

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Sanja G. Eraković

**ELEKTROFORETSKO TALOŽENJE I  
KARAKTERIZACIJA  
HIDROKSIAPATIT/LIGNIN I  
SREBRO/HIDROKSIAPATIT/LIGNIN  
PREVLAKA NA TITANU**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Sanja G. Eraković

**ELECTROPHORETIC DEPOSITION AND  
CHARACTERIZATION OF  
HYDROXYAPATITE/LIGNIN AND  
SILVER/HYDROXYAPATITE/LIGNIN  
COATINGS ON TITANIUM**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

**Mentor:** \_\_\_\_\_  
Dr Vesna Mišković-Stanković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**Članovi komisije:** \_\_\_\_\_  
Dr Tatjana Stevanović, redovni profesor  
Laval Univerzitet, Kvebek, Kanada

\_\_\_\_\_  
Dr Đorđe Janačković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**Datum odbrane doktorske disertacije:** \_\_\_\_\_, Beograd

# **ELEKTROFORETSKO TALOŽENJE I KARAKTERIZACIJA HIDROKSIAPATIT/LIGNIN I SREBRO/HIDROKSIAPATIT/LIGNIN PREVLAKA NA TITANU**

## **IZVOD**

Cilj ove doktorske disertacije je optimizacija nanošenja tankih hidroksiapatit (HAP) i biokompozitnih hidroksiapatit/lignin (HAP/Lig) prevlaka, kako bez tako i sa srebrom, postupkom elektroforetskog taloženja, kao i karakterizacija ovako dobijenih prevlaka različitim fizičko-hemijskim i biološkim metodama. Prednost korišćenja ovog postupka u odnosu na druge metode nanošenja jeste mogućnost precizne kontrole debljine i morfologije prevlaka. Variranjem vrednosti napona tokom različitog vremena taloženja utiče se na masu prevlake, a prevlake zadovoljavajuće debljine i dobre adhezije su taložene na titanu pri 60 V tokom 45 s.

Ispitan je uticaj koncentracije lignina na morfologiju, fazni sastav i termičko ponašanje HAP/Lig prevlaka različitim metodama kao što su skenirajuća elektronska mikroskopija, difrakcija X-zraka, termogravimetrijska analiza, spektroskopija infracrvene svetlosti sa Furijeovom transformacijom u modu totalne refleksije i fotoelektronska spektroskopija X-zracima. Pokazano je da su HAP i HAP/Lig prevlake uspešno sinterovane na temperaturi od 900 °C bez narušavanja kristalne strukture, koja je znatno niža od uobičajene temperature sinterovanja (1200 °C). Izostanak novih faza nakon sinterovanja na difraktogramima sinterovanih prevlaka ukazuje da koncentracija lignina veća od 0,5 mas. % u HAP/Lig prevlakama ima pozitivan efekat na održanje rešetke hidroksiapatita tokom procesa sinterovanja. Rezultati termogravimetrijske analize su pokazali da se termička stabilnost HAP/Lig prevlaka smanjuje sa povećanjem koncentracije lignina. Ispitivanje morfologije HAP/Lig prevlaka SEM analizom su pokazala da jedino HAP/Lig prevlaka sa 1 mas. % Lig pre i posle sinterovanja ima uniformnu površinu bez pukotina. Međutim, u slučaju sinterovanih HAP/Lig prevlaka sa koncentracijama lignina većim od 0,5 mas. % nije primećen veliki porast Ca/P odnosa, što potvrđuje da nema razgradnje HAP rešetke.

Spektroskopijom elektrohemijske impedancije je ispitana koroziona stabilnost HAP/Lig prevlake sa optimalnom koncentracijom lignina od 1 mas. %, a rezultati su pokazali da su sinterovane HAP/Lig prevlake koroziono stabilnije u odnosu na nesinterovane HAP/Lig prevlake tokom produženog vremena delovanja simulirane telesne tečnosti. Citotoksičnost je određena MTT testom i utvrđeno je da HAP/Lig

prevlaka sa 1 mas. % lignina blago umanjuje preživljavanje zdravih imunokompetentnih PBMC ćelija stimulisanih na proliferaciju mitogenom. Vijabilnost ćelija je iznosila 90,4 %. Međutim, glavni nedostatak HAP/Lig prevlake sa 1 mas. % lignina je antimikrobna neefikasnost prema bakterijskim sojevima *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*.

Dalji rad je bio usmeren na karakterizaciju Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka i ispitivanje uticaja srebra na morfologiju, fazni sastav, korozionu stabilnost, citotoksičnost i antimikrobna svojstva ovih prevlaka. Difrakcijom X-zraka, spektroskopijom infracrvene svetlosti sa Furijeovom transformacijom u modu totalne refleksije i fotoelektronskom spektroskopijom X-zracima je utvrđeno da nema transformacije rešetke hidroksiapatita nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka, kao i da je Ca/P odnos oko 1,64 što je približno vrednosti stehiometrijskog Ca/P odnosa od 1,67. Međutim, nakon sinterovanja dolazi do delimične razgradnje hidroksiapatita u slučaju Ag/HAP prevlake što je utvrđeno prethodno pomenutim metodama karakterizacije. Skenirajuća elektronska mikroskopija i visoko-rezoluciona skenirajuća elektronska mikroskopija pokazale su da Ag/HAP prevlaka ima površinu sa pukotinama za razliku od Ag/HAP/Lig prevlake, ali da su nakon ispitivanja bioaktivnosti obe površine pokrivene novim pločastim kristalima apatitne strukture. Takođe, površina Ag/HAP/Lig prevlake ima manje hrapavu i bolje kvašljivu površinu, na šta ukazuje mala vrednost ugla kvašenja simulirane telesne tečnosti, u poređenju sa Ag/HAP prevlakom. Bioaktivnost ovih prevlaka je potvrđena pojavom spontanog rasta novog apatitnog sloja sličnog koštanom tkivu na površinama Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka nakon 7 dana potapanja u simuliranu telesnu tečnost. Ipak, ovaj apatitni sloj ne narušava proces otpuštanja srebra iz Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka, što je pokazano ispitivanjem sa spektroskopijom indukovane kuplovane plazme.

Rezultati spektroskopije elektrohemijske impedancije su potvrdili da sinterovane Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake obezbeđuju dobru korozionu zaštitu u simuliranoj telesnoj tečnosti. Osim toga, malo povećanje otpornosti u porama prevlake i smanjenje kapacitivnosti prevlake tokom produženog vremena delovanja simulirane telesne tečnosti je ukazalo na rast novog apatitnog sloja. Ove prevlake su pokazale da poseduju dobro antimikrobno dejstvo i niska citotoksična svojstva. Metodom preživljavanja u rastvoru ispitana su antimikrobna dejstva u odnosu na bakterijski soj *Staphylococcus*

*aureus* i dobijeni rezultati pokazuju da dolazi do potpunog zaustavljanja rasta bakterija nakon samo 24 h. MTT testom je potvrđeno da Ag/HAP/Lig prevlaka sa 1 mas. % lignina nije toksična za PBMC ćelije. Na osnovu svih navedenih rezultata može se smatrati da su Ag/HAP/Lig prevlake sa 1 mas. % lignina obećavajući kandidati za tkivno inženjerstvo.

*Ključne reči:* elektroforetsko taloženje; kompozitne prevlake; hidroksiapatit; lignin; srebro; koroziona stabilnost; simulirana telesna tečnost; bioaktivnost; citotoksičnost; antimikrobna aktivnost.

**Naučna oblast:** Hemija i hemijska tehnologija

**UDK broj:** 537.363 : 66.017

# **ELECTROPHORETIC DEPOSITION AND CHARACTERIZATION OF HYDROXYAPATITE/LIGNIN AND SILVER/HYDROXYAPATITE/LIGNIN COATINGS ON TITANIUM**

## **ABSTRACT**

The main goal of this PhD thesis is optimization of formation of thin hydroxyapatite (HAP) and biocomposite hydroxyapatite/lignin (HAP/Lig) coatings, with and without silver, by electrophoretic deposition as well as characterization of obtained coatings by various physico-chemical and biological methods. The advantages of this method compared to different methods of ceramic coating deposition are good control of coating thickness and morphology. The influence of applied voltages during different deposition times was studied, and coatings deposited on titanium at 60 V during 45 s with satisfactory thickness and adhesion properties were proven as a most appropriate ones.

The effect of lignin concentration on morphology, phase composition and thermal behaviour of HAP/Lig coatings was investigated by various methods such as scanning electron microscopy, X-ray diffraction, thermogravimetric analysis, attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. The HAP and HAP/Lig coatings were successfully sintered at 900 °C, which is significantly lower than the usual sintering temperature (1200 °C), without any changes in their crystal structure. It was found that lignin concentration in HAP/Lig coatings higher than 0.5 wt. % protects hydroxyapatite lattice from decomposition, as indicated by absence of new peaks in diffractogram of sintered coatings. The thermogravimetric analysis results, showed that thermal stability of HAP/Lig coatings decreased with increasing of lignin concentration. The morphology investigated by SEM analysis of HAP/Lig coatings, demonstrated that only HAP/Lig coatings with 1 wt. % lignin exhibited uniform surface without fractures before and after sintering. Also, there was no indication of high increase in Ca/P ratio in sintered HAP/Lig coatings with lignin concentration higher than 0.5 wt. %, which represents another confirmation that there was no decomposition of HAP lattice.

Electrochemical impedance spectroscopy was used to investigate the corrosion stability of HAP/Lig coatings with optimal lignin concentration of 1 wt. % and the obtained results indicate that sintered HAP/Lig coatings are more stable in simulated

body fluid during prolonged exposure time than non-sintered HAP/Lig coatings. Cytotoxicity was determined by MTT test. The obtained results showed that HAP/Lig coating with 1 wt. % lignin slightly decreased survival of immunocompetent PBMC cells stimulated to proliferate by mitogen. The viability of cells was 90.4 %. However, the main problem with HAP/Lig coating with 1 wt. % lignin is the absence of antimicrobial effect against bacterial strain *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

In the next step of the investigation was determination of the silver effect on morphology, phase composition, corrosion stability, cytotoxicity and antimicrobial properties of Ag/HAP and Ag/HAP/Lig coatings. It was determined by X-ray diffraction, attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy that there was no phase transformation of hydroxyapatite lattice in non-sintered Ag/HAP and Ag/HAP/Lig coatings. The Ca/P ratio of 1.64 is comparable value to stoichiometric Ca/P ratio of 1.67. However, partial hydroxyapatite decomposition after sintering was observed for Ag/HAP coating. Scanning electron microscopy and field emission scanning electron microscopy revealed the surface of Ag/HAP coating with fractures unlike Ag/HAP/Lig coating. The bioactivity investigation of both surfaces confirmed the covering with new plate-shaped apatite crystals. Also, Ag/HAP/Lig coating surface was less rough with better wettability, exhibiting lower contact angle of simulated body fluid in comparison to Ag/HAP coating. The bioactivity of these coatings was confirmed by spontaneous growth of new apatite layer similar to bone mineral on Ag/HAP and Ag/HAP/Lig coatings surfaces after 7 days immersion in simulated body fluid. Nevertheless, this apatite layer does not affect silver ion release from Ag/HAP and Ag/HAP/Lig coatings, as determined by inductively coupled plasma spectroscopy.

The results of electrochemical impedance spectroscopy confirmed that sintered Ag/HAP and Ag/HAP/Lig coatings provide good corrosion protection in simulated body fluid. Besides, slight increase in coating pore resistance and decrease in coating capacitance during prolonged exposure time in simulated body fluid indicate the growth of new apatite layer. These coatings have shown good antimicrobial properties and low cytotoxicity. The antimicrobial activity against bacterial strain *Staphylococcus aureus* was investigated by spread plate method and the results showed total reduction in the bacterial numbers just after 24 h. MTT test confirmed that Ag/HAP/Lig coating with



1 wt. % of lignin is nontoxic against PBMC cells. Based on the obtained results, Ag/HAP/Lig coating with 1 wt. % of lignin is a promising candidate for tissue engineering.

*Keywords:* electrophoretic deposition; composite coatings; hydroxyapatite; lignin; silver; corrosion stability; simulated body fluid; bioactivity; cytotoxicity; antimicrobial activity.

**Scientific Field:** Chemistry and Chemical Technology

**UDC number:** 537.363 : 66.017

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za fizičku hemiju i elektrohemiju, kao i na Katedri za neorgansku hemijsku tehnologiju i Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, Laboratoriji za teorijsku fiziku i fiziku kondenzovane materije Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ i na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, kao i na „Centre de recherche sur le bois (CRB), Département des sciences du bois et de la forêt, Université Laval, Québec, Canada“. Zahvaljujem se mentoru **prof. dr Vesni Mišković-Stanković** na velikoj pomoći i podršci od samog početka kao i tokom izrade ove disertacije. **Prof. dr Tatjani Stevanović** dugujem veliku zahvalnost na iscrpnim diskusijama, korisnim savetima i podršci tokom rada na disertaciji, ali i na pruženoj mogućnosti da boravim i da uradim deo eksperimentalnog rada u CRB laboratoriji kao i da upoznam njene saradnike koji su mi danas dobri prijatelji za života. **Prof. dr Đorđu Janačkoviću** dugujem iskrenu zahvalnost za podršku i pomoć u mom naučnom usavršavanju.*

*Posebno se zahvaljujem **dr Ani Janković** na korisnim savetima i pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije, kao i **dr Papa N. Diouf** za nesebičnu pomoć prilikom izrade eksperimentalnog dela disertacije, podršci i savetima tokom ovih godina.*

*Mojoj mami i mom tati*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO .....	4
2.1. KOMPOZITNI MATERIJALI.....	4
2.1.1. BIOKERAMIČKI KALCIJUM-FOSFATNI MATERIJALI .....	4
2.1.2. HIDROKSIAPATIT .....	6
2.1.3. BOKOMPOZITNE HIDROKSIAPATIT/POLIMER PREVLAKE .....	12
2.1.4. LIGNIN .....	16
2.1.4.1. FIZIČKO–HEMIJSKA SVOJSTVA LIGNINA .....	18
2.1.4.2. ORGANOSOLV PULPOVANJE .....	19
2.1.4.3. MEHANIZAM ORGANOSOLV PROCESA.....	20
2.1.4.4. PRIMENA LIGNINA.....	21
2.1.5. PREVLAKE HIDROKSIAPATITA DOPIRANE SREBROM.....	23
2.1.6. TITAN .....	25
2.2. FORMIRANJE HIBRIDNIH KOMPOZITNIH PREVLAKA.....	26
2.2.1. ELEKTROFORETSKO TALOŽENJA .....	29
2.2.1.1. ELEKTROFORETSKO TALOŽENJE HAP I KOMPOZITNIH PREVLAKA NA BAZI HIDROKSIAPATITA.....	34
2.2.1.2. MEHANIZAM ELEKTROFORETSKOG TALOŽENJA.....	38
2.2.2. SINTEROVANJE.....	39
2.2.2.1. SINTEROVANJE U ČVRSTOJ FAZI.....	40
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	43
4. EKSPERIMENTALNI DEO.....	44
4.1. PRIPREMA POVRŠINE TITANA.....	44
4.2. MATERIJALI.....	44
4.2.1. SINTEZA NANOČESTIČNIH PRAHOVA HIDROKSIAPATITA I SREBRO/HIDROKSIAPATITA .....	44
4.2.2. LIGNIN .....	45
4.3. ELEKTROFORETSKO TALOŽENJE HAP, Ag/HAP, HAP/Lig I Ag/HAP/Lig PREVLAKA NA TITANU.....	45
4.4. PRIPREMA SIMULIRANE TELESNE TEČNOSTI.....	47
4.5. METODE KARAKTERIZACIJE .....	47
4.5.1. RASPODELA VELIČINA ČESTICA I $\zeta$ -POTENCIJAL .....	47
4.5.2. MERENJE VREDNOSTI UGLA KVAŠENJA.....	48
4.5.3. HRAPAVOST POVRŠINE.....	48
4.5.4. DIFRAKCIJA X–ZRAKA .....	48
4.5.5. SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA I VISOKO– REZOLUCIONA SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA .....	49
4.5.6. TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA.....	49
4.5.7. SPEKTROSKOPIJA INFRACRVENE SVETLOSTI SA FURJEOVOM TRANSFORMACIJOM U MODU TOTALNE REFLEKSIJE.....	50
4.5.8. FOTOELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA X–ZRACIMA.....	50
4.5.9. SPEKTROSKOPIJA ELEKTROHEMIJSKE IMPEDANCIJE.....	50
4.5.10. <i>In vitro</i> BIOAKTIVNOST.....	51
4.5.11. SPEKTROSKOPIJA INDUKOVANE KUPLOVANE PLAZME .....	51
4.5.12. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI .....	52
4.5.13. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNIH SVOJSTAVA .....	53

5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	55
5.1. RASPODELA VELIČINA ČESTICA U ETANOLSKIM SUSPENZIJAMA I $\zeta$ -POTENCIJAL .....	55
5.2. UTICAJ NAPONA I VREMENA TALOŽENJA NA MASU HAP, HAP/Lig I Ag/HAP/Lig PREVLAKA NA TITANU.....	57
5.3. MERENJE VREDNOSTI UGLA KVAŠENJA I HRAPAVOSTI POVRŠINE .....	59
5.4. XRD ANALIZA .....	61
5.5. SEM ANALIZA .....	71
5.6. TGA ANALIZA .....	80
5.7. ATR-FTIR ANALIZA .....	84
5.8. XPS ANALIZA .....	94
5.9. SEI ANALIZA .....	99
5.9.1. SEI ANALIZA NESINTEROVANIH HAP I HAP/Lig PREVLAKA .....	99
5.9.2. SEI ANALIZA NESINTEROVANIH Ag/HAP I Ag/HAP/Lig PREVLAKA .....	103
5.9.3. SEI ANALIZA SINTEROVANIH HAP I HAP/Lig PREVLAKA .....	108
5.9.4. SEI ANALIZA SINTEROVANIH Ag/HAP I Ag/HAP/Lig PREVLAKA .....	111
5.10. OTPUŠTANJE JONA SREBRA IZ NESINTEROVANIH Ag/HAP I Ag/HAP/Lig PREVLAKA .....	114
5.11. CITOTOKSIČNOST-MTT TEST .....	115
5.11.1. CITOTOKSIČNOST HAP I HAP/Lig PREVLAKA.....	115
5.11.2. CITOTOKSIČNOST Ag/HAP I Ag/HAP/Lig PREVLAKA.....	118
5.12. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA.....	119
5.12.1. AGAR DIFUZIONA METODA .....	119
5.12.2. METODA MERENJA PREŽIVLJAVANJA BAKTERIJA U RASTVORU .....	121
6. ZAKLJUČAK.....	125
7. LITERATURA .....	128

## 1. UVOD

Biomaterijali, u najopštijem smislu, su definisani kao materijali namenjeni za interakciju sa biološkim sistemima radi ispitivanja, lečenja, ili kao dodaci, odnosno zamena bilo tkiva, organa ili funkcije u telu (*Consensus definition, 2nd Biomaterials Consensus Conference, 1992, Chester, UK*). Interesovanje za biomaterijale i njihovu primenu je počelo posle prvog kongresa o biomaterijalima održanog na „Clemson“ Univerzitetu, u Južnoj Karolini 1969. godine i od tada privlači značajnu pažnju. Poslednjih nekoliko decenija je došlo do ekspanzije novih biomaterijala, prirodnih ili sintetskih, napravljenih u različitim formama i sa kontrolisanim karakteristikama do nano nivoa [1]. Idealan biomaterijal treba da bude biokompatibilan, bioresorptivan i biodegradabilan [2]. Takođe, biomaterijal ne sme da izazove inflamaciju ili toksični odgovor na implantaciju u telo [3]. Biomaterijal svojom strukturom mora da obezbedi početnu trodimenzionalnu strukturu za regeneraciju tkiva, ravnomernu raspodelu ćelija, nesmetanu razmenu nutrijenata i gasova i odgovarajuću brzinu degradacije u skladu sa razvojem i remodelovanjem kultivisanog tkiva.

Biomaterijali su veštački ili prirodni materijali koji se koriste za dobijanje struktura i implantata za reparaciju kao i potpunu zamenu oštećenog tkiva ili organa [4-7]. Stoga, može se reći da biomaterijal pomaže i u poboljšanju kvaliteta života, kao i da se polje primene biomaterijala neprekidno širi. Podele biomaterijala su brojne i raznovrsne po različitim kriterijumima. Prema poreklu mogu se podeliti na: autologe, homologe, heterologe i aloplastične. Prema mestu krajnje upotrebe biomaterijali mogu biti: ortopedski, dentalni, kardiovaskularni, oftalmološki, dermatološki, pomoćni, itd. Biomaterijali se prema interakciji živog tkiva i implantata dele na bioresorbilne, bioinertne i bioaktivne. Najčešća podela biomaterijala je, ipak, po hemijskom sastavu na metalne, polimerne, keramičke, prirodne i kompozitne [4].

Pravu revoluciju u istraživanju i tehnologiji predstavljaju današnji biomaterijali sa tačno određenim osobinama za specifičnu namenu [6-8]: veštački srčani zalisci, stentovi u krvnim sudovima, ortopedski implantati u kostima ramena, kolena, bedara, ušima i ortodontalnim strukturama (slika 1). Takođe, koriste se u ulozi srčanog simulatora i pri rekonstrukciji urinarnog trakta [4,9]. Zajednička osobina svih biomaterijala bez obzira na njihove različitosti je biokompatibilnost [3,10], što znači da se mora izbeći svaki negativan

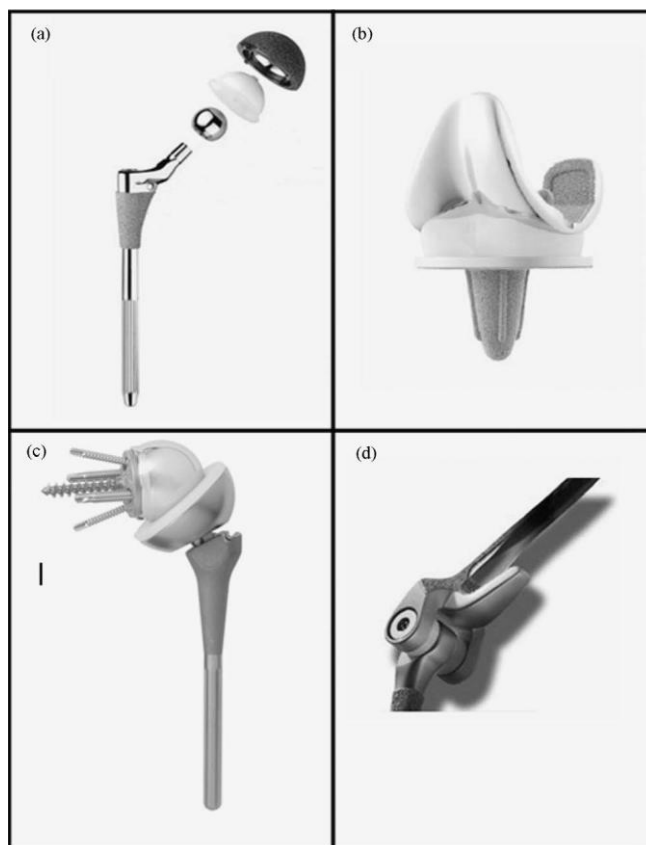
imunološki odgovor organizma i odbacivanja implantata od strane tela. Pri dobijanju i dizajnu biomaterijala moraju biti zadovoljena odgovarajuća mehanička svojstva slična svojstvima zamenjenih tkiva, biološka inertnost i biokompatibilnost [8,11]. Trajnost i funkcionalnost su određene osobinama biomaterijala, dok biokompatibilnost zavisi od topografije površine, hemijske strukture površine, hrapavosti, promene na površini i površinske energije [12-14]. Prema tome, biokompatibilni materijal implantata treba da bude netoksičan, nekancerogen, bez reakcije odbacivanja implantata, kao i da bude hemijski stabilan i koroziono otporan u prisustvu telesnih tečnosti [15].

Fokusiranje na reparaciju koštanog tkiva, kao jedan od najčešćih i veoma komplikovanih problema u medicini, u poslednjih par decenija se rešava ugradnjom implantata ili skafolda [8,16,17]. Razvoj biomaterijala, koji svojim odgovarajućim mehaničkim karakteristikama, topografijom i hemijskim osobinama površine oponašaju prirodnu strukturu koštanog tkiva i istovremeno predstavljaju povoljnu sredinu za regeneraciju i diferencijaciju osteoblasta (ćelija koštanog tkiva), dobijaju se sve savršeniji i bolji ortopedski i zubni implantati [5,18,19]. Kod implantata za restauraciju funkcija oštećenog koštanog tkiva, vodi se računa da mehaničke karakteristike materijala implantata podržavaju težinu tela, da se uklapaju specifičnim oblikom u okolno tkivo i najvažnije da su biokompatibilni i bioaktivni [11,19]. Bioaktivnost se definiše kao sposobnost materijala da u kontaktu sa telesnom tečnošću na svojoj površini podstakne odgovarajući odgovor organizma. U slučaju koštanog tkiva, bioaktivnost materijala podrazumeva stimulaciju rasta osteoblasta, stvarajući direktne i jake adherentne veze sa okolinom [19-21].

Biokeramički materijali su jedini sintetički materijali koji imaju potencijal da u potpunosti regenerišu koštano tkivo [22,23]. Ovi materijali su doživeli ekspanziju u medicinskoj primeni kao dentalni ili koštani implantati kroz veliki broj publikacija i patenata, zbog svoje izrazite bioaktivnosti i biokompatibilnosti [5,24]. Danas, u ortopediji i protetici biokeramički materijali su usmereni za obnovu bolesnog ili oštećenog koštanog tkiva. U suštini, iako nemaju prirodno poreklo, imaju sastav, strukturu i osobine slične kostima ili zubima. Zbog toga, biokeramika može se koristiti u obliku prevlaka, kako bi se poboljšala biokompatibilnost inertnih metalnih implantata ili kao materijal za obnovu oštećenog koštanog tkiva [5,25]. Mogućnost samoobnavljanja tkiva, protok telesne tečnosti kroz materijal, prilagođavanje strukture i

mehaničkih osobina implantata utiču na biokompatibilnost [5,22]. Prilikom implantacije treba voditi računa o promenama koje nastaju na dodirnoj površini biokeramičkog materijala sa biološkim okruženjem, kao i o kontaktu sa telesnim tečnostima. Takođe, potrebno je poznavati sve moguće hemijske reakcije na dodirnoj granici, kao i promene drugih osobina materijala radi spečavanja odbacivanja implantata [23].

Biokeramika koja se koristi kao implantat, mora da ispunjava sledeće uslove: da bude biokompatibilna, odnosno, ne sme da izaziva imunu reakciju organizma; ne sme da bude niti toksična ni kancerogena; da poseduje adekvatne fizičke i mehaničke karakteristike i da ima mogućnost oblikovanja u odgovarajuće forme koje su potrebne u praktičnoj upotrebi.



**Slika 1.** Ortopedski implantati sa sposobnošću opterećenja težine tela: (a) implantat za kuk, (b) implantat za koleno, (c) implantat za rame i (d) implantat za lakat [8].

Biokeramički materijali se klasifikuju prema vrsti biokompatibilnosti i načinu na koji se vezuju za okolno tkivo [26] na:



- bioinertne materijale na bazi metalnih oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ): dodirnom površinom ne uspostavljaju ni biološke ni hemijske veze sa okolnim tkivom,
- bioresorbilne materijale (trikalcijum–fosfat): postepeno se razlažu do potpune zamene sa novim prirodnim tkivom,
- bioaktivne materijale (hidroksiapatit, bioaktivno staklo, staklasta keramika): formiraju hemijsku vezu sa okolnim tkivom i na površini implantata obrazuju novi sloj koji ima istu strukturu kao mineralna faza kostiju, preko koje se formira veza sa kostima, pri čemu je jačina adhezije u dodirnom sloju veća od jačine kohezije implantnog materijala ili tkiva,
- poroznu biokeramiku (prevlake hidroksiapatita ili biostakla na metalnim supstratima): veza između implantata i koštanog tkiva se formira urastanjem tkiva unutar pora bilo da su na površini ili u masi implantata.

Među biokeramičkim materijalima najzastupljeniji je hidroksiapatit koji se koristi za ortopedске, dentalne i maksilofacijalne implantate zbog svoje izvanredne bioaktivnosti i biokompatibilnosti [24,27,28]. Sa stanovišta medicine i stomatologije hidroksiapatit, koji spada u grupu kalcijum–fosfatnih jedinjenja, ima široku primenu jer predstavlja biokeramički materijal koji pospešuje osteointegraciju [22–25].

## **2. TEORIJSKI DEO**

### **2.1. KOMPOZITNI MATERIJALI**

#### **2.1.1. BIOKERAMIČKI KALCIJUM-FOSFATNI MATERIJALI**

Upotreba biokeramičkih materijala datira još od 19-og veka kada je Dreesmann sa saradnicima prvi put koristio kalcijum–sulfat kao ispunu koštanih defekata u obliku gipsa zbog bolesti kostiju izazvane tuberkulozom [29,30]. Keramički materijali na bazi apatita su našli široku primenu u medicini od 1969. godine posle istraživanja Levitt i saradnika [31], koji su opisali metodu dobijanja ovih materijala polazeći od minerala fluoroapatita ukazujući na njihovu potencijalnu primenu u ortopediji. Danas najčešće korišćeni biokeramički materijali su bioinertni npr.  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgO}$ , kalcijum-fosfati tj.

hidroksiapatit (HAP), trikalcijum-fosfat (TCP), oktakalcijum-fosfat (OCP) i bioaktivna stakla [32]. Zbog odlične biokompatibilnosti, bioaktivnosti, osteokonduktivnosti i osteofilne prirode biokeramički materijali se najčešće primenjuju za koštane implantate u rekonstrukciji ili delimičnoj zameni kosti u skeletnom sistemu. Najznačajnija kalcijum-fosfatna (Ca-P) jedinjenja klasifikovana su u tri glavna strukturna tipa koji su prikazani u tabeli 1.

**Tabela 1.** Strukturni tipovi kalcijum-fosfatnih jedinjenja

Strukturni tip	Formula	Primeri
Apatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$	oktakalcijum-fosfat (OCP), $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}$
	(X=OH <sup>-</sup> ;F <sup>-</sup> )	tetrakalcijum-fosfat (TTCP), $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ tj. $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$
Glaserit		polimorfni trikalcijum-fosfati (TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Ca-P		dikalcijum-fosfat dihidrat (DCPD), $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
		anhidrovani dikalcijum-fosfat (DCPA), $\text{CaHPO}_4$
		monokalcijum-fosfat, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
		$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$

Kalcijum-hidroksiapatit (hidroksiapatit, HAP) je najznačajnija so kalcijuma i fosfora. Poznato je više od 200 fosfatnih minerala, međutim samo se minerali iz grupe apatita nalaze u većim količinama u prirodi i mogu da posluže kao komercijalni izvor fosfora. Apatiti su termodinamički najstabilnije faze među kalcijum-fosfatima zbog čega oni predstavljaju najčešći krajnji produkt mnogih reakcija [33].

Stabilnost pojedinih faza kalcijum-fosfata zavisi od temperature, prisustva vode i od prirode okruženja [34,35]. Na temperaturi tela od 37 °C, u kontaktu sa telesnim fluidima stabilne su samo dve faze: pri pH < 4,2 stabilna faza je  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , dok je pri pH > 4,3 stabilna faza  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  [36]. Najvažniji parametri kada su u pitanju kalcijum-fosfatna jedinjenjima jesu: Ca/P odnos i rastvorljivost, parametri koji u velikoj meri zavise od pH vrednosti samog rastvora. Generalno rastvorljivost kalcijum-fosfata u biološkom medijumu je  $\text{DCPD} > \text{TTCP} > \alpha\text{-TCP} > \beta\text{-TCP} \gg \text{HAP}$  [37]. Nakon implantacije pH vrednost opada na 5 u regiji oštećenog tkiva, ali se nakon kratkog vremena vraća na 7,4. Poznato je da je čak i pri ovakvim uslovima hidroksiapatit najstabilnija faza.

## 2.1.2. HIDROKSIAPATIT

Hidroksiapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) je bioaktivni keramički materijal koji poseduje veliku biokompatibilnost pošto formira direktne hemijske veze sa koštanim tkivom [38-40]. Hidroksiapatit predstavlja glavni mineralni sastav koštanog tkiva i čini oko 40 % ukupne mase kostiju [41]. Iako HAP predstavlja osnovnu komponentu, u koštanom mineralu mogu se naći prisutne i brojne nečistoće. Hidroksiapatit, kao i amorfni kalcijum–fosfat, se deponuje okolo i unutar kolagenih vlakana. Kristali hidroksiapatita mogu biti u vidu tankih ploča i štapića (dužine 20 – 40 nm, širine 15 nm i debljine 1,5 – 3 nm), koji su postavljeni paralelno sa kolagenim vlakanima u pravilnim razmacima od 60 do 70 nm [42].

Sintetički HAP predstavlja najčešće primenjeni biomaterijal za izradu zubnih i ortopedskih implantata zbog izuzetne bioaktivnosti, biokompatibilnosti, kao i hemijskog sastava sličnog kostima kojim se pospešuje formiranje novog tkiva [40-43]. Porozni HAP je veoma važan materijal za implantate, jer je potvrđeno da njegova struktura omogućava rast kosti unutar pora implantata, bolju biointegraciju i mehaničku stabilnost implantata u kostima [44]. HAP se, osim kao porozni materijal, upotrebljava i kao prevlaka na metalnom supstratu, a kako je osteokonduktivan materijal, predstavlja idealnu okolinu za diferencijaciju osteoblasta čime se pospešuje vezivanje ćelija na površini implantata ili skafolda uz istovremeno povećanje brzine rasta kostiju [45,46].

Zbog pomenutih sličnosti sa mineralom u koštanom tkivu, sintetisani stehiometrijski hidroksiapatit ima rasprostranjenu primenu kao materijal za potpunu ili delimičnu reparaciju oštećenog skeletnog sistema. Usled slabih mehaničkih osobina, uglavnom se koristi u formi prevlaka ili kompozita [47]. Pokazano je da, za razliku od HAP, titan i titanske legure predstavljaju pogodne materijale za implantate, zbog svoje dobre nosivosti. Na polju medicine su vrlo često korišćeni zbog čvrstoće, tvrdoće, otpornosti na udar i na koroziju [39]. U cilju poboljšanja bioaktivnosti titanskih implantata koriste se razne metode modifikacija površine kao što su peskarenje, formiranje nanotubularne strukture oksida titana procesom anodizacije titana (anatas - tetragonalni kristalni sistem  $\text{TiO}_2$ ; dobija se nakon termičkog tretmana nanotuba oksida titana na 450 °C), nanošenje kalcijum–fosfatnih prevlaka ili hemijski tretman površine [48,49]. Odbacivanje implanata se može izbeći nanošenjem biokompatibilnih prevlaka na površini titana. Prevlake hidroksiapatita koriste se za oblaganje metalnih implantata,

jer poboljšavaju njihovu biološku funkciju tako što kombinuju mehaničke osobine metala sa bioaktivnom prirodnom prevlaka [45,50]. Zbog sličnosti sa koštanim tkivom imaju mogućnost da formiraju direktne hemijske veze sa okolnim tkivom nakon implantacije [42]. HAP, osim što se čvrsto vezuje za koštanu strukturu, istovremeno pospešuje biomineralizaciju i formiranje novog koštanog tkiva na svojoj površini. Stoga, nanošenje HAP prevlaka na metalni supstrat obezbeđuje potrebnu bioaktivnost i biokompatibilnost implantata [40].

Morfologija, struktura i mehanička svojstva HAP prevlaka u velikoj meri zavise od postupka sintetisanja i variranja parametara dobijanja polaznog praha hidroksiapatita [51,52]. Karakteristike polaznog praha, kao što su veličina čestica, stepen aglomerisanosti, specifična površina, Ca/P odnos itd. u velikoj meri određuju svojstva prevlaka i njihovu primenu u stomatologiji i ortopediji. Iz literature je poznato da se Ca/P odnos bioaktivnih prevlaka hidroksiapatita kreće između 1,5 – 2,0 [53]. Međutim, istraživanja Suchanek i saradnika [54] su pokazala da Ca/P odnos ne utiče u velikoj meri na veličinu zrna hidroksiapatita. Idealan Ca/P odnos je 1,67 koji odgovara stehiometrijskom HAP sa teorijskom gustinom od  $3,156 \text{ g cm}^{-3}$  i ujedno je najbliži neorganskoj komponenti u kostima [55].

Brojna *in vivo* i *in vitro* istraživanja (vršena u simuliranoj telesnoj tečnosti, *eng.* SBF) [56] pokazala su da nakon implantacije bioaktivnih kalcijum-fosfatnih materijala, kao što je HAP, bez obzira na formu (skafold, prevlaka, prah ili porozna struktura) ili strukturu (kristalna ili amorfna), svi materijali utiču na aktivaciju i vezivanje osteoblasta istovremeno stimulišući proces osteogeneze – stvaranje i rast novog fibroznog tkiva. Nakon implantacije hidrofilne HAP prevlaka na oštećeno mesto koštanog tkiva dolazi do biomimetičkog taloženja biološkog apatita tj. karbonatnog HAP na površini prevlaka ubrzavajući proces biomineralizacije i srastanja implantata sa okolnim tkivom čime se potvrđuje njihova izrazita bioaktivnost. Utvrđeno je da negativno naelektrisana površina rastvorljivih HAP pospešuje ćelijsku adheziju i ranu fazu ćelijske diferencijacije osteoblasta, što je zaključeno na osnovu povećane koncentracije vezanih proteina alkalne fosfataze koja je detektovana na površini materijala [57,58].

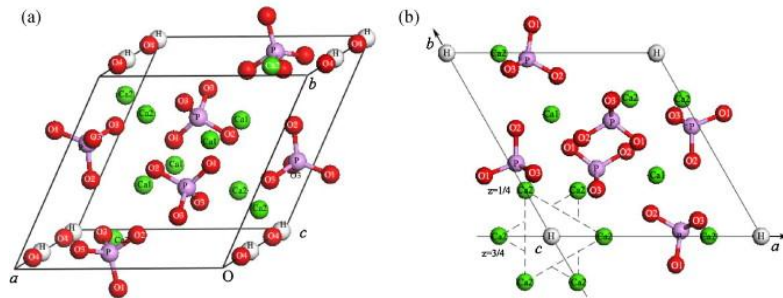
Na odgovor ćelija i tkiva u prihvatanju implantata može da utiče i topografija površine na mikroskopskom i makroskopskom nivou. Na ćelijskom nivou topografija igra ključnu ulogu u regulisanju ponašanja ćelija i njihovu proliferaciju i diferencijaciju

utičući na njihovu morfologiju, orijentaciju i adheziju [59]. Jedan od najvažnijih fenomena u tkivnom inženjerstvu je reakcija ćelija na topografiju supstrata i njihovo vezivanje koje ima ključnu ulogu u osteointegraciji i povezivanju implantata sa tkivom.

Istraživanja Martin i saradnika [60] su dokazala da ćelije na hrapavijoj površini titana pokazuju smanjenje ćelijske proliferacije i značajno različit fenotip koji inače odgovara osteoblastima. Takođe, poznato je da ćelije na hrapavijoj površini oslobađaju više prostaglandina E2 (PGE2) i transformišu faktor rasta  $\beta$  (LTGF- $\beta$ ), pri čemu oba proteina učestvuju u formiranju koštanog tkiva. Kako su pokazala istraživanja Thomas i saradnika [61] kombinacija hrapavosti i topografije površine značajno utiče na odgovor tela na implantat. Implantat sa hrapavijom površinom doprinosi boljoj otpornosti na smicanje i čvršćem vezivanju za koštano tkivo, dok implantat sa manje hrapavom površinom pokazuje različite stepene inkapsulacije fibroznog tkiva. Hrapavost površine biomaterijala se definiše merenjem aritmetičke sredine devijacije profila ( $R_a$ ), koja je aritmetička sredina apsolutnih vrednosti devijacije profila od srednje vrednosti na ispitanoj dužini uzorka. Iz svega navedenog proizilazi da se koštano tkivo bolje vezuje za hrapavije površine nego za glatke površine.

Neorganska komponenta kosti obuhvata različita kalcijum-fosfatna jedinjenja, a najvažniji među njima je hidroksiapatit. Stehiometrijski hidroksiapatit, po sastavu i strukturi najbliži mineralnoj komponenti u kostima, ima teorijski sastav - 39,89 mas. % Ca, 18,50 mas. % P, Ca/P maseni odnos iznosi 2,151 i Ca/P molarni odnos je 1,67 [55,62]. Pažljiva kontrola poroznosti, u kombinaciji sa dobrim bioaktivnim svojstvima može biti dobar preduslov za dobijanje dugoročnog materijala za koštane implantate, jer omogućava proliferaciju osteoblasta i prokrvljenost [63].

Prostorna heksagonalna kristalna rešetka hidroksiapatita je najčešći oblik u kome se javlja i ima prostornu grupu  $P6_3/m$ . Jedinična ćelija hidroksiapatita ima parametre rešetke  $a = b = 9,432 \text{ \AA}$  i  $c = 6,881 \text{ \AA}$ ,  $Z = 2$  [54,64,65]. Struktura hidroksiapatita je predstavljena na slici 2.



**Slika 2.** Kristalna struktura hidroksiapatita: (a) prostorne 3D pozicije atoma i (b) projekcija u pravcu c-ose [65].

Hidroksilni joni nalaze se na uglovima rombične baze jedinične ćelije praveći stubove hidroksilnim grupama sa rastojanjem polovine visine jedinične ćelije. Šest  $\text{Ca}^{2+}$  jona je asocirano na ovim hidroksilnim grupama praveći jednakostranične trouglove. Trouglovi su normalni na hidroksilne grupe. Susedni trouglovi su međusobno rotirani za  $60^\circ$ . Četiri kalcijumova atoma leže uzduž dva razdvojena niza koji su paralelni nizovima  $\text{OH}^-$  grupa na polovini rastojanja između trouglova kiseonika iz ortofosfornog tetraedra. Atomi kiseonika iz  $\text{OH}^-$  grupa su pomereni za 0,03 nm od ravni kalcijumovih trouglova. Hidroksilne grupe su tako orijentisane da se hidroksilna veza nalazi duž ose, ali ne seče ravan kalcijumovih trouglova.

Kao što je već rečeno mineral u kostima je sličan stehiometrijskom hidroksiapatitu  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , ali je zastupljen sa mnogim supstitucijama unutar molekula:  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$ , umesto  $\text{Ca}^{2+}$  jona. Isto tako i mineral kalcijum-karbonat je zastupljen u kostima, ali u tom slučaju u kristalnoj rešetki molekula fosfatni joni su supstituisani karbonatnim jonima. Neke od takvih supstitucija imaju značajan uticaj na strukturu i mehanička svojstva minerala kostiju. Biološki apatiti su obično kalcijum deficitarni i u njihovoj strukturi je uglavnom izvršena supstitucija fosfatnih jona karbonatnim jonima. Stepenn supstitucije karbonatnim jonima u velikoj meri zavisi od vrste supstitucije [66]. Postoje dve vrste - A i B supstitucija koje zavise od mesta supstitucije:  $\text{CO}_3^{2-}$  umesto  $\text{OH}^-$  (tip A) ili  $\text{CO}_3^{2-}$  umesto  $\text{PO}_4^{3-}$  (tip B). Biološki apatit po svojoj kristalnoj stukturi predominantno pripadaju B tipu, tj. karbonatnom hidroksiapatitu (*eng.* CHAP) [66]. Kod nekih prahova koji su dobijeni sintetskim metodama iz rastvora,  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{OH}^-$  grupe su zamenjene  $\text{CO}_3^{2-}$  grupom (tip AB). Među različitim biokeramičkim materijalima baziranim na hidroksiapatitu, CHAP je materijal koji omogućava bioresorpciju koštanog tkiva, što ga čini biomaterijalom sa najvećom potencijalnom primenom.

Biološki apatiti, koji obuhvataju mineralnu fazu i kalcinirano tkivo (gled, dentin, kost) i poneku patološku kalcifikaciju (npr. zubni kamenac, pljuvačka i urinarni kamenac) predstavljaju primere kalcijum-hidroksiapatita. Biološki apatiti se razlikuje od čistog HAP po stehiometriji, sastavu, kristaliničnosti i drugim fizičkim i mehaničkim svojstvima, kao što se može videti iz tabele 2.

**Tabela 2.** Uporedni sastav, kristalne i mehaničke karakteristike humane gleđi, kostiju i sintetisanog HAP [33]

	Gled	Kost	Sintetisani HAP
<b>Sastav, mas. %</b>			
Kalcijum, Ca <sup>2+</sup>	36,5	34,8	39,6
Fosfor, P	17,7	15,2	18,5
Ca/P molarni odnos	1,63	1,71	1,67
Natrijum, Na <sup>+</sup>	0,5	0,9	–
Kalijum, K <sup>+</sup>	0,08	0,03	–
Magnezijum, Mg <sup>2+</sup>	0,44	0,72	–
Karbonat, CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	3,2	7,4	–
Fluorid, F <sup>-</sup>	0,01	0,03	–
Hlorid, Cl <sup>-</sup>	0,30	0,13	–
Pepeo (neorganski)	97,0	65,0	100
Organski deo	1,5	25,0	–
Apsorbovana H <sub>2</sub> O	1,5	10,0	–
Elementi u tragovima: Sr <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>			
<b>Kristalografske osobine: Parametri rešetke (± 0,0003 nm)</b>			
a-osa	0,941	0,9419	0,9422
c-osa	0,6882	0,6880	0,6880
Indeks kristaliničnosti	70–75	33–37	100
Veličina kristala, nm	130 x 30	25 x (2,5–5)	
Proizvodi nakon sinterovanja (950 °C)	HAP+TCP	HAP+CaO	HAP
Modul elastičnosti (10 <sup>6</sup> MPa)	0,014	0,020	0,01
Zatezna čvrstoća (MPa)	70	150	100

Razlike u veličini kristala, kao i u rastvorljivosti između gleđi, kosti i dentina mogu biti pripisane razlikama u koncentraciji karbonatnih i magnezijumovih jona. Sintetički HAP ima visok stepen kristaliničnosti, a parametri kristalne rešetke,  $a = 0,9422 \text{ nm}$  i  $c = 0,6881 \text{ nm}$ , su slični koštanom mineralu, što je dovelo do velike upotrebe hidroksiapatita kao implantata u rekonstruktivnoj medicini. Takođe, pokazalo se da je njegova površina biokompatibilna sa nekoliko ćelijskih tipova: makrofagi, fibroblasti, osteoklasti, osteoblasti, peridontalne i ligamentne ćelije [33]. Istraživanja su pokazala da ćelije ne razlikuju površinu sintetičkog hidroksiapatita i kosti, što ukazuje na značajnu sličnost hemijskog sastava površine.

Mehaničke karakteristike sintetičkog hidroksiapatita uglavnom zavise od načina njegove sinteze, pritiska, uslova sinterovanja. Uglavnom, HAP je krt i pokazuje malu otpornost na mehaničke stresove, što je usko povezano sa njegovom poroznošću. Zbog toga, često se koristi u kombinaciji sa metalom koji obezbeđuje dobre mehaničke karakteristike dok HAP pokazuje dobru biokompatibilnost. Pokazano je da se sinterovanjem stehiometrijskog HAP ( $\text{Ca/P} = 1,67$ ) na atmosferskom pritisku može dobiti čist materijal bez pora i prisustva drugih faza. Može se zaključiti da stehiometrijski HAP ima veliku termičku stabilnost na temperaturama do  $1200 \text{ }^\circ\text{C}$  u poređenju sa karbonatnim HAP, tj. na temperaturama manjim od  $1200 \text{ }^\circ\text{C}$  ne dolazi do fazne transformacije HAP u druge kalcijum-fosfate. Karbonatna supstitucija u HAP rešetki utiče na razgradnju, termičku stabilnost, rastvorljivost i biološki odgovor implantiranog materijala [65]. Uslovi sinteze praha kao i karakteristike dobijenog praha u mnogome utiču na fazni sastav sinterovanih biokeramičkih materijala [65].

