju Chi i PVP-AgNP. U ostalim taložnim sustavima s Chi te Chi i AgNP talog je izoliran nakon 75 minuta. Izolirani kristalni talozi karakterizirani su difrakcijom rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom, pretražnom elektronskom mikroskopijom i termogravimetrijskom analizom.

Difraktogrami praha kompozita CaP/biomakromolekule (slika 36) sadrže maksimume velikog intenziteta pri 2θ 26,0° i 31,8° i maksimume manjeg intenziteta pri 2θ 16,1°, 28,1°, 31,7°, 39,3°, 46,4°, 49,6° i 53,3° koji potvrđuju nastanak CaDHA.²³⁵ Pored toga, difraktogrami sadrže difrakcijske maksimume pri 2θ 4,6° i 9,4° karakteristične za OCP (JCPDS br. 074-1301). Intenzitet navedenih maksimuma smanjuje se povećanjem koncentracije BSA i Chi. To ukazuje na promjenu količine nastalog OCP-a, što je u skladu s prijašnjim istraživanjima, gdje je pokazano da koprecipitacijom CaP-a uz BSA dolazi do postepene promjene sastava iz čistog OCP-a u smjesu OCP-a i karboniranog apatita porastom koncentracije BSA.²⁷¹ Nadalje, u istraživanjima Aimoli i sur.²⁷² pokazana je razlika u omjeru nastalih faza kalcijevih fosfata pri različitim pH u prisustvu Chi, dok u istraživanjima Fadeeva i sur.²⁷³ nije dobivena nikakva razlika. Nadalje, u istraživanjima Erceg i sur.¹⁸⁷ nije opažena promjena u sastavu nastalog taloga u prisutnosti biomakromolekula.

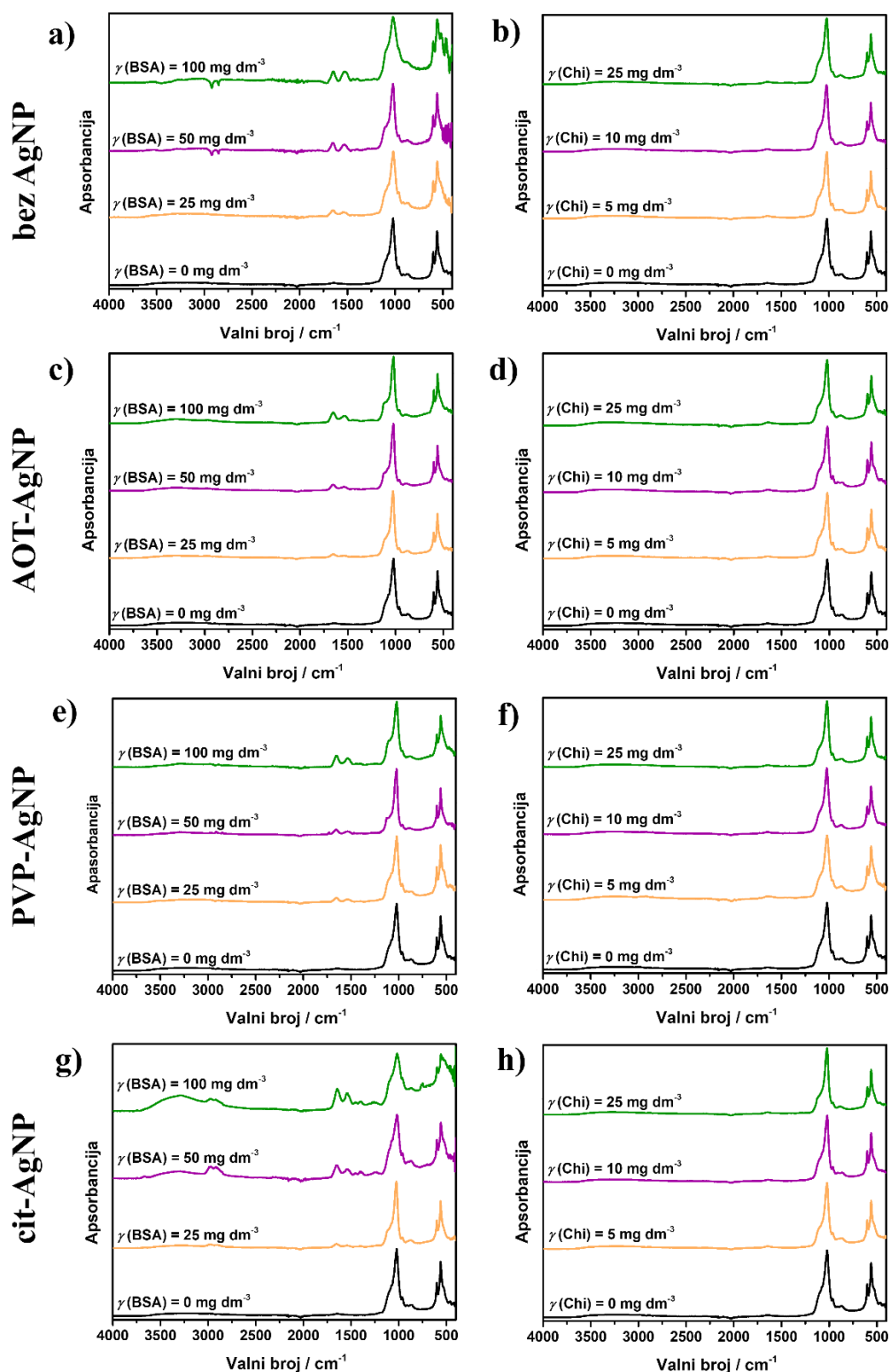
Difraktogrami praha ukazuju na različit utjecaj AgNP-a i biomakromolekula. U prisustvu svih AgNP-a i BSA opaženo je smanjenje intenziteta maksimuma OCP-a pri svim koncentracijama BSA. Razlika je opažena u difraktogramima praha kompozita CaP/cit-AgNP/BSA, pri dvije veće koncentracije BSA, gdje je opažen je maksimum pri 2θ 11,5°, karakterističan za DCPD. U prisustvu Chi nisu opaženi maksimumi novih faza CaP, no intenzitet OCP maksimuma smanjivao se s porastom koncentracije Chi u prisustvu PVP-AgNP-a i cit-AgNP-a, pri čemu je utjecaj bio izraženiji u prisustvu PVP-AgNP-a. U prisustvu AOT-AgNP-a i Chi nije opaženo smanjenje intenziteta maksimuma OCP-a, iako same AOT-AgNP utječu na smanjenje intenziteta OCP-a (slika 26 a)). Navedeno upućuje na to da sastav nastalih CaP-a ovisi o specifičnoj kombinaciji AgNP-a i biomakromolekula.



Slika 36. Difraktogrami praha kristalnih taloga dobivenih u kontrolnom sustavu i u prisustvu različitih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) (**a, c, e, g**), kitozana (Chi) (**b, d, f, h**) bez (**a, b**) ili u prisutnosti nanočestica srebra (**c-h**) modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP) (**c, d**), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) (**e, f**) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) (**g, h**) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$. Difrakcijski maksimumi označeni * odgovaraju maksimumima srebra prema JCPDS br. 04-0783.

U FTIR spektrima kompozita CaP/biomakromolekule i CaP/AgNP/biomakromolekule (slika 37) prisutne su vibracijske vrpce karakteristične za fosfatnu skupinu. Vrpca trostruko degeneriranog asimetričnog istezanja PO_4^{3-} (ν_{3a}) opažena je pri 1100 cm^{-1} , trostruko degeneriranog asimetričnog istezanja PO_4^{3-} (ν_{3c}) pri 1020 cm^{-1} , nedegeneriranog simetričnog istezanja PO_4^{3-} (ν_1) pri 962 cm^{-1} , istezanja HPO_4^{2-} pri 1076 cm^{-1} , 960 cm^{-1} i 917 cm^{-1} , trostruko degeneriranog savijanja PO_4^{3-} (ν_{4a}) pri 601 cm^{-1} i trostruko degeneriranog savijanja PO_4^{3-} (ν_{4b}) pri 559 cm^{-1} . Pored toga, prisutne su vrpce karakteristične za vibracije veza u vodi; široka vrpca u rasponu $3630\text{--}2870\text{ cm}^{-1}$ i vrpca pri 1643 cm^{-1} .^{244–246} Vrpca pri 917 cm^{-1} karakteristična za istezanje HPO_4^{2-} slabog je intenziteta u sustavima s najnižom koncentracijom Chi. Navedena vrpca, karakteristična za OCP, nije opažena u sustavima s dvije veće koncentracije Chi i pri svim koncentracijama BSA bez ili s AgNP. Navedeno potvrđuje PXRD rezultate gdje je ustanovljeno smanjenje količine nastalog OCP-a u prisustvu pojedinih kombinacija AgNP-a i biomakromolekula. Povećanjem koncentracije BSA u prisutnosti svih AgNP-a, povećava se intenzitet vrpce karakterističnih za BSA u rasponu valnih brojeva $1650\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$. Karakteristične vrpce kitozana nije bilo moguće jednoznačno asignirati jer se poklapaju s karakterističnom vrpcom fosfatnih skupina.^{272,273}

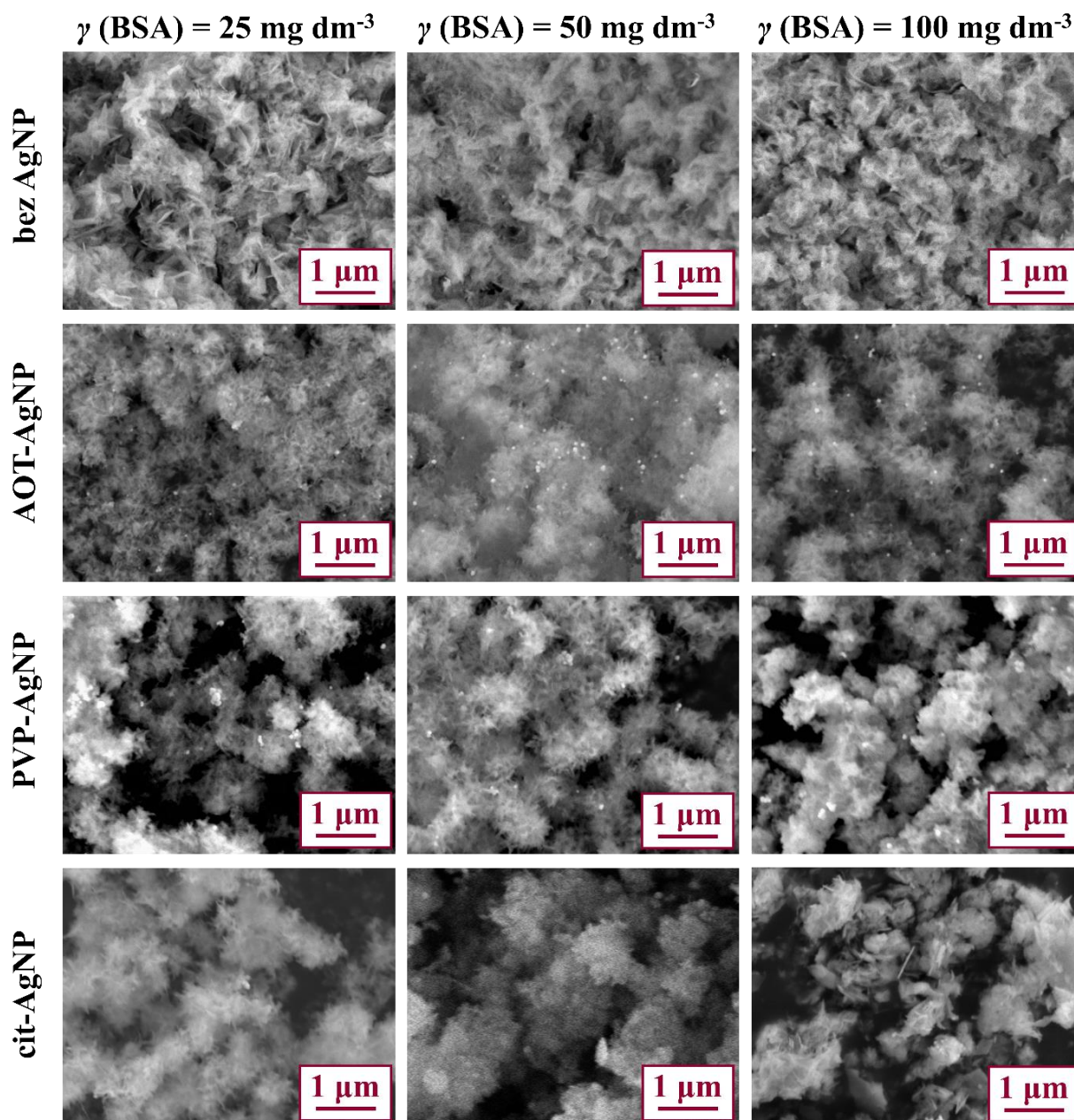
Na temelju prve i druge derivacija FTIR spektara ustanovljeno je da se valni broj vrpce trostruko degeneriranog asimetričnog istezanja PO_4^{3-} (ν_{3a}) mijenja za $\pm 7\text{ cm}^{-1}$ (slika D5, slika D6). Pored toga, u FTIR spektrima taloga dobivenih pri svim koncentracijama BSA u prisustvu AgNP-a, nije opažena vrpca vibracije HPO_4^{2-} skupine u rešetki OCP-a, pri 916 cm^{-1} , što potvrđuje inhibiciju nastajanja OCP-a u prisustvu BSA i različitih AgNP-a.



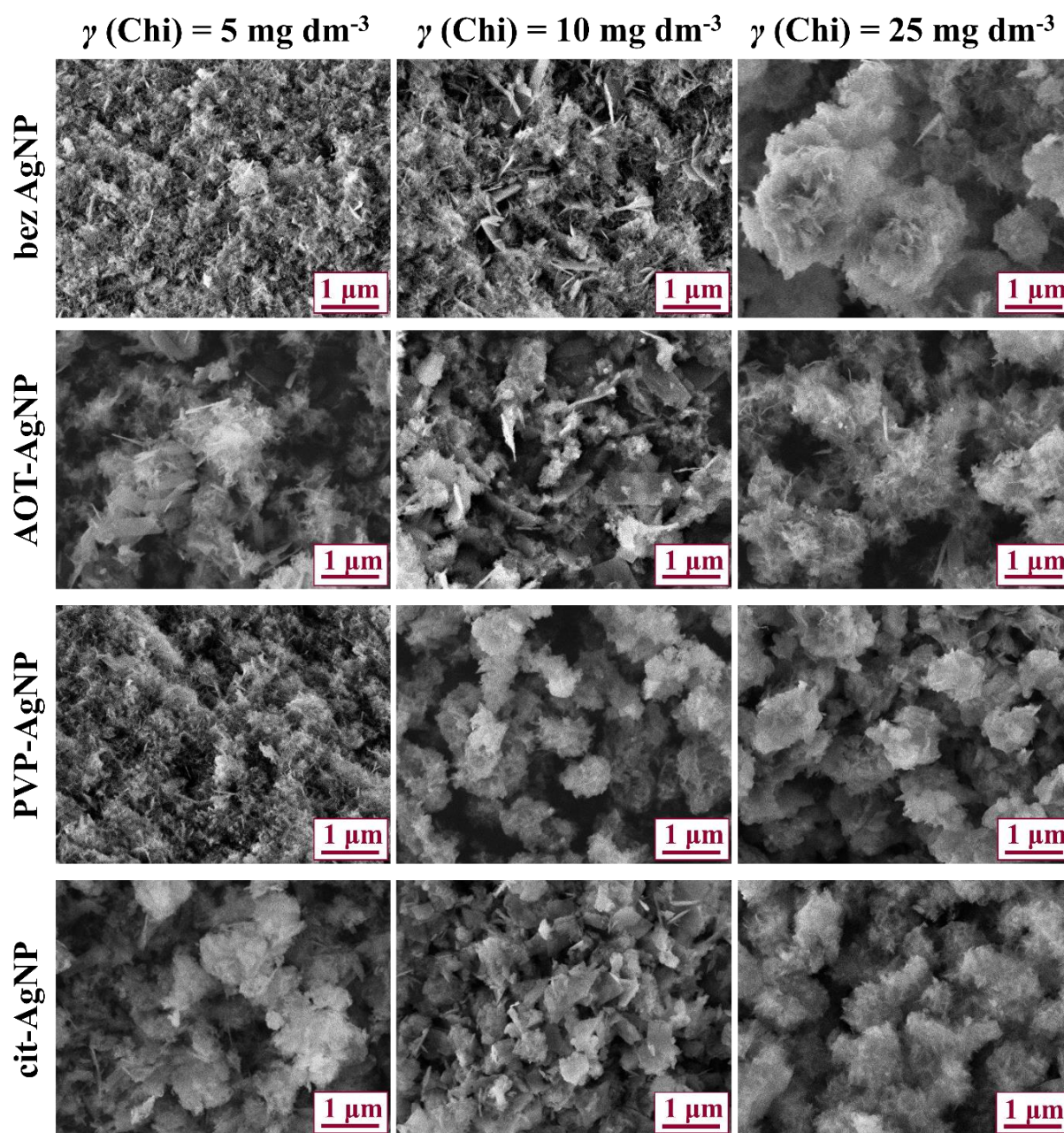
Slika 37. FTIR spektri kristalnih taloga dobivenih u kontrolnom sustavu i u prisustvu različitih koncentracija albumina iz govedeg seruma (BSA) (a, c, e, g) kitozana (Chi) (b, d, f, h) bez (a, b) ili u prisutnosti nanočestica srebra (c-h) modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP) (c,d), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) (e, f) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) (g, h) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$.

SEM mikrografije taloga CaP-a dobivenih u prisutnosti AgNP-a i različitih koncentracija BSA (slika 38) te različitih koncentracija Chi (slika 39) ukazuju na promjene morfologije nastalih kompozita. U prisustvu BSA, u odnosu na kontrolni sustav (slika 27), nastali su manje razvijeni i gušće pakirani kristali CaDHA. S druge strane, u prisutnosti Chi nastali su veći sferični agregati kristala CaDHA koji su također manje razvijeni u odnosu na kontrolni sustav. Povećanjem koncentracije obiju biomakromolekula u taložnom sustavu, uočena je manja količina pločastih kristala OCP-a, u skladu s rezultatima PXRD i FTIR analize. Opažene promjene u morfologiji u skladu su s rezultatima prethodnih istraživanja utjecaja biomakromolekula na morfologiju različitih faza CaP-a.^{187,271}

Zajednički utjecaj AgNP-a i biomakromolekula ovisio je o vrsti AgNP-a. U prisutnosti BSA i AgNP, nastali su sferični agregati kristala CaDHA različitih veličina. Najveći kristali i njihovi sferični agregati nastali su u prisutnosti BSA i cit-AgNP-a. U prisutnosti AOT-AgNP-a i PVP-AgNP-a te najmanje koncentracije BSA opaženi su i pločasti kristali OCP-a. Pločasti kristali opaženi u sustavima s cit-AgNP pri većim koncentracijama BSA, a prema PXRD rezultatima kristali su DCPD. Nadalje, pri dvije najniže koncentracije Chi te AOT-AgNP ili cit-AgNP, nastali su kristali OCP-a veći nego u kontrolnom sustavu. Pri najvećoj koncentraciji Chi, nastali su sferični agregati listićavih kristala CaDHA veći nego u kontrolnom sustavu. U prisustvu PVP-AgNP-a, kristali OCP-a opaženi su samo pri najmanjoj koncentraciji Chi. Navedena opažanja potvrđuju rezultate PXRD i FTIR analiza. Dobiveni rezultati potvrđuju hipotezu da utjecaj biomakromolekula na sastav CaP-a ovisi o vrsti AgNP-a što je u skladu s literaturnim podacima da slični nanomaterijali različite dimenzionalnosti različito utječu na morfologiju CaP-a u prisustvu biomakromolekula.¹⁸⁷ Pored toga, povećanjem koncentracije biomakromolekula smanjuje se količina AgNP-a adsorbirana na površinu kristala CaP-a. To može biti posljedica adsorpcije biomakromolekula na površinu CaP-a, kao što je pokazano DLS i ELS mjerenjima (tablica 6, tablica 7), koja može olakšati ugradnju AgNP-a.



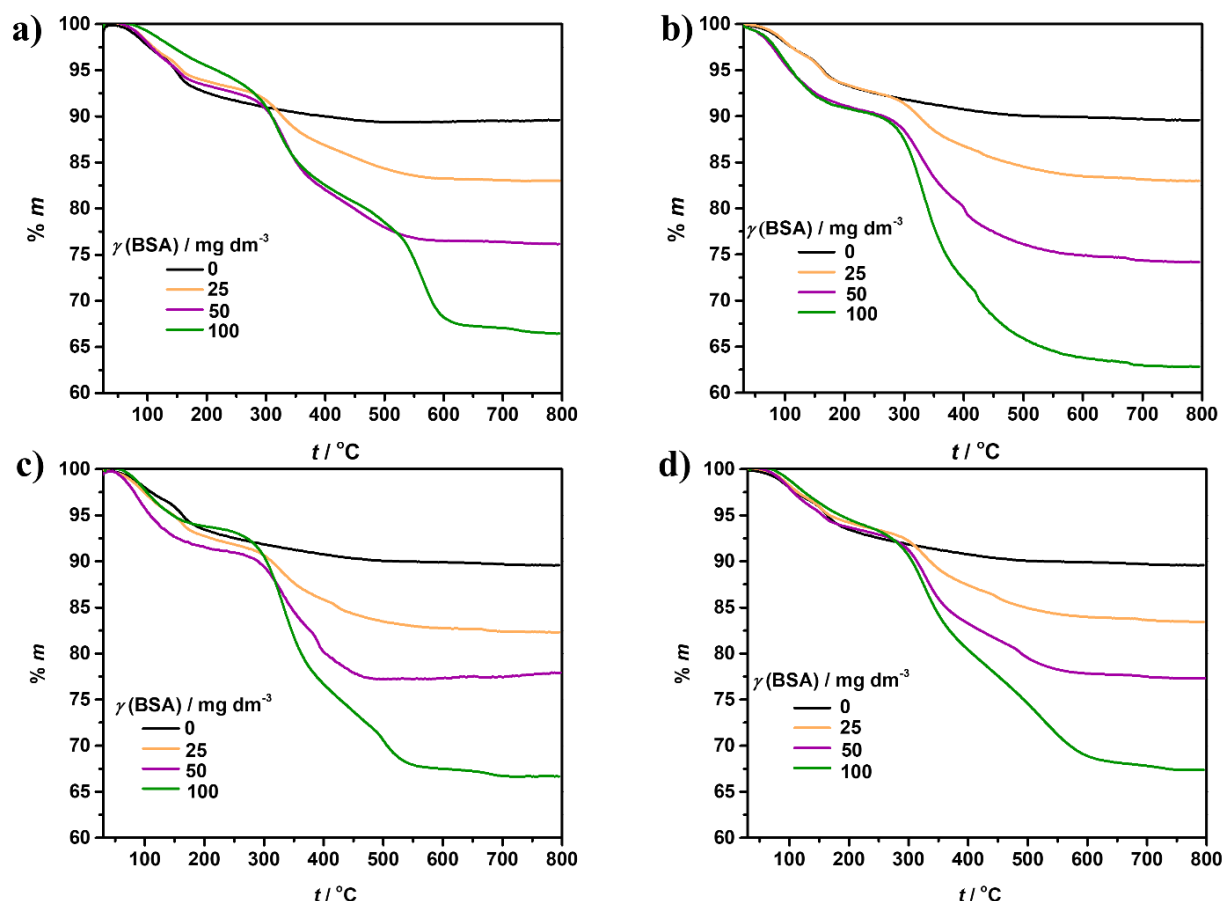
Slika 38. SEM mikrografije taloga dobivenih nakon 60 minuta u prisustvu različitih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) bez ili u prisutnosti nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$.



Slika 39. SEM mikrografije kristalnih taloga dobivenih u prisustvu različitih koncentracija kitozana (Chi) bez ili u prisutnosti nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, γ (AgNP) = 10 mg dm⁻³.

Kako bi se potvrdila ugradnja biomakromolekula u kompozite provedena je termogravimetrijska analiza. U termogramu taloga nastalog u kontrolnom sustavu opažena su dva gubitka mase. Prvi gubitak od 6,4 % u rasponu temperature 50–172 °C, odgovara gubitku adsorbirane vode. Drugi gubitak od 4,0 % u rasponu temperatura 172–495 °C, koji odgovara

razgradnji CaP.^{249,251} Termalna razgradnja BSA odvija se u 4 koraka (slika 21 c)). U temperaturnom rasponu 75–150 °C dolazi do gubitka mase 3,5 % koji se pripisuje gubitku vode. Daljnji gubitak mase u rasponima 210–430 °C, 430–600 °C i 600–675 °C u ukupnom iznosu gubitka mase od 88,0 % koji odgovara razgradnji BSA, slično ranijim istraživanjima.²²²

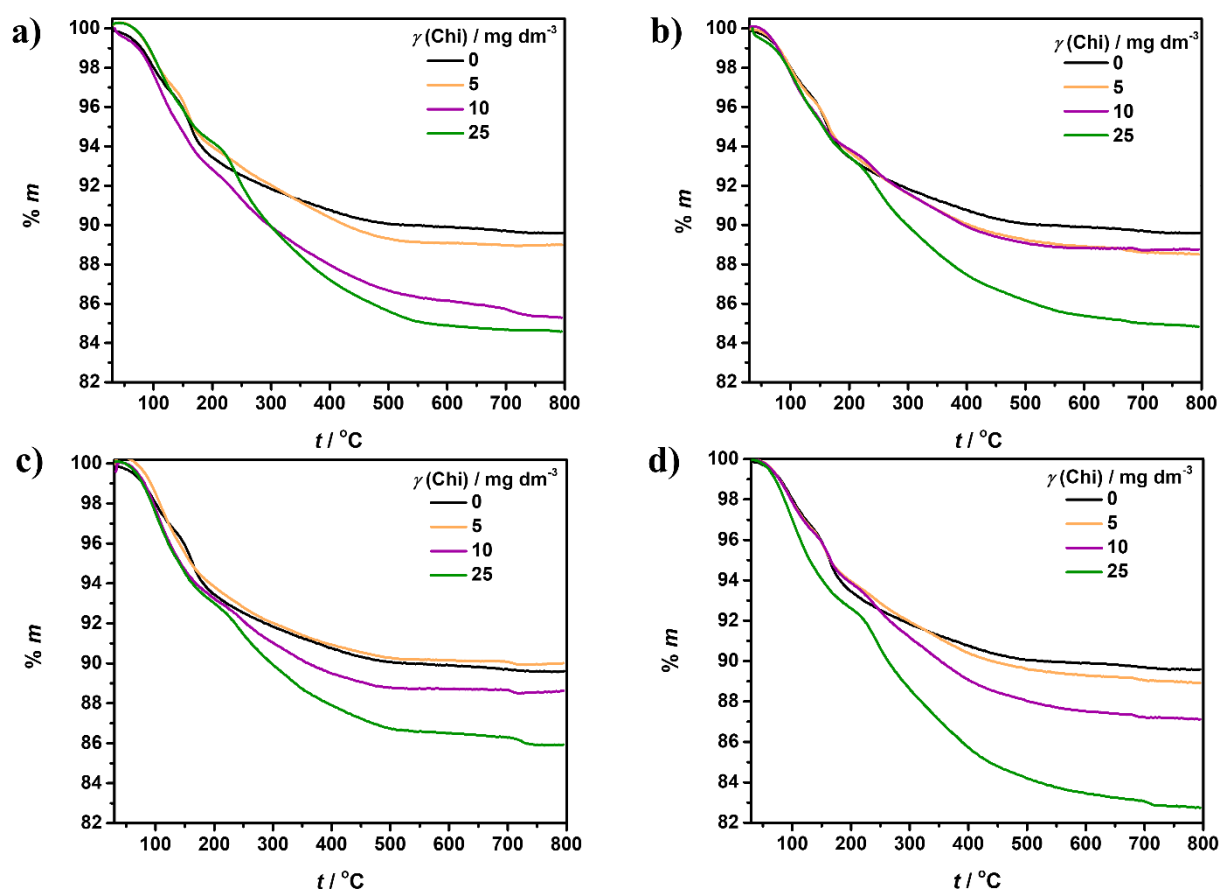


Slika 40. Termogravimetrijske krivulje taloga dobivenih nakon 60 minuta u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima u prisustvu različitih koncentracija BSA **a)** bez ili u prisutnosti nanočestica srebra modificiranih **b)** natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), **c)** poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i **d)** trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i pri 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$.

U termogramima taloga dobivenih u prisustvu različitih koncentracija BSA (slika 40 a)) opaženo je povećanje ukupnog gubitka mase porastom koncentracije BSA, što potvrđuje prisutnost, odnosno ugradnju BSA u kompozit. U termogramima taloga pripremljenih u prisustvu nanočestica srebra (slika 40 b), c), d)) nije opažen značajan utjecaj AgNP-a na ukupan gubitak mase, s obzirom na to da su ukupni gubici mase, za jednake koncentracije

BSA, podjednaki u kompozitima bez i s AgNP. Termogravimetrijske krivulje taloga s najvećom koncentracijom BSA bez/sa svim vrstama AgNP oblikom nalikuje na termogravimetrijsku krivulju razgradnje čistoga BSA (slika 21), što znači da većina gubitaka mase kompozita prilikom termogravimetrijske analize potječe od razgradnje BSA.

U termogravimetrijskoj krivulji Chi (slika 22 c)) prvi gubitak mase od 6,7 % opažen je u temperaturnom području 54–135 °C te se može pripisati gubitku adsorbirane vode. Glavni raspad odvija se u dva koraka, u temperaturnom području 235–331 °C i 331–684 °C, što rezultira ukupnim gubitkom mase od 91 %. Prethodna istraživanja pokazala su, da drugi, sporiji korak odgovara oksidaciji i razgradnji oksidiranog Chi.²²⁶



Slika 41. Termogravimetrijske krivulje taloga dobivenih nakon 60 minuta u kontrolnom sustavu i u taložnim sustavima u prisustvu različitih koncentracija Chi **a)** bez ili u prisutnosti nanočestica srebra modificiranih **b)** natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), **c)** poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i **d)** trinatrijevim citratom (cit-AgNP) pri početnom pH=7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\gamma(\text{AgNP}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$.

Termogrami taloga (slika 41) dobivenih u prisustvu Chi i AgNP-a potvrdili su ugradnju Chi u kompozite CaP/AgNP, s obzirom na to da je opaženo povećanje ukupnog gubitka mase porastom koncentracije Chi. Pored toga, oblik krivulje pri najvećoj korištenoj koncentraciji Chi nalikuje termogramu čistog Chi (slika 22), što ukazuje na to da gubitak mase većinom potječe od razgradnje kitozana. Nadalje, nisu uočene razlike u ukupnom gubitku mase za različite korištene AgNP te su gubitci mase slični onima za taloge dobivene u prisustvu Chi, bez AgNP-a. Navedeno dodatno potvrđuje da većina gubitka mase potječe od razgradnje kitozana i da AgNP nemaju utjecaja na termalno ponašanje pripremljenih kompozita.

4.4. Biomimetska priprema kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije na modificiranoj površini titanija

Funkcionalizacija površine titanija multifunkcionalnim, biološki aktivnim prevlakama omogućava bolju interakciju implantata s okolnim tkivom. Na taj način se u potpunosti koriste dobre strane metalnog implantata, biokompatibilnost i dobra mehanička svojstva, i prevlake, bioaktivnost. U prijašnjim istraživanjima pripremane su kompozitne prevlake s biološkim molekulama, odnosno raznih molekula važnih u rastu kostiju, raznih proteina i polisaharida, te anorganskim spojevima i nanomaterijalima.¹⁵¹ Pripremane su i kompozitne prevlake s CaP i Ag raspršivanjem plazme,¹⁷⁴ magnetronskim rasprašenjem,^{23,176} sol-gel metodom²⁴ i elektrokemijskom depozicijom.¹⁸¹ Pokazano je da takve prevlake poboljšavaju bioaktivnost implantata.^{165,174} Nedostatak kompozitnih prevlaka pripremljenih tim metodama može biti loša adhezija na površinu titanija.¹⁶⁷ Uz to, navedenim metodama nije moguće prevlačiti površine kompleksnih oblika, a kako neke od njih koriste visoke temperature i/ili povišeni ili sniženi tlak, nije ih moguće koristiti za ugradnju biomolekula.⁹¹ Iz navedenog razloga istražuje se biomimetska priprema kompozitnih prevlaka, koja omogućuje pripremu stabilnih bioaktivnih i multifunkcionalnih prevlaka koje mogu sadržavati biomolekule obzirom da su uvjeti pripreme bliski fiziološkim. Iako su u literaturi dostupna istraživanja pripreme prevlaka koje sadrže CaP i Ag, ne radi se o kompozitima već o zasebnim slojevima.^{23,182} Iz navedenog razloga u ovom radu je istražena biomimetska priprema kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra i biomakromolekula na površini titanija.

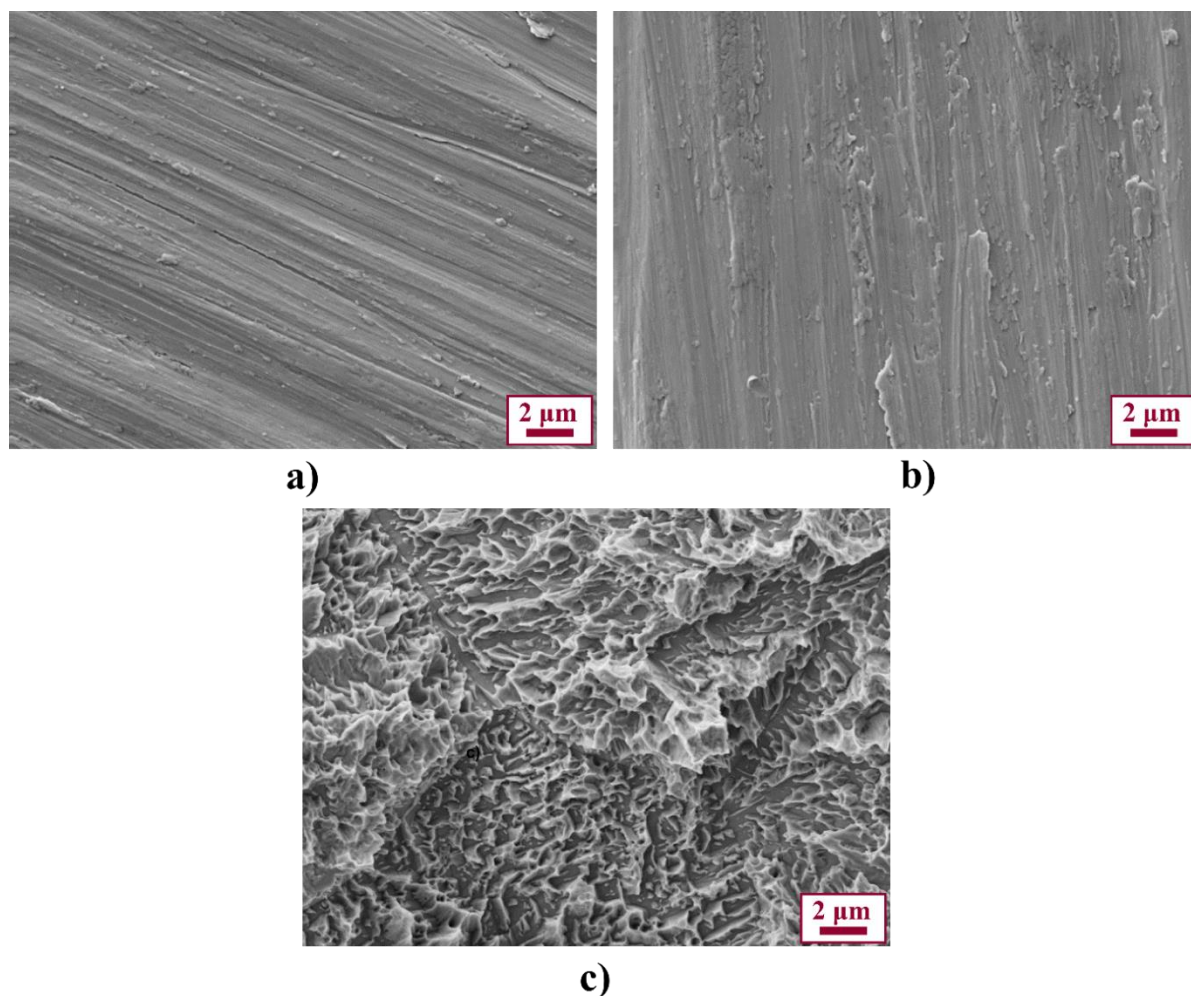
S obzirom na to da na nastajanje i svojstva biomimetskih CaP prevlaka mogu utjecati svojstva površine, ona je kemijski obrađivana. Korištene su dvije metode jetkanja kiselinom kako bi se mogao odrediti utjecaj hrapavosti i vlaženja na pripremu kompozitnih prevlaka različitog sastava. Dobivene prevlake karakterizirane su metodama poput pretražene elektronske mikroskopije, optičke profilometrije, određivanja kontaktnog kuta i slobodne energije površine, dok je sastav kompozita istražen energijski razlučujućom rendgenskom spektroskopijom i Ramanovom spektroskopijom.

4.4.1. Utjecaj kemijske obrade na svojstva površine titanija

Površine titanija obrađene su jetkanjem 20%-tnom vodenom otopinom HCl i smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ prema prethodno opisanim postupcima.^{15,17} Jetkanje klorovodičnom kiselinom blaga je metoda kemijske obrade površine te se u prijašnjim istraživanjima pokazalo da taj način ne utječe značajnije na mehanička svojstva materijala, ali povećava hrapavost njegove površine. Takva obrada površine rezultira boljom adhezijom i proliferacijom osteoblasta.¹⁵ Jetkanje smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ agresivnija je metoda obrade, koja uvelike mijenja površinska svojstva. Prijašnja istraživanja pokazala su značajne promjene u hrapavosti i svojstvima vlaženja koja doprinose boljoj adheziji CaP-a.¹⁷

Pretražnom elektronskom mikroskopijom vizualizirana je topografija različito obrađenih površina titanija (slika 42). Na mikrografiji neobrađene površine titanija (slika 42 a)) opažene su pravilne, paralelne linije, koje su posljedica poliranja uzorka. Topografija pločica titanija jetkanih 20%-tnom vodenom otopinom HCl (Ti_{HCl} , slika 42 b)) slična je onoj neobrađene površine titanija, ali su linije poliranja manje izražene. Navedeno ukazuje na to da jetkanje klorovodičnom kiselinom djelomično uklanja materijal na površini. S druge strane, jetkanje titanija smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ rezultira u potpuno drugačijoj topografiji površine. Pojavljuju se specifične neravnomjerno raspoređene strukture u obliku šiljaka (slika 42 c)), koji rezultiraju površinom hrapavom na mikrometarskoj razini, što je u skladu s prethodnim istraživanjima.^{17,274} Prijašnja istraživanja pokazala su da koncentracija i vrsta kiseline te vrijeme i temperatura jetkanja značajno utječu na svojstva i morfologiju obrađenog materijala. Pokazano je da tretiranje površine titanija smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ uzrokuje značajne promjene u svojstvima površine kao što su morfologija i hrapavost na mikrometarskoj razini.^{155,274} Površine obrađene na taj način imale su bolju biološku aktivnost u odnosu na one obrađene vodenom otopinom HCl.¹⁵⁵ Slična morfologija

dobivena je i jetkanjem samo 48 %-tnom vodenom otopinom sumporne kiseline, gdje se povećanjem vremena jetkanja povećavala dubina granice zrna te hrapavost površine.²⁷⁵ Nadalje, ustanovljeno je da jetkanje vodenom otopinom HF u prvom koraku, te smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ u drugom koraku, uzrokuje nastanak hrapave površine na mikrometerskoj skali, koja utječe na poboljšanu oseointegraciju.¹⁵⁵

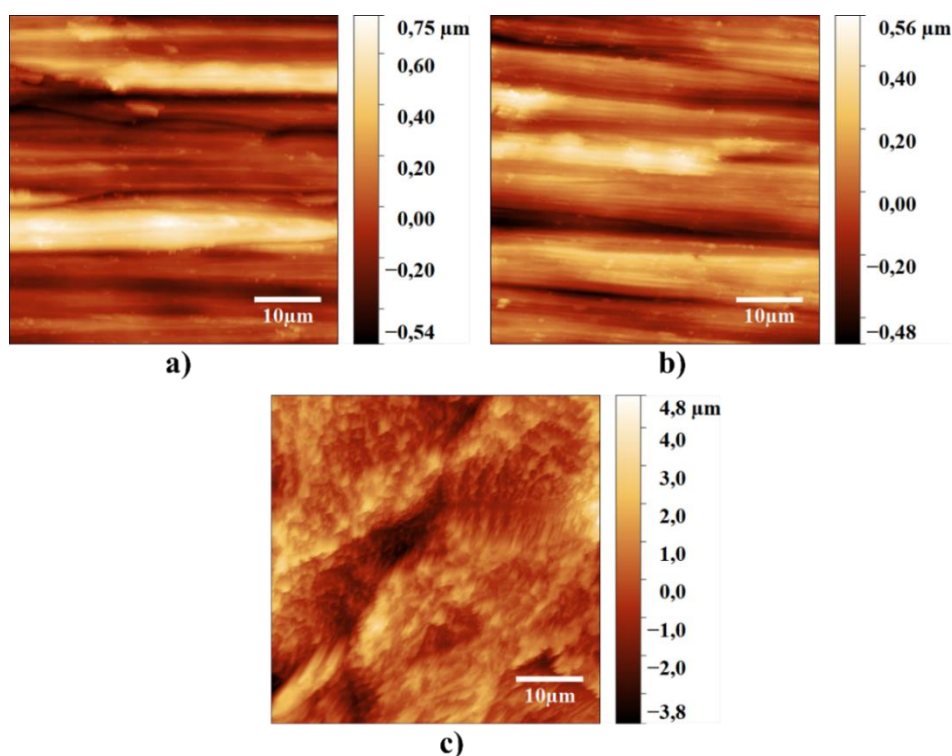


Slika 42. SEM mikrografija: **a)** neobrađene površine titanija, **b)** površine titanija jetkane 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi i **c)** površine titanija jetkane smjesom $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C

Adhezija i proliferacija stanica na površini implant materijala ovisi o raznim svojstvima, kao što su vlaženje, hrapavost, morfologija i tekstura. Hrapavost značajno utječe na svojstva vlaženja površine, a time i slobodnu energiju površine za koju je ustanovljeno kako je najvažniji parametar, koji određuje stupanj proliferacije stanica na površini.²⁷⁶ Pored toga, povećanjem hrapavosti površine dobiva se veća dostupna specifična površina za adheziju

čestica različitih oblika i veličina.²⁷⁷ Navedeno može utjecati na poboljšanje adhezije čestica, no može rezultirati i poboljšanom neželjenom adhezijom. Ranija istraživanja pokazala su da povećanje hrapavosti može utjecati na poboljšanu adheziju bakterija na površinu.²⁷⁸

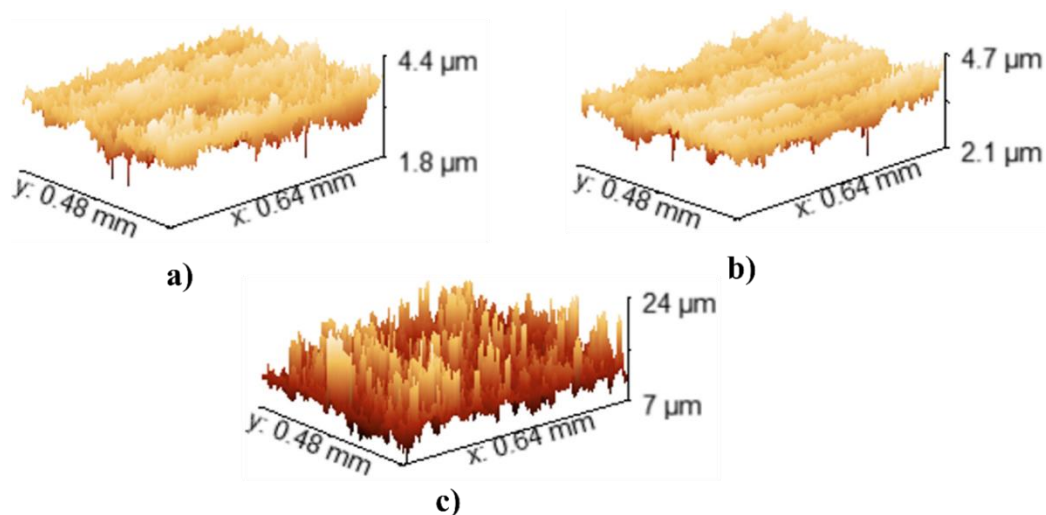
Kako bi se odredila prosječna površinska hrapavost različito obrađenih titanijevih površina, pripravljene površine karakterizirane su mikroskopijom atomskih sila i optičkom profilometrijom (slika 43, slika 44). Te dvije metode određivanja hrapavosti razlikuju se u principu mjerenja i veličini površine koja se karakterizira. AFM koristi beskontaktnu probu, dok optička profilometrija koristi elektromagnetsko zračenje u vidljivom području. AFM-om se karakterizira površina veličine $50\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ }\mu\text{m}$, a optičkom profilometrijom gotovo 10 puta veća površina ($0,48\text{ mm} \times 0,64\text{ mm}$). Kako bi se utvrdilo postoje li razlike u rezultatima tih dviju metoda (optička profilometrija i AFM), optičkom profilometrijom je prvo izmjerena hrapavost površine veličine jednake onoj mjerenoj AFM-om.



Slika 43. Topografija: **a)** neobrađene površine titanija, **b)** površine titanija jetkane 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi i **c)** površine titanija jetkane smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri $60\text{ }^\circ\text{C}$, oslikana mikroskopijom atomskih sila

Vrijednosti hrapavosti izmjerene različitim metodama na površini jednake veličine, za pojedinu površinu, malo se razlikuju (tablica 15). Slično je uočeno i za vrijednosti hrapavosti

neobrađene površine titanija i Ti_{HCl} . Hrapavost $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$ površina znatno je veća, oko 6 puta prema AFM mjerenjima te skoro 7 puta prema mjerenjima optičke profilometrije. Vrlo slične vrijednosti hrapavosti dobivene su u ranijim istraživanjima jetkanja površine titanija smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ pri 60 °C tijekom jednog sata.²⁷⁴ Pored toga, pokazano je da površina titanija jetkana 48 %-tnom vodenom otopinom H_2SO_4 pri 60 °C nakon jednog sata ima hrapavost oko 4 puta veću u odnosu na početnu.²⁷⁵ Jetkanjem površine titanija smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ nastaje površina hrapavosti 5 do 8 puta veće u odnosu na neobrađenu površinu, što ukazuje na sinergijski utjecaj HCl , H_2SO_4 i temperature na povećanje hrapavosti. Dvosmjerna ANOVA pokazuje da rezultati mjerenja dobivenih AFM-om i optičkom profilometrijom dobiveni za jednaku veličinu površine, nisu statistički značajno različiti. Pored toga, ne postoji statistički značajna razlika između rezultata hrapavosti $\text{Ti}_{\text{neobrađ.}}$ i Ti_{HCl} što upućuje na to da jetkanje 20%-tnom vodenom otopinom HCl ne utječe značajno na hrapavost površine titanija. S druge strane utvrđena je statistički značajna razlika, kao posljedica obrade površine, za $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$, ali pored toga statistički je značajna razlika hrapavosti dobivene AFM-om te S_a dobivene optičkom profilometrijom za veću analiziranu površinu $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$. Navedeno upućuje na veću hrapavost na većoj skali, no kako se s AFM može mjeriti samo manja površina, ona nije utvrđena tom metodom. Za očekivati je da je na deset puta većoj površini, kakva se analizira optičkom profilometrijom, vjerojatnija pojava većih nepravilnosti, što i rezultira većom hrapavošću.

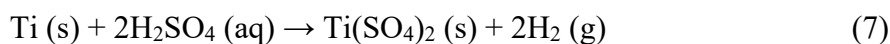
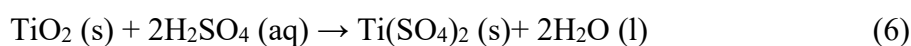


Slika 44. 3D topografija **a)** neobrađene površine titanija, **b)** površine titanija jetkane 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi i **c)** površine titanija jetkane smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C određena optičkom profilometrijom

Tablica 15. Prosječna površinska hrapavost (S_a), određena mikroskopijom atomskih sila (AFM) i optičkom profilometrijom ($n = 3$), neobrađene površine titanija ($Ti_{neobrađ.}$), površine titanija jetkane 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površine titanija jetkane smjesom vodenih otopina H_2SO_4/HCl ($V(H_2SO_4) : V(HCl) : V(H_2O) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($Ti_{H_2SO_4/HCl}$).

Površina uzorka	$S_a / \mu m$		
	AFM	Optička profilometrija	
	(50 x 50) μm	(50 x 50) μm	(0,48 x 0,64) mm
$Ti_{neobrađ.}$	$0,137 \pm 0,059$	$0,150 \pm 0,031$	$0,191 \pm 0,007$
Ti_{HCl}	$0,133 \pm 0,021$	$0,179 \pm 0,077$	$0,198 \pm 0,011$
$Ti_{H_2SO_4/HCl}$	$0,788 \pm 0,099$	$1,134 \pm 0,399$	$1,305 \pm 0,056$

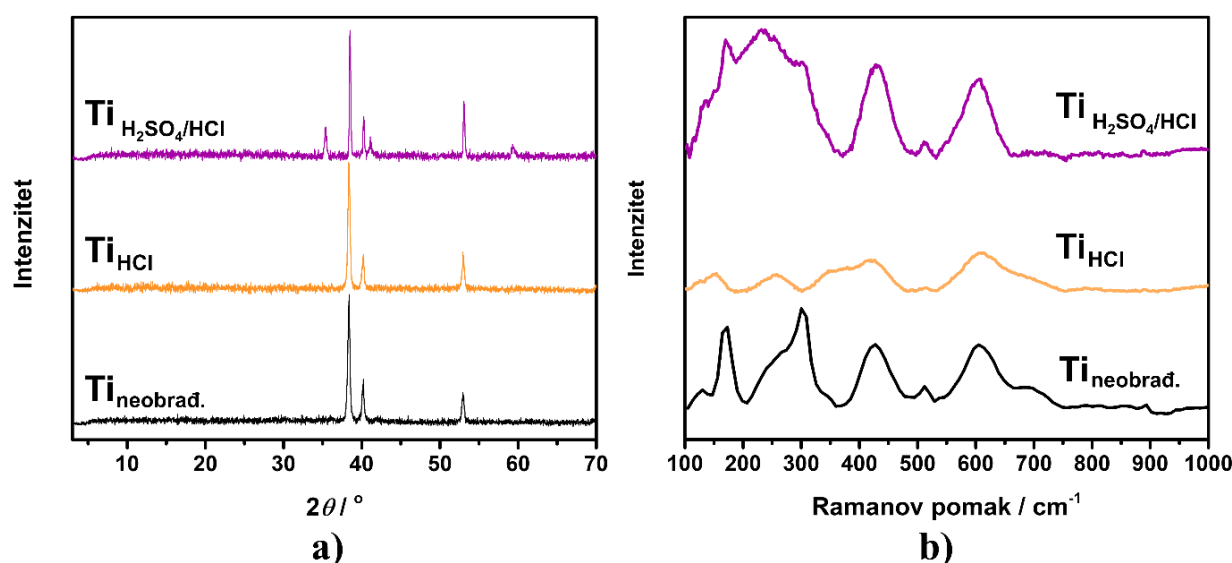
Prethodna istraživanja^{275,279} su pokazala da jetkanjem vodenom otopinom sumporne kiseline u prvom koraku dolazi do otapanja pasivnog sloja TiO_2 (jdba. 6), nakon čega, prilikom jetkanja smjesom vodenih otopina H_2SO_4/HCl , dolazi do reakcije titanija sa sumpornom kiselinom (jdba. 7). Navedenom reakcijom nastaje vodik koji može reagirati s titanijem i dati titanijev hidrid (jdba. 8):²⁷⁵



Stvaranje sloja hidrida na površini implantata u ranijim istraživanjima dovelo je do bržeg zacjeljivanja i nastanka stabilnije veze kost-implantat u *in vivo* eksperimentima na zečevima.²⁸⁰ S druge strane, nastanak hidrida i apsorpcija vodika može dovesti do narušavanja mehaničkih svojstava titanija.^{280,281} Pri jetkanju vodenom otopinom HCl odvijaju se samo prve dvije reakcije, ali ne nastaje TiH_2 .²⁸¹

Difraktogrami obrađenih površina titanija (slika 45 a)) razlikuju se zbog različitih reakcija koje se odvijaju na površini. U svim difraktogramima prisutni su difrakcijski maksimumi pri 2θ 38,4°, 40,2° i 53,1°. Navedeni maksimumi odgovaraju difrakciji na (200), (101) i (102) ravninama u heksagonskoj kristalnoj strukturi titanija.²⁸² U difraktogramu $Ti_{H_2SO_4/HCl}$, pored navedenih, prisutni su maksimumi pri 2θ 35,4° 40,9° i 59,6° koji odgovaraju

difrakciji rendgenskog zračenja na ravninama titanijevog hidrida.^{275,279} Maksimum pri $35,4^\circ$ odgovara difrakciji na (111) ravnini titanijevog hidrida, pri $41,1^\circ$ može biti superpozicija difrakcija ili difrakcija na jednoj od ravnina titanijevog hidrida, (002), (200) i (110). Maksimum pri 2θ $59,6^\circ$ također odgovara ili superpoziciji ili difrakciji na jednoj od ravnina titanijevog hidrida, (220) i (200). Vrlo sličan sastav dobiven je u ranijem istraživanju gdje je površina jetkana 48%-tnom vodenom otopinom sumpornom kiselinom tijekom jednog sata pri 60°C .²⁷⁵



Slika 45. a) Difraktogrami i **b)** Ramanovi spektri neobrađene površine titanija ($\text{Ti}_{\text{neobrađ.}}$), površine titanija jetkane 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površine titanija jetkane smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60°C ($\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$).

U Ramanovim spektrima vidljive su vrpce karakteristične za različite faze titanijevog dioksida. (slika 45 b)). U svim spektrima prisutne su vrpce vibracija karakterističnih za rutil, pri 235 cm^{-1} koja odgovara multifononskoj vibraciji, pri 440 cm^{-1} koja odgovara E_g načinu vibracije i pri 608 cm^{-1} koja odgovara A_{1g} načinu vibracije. Nadalje, vrpca pri 513 cm^{-1} , prisutna u svim spektrima, odgovara E_g načinu vibriranja anatas faze titanijevog dioksida.^{283–285} U spektrima $\text{Ti}_{\text{neobrađ.}}$ i $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$ prisutne su vrpce pri 310 cm^{-1} i 130 cm^{-1} , koje odgovaraju vibracijama brukita te vrpca pri 180 cm^{-1} , koja potječe od vibracije $\text{TiO}_2(\text{B})$. U spektru Ti_{HCl} prisutne su vrpce pri 152 cm^{-1} i 360 cm^{-1} koje odgovaraju vibracijama brukita.^{284,286} Jetkanjem površine titanija nisu značajno promijenjene faze titanijevog

dioksida, iako su u spektru Ti_{HCl} opažene vrpce brukita koje nisu prisutne u spektrima druge dvije površine. Pored toga u spektru Ti_{HCl} nije opažena vrpca koja potječe od $TiO_2(B)$. U difraktogramima različito obrađenih površina titanija nisu opaženi maksimumi TiO_2 , što može biti posljedica premalog udjela ili pretankog sloja koji XRD ne može detektirati. EDX mapiranjem potvrđena je prisutnost titanijevog oksida (slika D7), što je u skladu s rezultatima Ramanove spektroskopije.

Već je ranije spomenuto da su svojstva vlaženja, te slobodna energija površine (SFE) najvažniji parametri o kojima ovisi adhezija osteoblasta na površinu implantata, a time i integracija implantata u okolno tkivo i na kraju sama učinkovitost biomaterijala. Iako je hrapavost važan parametar, pokazano je da je SFE važnija karakteristika implantata.²⁷⁶ Pored toga, ustanovljeno je da se s povećanjem hidrofilnosti površine povećava proliferacija stanica na površini.²⁸⁷ Kako bi se odredio utjecaj obrade površine titanija na svojstva vlaženja i slobodnu energiju površine, izmjeren je kontaktni kut vode i dijodometana (tablica 16). Neobrađene površine titanija i površine obrađene vodenom otopinom HCl blago su hidrofilne, obzirom da je njihov kontaktni kut manji od 90° . Te dvije površine, uz slične vrijednosti kontaktnog kuta, imaju i slične vrijednosti slobodne energije. Suprotno tome, površina jetkana smjesom vodenih otopina H_2SO_4/HCl je hidrofobna. U ranijim istraživanjima jetkanja površine titanija smjesom vodenih otopina H_2SO_4/HCl pokazano je povećanje hidrofilnosti jetkane površine u prvih pola sata nakon jetkanja. Nakon pola sata, površina je postala hidrofobnija zbog vezanja raznih kontaminanata iz zraka.²⁷⁴ Navedeni rezultat kontaktnog kuta za $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ površinu može biti posljedica kontaminacije, obzirom da kontaktni kut nije mjeran na svježe pripremljenim uzorcima. Kako je slobodna energija površine pokazatelj površinske napetosti krute površine, a ne pokazatelj topografije površine, važno je određivati je na glatkim površinama. Hrapavost značajno utječe na vlaženje, pa tako i na rezultate računa SFE, zbog čega je navedene vrijednosti za hrapavije površine potrebno oprezno tumačiti.²⁸⁸ Ukupna slobodna energije površine $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ manja je od one za Ti i Ti_{HCl} . Također je za $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ polarna komponenta SFE zanemarivo mala. Polarne komponente drugih dviju površina nešto su veće, što ukazuje na to da su te površine polarnije u odnosu na $Ti_{H_2SO_4/HCl}$. U ranijim istraživanjima proliferacije stanica ustanovljeno je da smanjenje SFE utječe na bolju proliferaciju stanica osteoblasta na površini titanijskog implantata. Točnije, polarna komponenta je ključna u razmatranju proliferacije jer njeno smanjenje utječe na poboljšanu proliferaciju stanica.²⁸⁸

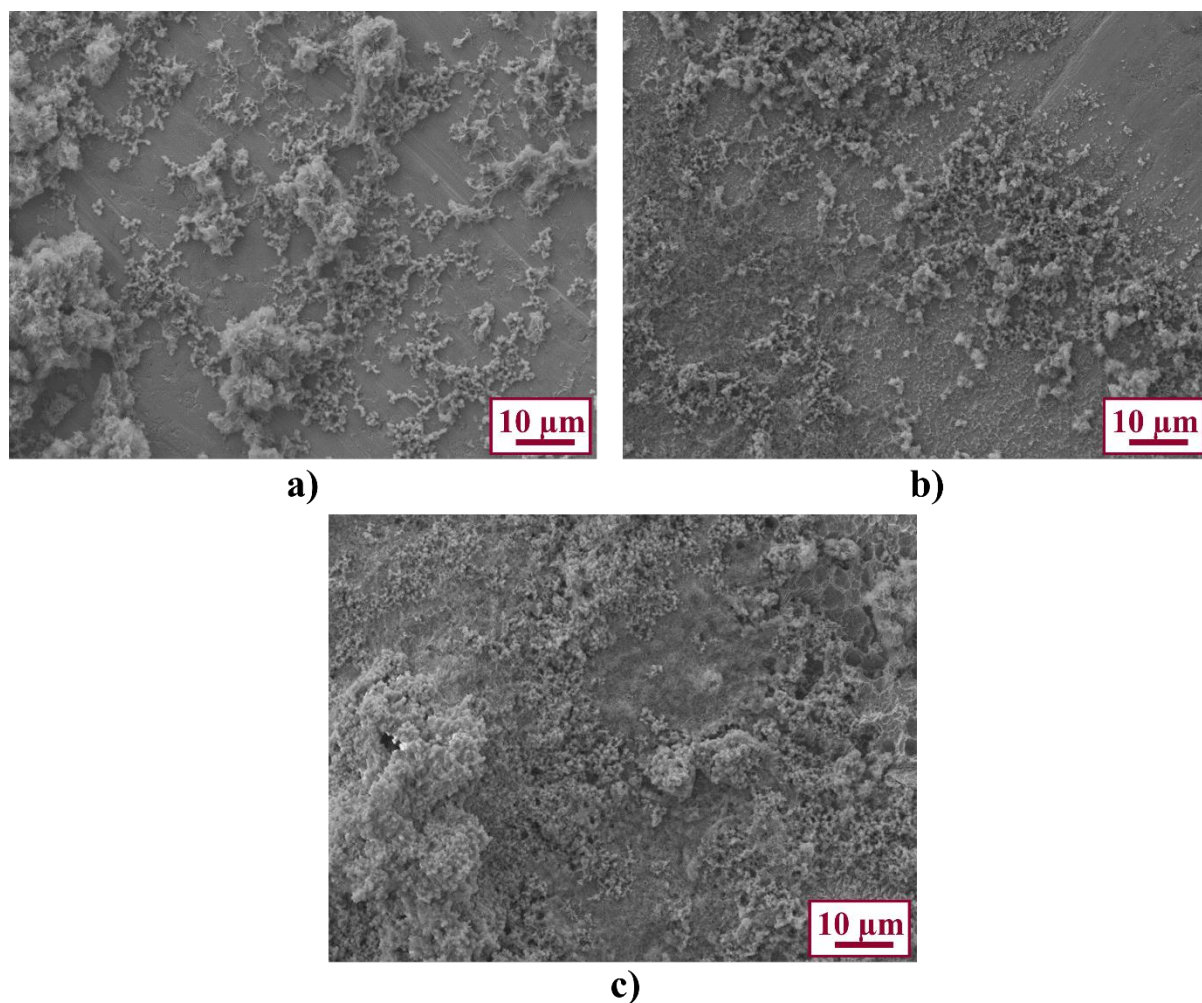
Tablica 16. Kontaktni kut (C_a) i slobodna energija površine (SFE) neobrađene površine titanija ($Ti_{neobrađ.}$), površine titanija jetkane 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površine titanija jetkane smjesom vodenih otopina H_2SO_4/HCl ($V(H_2SO_4) : V(HCl) : V(H_2O) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($Ti_{H_2SO_4/HCl}$).

Podloga	$C_a / ^\circ$		SFE / (mN m ⁻¹)		
	Voda	Dijodometan	Disperzna komponenta	Polarna komponenta	Ukupna
$Ti_{neobrađ.}$	74,1 ± 5,6	39,9 ± 2,8	39,7 ± 1,4	5,6 ± 2,3	45,3 ± 3,7
Ti_{HCl}	77,3 ± 2,5	38,7 ± 1,7	40,3 ± 0,8	4,3 ± 0,9	44,6 ± 1,8
$Ti_{H_2SO_4/HCl}$	120,5 ± 3,5	65,5 ± 8,3	25,4 ± 4,8	0,6 ± 0,7	26,0 ± 5,4

4.4.2. Karakterizacija prevlaka kalcijevih fosfata na modificiranim površinama titanija

Kako bi se mogao odrediti utjecaj AgNP-a i biomakromolekula na pripremu i svojstva kompozitnih prevlaka, u prvom koraku pripremljene su prevlake kalcijevih fosfata na različito obrađenim površinama titanija bez dodatka aditiva. Morfologija navedenih prevlaka promatrana je SEM-om, sastav je određen EDX-om i Ramanovom spektroskopijom, topografija prevlaka optičkom profilometrijom, dok je utjecaj prevlaka kalcijevih fosfata na vlaženje površine istraživao mjerenjem kontaktnog kuta i određivanjem slobodne energije površine.