Nađeno je da se funkcija osteoklasta povećava (ćelije koje erodiraju i resorbuju kost uravnoteženo sa formiranjem osteoblasta) u prisustvu nanočestičnog HAP, zbog povoljnije specifične površine u odnosu na obični HAP, i na taj način se ubrzava proces remodeliranja kosti [67]. Pored toga, Webster sa saradnicima [68] je pokazao da dolazi do značajnog povećanja adsorpcije proteina i adhezije osteoblasta na nanočestičnim keramičkim materijalima u poređenju sa tradicionalnim keramičkim materijalima mikro veličina. Prethodna ispitivanja su pokazala da zbog topografije površine u slučaju nanočestičnog hidroksiapatita dolazi do adsorpcije vitronektina, proteina koji posreduje adheziju osteoblasta, podstičući povećanje vezivanja kalcijuma na površini materijala i rast novog tkiva [69,70]. Iako HAP poseduje odlične osobine kao što su



biokompatibilnost, bioaktivnost i osteokonduktivnost zbog čega se vezuje direktno za kost, ima jako slabe mehaničke karakteristike sa malom vrednošću žilavosti ( $KIC = 0,8-1,2 \text{ MPa m}^{1/2}$ ) koja se smanjuje sa povećanjem poroznosti.

Kako je već rečeno, zbog krtosti hidroksiapatita i značajnog skupljanja tokom sinterovanja, postoje tendencije za razvojem kompozitnih HAP prevlaka. Poslednjih godina uočeno je da kompozitne prevlake unapređuju i druge funkcionalne osobine implantata, kao što su hemijska stabilnost, bioaktivnost, biokompatibilnost i antimikrobna svojstva [71]. Prirodni biorazgradivi ili sintetički polimeri se koriste u razvoju novih biokompozitnih prevlaka. Upotreba polimera omogućava da se termički tretman kompozitnih materijala vrši na nižim temperaturama sinterovanja [72].

### **2.1.3. BOKOMPOZITNE HIDROKSIAPATIT/POLIMER PREVLAKE**

Koštano tkivo pripada grupi vezivnih tkiva i karakteriše ga relativno mali broj ćelija (osteoblasta) okruženih ekstracelularnim matriksom (ECM). Za razliku od drugih vezivnih tkiva, tkivo kosti se sastoji od mineralizovanog ekstracelularnog matriksa, koji kostima daje tvrdoću, rigidnost i čvrstinu, što omogućava njihovu mehaničku funkciju za obavljanje potporne i zaštitne uloge skeletnog sistema [73,74]. ECM se sastoji iz organskog matriksa (kolagena vlakna), neorganske (mineralne) komponente i vode. Osnovna komponenta mineralnog ECM je hidroksiapatit koji daje kostima mehaničku čvrstoću. Zbog toga koštano tkivo se može posmatrati kao nanokompozitna struktura koja se sastoji od kolagena (tip I) i HAP [75]. Primena biokompozitnih hidroksiapatit/polimer materijala kao potencijalnih kandidata za reparaciju koštanog tkiva vezana je za upotrebu materijala po uzoru na biološke sisteme. Ovakvi biokompoziti, bilo da su u obliku skafolda ili prevlaka, se danas najviše koriste u tkivnom inženjerstvu upravo zbog svojstva da pospešuju ćelijsku adheziju i stvaranje mineralizovanog ECM [76].

Kombinovanjem hidroksiapatita i različitih vrsta polimera postižu se fizičko-hemijske i mehaničke osobine koje su najpribližnije osobinama prirodnog koštanog tkiva [77]. Modifikacija površine HAP prevlake vrši se dodatkom polimera u cilju poboljšanja adhezije prevlake i istovremenog smanjenja njene krtosti. Za tu namenu koriste se prirodni polimeri, kao što su polisaharidi – alginat, hitozan/hitin i hijaluronska kiselina; proteini – kolagen i svila; kao i različita biovlakna – lignin i celuloza [77]. S

druge strane, od sintetičkih polimera koriste se poli-L-laktid (*eng.* PLLA), poli-glikolna kiselina (*eng.* PGA), poli-ε-kaprolakton (*eng.* PCL) i poli-hidroksibutarat (*eng.* PHB) [78,79]. U istraživanjima se pokazalo da sintetički polimer ima relativno dobru mehaničku čvrstoću, ali je površina prevlake hidrofobna što je glavni uzrok nedostatka odziva ćelija. Prirodni polimeri imaju bolji odziv koštanog minerala pospešujući adheziju ćelija i rast novog tkiva. Carlson sa saradnicima [80] je potvrdio da nanočestični HAP suzbija rast patogenih bakterija (najčešći uzrok infekcije implantata), dok s druge strane kompozit hidroksiapatita sa sintetičkim polimerom kao što je poli-laktid-ko-glikolid ustvari ubrzava rast patogenih bakterija.

Poslednja istraživanja se razvijaju u pravcu dobijanja novih nanokompozita HAP u kombinaciji sa prirodnim polimerima, kao što su hitozan, alginat i hijaluronska kiselina. Literaturni podaci su pokazali da biopolimer poboljšava adheziju kompozitne HAP/biopolimer prevlake istovremeno izbegavajući densifikaciju tokom termičkog tretmana koja je karakteristična za čistu keramičku prevlaku [81]. Takođe, pokazalo se da HAP/biopolimer kompoziti pored odličnih mehaničkih svojstava poseduju izuzetnu biokompatibilnost i osteokonduktivnost [81]. Upotreba polisaharida kao veoma pogodnih kandidata za kompozitne HAP/biopolimer prevlake bila je tema istraživanja Pang i Zhitomirsky [82].

Najzastupljeniji prirodan polimer koji se koristi za dobijanje HAP/polimer prevlaka je hitozan zbog svojih odličnih antimikrobnih osobina [83]. Ovaj polisaharid dobijen deacetilovanjem iz hitina (sastojak opni insekata ljuštura), je biodegradabilan, netoksičan i poseduje antimikrobna svojstva [83,84]. Iz literature je poznato da kompozit HAP/hitozan pospešuje rast, proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta [85]. Najnovije istraživanje Song i saradnika [83] pokazalo je izuzetnu biokompatibilnost i osteokonduktivnost HAP/hitozan prevlaka prema koštanom tkivu, kao i odlična antimikrobna aktivnost. Gang i saradnici [86] su ispitivali interakciju između tri faze: glukomana (*eng.* konjac glucomannan, KGM), nanočestica HAP (*eng.* n-HAP) i hitozana (*eng.* CS) u trojnom n-HAP/KGM/CS kompozitu koji je dobijen metodom taloženja. Novi KGM polimer je glukoman rastvoran u vodi sa velikim brojem hidroksilnih grupa koji se dobija iz *Amorphophallus konjac* biljke. Stabilne intermolekulske veze se uspostavljaju između KGM i hitozana polimera, nakon čega se

uspostavljaju vodonične veze sa n-HAP formirajući stabilan trojni kompozit kao potencijalan biomaterijal za primenu kao koštani implantati.

Obećavajuća kombinacija hidroksiapatit/alginat se uveliko primenjuje u tkivnom inženjerstvu kao porozan mineralizovani skafold zbog biokompatibilnosti i biodegradabilnosti polimera [87]. Alginat je prirodan polisaharid ekstrahovan iz morske trave i bakterija, a dodavanje dvovalentnih katjona npr. kalcijuma u vodeni rastvor alginata dovodi do umrežavanja polimera, odnosno formiranja hidrogela. Najnovija istraživanja Alves Cardoso i saradnika [88] se odnose na proučavanje mehanizma geliranja i biokompatibilnosti novog alginat/glicerol/HAP kompozita sa potencijalnom primenom kao injektabilnog skafolda za regeneraciju koštanog tkiva. Pomenuta grupa utvrdila je da se kinetika geliranja može kontrolisati variranjem količine HAP ili glukon-deltalaktone (*eng.* glucono-deltalactone, GDL), komponente kojom se podešava kiselost. Nove alginat/glicerol/HAP kompozite je ipak potrebno optimizovati, iako su preliminarna *in vivo* ispitivanja pokazala da su minimalno invazivni kao materijali za koštane ispune. Rossi i saradnici [87] su istraživali sastav i strukturu okolnog koštanog tkiva nakon ugradnje dva različita kompozita HAP/alginat skafolda i sinterovanog HAP u temenu kost pacova. Novoformirana kost laminarne strukture potvrđuje da su biomaterijali ubrzali proces koštane mineralizacije. Struktura kosti se razlikuje na granici biomaterijal/kost i utvrđeno je da HAP/alginat kompozit pospešuje stvaranje mineralizovane kosti. Feng i saradnici [89] su ispitivali nove HAP/alginat mikročestice, dobijene ekstruzijom HAP/alginat suspenzije u  $\text{CaCl}_2$  rastvor kao potencijalne koštane ispune. Ovako dobijene mikročestice uniformne veličine su sinterovane da bi se formirala hrapava porozna površina sa međusobno povezanim porama kao budućim nosiocima ćelija. Pokazali su da su ovakve HAP/alginat mikročestice kao potencijalni nosioci osteoblasta obećavajući kandidati za koštane implantate. Yu i saradnici [90] su dobili nove, veoma porozne kompozitne skafolde elektrospining tehnikom koji se sastoje od alginata, hitozana, kolagena i HAP. Na ovaj način dobijen 3D porozan skafold je dobar za diferencijaciju i proliferaciju osteoblasta. Oslobođanje kolagena je iznosilo oko 17 % nakon stajanja u simuliranoj telesnoj tečnosti, što znači da je razgradnja skafolda smanjena u odnosu na skafold od čistog kolagena i zbog toga je bolji kandidat za regeneraciju koštanog tkiva.

Celuloza je prirodan polisaharid sačinjen od molekula D-glukoze koji su međusobno povezani  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glikozidnom vezom. Celuloza je pogodan materijal za dobijanje implantata kao zamena krvnih sudova i hrskavice, jer se pokazalo da endotelne ćelije, glatke mišićne ćelije i hondrociti jako lepo prijanjaju za njena vlakna [91]. Međutim, za primene u medicini se najčešće koristi bakterijska celuloza (*eng.* BC) koja nastaje fermentacijom bakterija *Acetobacter xylinum*. BC je biokompatibilna sa odličnim mehaničkim karakteristikama zbog čega se koristi kao skafold u tkivnom inženjerstvu. He i saradnici [92] su ispitivali HAP/nanoceluloza filmove kao nove organsko-neorganske hibridne filmove jednostavnom i jeftinom tehnikom – mešanjem nanočestica HAP sa vodenim rastvorom celuloze uz hlađenje i koagulaciju u vodenom rastvoru Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Porozna struktura ovakvih filmova je odlična za stabilizaciju i disperziju nanočestica HAP koje su povezane jakim intermolekulskim vodoničnim vezama između celuloze i HAP. Pokazalo se da su ovakvi filmovi netoksični i odlične biokompatibilnosti sa velikim potencijalom primene u medicini. Jiang i saradnici [93] su istraživali karboksimetil-celulozu u svrhu dobijanja novih kompozita HAP/hitozan/karboksimetil-celuloza kao 3D skafolda metodom smrzavanja-sušenja. Pokazali su da su novi skafoldi sa 30 mas. % karboksimetil-celuloze imali idealnu poroznost uz najveću čvrstoću i da nakon stajanja u SBF rastvoru imaju prihvatljivu brzinu degradacije i odličnu bioaktivnost. Može se zaključiti da su ovako dobijeni kompozitni skafoldi odlični za koštane implantate.

Hijaluronska kiselina je glukoaminoglikan koji nalazi u ekstracelularnim tkivima u telu i sve više se koristi kao biomaterijal za skafolde [94]. Ishikawa i saradnici [94] su ispitivali dobijanje biokompatibilnog nanokompozita sastavljenog iz nanočestičnog HAP i hijaluronske kiseline. Njihova istraživanja su pokazala da se nanokompozit sa hijaluronskom kiselinom bolje vezuje za koštano tkivo u poređenju sa kolagenim vlaknima. Istraživanja Chen i saradnika [95] su pokazala dobijanje nanokompozita HAP/hitozan/hijaluronska kiselina kao 3D poroznog skafolda. *In vitro* ispitivanja su potvrdila da 3D skafold ima odličnu penetraciju ćelija i istovremeno podstiče rast i proliferaciju osteoblasta tako da se smatra potencijalno uspešnim koštanim implantatom.

Najnovija istraživanja ispituju upotrebu lignina, drugog po zastupljenosti biopolimera na svetu, kao pogodnog kandidata za kompozitne HAP/polimer prevlake.

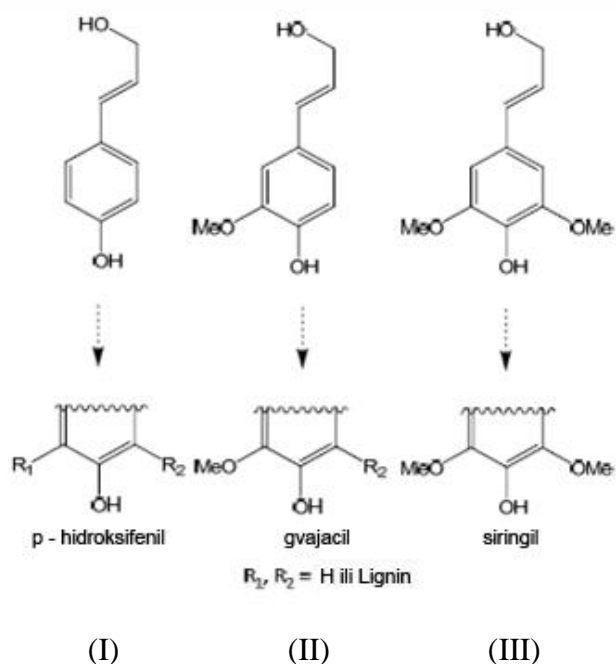
Lignin je kompleksan polifenolni polimer koji poseduje antioksidantna i antimikrobna svojstva, tako da je interesantna njegova potencijalna primena za kompozitne prevlake u medicini [96,97]. Mansur sa saradnicima [96] je prvi proučavao biokompozit hidroksiapatit/lignin (HAP/Lig) kao 3D skafold i koristio je organosolv lignin. Posle njih, naročito je interesantno pomenuti istraživanja Martinez i saradnika [97] koja su pokazala da se HAP/Lig skafoldi dobro integrišu sa koštanim tkivom, što znači da su odlična biokompatibilna i osteokonduktivna zamena za defekte u kostima. Naša pretpostavka je da će organosolv lignin, koji nema sumpora u svojoj strukturi, omogućiti stabilan kompozit u cilju dobijanja bolje povezane porozne strukture. Smatra se da će lignin u kompozitnim HAP/polimer prevlakama sprečiti pojavu ispucale površine kao što se navodi u istraživanju Wang i saradnika [98] za kompozitnu prevlaku sa hitozanom.

#### **2.1.4. LIGNIN**

Lignin (Lig) je kompleksan, amorfni, visoko umrežen polifenolni prirodni polimer. Nalazi se u drvetu kao jedna od tri glavne polimerne komponente. Zajedno sa celulozom i hemicelulozom, lignin formira efikasan kompozit sintetisan isključivo iz ugljenika, kiseonika i vodonika uz pomoć sunčeve energije. Uloga lignina u kompozitu je da deluje na matriks materijala i vezuje mikrofibrile, stoga je neophodan za vertikalni rast biljaka i drveća. Takođe, zbog hidrofobnosti u ratinometriji obezbeđuju nepermeabilnost ćelijskih zidova što podstiče bolji transport unutrašnjih fluida u tkivima biljaka i ima zaštitnu ulogu od parazita i drugih bioloških napada. Poseduje izuzetno dobra antimikrobna svojstva, jer predstavlja fizičku barijeru protiv prodora enzimskih sistema [99].

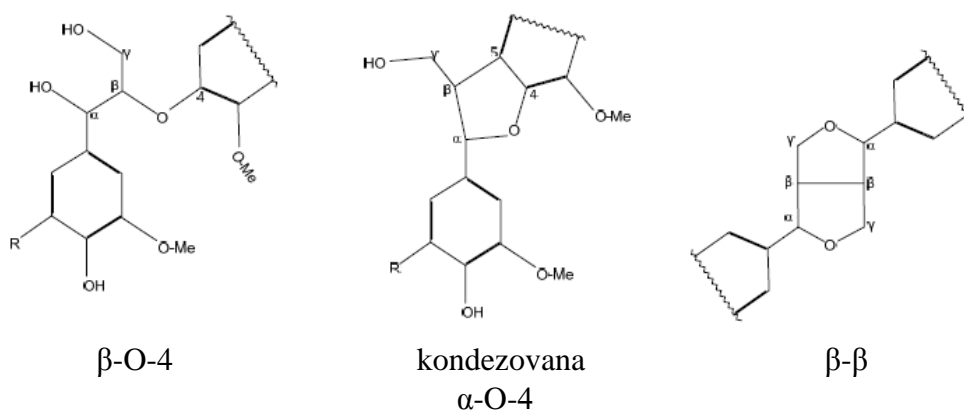
Lignin je jedan od najkorisnijih prirodnih resursa, koji sadrži fenolne i alkoholne grupe koje se koriste kao reaktivna hemijska mesta. Predstavlja trodimenzionalni polimer sintetisan polazeći od monolignola: p-kumaril, koniferil i siringil alkohol (slika 3). Zbog uspostavljanje različitih vrsta veza između tri fenil-propanskih jedinica, lignin osim OH<sup>-</sup> grupa, ima veliki broj drugih funkcionalnih grupa kao što su alkoholna, hidroksilna, metoksilna, karbonilna i karboksilna [100]. Grupe su zastupljene u različitim količinama i proporcijama, u zavisnosti od genetskog porekla i primenjenog

procesa ekstrakcije [101]. Stoga, karakterizacija lignina je izuzetno težak zadatak, zbog njihove različitosti u pogledu biljnog izvora i metode ekstrakcije [102].



**Slika 3.** Osnovne strukturne jedinice lignina-monolignoli: p-kumaril (I), koniferil (II) i sinapil (III) alkoholi [59].

Klasifikacija lignina zavisi od vrste zastupljenosti fenilpropanskih jediničnih struktura: para-hidroksifenil - H (p-kumaril), gvajacil - G (koniferil) i siringil - S (sinapil), ali i od porekla [103]. Lignini četinara (*gymnospermae*) imaju dominantnu gvajacil grupu, a lišćara (*angiospermae*) siringil u različitim odnosima [103]. Mala količina od oko 5 % p-kumaril alkohola je prisutna kod svih vrsta lignina, osim u slučaju kompresionog drveta četinara koje ima veću količinu od oko 20 % p-kumaril alkohola.



**Slika 4.** Neke od vrsta veza zastupljene u strukturi lignina [59].

Smatra se da dehidrogenativni polimer - veštački lignin dobro simulira prirodni lignin *in situ*. Postupkom enzimatske dehidrogenizacije cimernih alkohola nastaju: pet rezonantnih hibridnih oblika za kumaril, 4 za koniferil i 3 za sinapil što je posledica radikalnog elektrona i mogućnosti njegove delokalizacije na više različitih mesta. Kuplovanjem/umrežavanjem, nastaju diligninoli koji dehidrogenovanom polimerizacijom uspostavljaju veze gradeći lignin. Jedina izvesna regularnost u načinu stvaranja lignina jeste dominantno ponavljanje  $\beta$ -O-4 aril etarske veze. Međutim, javljaju se i veze kao što su:  $\alpha$ -O-4, 4-O-5,  $\beta$ -5, 5-5,  $\beta$ -1 i  $\beta$ - $\beta$  (slika 4) koje su posledica prisustva rezonantnog elektrona, mada ima još nerazjašnjenih pitanja u vezi sa biosintezom lignina i debata da li postoji doslednost ponavljanja podstrukture koja ukazuje na uređenost aromatične strukture. Sve najvažnije etarske i C-C veze su prikazane u tabeli 3 [104]. Najviše su zastupljene etarske veze u odnosu na C-C, ali postoje i slobodne hidroksilne grupe. Karakteristične alkoholne grupe, metoksilne i aldehidne grupe čine lignin jako reaktivnim [105].

**Tabela 3.** Prisustvo vrsta veza između monolignola u odnosu na njihov ukupan broj, u procentima [104]

Naziv veze	Vrsta veze	Četinarsko drvo (%)	Lišćarsko drvo (%)
$\beta$ -aril etarska	$\beta$ -O-4	35–60	50–70
Diaril etarska	4-O-5	<4	7
Fenol kumarinska	$\beta$ -5	11–12	4–9
Dihidroksi bifenilna	5-5	10	$\approx$ 5
Diaril 1,3-diol propanska	$\beta$ -1	1–2	1
Pinorezinolna	$\beta$ - $\beta$	2–3	3–4
Dibenzodioksanska	5-5-O-4	4–5	Tragovi
Spiro-dienonska	$\beta$ -1 $\alpha$ -O- $\alpha$	1–3	2–3

#### 2.1.4.1. FIZIČKO-HEMIJSKA SVOJSTVA LIGNINA

Struktura i fizičko-hemijske osobine lignina zavise od zastupljenosti određenih funkcionalnih grupa, naročito fenolnih, kao i zastupljenosti podstrukture, koje zavise od metoda pulpovanja. Olieť sa saradnicima [106] je razvio model kojim se mogu

predvideti funkcionalne grupe lignina etanolnim ekstrahovanjem na različitim vremenima, temperaturama i koncentracijama etanola.

Srednja masena vrednost molarne mase ( $M_w$ ) i srednja brojna vrednost molarne mase ( $M_n$ ) su bitne veličine da bi se odredila polidisperznost ( $M_w/M_n$ ) uzorka. U literaturi je primećeno da su srednje masene vrednosti molarnih masa lignina u širokom rasponu i zavise od prirode izvora iz kojeg se dobijaju ekstrakcijom. Prema istraživanju McCarty i saradnika ustanovljeno je da su lignosulfati lignina imali srednje masene vrednosti molarne mase čak manje od 260 [107]. Nasuprot tome srednje masene vrednosti molarne mase od preko 50 000 000 su otkrivene nakon frakcionisanja alkalno tretiranih lignina. Gosselink i saradnici [101] su ispitali srednje masene vrednosti molarnih masa,  $M_w$  lignina iz lišćarskog drveta (*Alcell*<sup>TM</sup>) u različitim rastvaračima koje su se kretale u opsegu od 6820 – 11 000 Da, dok se  $M_n$  kretao od 1320 – 1800 Da. Poznato je da je  $\beta$ -O-4 veza najčešće zastupljena u svim ligninima, ali veliki značaj imaju C–C veze od kojih je najzastupljenija ona u kojoj učestvuje  $C_5$  atom iz aromatičnog prstena [108]. Monolignoli G-tipa mogu da učestvuju u formiranju ovih C–C veza, dok s druge strane to nije moguće sa S-tipom pošto su  $C_5$  pozicije zamenjene metoksilnom grupom. Veoma je važna ova činjenica pri određivanju  $M_w$  lignina jer veoma stabilna C–C veza ne podleže raskidanju tokom procesa pulpovanja drveta. Lignin sastavljen od monolignola G-tipa ima veću vrednost  $M_w$  nego lignin sa velikim sadržajem monolignola S-tipa. Tejado sa saradnicima [108] je potvrdio da veća zastupljenost monolignola G-tipa u strukturi lignina povećava vrednost  $M_w$ . Pokazano je da *Alcell*<sup>TM</sup> lignin ima duplo više fenolnih grupa u odnosu na druge vrste lignina, kao i da je odnos fenolnih prema hidroksilnim grupama znatno veći [108]. Sadržaj fenolnih hidroksilnih grupa ukazuje na stepen degradacije lignina, jer se  $\beta$ -O-4 veza tokom procesa pulpovanja raskida formirajući fenolnu grupu [109].

#### **2.1.4.2. ORGANOSOLV PULPOVANJE**

Metode razdvajanja lignina iz lignocelulozne mase su: kraft, sulfatno i organosolv pulpovanje. U organosolv procesu, razvijenom tokom 90-ih godina prošlog veka, drvo je tretirano u sudovima pod pritiskom na visokoj temperaturi u različitim organskim rastvaračima, kao što su metanol ili etanol, koji se mešaju sa vodom u odnosu 1:2 i HCl kao pogodnim katalizatorom [110]. Hlorovodonična kiselina se dodaje



radi raskidanja veza između lignina i polisaharida, kao i da bi se lignin lakše rastvorio u organskom rastvaraču. pH vrednost rastvora koja se pokazala kao najpogodnija za ekstrakciju je 2, a lignin se dobija centrifugiranjem i sušenjem na temperaturi od 60 °C u vakuum pećnici do konstantne mase [111]. Razlikuju se četiri glavna tipa procesa i organosolv lignini su imenovani prema njima: *Alcell* lignin, *ASAM* lignin, *Organocell* lignin i *Acetosolv* lignin [112]. Organosolv lignini su visoke čistoće koji ne sadrže sumpor i zahvaljujući njihovim osobinama su pogodni u tradicionalnoj primeni.

Prema literaturi [103] organosolv pulpovanje sa etanolom daje 4 – 4,5 % veću količinu lignina u poređenju sa kraft pulpovanjem. Ovaj proces ne samo što je ekološki unapređen zbog odsustva sumpornih jedinjenja već je krajnji produkt veoma visokog kvaliteta. Najčešće korišćeni rastvarači su aceton i etanol. Za pulpovanje drvene mase sa 40 % vodenog rastvora acetona ili etanola potrebno je 60 minuta na temperaturi od 180 °C da bi se dobio lignin dobrih karakteristika. Organski rastvarači se uvek mešaju sa vodom radi smanjenja pritiska i pH vrednosti rastvora pošto se hidrolizom acetatnih grupa izdvaja sirćetna kiselina  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , a posledica je bolje rastvaranje hemiceluloze. Međutim, jedini nedostatak je što upotreba organskih rastvarača uključuje visok rizik zbog lake zapaljivosti. Zato najbolji rastvarači za organosolv pulpovanje jesu metanol i etanol, tzv. ekološki rastvarači. Početkom 1930-e su prvi put preporučeni od strane Kleinert-a. Za organosolv pulpovanje lišćara potreban je kiseli katalizator, sulfatna kiselina koncentracije  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  koja smanjuje temperaturu procesa za 30 °C. Pasquini i saradnici [103] ispitali su uticaj koncentracije etanola od 50–100 % i potvrdili da je najoptimalnija koncentracija etanola 50 %. Lora i Aziz [103] opisali su *Alcohol Pulping and Recovery* (APR) proces sa drvnom piljevinom tretiranom u tri stupnja, sa izuzetno čistim rastvaračem. Ispitan je uticaj parametara procesa: vreme ekstrakcije, temperatura, sastav rastvarača i pH vrednost. APR process je 1987. godine dobio naziv *Alcell*. U *Alcell* procesu kao organski rastvarač koristi se 40 % vodenog rastvora etanola za delignifikaciju drveta na temperaturama između 180 – 210 °C i pritisku od 2 – 3,5 MPa.

### **2.1.4.3. MEHANIZAM ORGANOSOLV PROCESA**

Ekstrakcija lignina predstavlja kombinaciju tri procesa: solvolize, solvatacije i rastvaranja. Solvoliza je raskidaje  $\alpha$ -aril etar veza u makromolekulu, a solvatacija jeste

okruživanje lignin fragmenata sa molekulima rastvarača i rastvaranje. Najlakše se hidrolizuju  $\alpha$ -aril etarske veze, dok su  $\beta$ -aril etarske ( $\beta$ -O-4) veze nešto otpornije. Kod četinara hidroliza  $\alpha$ -aril etarske veze je važniji proces, dok su Bose i Fransis [113] potvrdili da je kod lišćara hidroliza  $\beta$ -O-4 veze dominantna i da utiče na sastav dobijene pulpe.

Od strane nekoliko autora potvrđeno je da se proces pulpovanja odigrava u tri izražena stupnja označena kao inicijalni, glavni i završni. Najveća količina dobijenog lignina dobijena je u glavnom stupnju, dok se u završnom stupnju reakcija usporava. Inicijalni stupanj se ne može detektovati. Energija aktivacije ( $E_a$ ) i količina dobijenog lignina variraju u zavisnosti od vrste biljke i od uslova procesa pulpovanja. Meshgini i Sarkanen [103] su potvrdili da je vrednost energije aktivacije između 79 i 118 kJ/mol. Ova vrednost je jako bliska energiji aktivacije hidrolize  $\alpha$ -aril etarskih veza, dok je brzina hidrolize  $\beta$ -aril etarskih veza jako spora i ne može se uzeti u razmatranje. Što znači da proces delignifikacije zavisi samo od brzine hidrolize  $\alpha$ -aril etarskih veza.

Važni parametri organosolv pulpovanja su pH vrednost i temperatura. Arenijusovom jednačinom se objašnjava direktna zavisnost konstante brzine reakcije od temperature delignifikacije. Vazquez i saradnici [103] potvrdili su uticaj pH vrednosti na proces pulpovanja pošto dodavanje HCl kao katalizatora smanjuje energiju aktivacije sa 78,8 na 69,7 kJ/mol. Nekoliko faktora utiče na promenu pH vrednosti tokom etanol pulpovanja. Acetilne grupe hemiceluloze se oslobađaju u vidu sirćetne kiseline povećavajući kiselost luga za pulpovanje hemijskog rastvora. Hewson i saradnici [103] pokazali su da se katalizator jonizuje u prisustvu vode ubrzavajući delignifikaciju. Stoga, niža koncentracija etanola rezultuje ubrzavanjem reakcije. Ova činjenica je potvrđena od strane Goya i saradnika [103], kao i da je optimalna koncentracija etanola za najveći prinos lignina 50 %. Takođe, zabeležili su da se siringil lignin brže odstranjuje nego gvajacil lignin, kada se čist lignin dobija uparavanjem rastvarača.

#### **2.1.4.4. PRIMENA LIGNINA**

Izbor polimera kao materijala za koštane implantate zavisi od više faktora, osim generalnog zahteva za biokompatibilnošću: mehanička svojstva polimera, biodegradibilnost i sposobnost uspostavljanja direktnih veza sa okolnim koštanim tkivom. Generalno, polimeri imaju jako slabe mehaničke karakteristike, i nemaju

moгуćnost direktnog vezivanja sa kostima. Uvođenjem funkcionalnih grupa u polimerni lanac preko kalcifikacije polimernog materijala vezivanjem sa biostaklom, staklastom keramikom i hidroksiapatitom, povećava se bioaktivnost implantata.

Novi hibridni HAP/polimer kompoziti su obećavajuća mogućnost usavršavanja koštanih implantata. Svrha HAP u polimernom matriksu jeste da se inicijalni polimer koji nije bioaktivan, modifikuje tako da se dobije kompozit kompatibilan sa okolnim tkivom, dok polimer istovremeno poboljšava mehanička svojstva kompozita, pogotovo elastični moduo i čvrstoću. Vezivanje između neorganske i organske faze igra važnu ulogu u svojstvu kompozita. Uspostavljanjem jakih veza poboljšavaju se mehanička svojstva kompozita. Kao što je već rečeno, današnja istraživanja se razvijaju u cilju dobijanja novih HAP/biopolimer kompozita sa biopolimerima, kao što su hitozan, alginat, celuloza, hijaluronska kiselina i lignin.

Lignin, kao najzastupljeniji obnovljivi polifenolni (aromatski) polimer na svetu, se proučava u cilju primene u biomedicini [114]. Lignin i derivati imaju odgovarajuću hemijsku strukturu za upotrebu u prevlakama i kompozitima jer imaju male čestice, hidrofobni su i imaju sposobnost formiranja stabilne smeše sa neorganskim HAP. Poslednjih godina značajni uspesi su postignuti u proučavanju kompatibilnosti i strukturnih osobina materijala baziranih na ligninu [114]. Ispitivani su organosolv lignini, jer su pokazali značajno bolju rastvorljivost i termičke osobine nego sulfatni ili kraft lignini [115]. Primena lignina u medicini je interesantna, jer dovodi do termičke stabilnosti, hidrofilnosti, biokompatibilnosti različitih materijala [113-115]. Biokompozit hidroksiapatit/lignin (HAP/Lig) kao 3D skafold su prvi proučavali Mansur i saradnici [96], a korišćen je organosolv lignin polimer.

U dosadašnjim ispitivanjima je dokazano da HAP/Lig skafold ušvrćuje reparaciju koštanog tkiva, jer lignin poseduje antioksidantne i antimikrobne osobine, stoga njegovo uvođenje bi bilo interesantno za medicinsku primenu. Na osnovu do sada postignutih rezultata naša ideja je bila da upotrebimo organosolv lignin kao najpogodniju komponentu za HAP kompozite koja bi obezbedila bolju povezanost unutrašnje porozne strukture u cilju unapređenja osteogeneze.

Pan i saradnici [116] su ispitivali uslove rastvorljivosti i fizičko-hemijska svojstva ekstrahovanog organosolv lignina. Odlična rastvorljivost lignina, više od 90 %,

je dobijena iz rastvora koji su sadržali više od 65 % etanola. Iz istih razloga se HAP/Lig prevlaka na titanu taloži iz etanolske suspenzije.

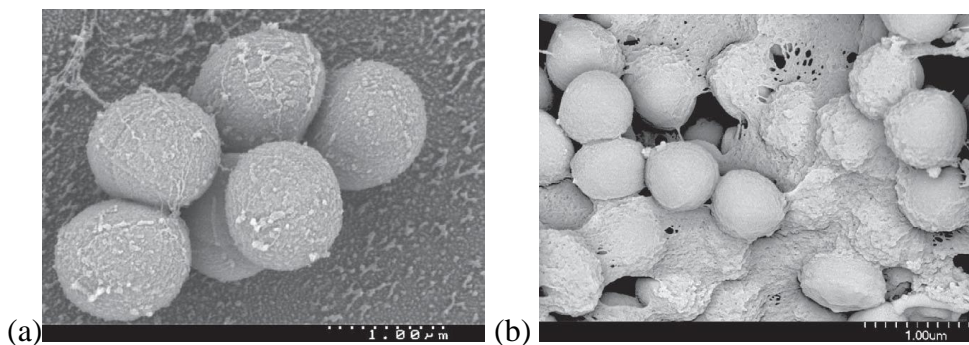
### **2.1.5. PREVLAKE HIDROKSIAPATITA DOPIRANE SREBROM**

Upotreba srebra kao antimikrobnog agensa za biomedicinsku primenu je veoma raspostranjena jer su bakterije otporne na antibiotike postale glavni problem posle hirurške intervencije [117]. Medicinski proizvodi na bazi srebra, od krema i zavoja za zarastanje rana, do stentova sa prevlakama, su se pokazali kao veoma efikasni u sprečavanju bakterijskih infekcija [118]. Poboljšanja u razvoju novih proizvoda na bazi srebra se kontinualno traže. Posebno je veliki napredak u tehnologijama razvoja bioaktivnih materijala dopiranih srebrom za implantate, sa ciljem kombinovanja antimikrobnih svojstava sa jedinstvenim svojstvima biomaterijala.

Bakterijske infekcije na površini biomaterijala se pojavljuju nakon implantacije u telu kao odgovor imuno sistema organizma. Nakon što se bakterije vežu za površinu implantata dolazi do formiranja višćelijske zajednice tzv. biofilma. Istraživači navode da prisustvo implantata povećava verovatnoću inficiranja sa bakterijom *Staphylococcus aureus* koja može dovesti do ozbiljnih komplikacija (slika 5) [119,120]. Imuni sistem ne može da spreči naseljavanje bakterija ukoliko njihovo prianjanje počne pre regeneracije tkiva jer se formira zaštitni sloj biofilma (slika 5). Dakle, sprečiti prianjanje bakterija u početnom postoperativnom periodu je od suštinskog značaja pošto se pokazalo da je biofilm izuzetno otporan na imuni sistem i antibiotike. Pored toga iz biofilma mogu se odvojiti pojedinačne bakterije u okolna tkiva i krvotok [120]. Patogeni mikroorganizmi posebno gram-pozitivne *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* su uzrok čak 90 % infekcija implantata, kao i gram-negativne *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* i *Proteus vulgaris*.

Srebro je delotvoran materijal koji sprečava rast bakterija u širokom spektru, bez stvaranja rezistentnosti, zbog čega proizvodi sa srebrom zaslužuju posebnu pažnju. Antibakterijsko dejstvo srebra zasniva se na molekularnom mehanizmu toksičnosti u kome se  $Ag^+$  hemijski vezuje za različite molekule, kao što su DNK, komponente ćelijskog zida ili tiolske grupe metaboličkih enzima bakterija čime dolazi do sprečavanja metaboličkih puteva, propustljivosti membrane i inhibicije bakterijske replikacije (slika 6) [120]. Antibakterijska aktivnost srebra je izuzetno velika u odnosu

na čak 16 različitih sojeva bakterija uključujući *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Srebro se pokazalo toksično za bakterije pri jako malim koncentracijama ( $10^{-5}$  do  $10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> Ag po ćeliji) što znači da smanjuje prisustvo mikroorganizama na površini biomaterijala implantata. S druge strane aktivni joni srebra nisu citotoksični prema ljudskim ćelijama čime je obezbeđena dugoročna antibakterijska otpornost implantata [120].



**Slika 5.** SEM mikrofotografija bakterije (a) *S. Aureus* i (b) njihov bakterijski biofilm pokriven polisaharidnim matriksom [121].



**Slika 6.** Antimikrobna aktivnost srebra [122].

Sintetički HAP se često koristi kao prevlaka na metalnim implantatima zbog svoje biokompatibilnosti i sposobnosti da formira jake veze sa kostima. Mogućnost da se spreči infekcija izazvana implantatom upotrebom antimikrobnih svojstva srebra izazvala je interesovanje za razvojem HAP kompozita koji sadrže srebro. Međutim, prilikom sinterovanja ovih kompozita javljaju se teškoće u vezi sa isparavanjem zbog niske tačke topljenja srebra [123]. Jedno od rešenja je upotreba hidroksiapatita dopiranog srebrom (Ag/HAP). Različite metode su razvijene za dopiranje srebra u HAP,

uključujući jonsku razmenu, mokru hemijsku precipitaciju i sol-gel metodu [124]. Chung i saradnici [125] su pokazali da se dodavanjem 100 ppm jona srebra u sol-gel prekursor kalcinisanja HAP prevlake na Ti-6Al-4V supstratu sprečava rast patogenih bakterija. Rameshbabu sa saradnicima [126] je ispitao uticaj koncentracije jona srebra (0,5 – 3 mas. %) u nanočesticama HAP dopiranim srebrom (30 nm) na antimikrobnu efikasnost prema *E. coli* i *S. aureus*. Pokazali su da niska koncentracija srebra smanjuje rizik od bakterijske infekcije, ali ne utiče na bioaktivnost prevlaka.

Ključno pitanje koje treba rešiti je kontrola otpuštanja jona srebra iz materijala prilikom čega treba izbeći dva najveća problema: jedan je niska koncentracija jona srebra otpuštenog sa dopiranog materijala nedovoljna za antimikrobnu efikasnost i drugi previsoka koncentracija koja može izazvati citotoksičnost [124].

#### **2.1.6. TITAN**

Titan je jedan od malog broja biokompatibilnih metala koji se uspešno primenjuje kod dentalnih i medicinskih implantata, zbog svojih dobrih mehaničkih karakteristika, kao što su nizak Jungov moduo, otpornost, čvrstoća i žilavost, kao i relativno visoka otpornost na koroziju [127]. Međutim, uprkos literaturnim podacima o maloj brzini korozije titana *in vitro*, postoje podaci da je korozija *in vivo* veća, zbog interakcije implantata sa telesnom tečnošću, proteinima i ćelijama, koja dovodi do otpuštanja jona titana i njegove akumulacije u susedno tkivo ili migracije u ostale delove tela [128]. Stoga, da bi se poboljšala koroziona stabilnost, biokompatibilnost i bioaktivnost titana i njegovih legura koriste se različite metode modifikacije površine titana kao što su peskarenje, formiranje nanoporozne strukture TiO<sub>2</sub>, nanošenje prevlake hidroksiapatita ili hemijski tretman površine [129].

Specifična i dugotrajna integracija između implantata i tela određuje brzinu ozdravljenja pacijenata. Stoga se hemijski sastav površine i topografija smatraju vrlo važnim karakteristikama kada su u pitanju koštani implantati. Ove osobine regulišu kontakt implantat–kost kroz adsorbciju jona i molekula proteina novonastalih slojeva kalcijum–fosfata i interakciju sa različitim tipovima ćelija, kao što su bela krvna zrnca, ćelije koštane srži (hematopoetske ćelije) i osteoblasti. Struktura i topografija površine treba da obezbede dobro prijanjanje za kost, a porozna struktura površine da olakša vezu sa koštanim tkivom zbog mogućnosti rasta osteoblasta unutar pora [128].

Pokazano je da nanoporozan sloj oksida titana omogućava bolje prijanjanje implantata titana za kost jer pospešuje urastanje koštanog tkiva u pore implantata. Nanotubularni sloj oksida titana je uočen kao perspektivan biokompatibilan materijal sa dobrom termičkom stabilnošću i otpornošću na koroziju. Oksid titana u nanotubularnom obliku se može dobiti različitim postupcima, kao što su sol–gel postupak, hemijska priprema površine titana u različitim elektrolitima, sonohemijsko taloženje i anodizacija [130]. Međutim, alergije na titan se pojavljuju sve češće iako se smatralo dugo vremena da je neutralan u organizmu [131]. Kao što je već pomenuto uspešna implantacija zavisi od mehaničkih, mikrostrukturnih i površinskih osobina materijala. Ključnu ulogu za pravi odgovor tela na implantat ima površina koja je u dodiru sa okolnim tkivom. Zbog toga modifikacija površine metalnog supstrata je najčešći pristup rešavanja ovog problema. Nanošenje bioaktivnih keramičkih prevlaka, hidroksiapatita ili kompozitnih HAP/polimera i HAP/biopolimera, na titan je najbolji način da se dobije koroziono otporan i biokompatibilan implantat.

## **2.2. FORMIRANJE HIBRIDNIH KOMPOZITNIH PREVLAKA**

Kalcijum–fosfatne prevlake se mogu nanositi različitim metodama taloženja kao što su termičko prskanje, taloženje pulsirajućim laserom, sol-gel, biomimetički rast i elektroforetsko taloženje [132].

Termičko ili plazma prskanje (*eng.* plasma spraying) je najrasprostranjenija komercijalna tehnika zbog lake manipulacije opremom, velike brzine nanošenja i jeftinih troškova [132]. U osnovi ovog procesa jeste ubrizgavanje materijala u obliku praha u plamen plazme na veoma visokoj temperaturi, pri čemu se materijal brzo zagreva i ubrzava ka površini metalnog supstrata. Nakon transfera vrućeg materijala na površinu metala dolazi do brzog hlađenja i formiranja prevlake. Ovaj postupak se pravilno naziva „hladan proces“ zbog niske temperature metalnog supstrata i na taj način se izbegavaju oštećenja, fazne i strukturne promene metala. Takođe, relativno niska temperatura metalnog supstrata tokom procesa taloženja je od posebnog značaja pošto se ne utiče na mehaničke karakteristike materijala implantata tokom plazma prskanja. Međutim, ova tehnika ima mnogo nedostataka, kao što su slaba adhezija prevlake, formiranje šupljina i pukotina, neuniformna morfologija i kristaliničnost prevlake.

Taloženje pulsirajućim laserom (Pulsed Laser Deposition, *eng.* PLD) je tehnika koja se pokazala efikasnom za dobijanje tankih kalcijum-fosfanih filmova odlične ahezije na metalnim supstratima [133]. U PLD metodi pulsirajući laser je usmeren ka meti oblika pastile, kako bi materijal ispario u obliku plazme pod vakuumom ili različitim gasovima. Plazma koja je sačinjena od jona, atoma, molekula ili klastera se taloži na paralelno postavljen metalni supstrat. Dakle, taloženje tankih kalcijum-fosfatnih filmova zavisi od fotohemijskog i termičkog efekta laserskog zračenja. PLD tehnika obezbeđuje stehiometrijski prenos materijala od mete do metalnog supstrata, odlično prianjanje prevlake i visoku stopu rasta filma. Osim toga, moguće je kontrolisati stehiometriju i kristaliničnost širokog spektra materijala pravilnim izborom ablacije i parametara taloženja [133]. Termički tretman posle taloženja uglavnom u vodenoj pari je od ključnog značaja, jer obnavlja stehiometriju kalcijum-fosfanog materijala i poboljšava kristaliničnost prevlake.

Sol-gel tehnika u poređenju sa ostalim tehnikama taloženja ima određene prednosti kao što su odlična kontrola nad formiranjem željenih faza, velika čistoća formiranih faznih struktura, fino zrnasta struktura i niske temperature tokom taloženja [132]. Štaviše, ova tehnika je ekonomski povoljna sa tehnički jednostavnom opremom za taloženje supstrata kompleksnih oblika. Uprkos prednostima sol-gel tehnika ima par nedostataka, na primer slaba adhezija prevlake, mala otpornost na habanje materijala i velika poroznost. U ovom postupku kalcijum-fosfatne prevlake se pripremaju potapanjem supstrata u rastvoru soli kalcijum-nitrata i fosfornog gela. Formiranje porozne prevlake, ne tako guste strukture i lošeg prianjanja na metalnom supstratu ograničava njihovu primenu. Zbog toga ovako dobijene prevlake je neophodno sinterovati na visokim temperaturama da bi se poboljšala adhezija i gustina prevlake. U zavisnosti od temperature sinterovanja mogu se dobiti različite fazne strukture kalcijum-fosfata, što je glavni nedostatak ovog postupka.

U cilju prevazilaženja nedostataka gore opisanih metoda za dobijanje kalcijum-fostanih prevlaka razvijena je tehnika biomimetičkog rasta (*eng.* biomimetic growth), koja je inspirisana prirodnim procesom biomineralizacije [132]. Ova tehnika nanošenja prevlaka se može primeniti na različite materijale kao što su biokeramika (kalcijum-fosfatna jedinjenja), metali i organski polimeri [134]. Međutim, tehnika biomimetičkog rasta je uspešna za taloženje samo onih površina materijala sa aktivnim hemijskim



grupama koja služe kao mesta za nukleaciju mineralizacije. Aktivne hemijske grupe kao što su dihidrogen fosfat ( $-H_2PO_4$ ) ili karboksilne kiseline ( $-COOH$ ) pokazale su se kao veoma pogodne za biomineralizaciju, dok metil grupa ( $-CH_3$ ) i grupe sačinjene od njih sprečavaju ovaj proces. U principu ovaj proces taloženja se zasniva na potapanju materijala u fiziološki rastvor (simulirana telesna tečnost), koristi se za *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti, koji je u ovom slučaju prilagođenog sastava kako bi se dobila prevlaka sastava i strukture slične prirodnim kostima. Ovaj metod podrazumeva heterogenu nukleaciju i rast kristala kao u kostima na površini implantata na temperaturi od 37 °C i pH vrednosti od 7,4; kao što je u ljudskom telu. U cilju da se ubrza proces taloženja prevlake iz fiziološkog rastvora koristi se pred-tretman za ubrzanje heterogene nukleacije. Najbolji pred-tretman je elektroforetsko (kataforetsko) taloženje bioaktivnih prevlaka.

Elektroforetsko taloženje (*eng.* EPD) se koristi kao postupak nanošenja bioaktivnih i biokompatibilnih kalcijum-fosfatnih prevlaka na metalne supstrate [135,136]. EPD je efikasna i adekvatna elektrohemijska metoda za nanošenje biokeramičkih prevlaka i tankih filmova [137-144]. Prednosti ove metode su mogućnost nanošenja prevlaka na podloge kompleksnih oblika, jednostavna i ekonomična aparatura, kao i dobijanje jako adherentne i homogene prevlake ili filma. Upotreba elektroforetskog taloženja kao metode nanošenja kalcijum-fosfatnih prevlaka na titanu prvi put je pomenuta u istraživanju Ducheyne i saradnika [135], posle čega su usledila detaljna ispitivanja Zhitomirsky i Gal-Or na primeru elektroforetskog taloženja nanočestica hidroksiapatita [138]. Razvoj multifunkcionalnih prevlaka u cilju dobijanja boljih antimikrobnih i antialergijskih svojstava podstakao je korišćenje elektroforetskog taloženja za dobijanje nanokompozitnih prevlaka [139]. Ispitivanja Roether sa saradnicima [140] potvrdila su dobijanje 3D poroznog biodegradabilnog polimera (polilaktid) sa česticama biostakla. Primena elektroforetskog taloženja tako se pokazala kao veoma uspešna za dobijanje funkcionalnih, nanostrukturnih i kompozitnih prevlaka, kao i nanošenja biopolimera, bioaktivnih nanočestica, ugljeničnih nanotuba i bioloških entiteta za primenu u oblasti biomedicine.

Najnoviji pravac primene elektroforetskog taloženja je upravo dobijanje keramika/polimer kompozitnih prevlaka na metalima. Kompozitni materijali se najčešće sastoje od hidroksiapatita, biostakla, titana, silicijum dioksida i drugih materijala za

primenu kao biomedicinski implantati. Najnovija istraživanja pokazala su da EPD pruža mogućnost dobijanja višeslojnih i funkcionalno gradijentnih kompozita za primene u medicini. Gradijenti mogu biti kontinualni na mikroskopskom nivou i na taj način se dobijaju materijali sa specifičnim karakteristikama koje su neophodne za implantate čvrstog tkiva.

### **2.2.1. ELEKTROFORETSKO TALOŽENJE**

Prvi put je u kasnim osamdesetim (1980-im) publikovano da se elektroforetsko taloženje koristi za pripremu keramičkih prevlaka. Tada su dobijene deblje, gušće i više adherentne prevlake alumine, dobijene sol-gel postupkom, na aluminijumu, što je bio veliki napredak u poređenju sa konvencionalnom metodom potapanja u rastvor [145]. Poslednjih par decenija unazad primena ove vrste taloženja se progresivno uvećava za nanošenje naprednih keramičkih i kompozitnih prevlaka na metalne supstrate što poboljšava karakteristike samog supstrata. Ova vrsta taloženja omogućava odličnu kontrolu stehiometrije elektroforetski nanete prevlake koja zavisi od stehiometrijskog sastava samog praha. Mehanizam elektroforetskog taloženja od najranijeg modela prema Hamaker i Verwey sve do najnovijih modela, gde spada Sarkar i Nicholson model prema kome se taloženje keramičkih čestica bez elektrohemijske reakcije vrši preko distorzije i tanjenja dvojnog sloja na površini elektrode uz istovremenu koagulaciju čestica na elektrodi [146,147]. Stoga, veoma je bitno da naelektrisanje čestica bude slično sa rastvaračem/diperzantom kao pogodnim elektrolitom što omogućava bolju kontrolisanost debljine filma.

EPD postupak predstavlja kombinaciju dva procesa: elektroforeze i taloženja. Elektroforeza predstavlja proces migracije naelektrisanih čestica suspendovanih u odgovarajućem elektrolitu pod uticajem električnog polja. Talozenje je proces koagulacije čestica na suprotno naelektrisanjoj elektrodi pri čemu nastaje relativno kompaktna i homogena prevlaka prema Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) teoriji [147-149]. Da bi taloženje bilo uspešno, neophodan uslov jeste stabilna suspenzija u kojoj naelektrisane čestice imaju veliki zeta potencijal,  $\zeta$  i veći stepen mobilnosti u suspenziji, dok jonska provodljivost i viskoznost suspenzije treba da imaju niske vrednosti. Prema tome, postupak elektroforetskog taloženja se može primeniti na bilo kakav čvrst materijal dostupan u vidu finog praha (veličina čestice manja od

30  $\mu\text{m}$ ) suspendovan u odgovarajućem elektrolitu ili kao koloidna suspenzija keramike, metala, polimera ili kompozita [145]. Jedini nedostatak ovog postupka je da se korišćenjem vodenog elektrolita pod uticajem napona izdvajaju vodonik i kiseonik u vidu gasa koji utiču na kvalitet formirane prevlake.

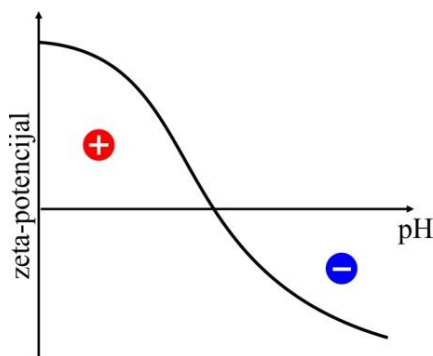
Postupak elektroforetskog taloženja može biti anodni (anaforetsko taloženje ili anaforeza) ili katodni (kataforetsko taloženje ili kataforeza), u zavisnosti od elektrode na kojoj se odigrava taloženje. Ako se predmet na koji se nanosi prevlaka veže u kolo kao anoda onda se postupak naziva anaforeza, ili ukoliko se veže kao katoda onda se naziva kataforeza. U početku je korišćen anaforetski postupak koji je kasnije skroz zamenjen kataforetskim. Kataforetsko taloženje ima niz prednosti: na katodi se ne odigrava rastvaranje metalnog supstrata na koji se prevlaka nanosi, što ima za posledicu dobijanje prevlake boljeg kvaliteta; zbog toga što izdvojeni vodonik na katodi ne reaguje sa nastalom prevlakom, dok kiseonik izdvojen na anodi može da oksidiše prevlaku. Takođe, povećana je i otpornost prevlaka prema delovanju korozionog agensa i pri manjim debljinama.

Za nanošenje bioaktivnih prevlaka na medicinske implantate dominantno se koristi kataforetsko taloženje, jer se izbegava nekontrolisana oksidacija supstrata (na katodi se odigrava redukcija) [150]. Primenom ove metode se mogu dobiti prevlake različite debljine ( $<1 \mu\text{m} - >100 \mu\text{m}$ ), a debljina i morfologija prevlake se može kontrolisati regulisanjem parametara taloženja, tj. napona i vremena taloženja [145,150-156]. Važan parametar za dobijanje homogene prevlake je i veličina čestica. Takođe, poželjno je da čestice nemaju veliku tendenciju aglomerisanja u suspenziji.

Veoma je važno da suspenzija bude stabilna, a čestice dobro dispergovane. Generalno, suspenzija može biti dispergovana elektrostatički, sternim ili elektrosternim mehanizmom stabilizacije. Keramičke čestice moraju biti naelektrisane da bi proces elektroforetskog taloženja mogao da se odvija.

Čestice su pozitivno naelektrisane pri nižim vrednostima pH. Povećanje pH vrednosti smanjuje pozitivno površinsko naelektrisanje čestica sola (disperzije). Odbojna sila među naelektrisanim česticama se smanjuje, i ukoliko je posmatran sol, čestice koagulišu formirajući gel. Promena vrste naelektrisanja na česticama može se očekivati na višim vrednostima pH [157], a koloidne čestice mogu da peptizuju u prisustvu  $\text{OH}^-$  jona.

Stabilnost koloidnih sistema je u uskoj vezi sa zeta potencijalom koloidnih čestica. Zeta potencijal ima pozitivnu vrednost za niske vrednosti pH, a negativnu pri visokim vrednostima pH, kao što je prikazano na slici 7 [157].



*Slika 7. Zavisnost zeta potencijala keramičkih čestica od pH vrednosti disperzije [146].*

Elektroforetsko taloženje je relativno nova tehnika za nanošenje keramičkih prevlaka sa glavnom namenom budućeg korišćenja u nanotehnologiji. Međutim, postoje određena ograničenja EPD primene u industrijske svrhe, koja se moraju prevazići. Ova tehnika se pokazala kao jako efikasna u dobijanju tankih ili poroznih filmova na različitim metalnim supstratima [145,158]. Međutim, jedan od problema predstavlja pucanje površine tokom sušenja i sinterovanja ovih prevlaka, koje može da se prevaziđe taloženjem keramičkog materijala sa polielektrolitom [158].

Najnovija istraživanja su fokusirana na dodavanje komponenata kao što su jonski aditivi, disperzanti i veziva neophodna za elektrolitičko kupatilo koje se koristi za elektroforetsko taloženje keramičkih ili kompozitnih čestica. Kao rezultat ove strategije došlo je do razvoja kompozita sa nanovlaknima i ugljeničnim nanotubama. Takođe se pokazalo da je elektroforetsko taloženje idealna metoda za dobijanje višeslojnih ili funkcionalno gradijentnih kompozita. Međutim, sinterovanje i dalje ostaje kao prepreka koju treba prevazići. Visoka temperatura sinterovanja koristi se za povećanje adhezije keramičkih prevlaka za metalne supstrate pri čemu dolazi do skupljanja i pucanja prevlake zbog razlike u vrednostima termičkih koeficijenata metala i keramike [159].

Elektroforetsko taloženje se najčešće primenjuje u cilju dobijanja keramičkih, kompozitnih keramika/keramika i polimer/keramika prevlaka za različite primene [160]. Jedna od primene je u vidu fotokatalizatora koji se načešće dobija elektroforetskim taloženjem  $\text{TiO}_2$  prevlaka [161-164]. Takođe, primena fotokatalitičkog efekta oksida

titana koristi se za tretman otpadnih voda i uklanjanje azo boja fotosenzitivnom anodom (mrežica od nerđajućeg čelika prevučena  $\text{TiO}_2$  prevlakom, P25- $\text{TiO}_2/\text{SS}$ ) [161]. Od velikog značaja je primena EPD tehnike za taloženje oksida cinka ( $\text{ZrO}_2$ , cirkonija), oksida aluminijuma ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , alumina), oksida titana ( $\text{TiO}_2$ , titanija), itrijum-cirkonijum dioksida (*eng.* yttria-stabilized zirconia, YSZ),  $\text{La}_x\text{Sr}_{1-x}\text{MnO}_3$  (*eng.* LSM), cerijuma dopiranim Sm (*eng.* samaria-doped cerium, SDC) i drugih poluprovodnika, kao i višeslojnih filmova Ni/YSZ,  $\text{ZrO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ , LSM/YSZ i NiO/SDC koji se koriste za sintezu čvrstih gorivih ćelija (*eng.* SOFC), koji predstavljaju uređaje nove generacije za dobijanje električne energije [165-170]. Novijim istraživanjem Abdoli i Alizadeh [169] pokazano je uspešno taloženje  $(\text{Mn},\text{Co})_3\text{O}_4$  praha kao potencijalne zaštitne prevlake na metalnom međusloju da bi se poboljšala trajnost metala u SOFC. S druge strane, Hadar i saradnici [170] su proučavali Li-jonske baterije na bazi YSZ-polietilenamina (*eng.* PEI) kao kompozitne membrane za 3D mikrobaterije, koje su kao i SOFC dobar izvor energije.

Odnedavno sve više ima istraživanja koja se bave primenom EPD metode za nanošenje grafena i materijala na bazi grafena, kao što su kompozitni filmovi grafen (G)-ugljenične nanotube (*eng.* CNT),  $\text{MnO}_2/\text{G}$ /pena nikla (*eng.* NF),  $\text{ZnO}/\text{G}$  i redukovano grafen oksida (RGO)/ $\text{Ni}(\text{OH})_2$  zbog potencijalne primene ovih materijala kao superkondenzatora [171-175].

Jedna od primena EPD metode je za dobijanje termički zaštitnih prevlaka koje se koriste za zaštitu uređaja na visokim temperaturama kao što su turbine na paru, turbine na gas i komore za sagorevanje. Najvažnija zaštitna uloga ovih keramičkih prevlaka se smanjuje sa povećanjem temperature supstrata. Pokazalo se da je najčešći i najbolji izbor za ove namene 8 mas. %  $\text{Y}_2\text{O}_3$  u keramičkoj 8YSZ prevlaci [176], a takođe se nanose i  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$  (*eng.* alumina-yttrium aluminum garnet, YAG) i  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Al}_2\text{TiO}_5$ , prevlake [177-179]. Ugljenični materijali, kao što je grafit ili ugljenik/ugljenik (C/C) npr. alumina/SiC i SiC/C, su obećavajući kandidati za termičke zaštitne prevlake zbog svojih odličnih mehaničkih karakteristika na visokim temperaturama [180,181]. SiC se najčešće koristi kao najpogodnija prevlaka za ugljenične materijale zbog svojih odličnih antioksidantnih svojstava, dobre fizičke i hemijske kompatibilnosti sa C/C matriksom. Jafari sa saradnicima [180] je proučavao

formiranje dvostruke prevlake na grafitu kao supstratu da bi se poboljšala oksidaciona otpornost.

Zeoliti kao molekulska sita predstavljaju trodimenzionalne kristalne alumino-silikate sa uniformnom veličinom pora. Željena orijentacija kristala utiče ne samo na stepen difuzije kroz slojeve već i na gustinu i morfologiju interkristalnih pora. Grupa Uchikoshi sa saradnicima [182] je proučavala primenu elektroforetskog taloženja za dobijanje tankog filma zeolita L ( $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

EPD metodom bilo iz vodene ili organske suspenzije se mogu dobiti oksidni filmovi silicijuma, cinka, aluminijuma i titana u različitim formama bilo kao monoslojne, višeslojne ili funkcionalne kompozitne prevlake za solarne ćelije [183-187].

S druge strane, poslednja i najvažnija primena EPD tehnike je za dobijanje biomedicinskih implantata od različitih bioaktivnih materijala – različitih oksida poluprovodnika, bioaktivnog stakla, kalcijum-fosfata itd. Oksid titana ( $\text{TiO}_2$ ), alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) i cirkonija ( $\text{ZrO}_2$ ) su obećavajući bioinertni keramički oksidi koji se koriste za biomedicinsku primenu pošto poseduju odlične karakteristike kao što su velika koroziona stabilnost, niska vrednost trenja, velika otpornost i velika čvrstoća [132].

Elektroforetskim taloženjem se uspešno nanose  $\text{TiO}_2$  prevlake potrebne zbog svoje odlične biokompatibilnosti. U literaturi je prvi put navedeno dobijanje nanostrukturne  $\text{TiO}_2$  prevlake na nerđajućem čeliku iz vodene suspenzije bez dodavanja organskih aditiva metodom elektroforetskog taloženja sa naizmeničnom strujom (*eng.* AC-EPD) [188], kao i alumina ili alumina-cirkonijum prevlake [189,190] i  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiC}/\text{ZrO}_2$  funkcionalno gradijentnog kompozitnog materijala (*eng.* FGM) za implantate kao što je veštački kuk [191]. Nove kompozitne prevlake poliakrilne kiseline (*eng.* PAA)/ $\text{TiO}_2$  mogu se dobiti EPD metodom, bilo da je u pitanju AC-EPD ili DC-EPD tehnika, i poznate su po odličnoj biokompatibilnosti i bioaktivnosti [192,193].

U poslednjih nekoliko decenija bioaktivna stakla imaju veliku primenu u ortopediji i stomatologiji zahvaljujući svojoj bioaktivnosti i biokompatibilnosti kao i izuzetnoj osteoinduktivnosti [194]. Među prvima Hench sa saradnicima [26] je izučavao sastav i mehaničke karakteristike bioaktivnog stakla 45S5 Bioglass<sup>®</sup> (*eng.* BG) sledećeg sastava: 45 mas. %  $\text{SiO}_2$ ; 24,5 mas. %  $\text{Na}_2\text{O}$ ; 24,5 mas. %  $\text{CaO}$  i 6 mas. %  $\text{P}_2\text{O}_5$ , i potvrdio njihovu primenu u medicini. Značajna primena EPD metode za nanošenje

kompozitnih prevlaka na bazi Bioglass<sup>®</sup> sa polimerima kao što su hitozan ili alginat je široko rasprostranjena. Pishbin sa saradnicima [195] je elektroforetskim taloženjem dobio kompozitnu antibakterijsku hitozan/BG/Ag-np (*eng.* CS/BG/Ag) prevlaku na nerđajućem čeliku (AISI 316L). Iako CS i CS/BG prevlake podstiču proliferaciju MG-63 ostoablasta nakon 7 dana kultivacije, kompozitna CS/BG/Ag-np (*eng.* nanoparticles Ag, Ag-np) prevlaka pokazala se citotoksičnom prema osteoblastima zbog velike koncentracije Ag-np inkorporiranih u prevlaku. Ananth sa saradnicima [196] je ispitao fizička, hemijska i biološka svojstva elektroforetski nanosene kompozitne BG/YSZ prevlake na Ti6Al4V supstratu. Zbog ugrađivanja ZrO<sub>2</sub> u matriks bioaktivnog stakla YSZ+YSZ-BG dvojne prevlake, poboljšana je njena bioaktivnost, otpornost na koroziju i mehanička čvrstoća u poređenju sa YSZ prevlakama. Zbog toga je YSZ+YSZ-BG prevlaka obećavajući kandidat kao materijal za dentalne i ortopedske implantate. Chen i saradnici [197] su po prvi put koristili AC-EPD metodu za nanošenje kompozitne BG/alginat prevlake iz vodene suspenzije kao višeslojne prevlake ili funkcionalno gradijentnih kompozita na 316L (SS) nerđajućem čeliku. Na osnovu ovog istraživanja može se zaključiti da se bioaktivna BG/alginat prevlaka taložena AC-EPD metodom može smatrati kao pogodna prevlaka za koštane implantate zbog odličnih karakteristika.

### **2.2.1.1. ELEKTROFORETSKO TALOŽENJE HAP I KOMPOZITNIH PREVLAKA NA BAZI HIDROKSIAPATITA**

Poznato je da sinterovanje biokeramičkih Ca-P prevlaka, kao što je prevlaka hidroksiapatita, na metalnom supstratu na visokim temperaturama može dovesti do degradacije metalnog supstrata pored fazne transformacije Ca-P prevlaka. Zbog toga danas raste interesovanje za usavršavanje i razvoj kompozitnih prevlaka kao kombinacija HAP i polimera, pogotovo biopolimera, kao što su hitozan, alginat, hijaluronska kiselina, glukoza, kolagen i lignin. Ovakva prevlaka ima za cilj da oponaša strukturu kostiju kombinovanjem nanočestica HAP i biopolimerne faze koja se svojim prisustvom ponaša kao vezivno sredstvo povećavajući adheziju prevlake za metalni supstrat čak i na visokim temperaturama sinterovanja [81].

Razvoj biokompozitnih HAP/polimer prevlaka naročito je značajan za primenu u medicini, tačnije transplantacionoj hirurgiji. Svojstva materijala koja ga čine

biokompatibilnim su netoksičnost, koroziona stabilnost i kontrolisana degradabilnost, što ga uz odgovarajuću vrednost modula elastičnosti, čini pogodnim za specifičnu biomedicinsku primenu. Među različitim metodama nanošenja prevlaka smatra se da je elektroforetsko taloženje najprikladniji metod za taloženje biokompatibilnih HAP/biopolimer prevlaka. Imajući ovo u vidu, kao i činjenicu da EPD obezbeđuje uniformno taloženje čak i na supstratima kompleksnih oblika, izabrali smo ovu metodu da po prvi put upotrebimo biopolimer lignin kao komponentu za HAP/Lig prevlaku. Debljina prevlake, morfologija, kristaliničnost i stehiometrija mogu se kontrolisati parametrima taloženja [137-151].

Pre samo nekoliko godina veliko interesovanje privukli su kompoziti koji se sastoje od prirodnih polisaharida i Ca-P nanočestica pošto su Wise i saradnici [198] otkrili da polisaharidi spajaju organsku i neorgansku komponentu u kostima i istovremeno regulišu kristalizaciju hidroksiapatita. Najpoznatiji prirodan polisaharid koji se često primenjuje kao polimerna matrica u kompozitnim prevlakama je hitozan (*eng.* CS), koji se dobija alkalnom N-deacetilacijom hitina. Zbog svoje jedinstvene strukture, antimikrobne aktivnosti, hemijske stabilnosti, biokompatibilnosti i mehaničkih osobina ima veliku primenu u medicini i koristi se za implantate, skafolde, biosenzore itd [81]. Najnovija istraživanja Gebhardt i saradnika [199] su nastavak ispitivanja Simchi i saradnika [120] koji su prvi objavili ispitivanja kako na brzinu rasta prevlake hitozana elektroforetski taložene na nerđajućem čeliku utiče pH vrednost i koncentracija biopolimera. Gebhardt i saradnici [199] su okarakterisali i ispitali koroziono ponašanje prevlake hitozana elektroforetski taložene na nerđajućem čeliku (AISI 316 L). Morfologija, debljina i kvašljivost prevlake hitozana mogu se kontrolisati električnim poljem elektroforetskog taloženja, a elektrohemijska merenja su potvrdila da je prevlaka hitozana koroziono stabilna u SBF5 rastvoru i sprečava koroziju AISI 316 L supstrata. Mahmoodi sa saradnicima [200] je proučavao nanokompozitne HAP/hitozan prevlake na 316 L nerđajućem čeliku dobijene iz alkoholnih suspenzija (metanol, etanol i izopropanol) sa koncentracijom 0,5 g/L hitozana. Utvrđeno je da elektroforetska migracija HAP nanočestica raste sa opadanjem molekulske mase alkohola, što znači da je brzina taloženja najveća u metanolskoj suspenziji. Mnoga istraživanja se fokusiraju na dobijanje kompozita hitozan/ugljenične nanotube i HAP/hitozan/ugljenične nanotube postupkom elektroforetskog taloženja jer poseduju



bolje mehaničke karakteristike zbog prisustva ugljениčnih nanotuba. Batmanghelich i saradnici [201] istraživali su elektroforetsko taloženje kompozitne prevlake HAP/hitozan/višeslojne ugljениčne nanotube na 316 L SS varirajući pH vrednosti tokom taloženja. Elektrohemijским merenjima ustanovljeno je da se sa povećanjem pH vrednosti suspenzije povećava koroziona stabilnost kompozitnih prevlaka u SBF rastvoru.

Alumo-silikatne nanotube (Halloysite nanotubes, *eng.* HNT) su od velikog interesa za dobijanje novih materijala i njihovu primenu kao katalizatora, lekova, medicinskih implantata, za korozionu zaštitu metala, kao biosenzori, vatrostalni premazi, za skladištenje energije itd [202]. Hijaluronska kiselina (*eng.* HYH) je veoma značajan prirodan biopolimer za dobijanje kompozitnih organsko-neorganskih prevlaka za biomedicinsku primenu jer je prisutna u visokoj koncentraciji u koži, zglobovima i rožnjači [202]. Široka primena HYH filmova koji se koriste za modifikaciju materijala u veštačkoj hrskavici, srčanim zaliscima, itd. Deen i Zhitomirsky [202] su prvi put postupkom elektroforetskog taloženja uspešno dobili kompozitne alumo-silikatne nanotube/hijaluronska kiselina i alumo-silikatne nanotube/HAP/hijaluronska kiselina prevlake. Hijaluronska kiselina je korišćena kao disperzant za alumo-silikatne nanotube i HAP čestice u suspenziji, što je omogućilo formiranje kompozitnih prevlaka. Pokazano je da kompozitne prevlake obezbeđuju dobru adheziju bez naknadne upotrebe procesa sinterovanja, i na taj način se izbegava delimična razgradnja HAP tokom termičkog tretmana. Takođe, Ma i Zhitomirsky [203] su uspešno primenili EPD metod za taloženje hijaluronska kiselina/SiO<sub>2</sub> i hijaluronska kiselina/TiO<sub>2</sub> filmova na različitim supstratima za osteokonduktivne implantate, jer nanostrukturna silika i titanija ubrzavaju spontano formiranje apatita nalik koštanom tkivu.

Alginati su anjonski polimeri, poreklom iz braon algi, sa karboksilnom grupom na kraju polimernog niza, zbog čega su interesantni polimeri za kompozitne prevlake dobijene elektroforetskim taloženjem [87]. Alginati su prirodni polisaharidi i poznato je da su biodegradibilni, biokompatibilni, netoksični i veoma jeftini polimeri, te se veoma često koriste za medicinske primene (obloge za rane, komponente za koštane implantate, reparaciju nervnog tkiva i naravno kao prenosioci lekova). Zbog svega navedenog primena kompozitnih HAP/alginat prevlaka dobijenih elektroforetskim taloženjem je interesantna jer omogućava nastajanje uniformne prevlake čak i na

supstratima kompleksnih oblika. Cheong i Zhitomirsky [204] su prvi uspešno primenili EPD metodu za dobijanje filmova alginatne kiseline. Međutim, cilj rada je bio elektroforetsko taloženje novih nanokompozitnih hitozan/alginatna kiselina/HAP filmova na NiTi supstratu, što je postignuto uz istovremeno taloženje alginatne kiseline, hidroksiapatita,  $\text{TiO}_2$  i hitozana. Kompozitni filmovi su pokazali izuzetnu korozionu zaštitu NiTi supstrata u Ringerovom rastvoru. Zhitomirsky i saradnici [205] su dobili bioaktivne kompozitne Bioglass<sup>®</sup>/HAP/hitozan i Bioglass<sup>®</sup>/HAP/alginat prevlake EPD postupkom. Koristili su dve strategije prilikom taloženja u zavisnosti od korišćenog biopolimera, tako da se jedna bazira na katjonskom hitozanu a druga na anjonskom alginatu. Mehanizam kataforetskog taloženja podrazumeva da se povećanjem pH vrednosti rastvora na katodi taloži hitozan, dok smanjenje pH omogućava taloženje alginata na anodi. Dakle, iz njihovog rada se može zaključiti da istovremeno korišćenje alginata i hitozana omogućava elektrosternu stabilizaciju BG i HAP čestica i pospešuje proces taloženja.

Glukoza je prirodni mohosaharid koji se nalazi u biljkama. Li sa saradnicima [206] je naneo kompozitnu HAP/glukoza prevlaku na titan EPD postupkom, a nakon sinterovanja ostaje samo porozna HAP prevlaka. Ispitivan je hemijski sastav, morfologija, fazni sastav i termička stabilnost ovako dobijenih poroznih HAP prevlaka. Rezultati su pokazali da je unutrašnji prečnik porozne HAP prevlake iznosio 2 – 20  $\mu\text{m}$  nakon sinterovanja na 700 °C sa jačinom vezivanja za metal od 17,6 MPa. Takođe, ovako dobijena prevlaka se pokazala kao bioaktivna jer se nakon njenog potapanja u SBF rastvor stvorio karbonatni apatit na površini.

Kako je poznato HAP ima slabe mehaničke karakteristike i zbog toga se sve više istražuju kompozitne prevlake dobijene dodavanjem raznih polimera ili oksida kao što je  $\text{Y}_2\text{O}_3$  pošto se na taj način poboljšavaju mehaničke karakteristike, dok se istovremeno zadržava dobra biokompatibilnost. Parente sa saradnicima [207] je ispitao dobijanje kompozitne  $\text{Y}_2\text{O}_3$ /HAP prevlake na titanu ili AISI 304 nerđajućem čeliku postupkom elektroforetskog taloženja. Nanočestice  $\text{Y}_2\text{O}_3$  poboljšavaju mehaničke karakteristike i adheziju HAP prevlake istovremeno sprečavajući HAP razgradnju. Rezultati su pokazali da su nanočestice  $\text{Y}_2\text{O}_3$  homogeno distribuirane po dubini prevlake i da se koncentracija čestica povećava od površine prevlake ka metalnom supstratu.

### 2.2.1.2. MEHANIZAM ELEKTROFORETSKOG TALOŽENJA

Elektroforetsko taloženje je vrlo efikasna metoda za dobijanje gustih i tankih prevlaka na metalnom supstratu. Masa i debljina prevlake se mogu kontrolisati promenom koncentracije čestica u suspenziji, jačine električnog polja i dužine vremena taloženja. Elektroforetsko taloženje podrazumeva dva stupnja: elektroforezu i taloženje naelektrisanih čestica praha. Čestice praha, rastvorene u elektrolitu, migriraju i talože se na suprotno naelektrisanom supstratu, radnoj elektrodi, pod uticajem električnog polja. Neophodan uslov koji obezbeđuje uspešno elektroforetsko taloženje je stabilnost suspenzije/sola, u kome čestice imaju visok  $\zeta$ -potencijal dok se jonska provodljivost suspenzije održava na niskoj vrednosti [208].

Čestice HAP i HAP/Lig u etanolu postaju pozitivno naelektrisane i time stvaraju provodnu sredinu. Kada se kroz ovakav sistem propusti električna struja, odigravaju se sledeći procesi [145]:

- Elektroforeza – pod dejstvom električnog polja pozitivno naelektrisane HAP i HAP/Lig čestice počinju da se kreću prema katodi.
- Brzina migracije naelektrisanih čestica,  $v$ , data je sledećom jednačinom [209]:

$$v = \frac{\varepsilon_r \zeta E}{6\pi\eta L} \quad (1)$$

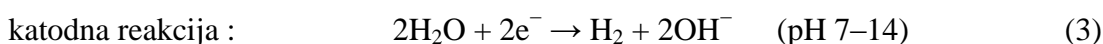
gde je  $E$  razlika potencijala između elektroda,  $\varepsilon_r$  je relativna dielektrična konstanta suspenzije,  $\zeta$  je zeta potencijal suspenzije,  $\eta$  je viskozitet suspenzije i  $L$  je rastojanje između elektroda, ili prema jednačini [210]:

$$v = \frac{zeE}{6\pi\eta rL} \quad (2)$$

gde je  $e$  elementarno naelektrisanje,  $r$  Stoksov jonski radijus i  $z$  je broj naelektrisanja jona, koji u oba slučaja pokazuje linearnu zavisnost brzine migracije jona u odnosu na razliku potencijala između elektroda.

- Kada naelektrisane čestice stignu do katode, dolazi do neutralisanja njihovog naelektrisanja. Kako su čestice dovoljno blizu katode, privlačne sile su dominantne i dovode do taloženja.

- Istovremeno, vodonik se izdvaja sa katode i kiseonik sa anode:

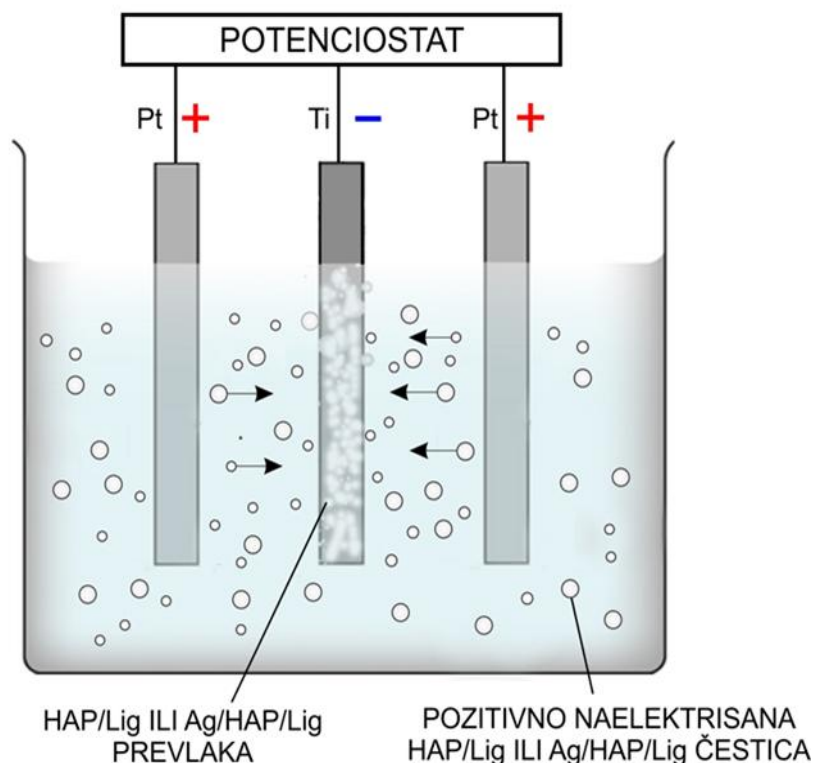


ili  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$  (pH 1–7) (4)

anodna reakcija:  $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + \text{O}_2 + 4\text{e}^-$  (5)

- Izdavanje vodika sa površine katode kroz prevlaku, stvara pore u unutrašnjosti HAP i HAP/Lig prevlaka, pa stoga se dobija porozna struktura prevlaka.

Šema principa kataforetskog taloženja prikazana je na slici 8.



*Slika 8. Princip kataforetskog taloženja biokeramičkih prevlaka.*

### 2.2.2. SINTEROVANJE

Sinterovanje je proces povećanja gustine i mehaničke čvrstoće oblikovanog keramičkog materijala koji se odvija u toku toplotne obrade procesom pečenja. Prema Balshin i Fedorchenko [211], sinterovanje predstavlja kvantitativnu i kvalitativnu promenu prirode kontakta između čestica praha, izazvanu toplotnom pokretljivošću atoma ili jona i uzajamnim delovanjem čestica sa atmosferom sinterovanja, koje je praćeno povećanjem kontaktne površine, smanjenjem poroznosti i povećanjem mehaničke čvrstoće sinterovanog materijala. Prema osnovnoj pokretačkoj sili koja deluje pri sinterovanju razlikuje se: hemijsko sinterovanje (hemijski potencijal),

mehaničko sinterovanje (primena pritiska), toplotno sinterovanje (povišena temperatura) i sinterovanje uz istovremenu primenu pritiska i toplote.

Prema studiji koju je objavio Show sa saradnicima [212], razlikuju se tri postupka sinterovanja keramičkih materijala, a to su:

- sinterovanje u čvrstoj fazi, u toku koga svi sastojci keramičkog materijala ostaju u čvrstom stanju, pa se prenos mase vrši difuzijom kroz čvrstu fazu, koja dovodi do promene oblika zrna i kompletne densifikacije keramičkog materijala;

- viskozno sinterovanje, tj. termička obrada pri kojoj se na temperaturi sinterovanja stvara dovoljna količina viskozne tečne faze, koja kompletno popunjava pore polaznog keramičkog materijala;

- sinterovanje u prisustvu tečne faze, tj. termička obrada pri kojoj se na temperaturi sinterovanja stvara tečna faza ali u količini koja nije dovoljna da na principu viskoznog tečenja popuni pore u poroznom materijalu. Formirana tečna faza olakšava preuređenje čestica i omogućava značajnu promenu oblika čestica, popunjavanje pora i formiranje gustog keramičkog materijala mehanizmom rastvaranja čvrste faze u njoj i naknadnog ponovnog očvršćavanja.

### **2.2.2.1. SINTEROVANJE U ČVRSTOJ FAZI**

Ovoj grupi tehnika sinterovanja pripadaju: standardni proces sinterovanja u vazdušnoj atmosferi; sinterovanje u zaštitnoj atmosferi (azota ili argona) ili vakuumu i sinterovanje uz primenu pritiska (toplotno presovanje, toplo izostatsko presovanje i sl.). Svi pomenuti postupci sinterovanja se u suštini sastoje od dva osnovna procesa, densifikacije i rasta zrna. Preko ta dva procesa je najjednostavnije objedinjeno razmatranje osnovnih elemenata svih pomenutih metoda sinterovanja, kao što su vučna sila i brzina sinterovanja.

Densifikacija je proces povećanja gustine materijala. Poznato je da se veće vrednosti gustine mogu postići ako je vreme sinterovanja duže, polazna gustina oblikovanog uzorka veća, temperatura sinterovanja viša, srednja polazna veličina čestica u kompaktnosti manja, sinterovanje potpomognuto primenom pritiska i slično.

Prilikom sinterovanja densifikacija se odigrava u tri faze. U početnoj fazi sinterovanja dolazi do preuređenja čestica (translatornim i rotacionim pomerajima čestica) i početka stvaranja vratova između čestica, ali veoma malog povećanja gustine.

Ta faza se može okarakterisati kao faza početnog rasta vratova između čestica, tako da se individualne čestice praha lako mogu razlikovati. Početna faza sinterovanja se završava kada se dostigne oko 60 – 75 % teorijske gustine. Drugu fazu ili intermedijarnu fazu sinterovanja karakteriše intenzivan rast vratova između čestica, pri čemu čestice gube svoj početni oblik, a međučestični prostor se znatno deformiše usled čega nastaju međusobno povezani kanali pora. U ovoj fazi keramički materijal sadrži znatnu količinu mreže kontinualnih pora otvorenih prema spoljašnjoj površini. Skupljanje tih tzv. otvorenih pora je veoma intenzivno, što je i razlog najvećeg povećanja gustine, tj. najintenzivnije densifikacije. Na kraju kada otvorene pore usled skupljanja postaju suviše uske da bi bile stabilne, one se transformišu u zatvorene pore, a proces sinterovanja ulazi u treću, finalnu fazu sinterovanja. Prelaz od otvorene ka zatvorenoj poroznosti se dešava pri gustinama od oko 90 – 93 % teorijske gustine, zavisno od ugla  $\theta$ , definisanog sledećim izrazom:

$$\gamma_b = \gamma_{sg} \cdot \cos\theta \quad (6)$$

gde su  $\gamma_{sg}$  i  $\gamma_b$  površinska energija i energija granice zrna, redom. Finalnu fazu sinterovanja karakteriše eliminacija zatvorenih pora i približavanje teorijskoj gustini.

U toku završnog stadijuma sinterovanja dolazi do rasta zrna, što dovodi do ukрупnjavanja mikrostrukture. U toku ovog procesa prosečna veličina zrna se povećava tako što veća zrna rastu na račun manjih zrna. Mogućnost razumevanja i kontrolisanja ovog procesa je važna iz dva razloga.

Prvi razlog je činjenica da veličina zrna određuje mnoge osobine kao što su električne, magnetne, optičke i mehaničke osobine. Drugi razlog je vezan za sprečavanje pojave tzv. diskontinualnog rasta zrna.

Vučna sila za sinterovanje oblikovanog keramičkog materijala je smanjenje Gibsove slobodne energije sistema,  $G$ , što je praćeno zamenom međufaze čvrsto/gas, koja poseduje veću energiju, sa međufazom čvrsto/čvrsto, koja poseduje manju energiju. Eliminisanjem površine čvrsto/gas dolazi do smanjenja zapremine pora,  $V_p$ , a tako i celokupne zapremine uzorka,  $V$ , usled skupljanja poroznog tela. Promena Gibsove slobodne energije je data izrazom:

$$dG = \gamma_{sg} \cdot dA_{sg} + \gamma_b \cdot dA_b \quad (7)$$

gde su  $dA_{sg}$  i  $dA_b$  odgovarajuće promene površine i površine granice zrna, redom.

Veoma važno je napomenuti da su konstitutivni zakoni koji opisuju sinterovanje izuzetno komplikovani, pa su mehanizmi i modeli sinterovanja prilagođeni specifičnim osobinama keramičkih materijala.

Sinterovanje biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita u velikoj meri zavisi od karakteristika polaznih HAP prahova. U te osobine se ubrajaju stehiometrija, morfologija, stepen kristaliničnosti, jonska supstitucija, sklonost ka aglomeraciji, itd. Nanočestični prahovi su zbog svoje velike površinske energije skloni aglomeraciji i veliki problem predstavlja eliminacija intraaglomeratskih pora, koje su uzročnik loše sinterabilnosti. Keramika na bazi hidroksiapatita zbog loše sinterabilnosti ima malu pritisnu čvrstoću i žilavost, a to se naročito manifestuje u fiziološkim uslovima, što ograničava primenu ovih materijala. Nedovoljna mehanička čvrstoća HAP prevlaka stimulisala je razvoj tankih keramičkih prevlaka na metalnom supstratu, sa dobrim adherentnim svojstvima, što je i uvelo u upotrebu biopolimere.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je dobijanje bioaktivnih hidroksiapatit (HAP) i srebro/hidroksiapatit (Ag/HAP), kao i biokompozitnih hidroksiapatit/lignin (HAP/Lig) i srebro/hidroksiapatit/lignin (Ag/HAP/Lig) prevlaka metodom elektroforetskog taloženja na konstantnom naponu na titanu kao metalnom supstratu, a koristiće se nanočestični HAP i Ag/HAP prahovi koji su prethodno dobijeni modifikovanom precipitacionom metodom. Ispitaće se optimalni parametri taloženja da bi se dobile uniformne, homogene i kompaktne prevlake bez pukotina.

U literaturi je već poznato da prisustvo nanočestičnog hidroksiapatita značajno smanjuje temperaturu sinterovanja u odnosu na uobičajenu temperaturu od ~1200 °C. Zbog toga će se fazni sastav HAP, HAP/Lig, Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu ispitati nakon sinterovanja na temperaturi od 900 °C difrakcijom X-zraka da bi se mogao videti uticaj niže temperature sinterovanja od uobičajene vrednosti. Ispitaće se uticaj koncentracije lignina u kompozitnim prevlakama na njihovu morfologiju, termičku stabilnost, fazni sastav i kristalnu strukturu hidroksiapatita različitim metodama karakterizacije, kao što su infracrvena spektroskopija, spektroskopija X-zračenja, termogravimetrijska analiza i difrakcija X-zraka. Bioaktivnost srebro/hidroksiapatit i srebro/hidroksiapatit/lignin prevlaka biće ispitana nakon 7 dana potapanja u SBF rastvoru i promene na površinama prevlaka biće ispitane skenirajućom elektronskom mikroskopijom i visoko-rezolucionom skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Takođe, koroziona stabilnost elektroforetskih nesinterovanih i sinterovanih HAP, HAP/Lig, Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu, ispitaće se metodom spektroskopije elektrohemijske impedancije nakon produženog vremena delovanja SBF. Najbitnije će biti da se ispitaju citotoksičnost, antimikrobna svojstva i kinetika otpuštanja srebra Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka zbog dokazivanja njihove biokompatibilnosti radi procenjivanja mogućnosti potencijalne primene za koštane implantate.



## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

### 4.1. Priprema površine titana

Pločice titana (dimenzija: 20 mm x 10 mm x 0,25 mm, za fizičko-hemijske analize, 40 mm x 20 mm x 0,25 mm za merenja spektroskopije elektrohemijske impendacije (SEI), 5 mm x 5 mm x 0,25 mm, za ispitivanje citotoksičnosti, Aldrich, čistoće 99,7 %) korišćene su kao supstrat za taloženje HAP, HAP/Lig, Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka. Površina titana je tretirana poliranjem sa grubim 800 i finim 1200 brusnim papirom, nakon čega je mokro ispolirana sa 0,3  $\mu\text{m}$  aluminom (aluminijum oksidom). Nakon poliranja, pločice titana su odmašćene u acetonu i etanolu u ultrazvučnom kupatilu po 15 min, zatim držane u etanolu do početka eksperimenta da bi se spečila spontana oksidacija površine titana na vazduhu.

### 4.2. Materijali

#### 4.2.1. Sinteza nanočestičnih prahova hidroksiapatita i srebro/hidroksiapatita

Prah HAP je sintetisan modifikovanom precipitacionom metodom [213-215] u skladu sa jednačinom (1):



Kalcijum-oksidi, dobijen žarenjem  $\text{CaCO}_3$  analitičke čistoće, tokom 4 – 5 h na 1000 °C u atmosferi vazduha, je u malim količinama dodat u destilovanu vodu tokom 10 min uz konstantno mešanje. Tako dobijena suspenzija  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  je kroz sito dodata u reakcioni balon u cilju uklanjanja neproreagovanih zrna  $\text{CaO}$ . U suspenziju  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  je zatim dodavana  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (1:1) kap po kap, u stehiometrijskoj količini u skladu sa jednačinom (1). Reakcija se prekida kada se dostigne željena pH vrednost od 7,4 – 7,6. Dobijena suspenzija je zatim zagrevana na 93 – 95 °C tokom 30 min, uz konstantno mešanje. Nakon taloženja gornji čist sloj rastvora je odvojen. Suspenzija je zatim „spray dry“ metodom osušena na temperaturi od 120 °C, u cilju dobijanja granulisanog praha.

Prah hidroksiapatita dopiran srebrom ( $\text{Ca}_{9,95}\text{Ag}_{0,05}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) je takođe dobijen prethodno opisanom modifikovanom precipitacionom metodom, pri čemu je dodat srebro-nitrat. Stehiometrijska količina dobijenog  $\text{CaO}$  uz mešanje je dodata u

destilovanu vodu tokom 10 min, posle čega se dodaje rastvor  $\text{AgNO}_3$  u suspenziju da bi se postigla željena koncentracija  $0,4 \pm 0,1$  mas. % jona srebra. Nakon toga postupak se ponavlja u cilju dobijanja nanočestičnog Ag/HAP praha.

#### **4.2.2. Lignin**

*Alcell* lignin (Repap Entrprises Inc., Stamford, CT) je ekstrahovan „organosolv“ industrijskim postupkom sa razblaženim etanolom iz mešavine lišćarskih vrsta drveta (javor, breza i topola). Prah lignina je korišćen bez dodatnog prečišćavanja. Sadržaj Klason lignina i lignina rastvorljivog u kiselini je određen na 96,5 %, a sadržaj *Alcell*<sup>TM</sup> lignina na 0,4 %, ukupni ugljeni hidrati su zastupljeni sa 0,32 %, sadržaj azota je bio 0,14 %, a sadržaj pepela 0,1 %. U *Alcell*<sup>TM</sup> ligninu je nađen nizak sadržaj karboksilnih grupa u vrednosti od 0,78 mmol/g. Srednja masena vrednost molarne mase ( $M_w$ ) je u rasponu od 6820 i 11000 Da, dok je srednja brojna vrednost molarne mase ( $M_n$ ) *Alcell* lignina u rasponu od 1320 i 1800 Da; gde je Da (dalton) – jedinica atomske mase [101].

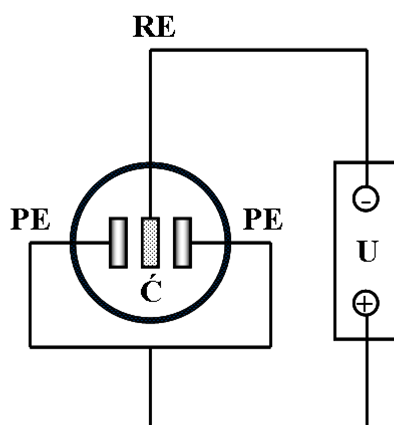
#### **4.3. Elektroforetsko taloženje HAP, HAP/Lig, Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu**

U cilju dobijanja HAP, HAP/Lig, Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka korišćeni su nanočestični HAP, Ag/HAP i lignin prahovi za pripremu etanolskih suspenzija. Elektroforetsko taloženje je izvedeno iz etanolskih suspenzija. Etanolska HAP suspenzija je pripremljena dodavanjem 1,0 g HAP praha (10 mas. % HAP) u 100 ml apsolutno čistog etanola, dok se za taloženje kompozitnih HAP/Lig prevlaka dodaje 0,5 – 10 mas. % lignin praha, u odnosu početnu masu HAP praha, u etanolsku HAP suspenziju. Elektroforetsko taloženje Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka je izvedeno iz 100 ml etanolske suspenzije koja sadrži 1,0034 g nanočestičnog Ag/HAP praha, sa koncentracijom jona srebra  $0,4 \pm 0,1$  mas. % u odnosu na početnu količinu praha, dok se za taloženje Ag/HAP/Lig prevlaka dodaje 1 mas. % organosolv *Alcell* lignin u etanolsku Ag/HAP suspenziju. Sve suspenzije su tretirane 15 min u ultrazvučnom kupatilu, u cilju postizanja homogenosti i stabilnosti čestica. Da bi se povećala stabilnost dodata je hlorovodonična kiselina i pH vrednost suspenzije je podešena na 2. Pre početka

taloženja suspenzije su mešane 2 h na magnetnoj mešalici, a potom tretirane 30 min u ultrazvučnom kupatilu, u cilju homogenizacije čestica u suspenzijama.