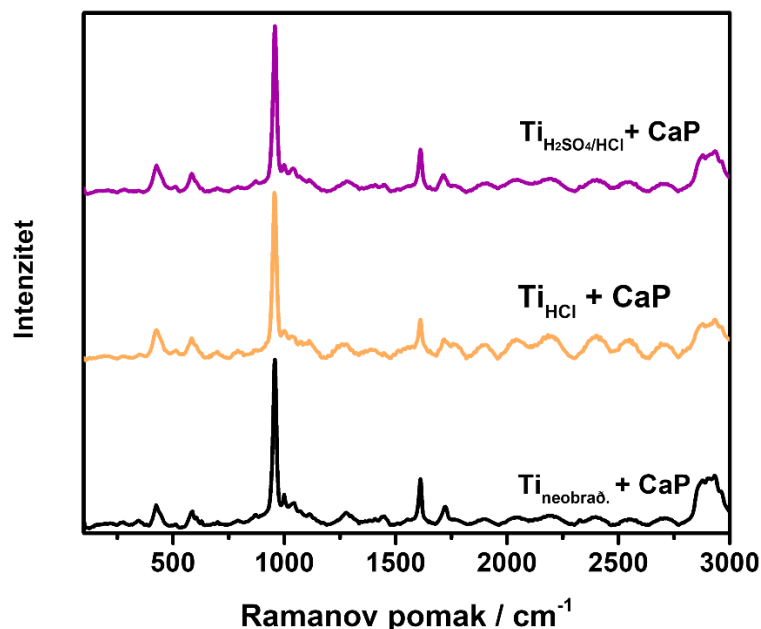
SEM mikrofografije CaP prevlaka na $Ti_{neobrađ.}$ prikazuju da nastali CaP ne prekrivaju cijelu površinu (slika 46 a)). Nastali su sferični agregati listićavih kristala različitih veličina, karakteristični za apatitnu fazu.²³⁵ Površina između depozita nije prekrivena s CaP, što uz morfologiju ukazuje na to da je CaP nastao transformacijom i rastom iz prvotno adsorbiranih čestica ACP-a. To također znači da netretirana površina titanija nije sposobna inducirati nastajanje CaP. Iako je slična morfologija CaP-a vidljiva i u slučaju Ti_{HCl} površina, nastali agregati su manji, ravnomjernije raspoređeni po površini te je između njih vidljiv i tanak sloj CaP-a nastao na površini (slika 46 b)). Navedeno ukazuje na to da Ti_{HCl} površina može, u manjoj mjeri, inducirati nastajanje CaP-a. Najbolja prekrivenost ostvarena je na $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ površini (slika 46 c)), što ukazuje na to da promijenjena svojstva površine, veća hrapavost, hidrofobnost i manja slobodna energija površine, pogoduju pripremi CaP prevlaka biomimetskom *in situ* metodom. EDX analizom potvrđena je prisutnost kalcijevih fosfata na svim analiziranim područjima (slika D8).



Slika 46. SEM mikrografije prevlaka kalcijevih fosfata na **a)** neobrađenoj površini titanija, **b)** površini titanija jetkanom 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi i **c)** površini titanija jetkanom smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C

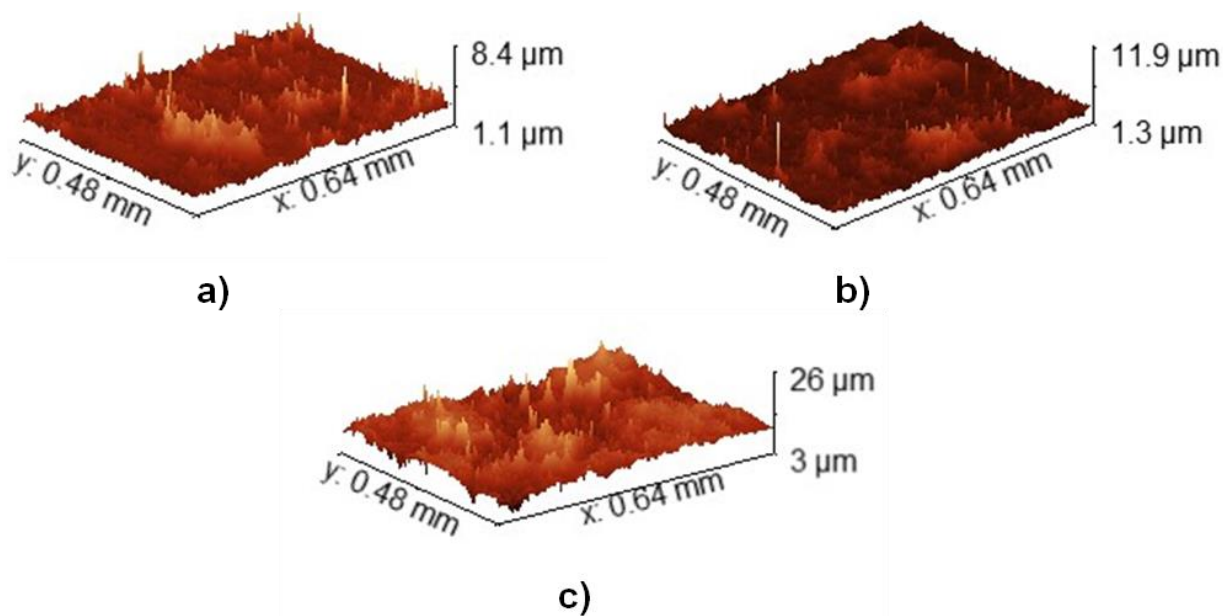
Ramanovom spektroskopijom analiziran je sastav pripremljenih prevlaka na različito obrađenim površinama titanija (slika 47). U sva tri Ramanova spektra opažene su vrpce pri 957 cm^{-1} (ν_1 simetrično istezanje veze P - O u PO_4^{3-}), pri 585 cm^{-1} i 425 cm^{-1} (ν_4 i ν_2 savijanje veza P - O - P u PO_4^{3-}), pri 1003 cm^{-1} (ν_1 istezanje veze P - O u HPO_4^{2-}) i pri 1040 cm^{-1} (ν_3 simetrično istezanje veze P - O u PO_4^{3-}).²⁴⁴ Navedene vrpce karakteristične su za apatitne faze kalcijevih fosfata, HA, CaDHA i OCP.^{244,289} U ranijim istraživanjima taloženja kalcijevih fosfata na površini titanija obrađenoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ sastav prevlake dobivene nakon 16 sati *in situ* prevlačenja je smjesa CaDHA i OCP-a.⁹¹ U Ramanovom spektru je pored navedenih prisutna i vrpca pri 1640 cm^{-1} koja odgovara istezanju veze C = O,²⁹⁰ što znači da je došlo do adsorpcije CO_2 iz zraka.²⁹¹ U

Ramanovim spektrima nisu opažene vrpce titanija, no kako je analiza ciljano provođena na dijelovima s većim agregatima CaP-a, to je bilo i očekivano.



Slika 47. Ramanovi spektri prevlaka kalcijevih fosfata (CaP) na neobrađenoj površini titanija ($Ti_{neobrađ.}$), površini titanija jetkanjoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanjoj smjesom H_2SO_4/HCl ($V(H_2SO_4) : V(HCl) : V(H_2O) = 1 : 1 : 1$) ($Ti_{H_2SO_4/HCl}$)

Optičkom profilometrijom vizualizirana je topografija prevlaka kalcijevih fosfata na različito obrađenim površinama titanija (slika 48). Na 3D rekonstrukcijama opaženi su nehomogeni slojevi kalcijevih fosfata na sve tri vrste površine titanija. Prosječna površinska hrapavost (S_a) izračunata na temelju tri različite lokacije na svakom uzorku iznosi $0,50 \mu m \pm 0,34 \mu m$ za neobrađenu površinu Ti, $0,62 \mu m \pm 0,27 \mu m$ za Ti_{HCl} i $1,57 \mu m \pm 0,52 \mu m$ za $Ti_{H_2SO_4/HCl}$. Opaženo je da su hrapavosti $Ti_{neobrađ.}$ i Ti_{HCl} i nakon prevlačenja s CaP međusobno vrlo slične, ali oko tri puta veće u odnosu na odgovarajuće površine bez CaP prevlake (tablica 15). Navedeno ukazuje na nastanak sloja CaP prevlake neuniformne debljine. Razlike mogu biti posljedica nastanka većih agregata CaP-a na pojedinim lokacijama, dok međuprostor ne sadrži CaP, što je u skladu sa SEM rezultatima. Slični rezultati dobiveni su u ranijim istraživanjima gdje je taloženjem CaP-a iz SBF-a dobiven porozni sloj CaP-a prosječne hrapavosti oko $0,57 \mu m$.²⁹² Prosječna hrapavost $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ s CaP prevlakom veća je u odnosu na druge dvije površine te nešto veća u odnosu na $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ bez CaP prevlake ($1,30 \mu m \pm 0,56 \mu m$). Navedeno upućuje na stvaranje sloja uniformnije debljine na površini.



Slika 48. 3D topografije prevlaka kalcijevih fosfata na **a)** neobrađenoj površini titanija, **b)** površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi i **c)** površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C određene optičkom profilometrijom

Utjecaj kalcijevih fosfata na vlaženje različito obrađene površine titanija istražen je mjerenjem kontaktnog kuta i računanjem slobodne energije površine (tablica 17). Nanošenje CaP-a na različite površine titanija rezultiralo je povećanjem njihove hidrofilnosti, u skladu s prethodnim istraživanjima.²⁹³ U slučaju neobrađene površine titanija i $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$, prevlačenjem s CaP značajno je smanjen kontaktni kut s diiodmetanom, za razliku od Ti_{HCl} površine na kojoj je ostao gotovo nepromijenjen. I nakon nanošenja CaP-a, glavni doprinos ukupnoj slobodnoj energiji površine imala je disperzna komponenta. U istraživanjima povezanosti komponenata SFE i jačine adhezije stanica, ustanovljeno je da SFE, točnije polarna komponenta SFE utječe na jačinu adhezije stanica. Smanjenje SFE kroz smanjenje polarne komponente doprinosi boljoj adheziji stanica. Takva poveznica nije ustanovljena za disperznu komponentu i jačinu adhezije stanica.²⁸⁸ Vrijednosti SFE prevlaka CaP-a na obrađenim površinama pokazuju da prevlačenje s CaP ne utječe na povećanje polarne komponente SFE što bi potencijalno moglo pogodovati adheziji stanica i boljoj oseointegraciji takvog implant materijala. S druge strane, prevlačenjem neobrađene površine titanija CaP-om, dolazi do povećanja polarne komponente, što ukazuje na važnu ulogu obrade površine.

Tablica 17. Kontaktni kut (C_a) i slobodna energija površine (SFE) prevlaka kalcijevih fosfata na neobrađenoj površini titanija ($Ti_{neobrad.}$), površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanoj smjesom H_2SO_4/HCl ($V(H_2SO_4) : V(HCl) : V(H_2O) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($Ti_{H_2SO_4/HCl}$) prevučениh kalcijevim fosfatima.

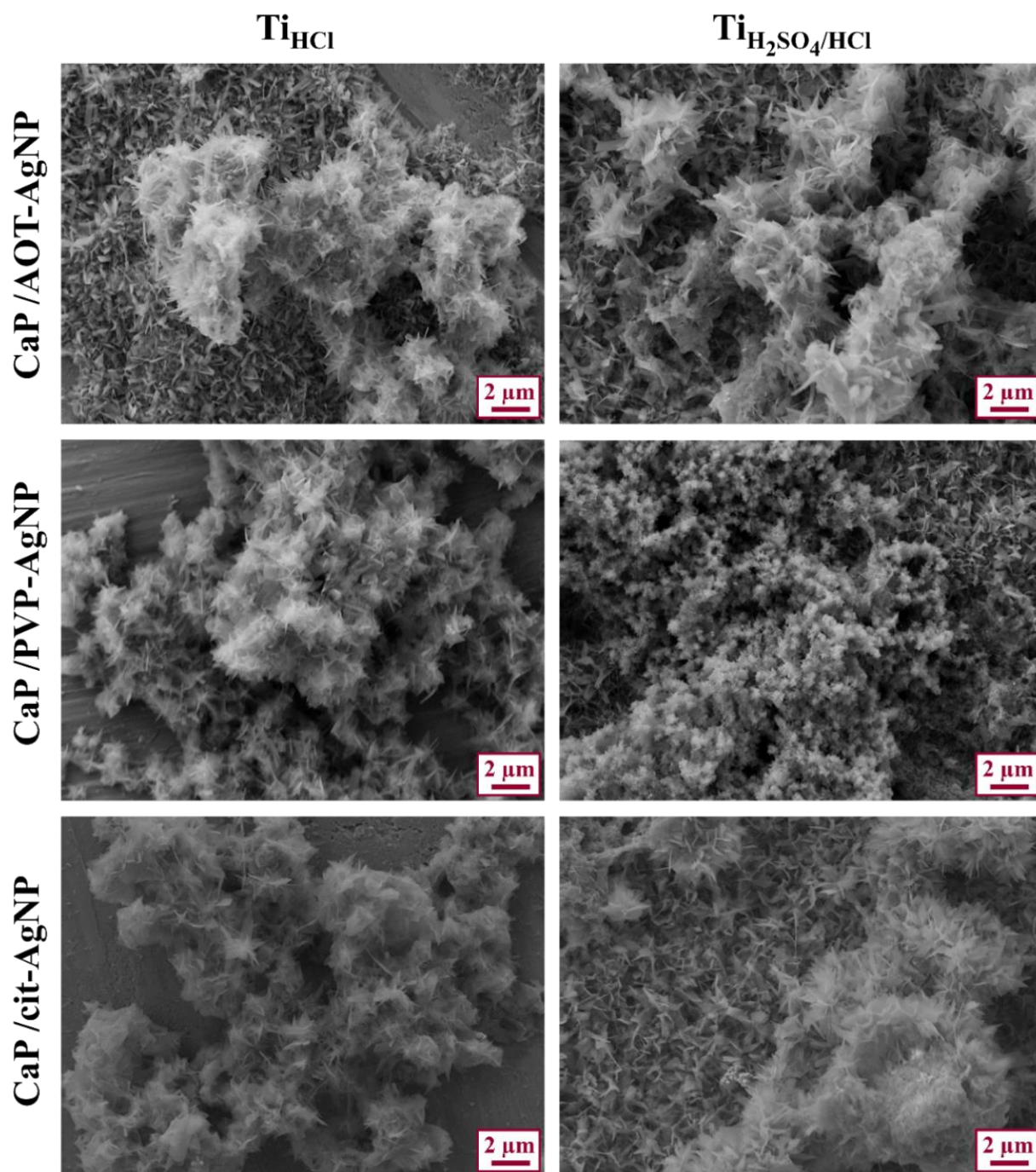
Podloga	$C_a / ^\circ$		SFE / $mN m^{-1}$		
	Voda	Dijodometan	Disperzna komponenta	Polarna komponenta	Ukupna
$Ti_{neobrad.}$	$60,9 \pm 2,3$	$12,0 \pm 2,1$	$49,7 \pm 2,0$	$8,8 \pm 1,9$	$58,5 \pm 2,1$
Ti_{HCl}	$57,5 \pm 6,5$	$39,7 \pm 0,6$	$39,8 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,9$	$44,6 \pm 1,1$
$Ti_{H_2SO_4/HCl}$	$80,7 \pm 4,2$	$41,5 \pm 1,0$	$38,8 \pm 0,5$	$2,6 \pm 9,0$	$41,4 \pm 9,6$

4.4.3. Karakterizacija prevlaka kalcijevih fosfata i nanočestica srebra različite površinske modifikacije na obrađenim površinama titanija

Prevlake kompozita kalcijevih fosfata i nanočestica srebra različite površinske modifikacije pripremljene su na dvije različito obrađene površine titanija, jetkane različitim kiselinama. Navedene obrade površine korištene su već ranije u literaturi te je ustanovljeno da pogoduju adheziji i proliferaciji stanica,¹⁵ a pokazano je i da pogoduju pripremi CaP prevlaka.¹⁷ To je u skladu s rezultatima opisanom u poglavlju 4.4.2 koji pokazuju da je prekrivenost s CaP obrađenih površina titanija bila bolja od prekrivenosti neobrađene površine. S obzirom da biomimetska priprema kompozitnih prevlaka CaP/AgNP na kemijski obrađenim površinama titanija nije ranije istražena, navedene CaP/AgNP prevlake karakterizirane su u svrhu određivanja utjecaja obrade površine, odnosno promjene u svojstvima površine na biomimetsku pripremu i svojstva CaP/AgNP prevlaka. Morfologija dobivenih prevlaka vizualizirana je SEM-om, sastav im je određen EDX-om i Ramanovom spektroskopijom, te je određen kontaktni kut vode i dijodometana, kao i izračunata slobodna energija površine.

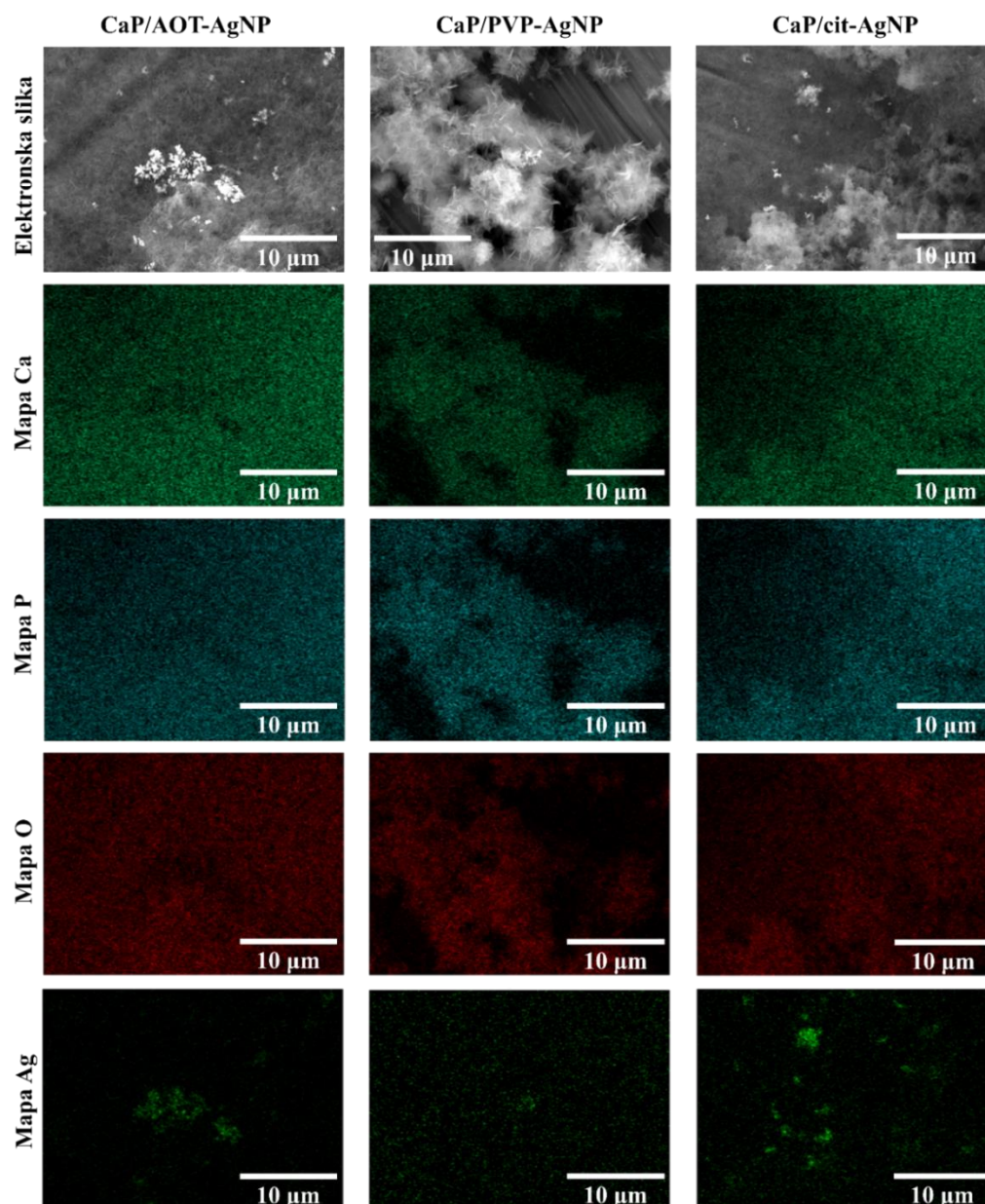
Iz SEM mikrografija kompozitnih prevlaka (slika 49) vidljivo je da su Ti_{HCl} površine samo djelomično prekrivene kompozitom. U slučaju PVP-AgNP-a i cit-AgNP-a uočeni su samo povezani sferični agregati listićavih kristala karakterističnih za apatitnu fazu.²³⁵ Takva morfologija ukazuje na to da je apatitna faza nastala samo na prethodno adsorbiranim česticama ACP-a. Za razliku od te dvije prevlake, u slučaju CaP/AOT-AgNP prevlake mjestimično su opaženi i nepravilni kristali CaDHA nastali na površini. Za razliku od Ti_{HCl} površine, $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ površine potpuno su prekrivene prevlakama, pri čemu su vidljivi i

povezani sferični agregati listićavih kristala CaDHA i nepravilni kristali nastali na površini, što potvrđuje sposobnost tako obrađene površine da inducira nastajanje CaP-a.



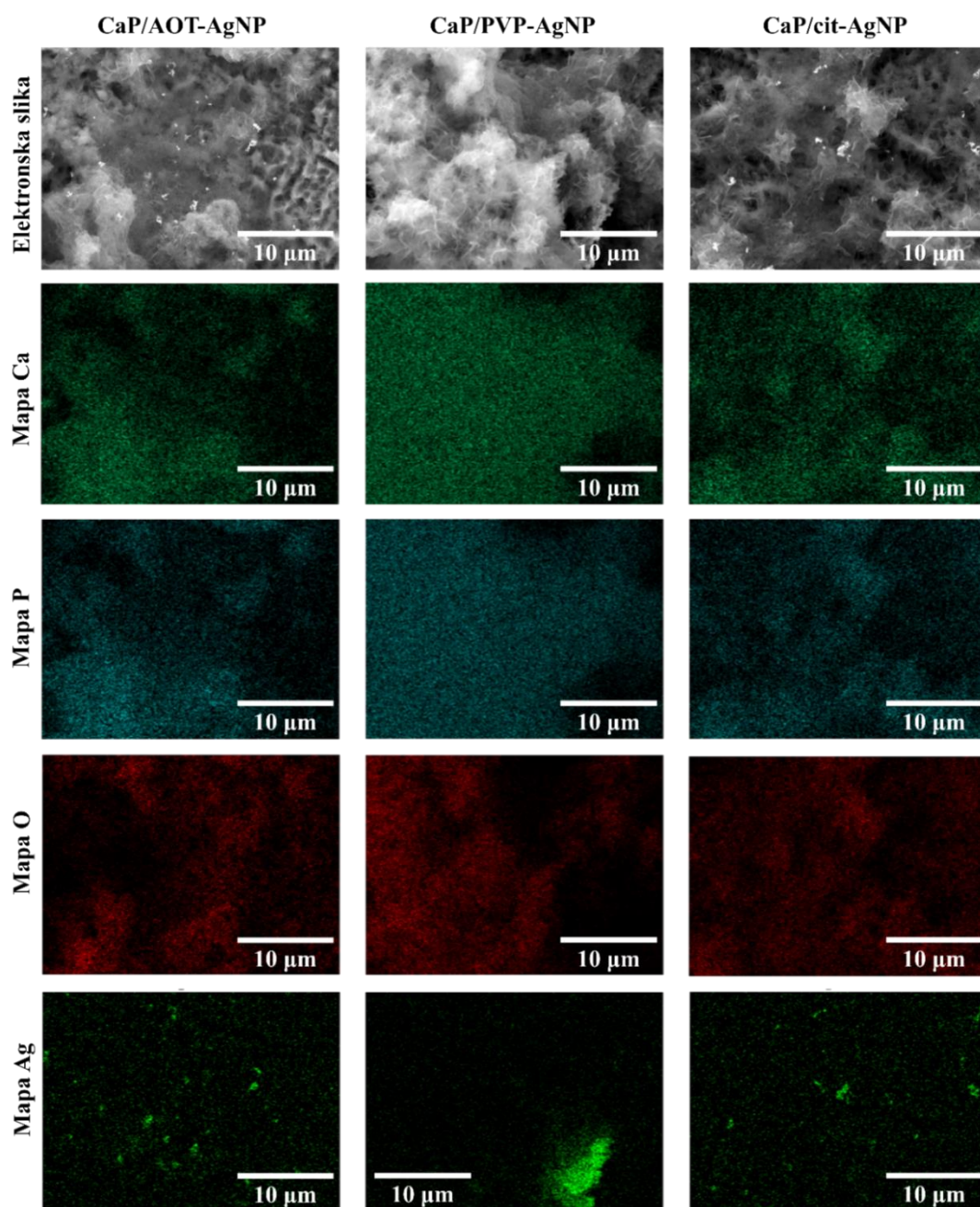
Slika 49. SEM mikrografije kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom ($\text{CaP}/\text{AOT-AgNP}$), poli(vinilpirolidonom) ($\text{CaP}/\text{PVP-AgNP}$) i trinatrijevim citratom ($\text{CaP}/\text{cit-AgNP}$) na površini titaniya jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titaniya jetkanoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60°C ($\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$).

Na SEM mikrografijama vidljiva je i značajna razlika u veličini sferičnih agregata kristala CaDHA u ovisnosti o primijenjenim AgNP. Najveći agregati nastali su u prisustvu cit-AgNP-a, a najmanji u prisutnosti PVP-AgNP-a. Navedeno je u skladu s ranije dobivenim rezultatima za kompozite CaP/AgNP, gdje u prisustvu cit-AgNP-a nastaju sferični agregati veće prosječne veličine u odnosu na kontrolni sustav, a manje prosječne veličine u prisustvu PVP-AgNP-a.



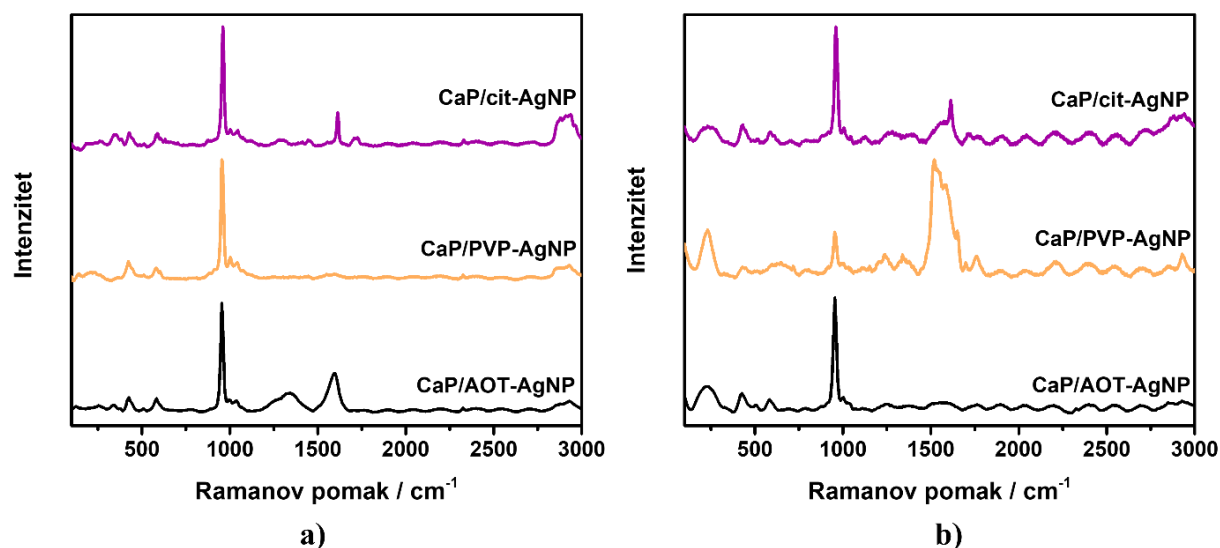
Slika 50. EDX mape kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi.

EDX analizom prevlaka na različito obrađenim površinama titanija (slika 50, slika 51) potvrđena je prisutnost kalcijevih fosfata i nanočestica srebra u prevlakama, pri čemu su nanočestice ravnomjerno raspoređene po površini uz prisutnost manjih agregata.



Slika 51. EDX mape kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP) na površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C.

Ramanovi spektri svih prevlaka (slika 52) sadrže vrpce karakteristične za fosfate pri 430 cm^{-1} i 580 cm^{-1} , koje odgovaraju savijanju veze P - O - P u PO_4^{3-} (ν_2 i ν_4), pri 960 cm^{-1} (ν_1 simetrično istezanje veze P - O u PO_4^{3-}), pri 1010 cm^{-1} (ν_1 istezanje veze P - O u HPO_4^{2-}) i pri 1040 cm^{-1} (ν_2 asimetrično istezanje veze PO - P u PO_4^{3-}). Navedene vrpce karakteristične su za apatitne faze CaP.^{244,289} Prisutnost vrpce pri 1010 cm^{-1} ukazuje na prisutnost OCP-a u prevlakama,²⁸⁹ no mali intenzitet vrpce ukazuje na njegov manji udio u smjesi. U spektrima CaP/AOT-AgNP i CaP/cit-AgNP prevlaka na Ti_{HCl} površini, također je opažena vrpca slabog intenziteta pri 354 cm^{-1} , koja odgovara savijanju veze O - P - O u HPO_4^{2-} (ν_2), karakteristična za OCP.²⁴⁴ Na temelju toga može se zaključiti da se prevlake sastoje od smjesa CaDHA i OCP, u kojima je OCP prisutan u malom udjelu.



Slika 52. Ramanovi spektri kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP) na površini titanija jetkanoj **a)** 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi i **b)** smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri $60\text{ }^\circ\text{C}$

Uz fosfatne vrpce, u spektrima prevlaka pripremljenih na Ti_{HCl} površini, prisutne su i vrpce pri 1302 cm^{-1} i 1605 cm^{-1} koje odgovaraju istezanju karboksilne skupine prisutne u stabilizatorima AOT i citratu.^{290,294} Navedene vrpce mogu biti i posljedica istezanja C = O veze ugljikovog dioksida ako je došlo do njegove adsorpcije iz zraka.²⁹¹ U svim spektrima prisutna je široka vrpca pri 2910 cm^{-1} koja odgovara istezanju CH_2 skupina. Nadalje, u spektru CaP/PVP-AgNP prevlake pripremljene na $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$ površini opažene su vrpce pri

1550 cm^{-1} karakteristične za istezanja hetero prstena PVP-a i vrpca pri 1649 cm^{-1} može se pripisati ili istezanju ketonske skupine PVP-a ili istezanju veze $\text{C} = \text{O}$ u slučaju adsorpcije ugljikovog dioksida iz zraka.²⁹⁰ U spektrima nisu opažene vrpce karakteristične za titanij.

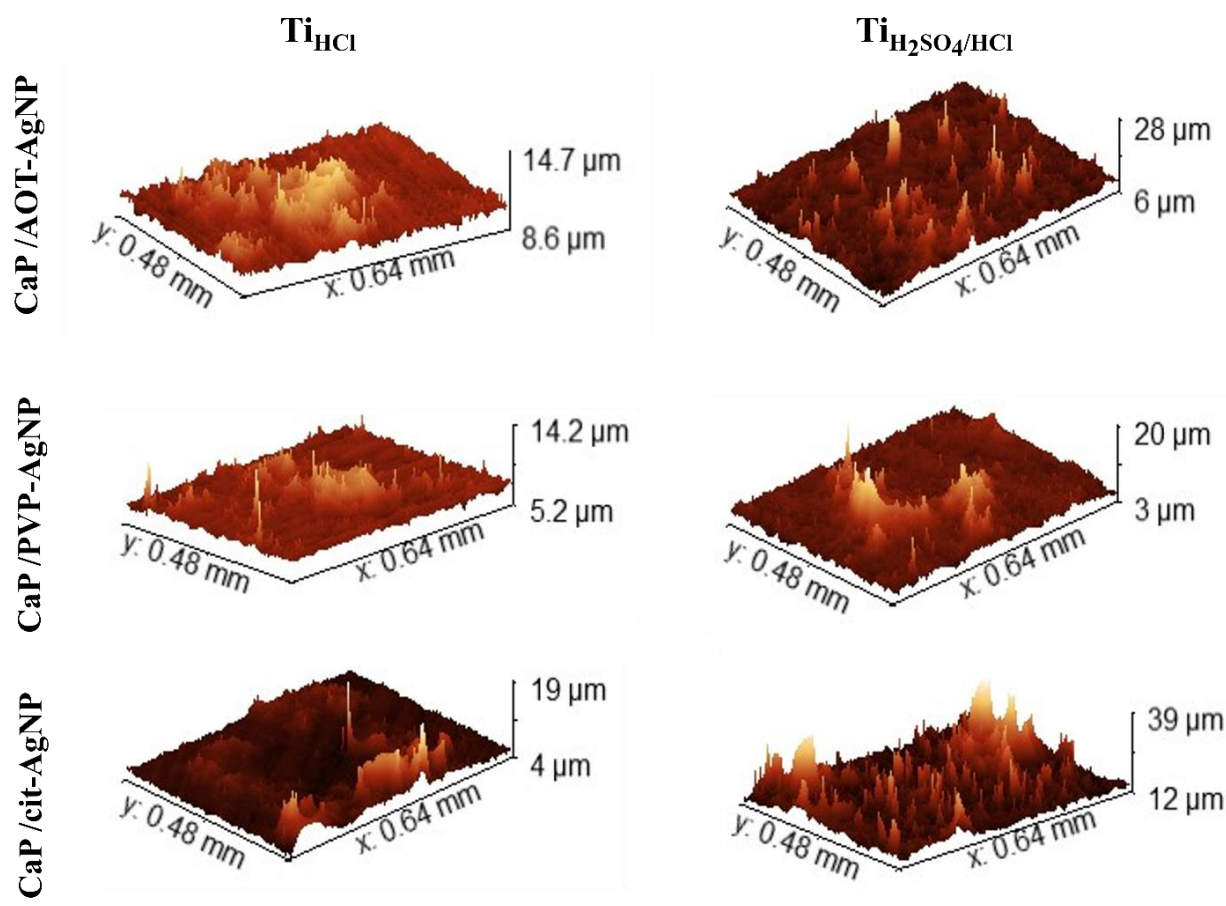
Optičkom profilometrijom vizualizirana je topografija CaP/AgNP prevlaka (slika 53) te je promatran utjecaj AgNP-a na prekrivenost površine i uniformnost pripremljenih prevlaka na različito obrađenim površinama titanija. Prisutnost AOT-AgNP-a i PVP-AgNP-a u CaP prevlakama na Ti_{HCl} (tablica 18) ne mijenja značajno prekrivenost površine i uniformnost prevlake, obzirom da su slične vrijednosti prosječne hrapavosti dobivene za prevlaku CaP bez AgNP-a ($0,62 \mu\text{m} \pm 0,27 \mu\text{m}$). CaP/cit-AgNP prevlaka na Ti_{HCl} ima značajno veću prosječnu hrapavost, od ostalih kompozitnih prevlaka na istoj površini te od samih CaP-a. Navedeno može biti posljedica prisutnosti većih kristala CaP-a nastalih u prisutnosti cit-AgNP-a, što je opaženo na SEM mikrofotografijama (slika 49). Pored toga, ovi rezultati slažu se s rezultatima dobivenim za kompozite CaP/cit-AgNP, gdje u prisutnosti cit-AgNP-a nastaju veći sferični agregati listićavih kristala u odnosu na kontrolni sustav bez AgNP-a.