Elektroforetsko taloženje je izvedeno u elektrohemijskoj ćeliji sa tri elektrode koja se sastoji od Ti pločice kao radne elektrode i dve Pt pločice, postavljene paralelno na rastojanju od 1,5 cm u odnosu na radnu elektrodu, kao pomoćne elektrode, uz konstantno mešanje suspenzije magnetnom mešalicom (slika 9). HAP i HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlake su taložene na titanu različitim vrednostima konstantnog napona od 50 – 100 V pri različitim vremenima od 0,5 – 5 min taloženja iz etanolske suspenzije. Masa HAP i HAP/Lig prevlaka je dobijena kao razlika mase katode izmerene pre i nakon taloženja.

Za fizičko-hemijske, elektrohemijske i biološke analize HAP, Ag/HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlake na titanu su taložene na konstantnom naponu od 60 V tokom 45 s. Dobijene prevlake su sušene na vazduhu tokom 24 h, na sobnoj temperaturi, potom su neke od njih sinterovane na 900 °C u atmosferi argona tokom 30 min, brzinom zagrevanja od 16 °C/min. Pre sinterovanja prevlake su držane na 200 °C u atmosferi argona tokom 45 min zbog deoksidacije površine.



**Slika 9.** Shema aparature za elektroforetsko taloženje (PE – pomoćna elektroda, RE – radna elektroda, Ć – ćelija za elektroforetsko taloženje, U – izvor konstantnog napona).

#### 4.4. Priprema simulirane telesne tečnosti

Simulirana telesna tečnost (*eng. Simulated Body Fluid - SBF*) dobijena je dodavanjem sledećih reagenasa u 1 dm<sup>3</sup> dejonizovane 4D vode redosledom kako su navedeni u tabeli 4 [216]. Sve hemikalije su prethodno sušene u sušnici na 50 °C u trajanju od 2 h. Potrebne količine osušenih hemikalija su odmerene na analitičkoj vagi tačnosti 10<sup>-4</sup> g. Merenje treba obaviti što brže zbog vlage iz vazduha.

**Tabela 4.** *Sastav SBF rastvora sa jonskim koncentracijama sličnim ljudskoj krvnoj plazmi*

Reagensi	<i>c</i> / g dm <sup>-3</sup>
NaCl	7,996
NaHCO <sub>3</sub>	0,350
KCl	0,224
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,228
MgCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,305
CaCl <sub>2</sub>	0,278
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071
(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	6,057
1M HCl	40 ml

Vrednost pH dobijenog rastvora je 7,4, a tako dobijen rastvor je neophodno držati u frižideru kako ne bi došlo do promena. Merenja u kojima je korišćen SBF rastvor su rađena na temperaturi od 37 °C.

#### 4.5. Metode karakterizacije

##### 4.5.1. Raspodela veličina čestica i ζ-potencijal

Raspodela veličina čestica u etanolskim HAP, Ag/HAP, HAP/Lig (1 mas. % Lig) i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) suspenzijama i vrednosti zeta potencijala, ζ, su određeni pomoću uređaja *Zeta nano ZS sa 633 nm He-Ne (Malvern, UK)*, koji radi na principu analize difraktovane svetlosti. He-Ne laser je izvor crvene svetlosti

talasne dužine 633 nm, a kao rezultat dobija se spektar rasejane svetlosti tokom prolaska dispergovanih čestica u suspenziji kroz laserski snop tokom određenog vremena. Ovaj instrument ima mogućnost merenja veličine čestica od 0,6 nm do 6  $\mu$ m. Neposredno pre merenja etanolske suspenzije su mešane i tretirane u ultrazvučnom kupatilu tokom 5 min.

#### 4.5.2. Merenje vrednosti ugla kvašenja

Za merenje vrednosti ugla kvašenja površine Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka rastvorom SBF korišćena je “sessile drop” metoda pomoću uređaja za analizu dinamičnog kontaktnog ugla - *FTA 200 Angle Meter (Goniometre Folio Instruments, Inc.)*. Merenja su vršena sa simuliranom telesnom tečnosti (SBF, pH = 7,4), čiji je sastav prikazan u tabeli 4, pri čemu je zapremina kapi bila 6  $\mu$ l. Slike kapi su zabeležene videokamerom.

#### 4.5.3. Hrapavost površine

Hrapavost površine sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka dobijenih elektroforetskim taloženjem na titanu je određena pomoću *TR-200 Handheld Roughness Tester*.

#### 4.5.4. Difrakcija X – zraka

Fazni sastav i strukturne promene HAP i HAP/Lig (0,5 – 10 mas. % Lig) prevlaka su ispitane difrakcijom X – zraka (*eng.* XRD) pomoću *Philips PW 1051* difraktometra sa Cu  $K_{\alpha}$  zračenjem ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). Takođe, XRD metodom ispitane su Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlake, pre i posle potapanja u SBF rastvor. Step difrakcije je meren tehnikom skeniranja u rasponu uglova od  $2\theta = 8\text{--}80^{\circ}$  uz interval merenja od  $0,05^{\circ}$  i vreme snimanja od 50 s za svaku tačku. Fazna analiza je urađena korišćenjem podataka PDF-2 (Powder Diffraction File) komercijalnog kompjuterskog programa *EVA V.9.0*.

Srednja vrednost veličine kristalita ( $D_p$ ) je izračunata pomoću Šererove jednačine (2) na (002) kristalne ravni ( $2\theta = 25,8^{\circ}$ ) koristeći širinu XRD pika na poluvisini ( $\beta_{1/2}$ ):

$$D_p = \frac{K\lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta} \quad (2)$$

gde je  $\lambda$  talasna dužina X-zraka, koeficijent  $K$  je 0,9 i  $\theta$  je ugao difrakcije.

#### **4.5.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija i visoko-rezoluciona skenirajuća elektronska mikroskopija**

Morfologija površina HAP i HAP/Lig (0,5 – 10 mas. % Lig) prevlaka na titanu je ispitana metodom skenirajuće elektronske mikroskopije (*eng.* SEM), na uređaju *JEOL JSM-5800* pri naponu struje vlakna od 20 keV. Analiza promene u morfologiji površina Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka na titanu je ispitana metodom skenirajuće elektronske mikroskopije (*eng.* SEM), na istom uređaju *JEOL JSM-5800* i visoko-rezolucione skenirajuće elektronske mikroskopije (*eng.* FE-SEM), uređajem *TESCAN MIRA 3 XMU* na 20 keV, kako pre tako i posle potapanja u SBF rastvor. Na uzorke je prethodno nanet Au–Pd sloj na naparivaču tipa *Polaron SC502 Sputter coater*, da bi se površina učinila provodnom.

Hemijski sastav Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka određen je energetsom disperzionom spektroskopijom (*eng.* EDS) sa SiLi detektorom karakterističnih rendgenskih zraka (*Oxford Instruments, UK*) kontrolisan Isis 3.2 softverskim paketom, koji je povezan na SEM uređajem.

#### **4.5.6. Termogravimetrijska analiza**

Termička stabilnost HAP, Ag/HAP, HAP/Lig (0,5 – 10 mas. % Lig) i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka, kao i praha lignina je ispitana termogravimetrijskom metodom (*eng.* TGA) na *Mettler Toledo (TGA/SDTA851e)* uređaju. Prevlake su nakon sušenja na sobnoj temperaturi skinute sa površine titana radi ispitivanja. Termogravimetrijska merenja su vršena od 25 do 1000 °C u dinamičnom modu pri brzini zagrevanja od 20 °C min<sup>-1</sup> u atmosferi azota (brzina protoka 50 ml min<sup>-1</sup>). Korišćeno je oko 5 mg praha uzorka za svaku analizu, koji je prethodno osušen u peći.

#### 4.5.7. Spektroskopija infracrvene svetlosti sa Furijeovom transformacijom u modu totalne refleksije

Za ispitivanje valencionih vibracija važnih funkcionalnih grupa na površini HAP i HAP/Lig (0,5 – 10 mas. % Lig) prevlaka na titanu korišćena je infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom u ATR modu (*eng.* ATR-FTIR). Takođe, ispitana je promena sastava ATR-FTIR analizom na površini Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka na titanu, pre i posle potapanja u SBF rastvor. ATR-FTIR merenja su urađena pomoću infracrvenog spektrometra *Spectrum 400 Perkin Elmer*, u oblasti talasnih brojeva od 525 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ , u rezoluciji od 4  $\text{cm}^{-1}$  i ukupno je urađeno 128 skeniranja.

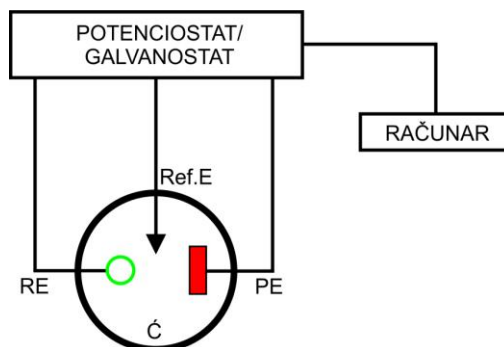
#### 4.5.8. Fotoelektronska spektroskopija X-zracima

Merenja fotoelektronske spektroskopije X-zracima (*eng.* XPS) HAP, Ag/HAP, HAP/Lig (0,5 – 10 mas. % Lig) i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka na titanu, su urađena pomoću spektrometra *Axis-Ultra (Kratos)* sa monohromatskim  $\text{AlK}_\alpha$  zračenjem (1486,6 eV) u širokom opsegu 0 – 1100 eV u visokom vakuumu  $5 \cdot 10^{-10}$  Torr. Ugao emitovanog snopa fotoelektrona je podešen na  $30^\circ$  u odnosu na normalnu površinu uzorka. Program *CasaXPS* je korišćen za fitovanje dobijenih XPS spektara, koji automatski i iterativno smanjuje razlike između eksperimentalne i izračunate krive da bi se odredio položaj pika, širina, visina, kao i *Gaussian/Lorentzian* odnos. Za C 1s, Ca 2p, P 2p i O 1s je korišćena visoka rezolucija skeniranja pri energiji od 20 eV sa 0,5 eV rezolucijom, dok je za Ti 2p korišćena energija od 40 eV sa 0,6 eV rezolucijom. Ovim merenjima je utvrđena atomska struktura površine prevlaka.

#### 4.5.9. Spektroskopija elektrohemijske impedancije

Spektroskopija elektrohemijske impedancije (SEI) je korišćena za ispitivanje korozione stabilnosti HAP, Ag/HAP, HAP/Lig (1 mas. % Lig) i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka na titanu i čistog titana, kao referentnog uzorka, tokom 10 dana u SBF rastvoru (Tabela 4) na temperaturi od  $37^\circ\text{C}$ . SEI merenja su vršena korišćenjem elektrohemijske ćelije (slika 10) sa tri elektrode, gde je radna elektroda prevlaka na titanu ili titan bez prevlake sa površinom ispitivanja od  $1 \text{ cm}^2$ , kontra elektroda je

platinska mrežica sa većom površinom od ispitane i referentna je zasićena kalomelova elektroda (ZKE). Eksperimentalni podaci su dobijeni na potencijalu otvorenog kola koristeći *Reference 600<sup>TM</sup> Potentiostat/Galvanostat/ZRA* (Gamry Instruments, Inc., Warminster, PA, USA) u opsegu frekvencija od 300 kHz do 10 mHz sa amplitudom naizmeničnog napona od  $\pm 5$  mV. Za fitovanje impedansnih dijagrama korišćen je program *Gamry Instruments Echem Analyst fitting program*, verzija 5,50.



*Slika 10. Shema aparature za merenje spektroskopije elektrohemijske impedancije (PE – pomoćna elektroda, RE – radna elektroda, Ref. E – referentna elektroda).*

#### 4.5.10. *In vitro* bioaktivnost

Bioaktivnost Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka je ispitana potapanjem u 10 ml SBF rastvora (Tabela 4), koji je menjan na svakih 24 h. Nakon 7 dana uzorci su izvađeni i oprani dejonizovanom 4D vodom, potom su osušeni na vazduhu pre karakterizacije površine FE-SEM, SEM, XRD i ATR-FTIR analizama.

#### 4.5.11. Spektroskopija indukovanе kuplovane plazme

Otpuštanje jona srebra iz nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka u 5 ml SBF rastvora je praćeno tokom 10 dana. SBF rastvor je periodično menjan svežim rastvorom svakog dana i koncentracija srebra je merena metodom indukovanе kuplovane plazme spregnute sa atomskom emisijom spektroskopijom (eng. ICP-AES), koristeći spektrofotometar *Varian SpectrAA 55B, USA*.



#### 4.5.12. Ispitivanje citotoksičnosti

MTT test je korišćen za ispitivanje preživljavanja humanih ćelija po *Mosmann* metodi, modifikovanoj prema ispitivanjima Oho i saradnika [217,218]. Humane mononuklearne ćelije periferne krvi (*eng.* PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) su izolovane iz heparinizovane pune krvi centrifugiranjem u gradijentu koncentracije pomoću separatora (Lymphoprep<sup>TM</sup>, Nycomed, Oslo, Norveška). MTT test je baziran na 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromidu (MTT) koji metabolišu samo žive ćelije i pri merenju aktivnosti sukcinil dehidrogenaze u mitohondrijama vijabilnih ćelija se može proceniti broj preživelih ćelija [219]. PBMC su isprane tri puta u Hemacelu (vodeni rastvor u kome se nalaze 145 mM Na<sup>+</sup>, 5,1 mM K<sup>+</sup>, 6,2 mM Ca<sup>2+</sup>, 145 mM Cl<sup>-</sup>, 35 g l<sup>-1</sup> želatinoznih polimera, pH 7,4). Zatim je odliven Hemacel i ćelijski talog je resuspendovan u hranljivom medijumu (RPMI 1640, pH 7,2 u koji se dodaje 10 % fetalni goveđi serum, termički inaktivisan na 56 °C tokom 30 minuta, L-glutamin (3 mM), streptomycin (100 µg ml<sup>-1</sup>), penicilin (100 IU ml<sup>-1</sup>) i Hapes (25 mM)).

Pločice titana sa HAP, Ag/HAP, HAP/Lig (1 i 10 mas. % Lig) i Ag/HAP/Lig (1 i 10 mas. % Lig) prevlakama su postavljene u određene sudiće u ploči-plejtu sa 24 sudića, pre dodavanja ćelijske suspenzije. Zatim je u deo tih sudića zasejano po 5·10<sup>5</sup> PBMC/0,6 ml hranljivog medijuma. U kontrolnim uzorcima ćelije su rasle samo u prisustvu hranljivog medijuma u jednoj polovini plejta. U odgovarajuće sudiće druge polovine plejta na prethodno pomenute pločice titana sa prevlakama zasejano je po 5·10<sup>5</sup> PBMC/0,6 ml hranljivog medijuma sa mitogenom koji stimuliše proliferaciju PBMC, fitohemaglutininom (*eng.* PHA, *c* = 5 µg ml<sup>-1</sup>). Nakon toga ćelijski uzorci su inkubirani tokom 72 h. Podaci su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta izvedena u duplikatu.

Za procenu broja prisutnih živih ciljnih ćelija u uzorcima korišćen je intenzitet apsorpcije na 570 nm (*A*<sub>570</sub>), određen pomoću UV-spektrofotometra (*Multiskan EX Thermo Labsystems*), u vidljivoj oblasti spektra, ćelija tretiranih bojom 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromidom (*eng.* MTT). Vijabilnost ćelija (*S*, %) se definiše kao odnos broja preživelih ćelija u nutritivnom medijumu sa prevlakama i broja preživelih ćelija u nutritivnom medijumu bez prevlaka, pomnožena sa 100, kao što je u jednačini (3):

$$S(\%) = \frac{A_u}{A_k} \cdot 100 \quad (3)$$

Podaci su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta izvedena u duplikatu, tako da je vijabilnost predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

#### 4.5.13. Ispitivanje antimikrobnih svojstava

Za detekciju antimikrobne aktivnosti agar difuzionom metodom prvo su rađene HAP i HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlake na dva tipa bakterija (*Escherichia coli* ATCC–25922 i *Staphylococcus aureus* TMF – Leskovac), a potom su ispitane antimikrobne aktivnosti praha lignina i biokeramičkih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka na dva tipa bakterija (*Escherichia coli* ATCC–25922 i dva soja vrste *Staphylococcus aureus*: ATCC–25923 i soj laboratorije za mikrobiologiju TMF u Leskovcu) i kvasac *Candida albicans* (ATCC–18259), gde su kao referentni uzorci korišćene HAP i HAP/Lig prevlake.

Agar difuziona metoda je izvedena u dve tj. četiri Petri šolje sa hranljivim agarom (2 % agara) ohlađenim do čvrstog stanja kao osnovnom podlogom debljine oko 4 mm. Na hranljivi agar nanet je sloj hranljivog top agara (0,7 % agara) koji je sadržao indikator soj test mikroorganizma na koji je ispitivana antimikrobna aktivnost. U dva tj. četiri mala erlenmajera sa po 15 ml hranljivog top agara dodato je po 200 ml suspenzije određenih bakterija starih 18 sati. Nakon očvršćavanja top agara postavljene su pločice titana sa HAP, Ag/HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlakama, dok u centralnom delu je naneta mala količina Lig praha. Petri šolje su inkubirane na 37 °C na atmosferskom pritisku tokom 24 h. Rezultati antimikrobne aktivnosti su procenjeni na osnovu merenja širine zone inhibicije rasta mikroorganizama oko ispitanih uzoraka (vrednosti su izražene u mm).

Najveći nedostatak ove metode jeste što ne može da diferencira baktericidno od bakteriostatičkog dejstva materijala pa na rezultate testa utiče ne samo toksičnost materijala, već i mogućnost rastvaranja i difuzije materijala u agaru [220].

Zbog toga je antibakterijski efekat HAP, Ag/HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlaka takođe ispitan drugom metodom takozvanom metodom preživljavanja u rastvoru na patogeni Gram-pozitivni bakterijski soj *Staphylococcus aureus* TL (TMF – Beograd). Kultura bakterija je održana kultivisanjem na svaka dva meseca na čvrstom

nutrijentnom medijumu (*Biomedics, Parque Tecnológico de Madrid*) na 37 °C i čuvana na 4 °C između eksperimenata. Aktiviranje bakterijskog soja je vršeno na LB podlozi (sastava ekstrakta kvasca 5 g l<sup>-1</sup>, triptona 10 g l<sup>-1</sup>, NaCl 5 g l<sup>-1</sup>) i inkubirano na 37 °C tokom noći. Pre eksperimenata kultura se rastvara u fiziološkom rastvoru (10<sup>-1</sup>) i 2 % (v/v) kulture se pelcuje u epruveti sa 7 ml sterilnog modifikovanog fosfatnog pufera (pH = 7,4) sa po 15 mg prevlake na titanu. Početni broj bakterija u svakoj suspenziji je između 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> CFU ml<sup>-1</sup> i koncentracija materijala prevlake je otprilike 2 mg ml<sup>-1</sup>. Uzorci se inkubiraju tokom 24 h na 37 °C, bez mešanja. Kao referentni uzorak koristi se titan bez prevlake sa fosfatnim puferom, takođe da bi se ispitaio uticaj srebra koriste se prevlake HAP i HAP/Lig prevlake. Broj bakterija se prati od početka eksperimenta i nakon 1 i 24 h inkubacije. Serijsko rastvaranje sa po 100 µl odgovarajućeg fosfatnog rastvora se vrši mešanjem sa 20 ml rastopljenog LB agara (temperatura 55 °C) i izliva u Petri šolju. Nakon 24 h inkubacije na 37 °C broje se kolonije koje su na agar podlozi i predstavljaju kao CFU ml<sup>-1</sup> preživelih bakterija *S. aureus*.

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. Raspodela veličina čestica u etanolskim suspenzijama i

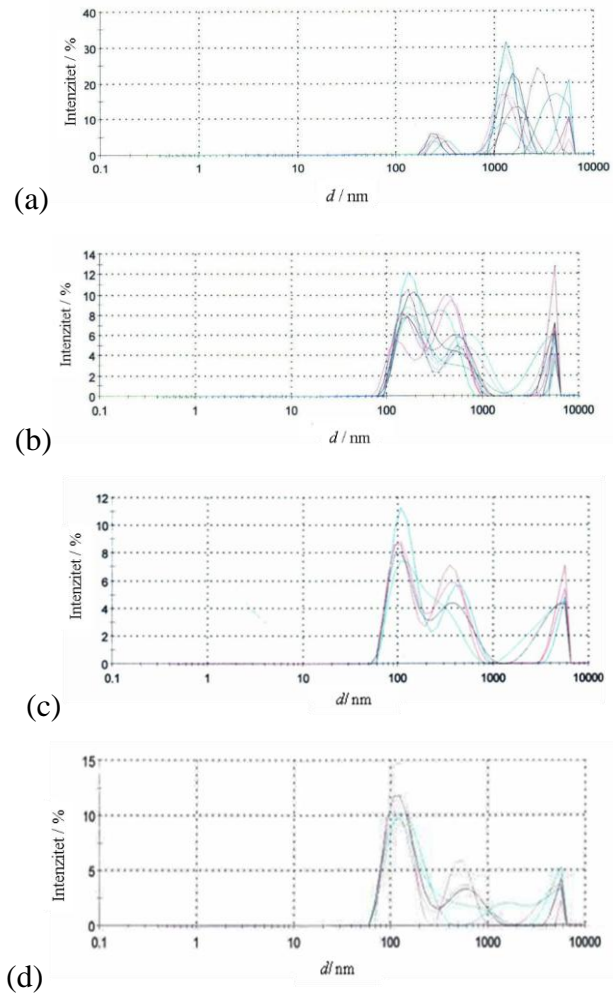
#### ζ-potencijal

Raspodela veličina čestica i vrednosti ζ-potencijala HAP, Ag/HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig suspenzija su ispitani u cilju određivanja stabilnosti koloidnih sistema. Rezultati merenja srednjeg prečnika čestica koji su dobijeni disperzijom intenziteta svetlosti, prikazani su u tabeli 5. Vrednosti maksimuma 1 i 2 (Tabela 5), koji su prvi i drugi pik na dijagramima raspodele veličina čestica (slika 11), predstavljaju odgovarajuće prečnike čestica u rastvoru.

*Tabela 5. Vrednosti srednjeg prečnika čestica suspenzija*

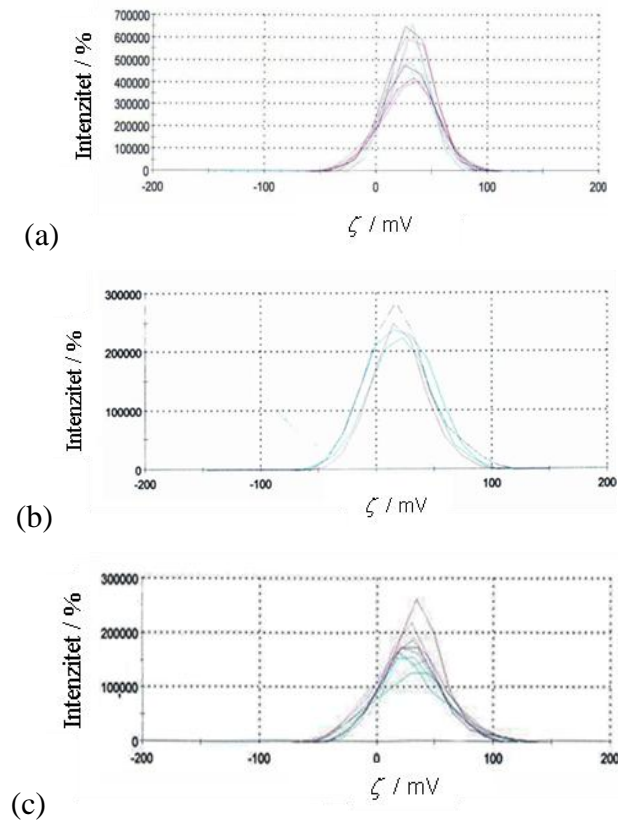
Intenzitet, %	HAP suspenzija	Ag/HAP suspenzija	HAP/Lig suspenzija	Ag/HAP/Lig suspenzija
z-srednji prečnik, nm	1500	213	363	207
Maksimum 1: z, nm	1490 (100,0)	115 (47,6)	187 (45,0)	135 (66,6)
Maksimum 2: z, nm	–	371 (40,0)	746 (43,3)	852 (23,2)

Raspodela veličina čestica HAP, Ag/HAP HAP/Lig i Ag/HAP/Lig suspenzija u zavisnosti od intenziteta rasute svetlosti prikazana je na slici 11. Kako se može videti sa ovih slika pripremljene suspenzije su polidisperzne. Srednji prečnik čestica je 363 nm za HAP/Lig suspenziju, dok je za HAP suspenziju iznosio 1500 nm. Kako je niža vrednost veličine čestica za HAP/Lig suspenziju može se zaključiti da lignin smanjuje aglomerizaciju HAP čestica. Za obe suspenzije se može pretpostaviti da su veće čestice aglomerati manjih čestica pošto je prema TEM analizi HAP praha dokazano da je nanoveličina čestica u rang 50 – 100 nm [215]. Srednji prečnik čestica Ag/HAP i Ag/HAP/Lig suspenzija je uporediv i iznosi oko 200 nm. Iako se mogu primetiti pikovi koji odgovaraju većim dimenzijama čestica (aglomeratima) može se zaključiti da dodatak Ag nije uticao na raspodelu dimenzija HAP čestica.



*Slika 11. Raspodela veličina čestica u etanolskim (a) HAP, (b) HAP/Lig, (c) Ag/HAP i (d) Ag/HAP/Lig suspenzijama.*

Poznato je da  $\zeta$ -potencijal predstavlja jačinu interakcije između koloidnih čestica, i samim tim utiče na stabilnost suspenzije i mogućnost formiranja prevlaka putem elektroforetskog taloženja [221].  $\zeta$ -potencijal biokeramičkih materijala određuje električne osobine površine. Biokeramičke čestice moraju biti naelektrisane da bi mogle da se elektroforetski istalože na metalne supstrate [222]. U slučaju elektroforetskog taloženja na katodi  $\zeta$ -potencijal na površini čestica u suspenziji treba da bude pozitivan, što se sigurno postiže na nižim pH vrednostima suspenzije.



**Slika 12.**  $\zeta$ -potencijal (a) HAP/Lig, (b) Ag/HAP i (c) Ag/HAP/Lig suspenzija.

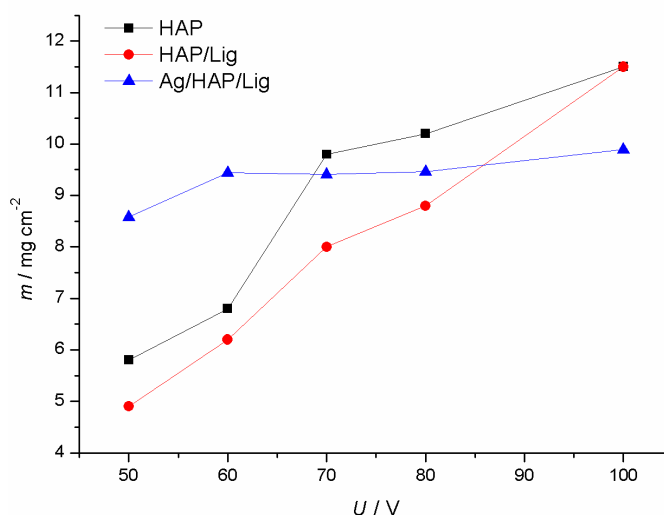
Visoke pozitivne vrednosti  $\zeta$ -potencijala za HAP/Lig, Ag/HAP i Ag/HAP/Lig suspenzije od 28, 23 i 29 mV pri konstantnoj pH vrednosti 2, prikazane na slici 12, redom, ukazuju na pozitivno naelektrisanje površine čestica, koje je potrebno za uspešno kataforetsko taloženje prevlaka.

## 5.2. Uticaj napona i vremena taloženja na masu HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu

Uticaj parametara taloženja tj. napona i vremena taloženja na morfologiju i debljinu prevlake je izuzetno veliki kod kataforetskog taloženja bioaktivnih prevlaka. Stoga, praćen je i analiziran uticaj napona i vremena taloženja na masu HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu dobijenih postupkom elektroforetskog taloženja iz etanolskih suspenzija. Napon taloženja je variran od 50 do 100 V pri različitim vremenima taloženja od 30 s do 5 min.

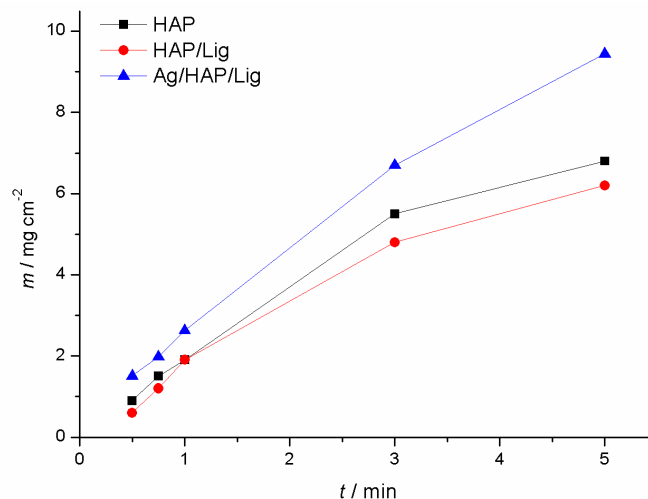
Na slici 13 prikazan je dijagram zavisnosti mase HAP i HAP/Lig prevlaka od

napona pri konstantnom vremenu taloženja od 5 min. Može se uočiti da masa prevlaka linearno raste sa porastom napona, što je u saglasnosti sa jednačinama (1) i (2) mehanizma elektroforetskog taloženja, po kojima je brzina migracije čestica u suspenziji direktno proporcionalna naponu i samim tim pri povećanju napona više čestica stiže do katode što ima za posledicu veću masu prevlake. Međutim, dijagram zavisnosti mase Ag/HAP/Lig prevlaka od napona pri konstantnom vremenu taloženja od 5 min ukazuje da na početku masa raste sa porastom napona do 60 V, nakon čega se može uočiti da je masa prevlake konstantna sa daljim povećanjem napona.



**Slika 13.** Zavisnost mase HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu od napona taloženja, pri konstantnom vremenu taloženja od 5 min.

Zavisnost mase HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlaka od vremena taloženja pri konstantnom naponu od 60 V prikazana je na slici 14. Sa dijagrama se može uočiti da dolazi do linearnog porasta mase prevlaka pri povećanju vremena taloženja do 3 min, a zatim se za duže vreme taloženja do 5 min sporije povećava masa prevlaka. Naime, veći broj čestica stiže do katode produžavanjem vremena taloženja, a činjenica je da jačina struje nije jednaka jačini struje rastvaranja prevlake ni posle dugog vremena taloženja već i dalje opada, zbog toga se nastavlja dalji porast mase, mada veoma sporo.



**Slika 14.** Zavisnost mase HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlake na titanu od vremena taloženja, pri konstantnom naponu od 60 V.

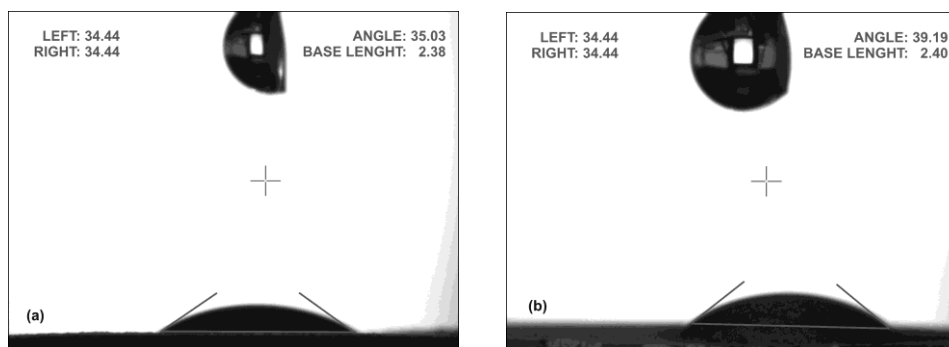
Može se uočiti da su na nižim naponima i vremenima prevlake tanje, dok se na višim naponima i vremenima uočava veća debljina i pojava pukotina (kao što je utvrđeno SEM analizom u poglavlju 5.5). Sa produžavanjem vremena taloženja veće količine izdvojenog vodonika sa katode uslovljavaju pojavu pora u istaloženoj prevlaci.

Dosadašnje analize su pokazale da je optimalan odnos mase i poroznosti kod nesinterovanih i sinterovanih biokeramičkih kompozitnih HAP prevlaka na titanu idealan pri naponu od 60 V tokom 45 s, stoga u ovom radu sve prevlake za dalje analize su dobijene pri tim uslovima taloženja.

### 5.3. Merenje vrednosti ugla kvašenja i hrapavosti površine

Vrednosti ugla kvašenja, koji predstavljaju pokazatelj kvašljivosti površine prevlaka i njene biokompatibilnosti, određen je „sessil drop“ metodom ispuštanja kapljica SBF rastvora određene zapremine na njihovu površinu. Oblik kapljice SBF rastvora na površini Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka je prikazan na slikama 15a i 15b, redom.





**Slika 15.** *Merenje vrednosti ugla kvašenja SBF rastvora na površini (a) Ag/HAP i (b) Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu.*

Izmerene vrednosti ugla kvašenja na Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlakama na titanu su  $35,03^\circ \pm 8,07^\circ$  i  $39,19^\circ \pm 1,21^\circ$ , redom. Kvašljivost površine (hidrofilna ili hidrofobna) je najvažniji parametar koji utiče na biološki odgovor organizma na biomaterijale implantata. Ovaj parametar je važan za adsorpciju proteina, adheziju i aktivaciju trombocita, zgrušavanje krvi i adheziju ćelija [223]. Prisustvo hidroksilnih grupa na površini čini hidroksiapatit hidrofilnim [224].

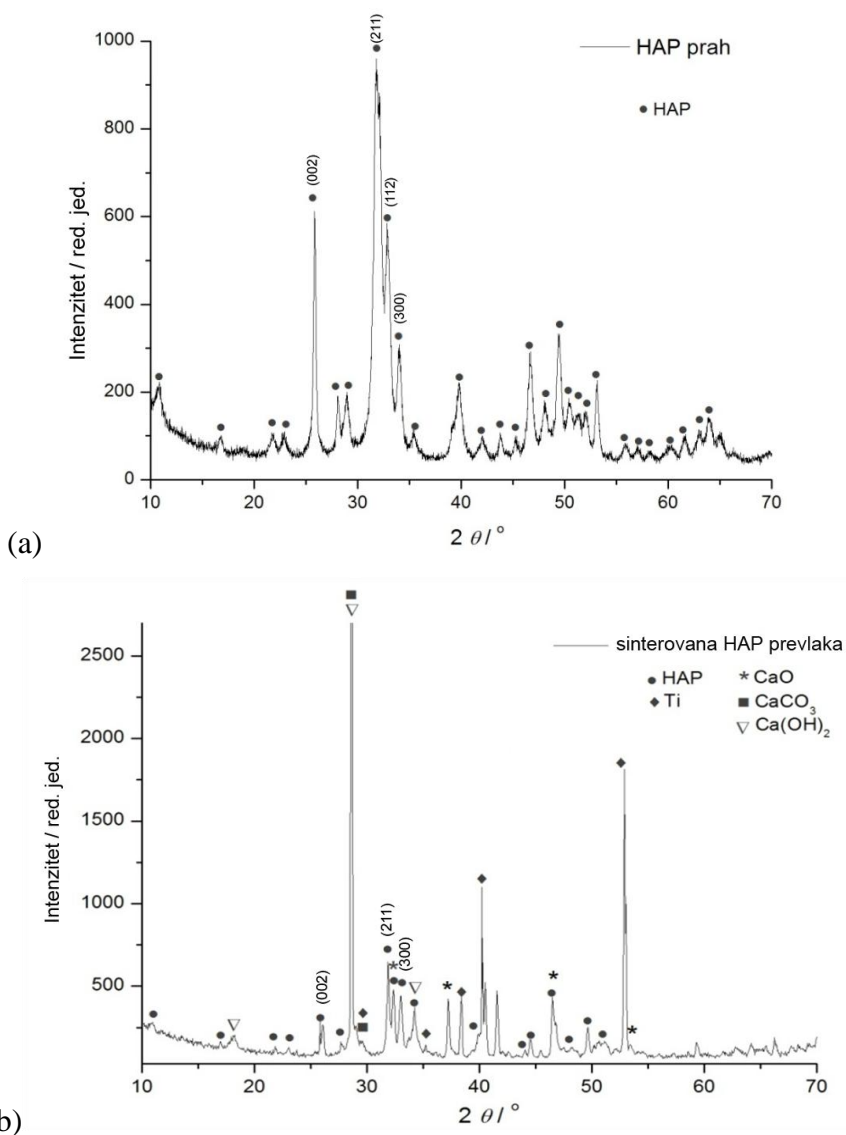
Male vrednosti ugla kvašenja utiču na visoku pokrivenost površine biomaterijala na implantatu. Sa slike 15 se može primetiti da obe prevlake ukazuju na hidrofilna svojstva površine. Pokazano je da se veliki stepen adhezije ćelija postiže na hidrofilnim površinama [225].

Izmerene vrednosti hrapavosti površine,  $R_a$ , Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka su 2,40 i 0,85  $\mu\text{m}$ , redom. Costa-Rodrigues i saradnici [226] su pokazali da optimalne vrednosti hrapavosti površine biomaterijala variraju od 0,20 do 2,87  $\mu\text{m}$ , što obezbeđuje bolju osteointegraciju i stoga direktno utiču na adheziju ćelija kostiju. Izmerene  $R_a$  vrednosti Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka su saglasne sa objavljenim rezultatima Costa-Rodrigues i saradnika. Takođe, ovi autori su zaključili da hrapavija površina prevlaka obezbeđuje bolju adheziju ćelija, ali istovremeno smanjuje pokretljivost ćelija. Zbog toga hrapavost površine Ag/HAP/Lig prevlake može bolje da stimuliše rast ćelija u odnosu na Ag/HAP prevlaku.

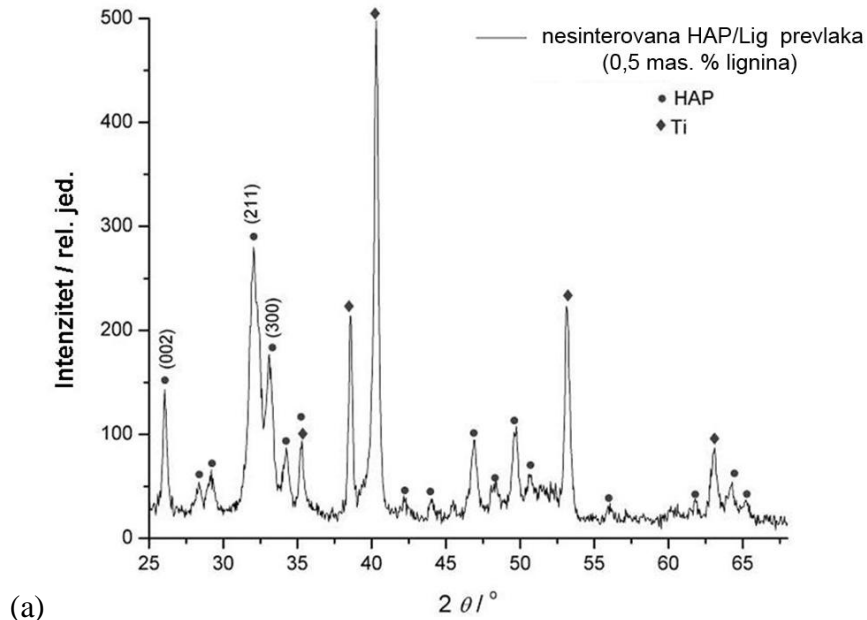
## 5.4. XRD analiza

Fazni sastav i struktura HAP praha, HAP i HAP/Lig (0,5 – 10 mas. % Lig) prevlaka sa različitim koncentracijama lignina ispitani su XRD analizom. Difraktogram HAP praha je prikazan na slici 16a, dok je difraktogram HAP prevlake nakon sinterovanja na temperaturi od 900 °C tokom 30 min prikazan na slici 16b. Na slikama 17–20 prikazani rezultati rendgenske XRD analize HAP/Lig prevlaka sa različitim koncentracijama lignina, pre i posle sinterovanja.

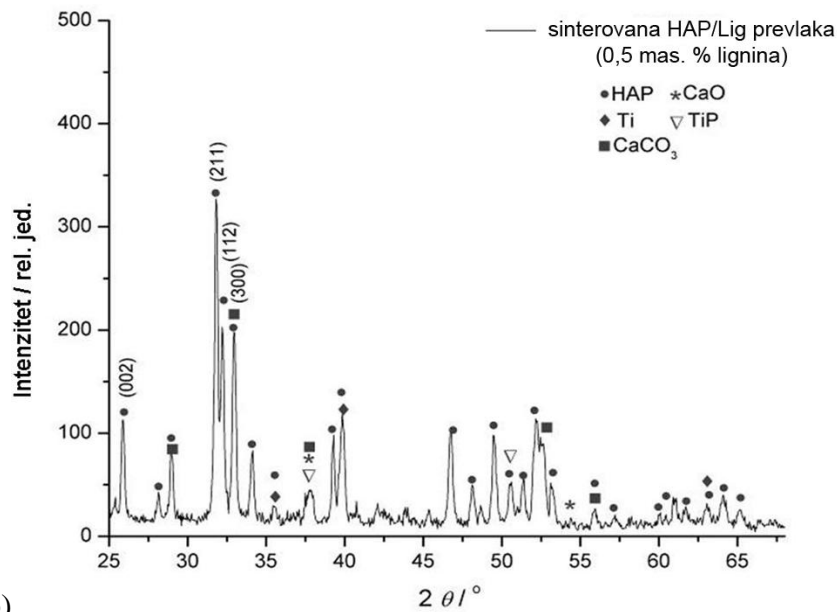
Potvrđeno je da se svi pikovi na difraktogramu HAP praha (slika 16a) savršeno poklapaju sa JCPDS šemom No. 09–0432 za hidroksiapatit, što potvrđuje prisustvo čistog hidroksiapatita dobijenog modifikovanom precipitacionom metodom.



Slika 16. XRD difraktogram (a) HAP praha i (b) sinterovane HAP prevlake.

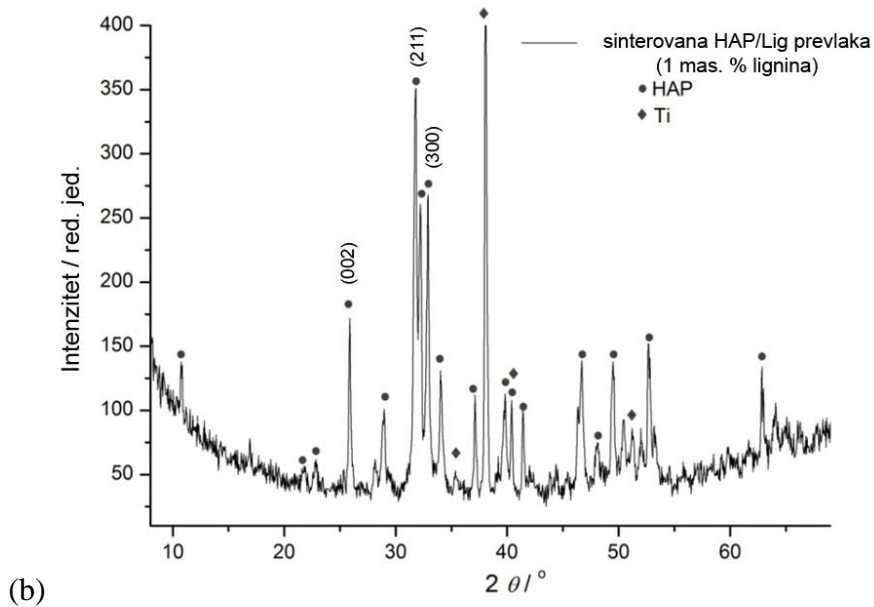
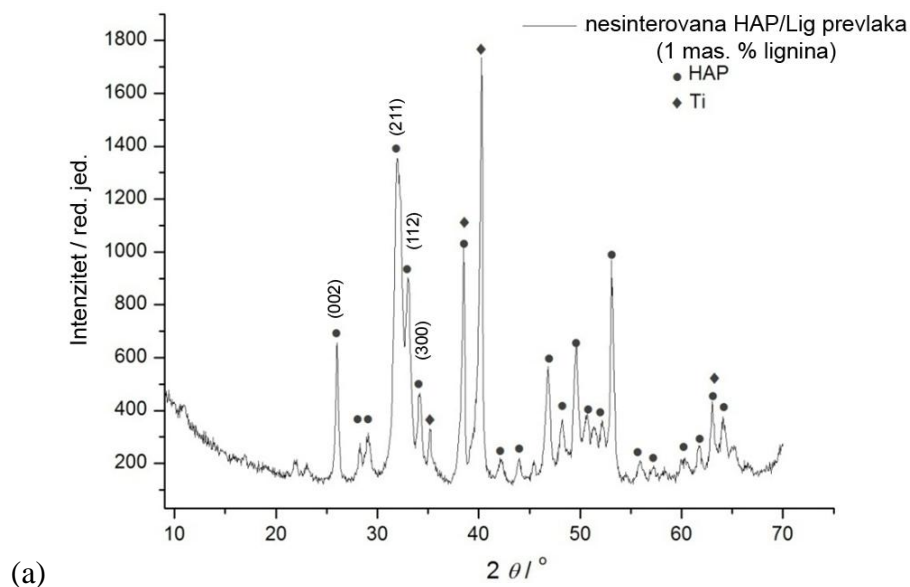


(a)

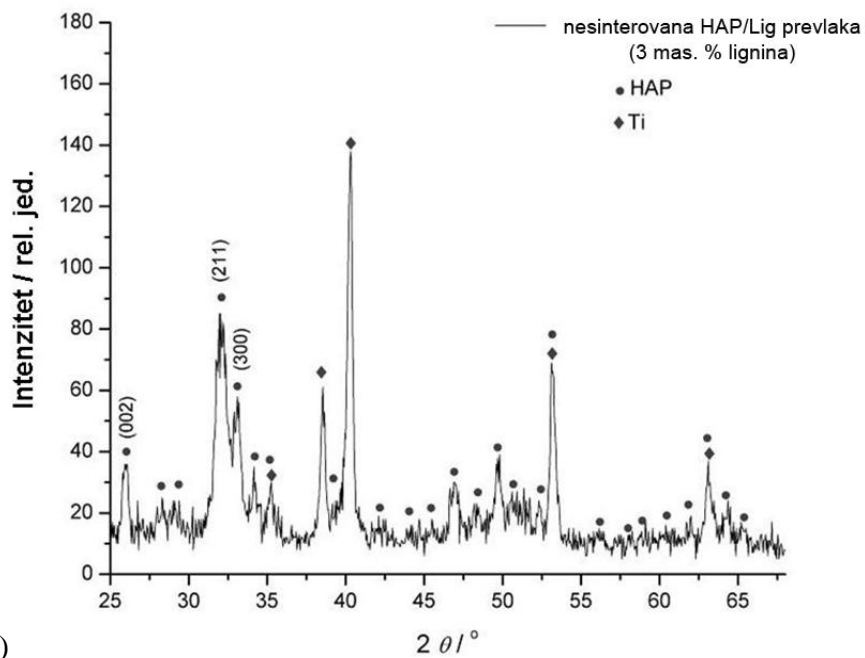


(b)

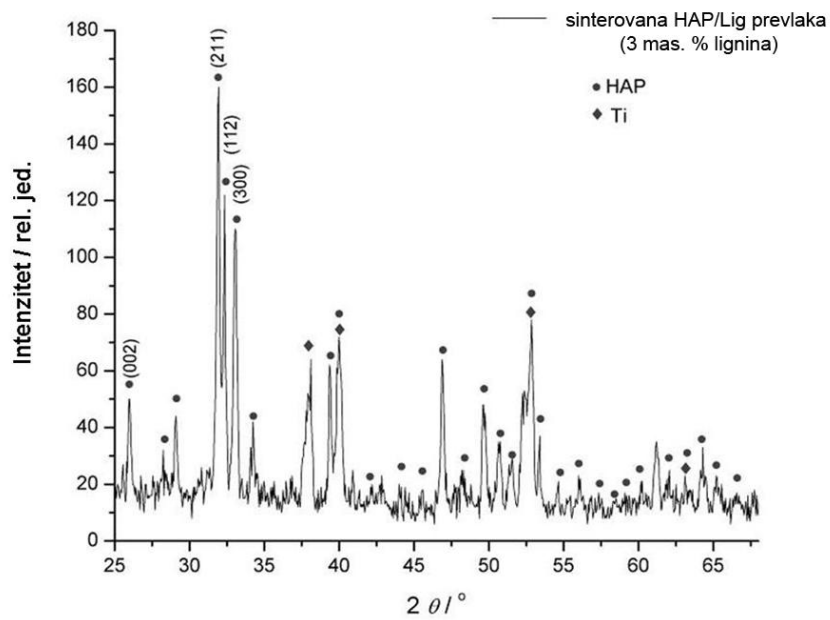
**Slika 17.** XRD difraktogram (a) nesinterovane i (b) sinterovane HAP/Lig prevlake (0,5 mas. % Lig) na titanu.



**Slika 18.** XRD difraktogram (a) nesinterovane i (b) sinterovane HAP/Lig prevlake (1 mas. % Lig) na titanu.

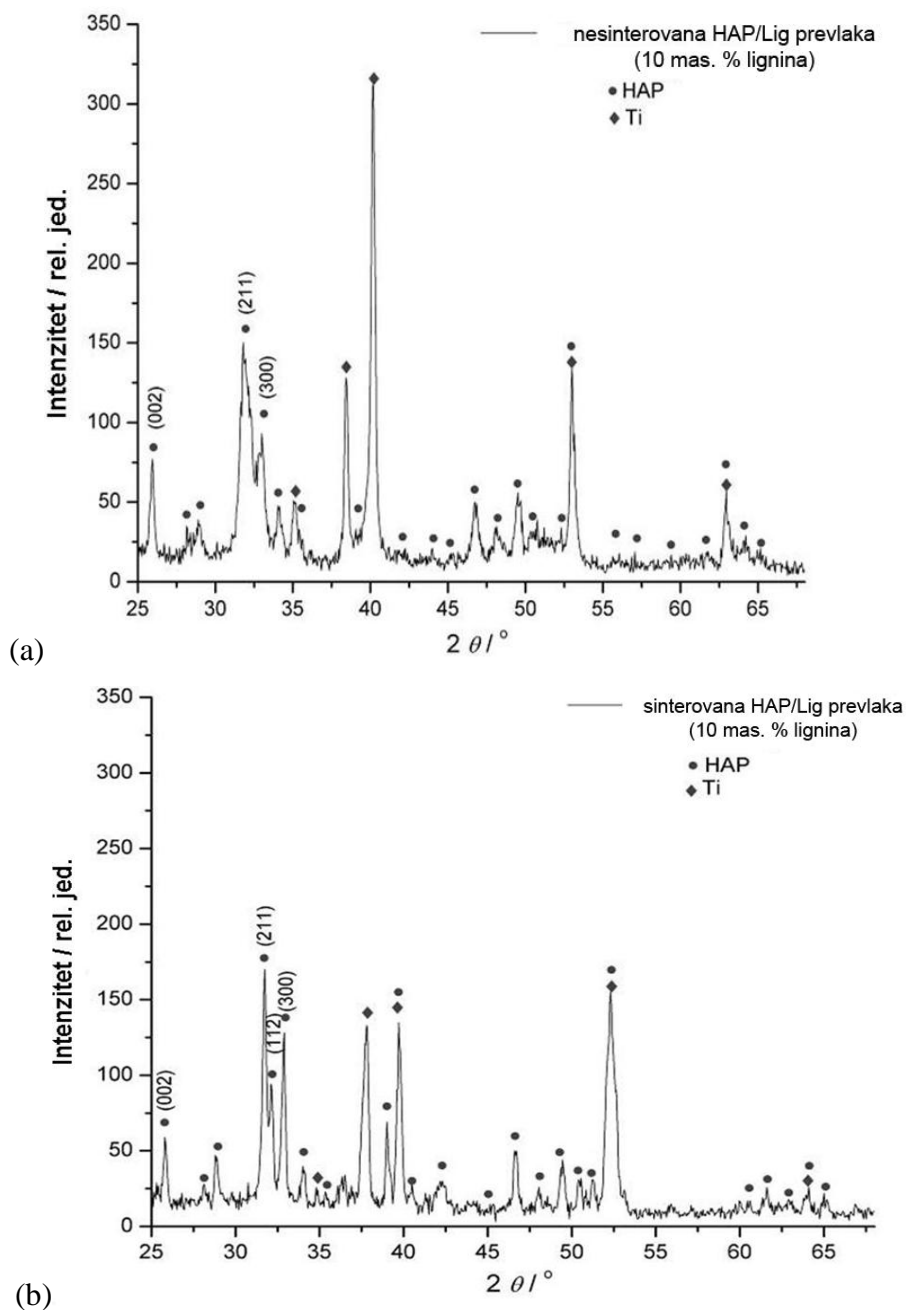


(a)



(b)

**Slika 19.** XRD difraktogram (a) nesinterovane i (b) sinterovane HAP/Lig prevlake (3 mas. % Lig) na titanu.



**Slika 20.** XRD difraktogram (a) nesinterovane i (b) sinterovane HAP/Lig prevlake (10 mas. % Lig) na titanu.

Pikovi na difraktogramima nesinterovanih HAP/Lig prevlaka sa različitim koncentracijama lignina od 0,5 do 10 mas. % prikazani na slikama 17a–20a, redom, pojavljuju se na potpuno istim uglovima kao kod HAP praha, pa se stoga potvrđuje da je hidroksiapatit u ispitanim prevlakama u čistom obliku. Međutim, razlika u intenzitetima pojedinih pikova na difraktogramima može se objasniti prisustvom Ti kao metalnog

supstrata (pikovi karakteristični za titan su takođe prikazani na slikama 17a–20a, radi poređenja).

Posle sinterovanja difrakcioni pikovi HAP i HAP/Lig prevlaka (0,5 – 10 mas. % Lig) postaju oštrije sa smanjenjem širine pika (slike 16b–20b, redom), što ukazuje da sinterovane prevlake imaju bolju kristalnu strukturu. Proces sinterovanja zavisi od osobina početnog HAP praha i manje čestice teže da smanje svoju visoku površinsku energiju grupisanjem, što znači da dolazi do aglomerisanja čime se povećava gustina materijala i rast zrna [227,228]. Upravo nanočestični HAP prah omogućava da se temperatura sinterovanja od 900 °C uspešno primeni kao termički tretman HAP i HAP/Lig prevlaka, iako je uobičajena temperatura sinterovanja za biokeramičke prevlake u rasponu temperatura od 1000 do 1300 °C [229].

Pojava novih pikova na difraktogramima HAP i HAP/Lig (0,5 mas. % Lig) prevlaka prikazanih na slikama 16b i 17b, potvrđuje delimičnu dekompoziciju hidroksiapatita tokom sinterovanja na 900 °C [230]. Analiza difraktograma prevlaka dobijenih posle sinterovanja ukazuje na to da je još uvek glavna kristalna faza hidroksiapatit, ali pojava specifičnih difrakcionih pikova ukazuje i na formiranje novih kristalnih faza CaO, CaCO<sub>3</sub> i TiP (slike 16b i 17b). Može se pretpostaviti da tokom sinterovanja dolazi do reakcije CaO, dobijenog razgradnjom hidroksiapatitne rešetke, sa atmosferskom vodom i CO<sub>2</sub> pri čemu nastaju Ca(OH)<sub>2</sub> i karbonati [231]. Prisustvo XRD pika slabog inteziteta koji odgovara novoj TiP fazi se može objasniti difuzijom fosfornih jona iz HAP rešetke ka površini Ti. U literaturi je zabeleženo da tokom sinterovanja dolazi do delimične difuzije jona kalcijuma i povećane difuzije fosfornih jona što dovodi do delimične razgradnje HAP rešetke [232]. Ipak nije zabeleženo prisustvo specifičnog pika za β-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, (TCP – trikalcijum fosfat) na  $2\theta = 30,7^\circ$  koji nastaje nakon razgradnje hidroksiapatita.

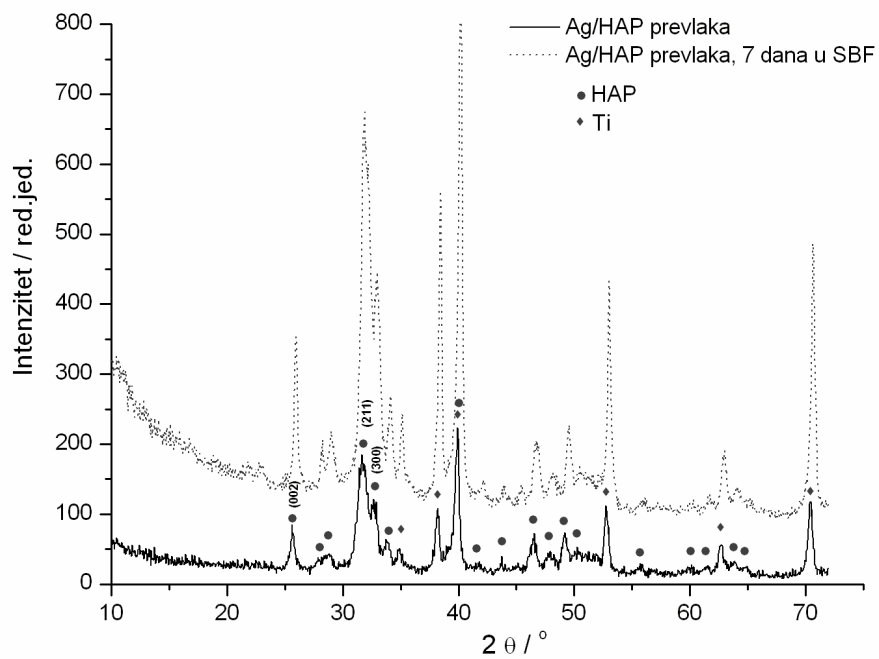
Na difraktogramima sinterovanih HAP/Lig prevlaka sa 1, 3 i 10 mas. % Lig, slike 17b–19b, nisu primećeni pikovi novih kristalnih faza, što ukazuje da je fazni sastav ostao isti kao pre sinterovanja. Poređenjem svih difraktograma sinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka (0,5 – 10 mas. % Lig), može se zaključiti da ne dolazi do razgradnje hidroksiapatita pri koncentracijama lignina većim od 0,5 mas. %, što znači da veće koncentracije lignina štite HAP rešetku od dekompozicije.

Srednja vrednost veličine kristalita ( $D_p$ ) HAP/Lig prevlaka sa različitim

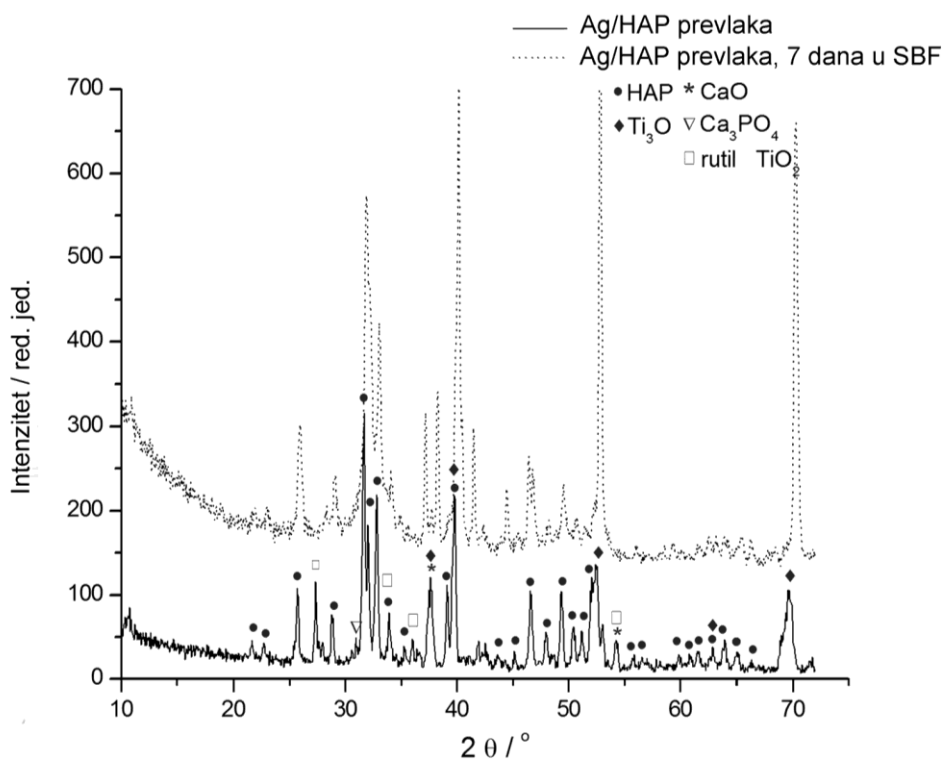
koncentracijama lignina je izračunata na osnovu Šererove jednačine (2) iz pika koji odgovara kristalnoj ravni (002) na  $2\theta \approx 26^\circ$ . Izračunate vrednosti srednje veličine kristalita su 35, 39 i 36 nm za prevlake sa 0,5; 3 i 10 mas. % Lig što ukazuje da promena koncentracije polimera ne utiče na veličinu kristalita i vrednosti parametara kristalne rešetke.

XRD analiza nesinterovanih i sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka (slike 21 i 22), vršena je pre i posle potapanja u SBF rastvor na  $37^\circ\text{C}$  tokom 7 dana, da bi se odredila eventualna promena u faznom sastavu i strukturi. Na difraktogramima nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka, slika 21a i 22a, dominantni su pikovi velikog inteziteta koji savršeno odgovaraju HAP fazi (JCPDS No. 86–1199). Ugradnja jona srebra u hidroksiapatitnu rešetku Ag/HAP prevlake dovodi do pomeranja specifičnih HAP pikova (kristalnih ravni (002), (211) i (300)) ka manjim  $2\theta$  uglovima, pre potapanja u SBF rastvor u poređenju sa čistom HAP prevlakom (slika 16a), što potvrđuje supstituciju kalcijuma srebrom [233].



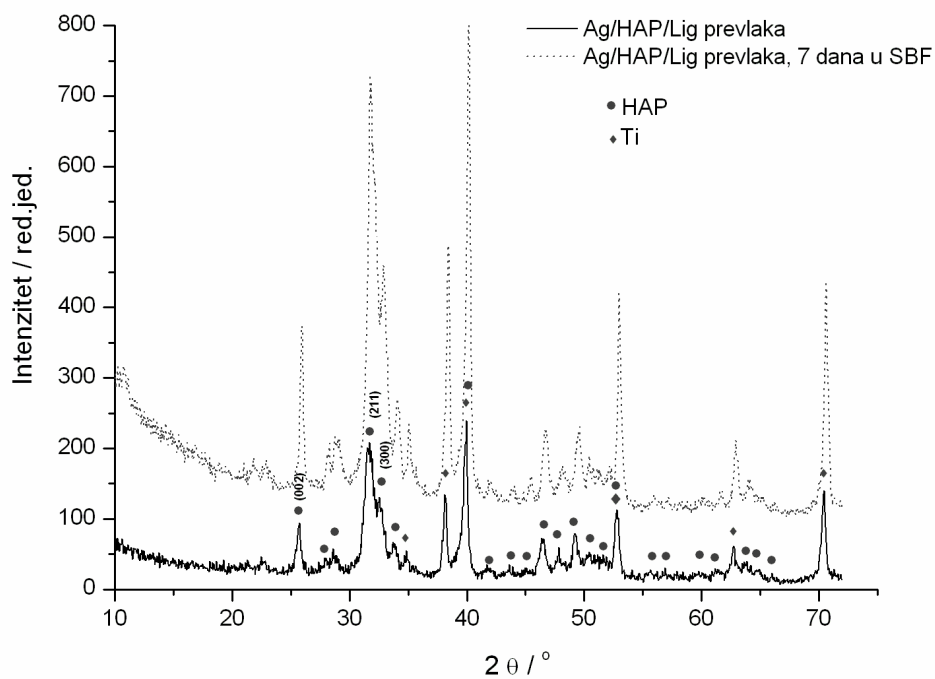


(a)

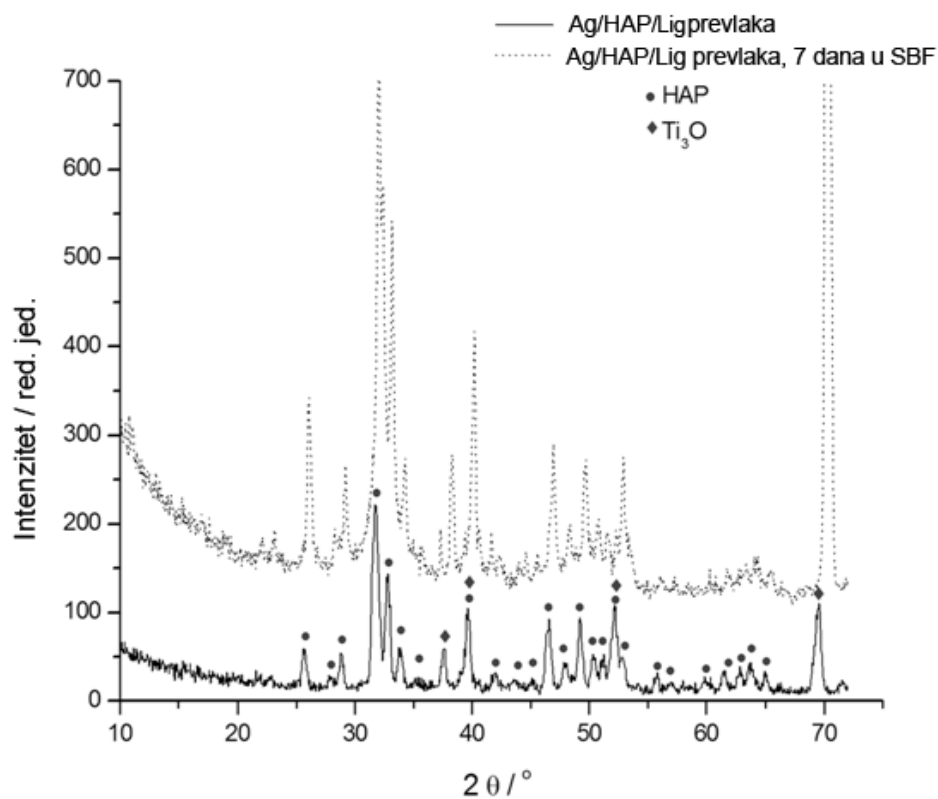


(b)

**Slika 21.** XRD difraktogram (a) nesinterovane i (b) sinterovane Ag/HAP prevlake na titanu, pre i nakon 7 dana potapanja u SBF rastvoru.



(a)



(b)

**Slika 22.** XRD difraktogram (a) nesinterovane i (b) sinterovane Ag/HAP/Lig prevlake (1 mas. % Lig) na titanu, pre i nakon 7 dana potapanja u SBF rastvoru.

Pojava novih pikova na difraktogramu sinterovane Ag/HAP prevlake pre potapanja u SBF rastvor, slika 21b, potvrđuje delimičnu razgradnju hidroksiapatita. Pored karakterističnih pikova koji najviše odgovaraju hidroksiapatitu, mogu se uočiti i novi difrakcioni pikovi koji odgovaraju kristalnim fazama CaO (JCPDS No. 74–1226) i  $\beta$ -trikalcijum fosfata ( $\beta$ -TCP, JCPDS No. 32–0176) at  $2\theta = 30,7^\circ$  ukazujući na razgradnju HAP rešetke tokom sinterovanja.

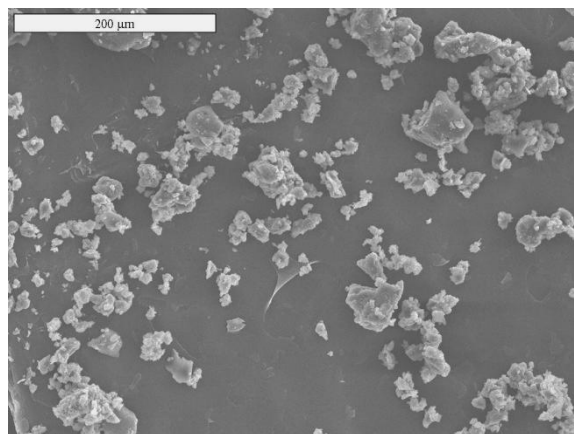
S druge strane, odsustvo specifičnih pikova za  $\beta$ -TCP i CaO na difraktogramu sinterovane Ag/HAP/Lig prevlake (slika 22b) potvrđuje da nema razgradnje HAP kristalne strukture. Stoga, svi pikovi odgovaraju čistom hidroksiapatitu, što dovodi do zaključka da tokom sinterovanja lignin doprinosi termičkoj stabilnosti Ag/HAP rešetke [234]. Dodatni pikovi koji po poziciji odgovaraju Ti supstratu ukazuju na prisustvo rutil faze  $\text{TiO}_2$  iako je sinterovanje rađeno u inertnoj atmosferi. Takođe je otkriveno prisustvo titan suboksida,  $\text{Ti}_3\text{O}$  (JCPDS No. 73–1586), na oba difraktograma Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka (slike 21b i 22b), koji predstavlja nestehiometrijski oksid deficitaran kiseonikom. Tokom sinterovanja usled difuzije kiseonika od spolja ka unutrašnjosti pojavljuje se viševalentni Ti. Prema Ye i saradnicima [235] Ti kao metal i titan suboksid na površinama kompozita su aktivniji u fiziološkom okruženju nego  $\text{TiO}_2$  i dovode do stvaranja hemijskih veza koje pospešuju vezivanje implantata.

SBF rastvor je metastabilni pufer sličan po hemijskom sastavu ljudskoj plazmi [236]. Zapažen je rast i formiranje apatitnog sloja sličnog koštanom tkivu na površini bioaktivnog materijala posle potapanja u SBF rastvor. Važno je napomenuti da je nakon 7 dana potapanja u SBF rastvor na difraktogramima Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka primećeno pomeranje karakterističnih HAP pikova koji odgovaraju kristalnim ravnima (002), (211) i (300) prema većim  $2\theta$  uglovima (slike 21 i 22). Ovo se može pripisati uvođenju karbonatnih jona u kristalnu rešetku zbog čega dolazi do rasta karbonatnog hidroksiapatita sličnog koštanom tkivu na površini prevlake. Stoga se može zaključiti da je pomeranje XRD pikova tipično za slabo kristaliničan karbonatni hidroksiapatit, sličan onome u kostima. Rast karbonatnog hidroksiapatitnog sloja posle 7 dana dokazuje bioaktivnu prirodu površine Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka što je takođe pokazano narednim rezultatima SEM i FE-SEM slikama (poglavlje 5.5). Stoga, formiranje karbonatnog HAP je vrlo korisno zbog njegove slabe kristalne forme koja podseća na ljudske kosti, koja omogućuje osteointegraciju.

Srednja vrednost veličine kristalita za sinterovane Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake je izračunata na  $2\theta \approx 26^\circ$  pomoću Šererove jednačine (2) i iznosila je 35,2 i 20,8 nm, redom. S druge strane, apatitni sloj formiran posle 7 dana u SBF ima skoro istu vrednost veličine kristalita za Ag/HAP (20,2 nm) prevlaku, kao i za Ag/HAP/Lig (22,0 nm) prevlaku. Razlika u vrednostima veličine kristalita pre i nakon potapanja u SBF se može objasniti ugrađivanjem  $\text{CO}_3^{2-}$  jona na mesto  $\text{OH}^-$  ili  $\text{PO}_4^{3-}$  u apatitnoj rešetci.

## 5.5. SEM analiza

SEM mikrofotografija praha lignina prikazana je na slici 23. Sa slike se vidi da je prah lignina sastavljen od skupa nepravilnih aglomerata koji se sastoje od velikog broja finih čestica lignina 10–50  $\mu\text{m}$  [213].

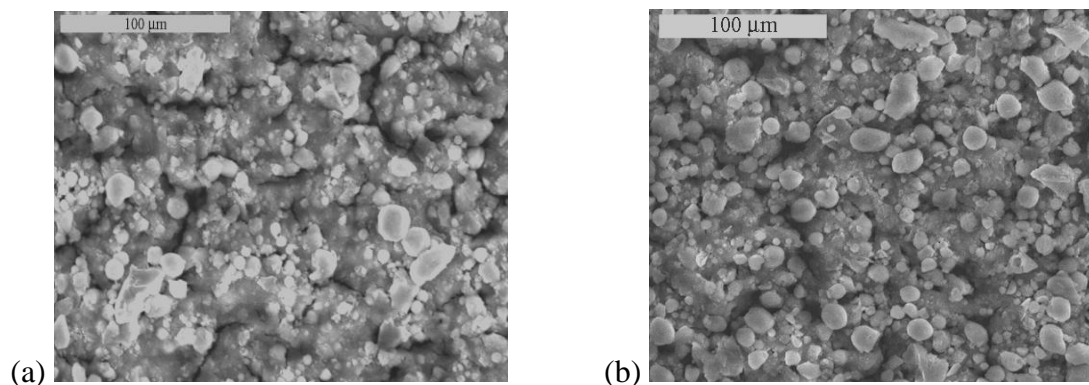


*Slika 23. SEM mikrofotografija Alcell praha lignina.*

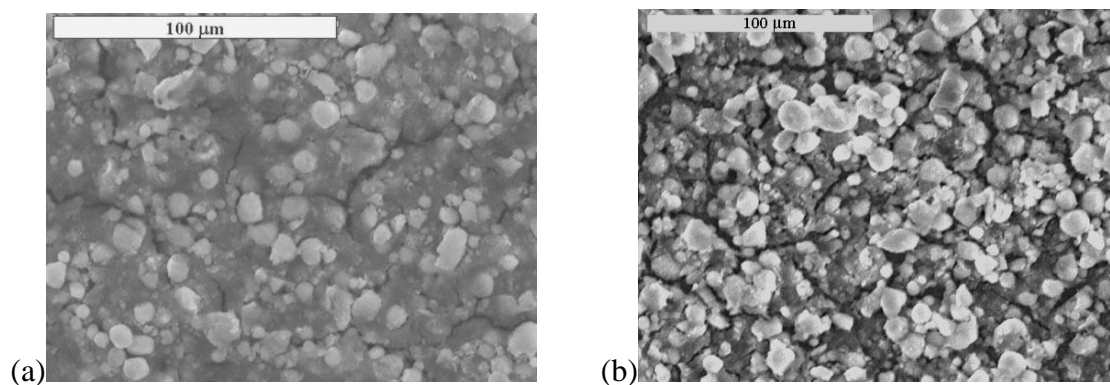
Analiza SEM mikrofotografije početnog HAP praha [215] ukazuje na to da se HAP aglomerati sastoje od velikog broja finih čestica. TEM slika [215] nanočestičnog praha hidroksiapatita pokazuje da se aglomerati sastoje od cevasto oblikovanih čestica nanodimenzije u rasponu od 50 – 100 nm. Odnos Ca/P u HAP prahu je određen ICP analizom i iznosi 1,67 [215].

SEM mikrofotografije HAP prevlaka taloženih na titanu na naponima od 50 i 60 V tokom 1 min, prikazane su na slici 24 [213]. Uočene pukotine na površini nesinterovanih prevlaka (slika 24) povećale su se nakon sinterovanja na temperaturi od 900 °C.

Da bi se izbeglo stvaranje pukotina na površini i obezbedila bolja adhezija, HAP prevlake su taložene tokom kraćih vremenskih perioda (manje od 1 min). SEM mikrofotografije HAP prevlake, pre i nakon sinterovanja, taložene na konstantnom naponu od 60 V tokom 45 s, prikazane su na slici 25. Može se primetiti da nesinterovana HAP prevlaka ima manje vidljive pukotine u odnosu na morfologiju sinterovane HAP prevlake.



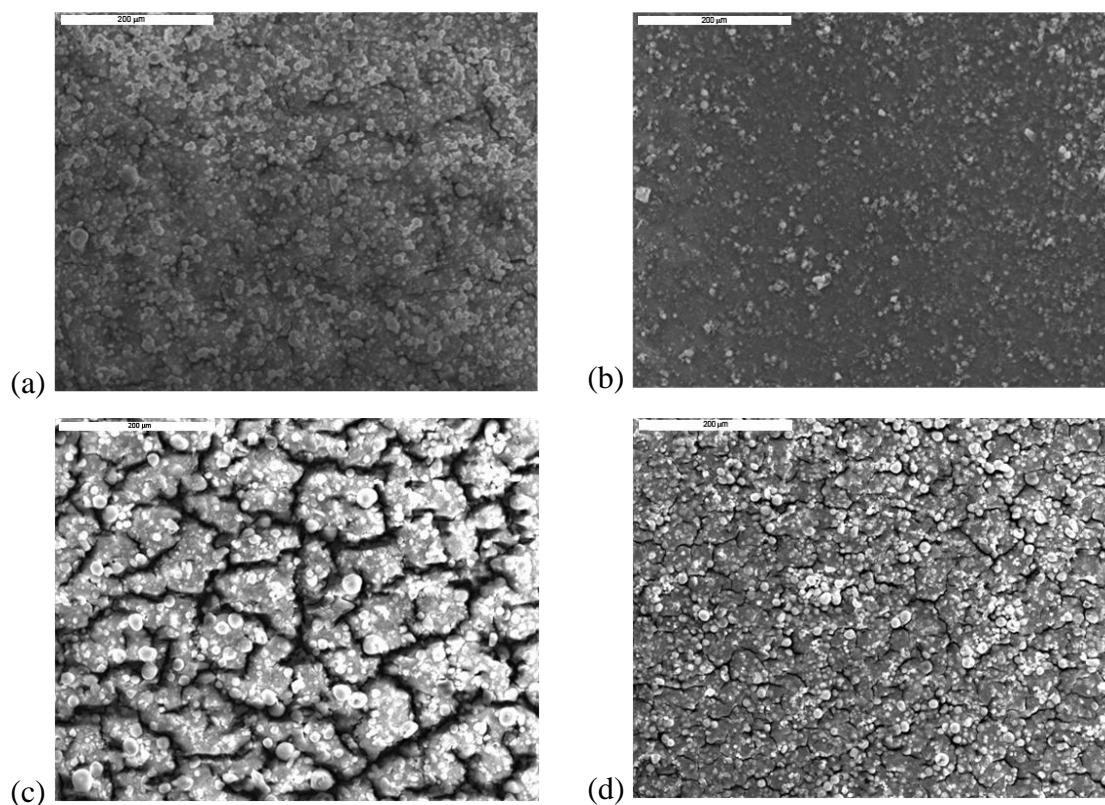
**Slika 24.** SEM mikrofotografije HAP prevlaka taloženeh na titanu na (a) 50 V i (b) 60 V tokom 1 min.



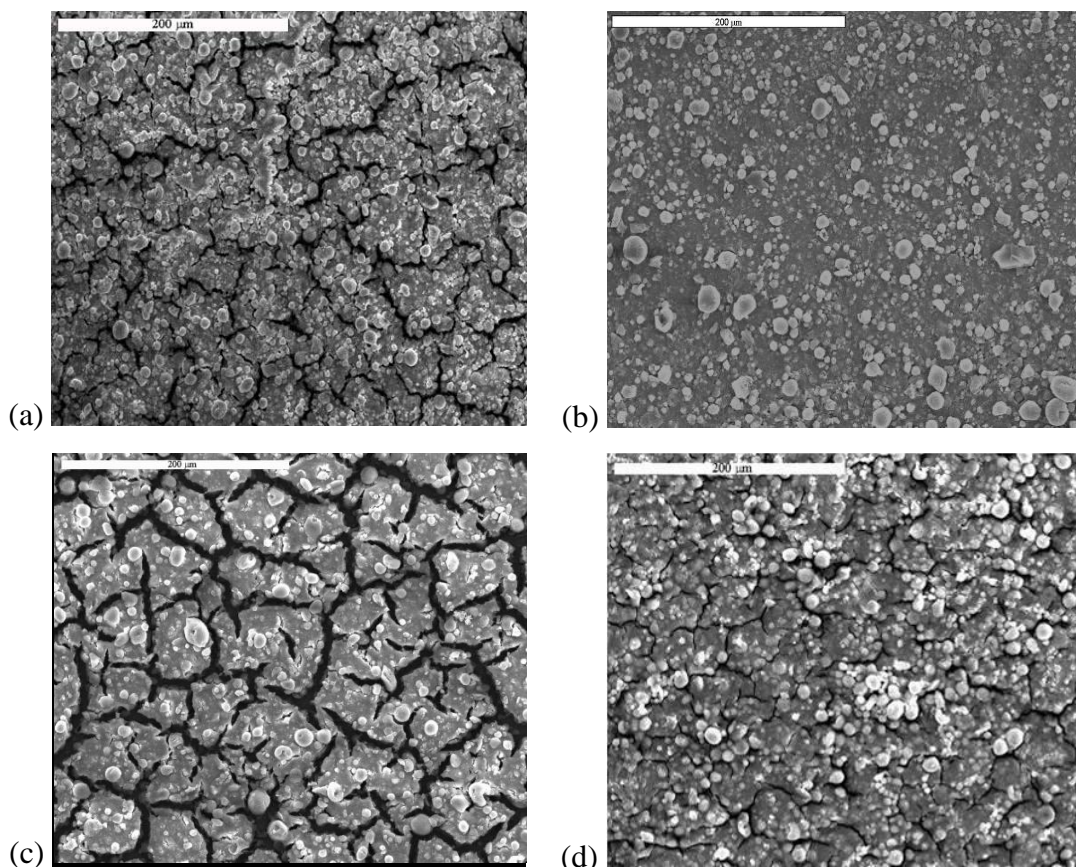
**Slika 25.** SEM mikrofotografije (a) nesinterovane i (b) sinterovane HAP prevlaka na titanu taložene na 60 V tokom 45 s.

HAP/Lig prevlake (0,5 – 10 mas. % Lig) taložene na titanu pod istim uslovima kao HAP prevlake, pri konstantnom naponu od 60 V tokom 45 s, imaju uniformnu i kompaktnu površinu (slika 26). Morfologije površina sinterovanih HAP/Lig prevlaka sa 0,5 – 10 mas. % Lig na 900 °C su prikazane na slici 27. Površina sinterovanih HAP/Lig prevlaka sa 0,5; 3 i 10 mas. % Lig (slike 27a, 27c i 27d) imaju veliki broj pukotina, koje

se mogu objasniti interakcijom između HAP i Lig, kao i termičkim naponima (sinterovanje) kojima su izložene kompozitne prevlake [230]. Međutim, SEM mikrofotografija sinterovane HAP/Lig prevlake sa 1 mas. % Lig (slika 27b) pokazuje njenu homogenu površinu bez pukotina. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da optimalna koncentracija lignina od 1 mas. % obezbeđuje uniformnu i glatku površinu prevlake bez pukotina. Poređenjem sa SEM mikrofotografijom sinterovane HAP prevlake (slika 25b), formirana homogena površina sinterovane HAP/Lig sa 1 mas. % lignina prevlake bez pukotina ukazuje da lignin pospešuje vezivanje između HAP čestica i površine supstrata.

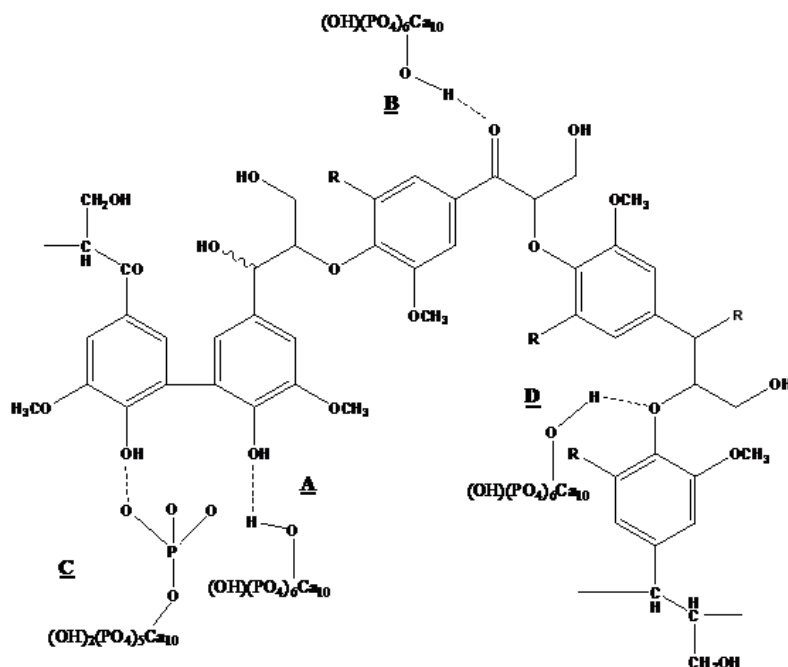


*Slika 26. SEM mikrofotografije nesinterovanih HAP/Lig prevlaka sa (a) 0,5, (b) 1, (c) 3 i (d) 10 mas. % Lig*



**Slika 27.** SEM mikrofotografije sinterovanih HAP/Lig prevlaka sa (a) 0,5, (b) 1, (c) 3 i (d) 10 mas. % Lig.

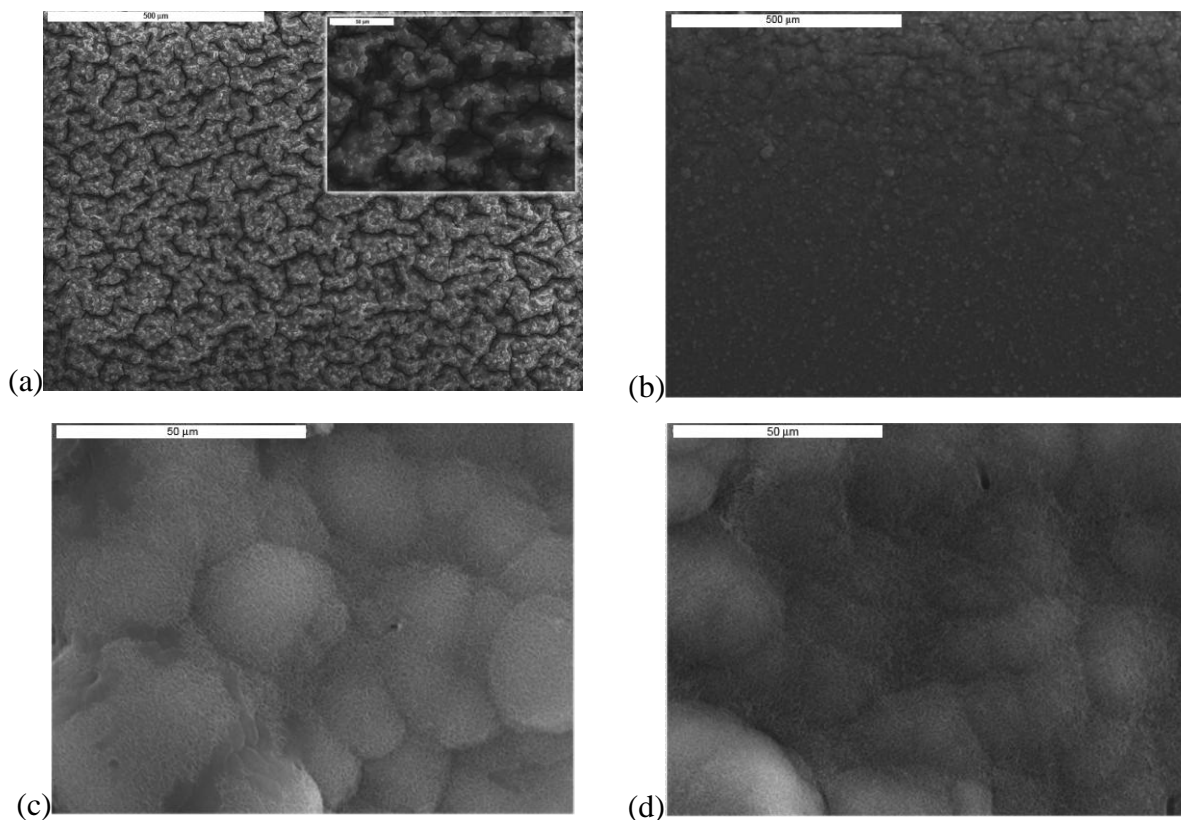
Uočeno je da fine HAP čestice sa velikom površinom zrna dovode do stvaranja pukotina na površini nakon sušenja na sobnoj temperaturi, što se može sprečiti upotrebom veziva [237]. Poznato je iz literature da razni vezivni materijali – hitozan, lignin, kopolimer glukomanan/hitozan, mogu da povećavaju prijanjanja HAP prevlake i sprečavaju nastanak pukotina na površini [78,101,238,239]. Moguća su četiri različita načina vezivanja između HAP i polimera lignina (slika 28). Prvi je između fenolnih –OH iz lignina i –OH iz HAP (mesto A); drugi je između  $\alpha$ -karbonila iz perifernog lanca lignina –C=O i –OH iz HAP (mesto B); treći je između –OH iz lignina i  $\text{PO}_4^{3-}$  iz HAP (mesto C); poslednji je između etarske veze kiseonika iz lignina, C–O–C i –OH iz HAP (mesto D).



*Slika 28. Shema moguće veze između fragmenata lignina i hidroksiapatita u HAP/Lig prevlaci ( $R=OCH_3$  ili H, C).*

SEM mikrofotografije prikazane na slici 29 pokazuju homogenost strukture nesinterovane Ag/HAP/Lig prevlake u odnosu na nesinterovanu Ag/HAP prevlaku pre potapanja u SBF rastvor. Morfološka struktura Ag/HAP prevlake (slika 29a) otkriva pojave mikro pukotina na površini kao i veliki broj aglomerata. Površinske pukotine su se najverovatnije formirale usled skupljanja tokom sušenja na vazduhu. Pored činjenice da Ag/HAP sloj sa pukotinama ne štiti površinu implantata, što može dovesti do otpuštanja jona titana u telo, rezultati SEM analize velikog uvećanja (insert slike 29a) pokazuju da su pukotine nano veličina.

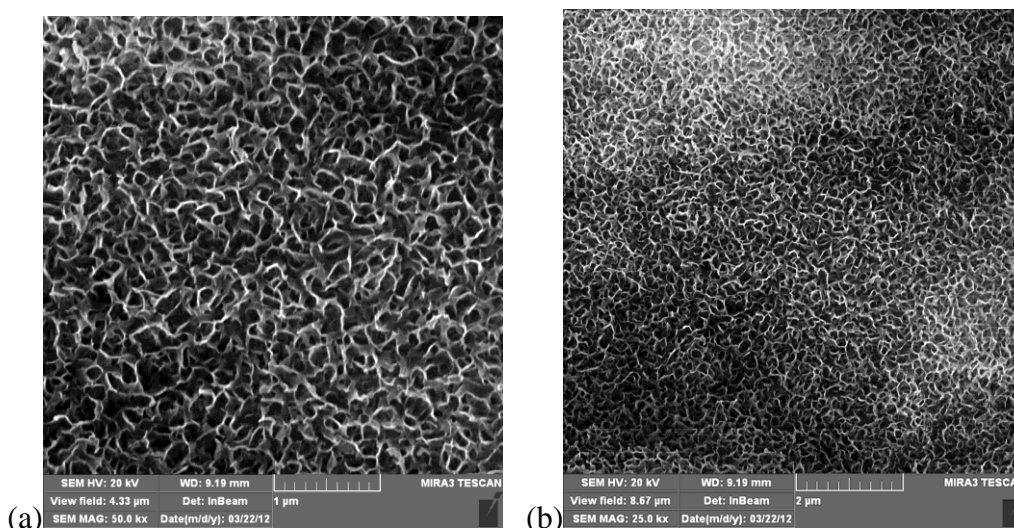




**Slika 29.** SEM mikrofotografije nesinterovanih Ag/HAP prevlaka (a) pre i (c) posle potapanja i Ag/HAP/Lig prevlaka (b) pre i (d) posle potapanja u SBF rastvor na 37 °C.

Na slikama 29c i 29d su prikazane površine Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka posle 7 dana potapanja u SBF rastvoru. Novoformirani pločasti kristali apatita su evidentni na slikama 29c i 29d posle potapanja u SBF rastvor. Takođe, novi apatitni sloj se može uočiti na FE-SEM mikrofotografijama Ag/HAP/Lig prevlake (slika 30) posle potapanja u SBF rastvor. Relativno visoka poroznost površine implantata, zajedno sa mehaničkom stabilnošću obezbeđuje bolju ćelijsku adheziju i olakšava osteointegraciju. Poznato je da povezana porozna struktura pospešuje penetraciju ćelija koje formiraju koštano tkivo što dovodi do bolje biointegracije [240]. Formiranje apatitnog sloja na površini posle samo 7 dana potapanja u SBF rastvoru potvrđuje očiglednu bioaktivnost Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka. Sastav novih pločastih apatitnih kristala je potvrđen ATR-FTIR (IC spektri će biti prikazani u poglavlju 5.7) i XRD analizama (slike 21a i 22b), dok je formiranje apatita prethodno objašnjeno od strane Sun i saradnika [241]. Ukratko, negativno naelektrisana površina hidroksiapatita interakcijom sa  $\text{Ca}^{2+}$  jonima iz SBF rastvora formira pozitivno naelektrisanu površinu bogatu kalcijumom. Zatim

takva površina reaguje sa negativnim jonima  $\text{PO}_4^{3-}$  iz SBF rastvora formirajući apatit siromašan Ca, koji kristališe u apatit sličan onome u kostima. Prema Sun i saradnicima [241] bioaktivnost implantata svih materijala je određena njihovom sposobnošću da potpomogne formiranje apatita sličnog kosti u fiziološkom rastvoru sa jonskim koncentracijama i pH vrednošću sličnim kao u ljudskoj krvnoj plazmi.

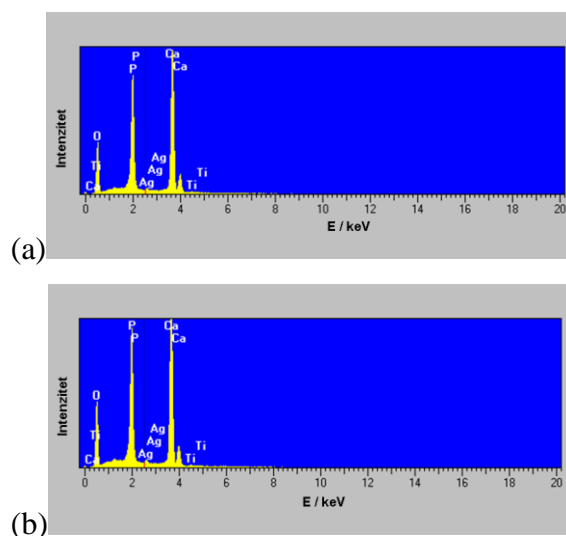


**Slika 30.** FE-SEM mikrofotografija nesinterovane Ag/HAP/Lig prevlake posle potapanja u SBF rastvor na (a) većem uvećanju od  $50\ 000\times$  i (b) manjem uvećanju od  $25\ 000\times$ .

Analiza EDS spektra Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka (slika 31) pokazuje dva jasna pika za Ca i P, kao i prisustvo pika za O i malih pikova za Ti i Ag. Pomoću EDS profilisanja prikazanog u tabeli 6, izračunato je da je atomski odnos Ca i P iznosi 1,64 i 1,62 za Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake, redom, što je blisko poznatom stehiometrijskom Ca/P odnosu od 1,67 u ljudskim kostima.