Tablica 18. Prosječna hrapavost (S_a), određena optičkom profilometrijom ($n = 3$), kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$).

Uzorak	$S_a / \mu\text{m}$	
	Ti_{HCl}	$\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$
CaP/AOT-AgNP	$0,87 \pm 0,40$	$1,40 \pm 0,50$
CaP/PVP-AgNP	$0,77 \pm 0,32$	$1,25 \pm 0,40$
CaP/cit-AgNP	$2,27 \pm 1,0$	$1,53 \pm 0,45$

Prosječne hrapavosti kompozitnih prevlaka CaP/AgNP pripremljenih na $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$ površini vrlo su slične hrapavosti CaP prevlake na $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$ površini ($1,57 \mu\text{m} \pm 0,52 \mu\text{m}$). Navedeno ukazuje na to da je nastali sloj CaP/AgNP uniforman, slično kao u slučaju CaP prevlake. Iako su razlike u hrapavosti male, najveća hrapavost opažena je u prisustvu cit-AgNP-a, što ukazuje na prisutnost većih nepravilnosti na površini. Navedeno je u skladu sa SEM

rezultatima, gdje su opaženih najveći agregati listićavih kristala koji potencijalno mogu utjecati na hrapavost površine.



Slika 53. 3D topografije kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP) na površini titanija jetkanom 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanom smjesom vodenih otopina H₂SO₄/HCl ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C (Ti_{H₂SO₄/HCl}) određene optičkom profilometrijom.

Mjerenja kontaktnog kuta (tablica 19) kompozitnih prevlaka na različito obrađenim površinama titanija ukazuju na blago povećanje hidrofilnosti površine s prevlakama kompozita u odnosu na neprevučenu površinu Ti_{HCl}, no nešto veće kontaktne kutove u odnosu na Ti_{HCl} površinu prevučenu samo s CaP. Izmjereni kontaktni kutovi za vodu i polarna komponenta te ukupna SFE nešto su veći u odnosu na rezultate za samu Ti_{HCl} što ukazuje na to da prevlaka utječe na povećanje polarnosti. Kako su dobivene prevlake veće hrapavosti,

mjerenja kontaktnog kuta i određivanje SFE nije precizno, obzirom da se promjenom hrapavosti mijenja specifična površina, pa tako i dodirna površina kapljice.²⁸⁸ Iz navedenog razloga, ta mjerenja se ne koriste za detaljnu analizu, već samo ilustraciju trendova. S druge strane, kontaktni kutovi, pa tako ni SFE, nisu izmjereni za prevlake na $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ površini jer je kontaktni kut vode bio manji od 5° te ga nije bilo moguće precizno izmjeriti. Takve površine, gdje je kontaktni kut vode jako mali, nazivaju se superhidrofilnima te imaju važnu ulogu za učinkovitost implant materijala.^{295,296} U ranijim istraživanjima pokazano je da je adhezija stanica puno veća na hidrofilnim površinama obrađenim kiselinama.²⁹⁵ Pored toga, superhidrofilne površine pokazuju veću osteokonduktivnost te značajno ubrzavaju oseointegraciju titanijskih implantata.²⁹⁶ Uzevši u obzir velike razlike u slučaju $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ površine, prazne, prevučene s CaP te prevučene CaP/AgNP kompozitom, promjena kontaktnog kuta moguća je posljedica velike hrapavosti površine i poroznosti slojeva, a ne nužno superhidrofilnosti. Samim povećanjem hrapavosti neprevučene površine titanija, povećava se dodirna površina analiziranih kapljica, čime rezultati postaju manje usporedivi s onima na manje hrapavim površinama.²⁸⁸ Dodatkom AgNP-a u CaP prevlaku na $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ dolazi do značajne promjene kontaktnog kuta što ukazuje na to da AgNP s CaP grade porozan sloj kroz koji dolazi do difundiranja analizirane kapljice.

Tablica 19. Kontaktni kut (C_a) i slobodna energija površine (SFE) kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata i nanočestica srebra stabiliziranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP) na površina titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi.

Prevlaka	$C_a / ^\circ$		SFE / (mN m^{-1})		
	Voda	Dijodometan	Disperzna komponenta	Polarna komponenta	Ukupna
CaP/AOT-AgNP	$63,5 \pm 3,3$	$32,5 \pm 2,1$	$43,2 \pm 0,9$	$9,5 \pm 1,7$	$52,6 \pm 2,6$
CaP/PVP-AgNP	$67,3 \pm 3,0$	$29,8 \pm 2,7$	$44,3 \pm 1,1$	$7,4 \pm 1,3$	$51,7 \pm 2,5$
CaP/cit-AgNP	$67,9 \pm 7,4$	$35,0 \pm 9,3$	$42,0 \pm 4,3$	$7,7 \pm 3,6$	$49,7 \pm 7,9$

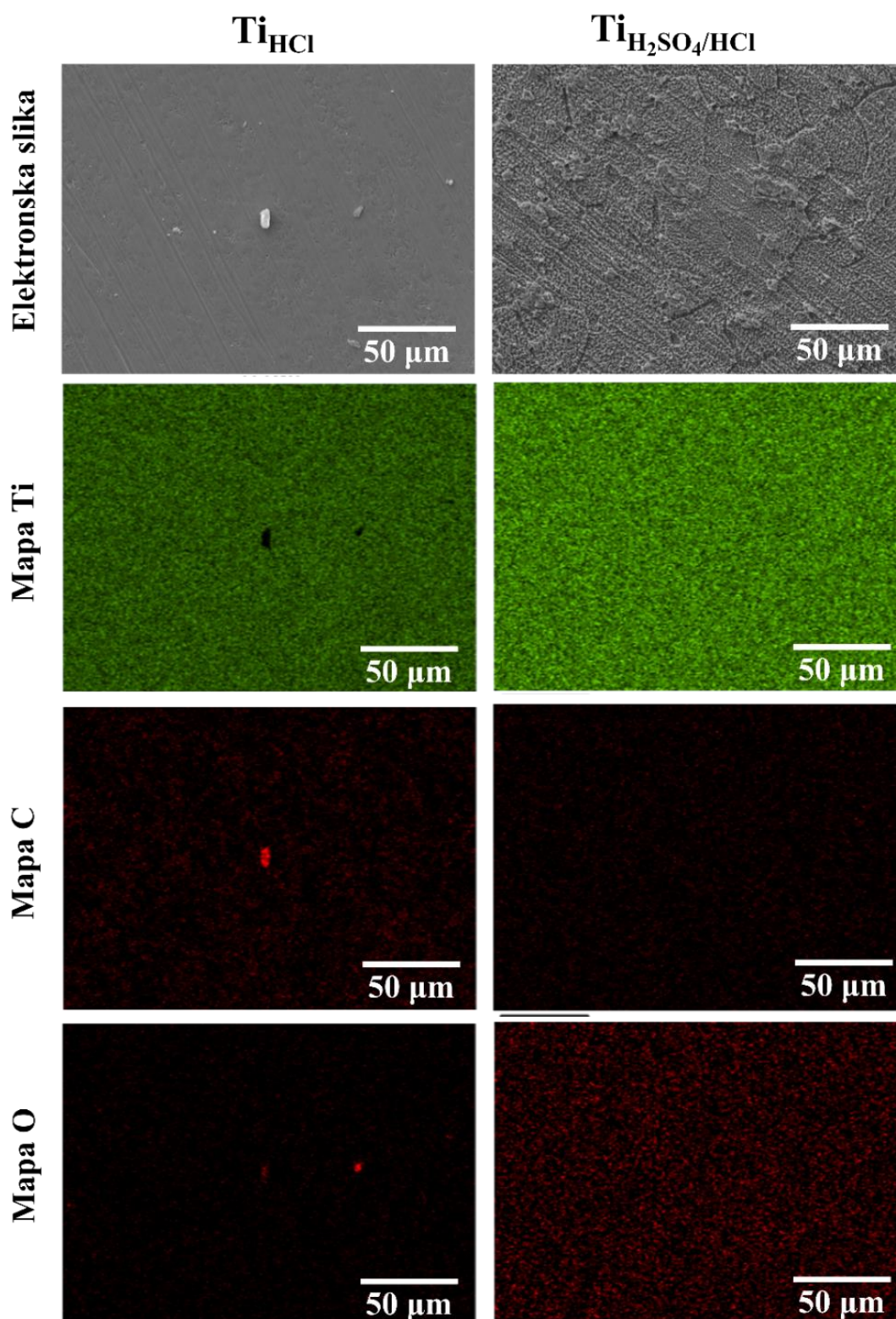
4.5. Biomimetska priprema kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i biomolekula na obrađenoj površini titanija

U svrhu dobivanja biološki aktivnih multifunkcionalnih površina na biokompatibilnom i mehanički jakom materijalu, jetkana je površina titanija slijedeći dva opisana protokola te su biomimetski pripremane kompozitne prevlake kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i albumina iz goveđeg seruma (CaP/AgNP/BSA) te kompozitne prevlake CaP-a, AgNP-a različite površinske modifikacije i kitozana (CaP/AgNP/Chi). Navedene prevlake pripremane su adsorpcijom biomolekule na površinu Ti u prvom koraku, a zatim prevlačenjem s CaP ili kompozitima CaP/AgNP u drugom koraku.

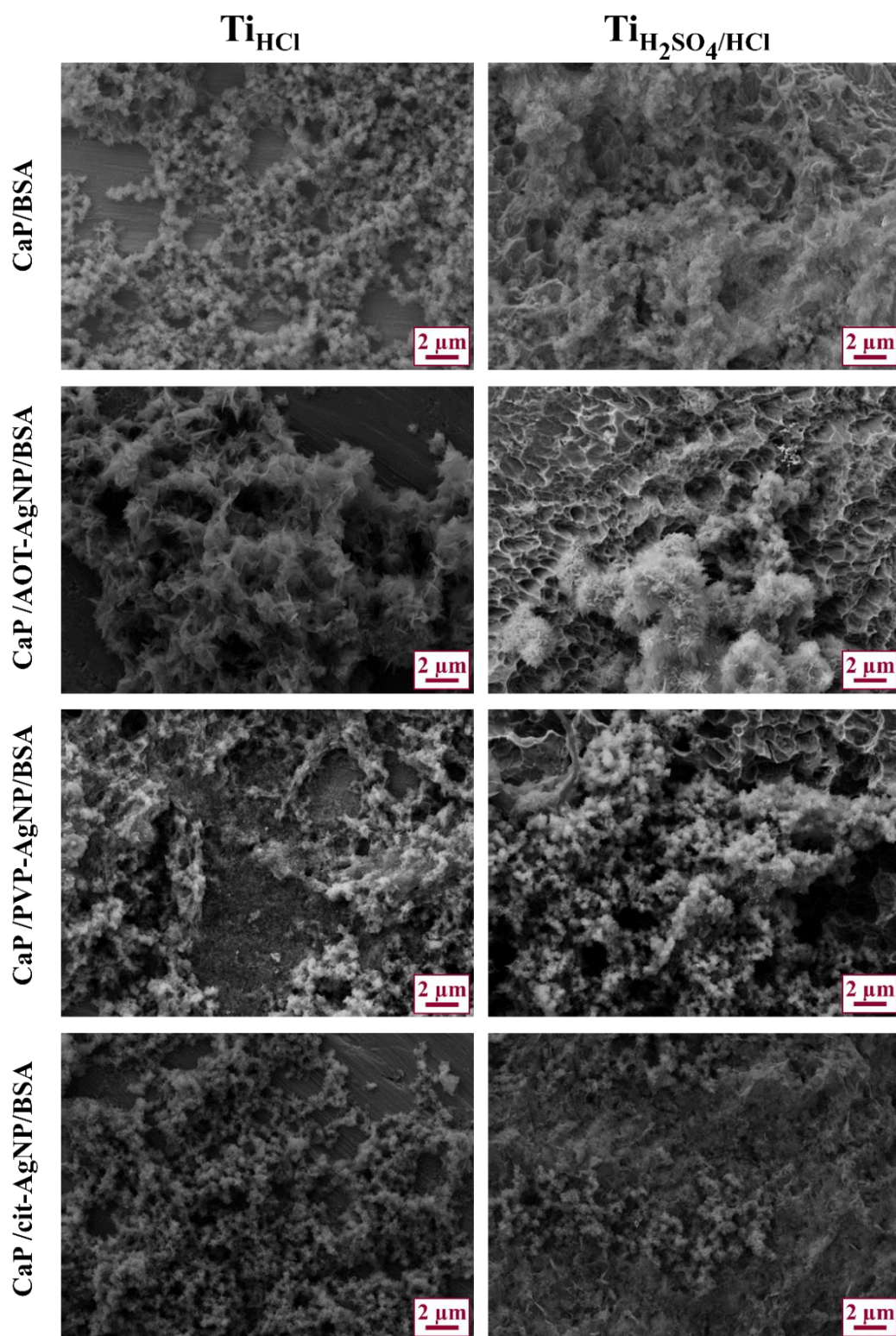
Prilikom pripreme navedenih prevlaka korištena je stalna koncentracija AgNP-a, BSA i Chi, određena na temelju rezultata istraživanja taloženja CaP-a u prisustvu AgNP-a i biomakromolekula (poglavlja 4.2. i 4.3.).

4.5.1. Karakterizacija prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i albumina iz goveđeg seruma na modificiranim površinama titanija

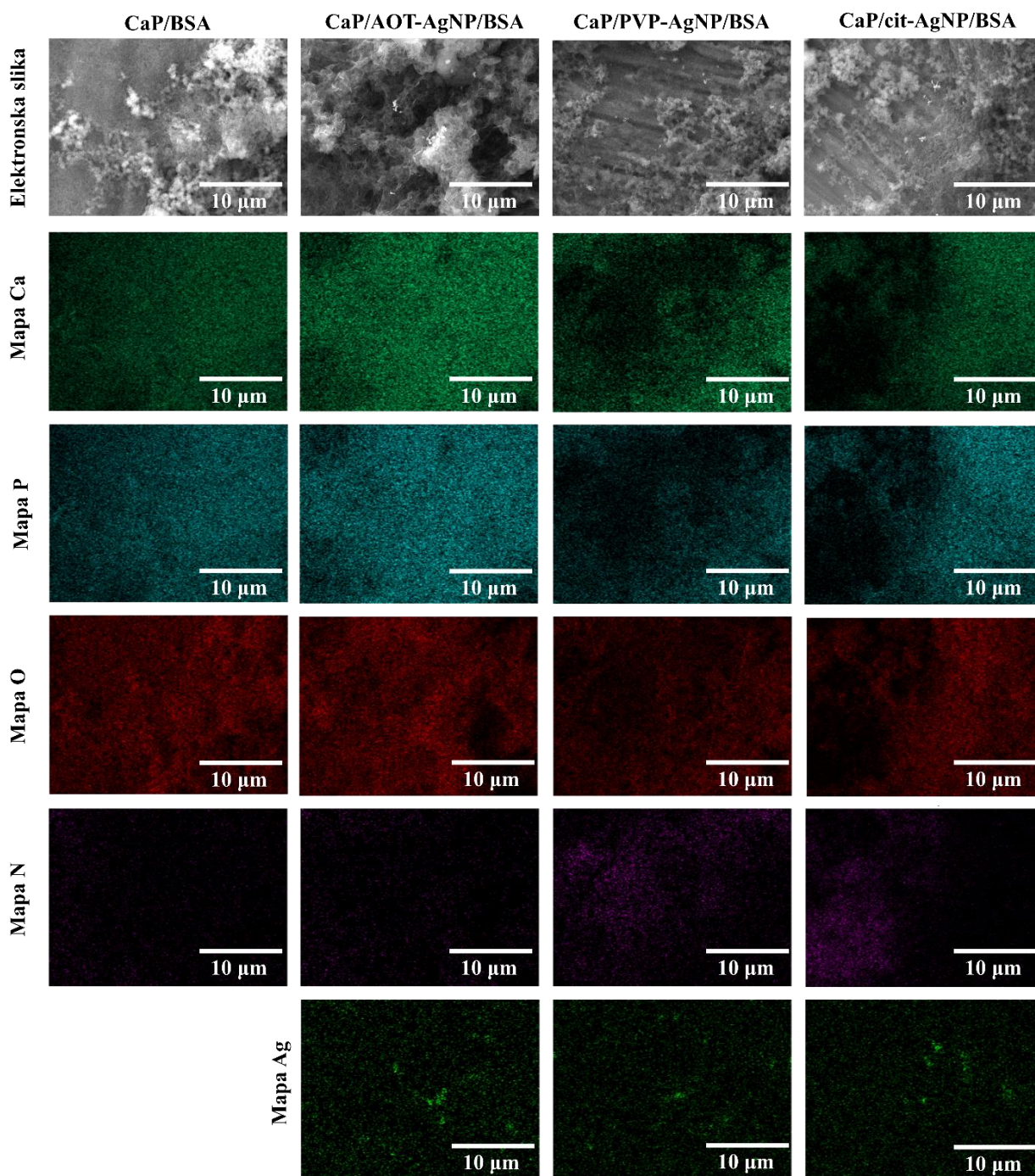
Adsorpcija BSA potvrđena je EDX-om, pri čemu je prisustvo ugljika u EDX mapi potvrdilo ravnomjernu adsorpciju BSA na obrađenim površinama titanija (slika 54). Na SEM mikrografijama CaP/BSA prevlaka (slika 55) uočena je manja prekrivenost površina, ali slična morfologija CaP-a kao u slučaju CaP prevlaka (slika 46). U slučaju $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ površine, manje CaP-a nastalo je između agregata CaP-a, što može biti posljedica inhibitornog učinka BSA na taloženje CaP-a opaženog u ranijim istraživanjima utjecaja BSA na taloženje i transformaciju CaP-a (poglavlje 4.2.1.).^{187,297} Morfologija CaP-a ovisi o vrsti AgNP-a te obradi površine, pri čemu su najpravilniji kristali CaDHA nastali u prisustvu AOT-AgNP-a i BSA na $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ površini. AgNP utječu na manju agregaciju kristala CaP-a, te je zanimljivo da nisu opaženi kristali OCP-a ni u jednoj kompozitnoj prevlaci na dvije različite površine. EDX-om je potvrđen nastanak kalcijevih fosfata u prisustvu BSA i AgNP-a (slika 56, slika 57). Iz mapa Ag vidljiv je ravnomjeran raspored AgNP-a u kompozitnim prevlakama, neovisno o vrsti AgNP-a. Kako kalcijevi fosfati imaju tendenciju adsorpcije CO_2 iz zraka,²⁹¹ za potvrdu prisustva BSA u CaP/BSA i CaP/AgNP/BSA prevlakama korištena je EDX mapa dušika, koja je potvrdila prisutnost BSA u svim prevlakama.



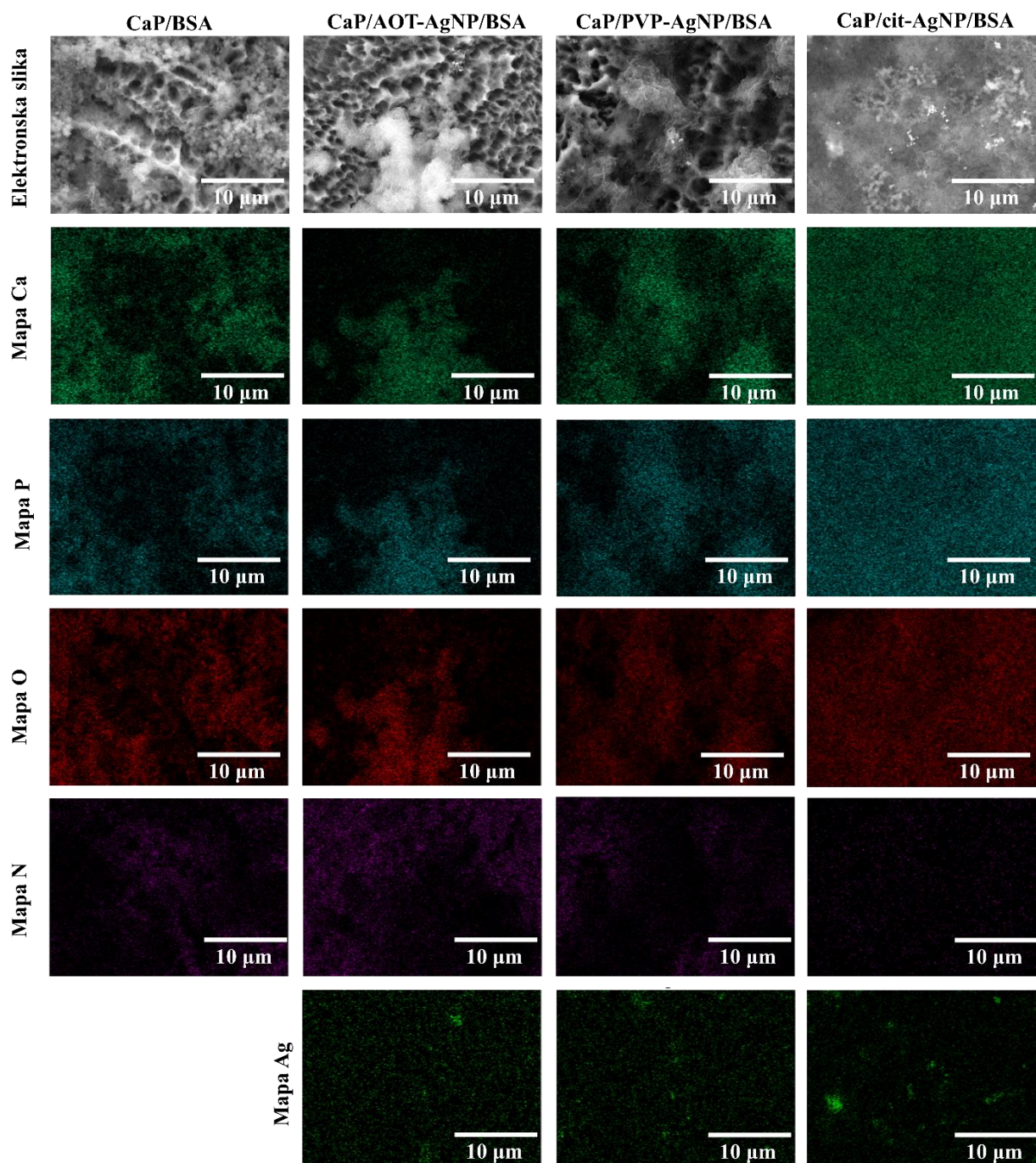
Slika 54. EDX mape prevlake albumina iz goveđeg seruma (BSA) na površini titanija jetkanog 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanog smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$)



Slika 55. SEM mikrofografije kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, albumina iz goveđeg seruma te nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/BSA), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/BSA) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/BSA) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$)



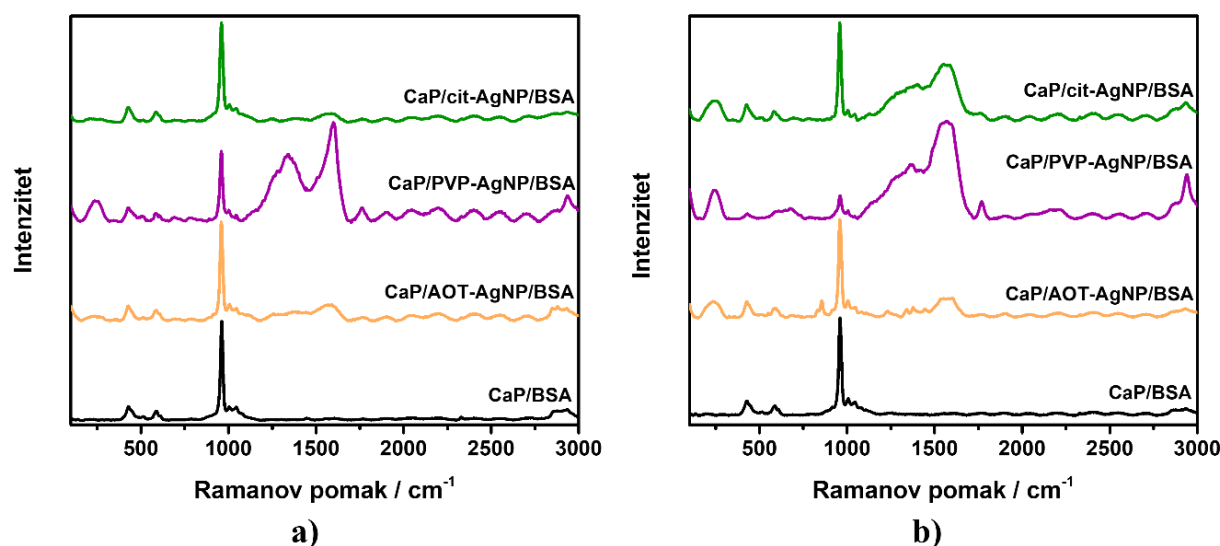
Slika 56. EDX mape kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, albumina iz goveđeg seruma i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/BSA), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/BSA) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/BSA) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi



Slika 57. EDX mape kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, albumina iz govedjeg seruma i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/BSA), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/BSA) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/BSA) na površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C

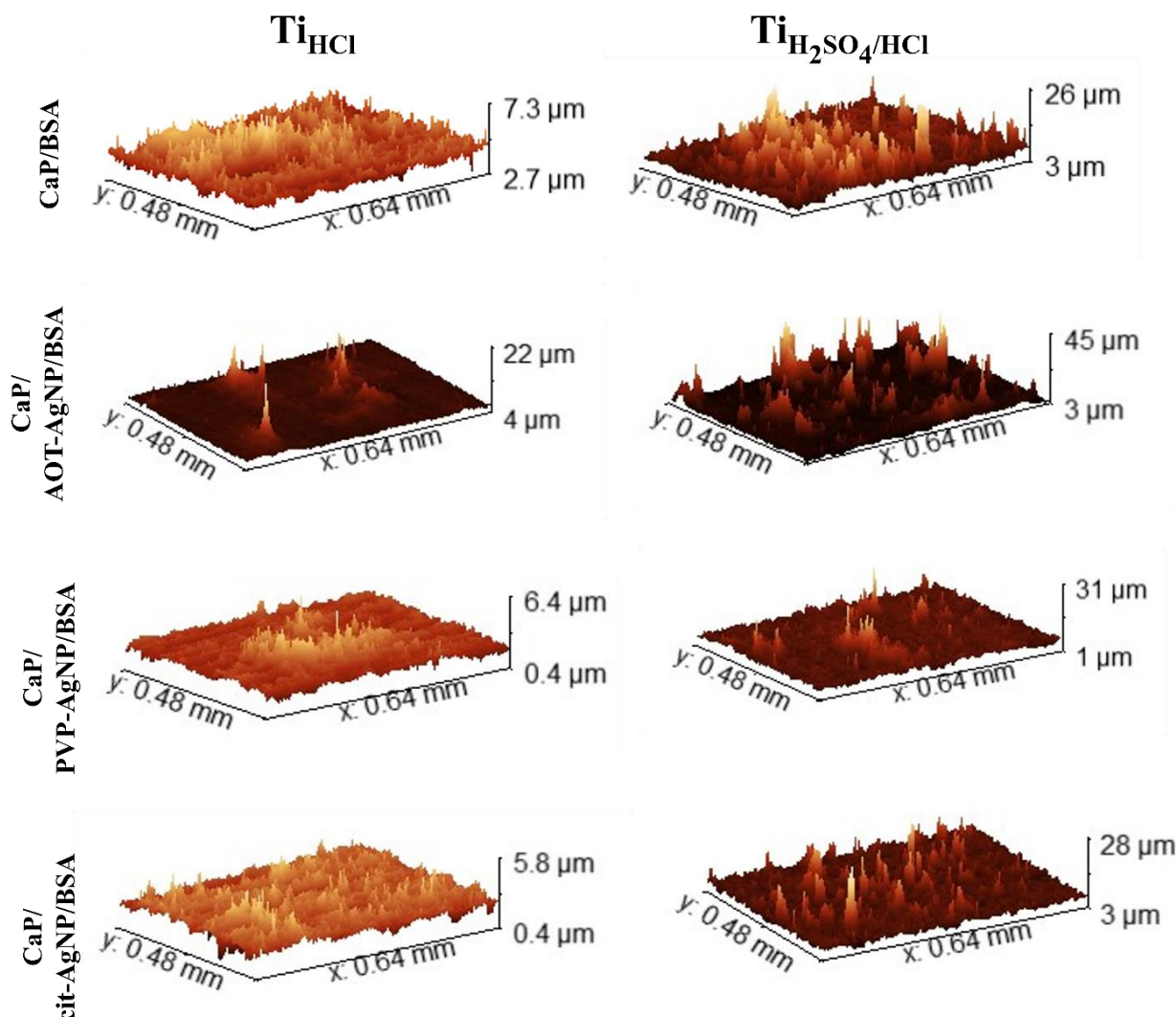
Pored EDX-a, za kvalitativnu analizu korištena je i Ramanova spektroskopija (slika 58). U svim spektrima prisutne su vrpce karakteristične za fosfatnu skupinu pri 427 cm^{-1} i 587 cm^{-1}

koje odgovaraju savijanju veze O - P - O u PO_4^{3-} (ν_2 i ν_4), pri 957 cm^{-1} (ν_1 simetrično istezanje veze P - O u PO_4^{3-}), pri 1003 cm^{-1} (ν_1 simetrično istezanje veze P - O u HPO_4^{2-}) i pri 1041 cm^{-1} (ν_3 asimetrično istezanje veze P - O u PO_4^{3-}). Navedene vrpce karakteristične su za apatitne faze CaP-a.^{244,289} Spektar prevlake CaP/AOT-AgNP/BSA na $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ površini sadrži dodatnu vrpcu pri 854 cm^{-1} , koja odgovara istezanju veze P - OH u HPO_4^{2-} (ν_1) karakterističnom za OCP.²⁴⁴ Prisutnost vrpce pri 1003 cm^{-1} ukazuje na prisutnost OCP-a u sastavu prevlaka,²⁸⁹ no mali intenzitet ukazuje na njegov mali udio u smjesi. Ostale vrpce OCP-a nisu opažene u spektrima, no moguće je da je to posljedica preklapanja većine vrpca CaDHA i OCP-a. Istraživanja utjecaja BSA na nastajanje kompozita CaP/AgNP/BSA (poglavlje 4.3.3.) pokazala su da BSA djelomično inhibira nastanak OCP-a, ovisno o vrsti AgNP-a. Pored vrpce karakterističnih za fosfate, u spektrima su prisutne vrpce pri 2940 cm^{-1} , 1410 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} i 1240 cm^{-1} koje odgovaraju istezanju CH_2 i CH_3 skupina prisutnih u stabilizatorima nanočestica srebra (AOT, PVP i cit) i BSA.²⁹⁸ Spektri CaP/AOT-AgNP/BSA i CaP/PVP-AgNP/BSA na obje površine titanija te CaP/cit-AgNP/BSA na $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ sadrže široku vrpcu pri 1560 cm^{-1} koja odgovara istezanju heterogenog prstena prisutnog u PVP-u ili istezanju ketonske skupine prisutne u AOT-u i citratu.²⁹⁴



Slika 58. Ramanovi spektri kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, albumina iz goveđeg seruma i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/BSA), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/BSA) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/BSA) na površini titanija jetkanoj **a)** 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi i **b)** smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri $60\text{ }^\circ\text{C}$

Optičkom profilometrijom promatrana je topografija prevlaka CaP/AgNP/BSA (slika 59) te je određivana hrapavost istih (tablica 20). Samo prevlačenje s BSA/CaP uzrokuje nastanak sloja nejednolike debljine na Ti_{HCl} površini. Dobivena vrijednost prosječne hrapavosti slična je vrijednosti dobivenoj za CaP prevlake, što ukazuje na to da BSA nema utjecaj na hrapavost. Slično vrijedi i za prevlaku BSA/CaP na $Ti_{H_2SO_4/HCl}$.



Slika 59. 3D topografija površine kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, albumina iz goveđeg seruma i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/BSA), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/BSA) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/BSA) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina H_2SO_4/HCl ($V(H_2SO_4) : V(HCl) : V(H_2O) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($Ti_{H_2SO_4/HCl}$) određena optičkom profilometrijom

Prosječne hrapavosti slojeva CaP/AgNP/BSA na obje vrste površina slične su onima određenim za CaP/AgNP prevlake (tablica 18). U oba slučaja hrapavost se smanjuje u nizu $\text{CaP/AOT-AgNP} > \text{CaP/cit-AgNP/BSA} > \text{CaP/PVP-AgNP/BSA}$. Rezultati su u skladu sa SEM mikrografijama na kojima je vidljiva bolja prekrivenost površine i uniformnost prevlaka CaP/PVP-AgNP/BSA te CaP/cit-AgNP/BSA na $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$, u odnosu na CaP/AOT-AgNP/BSA. To pokazuje da utjecaj BSA na prekrivenost supstrata i hrapavost nastale površine ovisi o vrsti AgNP.

Tablica 20. Prosječna hrapavost (S_a), određena optičkom profilometrijom ($n = 3$), kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, albumina iz goveđeg seruma i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/BSA), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/BSA) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/BSA) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60°C ($\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$)

Prevlaka i površina	$S_a / \mu\text{m}$	
	Ti_{HCl}	$\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$
CaP/BSA	$0,68 \pm 0,27$	$1,58 \pm 0,21$
CaP/AOT-AgNP/BSA	$0,80 \pm 0,27$	$1,33 \pm 0,34$
CaP/PVP-AgNP/BSA	$0,49 \pm 0,37$	$1,00 \pm 0,19$
CaP/cit-AgNP/BSA	$0,55 \pm 0,34$	$1,10 \pm 0,19$

Kako bi se odredio utjecaj BSA na svojstva vlaženja površine s različitim kompozitnim prevlakama CaP/AgNP/BSA, mjereno je kontaktni kut vode i dijodometana te je izračunata slobodna energija površine. Prije određivanja svojstva vlaženja površine prevučene kompozitima, određena su svojstva vlaženja obrađenih površina s adsorbiranim BSA. Rezultati (tablica 21) prikazuju blagu hidrofilnost Ti_{HCl} površine, sličnu onoj dobivenoj za odgovarajuću neprevučenu obrađenu površinu, dok je utjecaj BSA vidljiviji na $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$ površini kojoj se adsorpcijom BSA znatno mijenja kontaktni kut, te postaje gotovo jednak kontaktnom kutu za Ti_{HCl} površinu s adsorbiranim BSA, odnosno poprima hidrofilna svojstva. Pored toga, slobodna energija površine slična je za obje obrađene površine, te slična SFE prazne Ti_{HCl} površine.

Tablica 21. Kontaktni kut (C_a), disperzna i polarna komponenta te ukupna slobodna energija površine (SFE) kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, albumina iz goveđeg seruma i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/BSA), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/BSA) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/BSA) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (T_{HCl}) i površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$)

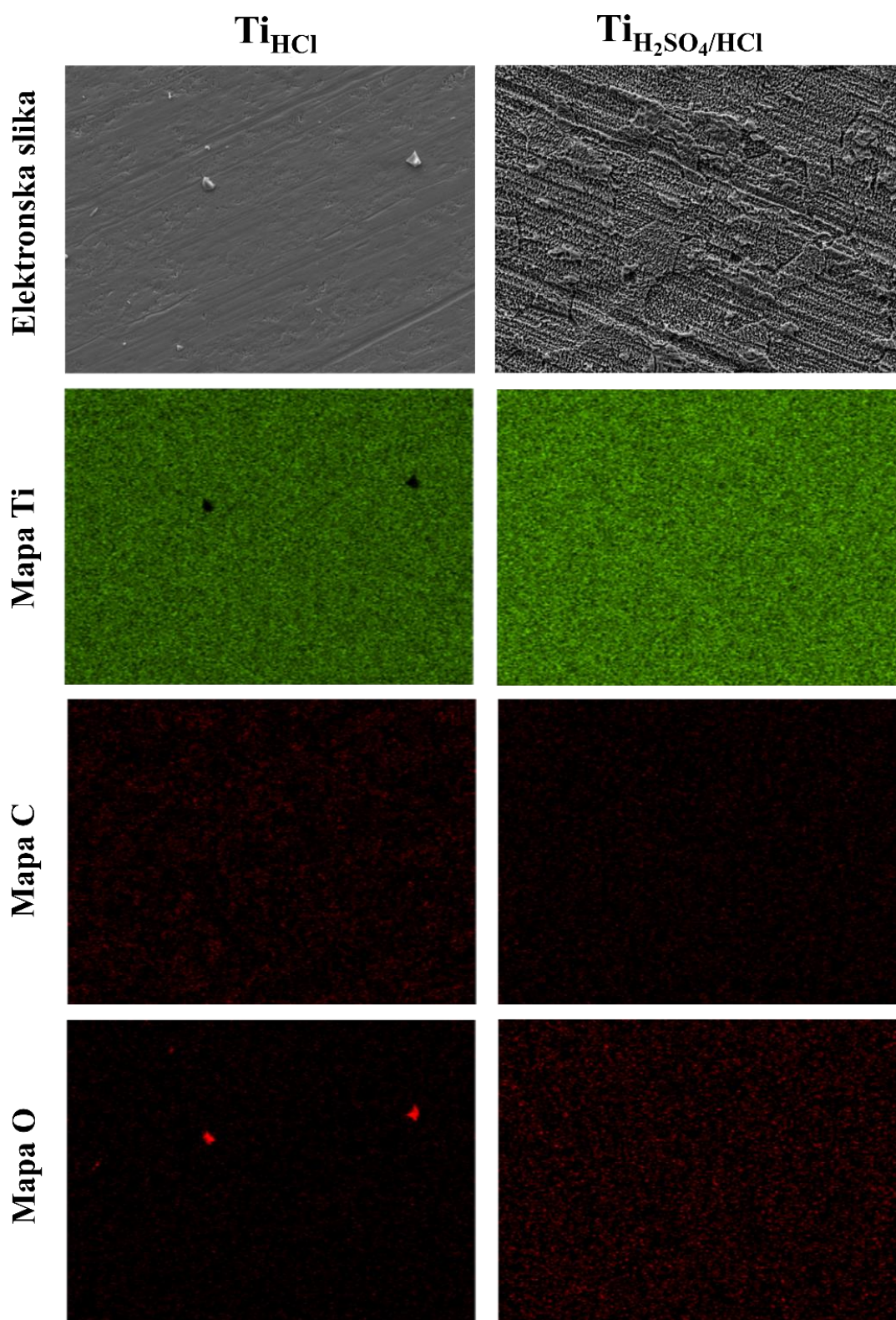
Površina	Prevlaka	$C_a / ^\circ$		SFE / (mN m^{-1})		
		Voda	Dijodometan	Disperzna komponenta	Polarna komponenta	Ukupna
T_{HCl}	BSA	$75,2 \pm 1,6$	$43,9 \pm 8,0$	$37,6 \pm 4,2$	$5,7 \pm 1,3$	$43,3 \pm 5,5$
	CaP/BSA	$56,2 \pm 4,0$	$27,4 \pm 2,4$	$45,3 \pm 0,9$	$12,5 \pm 2,1$	$57,8 \pm 3,0$
	CaP/AOT-AgNP/BSA	$64,2 \pm 5,7$	$29,9 \pm 4,1$	$44,3 \pm 1,7$	$8,8 \pm 2,7$	$53,1 \pm 4,4$
	CaP/PVP-AgNP/BSA	$66,7 \pm 7,1$	$34,0 \pm 3,6$	$42,5 \pm 1,6$	$8,2 \pm 3,4$	$50,6 \pm 5,0$
	CaP/cit-AgNP/BSA	$43,5 \pm 7,0$	$19,8 \pm 1,7$	$47,8 \pm 0,5$	$18,3 \pm 3,7$	$66,1 \pm 4,2$
Površina	Prevlaka	$C_a / ^\circ$		SFE / (mN m^{-1})		
		Voda	Dijodometan	Disperzna komponenta	Polarna komponenta	Ukupna
$T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	BSA	$74,4 \pm 9,0$	$31,3 \pm 10,6$	$43,7 \pm 4,5$	$4,6 \pm 3,5$	$48,3 \pm 8,0$
	CaP/BSA	$58,8 \pm 2,7$				
	CaP/AOT-AgNP/BSA	$60,3 \pm 2,3$				
	CaP/PVP-AgNP/BSA	$62,5 \pm 6,3$				
	CaP/cit-AgNP/BSA	$55,2 \pm 6,1$				

Rezultati mjerenja kontaktnog kuta i vrijednosti SFE za T_{HCl} površinu s kompozitnim prevlakama CaP/AgNP/BSA (tablica 21) slični su onima za T_{HCl} površinu s CaP/AgNP prevlakama, što ukazuje na to da utjecaj BSA na vlaženje T_{HCl} površine nije velik, što je očekivano s obzirom na to da je BSA adsorbiran prije nanošenja CaP. S druge strane, kontaktni kut vode i $T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$ površine s kompozitnim prevlakama CaP/BSA te CaP/AgNP/BSA sličan je rezultatima kontaktnog kuta tih prevlaka na T_{HCl} površini, što nije bio slučaj kod CaP/AgNP prevlaka na $T_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$ površini. U ranijim rezultatima (poglavlje

4.4.3.) pokazano je da CaP/AgNP prevlake na $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ utječu na povećanje hidrofilnosti. Povećanje kontaktnog kuta vode za CaP/AgNP/BSA prevlake na $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ može biti posljedica nastanka neuniformnog i tanjeg sloja prevlake u prisustvu BSA, što je u skladu s rezultatima SEM-a i optičke profilometrije. Kontaktni kut dijodometana i $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ površine s CaP/AgNP/BSA i CaP/BSA prevlakama nije bilo moguće precizno izmjeriti, pa tako ni izračunati SFE. Navedeno ukazuje na to da BSA ima utjecaj na vlaženje površine, no jačina utjecaja ovisi o svojstvima površine.

4.5.2. *Karakterizacija prevlaka kalcijevih fosfata, nanočestica srebra različite površinske modifikacije i kitozana na obrađenim površinama titanija*

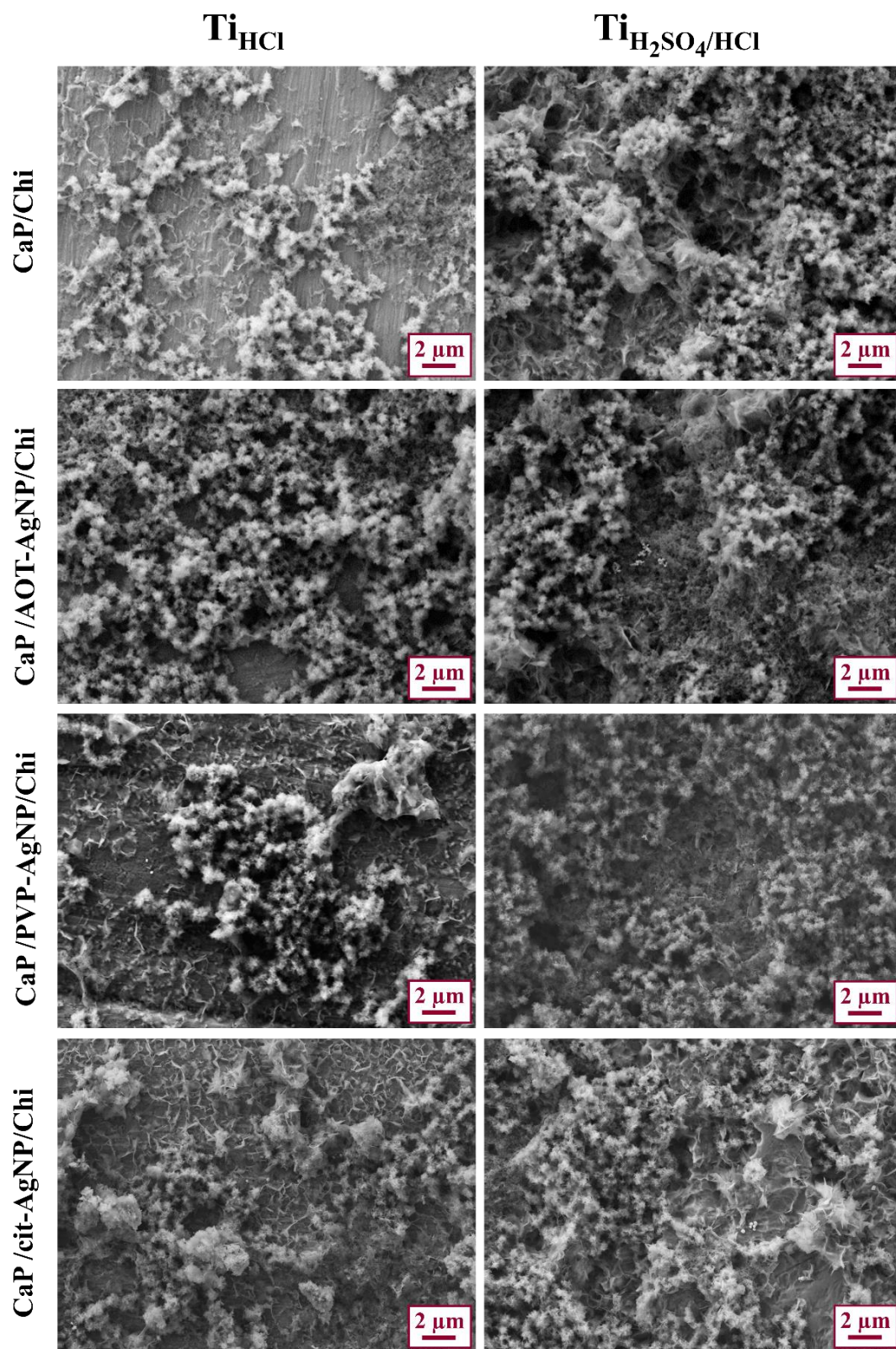
Adsorpcija kitozana na različite površine potvrđena je prisustvom ugljika u EDX analizi. (slika 60). Na SEM mikrografijama CaP/Chi prevlaka (slika 61) na TiHCl opažena je manja prekrivenost površine s CaP u odnosu na CaP/Chi prevlake na $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$, gdje je gotovo cijela površina prekrivena. Slično kao i u slučaju CaP-a, prisutni su i manji samostalni kristali CaP-a, koji prekrivaju površinu između agregata CaP-a, što nije bilo opaženo u slučaju prevlaka s BSA. Opaženi su sferični agregati kristala CaP-a karakteristični za CaDHA.²³⁵ U ranijim rezultatima opaženo je da kitozan inhibira taloženje i transformaciju CaP (poglavlje 4.3.1.), što nije dobiveno u slučaju prevlaka. Navedeno može biti posljedica različitog utjecaja kitozana u otopini i adsorbiranog na površinu ili posljedica lošije adsorpcije Chi u odnosu na BSA. Na $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ s CaP/Chi prevlakom opažena je vrlo dobra prekrivenost, slično kao i kod $\text{TiH}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ s CaP prevlakom bez Chi. Iako nije moguće direktno usporediti, u ranijim rezultatima, na SEM mikrografijama praškastih kompozita CaP/Chi, ustanovljeno je da pod utjecajem kitozana nastaju veći sferični agregati kristala CaP-a, što ovdje nije opaženo.²³⁵ Ta razlika može biti posljedica taloženja na površini ili prisutnosti manje količine kitozana.



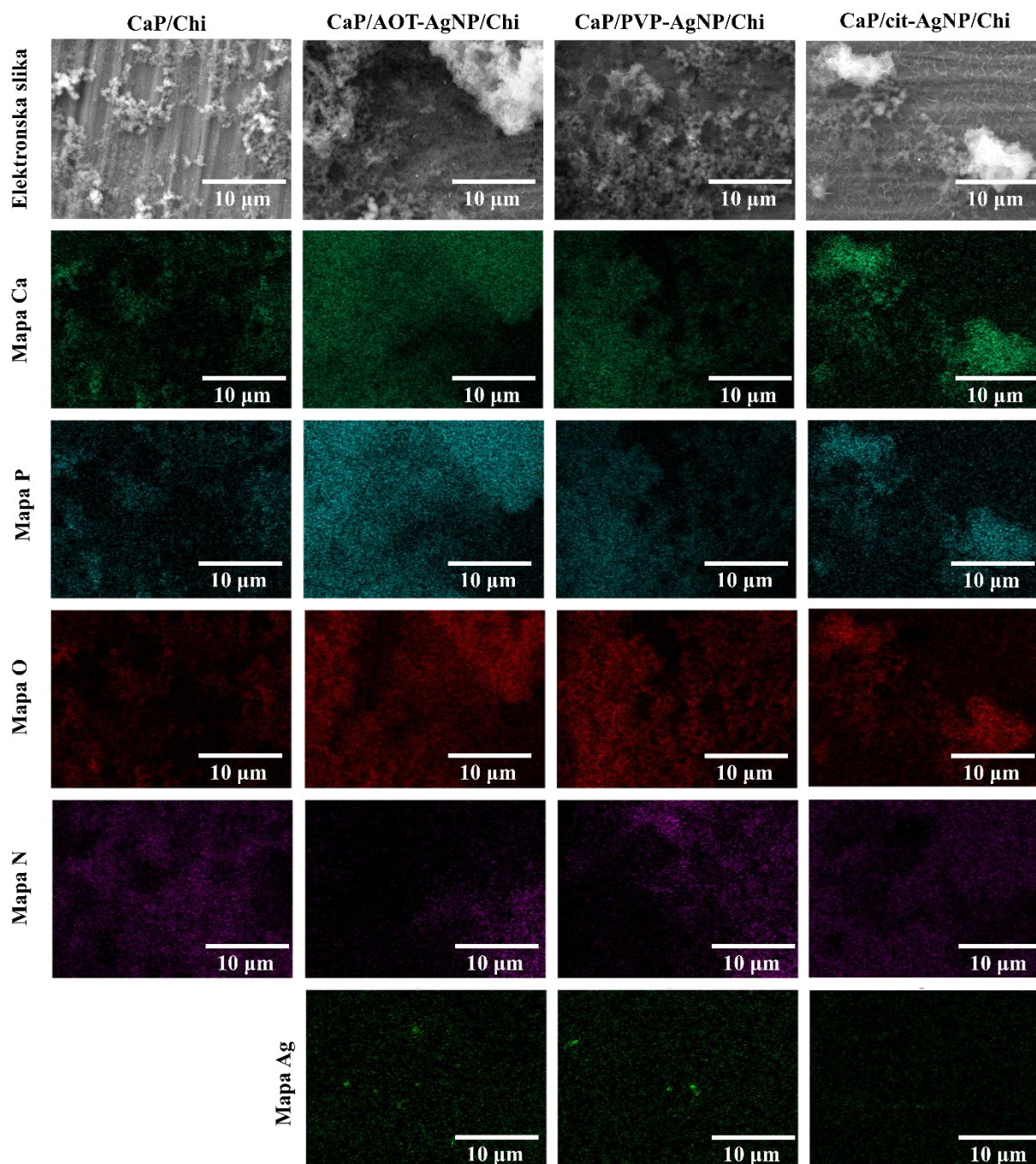
Slika 60. EDX mape prevlake kitozana (Chi) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$)

Prevlake CaP/AgNP/Chi (slika 61) imaju slična svojstva CaP/Chi prevlakama bez AgNP-a. Točnije, Ti_{HCl} površina ima sličnu pokrivenost s CaP/AgNP/Chi prevlakom kao u slučaju CaP te CaP/AgNP prevlaka, koje sadrže sferične agregate kristala CaP-a između kojih je vidljiva površina prekrivena manjim kristalima CaP-a. CaP/AOT-AgNP/Chi i CaP/cit-AgNP/Chi prevlake na Ti_{HCl} sadrže manje sferične agregate CaP-a kakvi nisu opaženi u odgovarajućim CaP/AgNP prevlakama. Morfologija CaP/PVP-AgNP/Chi prevlake na Ti_{HCl} površini slična je morfologiji CaP/PVP-AgNP prevlaka. Također sadrži slične agregate, no vrlo slične sadrži i prevlaka bez Chi. Pokrivenost $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ površine svim CaP/AgNP/Chi prevlakama je dobra, kao i u slučaju CaP te CaP/AgNP prevlaka. Na obje površine u prisutnosti AgNP-a nastali su samo sferični agregati kristala CaP-a karakteristični za CaDHA.²³⁵ Sferični agregati kristala CaDHA u CaP/AOT-AgNP/Chi te CaP/cit-AgNP/Chi prevlakama manji su u odnosu na prevlake bez Chi. Ti rezultati ukazuju na to da obrada površine može utjecati na taloženje specifične faze CaP-a.

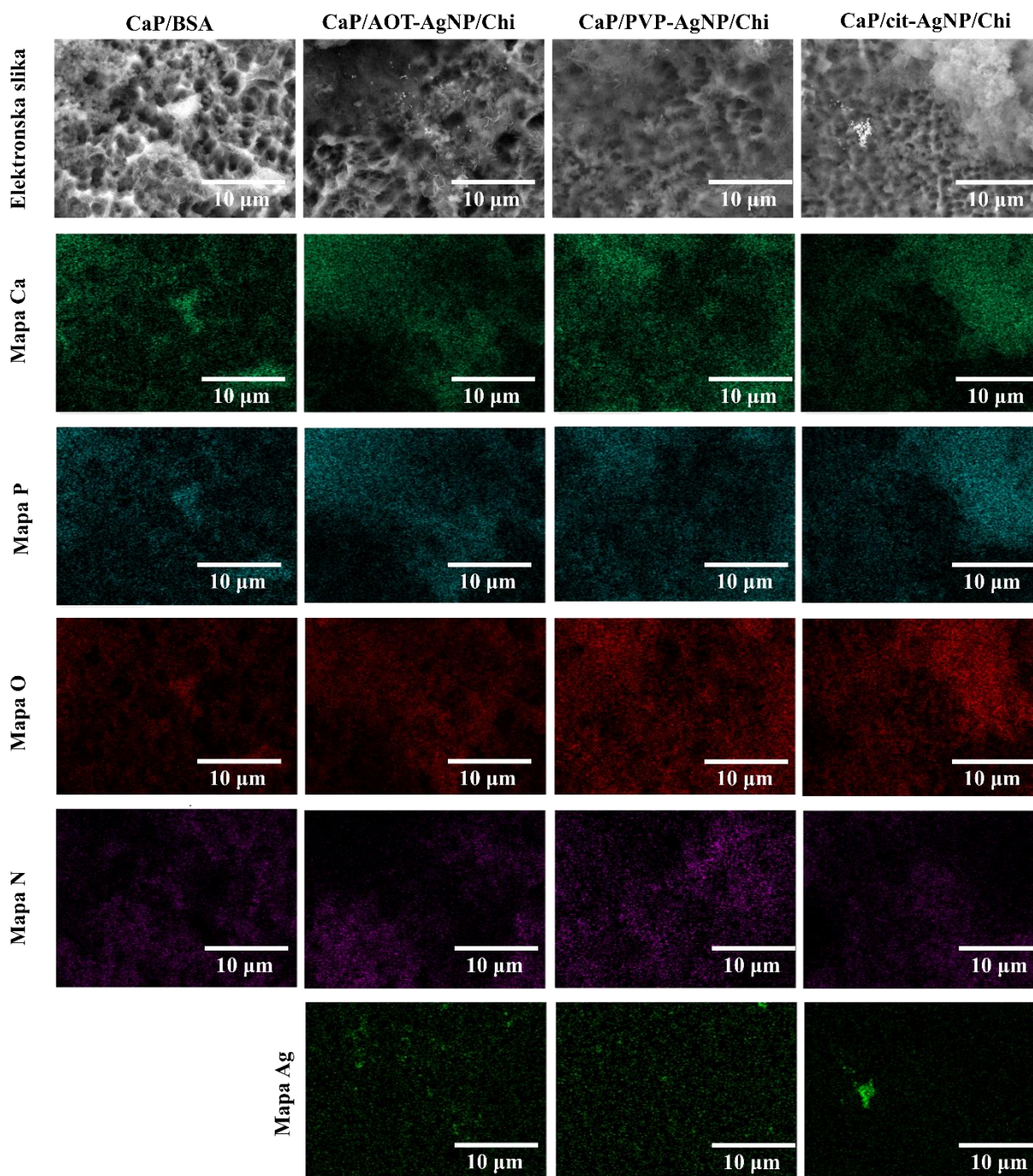
EDX analizom opažen je ravnomjeran raspored AgNP-a u kompozitnim prevlakama, neovisno o vrsti AgNP-a (slika 62, slika 63). Pored toga, s pomoću mape dušika potvrđena je prisutnost kitozana u svim prevlakama.



Slika 61. SEM mikrografije kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, kitozana i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/Chi), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/Chi) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/Chi) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$)



Slika 62. EDX mape kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, kitozana i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/Chi), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/Chi) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/Chi) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi

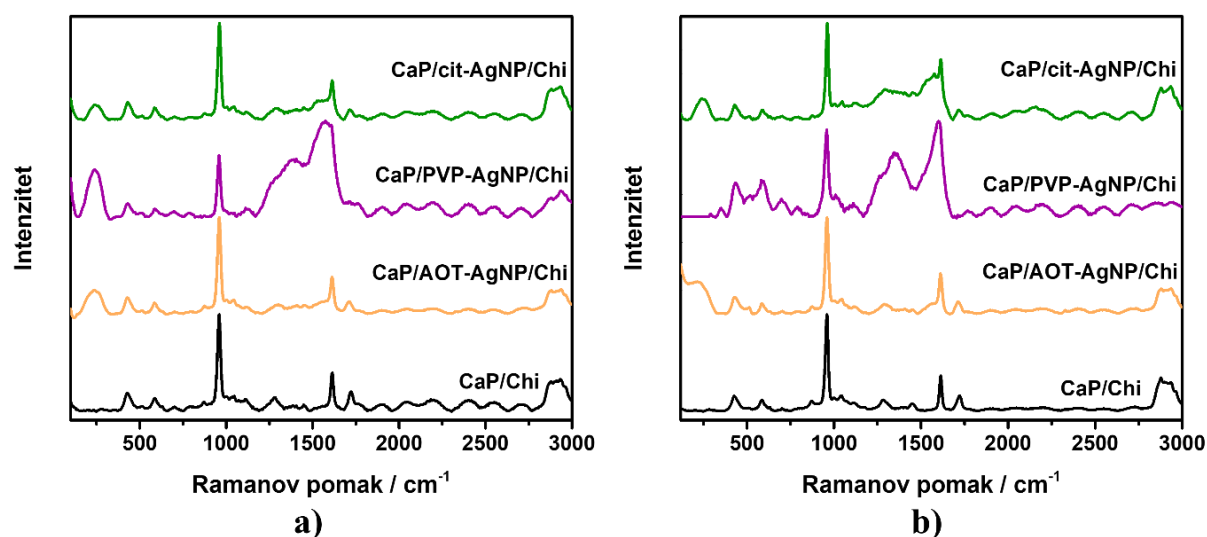


Slika 63. EDX mape kompozitne prevlake kalcijevih fosfata, kitozana i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/Chi), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/Chi) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/Chi) na površini titanija jetkanj smjesom vodenih otopina H_2SO_4/HCl ($V(H_2SO_4) : V(HCl) : V(H_2O) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri $60^\circ C$

U Ramanovim spektrima (slika 64) opažene su vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine, pri 433 cm^{-1} i 587 cm^{-1} koje odgovaraju savijanju $P - O - P$ veze u PO_4^{3-} (ν_2 i ν_4),

pri 956 cm^{-1} (ν_1 simetrično istezanje P – O veze u PO_4^{3-}), pri 1002 cm^{-1} (ν_1 istezanje P – O veze u HPO_4^{2-}), pri 1047 cm^{-1} (ν_3 asimetrično istezanje P – O veze u PO_4^{3-}) i pri 1113 cm^{-1} (ν_3 istezanje P – O veze u PO_4^{3-}). Navedene vrpce karakteristične su za apatitne faze CaP-a.^{244,299} Prisutnost vrpce pri 1002 cm^{-1} sugerira prisutnost OCP-a u prevlakama,²⁸⁹ no mali intenzitet navedene vrpce, ukazuje na mali udio OCP-a.

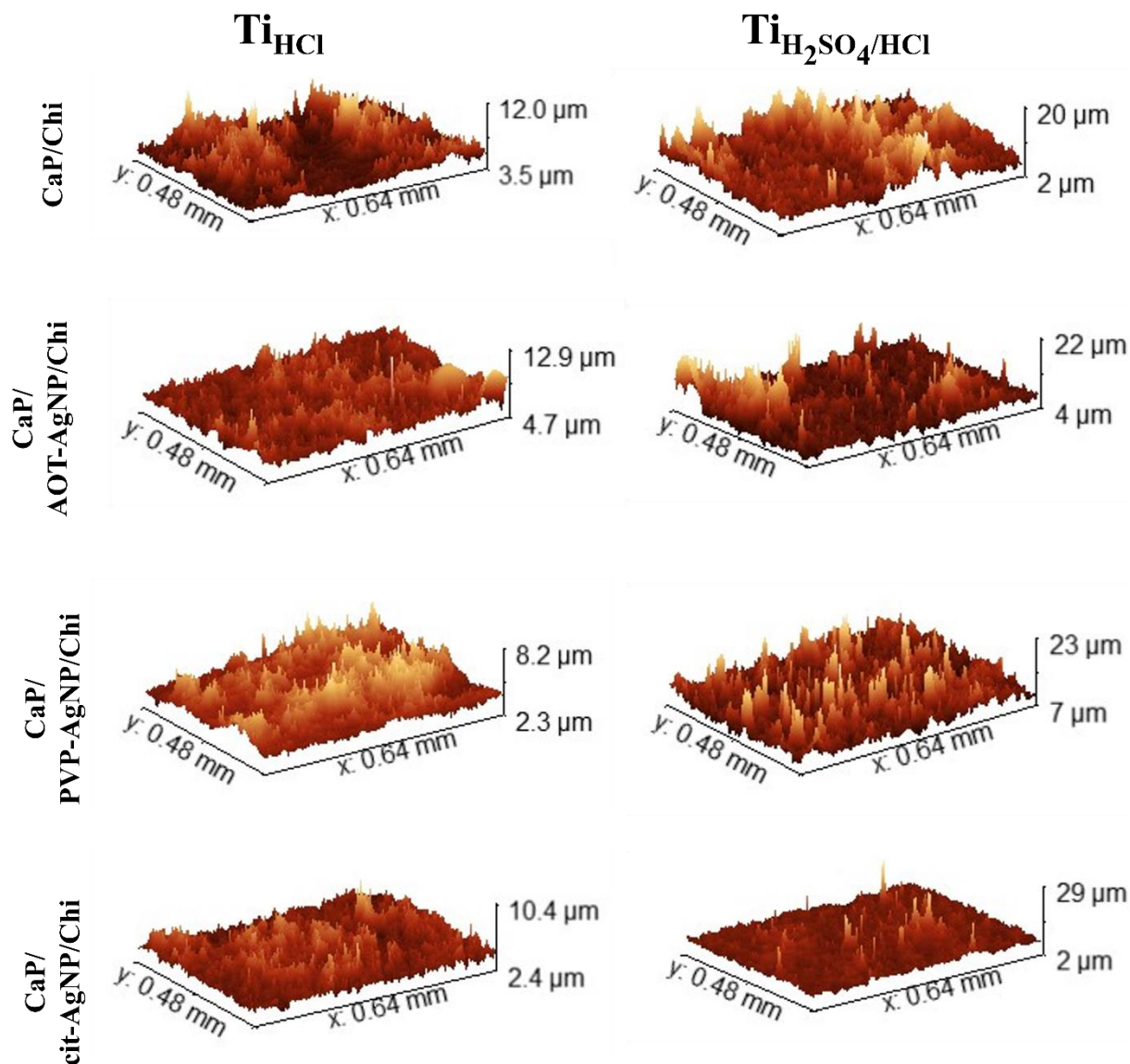
Pored vrpce CaP, u Ramanovim spektrima kompozitnih prevlaka prisutna je vrpca pri 1610 cm^{-1} koja odgovara istezanju karboksilne skupine u AOT-a²⁹⁴ i citratu te istezanju hetero-prstena prisutnog u PVP-u i kitozanu. Svi spektri sadrže široku vrpcu pri 2900 cm^{-1} koja odgovara istezanju CH_2 i CH_3 skupina prisutnih u svim stabilizatorima i kitozanu.²⁹⁰ Nadalje, vrpca pri 1340 cm^{-1} različitog je intenziteta u spektrima, a pripada vibracijama CH skupine prisutne u svim stabilizatorima AgNP-a i kitozanu.²⁹⁰ U spektrima nisu opažene vrpce titanija.