**Tabela 6.** Rezultati EDS analize elementarnog sastava površine nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka

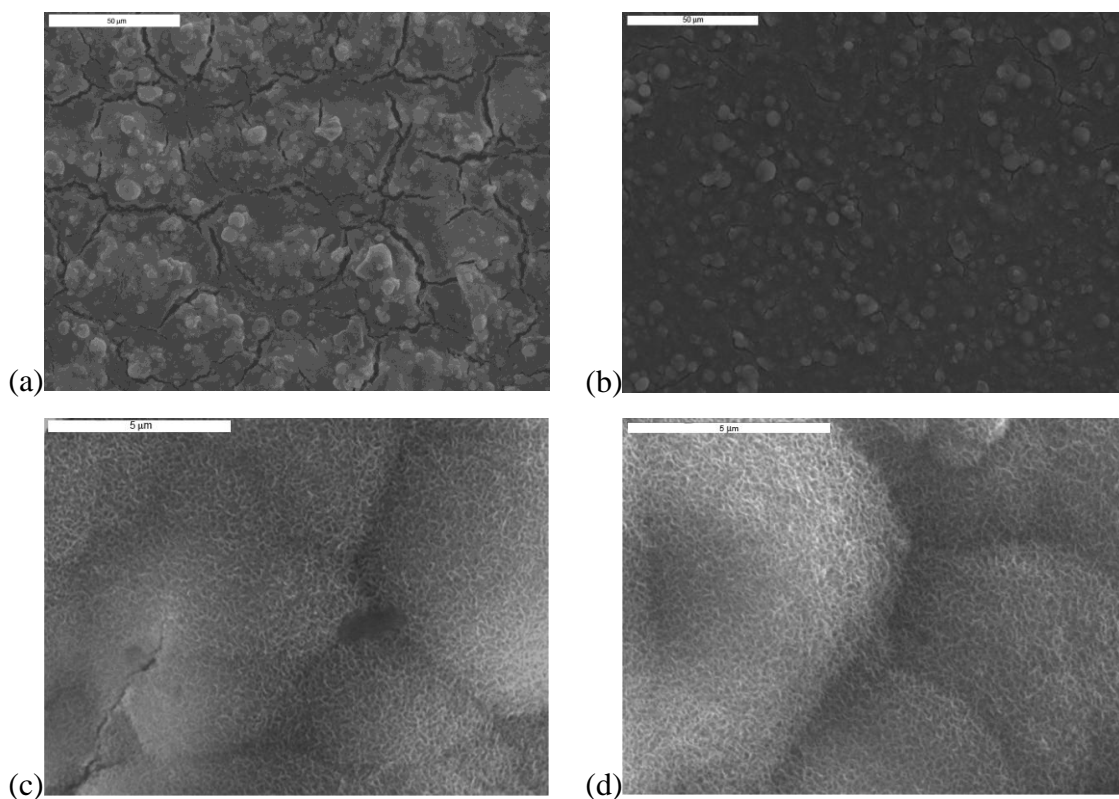
Element	Intenzitet	Atomski %	Intenzitet	Atomski %
	Ag/HAP		Ag/HAP/Lig	
O K	0,662	69,35	–	–
P K	1,405	11,53	1,486	37,94
Ca K	1,024	18,92	1,040	61,26
Ti K	0,803	0,11	0,803	0,5
Ag L	0,766	0,08	0,785	0,3
<b>Ca/P</b>	–	<b>1,64</b>	–	<b>1,62</b>



**Slika 31.** EDS profil površina nesinterovanih (a) Ag/HAP i (b) Ag/HAP/Lig prevlaka.

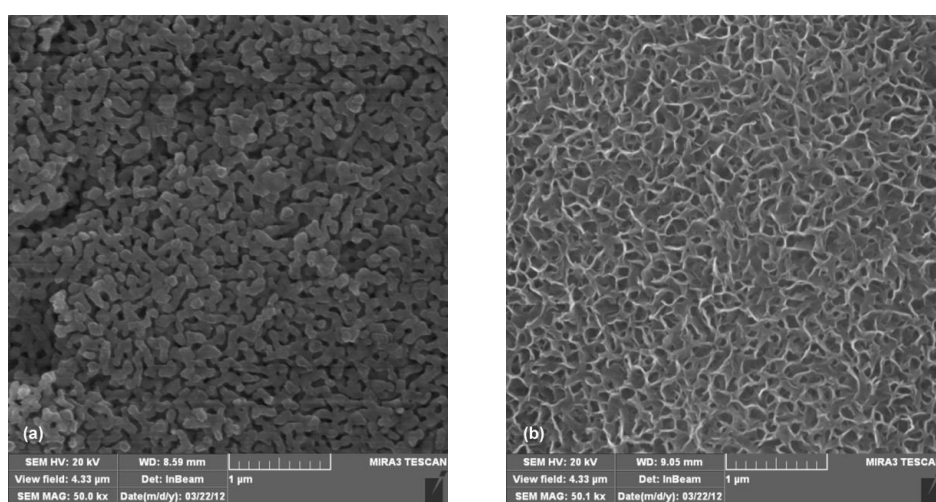
Morfologija površina sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka, pre i posle 7 dana potapanja u SBF rastvor na temperaturi od 37 °C prikazana je na slikama 32a–d, redom. Takođe, FE-SEM mikrofotografije Ag/HAP/Lig prevlake, pre i posle potapanja u SBF su prikazane na slici 33. Veličina kristalita Ag/HAP/Lig prevlake pre i posle potapanja se ne menja (20,8 i 22,0 nm), što potvrđuje homogenost površine (slika 32b i 32d). Nasuprot tome veličina kristalita Ag/HAP prevlake pre i posle potapanja u SBF je

izračunata i iznosi 35,2 i 20,2 nm, redom, što ukazuje na smanjenje veličine kristalita nakon potapanja i površinu sa pukotinama (slike 32a i 32c).



**Slika 32.** SEM mikrofotografije sinterovanih Ag/HAP prevlaka (a) pre i (c) posle potapanja i Ag/HAP/Lig prevlaka (b) pre i (d) posle potapanja u SBF rastvor na 37 °C.

FE-SEM mikrofotografije, prikazane na slici 33a, potvrđuju poroznu strukturu površine Ag/HAP/Lig prevlake, kao i da je veličina zrna 100 nm, dok je na slici 33b potvrđeno formiranje novog apatitnog sloja posle potapanja u SBF rastvor koji se sastoji od pločastih HAP kristala prikazanih pri velikom uvećanju (50 000×). Velika poroznost koja se uočava na ovoj mikrofotografiji doprinosi boljoj adheziji ćelija, koja omogućava bolju vezu implantata sa okolnim koštanim tkivom. U literaturi je poznato da povezana porozna struktura pospešuje urastanje okolnog koštanog tkiva obezbeđujući bolju biointegraciju i mehaničku stabilnost implantata [240].

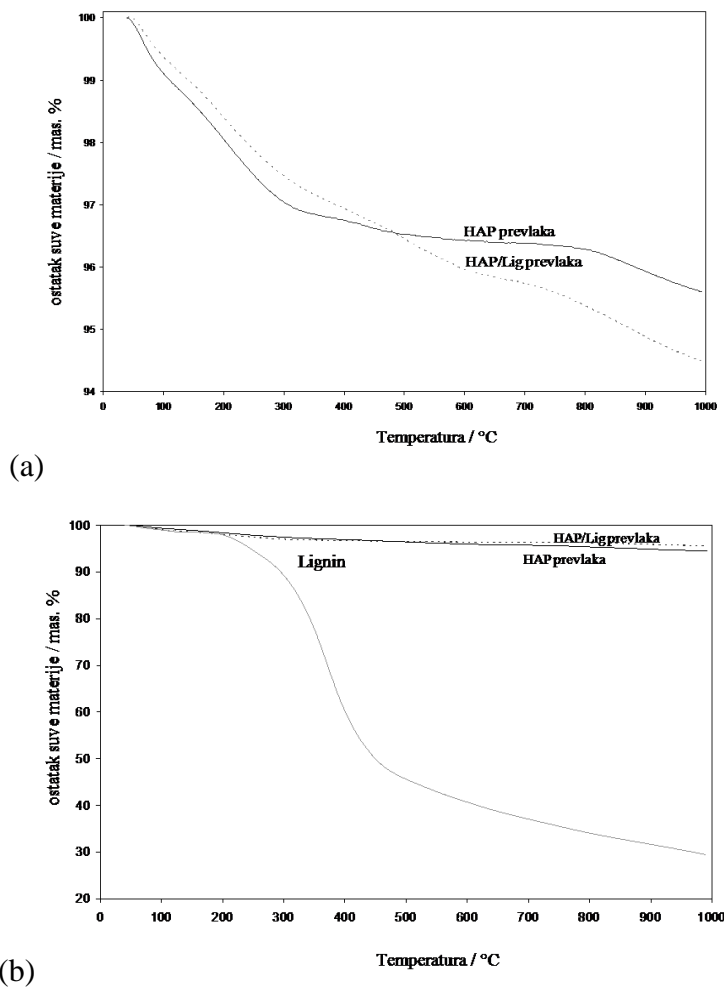


*Slika 33. FE-SEM mikrofotografije sinterovane Ag/HAP/Lig prevlake (a) pre i (b) posle potapanja u SBF rastvor na 37 °C.*

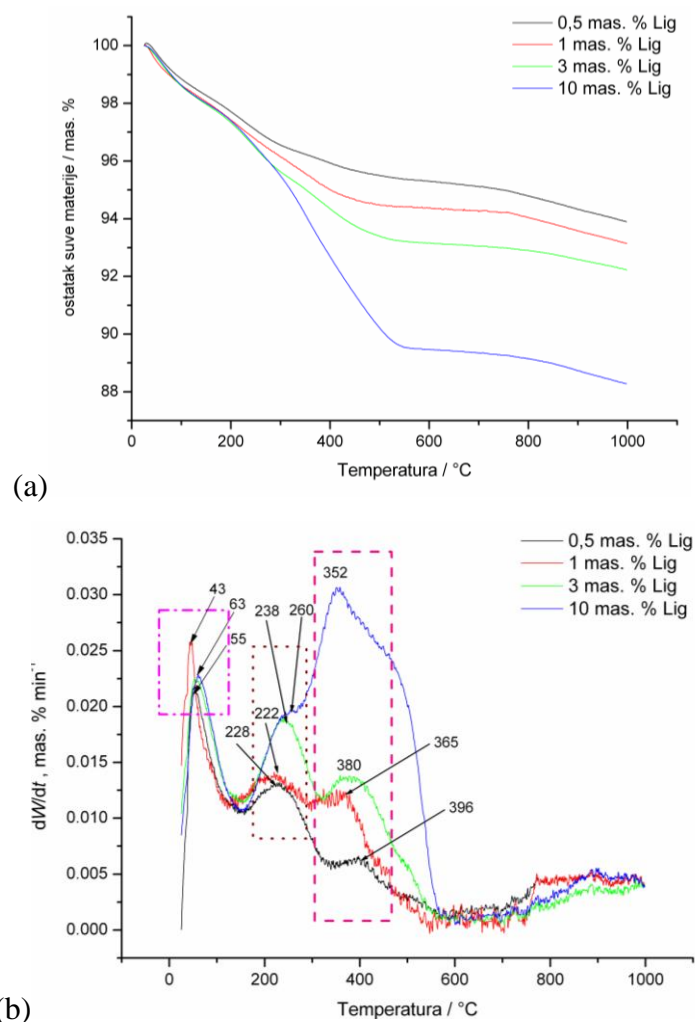
## 5.6. TGA analiza

Na slici 34 prikazane su termogravimetrijske krive (TG) Alcell praha lignina i nesinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka sa različitim koncentracijama lignina. Sa TG krive praha lignina uočava se da gubitak mase na 200 °C, koje se ipak se ne razlaže u potpunosti na maksimalnoj temperaturi sinterovanja. Na temperaturi sinterovanja od 900 °C ostaje oko 31,7 mas. % lignina [213]. U studiji Yang i saradnika [242] potvrđeno je da se samo 40 mas. % lignina gubi malom brzinom (manje od 0,15 mas. %/°C) u opsegu temperatura od temperature okoline do 700 °C (N<sub>2</sub> atmosfera). Na temperaturi višoj od 750 °C brzina gubitka mase se malo povećava do 0,3 mas. %/°C i ukupno 67 mas. % lignina se gubi na temperaturi 850 °C. Dobijeni rezultati su u skladu sa

literaturnim podacima. Na slici 34a TG kriva nesinterovane HAP prevlake na titanu pokazuje tri karakteristična stupnja gubitka mase u funkciji temperature: prvi, od 40 do 350 °C odnosi se na gubitak apsorbirane vode iz HAP prevlake, drugi, od 350 do 750 °C u kom se ne pojavljuje značajan gubitak mase, i treći od 750 do 1000 °C koji se može odnositi na dehidroksilaciju i razgradnju HAP. Ukupan gubitak mase na 1000 °C je 4,4 %.



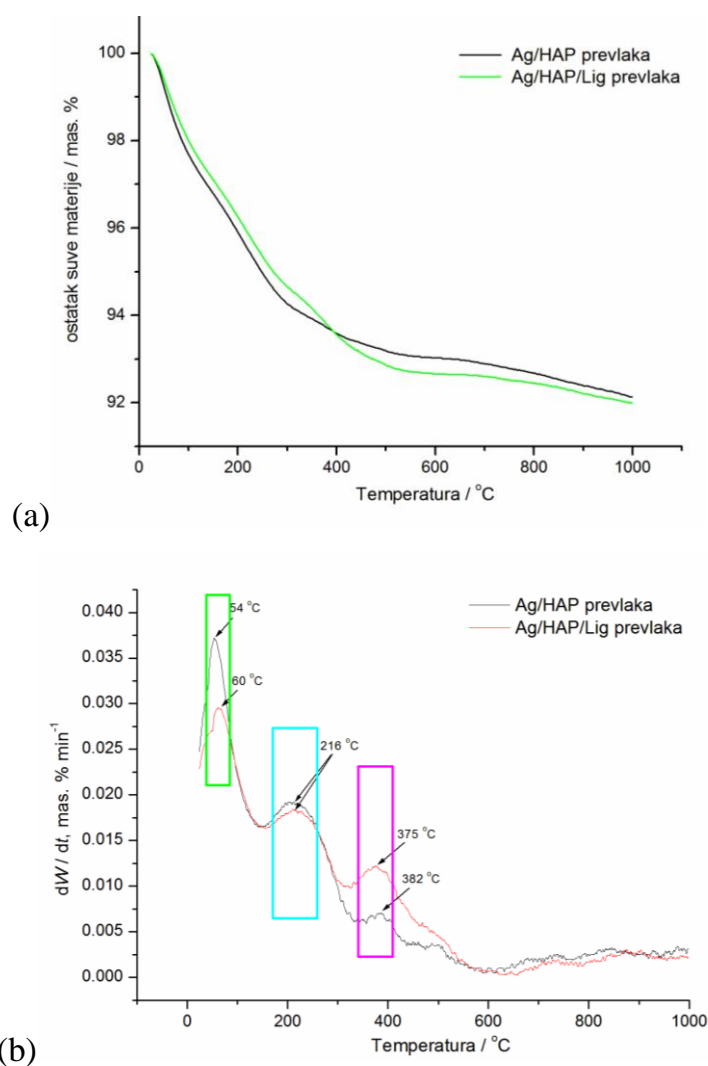
*Slika 34. TG krive (a) nesinterovanih HAP i HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka, i (b) praha lignina.*



**Slika 35.** (a) TG krive i (b) diferencijalne TG (DTG) krive nesinterovanih HAP/Lig prevlaka sa različitim koncentracijama lignina od 0,5 – 10 mas. % Lig.

TG krive nesinterovanih HAP/Lig prevlaka sa različitim koncentracijama lignina od 0,5 do 10 mas. %, dobijene su u rasponu temperatura od 25 – 1000 °C i prikazane su na slici 35. Ipak TG krive pokazuju kontinualan gubitak mase u tri stupnja, što se takođe vidi i sa TG kriva HAP/Lig prevlake sa 1 mas. % Lig na slici 34a. U prvom stupnju između od 25 do 200 °C gubitak mase se može pripisati gubitku apsorbirane vode na površini HAP/Lig prevlake, drugi stupanj od 200 do 600 °C odgovara termičkoj razgradnji lignina, dok se treći stupanj gubitka mase od 600 do 1000 °C može pripisati dehidroksilaciji i sporij razgradnji hidroksiapatita i preostalog lignina. Ukupan gubitak mase u rasponu temperatura od 25 – 1000 °C je 6; 6,9; 7,5 i 11,8 mas. % za HAP/Lig prevlake sa 0,5; 1; 3 i 10 mas. % Lig, redom. Ovaj rezultat sugerira da povećanje koncentracije lignina smanjuje termičku stabilnost HAP/Lig prevlaka [230].

U zavisnosti od kliničkih potreba, kristalni nanočestični hidroksiapatiti su korišćeni u raznim formama kao što je prah ili poseban materijal za dostavljanje lekova, ispunjavanje koštanih šupljina, oblaganje metalnih proteza, pomoćna konstrukcija kod presađivanja kostiju, sredstvo sa dostavljanje lekova ili razvijanje kompozitnih biomaterijala. Jedan od važnih faktora za ovu vrstu namene je termička stabilnost HAP u opsegu od 400 – 1200 °C. Iz tog razloga je vrlo važno proučiti ponašanje nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka skinutih sa pločica titana nakon taloženja i sušenja na vazduhu tokom 24 h. TG i DTG dijagrami (slika 36) pokazuju gubitak mase prevlaka pri povećanju temperature.



**Slika 36.** (a) TG i (b) DTG krive nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka.



Prema dijagramima TG analize postoje tri jasno vidljive faze gubitka mase na slikama 36a i 36b. Prva faza gubitka mase se može uočiti između 25 i 150 °C sa oštrim maksimumom na temperaturi od oko 55 °C na DTG dijagramu. Ova faza odgovara desorpciji vode apsorbirane na površini prevlaka. Druga faza gubitka mase je između 150 i 600 °C (slika 36a) sa oštrim pikovima na DTG krivoj između 215 i 380 °C (slika 36b) što se može pripisati dehidroksilaciji Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka. Po izveštajima Kalita i Verma [243] svi endotermni pikovi koji su povezani sa gubitkom mase na temperaturama nižim od 600 °C mogu doprineti desorpciji apsorbirane vode i mogućoj eliminaciji vode iz kristalne rešetke. Treća faza gubitka težine je uočena u TG dijagramu između 600 i 1000 °C (slika 36) bez izraženih pikova na DTG krivoj. Ova faza može biti pripisana dehidroksilaciji ili ranoj razgradnji hidroksiapatitne rešetke. Ukupni gubitak mase Ag/HAP prevlake na temperaturi od 25 – 1000 °C je iznosio 7,9 mas. %, dok je za Ag/HAP/Lig prevlaku 7,1 mas. %.

## 5.7. ATR-FTIR analiza

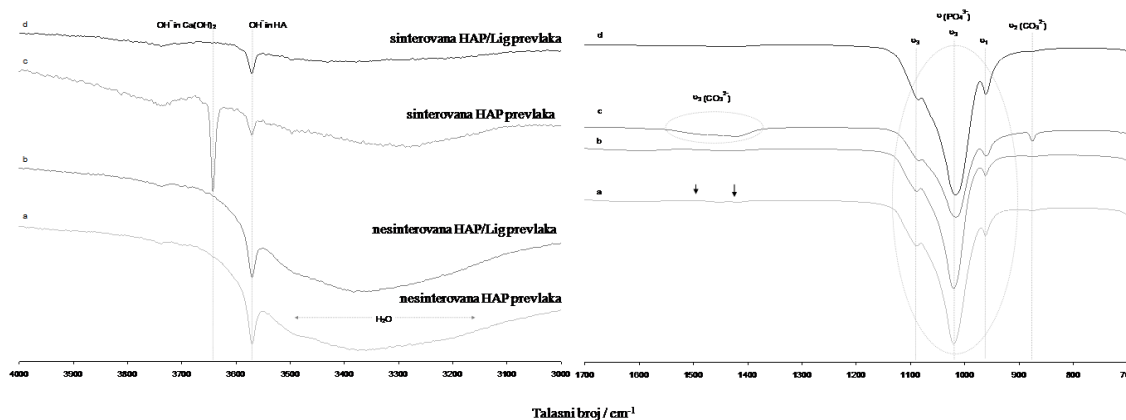
Infracrveni spektri HAP i HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka, pre i posle sinterovanja prikazani su na slici 37. ATR-FTIR spektri nesinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka sadrže apsorpcione trake karakteristične za čist hidroksiapatit [244,245]. Na slici 37 se mogu uočiti specifične apsorpcione trake za fosfatnu grupu na 960 ( $\nu_1$ ), 1018 ( $\nu_3$ ) i 1088  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ), a traka karakteristična za hidroksilne jone javlja se na 3570  $\text{cm}^{-1}$ . Traka zabeležena na oko 3375  $\text{cm}^{-1}$  odnosi se na apsorbiranu vodu. Čitav FTIR spektar ukazuje na odsustvo traka u rasponu od 1500 – 1400  $\text{cm}^{-1}$  koje su karakteristične za karbonate [245], što ukazuje da je prah hidroksiapatita samo čista HAP faza. FTIR spektar HAP/Lig prevlake pre sinterovanja (slika 37b) je jako sličan FTIR spektru HAP prevlake (slika 37a) s obzirom na funkcionalne grupe, što ukazuje da prisustvo lignina u sintezi HAP/Lig prevlake ne menja bitno strukturu hidroksiapatitne rešetke. Ipak, traka na 1018  $\text{cm}^{-1}$  (slika 37b) koja odgovara formiranju apatita postaje slabija nego što je traka kod HAP prevlake i time ukazuje na formiranje HAP/Lig kompozita.

Nakon sinterovanja uočene su promene u intenzitetu individualnih traka kod HAP i HAP/Lig prevlaka, dok su promene u obliku uočene samo kod HAP prevlake. Ove promene na karakterističnim trakama nakon sinterovanja ilustrovane su na slikama 37c i

37d. Smanjenje inteziteta karakteristične trake OH<sup>-</sup> grupe na 3572 cm<sup>-1</sup>, za HAP (slika 37c) i HAP/Lig prevlake (slika 37d) ukazuje da se tokom procesa sinterovanja odvija proces dehidroksilacije. Široka apsorpciona traka koja odgovara apsorbovanoj vodi nakon sinterovanja postaje ravna, naročito kod HAP/Lig prevlake (slika 37d). Međutim, samo kod HAP prevlake posle sinterovanja traka ν<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) na 1018 cm<sup>-1</sup> slabi (slika 37c) i uočava se pojava novih apsorpcionih traka. Nove apsorpcione trake u rasponu od 1500 – 1400 cm<sup>-1</sup> odgovaraju karbonatima (slika 37c), kao i apsorpciona traka na 873 cm<sup>-1</sup> koja takođe potvrđuje prisustvo CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> grupe (slika 37c). Nova traka na 3642 cm<sup>-1</sup> (slika 37c) odgovara OH<sup>-</sup> grupi u Ca(OH)<sub>2</sub>, koji se formira reagovanjem CaO sa atmosferskom vodom. Ovo ukazuje na prisustvo CaO koji se formira tokom sinterovanja prema sledećoj reakciji:

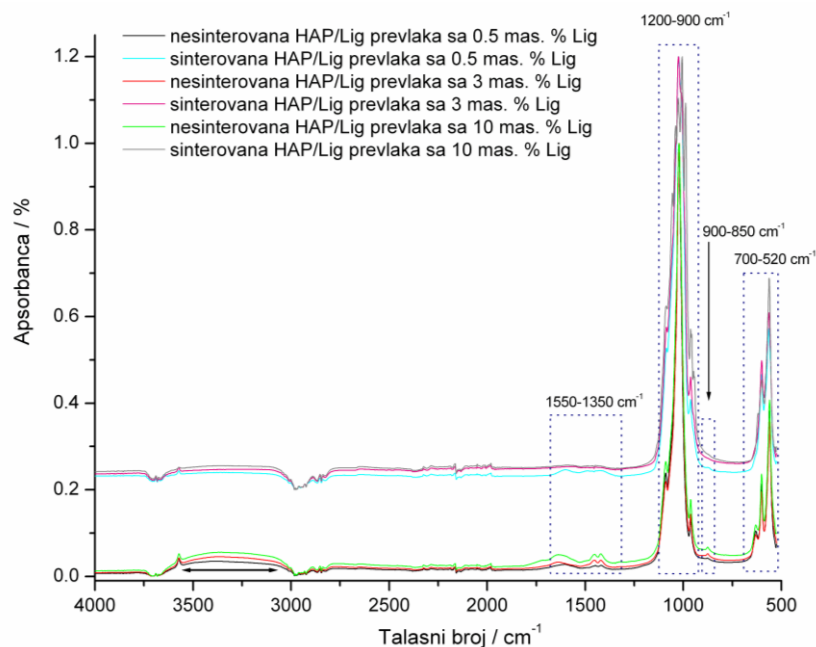


Jasno izražene trake karakteristične za karbonate, na 873 cm<sup>-1</sup> i u rasponu od 1500 – 1400 cm<sup>-1</sup>, kao i za Ca(OH)<sub>2</sub>, na 3642 cm<sup>-1</sup>, potvrđuju delimično razlaganje hidroksiapatita tokom sinterovanja. Takođe, zabeleženo je da jedna od predominantnih faza formirana tokom sinterovanja HAP na titanu jeste CaO [235]. Prisustvo karbonata, CaO i Ca(OH)<sub>2</sub> nakon sinterovanja HAP potvrđeno je pikovima koji odgovaraju navedenim fazama na difraktogramu sinterovane HAP prevlake (slika 37c). Ipak, ovo razlaganje hidroksiapatita tokom procesa sinterovanja se ne pojavljuje kod HAP/Lig prevlake, što se potvrđuje izostankom traka karakterističnih za karbonate, CaO i Ca(OH)<sub>2</sub> na FTIR spektru sinterovane HAP/Lig prevlake (slike 37d). Isto tako, izostanak pikova koji odgovaraju pomenutim fazama na difraktogramu sinterovane HAP/Lig prevlake pokazuju da nema razgradnje HAP tokom sinterovanja (slika 37d). Ovo potvrđuje da lignin štiti HAP/Lig prevlaku vezujući se za hidroksilne grupe HAP rešetke, i stoga sprečava razlaganje hidroksiapatita tokom sinterovanja [213].



**Slika 37.** ATR-FTIR spektri u opsegu od 4000-3000 i 1700-700  $\text{cm}^{-1}$ : (a) nesinterovane HAP, (b) nesinterovane HAP/Lig, (c) sinterovane HAP i (d) sinterovane HAP/Lig prevlaka, na titanu.

Na slici 38 su prikazani ATR-FTIR spektri HAP/Lig prevlaka sa 0,5; 3 i 10 mas. % Lig, pre i posle sinterovanja. Može se uočiti da se na FTIR spektrima nesinterovanih HAP/Lig prevlaka javljaju apsorpcione trake u oblasti 3000 – 3700  $\text{cm}^{-1}$  koje se pripisuju apsorbovanoj vodi. Spektri nesinterovanih HAP/Lig prevlaka su detaljnije prikazani u određenim insertima FTIR spektara na slikama 39a–d. Sa slike 39b se može uočiti da FTIR spektri sadrže trake karakteristične za fosfatnu grupu, 900 – 1100  $\text{cm}^{-1}$ , traka na 960  $\text{cm}^{-1}$  prisuje se  $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ , dok se trake na 1030 i 1090  $\text{cm}^{-1}$ , pripisuju  $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ . Takođe, trake na 560 i 600  $\text{cm}^{-1}$  (slika 39d) se pripisuju  $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ , i karakteristična traka na 630  $\text{cm}^{-1}$  odgovara vibraciji  $\text{OH}^-$  grupe [109]. Slaba traka između 870 i 885  $\text{cm}^{-1}$  može se pripisati deformacionim vibracijama C–H veza u aromatskim prstenovima (slika 39c), što potvrđuje prisustvo lignina. Ova činjenica ukazuje da lignin u HAP/Lig prevlaci ne menja strukturu rešetke. Detektovane trake na 1420 i 1450  $\text{cm}^{-1}$  se pripisuju metoksilnim grupama lignina i prikazane su na slici 39a [242]. Prema literaturi trake karakteristične za vibracije istezanja C–H veze su prisutne na 2939, 2881, 1460 i 1425  $\text{cm}^{-1}$ . Lignin ima veliki broj fenolnih hidroksilnih grupa, koje imaju veliki afinitet stvaranja vodoničnih veza sa karbonilnim grupama; formiranje ovih veza generiše očigledno pomeranje traka prema nižim talasnim brojevima. Ovo pomeranje traka odgovara nastajanju intermolekularnih vodoničnih veza između lignina i hidroksiapatita [246].



**Slika 38.** ATR-FTIR spektri u opsegu od  $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  nesinterovanih i sinterovanih HAP/Lig prevlaka sa 0,5; 3 i 10 mas. % Lig.

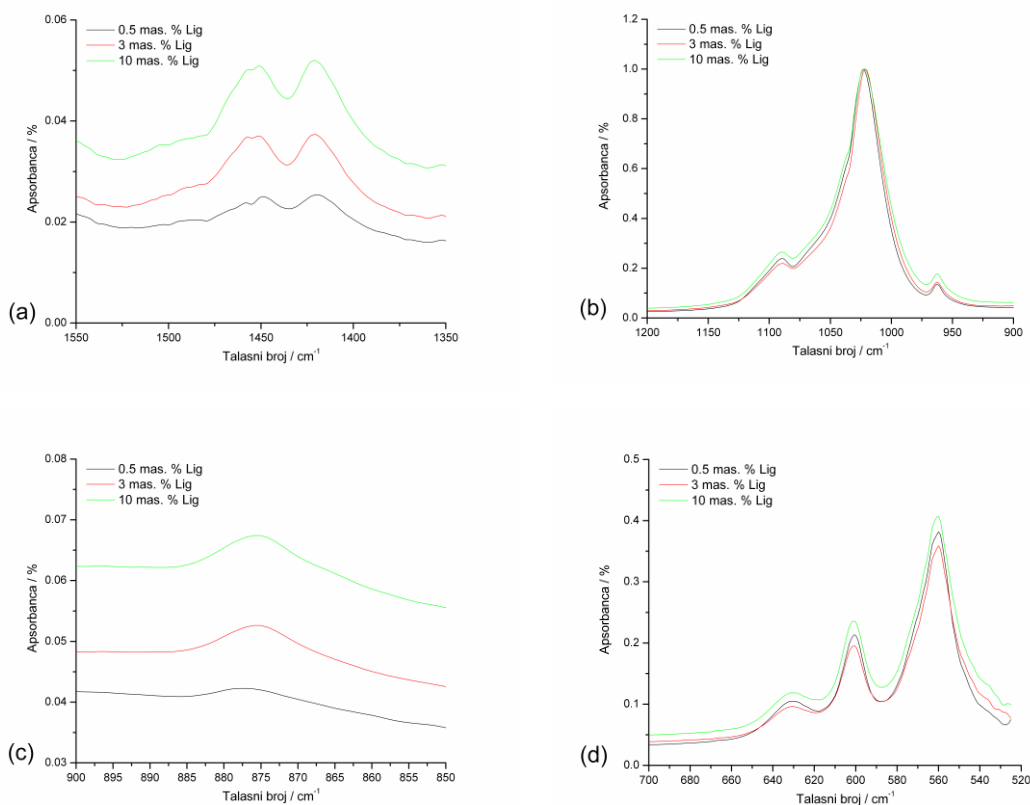
Apsorpciona traka na  $630\text{ cm}^{-1}$  je pripisana valencionoj vibraciji  $\text{OH}^-$  grupe iz HAP i pojavljuje se na nižim talasnim brojevima od očekivanog ( $650\text{ cm}^{-1}$ ) [246], potvrđujući time da ove grupe učestvuju u intermolekularnim vodoničnim vezama između HAP i Lig. Prema literaturi, apsorpciona traka se pojavljuje na  $1101\text{ cm}^{-1}$  zbog vibracije istezanja P–O veza fosforne grupe. Stoga, može se pretpostaviti da su uspostavljene intermolekularne vodonične veze ( $\text{P-O}\cdots\text{OH}$ ) između  $\text{OH}^-$  grupe iz lignina i  $\text{PO}_4^{3-}$  iz HAP zbog pomeranja trake na  $1090\text{ cm}^{-1}$  (slika 38b), što se može videti na našem prethodno predloženom modelu prikazanom na slici 28.

Razgradnja lignina tokom sinterovanja uključuje fragmentaciju unutrašnjih vodoničnih veza između fenolnih hidroksilnih i benzil i alkoholnih hidroksilnih grupa, oslobađajući monomerne cimetne alkohole u gasnoj fazi, ali ostaju nerastvorne frakcije sa visoko kondenznom aromatičnom strukturom [109].

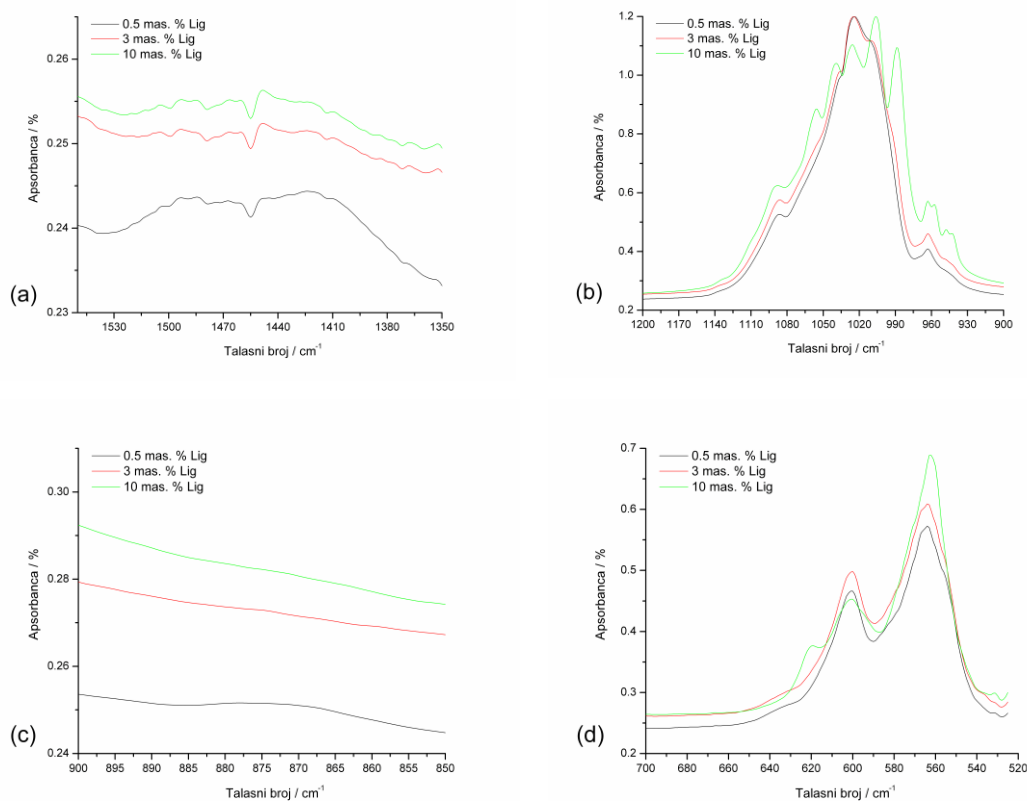
Nakon sinterovanja mogu se uočiti razlike u obliku spektra u rasponima od  $1350\text{-}1550$  i  $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  između nesinterovanih (slike 39a i c) i sinterovanih HAP/Lig (slike 40a i c) prevlaka. Na slici 40 intenzitet apsorpcionih traka na  $1410$  i  $1460\text{ cm}^{-1}$  se smanjuje, ali se ne primećuje pomeranje traka. Slabe karbonatne trake u

opsegu od  $865 - 880 \text{ cm}^{-1}$  su primećene samo kod sinterovane HAP/Lig prevlake sa 0,5 mas. % Lig (slika 39c), što potvrđuje dekompoziciju HAP tokom sinterovanja.

Poređenjem ATR-FTIR rezultata svih HAP/Lig prevlaka sa različitim koncentracijama lignina, može se zaključiti da se razgradnja HAP tokom sinterovanja ne može uočiti za koncentracije lignina veće od 0,5 mas. %. Drugim rečima  $c(\text{Lig}) > 0,5$  sprečava difuziju fosfornih jona na površinu Ti zbog uspostavljenih vodoničnih veza. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima XRD analize.



**Slika 39.** ATR-FTIR spektri u opsegu od: (a)  $1550-1350 \text{ cm}^{-1}$ , (b)  $1200-900 \text{ cm}^{-1}$ , (c)  $900-850 \text{ cm}^{-1}$  i (d)  $700-520 \text{ cm}^{-1}$  nesinterovanih HAP/Lig prevlaka sa 0,5; 3 i 10 mas. % Lig.



**Slika 40.** ATR-FTIR spektri u opsegu od: (a)  $1550-1350\text{ cm}^{-1}$ , (b)  $1200-900\text{ cm}^{-1}$ , (c)  $900-850\text{ cm}^{-1}$  i (d)  $700-520\text{ cm}^{-1}$  sinterovanih HAP/Lig prevlaka sa 0,5; 3 i 10 mas. % Lig.

Bioaktivnost biokeramičkih materijala za implantate se može proceniti formiranjem novog biološkog apatitnog sloja na njihovoj površini koji je po svojoj strukturi sličan koštanom tkivu. Prisustvo karbonatnih traka u FTIR spektru je jasan dokaz njihovog ugrađivanja u strukturu hidroksiapatita. Poznato je da biološki hidroksiapatiti takođe sadrže karbonatne grupe [247], stoga su nesinterovane kao i sinterovane Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake ispitane ATR-FTIR analizom posle potapanja u SBF rastvor, a mogu se smatrati biološki aktivnim ako se pronađu tragovi karbonata [248].

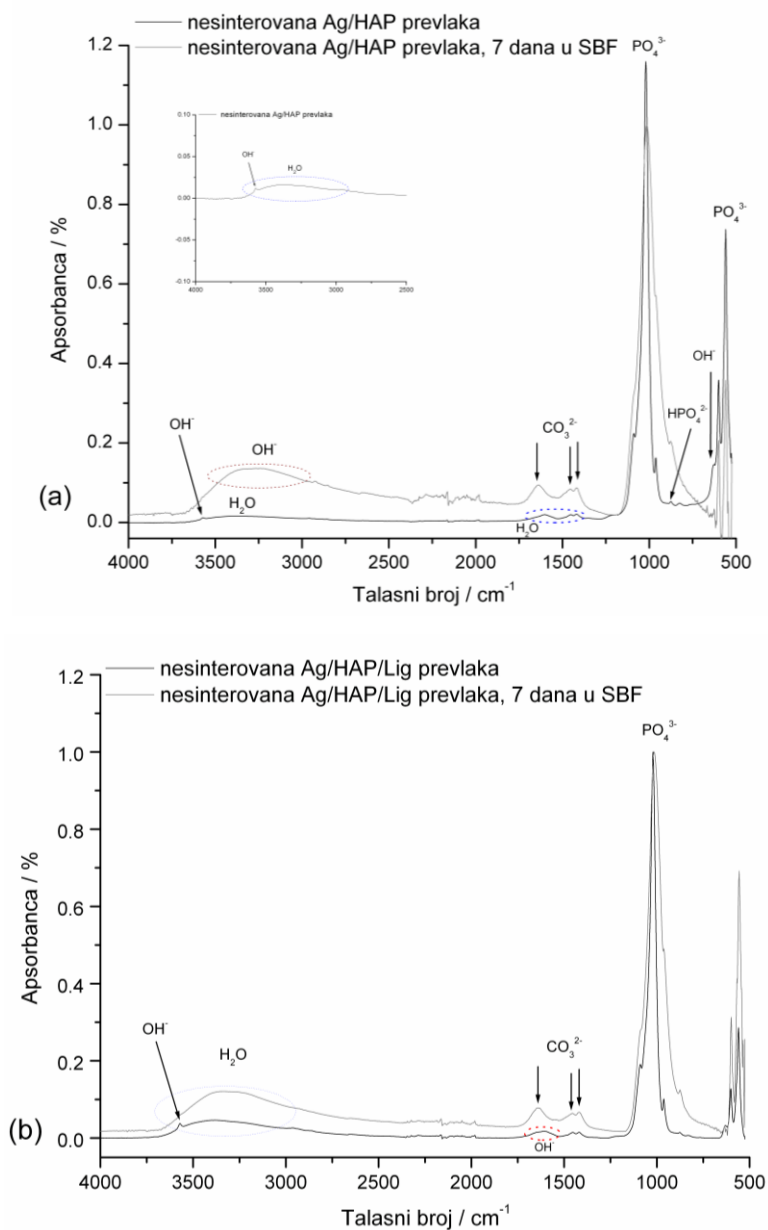
ATR-FTIR spektroskopska analiza nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu, kako pre tako i posle stajanja u SBF rastvoru, je prikazana na slici 41. Karakteristične apsorpcione trake tipične za hidroksiapatit se mogu videti na FTIR spektru Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake pre potapanja u SBF kao što je opisano i u

literaturi [249]. Kao što je prikazano, sve karakteristične trake su tipične za hidroksiapatit, npr. široke apsorpcione trake na  $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  i vibracije savijanja na  $1613 \text{ cm}^{-1}$  se odnose na O–H pružanje i savijanje  $\text{H}_2\text{O}$  u spektru Ag/HAP prevlaka [250]. Izdužene vibracije  $\text{OH}^-$  su primećene na  $3572 \text{ cm}^{-1}$ . Najintenzivnija apsorpciona traka u oblasti od  $1216-920 \text{ cm}^{-1}$  se pripisuje P–O asimetričnom stanju istežanja vibracija ( $\nu_3$ )  $\text{PO}_4^{3-}$  grupe [250,251]. Drugi snažni pikovi na FTIR spektru se nalaze na  $635-500 \text{ cm}^{-1}$  i nastali su iz trostrukih ( $\nu_4$ ) deformacionih tj. savijajućih vibracija fosfatnih O–P–O veza [235], osim jedne trake slabih karakteristika na  $636 \text{ cm}^{-1}$  koja odgovara vibracijama O–H grupa u hidroksiapatitima. Mala oštra traka na  $876 \text{ cm}^{-1}$  se pripisuje prisustvu grupe  $\text{HPO}_4^{2-}$  u kristalnoj rešetci. Po literaturi, napredak kristalizacije hidroksiapatita se može posmatrati kroz transformaciju jedne apsorpcione trake u  $\nu_4$  regionu  $\text{PO}_4^{3-}$  grupe u duplet traku [235]. Iz literature je poznato da nanočestice hidroksiapatita usled svoje veličine imaju veliku površinu što omogućava homogenu resorpciju od strane osteoklasta [250].

Prisustvo biopolimera lignina u Ag/HAP/Lig prevlaci zapaža se kroz pojavu traka na  $1420$  i  $1448 \text{ cm}^{-1}$  karakterističnih za metoksilnu grupu [252]. Prisustvo polimera se može uočiti kroz slabu traku na  $875 \text{ cm}^{-1}$  iz valencione vibracije C–H veze u aromatičnim prstenovima [253]. Sposobnost lignina da formira intermolekularne vodonične veze je dokumentovana u literaturi i naši rezultati to potvrđuju pomeranjem traka na FTIR spektru [254,255]. Intermolekularne vodonične veze između HAP i Lig su potvrđene trakom na  $635 \text{ cm}^{-1}$  za vibraciju  $\text{OH}^-$  veze u HAP rešetci (slika 41b) [246]. Takođe, nastajanje intermolekularnih vodoničnih veza između  $\text{OH}^-$  grupa iz lignina i  $\text{PO}_4^{3-}$  grupa iz HAP se može pretpostaviti pojavom apsorpcione trake na  $1101 \text{ cm}^{-1}$  zbog vibracije istežanja P–O veze [256].

Za ispitivanje površine Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake posle 7 dana potapanja u SBF korišćena je ATR-FTIR analiza koja se već pokazala kao efikasan i osetljiv metod za određivanje malih količina karbonata [257]. FTIR spektri Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake posle 7 dana potapanja u SBF rastvor, prikazani su kao sive linije na slici 41, imaju široku apsorpcionu traku na  $3380 \text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje vibraciji istežanja  $\text{OH}^-$  grupe. Ova traka ima veći intezitet u odnosu na intezitet te iste trake pre potapanja u SBF rastvor što ukazuje na formiranje novog apatitnog sloja sličnog koštanom tkivu na površini prevlake [241]. Uočene apsorpcione trake na  $1642$ ,  $1460$  i

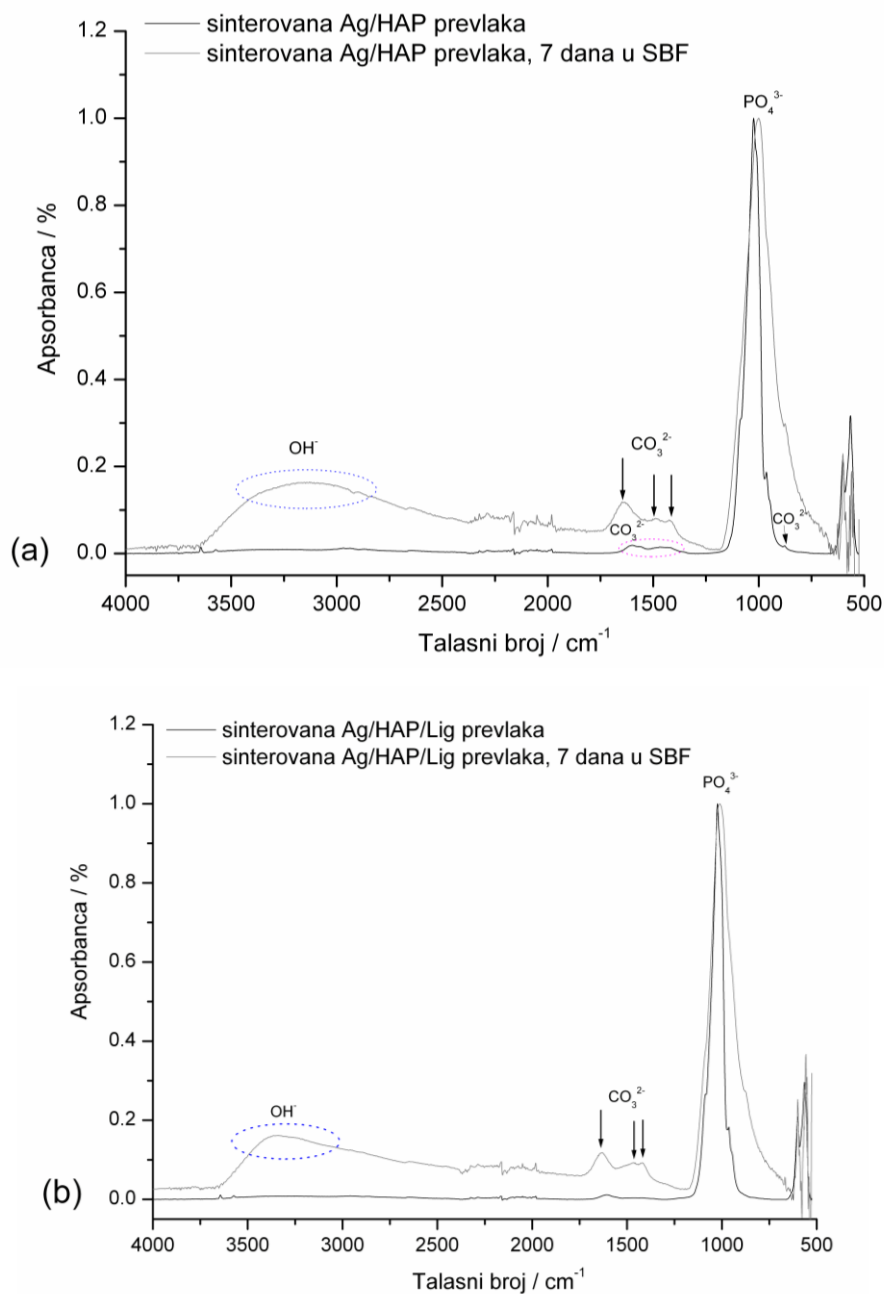
1424  $\text{cm}^{-1}$  koje se pripisuju valencionim vibracijama  $\text{CO}_3^{2-}$  grupe su još jedna potvrda prisustva biološkog apatita. Prema literaturi karbonatni apatit B-tipa se pojavljuje na površini posle potapanja u SBF rastvor [251]. Stoga, bioaktivnost Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka je potvrđena ovim rezultatima i njihova površina predstavlja pogodnu sredinu za nukleaciju apatita što se potvrđuje SEM i FE-SEM mikrofotografijama (slike 29 i 30, redom).



**Slika 41.** ATR-FTIR spektri u opsegu od 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  nesinterovanih (a) Ag/HAP i (b) Ag/HAP/Lig prevlaka, pre i posle 7 dana potapanja u SBF na 37 °C (insert za Ag/HAP prevlaku: u opsegu od 2500-4000  $\text{cm}^{-1}$ ).



FTIR spektri sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka su prikazani na slici 42, sa koje se može uočiti da spektri pre potapanja u SBF imaju karakteristične apsorpcione trake za hidroksiapatit. Jedina razlika koja se uočava u slučaju Ag/HAP prevlake (slika 42a) je široka apsorpciona traka malog inteziteta na oko  $1400\text{--}1585\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara prisustvu karbonatne grupe [247]. Pojava apsorpcione trake na  $875\text{ cm}^{-1}$  takođe ukazuje na prisustvo karbonata u tragovima što dodatno potvrđuje delimičnu razgradnju Ag/HAP prevlake prilikom sinterovanja. Mada karbonati nisu detektovani XRD analizom (slika 21b), nastanak ovih traka se može objasniti reakcijom između CaO (slika 21b) i  $\text{CO}_2$  iz atmosfere [235] što dovodi do stvaranja  $\text{CaCO}_3$ . S druge strane odsustvo karbonatnih traka na FTIR spektru Ag/HAP/Lig prevlake, na slici 42b, pre potapanja u SBF rastvor potvrđuje da nije došlo do razgradnje hidroksiapatita, što je takođe potvrđeno XRD analizom (slika 22b).



**Slika 42.** ATR-FTIR spektri u opsegu od  $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  sinterovanih (a) Ag/HAP i (b) Ag/HAP/Lig prevlaka, pre i posle 7 dana potapanja u SBF na  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

Nakon 7 dana potapanja u SBF rastvor karbonatni apatitni sloj se formira na površini prevlaka, što je potvrđeno ATR-FTIR analizom i prikazano sivim linijama na slici 42. Pojava široke apsorpcione trake na  $3382\text{ cm}^{-1}$  pripisana je vibraciji istezanja  $\text{OH}^-$  grupe i primećeno je da je intezitet ove trake veći za prevlake nakon potapanja, pokazujući formiranje apatitnog sloja sličnog koštanom tkivu, na površini prevlake

[241]. Takođe dodatna potvrda je pojava tripleta karbonatnih aporpcionih traka na 1640, 1476 i 1420  $\text{cm}^{-1}$  koje odgovaraju valencionim vibracijama  $\text{CO}_3^{2-}$  grupa B-tip karbonatnog hidroksiapatita nastalog nakon potapanja u SBF rastvor [251]. FTIR spektar apatita sličnog koštanom tkivu pokazuje visoku koncentraciju hidroksilnih i fosfatnih grupa u poređenju sa FTIR spektrima prevlaka pre potapanja u SBF (slika 42), što znači da površina prevlaka ima negativan površinski potencijal potreban za stvaranje apatita. Stoga, ovi rezultati pokazuju bioaktivnost obe prevlake i da njihove površine predstavljaju pogodne supstrate za stvaranje apatita, što je potvrđeno SEM i FE-SEM slikama (slike 32 i 33, redom). Zaključak naših istraživanja je da rast sloja apatita podseća na strukturu biološkog karbonatnog HAP.

## 5.8. XPS analiza

Kvalitativnom analizom XPS spektara HAP i HAP/Lig prevlaka sa različitim koncentracijama lignina od 0,5 – 10 mas. %, uočene su razlike između nesinterovanih i sinterovanih prevlaka i dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 7.

Sve prevlake sadrže C 1s čak i HAP prevlaka koja ne bi trebalo da sadrži organski materijal. Ovo se dešava zbog organskog zagađenja iz okoline (adventivni ugljenik) na površini supstrata. Dobro je poznato da je zagađenje često ugrađeno u sintetički kalcijum-fosfat zbog prisustva  $\text{CO}_2$  u vazduhu ili rastvoru. Ipak, sadržaj ugljenika u nesinterovanim HAP/Lig prevlakama je veći nego onaj u nesinterovanoj HAP prevlaci. Može se uočiti da se sadržaj C 1s u nesinterovanim HAP/Lig prevlakama povećava sa povećanjem koncentracije lignina, što potvrđuje vezivanje lignina sa HAP rešetkom kao što je zaključeno u rezultatima drugih metoda karakterizacije. S druge strane, porast sadržaja ugljenika sinterovane HAP prevlake i HAP/Lig prevlake sa 0,5 mas. % Lig (Tabela 7), koji se može objasniti prisustvom  $\text{CaCO}_3$  nastalog reakcijom CaO dobijenog tokom razgradnje HAP rešetke sa atmosferskim  $\text{CO}_2$ . Prisustvo formiranog CaO i nastalog  $\text{CaCO}_3$  je takođe potvrđeno karakterističnim pikovima na difraktogramima (slike 16b i 17b) i trakama na ATR-FTIR spektrima (slike 37c i 40c), što dokazuje delimičnu razgradnju HAP rešetke tokom sinterovanja. Mali porast sadržaja ugljenika sinterovanih HAP/Lig prevlaka sa 1 i 3 mas. % Lig u odnosu na nesinterovane prevlake (Tabela 7) ukazuje na odsustvo dekompozicije hidroksiapatita tokom sinterovanja, što znači da lignin ograničava formiranje CaO. Smanjenje sadržaja

C 1s sinterovane HAP/Lig prevlake sa 10 mas. % Lig ukazuje na najveći gubitak mase lignina, što se potvrdilo TG analizom (slika 35). Izostanak pikova na difraktogramima (slike 18b–20b) i traka na ATR-FTIR spektrima (slike 37d i 40c) sinterovanih HAP/Lig prevlaka sa 1, 3 i 10 mas. % Lig koje odgovaraju prisustvu karbonata, CaO i Ca(OH)<sub>2</sub>, je takođe potvrda da nema razgradnje hidroksiapatita.

*Tabela 7. Hemijska analiza rezultata XPS merenja*

<b>HAP/Lig (mas. % Lig)</b>		<b>Ca</b>	<b>P</b>	<b>O</b>	<b>C</b>	<b>Ca/P</b>
<b>HAP</b>	nesinterovana	19,4	11,3	60,6	7,2	1,72
	sinterovana	16,5	5,5	54,3	21,7	3,00
<b>0,5</b>	nesinterovana	19,1	11,3	58,3	8,2	1,69
	sinterovana	18,4	7,9	56,4	15,9	2,33
<b>1</b>	nesinterovana	19,3	10,8	57,4	10,5	1,79
	sinterovana	18,7	8,9	58,9	11,3	2,10
<b>3</b>	nesinterovana	18,4	12,0	55,5	11,7	1,53
	sinterovana	18,8	10,8	55,2	12,9	1,74
<b>10</b>	nesinterovana	15,8	10,3	51,1	21,3	1,53
	sinterovana	17,1	9,6	52,2	18,9	1,78

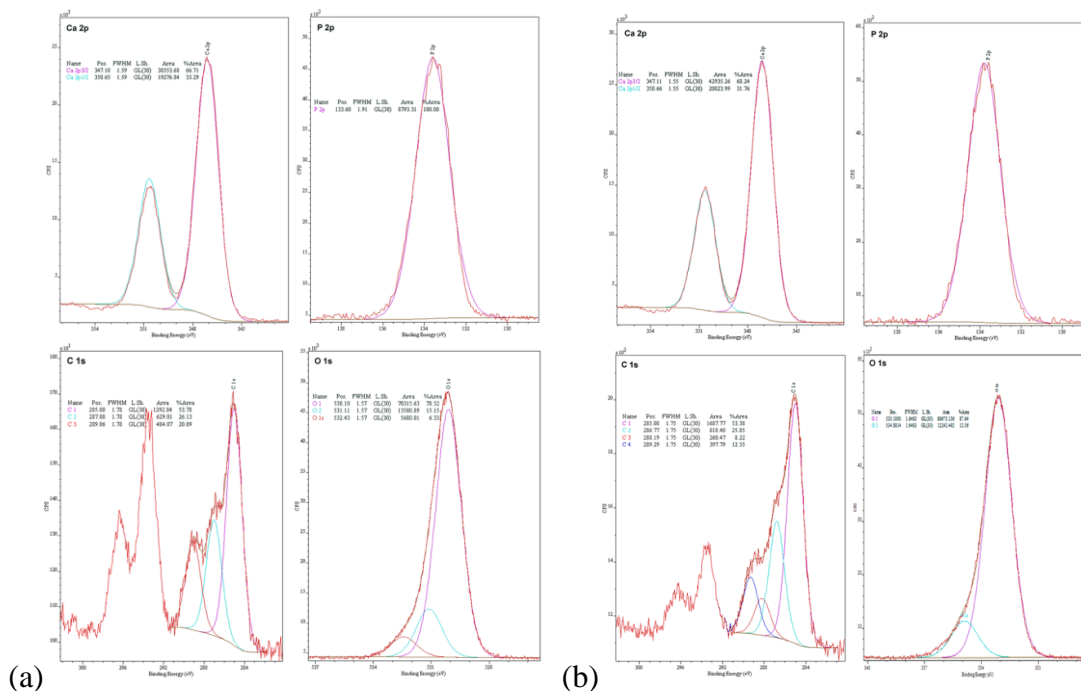
Rezultati XPS merenja pokazuju da kod nesinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka Ca/P odnos je u opsegu vrednosti od 1,53 – 1,69 sličan stehiometrijskom hidroksiapatitu (Ca/P = 1,67). Iako idealni Ca/P odnos stehiometrijskog HAP treba da bude 1,67 potvrđeno je da stabilne HAP faze postoje u rasponu između 1,3 – 1,8 [246]. Posle sinterovanja Ca/P odnos za sinterovane HAP/Lig prevlake raste u odnosu na vrednosti nesinterovanih HAP/Lig prevlaka (Tabela 7). Najviše povećanje Ca/P odnosa na 3,00 sinterovane HAP prevlake i 2,10 sinterovane HAP/Lig prevlake (0,5 mas. % Lig) se može objasniti difuzijom jona fosfora, što ima za posledicu delimičnu razgradnju hidroksiapatita i prisustvo novog TiP pika na difraktogramima (slike 16b i 17b). Može se zaključiti da lignin sprečava razgradnju HAP rešetke tokom sinterovanja u slučaju HAP/Lig prevlaka sa 1 – 10 mas. % Lig na šta ukazuje mala promena sadržaja ugljenika i Ca/P odnosa, što je prikazano u tabeli 7 [230]. Dakle može

se zaključiti da koncentracija lignina veća od 0,5 mas. % štiti rešetku hidroksiapatita, što je takođe prethodno potvrđeno XRD i ATR-FTIR rezultatima.

Analiza površina nesinterovanih i sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka, pre i posle potapanja u SBF rastvor, ispitana je pomoću XPS merenja koja su prikazana na slikama 43 i 44, redom.

Posmatrani pregledni spektri (0–1400 eV) i spektri visoke rezolucije C 1s, O 1s, P 2p, Ca 2p i Ti 2p elemenata su prikazani na slikama 43 i 44, dok se Ag nije moglo detektovati. XPS je veoma osetljiva tehnika, ali se primenjuje samo na ispitivanje površinskog sloja prevlake. Prisustvo srebra je dokazano analizom i poređenjem XRD difraktograma HAP i Ag/HAP prevlake, pre potapanja u SBF (slike 16a i 21a, redom).

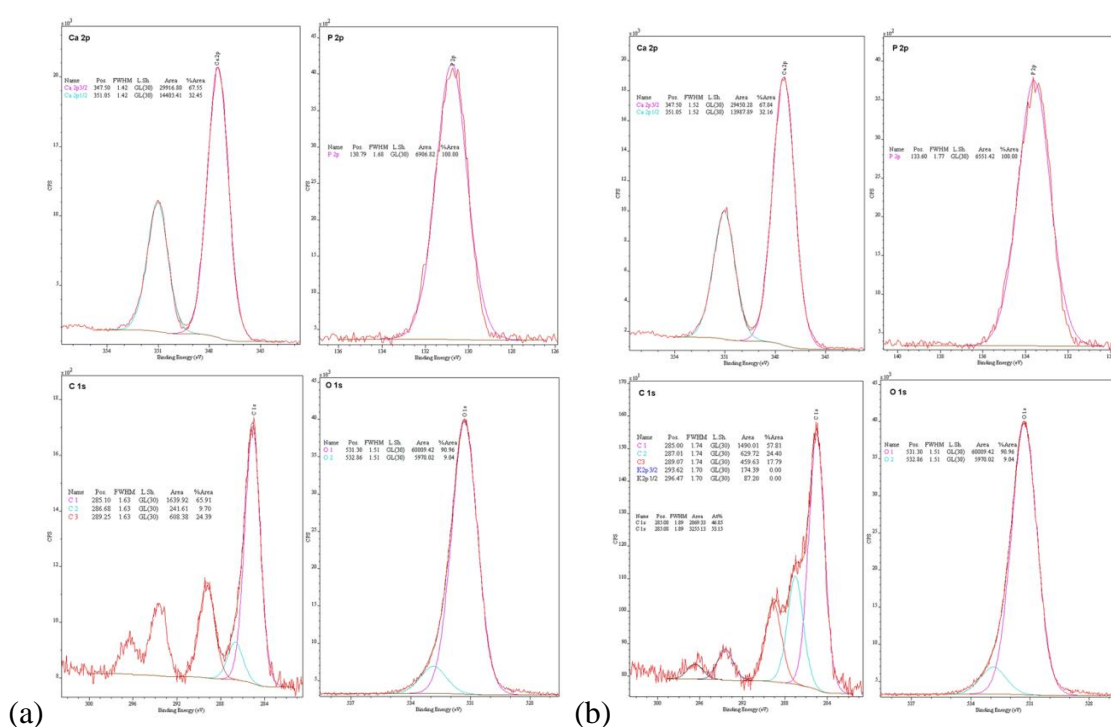
Površinska analiza nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka pre potapanja u SBF je prikazana na slici 43, kao dekonvolucija spektra visoke rezolucije odgovarajućih karakterističnih elemenata za hidroksiapatit. Vrednosti izmerene energije vezivanja (BE) su kalibrisane pomoću C1s (ugljovodonicima C–C, C–H) na 285 eV, a rezultati hemijske analize su predstavljeni u tabeli 8. Prisustvo hidroksiapatita u Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlakama (slika 43) se identifikuje kroz duplet Ca 2p spektra kao Ca 2p 3/2 (BE = 347,1 eV) i Ca 2p 1/2 (BE = 350,6 eV) pikovi i P 2p spektra koji ima jedinstveni pik P 2p 3/2 na 133,6 eV [258, 259]. S druge strane srebro se nije moglo detektovati zbog veoma male količine dopanta. Elementi C 1s posle dekonvolucije, slika 43, imaju četiri komponente sa pikovima na pozicijama 285 eV; 286,7 eV; 288,2 eV i 289,3 eV što odgovara aromatičnim ugljovodonicima, alkoksi i RCOO<sup>-</sup> grupama, redom [260]. Prisustvo polimera lignina je sugerisano pojavom novog pika na 289,3 eV (C=O veze) uzimajući u obzir C 1s liniju [261]. Poznato je da se mehanizam međusobnog delovanja vodoničnog vezivanja može otkriti XPS analizom. Vodonično vezivanje između C=O i –OH grupa pokazuje da se energija vezivanja O 1s od C=O grupe povećava, dok se istovremeno energija vezivanja O 1s –OH grupe smanjuje. Signal O 1s na 533,1 eV (slika 43) se može pripisati PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> grupama, dok na 532,4 eV odgovara hidroksiapatitnim –OH grupama [261,262]. Stoga, linije O 1s su na većim energijama vezivanja nego što su kod O 1s za PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> grupe što ukazuje na vodonično vezivanje između lignina i HAP rešetke.



**Slika 43.** Dekonvolucija Ca 2p, P 2p, C 1s i O 1s spektara visoke rezolucije nesinterovanih (a) Ag/HAP i (b) Ag/HAP/Lig prevlaka.

Površinska analiza sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka pre potapanja u SBF je prikazana na slici 44. Energija vezivanja je izmerena u vrednostima kalibrisanim na C 1s (C–C, C–H) na 285 eV. Rezultati dobijeni iz dekonvolucionih XPS spektara za C 1s, O 1s, Ca 2p i P 2p elementa i njihove relativne koncentracije za Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake su prikazani u tabeli 8. Na oba XPS spektra (slika 44) Ca 2p pik je u obliku dupleta Ca 2p<sub>3/2</sub> (BE = 347,5eV) i Ca 2p<sub>1/2</sub> (BE = 351,1 eV), a pik P 2p ima samo jedan P 2p<sub>3/2</sub> pik na BE poziciji od 133,6 eV za Ag/HAP prevlaku (slika 44) i 133,8 eV za Ag/HAP/Lig prevlaku (slika 44), što potvrđuje prisustvo hidroksiapatita [255-257], ali pik za Ag nije detektovan zbog male količine dopiranog srebra u Ag/HAP prahu. Mada Ca 2p za Ag/HAP prevlaku pokazuje duplet na istim energijama vezivanja kao i kod Ag/HAP/Lig prevlake, prema literaturi [258] Ca 2p<sub>3/2</sub> i Ca 2p<sub>1/2</sub> (347,5 i 351,1 eV) takođe odgovaraju prisustvu dve različite kristalne faze istovremeno Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> i hidroksiapatit. Identifikacija ove dve kristalne faze na osnovu Ca 2p spektra nije moguća samo XPS analizom jer se Ca nalazi u različitim fazama – CaO i Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> koje nastaju tokom sinterovanja hidroksiapatita. Razgradnja Ag/HAP prevlake nakon sinterovanja je zato potvrđena XRD (slika 21b) i ATR-FTIR (slika 42a) analizama. Komponenta O 1s na BE = 531,3 eV za obe prevlake može se pripisati PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> grupi, a

drugi O 1s na 532,8 eV može se pripisati –OH grupi iz hidroksiapatita [250]. Rezultat fitovanja XPS pikova C 1s spektra (slika 44), sadrži tri komponente na pozicijama 285,0; 286,6–287 i 288,0–289,3 eV pripisane aromatičnim ugljovodicima, alkoksi i RCOO<sup>-</sup> grupama, redom [263]. Prema literaturi C 1s pik sa BE = 286–286,3 i 287,7–288,4 eV ukazuje na prisustvo karbonilnih grupa, dok treći pik koji se pojavljuje na 289,3 eV, odgovara C–O vezama [262], što potvrđuje prisustvo lignina povezanog sa HAP. Pozicija Ti 2p pika titana na XPS spektru se ne može fitovati i njegove faze se ne mogu uočiti jer je teško ispitati veoma tanak film titan suboksida.



**Slika 44.** Dekonvolucija Ca 2p, P 2p, C 1s i O 1s spektara visoke rezolucije sinteovanih (a) Ag/HAP i (b) Ag/HAP/Lig prevlaka.

**Tabela 8.** Hemijska analiza rezultata XPS merenja sa atomskim udelima elemenata i Ca/P odnosa.

koncentracija lignina (mas. % Lig)		Ca	P	O	C	Ca/P
<b>0</b> (Ag/HAP)	nesinterovana	18,1	11,1	64,8	4,8	1,62
	sinterovana	19,1	11,2	62,0	6,9	1,70
<b>1</b> (Ag/HAP/Lig)	nesinterovana	18,3	11,3	64,0	5,5	1,62
	sinterovana	18,7	11,5	62,3	5,8	1,62

Hemijski sastav na površini prevlake je veoma važan jer je u direktnom kontaktu sa koštanim tkivom i rastvara se u početnom stadijumu implantacije. U literaturi je pokazano da je optimalni Ca/P odnos između 1,67 – 1,76 [246], stoga su izračunate vrednosti Ca/P odnosa iz XPS merenja za Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake. U tabeli 8 su prikazane vrednosti Ca/P odnosa, odakle se može zaključiti da povećanje Ca/P odnosa potvrđuje HAP dekompoziciju kod Ag/HAP prevlake nakon sinterovanja, dok za Ag/HAP/Lig prevlaku ostaje isti i bliske je vrednosti sa stehiometrijskim hidroksiapatitom od 1,67 [246].

## 5.9. SEI analiza

### 5.9.1. SEI analiza nesinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka

Koroziona stabilnost HAP i HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka je ispitana SEI metodom. Na slici 45 su prikazani Najkvistovi dijagrami nesinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka i titana bez prevlake (referentni uzorak) posle 10 dana stajanja u SBF rastvoru na temperaturi od 37 °C. Na dijagramima u kompleksnoj ravni za obe prevlake polukrug na visokim frekvencijama, u opsegu od 100 kHz do 1 Hz, odgovara HAP ili HAP/Lig prevlaci, a impedansni odgovor na niskim frekvencijama, u opsegu od 1 Hz do 10 mHz, opisuje pasivni film oksida titana ispod prevlake.

Prilikom fitovanja Najkvistovih dijagrama u programu *Gamry Instruments Echem Analyst* korišćena su ekvivalentna električna kola, koja su prikazana na slici 46. Ekvivalentno električno kolo na slici 46a korišćeno je za HAP i HAP/Lig prevlake, gde je  $R_s$  otpornost elektrolita,  $R_p$  otpornost elektrolita u porama prevlake i  $CPE_c$  i  $CPE_{ox}$



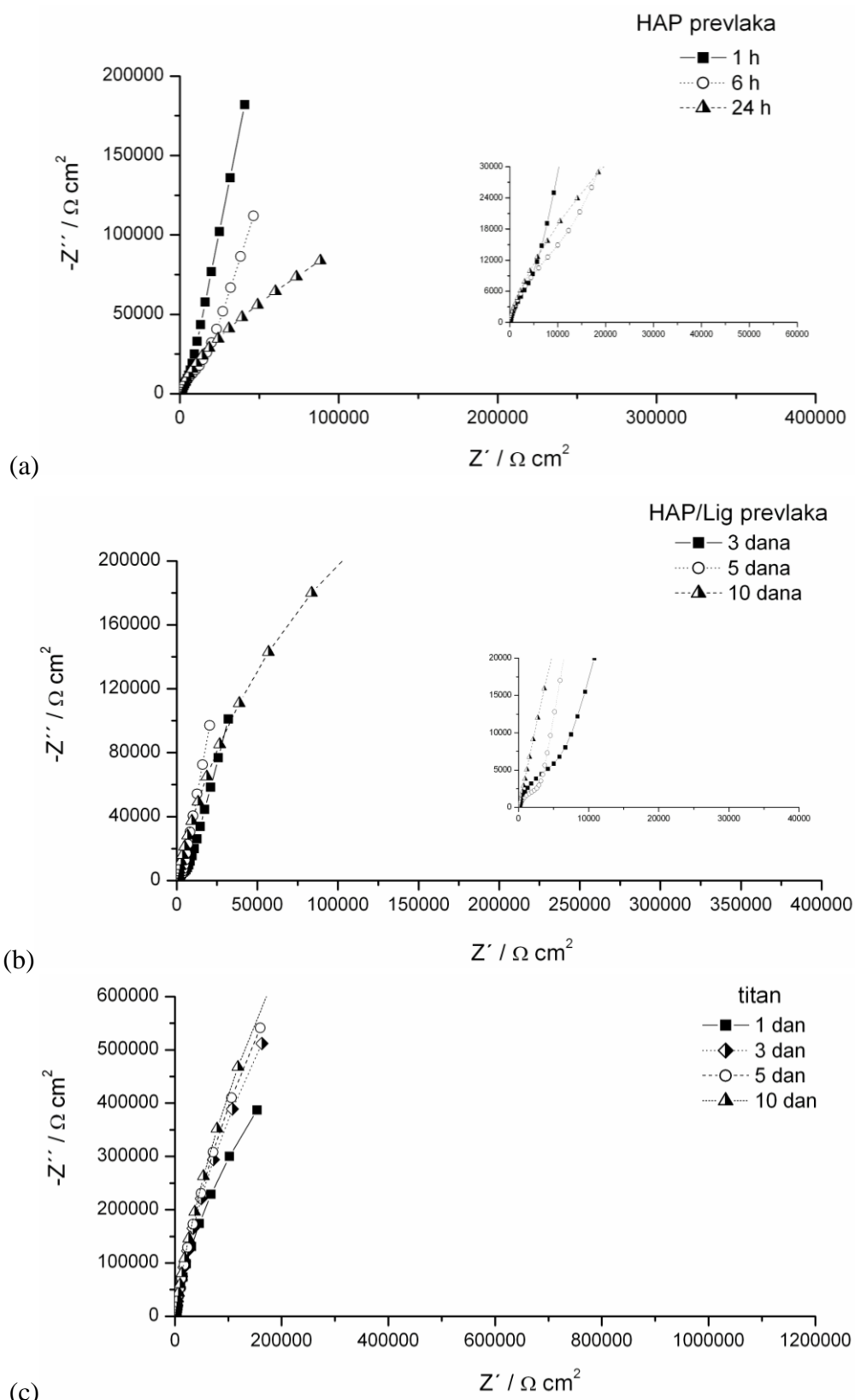
elementi sa konstantnim faznim uglom koji uključuju elektrohemijske fenomene kao što su  $C_c$ , kapacitivnost prevlake i  $C_{ox}$ , kapacitivnost pasivnog filma oksida titana i difuzionih procesa. CPE se koristi u modelu da bi se kompenzovala nehomogenost sistema i definisan je kroz dva parametra,  $Y_0$  i  $n$ . Impedancija CPE je predstavljena sledećom jednačinom [264-266]:

$$Z_{CPE} = Y_0^{-1} \cdot (j\omega)^{-n} \quad (4)$$

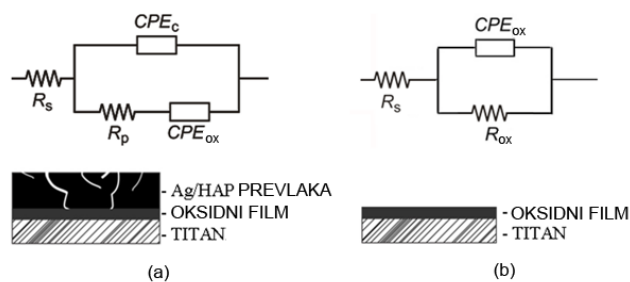
gde je  $j = (-1)^{1/2}$ ,  $\omega = 2\pi f$  je frekvencija u  $\text{rad s}^{-1}$  i  $f$  je frekvencija u Hz. Ako su vrednosti  $n$  od  $0,8 - 1$ , impedancija CPE može biti jednaka kapacitivnosti:

$$Z_{CPE} = (j\omega C)^{-n} \quad (5)$$

I u ovom slučaju  $Y_0$  daje čistu kapacitivnost ( $C$ ). Za analizu impedansnog odgovora titana bez prevlake korišćeno je drugačije ekvivalentno električno kolo prikazano na slici 46b, gde je  $R_s$  otpornost elektrolita,  $R_{ox}$  otpornost pasivnog filma, i  $CPE_{ox}$  element sa konstantnim faznim uglom. Svi rezultati fitovanja su prikazani u tabeli 9.



**Slika 45.** Impedansni dijagrami u kompleksnoj ravni za (a) nesinterovanu HAP prevlaku na titanu, (b) nesinterovanu HAP/Lig prevlaku na titanu i (c) titan bez prevlake, tokom različitih vremena delovanja SBF rastvora na 37 °C.



**Slika 46.** Ekvivalentno električno kolo i modeli za (a) nesinterovane HAP i HAP/Lig prevlake i (b) titan bez prevlake.

Rezultati prikazani u tabeli 9 pokazuju da su vrednosti  $n_c$  u slučaju obe prevlake veće od 0,8 pa je  $CPE_c$  isto što i  $C_c$ , kapacitivnost prevlake. U tabeli 9 je prikazana vremenska zavisnost  $R_p$ , otpornosti elektrolita u porama prevlake i  $C_c$ , kapacitivnosti prevlake tokom 10 dana u SBF rastvoru. Najkvistov dijagram nesinterovane HAP prevlake (slika 45a) u poređenju sa Najkvistovim dijagramom titana bez prevlake (slika 45c) posle jednog dana izlaganja SBF rastvoru nema polukrug u opsegu visokih frekvencija koji se može pripisati HAP sloju na površini. Tako da se može zaključiti da HAP prevlaka nakon 24 h gubi svoja zaštitna svojstva [267]. Dok se poređenjem Najkvistovih dijagrama obe prevlake i titana bez prevlake može zaključiti da su zaštitna svojstva HAP/Lig prevlake bolja nego čiste HAP prevlake jer se visokofrekventni polukrug javlja do 5 dana. Prema tim rezultatima tokom prvih 5 dana izlaganja SBF rastvoru  $R_p$  i  $C_c$  ostaju skoro nepromenjeni što ukazuje na korozionu stabilnost prevlake. Impedansni dijagram titana bez prevlake odgovara ponašanju pasivnog filma oksida titana na njegovoj površini. Prema tabeli 9 smanjenje  $C_{ox}$  i povećanje  $R_{ox}$  vrednosti ukazuju na rast oksidnog sloja i njegovu odličnu stabilnost u SBF.

**Tabela 9.** Rezultati parametara ekvivalentnog električnog kola dobijeni fitovanjem

Uzorak	$t$ / h	$R_s$ / $\Omega \text{ cm}^2$	$CPE_{ox}$		$R_{ox}$ / $k\Omega \text{ cm}^2$	$CPE_c$		$R_p$ / $k\Omega \text{ cm}^2$
			$(C_{ox})$ / $\mu F \text{ cm}^{-2}$	$n_{ox}$		$(C_c)$ / $\mu F \text{ cm}^{-2}$	$n_c$	
HAP	1	30,2	35,6	0,88	–	39,8	0,87	19,7
	6	30,6	62,0	0,79	–	37,3	0,86	31,8
	24	24,1	44,8	0,82	157,3	–	–	–
HAP/Lig	72	66,4	87,3	0,83	–	33,4	0,88	10,9
	120	111,0	109,5	0,89	–	31,3	0,87	14,8
	240	137,2	35,3	0,87	815,4	–	–	–
Ti	24	22,5	38,8	0,89	1009	–	–	–
	72	67,8	26,6	0,90	3654	–	–	–
	120	13,1	25,5	0,90	4169	–	–	–
	240	14,6	22,6	0,91	4684	–	–	–

### 5.9.2. SEI analiza nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka

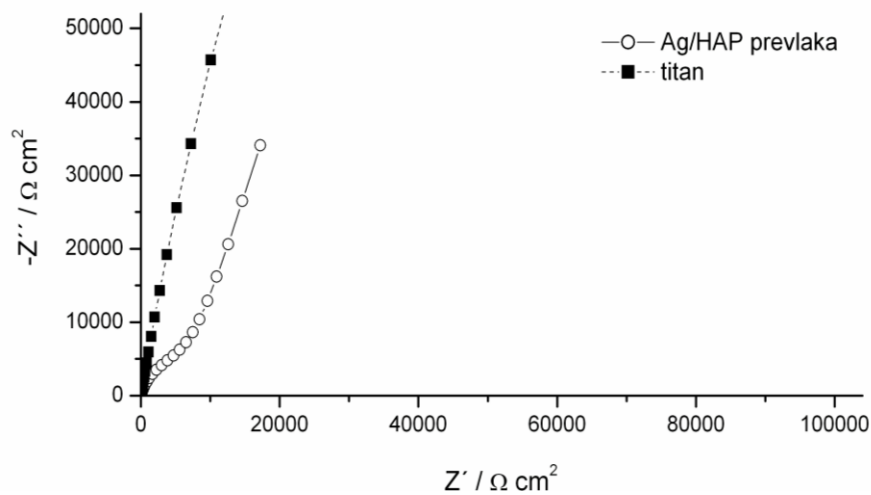
Koroziona stabilnost nesinterovanih i sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu ispitana je metodom spektroskopije elektrohemijske impedancije u fiziološkoj sredini kao što je SBF rastvor na temperaturi od 37 °C radi imitiranja uslova u ljudskom telu.

SEI merenja su korišćena u cilju proučavanja korozije elektroforetskih Ag/HAP prevlaka na titanu u fiziološkoj sredini (SBF rastvoru) [241]. Najkvistovi dijagrami čistog titana i nesinterovane Ag/HAP prevlake na titanu potopljenih u SBF na temperaturi od 37 °C posle 1 dana (slika 47a) i posle 3 dana prikazani su na slici 47b. Sa slike 47a Najkvistov dijagram Ag/HAP prevlake na titanu u poređenju sa Najkvistovim dijagramom titana bez prevlake posle jednog dana izlaganja ima polukrug u opsegu visokih frekvencija (100 kHz – 1 Hz) koji se može objasniti obrazovanim Ag/HAP slojem na površini, dok impedansni odgovor u opsegu niskih frekvencija (1 Hz – 10 mHz) objašnjava karakteristike pasivnog filma oksida titana ispod površinskog sloja prevlake.

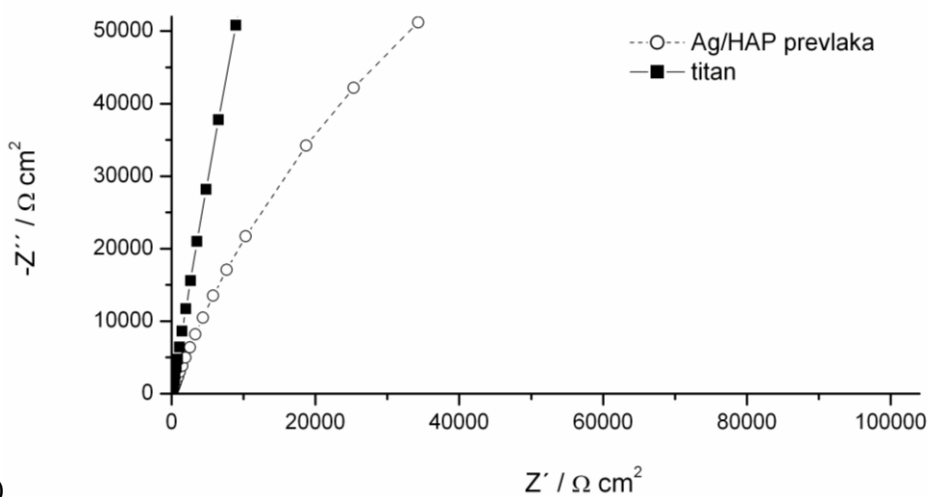
Za fitovanje eksperimentalnih podataka impedancije dobijenih iz Najkvistovih dijagrama za Ag/HAP prevlaku korišćena su kola prikazana na slikama 48a i 48b, a za

podatke dobijene za titan bez prevlake kolo sa slike 48c. Pretpostavljena ekvivalentna električna kola (slike 48a i 48b) se sastoje od  $R_s$  otpornosti elektrolita,  $R_p$  otpornosti elektrolita u porama prevlake,  $CPE_c$  i  $CPE_{ox}$  elemenata sa konstantnim faznim uglom koji uključuju sve elektrohemijske parametre tj.  $C_c$  kapacitivnost prevlake,  $C_{ox}$  kapacitivnost pasivnog filma oksida titana, i difuzione procese. CPE je korišćen u ovom modelu da bi kompenzovao nehomogenost sistema i definisan je sa dva parametra  $Y_0$  i  $n$ . Ako je vrednost  $n$  u rasponu od 0,8 – 1, CPE se može smatrati kao slab kapacitivni odgovor i smatra se kao kapacitivnost ( $C$ ). Pri tom je za analizu eksperimentalnih podataka dobijenih za titan bez prevlake korišćeno ekvivalentno električno kolo prikazano na slici 48c, gde je  $R_s$  otpor elektrolita, a  $CPE_{ox}$  element sa konstantnim faznim uglom pasivnog filma oksida titana. Rezultati ovih fitovanja za nesinterovanu Ag/HAP prevlaku kao i za titan bez prevlake su prikazani u tabeli 10.

Kao što je navedeno u tabeli 10 za Ag/HAP prevlaku vrednosti  $n_c$  su veće od 0,8 tako da je  $CPE_c$  isto što i  $C_c$  kapacitivnost prevlake. Takođe prikazana je vremenska zavisnost  $R_p$  otpornosti u porama prevlake, kao i  $C_c$  kapacitivnosti prevlake. Može se zaključiti da  $R_p$  i  $C_c$  vrednosti za Ag/HAP prevlaku ostaju konstantne tokom izlaganja SBF rastvoru što pokazuje da prevlaka zadržava dobra zaštitna svojstva. Međutim, posle 72 h Najkvistov dijagram (slika 47b) nije mogao biti fitovan sa kolom prikazanim na slici 48a, pa je upotrebljeno kolo prikazano na slici 48b. U tabeli 10 su prikazane izračunate vrednosti  $R_p$  ( $240,7 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ ) i  $C_c$  ( $147,2 \text{ }\mu\text{F cm}^{-2}$ ) posle 72 h, koje mogu ukazati na formiranje novog apatitnog sloja na površini prevlake u SBF rastvoru. Pore prevlake nakon stajanja u SBF rastvoru se ispunjavaju i prerastaju u vrlo otporan pasivni film, dok sa druge strane površina prevlake predstavlja pogodan teren za nukleaciju i rast novog apatita. SEI spektar titana bez prevlake izloženog SBF rastvoru (slika 47b) je fitovan korišćenjem ekvivalentnog električnog kola prikazanog na slici 48c. Impedansni dijagram čistog titana ukazuje na ponašanje blisko kapacitivnom odgovoru. Šta više spori rast filma titan oksida se može pratiti kroz malo smanjenje vrednosti  $C_{ox}$  i uvećanje  $R_{ox}$  tokom 72 h izlaganja SBF rastvoru (Tabela 12), što je u skladu sa prethodno objavljenim podacima [268]. Osim toga, novo-formirani apatit posle potapanja u SBF rastvor je poznat po tome što pospešuje bolje vezivanje implantata i kosti [241].

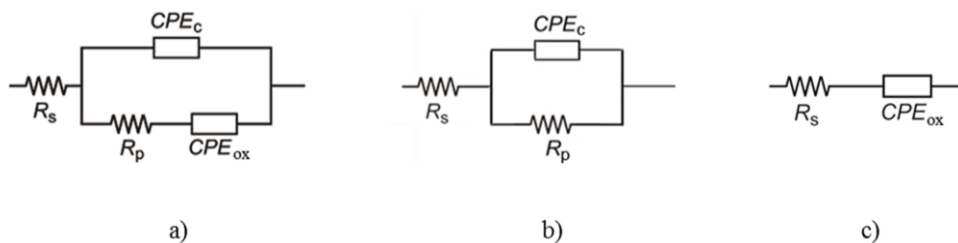


(a)



(b)

**Slika 47.** Impedansni dijagrami u kompleksnoj ravni za nesinterovano Ag/HAP prevlaku na titanu i titan bez prevlake nakon (a) 1 dana i (b) 3 dana delovanja SBF rastvora na 37 °C.

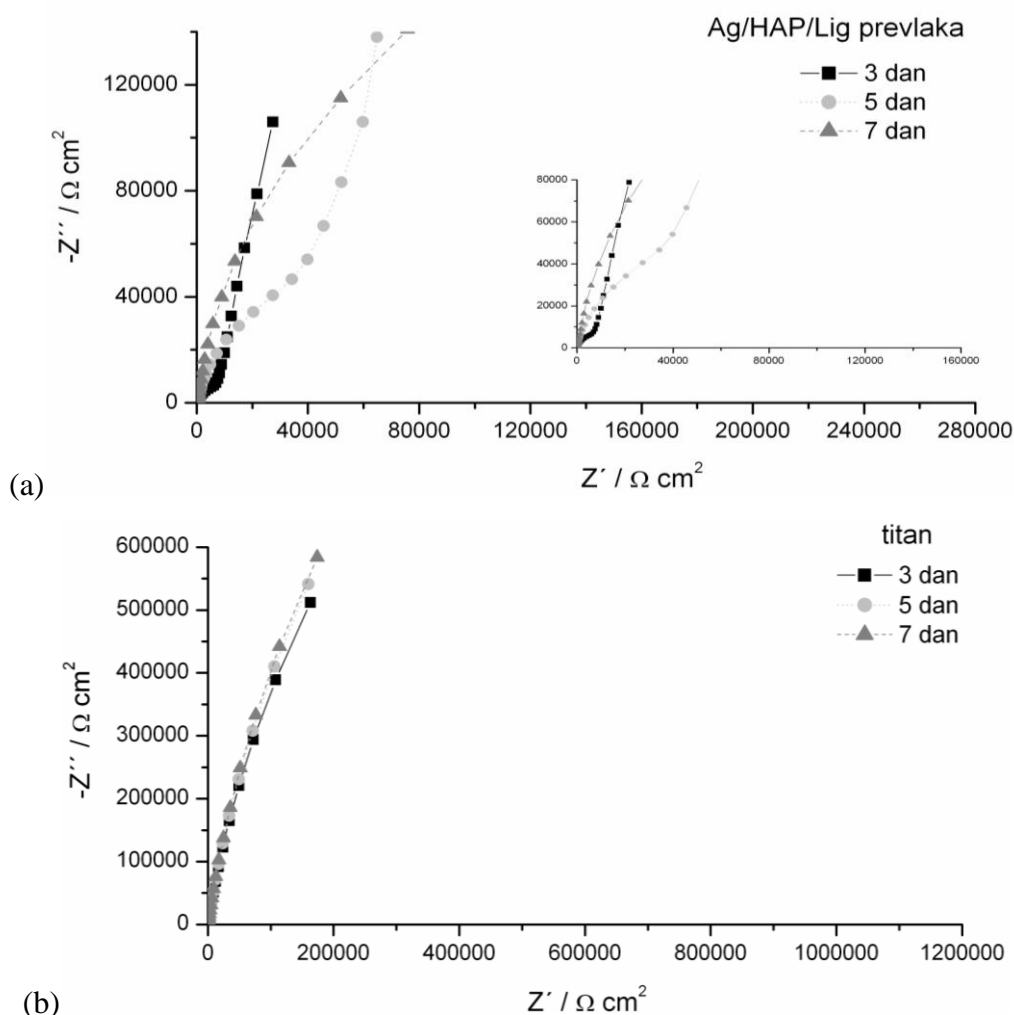


**Slika 48.** Ekvivalentno električno kolo za (a) nesinterovane Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake na titanu posle početnog vremena delovanja SBF rastvora, (b) nesinterovane Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake na titanu posle dužeg vremena delovanja SBF rastvora i (c) titan bez prevlake.

**Tabela 10.** Parametri ekvivalentnog električnog kola dobijeni fitovanjem

Uzorak	$t$ / h	$R_s$ / $\Omega \text{ cm}^2$	$\text{CPE}_{\text{ox}}$		$\text{CPE}_c$		$R_p$ / $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$
			$(C_{\text{ox}})$ / $\mu\text{F cm}^{-2}$	$n_{\text{ox}}$	$(C_c)$ / $\mu\text{F cm}^{-2}$	$n_c$	
Ag/HAP	1	31,6	220	0,77	89,5	0,83	12,6
	24	31,5	223	0,80	88,4	0,83	11,9
	72	87,8	–	–	147,2	0,78	240,7
Ag/HAP/Lig	1	29,4	118,0	0,91	33,3	0,88	10,4
	72	50,6	101,9	0,91	34,4	0,88	13,0
	120	87,8	75,8	1,00	36,4	0,87	110,3
	168	82,0	–	–	35,4	0,86	634,7
Ti	1	21,1	33,2	0,88	–	–	–
	72	72,9	26,8	0,89	–	–	–
	120	13,9	25,7	0,90	–	–	–
	168	29,7	24,1	0,90	–	–	–

SEI merenja nesinterovane Ag/HAP/Lig prevlake vršena su u cilju proučavanja korozione otpornosti tokom izlaganja SBF rastvoru na temperaturi od 37 °C. Na slikama 49a i 49b su prikazani Najkvistovi impedansni dijagrami za Ag/HAP/Lig prevlaku na titanu kao i čistog titana, redom, koji je uzet kao referenca posle 3, 5 i 7 dana izlaganja SBF rastvoru. Visokofrekventni opseg je pripisan Ag/HAP/Lig prevlaci, dok niskofrekventni opseg predstavlja karakteristike pasivnog filma titan oksida ispod prevlake.



**Slika 49.** Impedansni dijagrami u kompleksnoj ravni za (a) nesinterovanu Ag/HAP/Lig prevlaku na titanu i (b) titan bez prevlake tokom različitih vremena delovanja SBF rastvora na 37 °C.

Najkvistovski dijagrami su fitovani ekvivalentnim električnim kolima prikazanim na slici 48. Ekvivalentno električno kolo korišćeno za fitovanje impedansnih podataka za Ag/HAP/Lig prevlaku tokom početnog vremena izlaganja je prikazano na slici 48a, dok je za fitovanje impedansnih podataka za Ag/HAP/Lig prevlaku tokom produženog izlaganja korišćeno kolo sa slike 48b, a za analizu impedansnih podataka čistog titana korišćeno je ekvivalentno električno kolo prikazano na slici 48c. Rezultati fitovanja su prikazani u tabeli 10.