Slika 64. Ramanovi spektri kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, kitozana i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/Chi), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/Chi) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/Chi) na površini titanija jetkanoj **a)** 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi i **b)** smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri $60\text{ }^\circ\text{C}$

Optičkom profilometrijom vizualizirana je topografija (slika 65) i izmjerena prosječna hrapavost uzoraka (tablica 22), koja je korištena kao mjerilo uniformnosti debljine pojedinih slojeva nastalih na dvije različito obrađene površine titanija. Prosječne hrapavosti CaP/Chi prevlaka na obje površine slične su onima CaP prevlaka bez Chi. Navedeno ukazuje na nastali

neuniformni sloj CaP/Chi na Ti_{HCl} , dok je CaP/Chi prevlaka uniformnija, obzirom da je hrapavost slična onoj neprevučene $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$.



Slika 65. 3D topografije kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, kitozana i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/Chi), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/Chi) i citratom (CaP/cit-AgNP/Chi) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$) određene optičkom profilometrijom

Prosječna hrapavost CaP/AOT-AgNP/Chi i CaP/cit-AgNP/Chi prevlaka na Ti_{HCl} površini slična je prosječnoj hrapavosti CaP i CaP/AgNP prevlaka. Navedeno ukazuje na nastanak prevlake nejednolike debljine, slično kao i u slučaju CaP i CaP/AgNP prevlaka. Prolaka

CaP/PVP-AgNP/Chi na Ti_{HCl} značajno je manje hrapavosti u odnosu na CaP i CaP/PVP-AgNP. Navedeno ukazuje na nastanak uniformnije prevlake pod utjecajem Chi, obzirom da je hrapavost slična onoj neprevučene površine. Na $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ najveće promjene opažene su za CaP/AOT-AgNP/Chi prevlaku, čija hrapavost je puno veća u odnosu na hrapavost CaP i CaP/AOT-AgNP prevlake. Navedeno upućuje na nastanak neuniformne prevlake pod utjecajem kitozana. Prevlaka CaP/PVP-AgNP/Chi ima sličnu hrapavost kao CaP prevlaka te nešto veću u odnosu na CaP/PVP-AgNP prevlaku na istoj površini. Navedeno ukazuje na nastanak manje uniformne prevlake u odnosu na CaP/PVP-AgNP. Prevlaka CaP/cit-AgNP/Chi na $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ ima manju hrapavost u odnosu na CaP i CaP/cit-AgNP prevlake te je hrapavost sličnija onoj neprevučene površine. Navedeno ukazuje na nastanak uniformnije prevlake pod utjecajem kitozana.

Tablica 22. Prosječna hrapavost, određena optičkom profilometrijom, kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, kitozana i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/Chi), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/Chi) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/Chi) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanoj smjesom vodenih otopina H_2SO_4/HCl ($V(H_2SO_4) : V(HCl) : V(H_2O) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C ($Ti_{H_2SO_4/HCl}$).

Prevlaka i površina	$S_a / \mu m$	
	Ti_{HCl}	$Ti_{H_2SO_4/HCl}$
CaP/Chi	$0,66 \pm 0,24$	$1,63 \pm 0,05$
CaP/AOT-AgNP/Chi	$0,63 \pm 0,30$	$2,22 \pm 0,71$
CaP/PVP-AgNP/Chi	$0,30 \pm 0,18$	$1,75 \pm 0,38$
CaP/cit-AgNP/Chi	$0,68 \pm 0,37$	$0,89 \pm 0,24$

Utjecaj kitozana u kompozitnim prevlakama na svojstva vlaženja površine istražen je mjerenjem kontaktnog kuta vode i dijodometana te određivanjem slobodne energije površine. Prije određivanja svojstva vlaženja različitih kompozitnih prevlaka CaP/AgNP/Chi, određena su svojstva vlaženja obrađenih površina titanija prevučenih slojem Chi, pri čemu su dobiveni rezultati za Ti_{HCl} površinu slični rezultatima neprevučene obrađene površine (tablica 23). S druge strane, kontaktni kut vode i $Ti_{H_2SO_4/HCl}$ površine prevučene Chi nešto je manji u odnosu na neprevučenu površinu što sugerira blag utjecaj kitozana na smanjenje hidrofobnosti.

Razlika u kontaktnim kutovima i SFE u odnosu na neprevučenu površinu vidljivija je za CaP/Chi prevlaku na Ti_{HCl} površini, s obzirom na to da su kontaktni kutovi znatno manji, a polarna komponenta te ukupna slobodna energija površine veća od vrijednosti određenih za ostale prevlake. Navedeno ukazuje na to da kombinacija Chi i CaP-a utječe na povećanje hidrofilnosti površine. Nadalje, izmjereni kontaktni kutovi vode i dijodometana s Ti_{HCl} površinom prevučenom CaP/AOT-AgNP/Chi te CaP/PVP-AgNP/Chi prevlakama manji su u odnosu na prevučene površine bez kitozana. Pored toga, SFE navedenih prevlaka je veći u odnosu na analogne površine bez kitozana. Kontaktni kut vode i Ti_{HCl} površine prevučene CaP/cit-AgNP/Chi prevlakom znatno je manji u odnosu na odgovarajuću prevlaku bez kitozana, dok kontaktni kut dijodometana za navedenu prevlaku nije bilo moguće točno izmjeriti zbog njegove male veličine. Navedeno upućuje na utjecaj kitozana na povećanu hidrofilnost površine prevučene kompozitnim prevlakama.

Tablica 23. Kontaktni kut (C_a), disperzna i polarna komponenta te ukupna slobodna energija površine (SFE) kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata, kitozana i nanočestica srebra modificiranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (CaP/AOT-AgNP/Chi), poli(vinilpirolidonom) (CaP/PVP-AgNP/Chi) i trinatrijevim citratom (CaP/cit-AgNP/Chi) na površini titanija jetkanoj 20 %-tnom vodenom otopinom HCl 1 h pri sobnoj temperaturi

Prevlaka	$C_a / ^\circ$		SFE / (mN m^{-1})		
	Voda	Dijodometan	Disperzna komponenta	Polarna komponenta	Ukupna
Chi	$73,3 \pm 1,9$	$36,8 \pm 0,9$	$41,2 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,8$	$46,8 \pm 1,2$
CaP/Chi	$43,9 \pm 10,1$	$20,9 \pm 1,8$	$47,5 \pm 0,5$	$18,2 \pm 5,3$	$65,7 \pm 5,8$
CaP/AOT-AgNP/Chi	$57,4 \pm 2,3$	$24,3 \pm 6,8$	$46,4 \pm 2,4$	$11,5 \pm 1,4$	$57,9 \pm 3,8$
CaP/PVP-AgNP/Chi	$54,3 \pm 3,8$	$26,7 \pm 5,0$	$45,5 \pm 1,9$	$13,4 \pm 2,1$	$58,9 \pm 4,0$
CaP/cit-AgNP/Chi	$26,5 \pm 7,2$	/	/	/	/
Chi na $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$	$106,0 \pm 5,4$	$34,4 \pm 11,0$	$42,3 \pm 5,0$	$0,3 \pm 0,6$	$42,6 \pm 5,6$

Zbog velike hidrofilnosti CaP/Chi te CaP/AgNP/Chi prevlaka na površini $\text{Ti}_{\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}}$, kontaktni kut nije bilo moguće točno izmjeriti. To je u skladu s rezultatima dobivenim za CaP/AgNP prevlake na istoj površini.

§ 5. ZAKLJUČAK

Multifunkcionalni implant materijali za regeneraciju čvrstih tkiva, koji uz odličnu biokompatibilnost i bioaktivnost te mehanička svojstva, posjeduju i antimikrobna svojstva, smatraju se rješenjem glavnih problema liječenja bolesti i ozljeda čvrstih tkiva. Kako bi se osigurala što sigurnija primjena takvih materijala, njihove antimikrobne komponente moraju imati mali potencijal uzrokovanja bakterijske rezistencije.

U ovom radu je stoga istražen utjecaj AgNP-a različite površinske modifikacije na nastajanje i svojstva kalcijevih fosfata te utjecaj albumina iz goveđeg seruma (BSA) i kitozana (Chi) na nastajanje i svojstva kompozita i kompozitnih prevlaka kalcijevih fosfata i nanočestica srebra. Kompoziti i kompozitne prevlake pripremani su biomimetskom metodom, koja omogućava prevlačenje implantata kompleksnih oblika te ugradnju biološki aktivnih molekula. Uz to je biomimetska metoda ekološki i ekonomski prihvatljiva, jednostavna te se može skalirati i primijeniti u raznim industrijskim procesima.

Rezultati istraživanja utjecaja AgNP-a na nastajanje i transformaciju CaP-a pokazali su da samo najmanja istražena koncentracija cit-AgNP-a i najveća koncentracija AOT-AgNP-a utječu na stabilnost amorfnog kalcijevog fosfata. Najveća koncentracija AOT-AgNP-a dodatno stabilizira amorfni kalcijev fosfat, dok ga najmanja koncentracija cit-AgNP-a destabilizira i promovira njegovu transformaciju. Međutim, morfologija amorfnog kalcijevog fosfata nastalog u prisutnosti AgNP-a je bila značajno promijenjena u odnosu na kontrolni sustav, pri čemu je vrsta i jačina utjecaja ovisila o vrsti AgNP-a. U svim slučajevima, detektirane su uglavnom pojedinačne AgNP raspodijeljene u amorfni kalcijev fosfat. Transformacijom amorfnog CaP, nakon 60 minuta reakcije, u kontrolnom sustavu nastala je smjesa kalcijem deficitarnog hidroksiapatita i male količine oktakalcijevog fosfata. Rezultati difrakcije rendgenskih zraka na praškastom uzorku i EPR spektroskopije pokazali su da se količina oktakalcijevog fosfata smanjuje s povećanjem koncentracije AgNP-a u taložnom sustavu. Opaženi utjecaji AgNP-a na brzinu transformacije amorfne u kristalne faze, kao i na svojstva nastalih faza, ukazali su na to da različito stabilizirane AgNP mogu imati različiti utjecaj na taložni proces, čak i kad su slične veličine (PVP-AgNP i AOT-AgNP). Iako nije bilo moguće razdvojiti utjecaj nanočestica i stabilizatora, kako međudjelovanja na

međupovršinama imaju važnu ulogu u taloženju, dobiveni rezultati ukazuju na važnu ulogu stabilizatora.

Dodatak BSA i Chi u taložni sustav rezultirao je inhibicijom transformacije amorfnog kalcijevog fosfata, pri čemu je Chi bio učinkovitiji inhibitor. Iako AgNP u prisutnosti BSA nisu utjecale na brzinu transformacije, ona je u prisutnosti Chi ovisila o vrsti AgNP-a te je bila najveća u prisutnosti PVP-AgNP-a. Obje biomakromolekule utjecale su na morfologiju amorfnog kalcijevog fosfata. U prisutnosti BSA nastala je faza nalik gelu, dok su prisutnosti Chi nastale sferične čestice manje od onih nastalih u kontrolnom sustavu. Obje biomakromolekule, BSA i Chi, utjecale su i na morfologiju i sastav nastale kristalne faze. Najveća promjena uočena je u prisutnosti BSA i cit-AgNP-a. U tom taložnom sustavu nastala je smjesa kalcijem deficitarnog hidroksiapatita i dikalcijevog fosfata dihidrata, a inhibirano je nastajanje oktakalcijevog fosfata. Dobiveni rezultati pokazuju da u kompleksnom taložnom sustavu s dva aditiva utjecaj biomakromolekula ovisi o specifičnoj kombinaciji biomakromolekule i AgNP-a.

Kompozitne prevlake CaP/AgNP/biomakromolekula, pripremljene biomimetskom metodom na različito obrađenim površinama titanija (neobrađene, jetkane vodenom otopinom klorovodične kiseline pri sobnoj temperaturi, jetkane smjesom vodenih otopina sumporne i klorovodične kiseline pri povišenoj temperaturi) različite su hrapavosti i hidrofilnosti. Prekrivenost površine titanija kalcijevim fosfatima ovisi o njezinoj hrapavosti te je najbolja za najhrapaviju površinu dobivenu jetkanjem smjesom kiselina pri povišenoj temperaturi. Dobivene prevlake bile su smjesa kalcijem deficitarnog hidroksiapatita i male količine oktakalcijevog fosfata, a osim na prekrivenost, obrada površine utjecala je i na morfologiju dobivenih kalcijevih fosfata. Dodatak AgNP-a utjecao je na morfologiju dobivenih prevlaka. Prisustvo BSA i Chi nije utjecalo na sastav nastalih CaP-a, ali je prekrivenost površina prevlakama bila manja u prisutnosti BSA, što pokazuje da BSA adsorbiran na površini može inhibirati nastajanje CaP-a. Navedeni rezultati karakterizacije potvrdili su da različita kemijska obrada površine titanija uzrokuje promjene u fizikalno kemijskim svojstvima kompozitnih prevlaka, pri čemu je veći utjecaj vidljiv pri korištenju agresivnije metode jetkanja, smjesom vodenih otopina sumporne i klorovodične kiseline pri povišenoj temperaturi.

Dobiveni rezultati potvrđuju da se biomimetska metoda može uspješno koristiti za pripremu kompozita i kompozitnih prevlaka CaP/AgNP/biomakromolekula. Svojstva

prevlaka mogu se podešavati izborom vrste AgNP-a i biomakromolekule, što je od značaja za racionalni dizajn biomimetskih, zelenih metoda sinteze multikomponentnih kompozita.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AAS – atomska apsorpcijska spektrometrija,
ACP – amorfni kalcijev fosfat,
AFM – mikroskopija atomskih sila,
AgNP – nanočestice srebra,
AOT – natrijev bis(2-etilheksil)sulfosukcinat,
BET – Brunauer, Emmett, Teller teorija,
BSA – albumin iz govedeg seruma,
 C_a – kontaktni kut,
CaDHA- kalcijem deficijentni hidroksiapatit,
CaP – kalcijev fosfat,
Chi – kitozan,
cit – citrat,
DCPA – dikalcijev fosfat bezvodni,
DCPD – dikalcijev fosfat dihidrat,
DLS – dinamičko raspršenje svjetla,
 D – koeficijent translacijske difuzije
 d_h – hidrodinamički promjer,
EDX – energijski razlučujuća rendgenska spektroskopija,
ELS – elektroforetsko raspršenje svjetla,
EPR – elektronska paramagnetska rezonancija,
FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom,
HA – hidroksiapatit,
HBSS – Hankova balansirana otopina soli,
IAI – infekcije povezane s implantatima (engl. *implant associated infections*),
ICP-MS – spektrometrija mase s induktivno spregnutom plazmom,
 k_B – Boltzmannova konstanta,
MCPA – monokalcijev fosfat bezvodni,
MCPM – monokalcijev fosfat monohidrat,

MRSA – *Staphylococcus aureus* otporna na nekoliko antibiotika (engl. *multiple drug-resistant Staphylococcus aureus*)

OA – oksipatit,

OCP – oktakalcijev fosfat ,

OWRK – Owens, Wendt, Rabel, Kaelble teorija,

PBS – otopina fosfatnog pufera,

PVP – poli(vinilpirolidon),

S_a – prosječna površinska hrapavost,

SBF – simulirana tjelesna tekućina,

SEM – pretražna elektronska mikroskopija,

SFE – slobodna energija površine,

T – apsolutna temperatura,

t_i – vrijeme indukcije sekundarnog taloženja,

Ti_{HCl} – površina titanija jetkana klorovodičnom kiselinom,

$Ti_{H_2SO_4/HCl}$ – površina titanija jetkana smjesom sumporne i klorovodične kiseline,

TEM – transmisijska elektronska mikroskopija,

TGA – termogravimetrijska analiza,

TTCP – tetrakalcijev fosfat,

XRD – difrakcija rendgenskog zračenja,

α -TCP – alfa trikalcijev fosfat,

β -TCP – beta trikalcijev fosfat,

γ^d – disperzna komponenta napetosti površine,

γ_L – napetost na granici faza tekuće – plinovito,

γ^p – polarna komponenta napetosti površine,

γ_S – napetost na granici faza kruto – plinovito,

γ_{SL} – napetost na granici faza kruto – tekuće,

η – dinamička viskoznost,

ζ – zeta potencijal.

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. T. Mastnak, U. Maver, M. Finšgar, *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (2022) 2786.
2. S.V. Dorozhkin, *J. Compos. Sci.*, 7 (2023) 273.
3. S.V. Dorozhkin, *Ceram. Int.*, 42 (2016) 6529–6554.
4. S.V. Dorozhkin, *J. Mater. Chem. B*, 7 (2019) 7471–7489.
5. P. Alvarez-Urena, J. Kim, S. Bhattacharyya, P. Ducheyne, *Comprehensive Biomaterials II*, Elsevier, (2017), pp. 1–19.
6. T.F. Moriarty, R. Kuehl, T. Coenye, W.-J. Metsemakers, M. Morgenstern, E.M. Schwarz, M. Riool, S.A.J. Zaat, N. Khana, S.L. Kates, R.G. Richards, *EFORT Open Rev.*, 1 (2016) 89–99.
7. C. Zhao, W. Liu, M. Zhu, C. Wu, Y. Zhu, *Bioact. Mater.*, 18 (2022) 383–398.
8. M. Wang, H. Li, Y. Yang, K. Yuan, F. Zhou, H. Liu, Q. Zhou, S. Yang, T. Tang, *Bioact. Mater.*, 6 (2021) 1318–1329.
9. H.H. Lara, E.N. Garza-Treviño, L. Ixtapan-Turrent, D.K. Singh, *J. Nanobiotechnol.*, 9 (2011) 30–37.
10. S.A. Brennan, C. Ní Fhoghlú, B.M. Devitt, F.J. O'Mahony, D. Brabazon, A. Walsh, *Bone Joint J.*, 97-B (2015) 582–589.
11. T.J. Webster, E. Taylor, *Int. J. Nanomed.*, 6 (2011) 1463–1473.
12. S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Epple, *Chem. Mater.*, 22 (2010) 4548–4554.
13. S. Weiner, H.D. Wagner, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 28 (1998) 271–298.
14. M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park, *Int. J. Food Microbiol.*, 144 (2010) 51–63.
15. D. Wang, G. He, Y. Tian, N. Ren, W. Liu, X. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res.*, 108 (2020) 2386–2395.
16. P. Kwaśniak, J. Pura, M. Zwolińska, P. Wiciński, H. Skarżyński, L. Olszewski, J. Marczak, H. Garbacz, K.J. Kurzydłowski, *Appl. Surf. Sci.*, 336 (2015) 267–273.
17. X. Lu, Z. Zhao, Y. Leng, *Mater. Sci. Eng. C*, 27 (2007) 700–708.
18. M. Keskar, C. Sabatini, C. Cheng, M.T. Swihart, *Nanoscale Adv.*, 1 (2019) 627–635.
19. M. López-Álvarez, L. González-Rodríguez, F. Gontad, R. Teixeira-Santos, M. Doiro, L. Álvarez-Gómez, F.J.M. Mergulhão, P. González, J. Serra, *Biomed. Phys. Eng. Express*, 8 (2022) 065019.
20. E. Boanini, M.C. Cassani, K. Rubini, C. Boga, A. Bigi, *Nanomaterials*, 8 (2018) 390.
21. V.P. Padmanabhan, P. Sivashanmugam, R. Kulandaivelu, S. Sagadevan, B. Sridevi, R. Govindasamy, M. Thiruvengadam, *Antibiotics*, 11 (2022) 1780.
22. P.W. Citradewi, H. Hidayat, G. Purwiandono, I. Fatimah, S. Sagadevan, *Chem. Phys. Lett.*, 769 (2021) 138412.
23. J.A. Lenis, L.J. Toro, F.J. Bolívar, *Surf. Coat. Technol.*, 367 (2019) 203–211.
24. W. Chen, S. Oh, A.P. Ong, N. Oh, Y. Liu, H.S. Courtney, M. Appleford, J.L. Ong, *J. Biomed. Mater. Res.*, 82A (2007) 899–906.
25. Y. Chen, X. Zheng, Y. Xie, C. Ding, H. Ruan, C. Fan, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 19 (2008) 3603–3609.
26. G. Falini, S. Fermani, *Cryst. Res. Technol.*, 48 (2013) 864–876.
27. V. Sokolova, M. Epple, *Chem. Eur. J.*, 27 (2021) 7471–7488.
28. S.V. Dorozhkin, *Prog. Biomater.*, 5 (2016) 9–70.

29. N. Reznikov, R. Shahar, S. Weiner, *Acta Biomater.*, 10 (2014) 3815–3826.
30. A. Rodriguez-Palomo, M. Østergaard, H. Birkedal, *Adv. Funct. Mater.*, 34 (2024) 2307026.
31. M.P. McKinley, V.D. O’Loughlin, E.E. Pennefather-O’Brien, *Human Anatomy*, Fifth Edition, 5th ed., McGraw Hill Education, (2017) New York.
32. A. Bigi, E. Boanini, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.*, 15 (2017) e313–e325.
33. J. Christoffersen, M.R. Christoffersen, W. Kibalczyk, F.A. Andersen, *J. Cryst. Growth*, 94 (1989) 767–777.
34. S.V. Dorozhkin, *Biomater. Sci.*, 9 (2021) 7748–7798.
35. S.V. Dorozhkin, *Materials*, 2 (2009) 399–498.
36. A.S. Posner, F. Betts, N.C. Blumenthal, *Prog. Cryst. Growth Charact.*, 3 (1980) 49–64.
37. M.L. Watson, R.A. Robinson, *Am. J. Anat.*, 93 (1953) 25–59.
38. S.V. Dorozhkin, *Int. J. Mater. Chem.*, 2 (2012) 19–46.
39. R.Z. LeGeros, D.Q. Mijares, J. Park, X.-F. Chang, I. Khairoun, R. Kijkowska, R. Dias, J.P. LeGeros, *KEM*, 284–286 (2005) 7–10.
40. B. Viswanath, V.V. Shastry, U. Ramamurty, N. Ravishankar, *Acta Mater.*, 58 (2010) 4841–4848.
41. G.H. Nancollas, M.S. Mohan, *Arch. Oral Biol.*, 15 (1970) 731–745.
42. J.E. Harries, D.W.L. Hukins, C. Holt, S.S. Hasnain, *J. Cryst. Growth*, 84 (1987) 563–570.
43. N.C. Blumenthal, F. Betts, A.S. Posner, *Calcif. Tissue Int.*, 33 (1981) 111–117.
44. C.J.S. Ibsen, D. Chernyshov, H. Birkedal, *Chem. Eur. J.*, 22 (2016) 12347–12357.
45. T.P. Feenstra, P.L. De Bruyn, *J. Colloid Interface Sci.*, 84 (1981) 66–72.
46. A. Carino, C. Ludwig, A. Cervellino, E. Müller, A. Testino, *Acta Biomater.*, 74 (2018) 478–488.
47. J.C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, (1994).
48. W. Pompe, H. Worch, W.J.E.M. Habraken, P. Simon, R. Kniep, H. Ehrlich, P. Paufler, *J. Mater. Chem. B*, 3 (2015) 5318–5329.
49. N. Susaki, T. Saito, T. Yokoi, Y. Ogura, K. Matsunaga, *Inorg. Chem.*, 63 (2024) 15924–15930.
50. R.Z. LeGeros, *Calcif. Tissue Int.*, 37 (1985) 194–197.
51. A. Bigi, E. Boanini, M. Borghi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, N. Roveri, *J. Inorg. Biochem.*, 75 (1999) 145–151.
52. N.A. Curry, D.W. Jones, *J. Chem. Soc., A* (1971) 3725.
53. B.-Q. Lu, T. Willhammar, B.-B. Sun, N. Hedin, J.D. Gale, D. Gebauer, *Nat. Commun.*, 11 (2020) 1546.
54. M. Landín, R.C. Rowe, P. York, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2 (1994) 245–252.
55. J.R. Sutter, H. McDowell, W.E. Brown, *Inorg. Chem.*, 10 (1971) 1638–1643.
56. S.V. Dorozhkin, *Acta Biomater.*, 10 (2014) 2919–2934.
57. S. Hu, F. Jia, C. Marinescu, F. Cimpoesu, Y. Qi, Y. Tao, A. Stroppa, W. Ren, *RSC Adv.*, 7 (2017) 21375–21379.
58. M. Mathew, S. Takagi, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, 106 (2001) 1035.
59. H. El Briak-BenAbdeslam, M.P. Ginebra, M. Vert, P. Boudeville, *Acta Biomater.*, 4 (2008) 378–386.
60. L.L. Hench, J. Wilson, *An Introduction to Bioceramics*, WORLD SCIENTIFIC, (1993).
61. H.-B. Pan, B.W. Darvell, *Cryst. Growth Des.*, 9 (2009) 639–645.
62. M.S.-A. Johnsson, G.H. Nancollas, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 3 (1992) 61–82.

63. A.K. Lynn, W. Bonfield, *Acc. Chem. Res.*, 38 (2005) 202–207.
64. N. Kivrak, A.C. Taş, *JACerS*, 81 (1998) 2245–2252.
65. S.-H. Kwon, Y.-K. Jun, S.-H. Hong, H.-E. Kim, *Journal of the European Ceramic Society* (2003).
66. L. F. Koroleva, *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, 03 (2012) 226–237.
67. K. Kostka, S. Hosseini, M. Epple, *Micro*, 3 (2023) 156–171.
68. L. Nie, M. Hou, T. Wang, M. Sun, R. Hou, *Sci. Rep.*, 10 (2020) 13738.
69. A.P. Serro, A.C. Fernandes, B. Saramago, J. Lima, M.A. Barbosa, *Biomaterials*, 18 (1997) 963–968.
70. J.F.V. Vincent, O.A. Bogatyreva, N.R. Bogatyrev, A. Bowyer, A.-K. Pahl, *J. R. Soc. Interface.*, 3 (2006) 471–482.
71. A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel, *Biom mineralization: From Nature to Application*, John Wiley & Sons, Ltd., (2008) Chichester, UK.
72. S.V. Dorozhkin, *J. Mater. Sci.*, 42 (2007) 1061–1095.
73. B. Težak, *Croat. Chem. Acta*, 42 (1970) 351–362.
74. A.E. Nielsen, *Croat. Chem. Acta*, 42 (1970) 319–333.
75. J.W. Mullin, *Crystallization*, 4th ed., Butterworth-Heinemann, (2001) Oxford, UK.
76. H. Füredi-Milhofer, S. Sarig, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, 32 (1996) 45–74.
77. N.T. Barrett, G.M. Lamble, K.J. Roberts, J.N. Sherwood, G.N. Greaves, R.J. Davey, R.J. Oldman, D. Jones, *J. Cryst. Growth*, 94 (1989) 689–696.
78. S. Weiner, L. Addadi, *TIBS*, 16 (1991) 252–256.
79. L.L. Hench, *Science*, 208 (1980) 826–831.
80. M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, J.A. Planell, *J. R. Soc. Interface.*, 5 (2008) 1137–1158.
81. L.L. Hench, J.M. Polak, *Science*, 295 (2002) 1014–1017.
82. L.L. Hench, J. Wilson, eds., *Clinical Performance of Skeletal Prostheses*, Springer Netherlands, (1995) Dordrecht.
83. C. Ning, L. Zhou, G. Tan, *Mater. Today*, 19 (2016) 2–3.
84. T.D. Nguyen, N. Deshmukh, J.M. Nagarah, T. Kramer, P.K. Purohit, M.J. Berry, M.C. McAlpine, *Nature Nanotech.*, 7 (2012) 587–593.
85. D.J. Cohen, W. James Nelson, M.M. Maharbiz, *Nature Mater.*, 13 (2014) 409–417.
86. D. Kuzum, H. Takano, E. Shim, J.C. Reed, H. Juul, A.G. Richardson, J. de Vries, H. Bink, M.A. Dichter, T.H. Lucas, D.A. Coulter, E. Cubukcu, B. Litt, *Nat. Commun.*, 5 (2014) 5259.
87. M. Valletregi, *Prog. Solid State Chem.*, 32 (2004) 1–31.
88. T. Kokubo, H. Takadama, *Biomaterials*, 27 (2006) 2907–2915.
89. J.H. Hanks, R.E. Wallace, *EBM*, 71 (1949) 196–200.
90. Y.B. Gao, W.J. Weng, X.L. Deng, K. Cheng, X.G. Liu, P.Y. Du, G. Shen, G.R. Han, *KEM*, 309–311 (2006) 569–572.
91. H.B. Wen, J.G.C. Wolke, J.R. de Wijn, Q. Liu, F.Z. Cui, K. de Groot, *Biomaterials*, 18 (1997) 1471–1478.
92. Z. Li, Q. Wang, G. Liu, *Micromachines*, 13 (2022) 528.
93. S. Chernousova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52 (2013) 1636–1653.
94. H. Cao, X. Liu, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2 (2010) 670–684.
95. V. Sambhy, M.M. MacBride, B.R. Peterson, A. Sen, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 9798–9808.
96. A. Agarwal, T.L. Weis, M.J. Schurr, N.G. Faith, C.J. Czuprynski, J.F. McAnulty, C.J. Murphy, N.L. Abbott, *Biomaterials*, 31 (2010) 680–690.

97. Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.*, 52 (2000) 662–668.
98. Z.-M. Xiu, J. Ma, P.J.J. Alvarez, *Environ. Sci. Technol.*, 45 (2011) 9003–9008.
99. K. Chaloupka, Y. Malam, A.M. Seifalian, *Trends Biotechnol.*, 28 (2010) 580–588.
100. P.L. Phillips, Q. Yang, S. Davis, E.M. Sampson, J.I. Azeke, A. Hamad, G.S. Schultz, *Int. Wound J.*, 12 (2015) 469–483.
101. A. Klug, Y. Gramlich, M. Rudert, P. Drees, R. Hoffmann, M. Weißenberger, K.P. Kutzner, *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, 29 (2021) 3287–3298.
102. A. Zhao, J. Sun, Y. Liu, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 13 (2023) 1137947.
103. A. Schulze, F. Mitterer, J.P. Pombo, S. Schild, *Microb. Cell*, 8 (2021) 28–56.
104. F.-R.F. Fan, A.J. Bard, *J. Phys. Chem. B*, 106 (2002) 279–287.
105. M. Pollini, F. Paladini, M. Catalano, A. Taurino, A. Licciulli, A. Maffezzoli, A. Sannino, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 22 (2011) 2005–2012.
106. D.R. Monteiro, L.F. Gorup, A.S. Takamiya, A.C. Ruvollo-Filho, E.R. de Camargo, D.B. Barbosa, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 34 (2009) 103–110.
107. A. Menichetti, A. Mavridi-Printezi, D. Mordini, M. Montalti, *J. Funct. Biomater.*, 14 (2023) 244.
108. V.A. Spirescu, C. Chircov, A.M. Grumezescu, B. Ştefan Vasile, E. Andronescu, *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (2021) 4595.
109. U. Backman, J.K. Jokiniemi, A. Auvinen, K.E.J. Lehtinen, *Journal of Nanoparticle Research*, 4 (2002) 325–335.
110. G.A. Martínez-Castañón, N. Niño-Martínez, F. Martínez-Gutierrez, J.R. Martínez-Mendoza, F. Ruiz, *J. Nanopart. Res.*, 10 (2008) 1343–1348.
111. B.J. Wiley, Y. Xiong, Z.-Y. Li, Y. Yin, Y. Xia, *Nano Lett.*, 6 (2006) 765–768.
112. S. Chen, Z. Fan, D.L. Carroll, *J. Phys. Chem. B*, 106 (2002) 10777–10781.
113. Y. Gao, P. Jiang, L. Song, L. Liu, X. Yan, Z. Zhou, D. Liu, J. Wang, H. Yuan, Z. Zhang, X. Zhao, X. Dou, W. Zhou, G. Wang, S. Xie, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 38 (2005) 1061–1067.
114. J. Zeng, Y. Zheng, M. Rycenga, J. Tao, Z.-Y. Li, Q. Zhang, Y. Zhu, Y. Xia, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 8552–8553.
115. G.S. Métraux, C.A. Mirkin, *Adv. Mater.*, 17 (2005) 412–415.
116. A.A. Zinchenko, K. Yoshikawa, D. Baigl, *Adv. Mater.*, 17 (2005) 2820–2823.
117. Y. Xiong, A.R. Siekkinen, J. Wang, Y. Yin, M.J. Kim, Y. Xia, *J. Mater. Chem.*, 17 (2007) 2600.
118. R. Jin, Y. Cao, C.A. Mirkin, K.L. Kelly, G.C. Schatz, J.G. Zheng, *Science*, 294 (2001) 1901–1903.
119. J. Liu, D.A. Sonshine, S. Shervani, R.H. Hurt, *ACS Nano*, 4 (2010) 6903–6913.
120. W. Liu, Y. Wu, C. Wang, H.C. Li, T. Wang, C.Y. Liao, L. Cui, Q.F. Zhou, B. Yan, G.B. Jiang, *Nanotoxicology*, 4 (2010) 319–330.
121. T. Kim, M. Kim, H. Park, U.S. Shin, M. Gong, H. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.*, 100A (2012) 1033–1043.
122. Y.N. Slavin, J. Asnis, U.O. Häfeli, H. Bach, *J. Nanobiotechnol.*, 15 (2017) 65.
123. X. Hong, J. Wen, X. Xiong, Y. Hu, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23 (2016) 4489–4497.
124. D. Goyal, G. Kaur, R. Tewari, R. Kumar, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24 (2017) 20429–20437.
125. C. Noguez, *J. Phys. Chem. C*, 111 (2007) 3806–3819.
126. M. Yamanaka, K. Hara, J. Kudo, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (2005) 7589–7593.

127. V. Alt, T. Bechert, P. Steinrücke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, R. Schnettler, *Biomaterials*, 25 (2004) 4383–4391.
128. H.-J. Park, J.Y. Kim, J. Kim, J.-H. Lee, J.-S. Hahn, M.B. Gu, J. Yoon, *Water Res.*, 43 (2009) 1027–1032.
129. J.A. Kloepper, R.E. Mielke, J.L. Nadeau, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (2005) 2548–2557.
130. Z. Sheng, Y. Liu, *Water Res.*, 45 (2011) 6039–6050.
131. S. Galdiero, A. Falanga, M. Vitiello, M. Cantisani, V. Marra, M. Galdiero, *Molecules*, 16 (2011) 8894–8918.
132. A. Dubnika, D. Loca, V. Rudovica, M.B. Parekh, L. Berzina-Cimdina, *Ceram. Int.*, 43 (2017) 3698–3705.
133. W. He, M. Andersson, The World Scientific Encyclopedia of Nanomedicine and Bioengineering II, WORLD SCIENTIFIC, (2017) New Jersey, SAD.
134. A. Marian, F.D. Ivan, M. Butnaru, L. Verestiuc, 2013 E-Health and Bioengineering Conference (EHB), IEEE, (2013) IASI, Romania, pp. 1–4.
135. G. Wu, Y. Liu, T. Iizuka, E.B. Hunziker, *Tissue Eng. C: Methods*, 16 (2010) 1255–1265.
136. K.A. Majorek, P.J. Porebski, A. Dayal, M.D. Zimmerman, K. Jablonska, A.J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor, *Mol. Immunol.*, 52 (2012) 174–182.
137. S.V. Dorozhkin, *Mater. Sci. Eng. C*, 55 (2015) 272–326.
138. H.B. Wen, J.R. de Wijn, C.A. van Blitterswijk, K. de Groot, *J. Biomed. Mater. Res.*, 46 (1999) 245–252.
139. Y. Liu, E. B. Hunziker, N.X. Randall, K. de Groot, P. Layrolle, *Biomaterials*, 24 (2003) 65–70.
140. S.V. Dorozhkin, E.I. Dorozhkina, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 215 (2003) 191–199.
141. R.A. Mickiewicz, A.M. Mayes, D. Knaack, *J. Biomed. Mater. Res.*, 61 (2002) 581–592.
142. C. Gartner, B.L. López, L. Sierra, R. Graf, H.W. Spiess, M. Gaborieau, *Biomacromolecules*, 12 (2011) 1380–1386.
143. V.E. Tikhonov, E.A. Stepnova, V.G. Babak, I.A. Yamskov, J. Palma-Guerrero, H.-B. Jansson, L.V. Lopez-Llorca, J. Salinas, D.V. Gerasimenko, I.D. Avdienko, V.P. Varlamov, *Carbohydr. Polym.*, 64 (2006) 66–72.
144. E.I. Rabea, M.E.-T. Badawy, C.V. Stevens, G. Smaghe, W. Steurbaut, *Biomacromolecules*, 4 (2003) 1457–1465.
145. J. Wilson, *Fundamental Biomaterials: Metals*, Elsevier, (2018), pp. 1–33.
146. J. Barberi, S. Spriano, *Materials*, 14 (2021) 1590.
147. D. Buser, S.F.M. Janner, J. Wittneben, U. Brägger, C.A. Ramseier, G.E. Salvi, *Clin. Implant. Dent. Rel. Res.*, 14 (2012) 839–851.
148. J.M. Anderson, S. Jiang, B. Corradetti (Ed.), *The Immune Response to Implanted Materials and Devices*, Springer International Publishing, (2017) Cham, pp. 15–36.
149. R. Trindade, T. Albrektsson, P. Tengvall, A. Wennerberg, *Clin. Implant. Dent. Rel. Res.*, 18 (2016) 192–203.
150. J.J. Gray, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14 (2004) 110–115.
151. J.C.M. Souza, M.B. Sordi, M. Kanazawa, S. Ravindran, B. Henriques, F.S. Silva, C. Aparicio, L.F. Cooper, *Acta Biomater.*, 94 (2019) 112–131.
152. L.-C. Zhang, L.-Y. Chen, L. Wang, *Adv. Eng. Mater.*, 22 (2020) 1901258.
153. A. Fukuda, M. Takemoto, T. Saito, S. Fujibayashi, M. Neo, S. Yamaguchi, T. Kizuki, T. Matsushita, M. Niinomi, T. Kokubo, T. Nakamura, *Acta Biomater.*, 7 (2011) 1379–1386.

154. D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*, Springer Berlin Heidelberg, (2001) Berlin, Njemačka.
155. T.Y. Linn, E. Salamanca, C.-Y. Ho, Y.-F. Wu, H.-C. Chiu, W.-J. Chang, Y.-S. Sun, *J. Dent. Sci.*, 20 (2025) 373–383.
156. S.F. Lamolle, M. Monjo, M. Rubert, H.J. Haugen, S.P. Lyngstadaas, J.E. Ellingsen, *Biomaterials*, 30 (2009) 736–742.
157. S. Cho, *Biomaterials*, 24 (2003) 3611–3617.
158. H.B. Wen, Q. Liu, J.R.D. Wijn, K.D. Groot, F.Z. Cui, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 9 (1998) 121–128.
159. C. Elias, Y. Oshida, J. Lima, C. Muller, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 1 (2008) 234–242.
160. H.-M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Nakamura, *J. Biomed. Mater. Res.*, 32 (1996) 409–417.
161. A.C. Carreira, F.H. Lojudice, E. Halcsik, R.D. Navarro, M.C. Sogayar, J.M. Granjeiro, *J. Dent. Res.*, 93 (2014) 335–345.
162. P.-Y. Chen, J. McKittrick, M.A. Meyers, *Prog. Mater. Sci.*, 57 (2012) 1492–1704.
163. J.E. Park, I.-S. Park, M.P. Neupane, T.-S. Bae, M.-H. Lee, *Applied Surface Science*, 292 (2014) 828–836.
164. S. Yao, X. Feng, J. Lu, Y. Zheng, X. Wang, A.A. Volinsky, L.-N. Wang, *Nanotechnology*, 29 (2018) 244003.
165. M.V. Cardoso, J. de Rycker, A. Chaudhari, E. Coutinho, Y. Yoshida, B. Van Meerbeek, M.F. Mesquita, W.J. da Silva, K. Yoshihara, K. Vandamme, J. Duyck, *J. Clin. Periodontol.*, 44 (2017) 950–960.
166. A. Rajyalakshmi, B. Ercan, K. Balasubramanian, T.J. Webster, *Int. J. Nanomed.* (2011) 1765.
167. T. Xue, S. Attarilar, S. Liu, J. Liu, X. Song, L. Li, B. Zhao, Y. Tang, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 8 (2020) 603072.
168. P. Yuan, M. Chen, X. Lu, H. Yang, L. Wang, T. Bai, W. Zhou, T. Liu, S. Yu, *J. Mater. Chem. B*, 12 (2024) 10516–10549.
169. P. Yang, N. Huang, Y. Leng, G. Wan, A. Zhao, J. Chen, J. Wang, H. Sun, *Surf. Coat. Technol.*, 201 (2007) 6828–6832.
170. H. Cao, T. Cui, G. Jin, X. Liu, *Surf. Coat. Technol.*, 256 (2014) 9–14.
171. J. Du, X. Li, K. Li, X. Gu, W. Qi, K. Zhang, *J. Alloys Compd.*, 687 (2016) 893–897.
172. J. Xu, Y. Li, X. Zhou, Y. Li, Z. Gao, Y. Song, P. Schmuki, *Chem. Eur. J.*, 22 (2016) 3947–3951.
173. D. Horkavcová, P. Novák, I. Fialová, M. Černý, E. Jablonská, J. Lipov, T. Ruml, A. Helebrant, *Mater. Sci. Eng. C*, 76 (2017) 25–30.
174. R. Narayanan, S.K. Seshadri, T.Y. Kwon, K.H. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.*, 85B (2008) 279–299.
175. A. Nemati, M. Saghafi, S. Khamseh, E. Alibakhshi, P. Zarrintaj, M.R. Saeb, *Surf. Coatings Technol.*, 349 (2018) 251–259.
176. 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, *Appl. Surf. Sci.*, 463 (2019) 292–299.
177. Y.-P. Lu, G.-Y. Xiao, S.-T. Li, R.-X. Sun, M.-S. Li, *Appl. Surf. Sci.*, 252 (2006) 2412–2421.
178. Y.-P. Lu, Y.-M. Chen, S.-T. Li, J.-H. Wang, *Acta Biomater.*, 4 (2008) 1865–1872.

179. A.K. Lynn, D.L. DuQuesnay, *Biomaterials*, 23 (2002) 1947–1953.
180. Y.-P. Lee, C.-K. Wang, T.-H. Huang, C.-C. Chen, C.-T. Kao, S.-J. Ding, *Surf. Coat. Technol.*, 197 (2005) 367–374.
181. J. Katić, S. Krivačić, Ž. Petrović, D. Mikić, M. Marciuš, *Coatings*, 13 (2023) 640.
182. T. Mokabber, H.T. Cao, N. Norouzi, P. van Rijn, Y.T. Pei, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 12 (2020) 5531–5541.
183. I.V. Vrček, I. Pavičić, T. Crnković, D. Jurašin, M. Babić, D. Horák, M. Lovrić, L. Ferhatović, M. Ćurlin, S. Gajović, *RSC Adv.*, 5 (2015) 70787–70807.
184. D.D. Jurašin, M. Ćurlin, I. Capjak, T. Crnković, M. Lovrić, M. Babić, D. Horák, I. Vinković Vrček, S. Gajović, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 7 (2016) 246–262.
185. C.H. Munro, W.E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P.C. White, *Langmuir*, 11 (1995) 3712–3720.
186. I. Capjak, M. Zebić Avdičević, M.D. Sikirić, D. Domazet Jurašin, A. Hozić, D. Pajić, S. Dobrović, W. Goessler, I. Vinković Vrček, *Environ. Sci.: Water Res. Technol.*, 4 (2018) 2146–2159.
187. I. Erceg, M. Dutour Sikirić, *Minerals*, 12 (2022) 1557.
188. H.B. Wen, J. van den Brink, J.R. de Wijn, F.Z. Cui, K. de Groot, *J. Cryst. Growth*, 186 (1998) 616–623.
189. M.D. Sikirić, C. Gergely, R. Elkaim, E. Wachtel, F.J.G. Cuisinier, H. Füredi-Milhofer, *J. Biomed. Mater. Res.*, 89A (2009) 759–771.
190. P.A. Hassan, S. Rana, G. Verma, *Langmuir*, 31 (2015) 3–12.
191. S. Bhattacharjee, *JCR*, 235 (2016) 337–351.
192. R. Biswas, *ARR*, 5 (2019).
193. B. Welz, M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd ed., Wiley-VCH, (1998) Weinheim, Njemačka.
194. A.A. Ammann, *J. Mass Spectrom.*, 42 (2007) 419–427.
195. P. Bar-Yosef Ofir, R. Govrin-Lippman, N. Garti, H. Füredi-Milhofer, *Cryst. Growth Des.*, 4 (2004) 177–183.
196. C. Giacovazzo, Internationale Union für Kristallographie, eds., *Fundamentals of Crystallography*, Repr, Internat. Union of Crystallography, (2000) New York.
197. Vukoman Jakanović, *Instrumentalne metode ključ razumevanja nanotehnologije i nanomedicine*, Inženjerska Akademija Srbije i Institut za nuklearne nauke “Vinča,” (2014) Beograd, Srbija.
198. V. Uskoković, *Vib. Spectrosc.*, 108 (2020) 103045.
199. J.C. Vickerman, I.S. Gilmore, eds., *Surface Analysis: The Principal Techniques*, 2nd ed, Wiley, (2009) Chichester, U.K.
200. A.W. Coats, J.P. Redfern, *Analyst*, 88 (1963) 906.
201. D. Dollimore, P. Spooner, A. Turner, *Surf. Technol.*, 4 (1976) 121–160.
202. S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.*, 178 (2006) 42–55.
203. M. Majer, M. Roguljić, Ž. Knežević, A. Starodumov, D. Ferenček, V. Brigljević, B. Mihaljević, *Appl. Radiat. Isot.*, 154 (2019) 108824.
204. *Guidelines for Industrial Radiation Sterilization of Disposable Medical Products (Cobalt-60 Gamma Irradiation)*, International Atomic Energy Agency, (1990) Beč, Austrija.
205. *Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control*, International Atomic Energy Agency, (2007) Beč, Austrija.
206. Stanislav Kurajica, Sanja Lučić Blagojević, *Uvod u nanotehnologiju*, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, (2017).

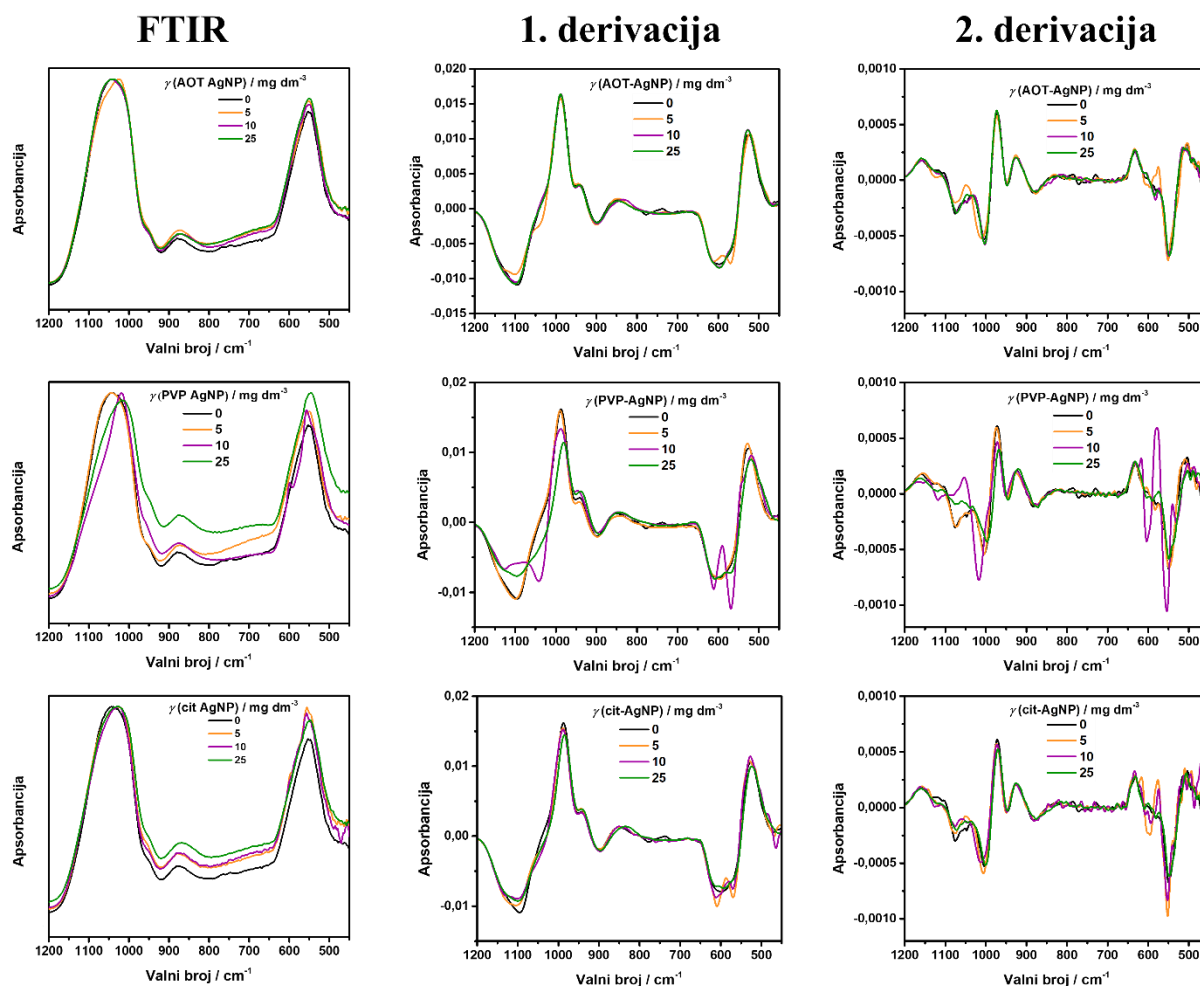
207. F. Farahi, J.L. Santos, Handbook of Optical Sensors, CRC Press, Taylor & Francis Group, (2014) Boca Raton, SAD.
208. G. Bracco, B. Holst, eds., Surface Science Techniques, Springer Berlin Heidelberg, (2013) Berlin, Heidelberg.
209. D.K. Owens, R.C. Wendt, *J. Appl. Polym. Sci.*, 13 (1969) 1741–1747.
210. D.H. Kaelble, *J. Adhes.*, 2 (1970) 66–81.
211. L. Wang, G.H. Nancollas, *Dalton Trans.* (2009) 2665.
212. A. Selmani, I. Coha, K. Magdić, B. Čolović, V. Jokanović, S. Šegota, S. Gajović, A. Gajović, D. Jurašin, M. Dutour Sikirić, *CrystEngComm*, 17 (2015) 8529–8548.
213. S. Li, L. Wang, *CrystEngComm*, 14 (2012) 8037.
214. J.N. Miller, J.C. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6th ed, Prentice Hall/Pearson, (2010) Harlow.
215. D. Wei, W. Qian, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 62 (2008) 136–142.
216. N. Akaighe, S.W. Depner, S. Banerjee, V.K. Sharma, M. Sohn, *Sci. Total Environ.*, 441 (2012) 277–289.
217. Md.A. Huq, Md. Ashrafudoulla, Md.A.K. Parvez, S.R. Balusamy, Md.M. Rahman, J.H. Kim, S. Akter, *Polymers*, 14 (2022) 5302.
218. J. Kong, S. Yu, *ABBS*, 39 (2007) 549–559.
219. E. Bronze-Uhle, B.C. Costa, V.F. Ximenes, P.N. Lisboa-Filho, *Nanotechnol. Sci. Appl.*, Volume 10 (2016) 11–21.
220. S.S. Rohiwal, R.K. Satvekar, A.P. Tiwari, A.V. Raut, S.G. Kumbhar, S.H. Pawar, *Appl. Surf. Sci.*, 334 (2015) 157–164.
221. M.H. Çalimli, Ö. Demirbaş, A. Aygün, M.H. Alma, M.S. Nas, F. Şen, *Appl. Water. Sci.*, 8 (2018) 209.
222. A. Gebregeorgis, C. Bhan, O. Wilson, D. Raghavan, *J. Colloid Interface Sci.*, 389 (2013) 31–41.
223. R.H. Marchessault, F. Ravenelle, X.X. Zhu, eds., Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications, American Chemical Society, (2006) Washington, DC, SAD.
224. C. Paluszkievicz, E. Stodolak, M. Hasik, M. Blazewicz, *SAA*, 79 (2011) 784–788.
225. M. Darder, M. Colilla, E. Ruiz-Hitzky, *Chem. Mater.*, 15 (2003) 3774–3780.
226. H. Kaczmarek, J. Zawadzki, *Carbohydr. Res.*, 345 (2010) 941–947.
227. P. Hong, S. Li, C. Ou, C. Li, L. Yang, C. Zhang, *J. Appl. Polym. Sci.*, 105 (2007) 547–551.
228. H. Füredi-Milhofer, B. Purgarić, Lj. Brečević, N. Pavković, *Calc. Tis Res.*, 8 (1971) 142–153.
229. L.-W. Du, S. Bian, B.-D. Gou, Y. Jiang, J. Huang, Y.-X. Gao, Y.-D. Zhao, W. Wen, T.-L. Zhang, K. Wang, *Cryst. Growth Des.*, 13 (2013) 3103–3109.
230. H. Ding, H. Pan, X. Xu, R. Tang, *Cryst. Growth Des.*, 14 (2014) 763–769.
231. C.-G. Wang, J.-W. Liao, B.-D. Gou, J. Huang, R.-K. Tang, J.-H. Tao, T.-L. Zhang, K. Wang, *Cryst. Growth Des.*, 9 (2009) 2620–2626.
232. Y. Chen, W. Gu, H. Pan, S. Jiang, R. Tang, *CrystEngComm*, 16 (2014) 1864–1867.
233. I. Erceg, A. Selmani, A. Gajović, B. Radatović, S. Šegota, M. Ćurlin, V. Strasser, J. Kontrec, D. Kralj, N. Maltar-Strmečki, R. Barbir, B. Pem, I. Vinković Vrček, M. Dutour Sikirić, *Nanomaterials*, 11 (2021) 1523.
234. I. Erceg, A. Selmani, A. Gajović, I. Panžić, D. Iveković, F. Faraguna, S. Šegota, M. Ćurlin, V. Strasser, J. Kontrec, D. Kralj, N. Maltar Strmečki, M. Dutour Sikirić, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 593 (2020) 124615.

235. I. Buljan Meić, J. Kontrec, D. Domazet Jurašin, B. Njegić Džakula, L. Štajner, D.M. Lyons, M. Dutour Sikirić, D. Kralj, *Cryst. Growth Des.*, 17 (2017) 1103–1117.
236. S.V. Dorozhkin, *Acta Biomater.*, 6 (2010) 4457–4475.
237. C. Combes, C. Rey, *Acta Biomater.*, 6 (2010) 3362–3378.
238. X. Yang, B. Xie, L. Wang, Y. Qin, Z.J. Henneman, G.H. Nancollas, *CrystEngComm*, 13 (2011) 1153–1158.
239. B. Xie, T.J. Halter, B.M. Borah, G.H. Nancollas, *Cryst. Growth Des.*, 14 (2014) 1659–1665.
240. X. Yang, L. Wang, Y. Qin, Z. Sun, Z.J. Henneman, J. Moradian-Oldak, G.H. Nancollas, *J. Phys. Chem. B*, 114 (2010) 2293–2300.
241. C.-M. Xie, X. Lu, K.-F. Wang, F.-Z. Meng, O. Jiang, H.-P. Zhang, W. Zhi, L.-M. Fang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6 (2014) 8580–8589.
242. S.-C. Liou, S.-Y. Chen, H.-Y. Lee, J.-S. Bow, *Biomaterials*, 25 (2004) 189–196.
243. M.D. Sikirić, H. Füredi-Milhofer, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 128–130 (2006) 135–158.
244. S. Koutsopoulos, *J. Biomed. Mater. Res.*, 62 (2002) 600–612.
245. C. Mochales, R.M. Wilson, S.E.P. Dowker, M.-P. Ginebra, *J. Alloys Compd.*, 509 (2011) 7389–7394.
246. C. Drouet, *BioMed Research International*, 2013 (2013) 1–12.
247. B.O. Fowler, M. Markovic, W.E. Brown, *Chem. Mater.*, 5 (1993) 1417–1423.
248. M. Mir, S. Anwar Siddiqi, T. Hussain, A. Anwar Chaudhry, I. Ur Rehman, A.S. Khan, G. Abbas, *Ceram. Int.*, 40 (2014) 10719–10725.
249. K. Tõnsuaadu, K.A. Gross, L. Plūduma, M. Veiderma, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 110 (2012) 647–659.
250. S. Lazić, S. Zec, N. Miljević, S. Milonjić, *Thermochim. Acta*, 374 (2001) 13–22.
251. H. Shi, X. Ye, J. Zhang, T. Wu, T. Yu, C. Zhou, J. Ye, *Bioact. Mater.*, 6 (2021) 1267–1282.
252. V.I. Putlyaev, E.V. Kukueva, T.V. Safronova, V.K. Ivanov, B.R. Churagulov, *Refract. Ind. Ceram.*, 54 (2014) 420–424.
253. K.A. Murray, N. Döbelin, A.B. Albadarin, J. Sadlo, G. Ren, M.N. Collins, C. O'Neill, *Octacalcium Phosphate Biomaterials*, Elsevier, (2020), pp. 55–84.
254. B. Adebayo-Tayo, A. Salaam, A. Ajibade, *Heliyon*, 5 (2019) e02502.
255. M.A. Majeed Khan, S. Kumar, M. Ahamed, S.A. Alrokayan, M.S. AlSalhi, *Nanoscale Res. Lett.*, 6 (2011) 434.
256. A. Lebugle, E. Zahidi, G. Bonel, *React. Solids*, 2 (1986) 151–161.
257. C. Guo, J. Xue, Y. Tan, Y. Dong, *Micro Nano Lett.*, 11 (2016) 391–394.
258. F.J. Callens, R.M. Verbeeck, P.F. Matthys, L.C. Martens, E.R. Boesman, *Calcif. Tissue Int.*, 41 (1987) 124–129.
259. P. Cevc, M. Schara, Č. Ravnik, C. Ravnik, *Radiat. Res.*, 51 (1972) 581.
260. I. Erceg, N. Maltar-Strmečki, D.D. Jurašin, V. Strasser, M. Čurlin, D.M. Lyons, B. Radatović, N.M. Mlinarić, D. Kralj, M.D. Sikirić, *Crystals*, 11 (2021) 792.
261. F.F. Murzakhanov, P.O. Grishin, M.A. Goldberg, B.V. Yavkin, G.V. Mamin, S.B. Orlinskii, A.Yu. Fedotov, N.V. Petrakova, A. Antuzevics, M.R. Gafurov, V.S. Komlev, *Appl. Sci.*, 11 (2021) 7727.
262. F. Murzakhanov, G.V. Mamin, S. Orlinskii, M. Goldberg, N.V. Petrakova, A.Y. Fedotov, P. Grishin, M.R. Gafurov, V.S. Komlev, *ACS Omega*, 6 (2021) 25338–25349.
263. M. Gafurov, B. Yavkin, G. Mamin, S. Orlinskii, I. Smirnov, A. Fedotov, V. Komlev, *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 155 (2018) 012018.

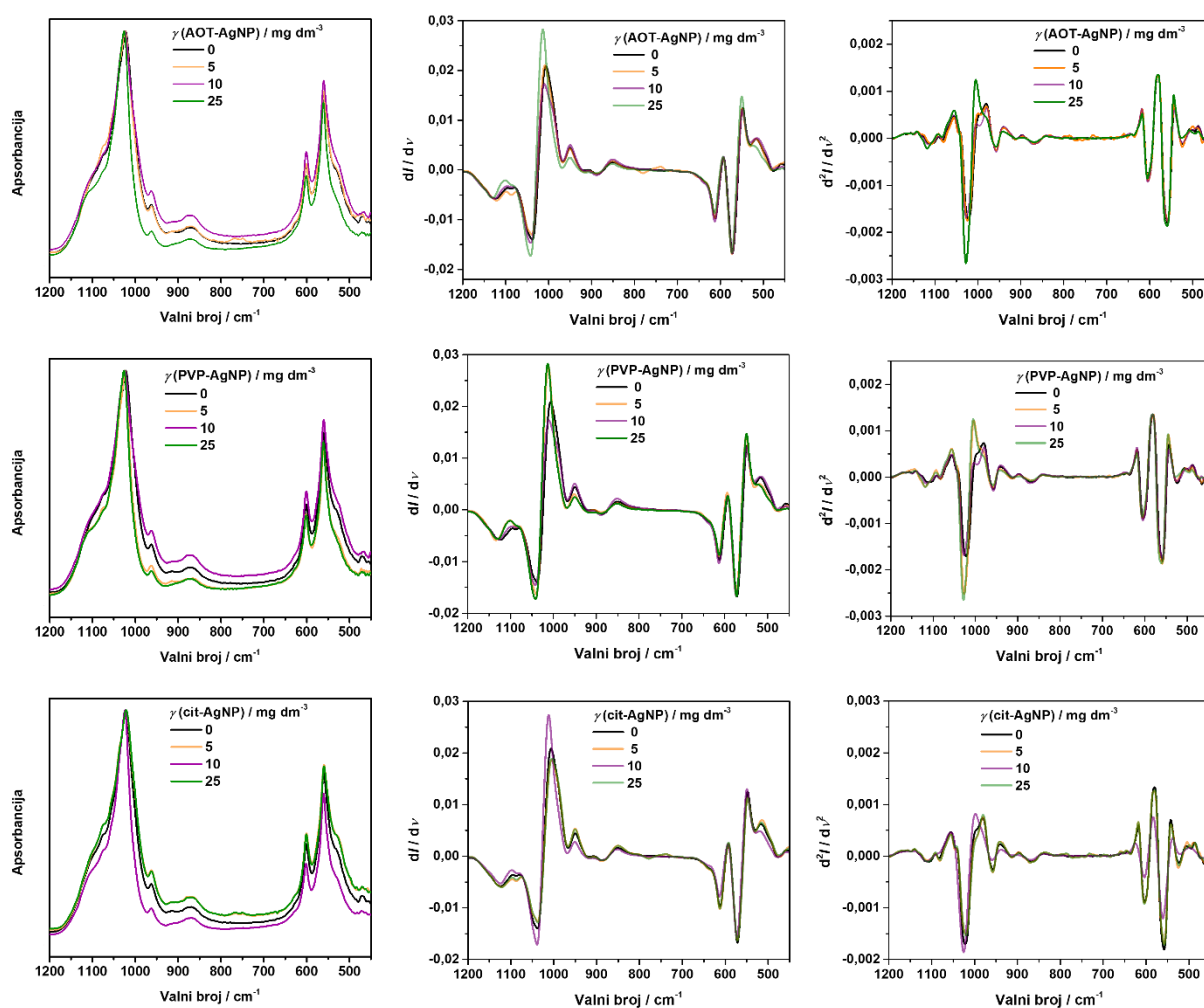
264. D.V. Shurtakova, B.V. Yavkin, G.V. Mamin, S.B. Orlinskii, V.P. Sirotinkin, A.Yu. Fedotov, A. Shinkarev, A. Antuzevics, I.V. Smirnov, V.I. Tovtin, E.E. Starostin, M.R. Gafurov, V.S. Komlev, *Radiat. Res.*, 195 (2020).
265. F. Callens, G. Vanhaelewyn, P. Matthys, E. Boesman, *Appl. Magn. Reson.*, 14 (1998) 235–254.
266. R. Grün, R. Joannes-Boyau, C. Stringer, *Quat. Geochronol.*, 3 (2008) 150–172.
267. P.N. Lim, L. Chang, B.Y. Tay, V. Guneta, C. Choong, B. Ho, E.S. Thian, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6 (2014) 17082–17092.
268. M. Honda, Y. Kawanobe, K. Ishii, T. Konishi, M. Mizumoto, N. Kanzawa, M. Matsumoto, M. Aizawa, *Mater. Sci. Eng. C*, 33 (2013) 5008–5018.
269. W.J.E.M. Habraken, J. Tao, L.J. Brylka, H. Friedrich, L. Bertinetti, A.S. Schenk, A. Verch, V. Dmitrovic, P.H.H. Bomans, P.M. Frederik, J. Laven, P. van der Schoot, B. Aichmayer, G. de With, J.J. DeYoreo, N.A.J.M. Sommerdijk, *Nat. Commun.*, 4 (2013) 1507.
270. S. Inkret, M. Ćurlin, K. Smokrović, N. Kalčec, N. Peranić, N. Maltar-Strmečki, D. Domazet Jurašin, M. Dutour Sikirić, *Materials*, 16 (2023) 1764.
271. Y. Liu, P. Layrolle, J. de Bruijn, C. van Blitterswijk, K. de Groot, *J. Biomed. Mater. Res.*, 57 (2001) 327–335.
272. C.G. Aimoli, D.O. de Lima, M.M. Beppu, *Materials Science and Engineering: C*, 28 (2008) 1565–1571.
273. I.V. Fadeeva, S.M. Barinov, A.Yu. Fedotov, V.S. Komlev, *Dokl. Chem.*, 441 (2011) 387–390.
274. X. Lin, L. Zhou, S. Li, H. Lu, X. Ding, *Biomed. Mater.*, 9 (2013) 015002.
275. S. Ban, Y. Iwaya, H. Kono, H. Sato, *Dental Materials*, 22 (2006) 1115–1120.
276. N.J. Hallab, K.J. Bundy, K. O'Connor, R.L. Moses, J.J. Jacobs, *Tissue Eng.*, 7 (2001) 55–71.
277. Z. Wei, M.-F. He, Y.-P. Zhao, *J. Adhes. Sci. Technol.*, 24 (2010) 1045–1054.
278. L. Mei, H.J. Busscher, H.C. van der Mei, Y. Ren, *Dent. Mater.*, 27 (2011) 770–778.
279. J. Krysa, R. Mraz, *Electrochimica Acta*, 40 (1995) 1997–2003.
280. K. Videm, S. Lamolle, M. Monjo, J.E. Ellingsen, S.P. Lyngstadaas, H.J. Haugen, *Appl. Surf. Sci.*, 255 (2008) 3011–3015.
281. A. Nagaoka, K. Yokoyama, J. Sakai, *Corros. Sci.*, 52 (2010) 1130–1138.
282. L. Bolzoni, F. Yang, *Phys. Scr.*, 99 (2024) 065024.
283. E.J. Ekoi, A. Gowen, R. Dorrepaal, D.P. Dowling, *Results Phys.*, 12 (2019) 1574–1585.
284. T. Ohsaka, F. Izumi, Y. Fujiki, *J. Raman Spectrosc.*, 7 (1978) 321–324.
285. D.V. Kilpadi, G.N. Raikar, J. Liu, J.E. Lemons, Y. Vohra, J.C. Gregory, *J. Biomed. Mater. Res.*, 40 (1998) 646–659.
286. W.F. Zhang, Y.L. He, M.S. Zhang, Z. Yin, Q. Chen, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 33 (2000) 912–916.
287. G. Altankov, F. Grinnell, T. Groth, *J. Biomed. Mater. Res.*, 30 (1996) 385–391.
288. L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, C. Martelet, *Mater. Sci. Eng. C*, 23 (2003) 551–560.
289. I.A. Karampas, C.G. Kontoyannis, *Vib. Spectrosc.*, 64 (2013) 126–133.
290. P. Larkin, *Infrared and Raman Spectroscopy*, Elsevier, (2011), pp. 1–5.
291. F.S. Souza, M.J.S. Matos, B.R.L. Galvão, A.F.C. Arapiraca, S.N. da Silva, I.P. Pinheiro, *Chemical Physics Letters*, 714 (2019) 143–148.
292. M.S. Đozić, M. Mitrić, V.B. Mišković-Stanković, *J. Serb. Chem. Soc.*, 80 (2015) 237–251.

-
293. J.-W. Park, J.-H. Jang, C.S. Lee, T. Hanawa, *Acta Biomater.*, 5 (2009) 2311–2321.
294. P.D. Moran, G.A. Bowmaker, R.P. Cooney, J.L. Woolfreyb, *J. Mater. Chem.*, 5 (1995).
295. S. Moradi, N. Hadjesfandiari, S.F. Toosi, J.N. Kizhakkedathu, S.G. Hatzikiriakos, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8 (2016) 17631–17641.
296. E. El Chaar, L. Zhang, Y. Zhou, R. Sandgren, J.-C. Fricain, M. Dard, B. Pippenger, S. Catros, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 34 (2019) 443–450.
297. S. Areva, T. Peltola, E. Säilynoja, K. Laajalehto, M. Lindén, J.B. Rosenholm, *Chem. Mater.*, 14 (2002) 1614–1621.
298. V.J.C. Lin, J.L. Koenig, *Biopolymers*, 15 (1976) 203–218.
299. M. Głąb, S. Kudłacik-Kramarczyk, A. Drabczyk, A. Kordyka, M. Godzierz, P.S. Wróbel, A. Tomala, B. Tyliszczak, A. Sobczak-Kupiec, *J. Biomed. Mater. Res.*, 110 (2022) 2649–2666.

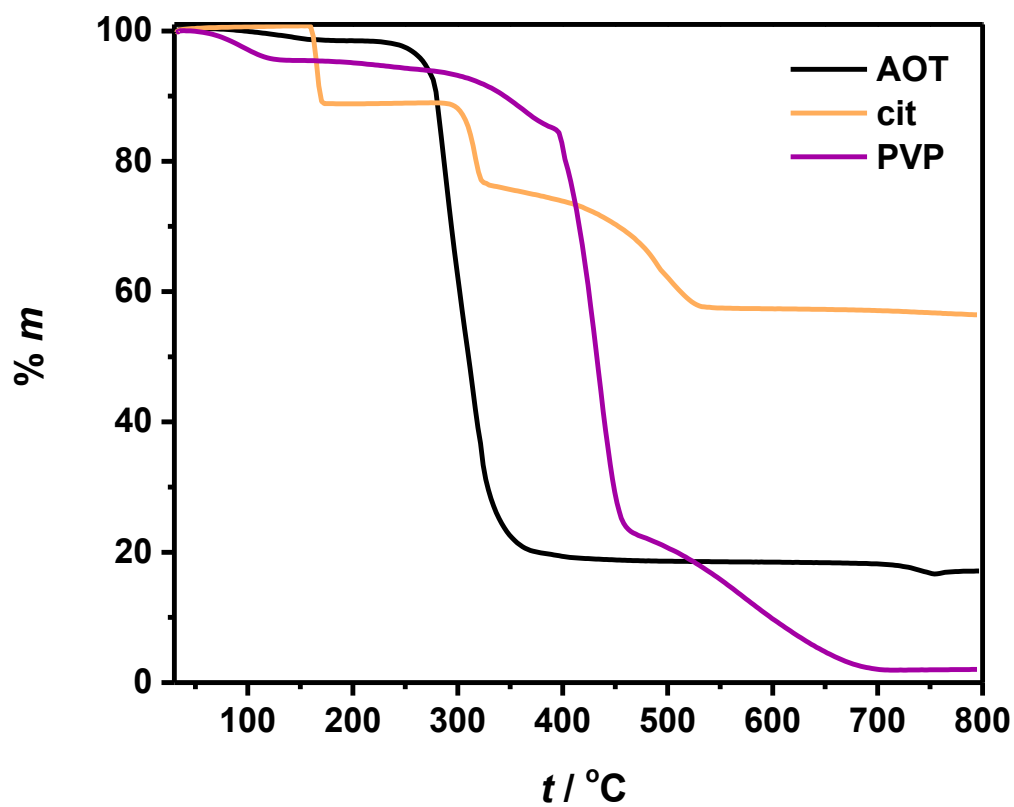
§ 8. DODATAK



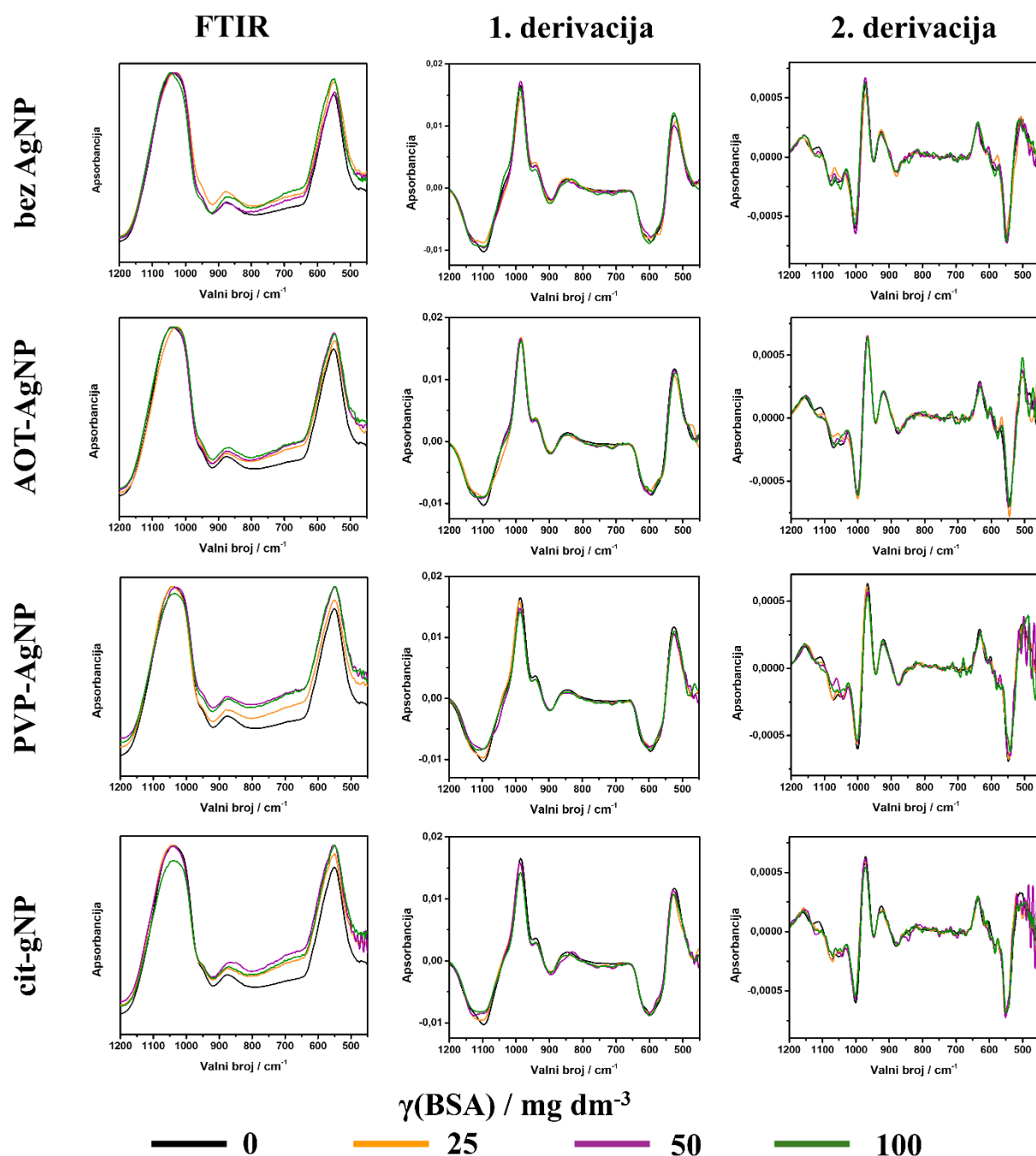
Slika D1. Područje vibracija fosfatnih skupina u spektrima infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) i odgovarajuće prve i druge derivacije spektara taloga dobivenog nakon 10 minuta reakcije taloženja u kontrolnom sustavu bez prisustva nanočestica srebra (AgNP) i u taložnim sustavima u prisutnosti različitih koncentracija nanočestica srebra stabiliziranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i citratom (cit-AgNP) pri početnom pH 7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.



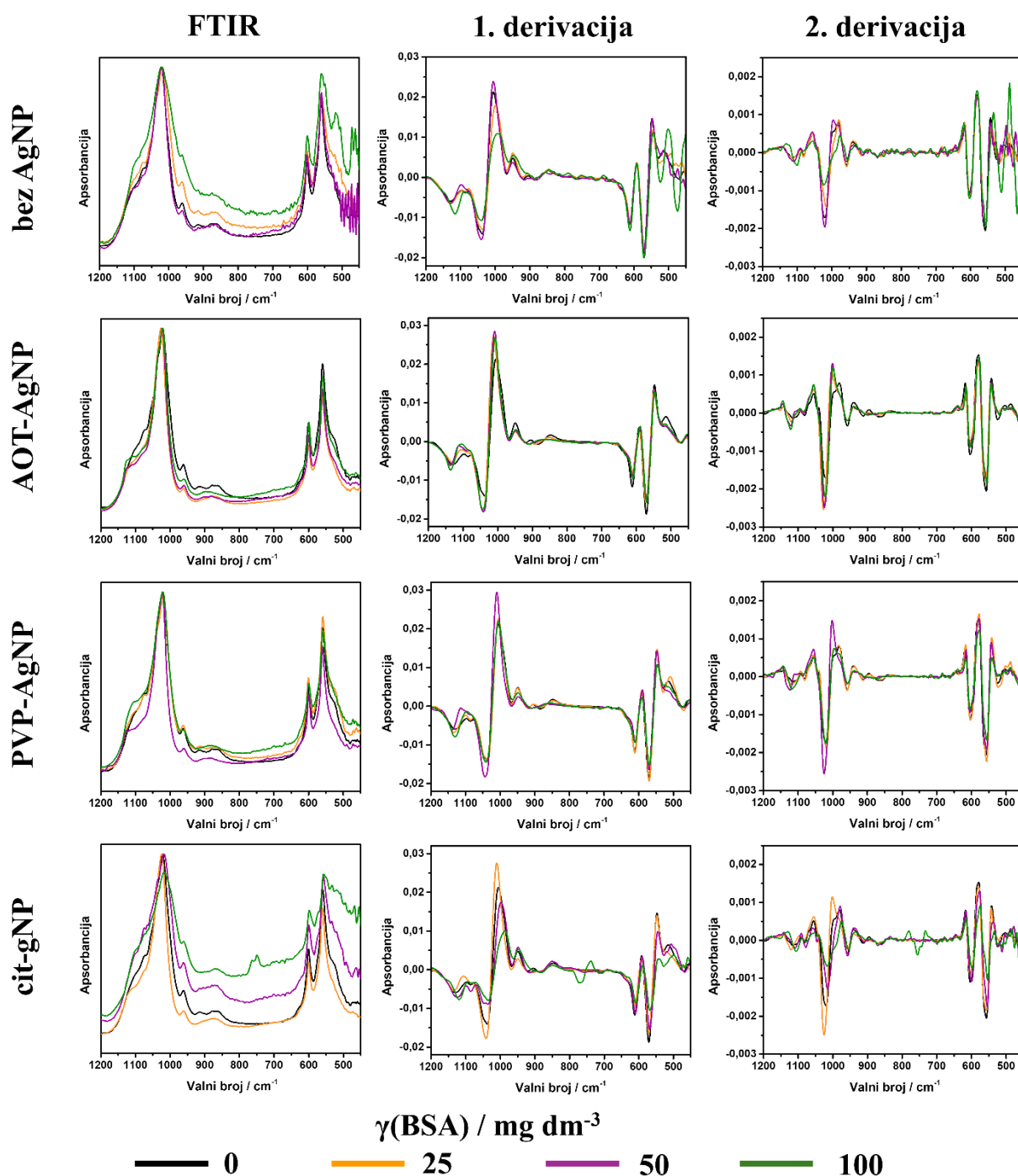
Slika D2. Područje vibracija fosfatnih skupina u spektarima infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) i odgovarajuće prve i druge derivacije spektara taloga dobivenog nakon 60 minuta reakcije taloženja u kontrolnom sustavu bez prisustva nanočestica srebra (AgNP) i u taložnim sustavima u prisutnosti različitih koncentracija nanočestica srebra stabiliziranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i citratom (cit-AgNP) pri početnom pH 7,4 i 25 °C. $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.



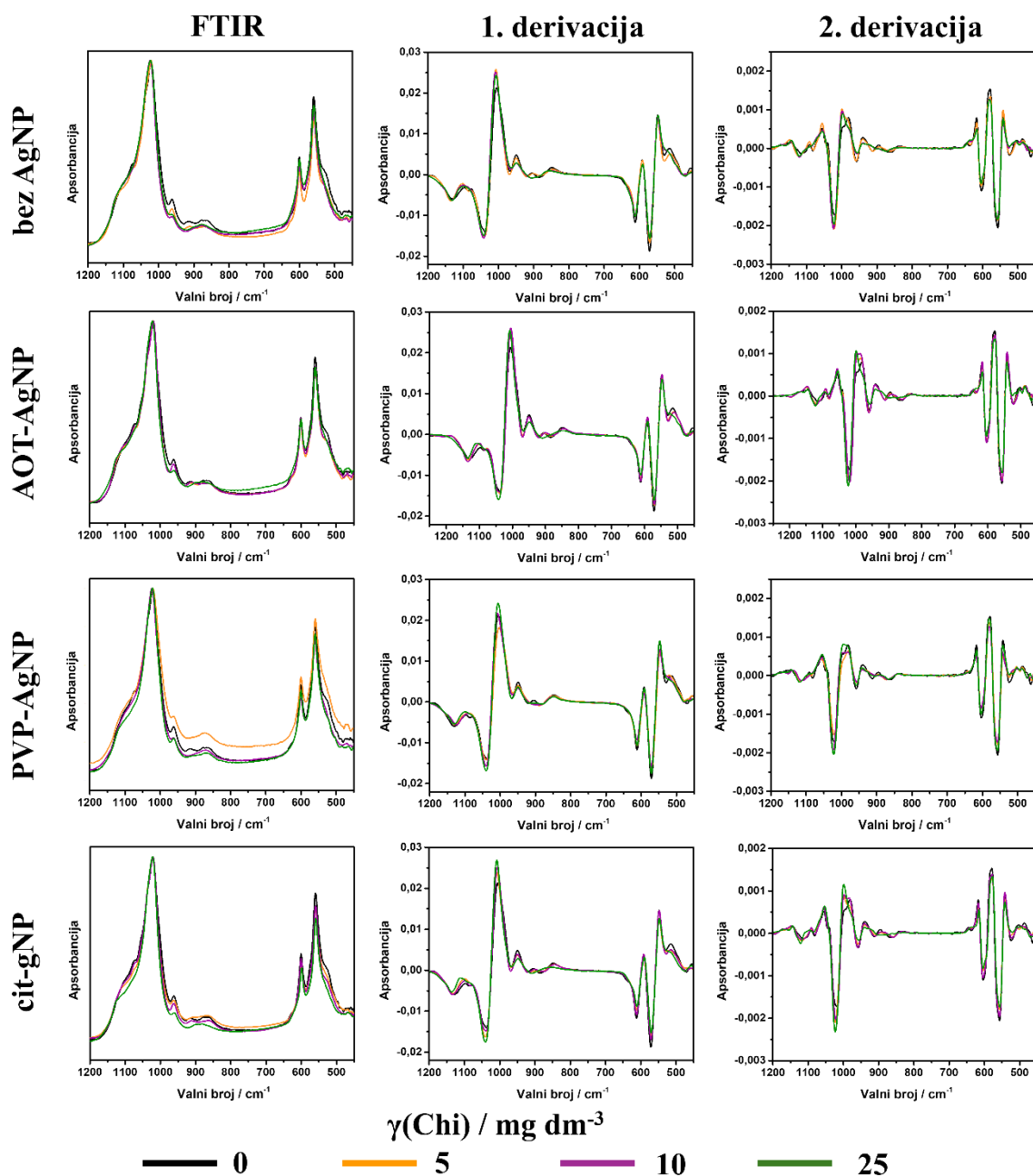
Slika D3. Termogrami stabilizatora nanočestica srebra. AOT – natrijev bis(2-etilheksil)sulfosukcinat, PVP – poli(vinilpirolidon), cit – citrat.



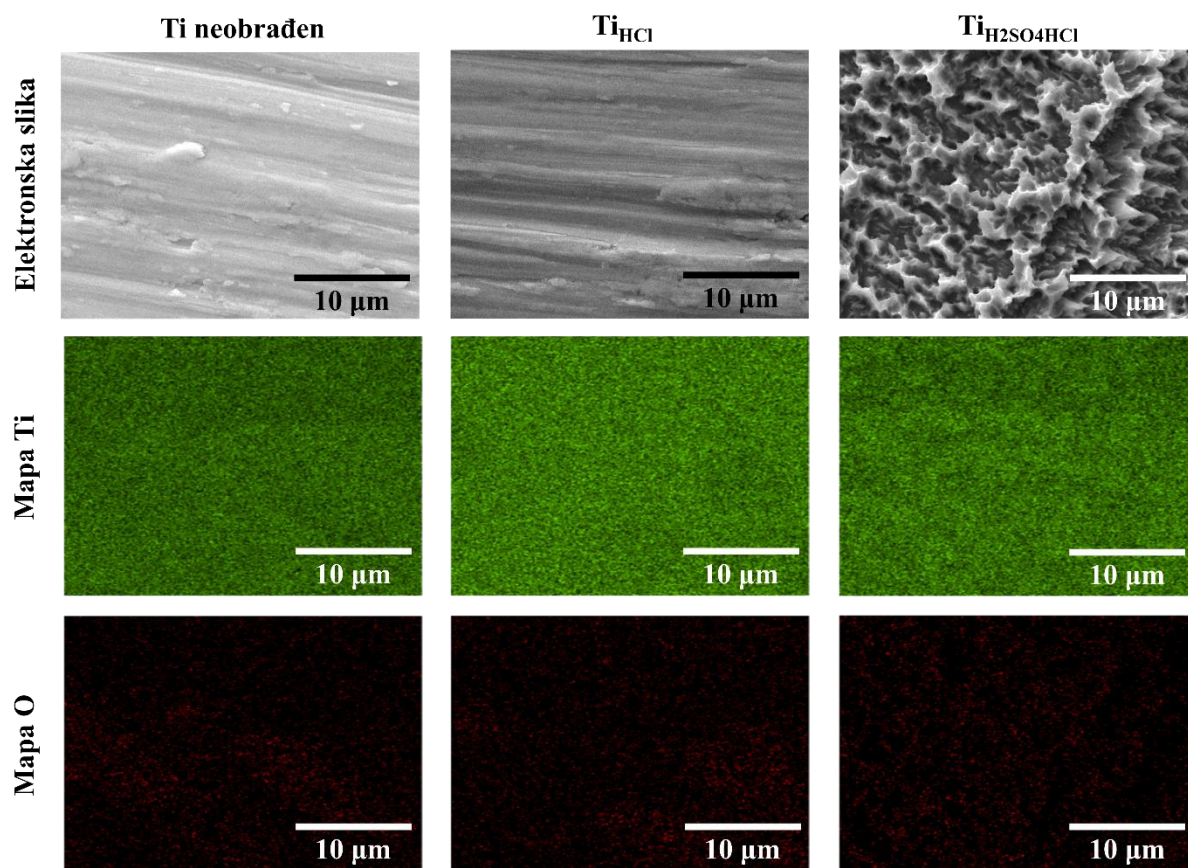
Slika D4. Područje vibracija fosfatnih skupina u spektrima infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) i odgovarajuće prve i druge derivacije spektara taloga dobivenog nakon 15 minuta reakcije taloženja u kontrolnom sustavu bez prisustva nanočestica srebra (AgNP) i u taložnim sustavima u prisutnosti različitih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) i 10 mg dm^{-3} nanočestica srebra stabiliziranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i citratom (cit-AgNP) pri početnom pH 7,4 i 25°C . $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.



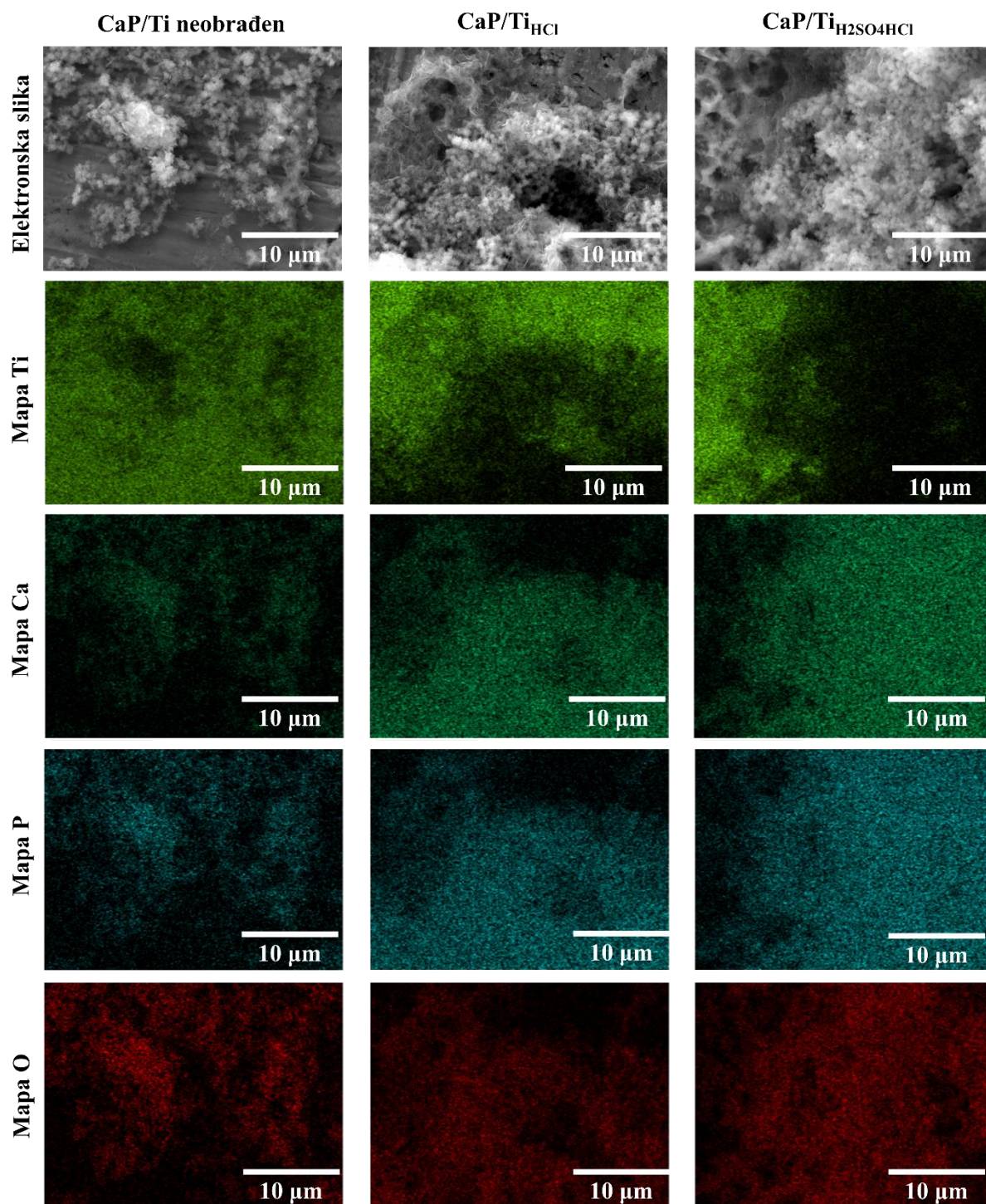
Slika D5. Područje vibracija fosfatnih skupina u spektarima infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) i odgovarajuće prve i druge derivacije spektara kristalnih produkata reakcije taloženja u kontrolnom sustavu bez prisustva nanočestica srebra (AgNP) i u taložnim sustavima u prisutnosti različitih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) i 10 mg dm^{-3} nanočestica srebra stabiliziranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i citratom (cit-AgNP) pri početnom pH 7,4 i 25°C . $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika D6. Područje vibracija fosfatnih skupina u spektarima infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) i odgovarajuće prve i druge derivacije spektara kristalnih produkata reakcije taloženja u kontrolnom sustavu bez prisustva nanočestica srebra (AgNP) i u taložnim sustavima u prisutnosti različitih koncentracija kitozana (Chi) i 10 mg dm^{-3} nanočestica srebra stabiliziranih natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT-AgNP), poli(vinilpirolidonom) (PVP-AgNP) i citratom (cit-AgNP) pri početnom pH 7,4 i 25°C . $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika D7. EDX mapa neobrađenih površina titanija i površina titanija jetkanih HCl-om 1 h pri sobnoj temperaturi (Ti_{HCl}) te jetkanih smjesom H₂SO₄/HCl 1 h pri 60 °C (Ti_{H₂SO₄/HCl})



Slika D8. EDX mapa prevlaka kalcijevih fosfata (CaP) na neobrađenoj površini titanija (CaP/Ti neobrađen), površini titanija jetkanog HCl-om 1 h pri sobnoj temperaturi (CaP/Ti_{HCl}) i površini titanija jetkanog smjesom H₂SO₄/HCl ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 1$) 1 h pri 60 °C (CaP/Ti_{H₂SO₄/HCl})

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezima: Suzana Inkret

Datum rođenja: 14. ožujka 1998.

Mjesto rođenja: Zabok

Obrazovanje

- | | |
|---------------|--|
| 2004. – 2012. | Osnovna škola Side Košutić Radoboj |
| 2012. – 2016. | Srednja škola Krapina, jezična gimnazija |
| 2016. – 2019. | Preddiplomski studij Kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu |
| 2019. – 2021. | Diplomski studij Kemija – smjer istraživački, grane biokemija i analitička kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu |
| 2022. – | Doktorski studij Kemija – smjer anorganska i strukturna kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu |

Znanstveni radovi

1. S. Inkret, M. Ćurlin, K. Smokrović, N. Kalčec, N. Peranić, N. Maltar-Strmečki, D. Domazet Jurašin, M. Dutour Sikirić. *Mater.* **16** (2023), 5;1764, 23.
2. S. Inkret, I. Erceg, M. Ćurlin, N. Kalčec, N. Peranić, I. Vinković Vrček, D. Domazet Jurašin, M. Dutour Sikirić. *RSC Adv.* **13** (2023), 17384 – 17397.

Projekti

Projekt odlazne mobilnosti doktoranda – MOBDOK-2023-4472, uloga voditelja.

➤ trajanje: 02.04. – 28.06.2024.

Usavršavanja

1. Winter Workshop 2023, American Ceramic Society, Daytona Beach, Florida, SAD, 20.01. – 22.01.2023..

2. Innovations Institut für Nanotechnologie und Korrelative Mikroskopie, INAM, Fraunhofer-Institut für keramische Technologien und Systeme, IKTS. – usavršavanje u sklopu projekta mobilnosti MOBDOK-2023-4472. Forchheim, Njemačka, 02.04. – 28.06.2024.

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. S. Inkret, N. Radmilović, K. Smokrović, N. Maltar Strmečkia, M. Dutour Sikirić. Influence of differently stabilized silver nanoparticles on calcium phosphate formation and transformation // Solutions in Chemistry: Book of Abstracts. Sveti Martin na Muri, Croatian Chemical Society, 2022. str. 94 – 94.
2. S. Inkret, M. Ćurlin, M. Dutour Sikirić. Influence of BSA on formation of calcium phosphates and silver nanoparticles composites // 16th Christmas Biophysics Workshop, Book of Abstracts. Kranj, 2022. str. 19 – 19.
3. S. Inkret, M. Ćurlin, I. Erceg, M. Dutour Sikirić. Comparison of the influence of bovine serum albumin and chitosan on the formation of calcium phosphates and silver nanoparticles composites // 3rd YCN Workshop, Aveiro, Portugal, 19.04. – 21.04.2023.
4. S. Inkret, K. Bojanić, M. Dutour Sikirić. Combined influence of silver nanoparticles and biomacromolecules on calcium phosphates precipitation and antibacterial activity // 17th Christmas Biophysics Workshop, Book of Abstracts, 2023., str. 8 – 8.
5. S. Inkret, I. Erceg, S. Christiansen, M. Dutour Sikirić. Influence of titanium surface modifications on formation of composite calcium phosphates/silver nanoparticles coatings // European Microscopy Congress, Copenhagen, Danska, 25.08. – 30.08.2024.
6. S. Inkret, I. Erceg, K. Bojanić, S. Christiansen, M. Dutour Sikirić. Calcium phosphates/silver nanoparticles composite coatings on the titanium surface – properties and antibacterial activity // RiChem2025: Book of Abstracts. Rijeka, Hrvatsko kemijsko društvo, 2025. str. 11 – 11.

Članstva u društvima

- Hrvatsko kemijsko društvo,
- Hrvatsko mikroskopijsko društvo,
- Hrvatsko društvo za keramičke materijale,
- Hrvatsko biofizičko društvo.