Kao što se vidi iz tabele 10 vrednosti  $n_c$  i  $n_{ox}$  kod Ag/HAP/Lig prevlaka su veće od 0,8 tako da je  $CPE_c$  isto što i  $C_c$  kapacitivnost prevlake, dok se  $CPE_{ox}$  može smatrati

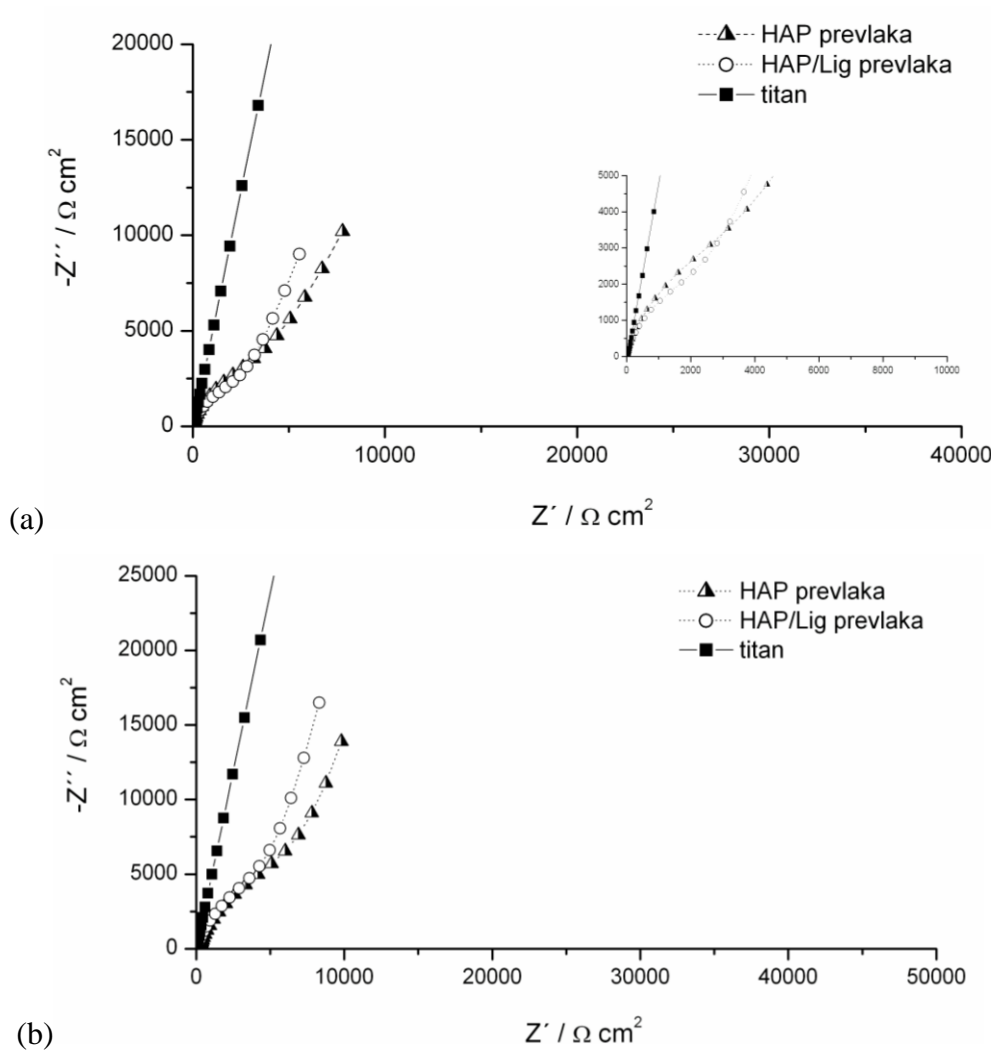


kao  $C_{ox}$  tj. kapacitivnost pasivnog filma oksida titana ispod Ag/HAP/Lig prevlake. U tabeli 10 je prikazana vremenska zavisnost kako  $R_p$ , otpornosti elektrolita u porama prevlake tako i  $C_c$ , kapacitivnosti prevlake, tokom 7 dana u SBF rastvoru. Za fitovanje Najkvistovih dijagrama Ag/HAP/Lig prevlake, tokom 5 dana u SBF rastvoru, korišćeno je ekvivalentno električno kolo prikazano na slici 48a. Prema tim rezultatima tokom prva 3 dana izlaganja SBF rastvoru  $R_p$  i  $C_c$  ostaju skoro nepromenjeni čime je potvrđena koroziona stabilnost Ag/HAP/Lig prevlake. Posle petog dana vrednost  $R_p$  je porasla deset puta što ukazuje na početak stvaranja novog apatitnog sloja. Nakon sedmog dana, fitovanje Najkvistovih dijagrama se nije moglo izvršiti pomoću ekvivalentnog električnog kola prikazanog na slici 48a, pa je umesto njega korišćeno ekvivalentno električno kolo prikazano na slici 48b. Posle 7 dana u SBF rastvoru izračunata vrednost  $R_p$  je iznosila  $634,7 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$  (Tabela 10), što ukazuje na taloženje novo formiranog karbonatnog HAP na površini prevlake. Ovaj rezultat je potvrđen SEM i FE-SEM fotografijama (slike 29 i 30), kao i ATR-FTIR (slika 42) i XRD analizama (slike 22a i 22b). Navedeno ukazuje da površina Ag/HAP/Lig prevlake predstavlja mesto nukleacije i rasta novog apatitnog sloja. Prema literaturi transformacija hidroksiapatita sa apatitnim slojem koji je po kristalnoj strukturi sličan koštanom tkivu u ljudskom telu doprinosi stabilnom vezivanju implantata za koštano tkivo [269]. SEI spektar titana bez prevlake izloženog SBF rastvoru (slika 49b) se može fitovati samo sa ekvivalentnim električnim kolom prikazanim na slici 48c. Njegov impendansni dijagram pokazuje ponašanje tipično za tanak film pasivnog oksida na površini titana, a neznatno povećanje vrednosti  $C_{ox}$  tokom potapanja (Tabela 10) može odgovarati sporom rastu filma titan oksida što ukazuje na dugoročnu stabilnost tankog filma oksida u SBF rastvoru.

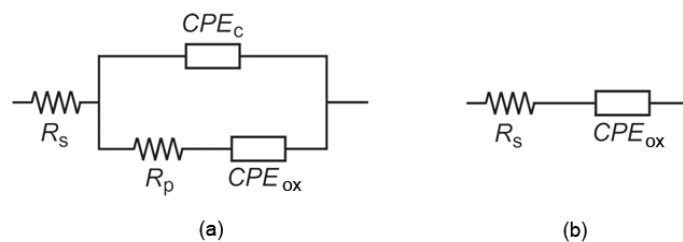
### **5.9.3. SEI analiza sinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka**

Ispitana je i koroziona stabilnost sinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka nakon 10 dana stajanja u SBF rastvoru i termički tretiranog titana kao referentnog uzorka čiji su impedansni dijagrami prikazani na slici 50. Ekvivalentna električna kola, prikazana na slici 51, su korišćena za fitovanje Najkvistovih dijagrama u programu *Gamry Instruments Echem Analyst*. Za sinterovane HAP i HAP/Lig prevlaka korišćeno je ekvivalentno električno kolo prikazano na slici 51a, dok se za termički tretiran titan koristilo ekvivalentno električno kolo prikazano na slici 51b. Rezultati fitovanja su

prikazani u tabeli 11. Može se primetiti da su vrednosti  $n_c$  u slučaju obe prevlake veće od 0,8 tako da je  $CPE_c$  isto što i  $C_c$  kapacitivnost prevlake.



**Slika 50.** Impedansni dijagrami u kompleksnoj ravni za sinterovanu HAP, sinterovanu HAP/Lig prevlaku na titanu i termički tretiran titan nakon (a) 1 dana i (b) 10 dana delovanja SBF rastvora na 37 °C.

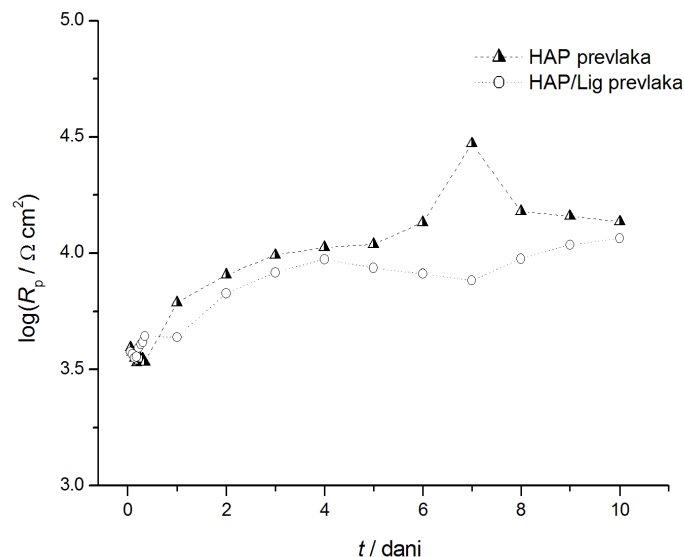


**Slika 51.** Ekvivalentno električno kolo za (a) sinterovane HAP i HAP/Lig prevlake na titanu posle dužeg vremena delovanja SBF rastvora i (b) termički tretiran titan.

Vremenska zavisnost  $R_p$  otpornosti elektrolita u porama prevlake za HAP i HAP/Lig prevlake je prikazana na slici 52. Može se primetiti da vrednosti  $R_p$  i  $C_c$  za obe prevlake ostaju skoro konstantne tokom 10 dana delovanja SBF rastvora, što ukazuje na trajnost zaštitnih osobina ispitanih prevlaka. Iz tabele 11 se može primetiti da se vrednosti  $R_p$  vrlo malo povećavaju dok se kapacitivnost  $C_c$  neznatno smanjuje.

**Tabela 11.** Rezultati parametara ekvivalentnog električnog kola dobijeni fitovanjem

Uzorak	$t$ / h	$R_s$	$CPE_{ox}$	$n_{ox}$	$CPE_c$	$n_c$	$R_p$
		/ $\Omega$ cm <sup>2</sup>	( $C_{ox}$ ) / $\mu$ F cm <sup>-2</sup>		( $C_c$ ) / $\mu$ F cm <sup>-2</sup>		/ k $\Omega$ cm <sup>2</sup>
HAP	24	14,1	597,3	0,69	275,9	0,85	6,2
	120	57,9	864,1	0,90	262,5	0,82	10,9
	240	99,1	632,4	0,77	254,8	0,84	13,6
HAP/Lig	24	23,1	642,4	0,76	264,3	0,86	4,4
	120	71,0	818,7	0,89	262,2	0,84	8,6
	240	89,8	498,1	0,84	259,7	0,84	10,6
termički tretiran Ti	24	34,8	79,6	0,87	–	–	–
	120	18,8	69,3	0,87	–	–	–
	240	21,6	64,6	0,87	–	–	–



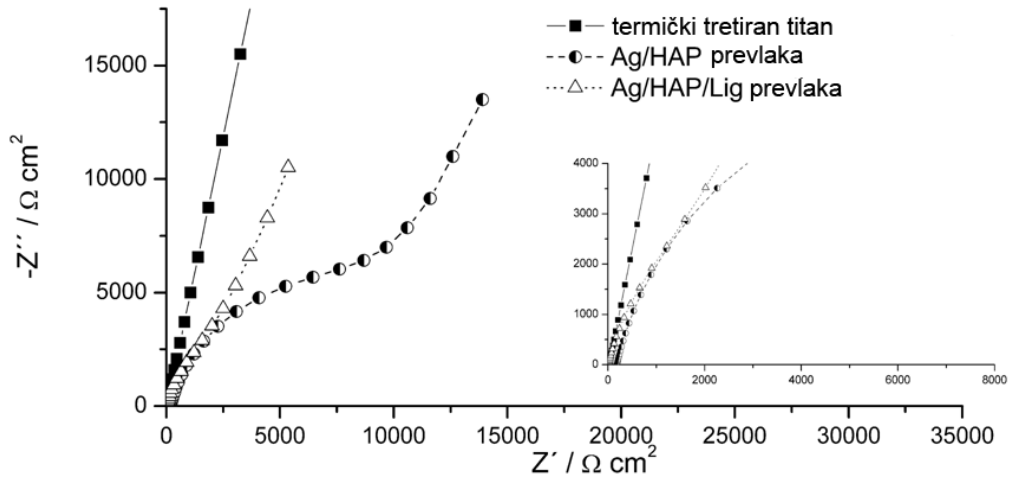
**Slika 52.** Promene otpornosti elektrolita u porama prevlake,  $R_p$ , za sinterovane HAP i HAP/Lig prevlake tokom 10 dana delovanja SBF rastvora.

#### 5.9.4. SEI analiza sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka

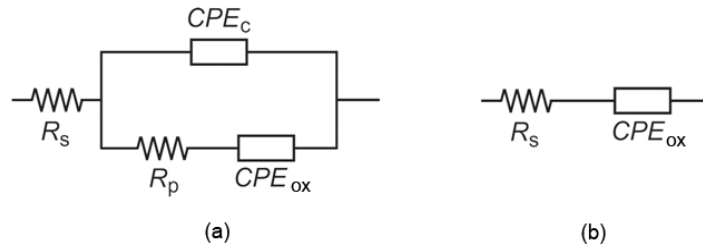
Koroziona stabilnost sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka ispitivana je metodom spektroskopije elektrohemijske impedancije u fiziološkoj sredini kao što je SBF rastvor. Najkvistovi dijagrami za Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake, kao i za termički tretiran titan (referentni uzorak) posle dužeg vremena delovanja SBF rastvora na 37 °C su prikazani na slici 53. Na Najkvistovim dijagramima u kompleksnoj ravni za obe prevlake polukrug na visokim frekvencijama, u opsegu od 100 kHz do 1 Hz, odgovara Ag/HAP ili Ag/HAP/Lig prevlaci, a impedansni odgovor na niskim frekvencijama, u opsegu od 1 Hz do 10 mHz, opisuje pasivni film oksida titana ispod prevlake.

Prilikom fitovanja Najkvistovih dijagrama u programu *Gamry Instruments Echem Analyst* korišćena su ekvivalentna električna kola, kako je prikazano na slici 54. Ekvivalentno električno kolo na slici 54a korišćeno je za Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake, gde je  $R_s$  otpornost elektrolita,  $R_p$  otpornost elektrolita u porama prevlake i  $CPE_c$  i  $CPE_{ox}$  elementi sa konstantnim faznim uglom, koji uključuju elektrohemijske fenomene kao što su  $C_c$  kapacitivnost prevlake,  $C_{ox}$  kapacitivnost pasivnog filma oksida titana i difuzionih procesa. Za analizu impedansnog odgovora titana korišćeno je ekvivalentno električno kolo prikazano na slici 54b, gde je  $R_s$ , otpornost elektrolita,  $R_{ox}$ ,

otpornost pasivnog filma oksida titana, i  $CPE_{ox}$ , element sa konstantnim faznim uglom. Svi rezultati fitovanja su prikazani u tabeli 12.



**Slika 53.** Najkvistovski dijagrami sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu i termički tretiran titan posle 10 dana delovanja SBF rastvora na 37 °C .

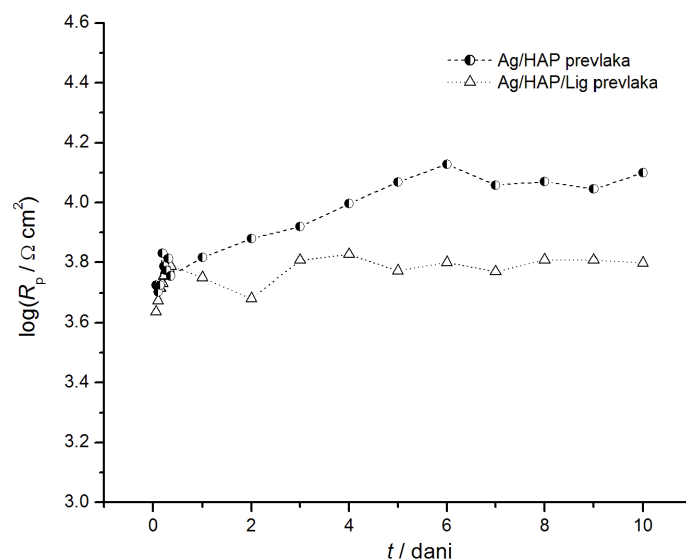


**Slika 54.** Ekvivalentno električno kolo za (a) Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake na titanu i (b) termički tretiran titan posle dužeg vremena delovanja SBF rastvora na 37 °C.

**Tabela 12.** Parametri ekvivalentnog električnog kola dobijeni fitovanjem

Uzorak	$t$ / h	$R_s$ / $\Omega \text{ cm}^2$	$CPE_{ox}$		$CPE_C$		$R_p$ / $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$
			$(C_{ox})$ / $\mu\text{F cm}^{-2}$	$n_{ox}$	$(C_C)$ / $\mu\text{F cm}^{-2}$	$n_C$	
<b>Ag/HAP</b>	24	65,3	334,4	0,60	223,4	0,88	6,6
	120	63,1	968,5	0,90	148,3	0,80	11,7
	240	85,6	670,7	0,77	123,0	0,85	12,6
<b>Ag/HAP/Lig</b>	24	29,2	620,8	0,69	627,2	0,88	5,6
	120	31,5	610,4	0,74	560,6	0,89	5,9
	240	21,8	522,0	0,74	543,5	0,88	6,3
<b>termički tretiran Ti</b>	24	34,8	79,6	0,87	–	–	–
	120	18,8	69,3	0,87	–	–	–
	240	21,6	64,6	0,87	–	–	–

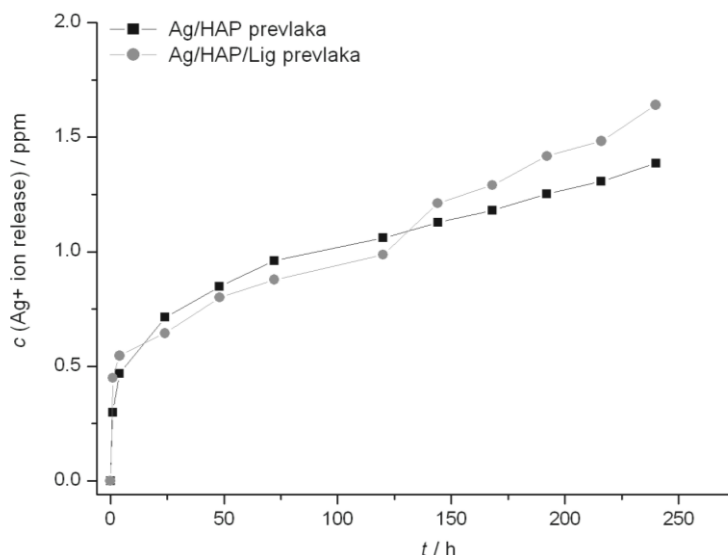
Rezultati prikazani u tabeli 12 pokazuju da su vrednosti  $n_c$  u slučaju obe prevlake veće od 0,8 tako da je  $CPE_c$  isto što i  $C_c$  kapacitivnost prevlake. Vremenska zavisnost  $R_p$  otpornosti u porama prevlake, za obe prevlake prikazana je na slici 55. Kako su  $R_p$  i  $C_c$  za obe prevlake ostali skoro konstantni nakon 10 dana delovanja SBF rastvora, to ukazuje na trajnost zaštitnih osobina prevlaka. Iz tabele 12 vrednosti  $R_p$  se malo povećavaju dok se kapacitivnost smanjuje nakon dužeg vremena delovanja SBF rastvora, što se direktno povezuje sa stvaranjem apatitnog sloja na površini prevlake. Kontinualno povećanje  $R_p$  i smanjenje  $C_c$  oslikava rast apatitnog sloja nakon nedelju dana, što se jasno može videti na SEM i FE-SEM slikama (slike 32 i 33), kao i na difraktogramima (slike 25b i 26b) i FTIR spektrima (slike 41 i 42) Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka nakon potapanja u SBF rastvor.



*Slika 55. Promene otpornosti elektrolita u porama prevlake,  $R_p$ , za sinterovane Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake na titanu sa vremenom delovanja SBF rastvora na 37 °C.*

### **5.10. Otpuštanje jona srebra iz nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka**

Otpuštanje srebra u fiziološku sredinu igra važnu ulogu u antibakterijskoj efikasnosti [270]. Prevlake dopirane jonima srebra obezbeđuju visoku početnu koncentraciju antimikrobnog agensa u okolnom tkivu. Ova osobina je posebno važna u ranom i veoma kritičnom post-implantacionom periodu jer sprečava početnu adheziju bakterija [271]. Takođe, i posle kritičnog perioda, kontinualno oslobađanje jona srebra je poželjno jer i dalje sprečava formiranje bakterijskog biofilma. Na slici 56 prikazana je koncentracija jona srebra otpuštenih iz Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka tokom 10 dana u SBF rastvoru na temperaturi od 37 °C.



**Slika 56.** Vremenska zavisnost otpuštanja jona srebra iz Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka nakon 10 dana potapanja u SBF rastvor na 37 °C.

Naša istraživanja su pokazala da izmerena kumulativna količina jona srebra otpuštenih iz Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake posle 10 dana iznosi 1,386 i 1,704 ppm, redom. Prethodno su Jamuna-Thevi i saradnici [271] objavili da je minimalna koncentracija jona srebra od 0,1 ppb potrebna za antimikrobnu zaštitu, dok je maksimalna netoksična koncentracija prema ljudskim ćelijama 10 ppm. Na osnovu toga može se zaključiti da se izmerene koncentracije u našem radu nalaze u tom poželjnom opsegu koncentracija. Otpuštanje srebra iz Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka se nalazi u okviru inicijalne antibakterijske koncentracije srebra koja je iznosila 56 ppb [271].

## 5.11. Citotoksičnost – MTT test

### 5.11.1. Citotoksičnost HAP i HAP/Lig prevlaka

Citotoksičnost je ispitana na uzorcima pripremljenim u vidu pločica titana sa HAP i HAP/Lig (najmanje i najveće koncentracije, 1 i 10 % Lig, redom) prevlakama, a procenat preživelih PBMC ćelija je određen MTT testom i vijabilnost ćelija je računata na osnovu jednačine (3).

U tabeli 13 je prikazan procenat preživljavanja PBMC ćelija i PBMC ćelija stimulisanih na proliferaciju fitohemaglutininom (*eng.* PHA) u prisustvu kontrolnog uzorka i sinterovanih uzoraka, HAP i HAP/Lig (1 i 10 mas.% Lig) prevlaka, 72 h nakon

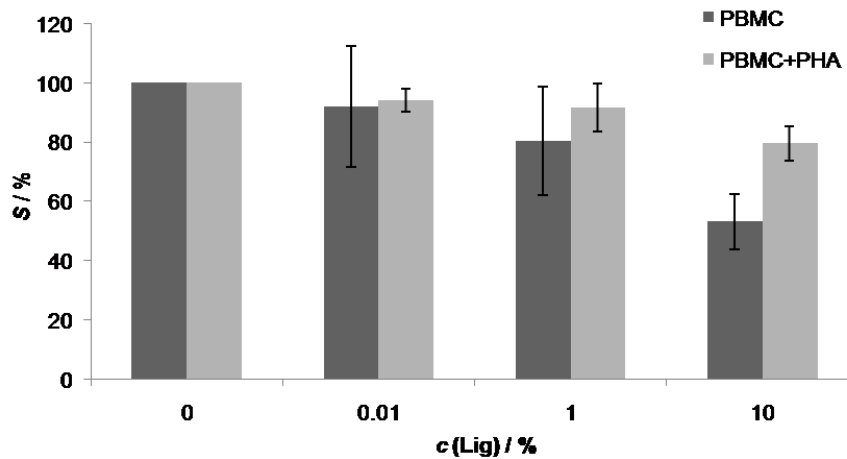


zasejavanja. Na slici 57 je prikazana zavisnost vijabilnosti,  $S$ , od koncentracije lignina,  $c(\text{Lig})$ , u HAP/Lig prevlakama. Preživljavanje PBMC ćelija se značajno umanjuje sa povećanjem koncentracije lignina, dok se preživljavanje PHA-stimuliranih PBMC ćelija ne smanjuje značajno (Tabela 13) [238].

Rezultati MTT testa pokazuju da se u prisustvu HAP i obe HAP/Lig prevlake blago umanjuje vijabilnost zdravih imunokompetentnih PHA-stimuliranih PBMC ćelija i da su svi rezultati slični kontrolnom uzorku ( $S = 100\%$ ).

**Tabela 13.** *Vijabilnost PBMC i PBMC ćelija stimuliranih na proliferaciju u prisustvu sinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka*

<b>Vrsta ćelije</b>	<i>Humane mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC)</i>		
<b>Materijal</b>	HAP prevlaka	HAP/Lig prevlaka, 1 mas. % Lig	HAP/Lig prevlaka, 10 mas. % Lig
<b>Vijabilnost (<math>S</math>), %</b>	81,7 ± 20,5	65,9 ± 18,3	54,0 ± 9,4
<b>Klasifikacija</b>	Umereno citotoksičan	Umereno citotoksičan	Izraženo citotoksičan
<b>Vrsta ćelije</b>	<i>PHA-stimulirane humane mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC+PHA)</i>		
<b>Vijabilnost (<math>S</math>), %</b>	93,4 ± 4,0	90,4 ± 8,2	83,7 ± 5,8
<b>Klasifikacija</b>	Necitotoksičan	Necitotoksičan	Umereno citotoksičan



*Slika 57. Vijabilnost PBMC i PBMC stimulisanih na proliferaciju fitohemaglutininom (PBMC+PHA) u prisustvu sinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka, sa 1 i 10 mas. % Lig.*

Na osnovu dijagrama prikazanog na slici 57 zavisnosti vijabilnosti od  $c(\text{Lig})$  se vidi da se umanjuje vijabilnost ciljnih PBMC ćelija sa povećanjem koncentracije lignina u HAP/Lig prevlaci. Sa dijagrama se može uočiti da se u prisustvu HAP, odnosno HAP/Lig prevlaka ne umanjuje značajno preživljavanje zdravih imunokompetentnih PBMC stimulisanih na proliferaciju mitogenom, dok se preživljavanje zdravih PBMC ćelija umanjuje kada nisu stimulisane na proliferaciju. Ipak, citotoksičnost nije tolika da bi ugrozila primenu ovih kompozitnih prevlaka u biomedicini.

Slaba citotoksičnost lignina može se objasniti njegovom poznatom apsorpcionom sposobnošću, odnosno lignin može da apsorbuje neke od mikronutrijenata neophodnih za održavanje proliferacije testiranih PBMC ćelija, kao i svojim antioksidantnim svojstvima, kako je pokazano ranije u ispitivanjima sa ljudskim keratinocitima i mišijim fibroblastima [272]. S druge strane, struktura lignina nakon sinterovanja postaje više kondenzovana, što dovodi do formiranja visoko umreženih aromatičnih struktura (polikondezovani aromati), poznatih po svojoj toksičnosti. Međutim, preživljavanje PHA–stimulisanih PBMC ćelija je preko 90 % u prisustvu sinterovane HAP/Lig prevlake sa 1 mas. % Lig u poređenju sa kontrolnim uzorkom, što je značajno uvećan procenat u poređenju sa dosta smanjenim preživljavanjem ćelija u prisustvu sinterovane HAP/Lig prevlake sa 10 mas. % Lig (Tabela 13).

Na osnovu dobijenih rezultata određen je opseg efektivne koncentracije lignina koji obezbeđuje korozionu stabilnost prevlaka i bezbednost njihovog korišćenja kao

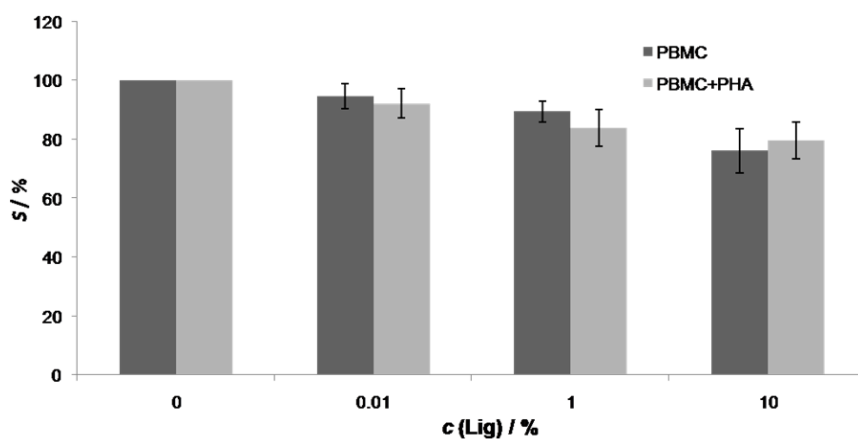
netoksičnih materijala za ćelijske linije. Zbog toga, prevlaka sa 1 mas. % Lig se može klasifikovati kao netoksičan biomaterijal prema literaturi [273].

### 5.11.2. Citotoksičnost Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka

Citotoksičnost sinterovanih Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig), kao i Ag/HAP i Ag/HAP/Lig (10 mas. % Lig) prevlaka kao uzorci za poređenje, ispitana je MTT testom na PBMC i PHA-simulisanim PBMC ćelijama (Tabela 14). Vijabilnost ( $S$ , %) je definisan kao odnos između broja ćelija izraslih u hranljivoj sredini sa prevlakom i broja ćelija izraslih u kontrolnim posudama sa hranljivom sredinom bez prevlake pomnožen sa 100.

**Tabela 14.** Vijabilnost PBMC i PBMC ćelija stimulisanih na proliferaciju u prisustvu sinterovanih Ag/HAP i Ag HAP/Lig prevlaka

Tip ćelije	<i>Humane mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC)</i>		
<b>Materijal</b>	Ag/HAP prevlaka	Ag/HAP/Lig prevlaka, 1 mas. % Lig	Ag/HAP/Lig prevlaka, 10 mas. % Lig
<b>Vijabilnost (<math>S</math>), %</b>	94,6 ± 4,2	89,4 ± 3,5	76,0 ± 7,6
<b>Klasifikacija</b>	Necitotoksičan	Necitotoksičan	Umereno citotoksičan
Tip ćelije	<i>PHA-stimulisane humane mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC+PHA)</i>		
<b>Vijabilnost (<math>S</math>), %</b>	92,1 ± 5,0	83,8 ± 6,3	79,6 ± 6,3
<b>Klasifikacija</b>	Necitotoksičan	Necitotoksičan	Umereno citotoksičan



*Slika 58. Vijabilnost PBMC i PBMC stimuliranih na proliferaciju fitohemaglutininom (PBMC+PHA) u prisustvu sinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka, sa 1 i 10 mas. % Lig.*

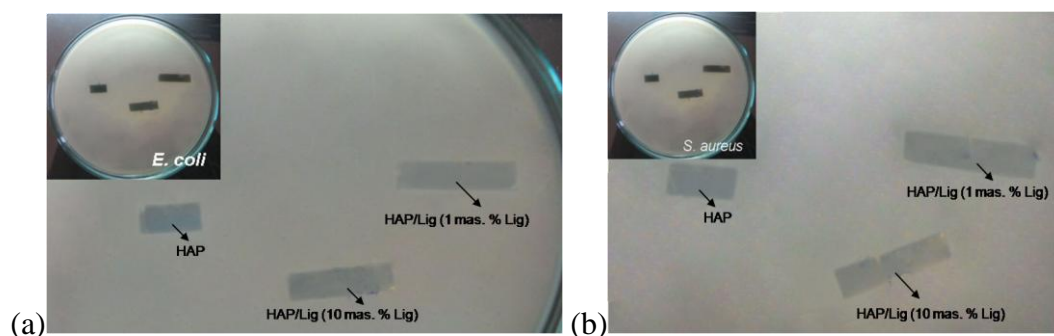
Poređenjem citotoksičnog efekta ispitanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka uočeno je blago umanjeње broja zdravih imunokompetentnih PBMC ćelija, nestimuliranih i PHA-stimuliranih u poređenju sa kontrolnim uzorkom ( $S = 100\%$ ), kao što se vidi sa slike 58. Prema klasifikaciji iz literature [273], Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake sa 1 mas. % Lig mogu se klasifikovati kao netoksične prema PBMC ćelijama, dok su Ag/HAP/Lig prevlake sa 10 mas. % Lig klasifikovane kao blago citotoksične. Preživljavanje PBMC ćelija je veće u prisustvu Ag/HAP/Lig prevlaka sa 1 mas. % Lig, nego u prisustvu Ag/HAP/Lig prevlaka sa 10 mas. % Lig, pa je stoga optimalna netoksična koncentracija lignina 1 mas. %.

## 5.12. Antimikrobna svojstva

### 5.12.1. Agar difuziona metoda

Ispitana je i antimikrobna aktivnost HAP i HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka na titanu prema dva tipa bakterija (*Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*) agar difuzionom metodom. Nije uočena svetla zona oko HAP, odnosno HAP/Lig prevlaka (1 i 10 mas. % Lig) nakon 24 h inkubacije u slučaju obe bakterijske kulture *S. aureus* i *E. coli* (slika 59). Uklanjanjem uzoraka sa agarne površine uočava se zona inhibiranog rasta bakterija, kako bakterijske kulture *S. aureus*, tako i *E. Coli* (slika 59) samo ispod samog uzorka, ali ne i oko njega. Na osnovu nedostatka zone inhibicije rasta bakterija

može se zaključiti da HAP i HAP/Lig prevlake ne poseduju antimikrobnu aktivnost neophodnu za zaštitu biomaterijala prilikom ugradnje u ljudski organizam.



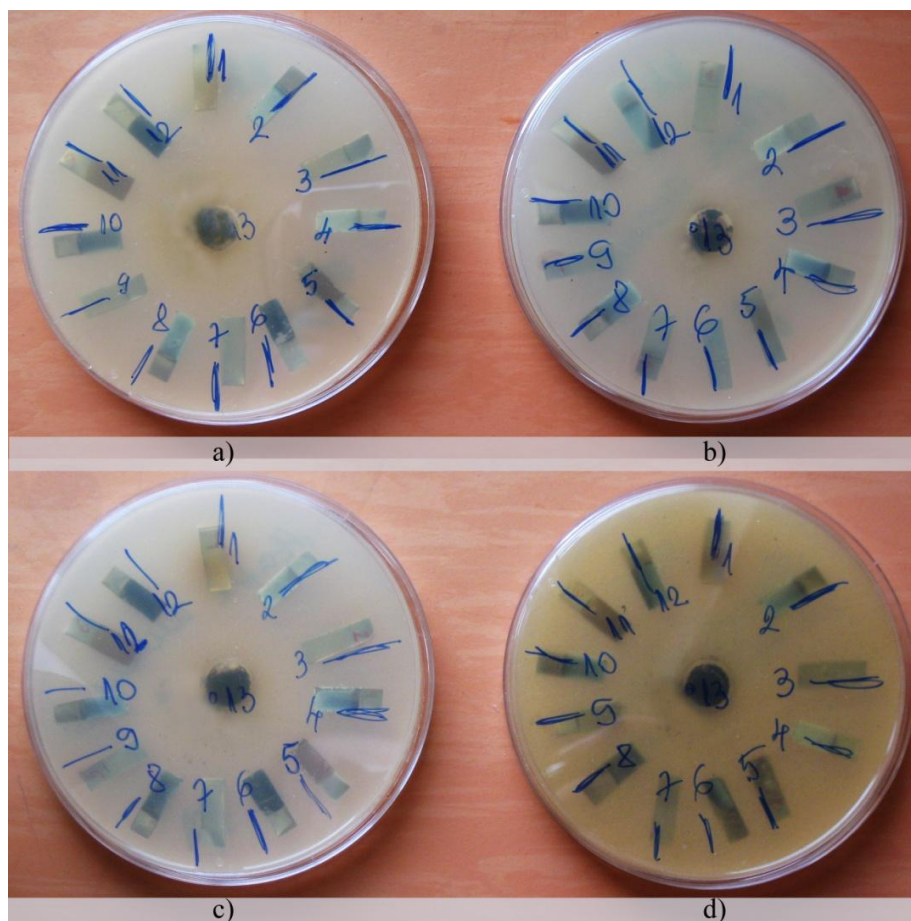
**Slika 59.** Fotografije sinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka na titanu ispitanih testom agar difuzije, bakterijama: (a) *E. coli* i (b) *S. aureus*.

Navedeni rezultati ukazuju da prisustvo lignina nema značajan uticaj na antimikrobna svojstva hidroksiapatita. Antibakterijski efekat HAP/Lig prevlaka je sličan efektu same HAP prevlake pošto u oba slučaja izostaje zona inhibicije rasta bakterija oko ispitanih prevlaka. Pošto je uočeno da ispod prevlaka postoji zona inhibiranog rasta bakterija, može se pretpostaviti da je difuzija kroz agarnu podlogu ubrzana gravitacionom silom.

Međutim, glavni problem HAP/Lig prevlake sa 1 mas. % Lig jeste nedostatak antimikrobne aktivnosti koja je neophodna za zaštitu implantata u početnom periodu implantacije. Stoga je dalji tok istraživanja usmeren ka dobijanju biokompozitnih prevlaka dopiranih sa najpoznatijim antimikrobnim agensom, jonima srebra. Krajnji cilj je bio dobijanje kompaktne, dobro prijanjajuće kompozitne Ag/HAP/Lig prevlake sa 1 mas. % Lig sa odličnim antimikrobnim svojstvima, koroziono stabilnom u SBF rastvoru i netoksičnom prema humanim ćelijama.

Antimikrobna aktivnost praha lignina i HAP, Ag/HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu prema dva tipa bakterija (*Escherichia coli* ATCC–25922 i dva soja vrste *Staphylococcus aureus*: ATCC–25923 i soj laboratorije za mikrobiologiju TMF u Leskovcu) i kvasac *Candida albicans* (ATCC–18259) ispitana je agar difuzionom metodom. Nije uočena svetla zona oko ispitanih prevlaka posle 24 h inkubacije u slučaju svih kultura mikroorganizama (slika 60), što dovodi do zaključka

da prevlake treba ispitati drugom antimikrobnom metodom, kao što je metoda preživljavanja bakterija u rastvoru.



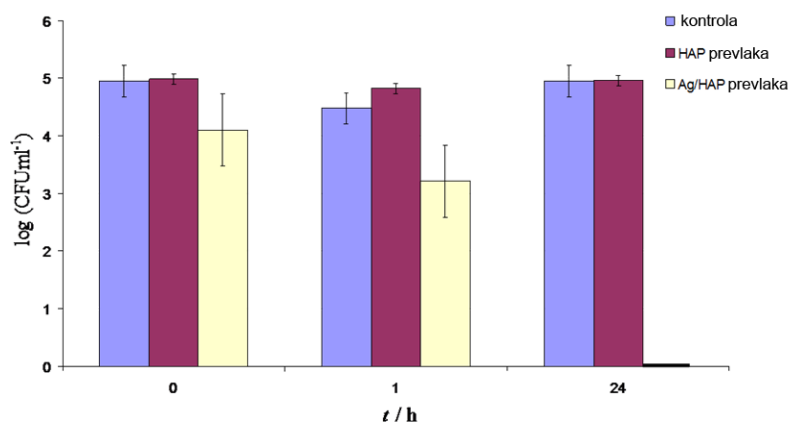
**Slika 60.** Fotografije nesinterovanih i sinterovanih HAP, Ag/HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlaka na titanu ispitanih testom agar difuzije, bakterijama: (a) *E. coli* (ATCC–25922), (b) *S. aureus* (ATCC–25923), (c) *S. aureus* (TMF–Leskovac) i kvascem (d) *C. albicans* (ATCC–18259).

### 5.12.2. Metoda merenja preživljavanja bakterija u rastvoru

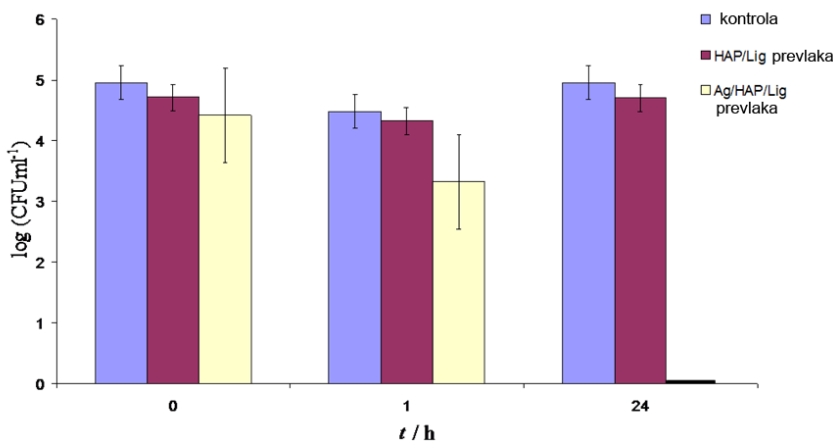
Skorija istraživanja u ortopedskoj hirurgiji su fokusirana na dobijanje i razvoj novih površinski modifikovanih materijala za implantate sa mogućnošću otpuštanja leka adaptiranih određenoj kliničkoj situaciji (antibiotici, antimikrobni agensi itd.) u kontrolisanom i predvidljivom načinu, i u skladu sa uspostavljenim kinetičkim zakonima. Srebro, bilo da su joni ili nanočestice srebra, je najpoznatiji antimikrobni dopant sa širokom primenom u raznim poljima medicine. Uticaj Ag jona još nije

potpuno poznat, ali pretpostavlja se da se srebro vezuje za enzime i proteine bakterijske ćelije i ubrzava njeno umiranje [110].

Stoga ispitana su antimikrobna svojstva HAP, Ag/HAP, HAP/Lig (1 mas. % Lig) i Ag/HAP/Lig (1 mas. % Lig) prevlaka na bakterijskom soju *Staphylococcus aureus*, koja je najčešći uzrok post-operativnih infekcija u ortopedskoj hirurgiji [274]. Antimikrobna aktivnost je ispitana kvantitativnom metodom praćenja promena u broju preživelih bakterijskih ćelija u suspenziji. Kontrolni uzorak je bakterijska suspenzija, kao i HAP i HAP/Lig prevlake, da bi se mogao uporediti antibakterijski efekat srebra Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka. Na slici 61 je predstavljena antimikrobna aktivnost bakterijskog soja *S. aureus* TL u fosfatnom puferu.

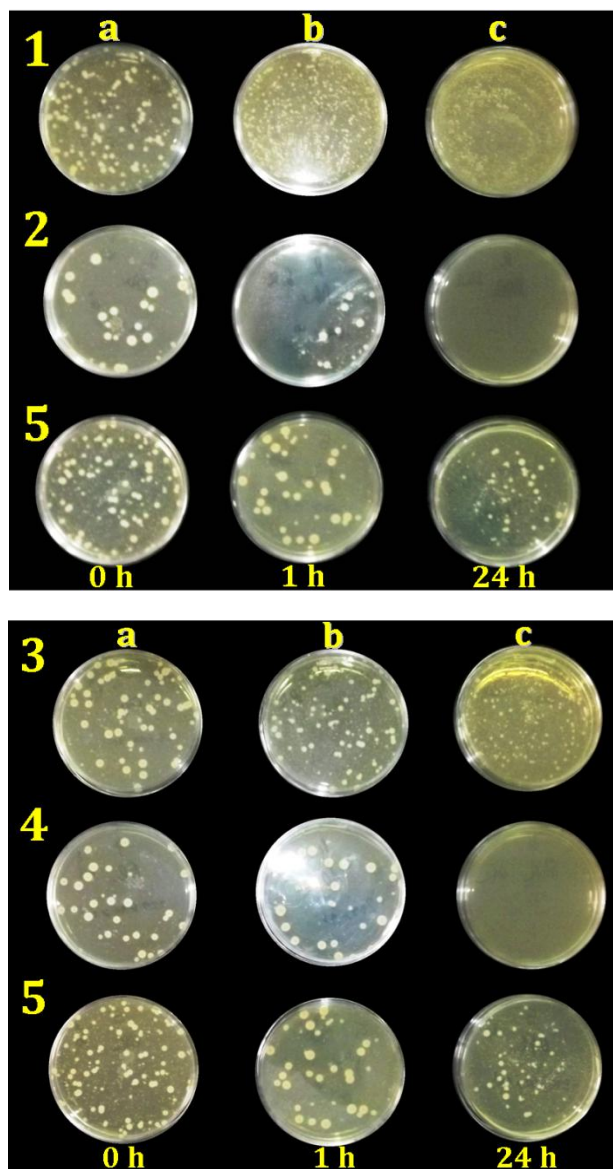


(a)



(b)

**Slika 61.** Redukcioni broj preživelih ćelija *S. aureus* TL nakon kontakta sa: (a) HAP i Ag/HAP prevlakama i (b) HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlakama za 0, 1 h i 24 h u fosfatnom puferu u poređenju sa kontrolom.



**Slika 62.** Antimikrobna aktivnost **1-** HAP, **2-** Ag/HAP, **3-** HAP/Lig i **4-** Ag/HAP/Lig prevlaka na čvrstoj agarnoj podlozi, nakon 0, 1 i 24 h, kolone: **a-**razblaženje 100x, **b-** direktno iz suspenzije, **c-** direktno iz suspenzije, redom, i **5-** kontrola.

Čiste HAP i HAP/Lig prevlake ne pokazuju nikakav antibakterijski efekat i inhibicija nije primećena ni posle 24 h (slike 61 i 62). Mali pad u broju preživelih bakterijskih ćelija u prisustvu HAP i HAP/Lig prevlaka nakon 1 h inkubacije može se objasniti adhezijom ćelija za HAP čestice. Sličan fenomen je zabeležen u istraživanjima Stanic i saradnika [275], gde je ispitivana antimikrobna aktivnost čistog HAP i HAP dopiranog različitim koncentracijama jona srebra *in vitro* u odnosu na različite patogene mikroorganizme.



Prema rezultatima prikazanim na slikama 61 i 62 antimikrobna aktivnost Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka se može primetiti odmah posle inokulacije uzoraka i dodatne redukcije životne sposobnosti ćelija za dve logaritamske jedinice u rastvorima nakon 1 h inkubacije, procenat ćelijske redukcije je 98,17 % i 97,67 %, redom. Na osnovu rezultata oslobođenih jona srebra koncentracija jona srebra posle 1h je iznosila 0,4493 ppm (slika 56), što je dovoljno mala koncentracija za postizanje antibakterijskog efekta bez izazivanja citotoksičnosti (slika 61). U poređenju sa rezultatima Stanic i saradnika, koji se odnose na otpuštanje srebra iz praha hidroksiapatita [275], antimikrobna efikasnost naših Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka se pokazala boljom jer izaziva veću redukciju na *S. aureus* TL i uzorci analizirani posle 24 h ne sadrže nijednu preživelu ćeliju bakterijskog soja i vidljive kolonije nisu detektovane u uzorcima uzetim iz suspenzije prikazanim na slici 62. Prema antibakterijskim ogledima antimikrobna efikasnost naših uzoraka koji sadrže Ag (Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake) je vrlo slična što se može videti iz kinetike uništavanja bakterija prikazane na slici 61. Potpuna redukcija broja bakterija posle 24 h potvrđuje antimikrobnu aktivnost 0,5 mas. % srebra u Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlakama, što u dovoljnoj meri obezbeđuje odličnu zaštitu od infekcije. Na osnovu rezultata, očigledno je trenutno otpuštanje jona srebra koje dovodi do neizbežnog pada CFU broja, posle izlaganja bakterija prevlakama nakon svega 1 h, što potvrđuje baktericidan efekat neophodan za prevenciju formiranja biofilma [258].

## 6. ZAKLJUČAK

- Postupkom elektroforetskog taloženja uspešno su dobijene HAP, Ag/HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlake na titanu zadovoljavajuće debljine, dobre adhezije, uniformne i kompaktne površine bez pukotina na optimizovanim parametrima taloženja (60 V, 45 s).
- Rezultati XRD analize nesinterovanih HAP, Ag/HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlaka utvrdili su da se elektroforetskim taloženjem dobija kristalna struktura čistog hidroksiapatita bez fazne transformacije. Difraktogrami sinterovanih prevlaka su pokazali da su uspešno sinterovane na temperaturi od 900 °C, koja je znatno niža od uobičajene temperature sinterovanja, koja se kreće u rasponu od 1000 °C do 1300 °C, što je posledica korišćenja nanočestičnih HAP i Ag/HAP prahova. Proračunate srednje vrednosti veličine kristalita,  $D_p$ , za koncentracije lignina u opsegu od 0,5 do 10 mas. %, su slične što ukazuje da prisustvo lignina ne menja kristalnu strukturu hidroksiapatita.
- Na osnovu XRD, ATR-FTIR i XPS rezultata potvrđeno je da koncentracija lignina veća od 0,5 mas. % štiti rešetku hidroksiapatita od razgradnje tokom procesa sinterovanja HAP/Lig prevlaka. XPS kvantitativna merenja su pokazala da su vrednosti Ca/P odnosa nesinterovanih HAP i HAP/Lig prevlaka slične vrednostima stehiometrijskog Ca/P odnosu od 1,67 nezavisno od koncentracije prisutnog lignina. Prilikom sinterovanja dolazi do povećanja Ca/P odnosa u slučaju sinterovane HAP prevlake, kao i HAP/Lig prevlake sa 0,5 mas. % lignina što je posledica difuzije jona fosfora iz HAP rešetke u titan, čime je ponovo potvrđena razgradnja hidroksiapatita.
- Rezultati XRD, ATR-FTIR i XPS analiza nesinterovanih Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka su pokazali da nema fazne transformacije hidroksiapatita, kao i da je Ca/P odnos dobijen XPS i EDS analizom približno iznosio 1,64, skoro kao u koštanom tkivu (1,67). Fazna transformacija je primećena kod Ag/HAP prevlake nakon sinterovanja na 900 °C, dok prisustvo lignina u kompozitnoj Ag/HAP/Lig prevlaci štiti HAP rešetku.

- Rezultati TG analize su potvrdili da se termička stabilnost HAP/Lig prevlaka smanjuje sa povećanjem koncentracije lignina i da su HAP, Ag/HAP, HAP/Lig i Ag/HAP/Lig prevlake termički stabilne do 600 °C.
- Ispitana morfologija HAP i HAP/Lig prevlaka SEM analizom pokazala je da se uniformna površina dobija samo u slučaju HAP/Lig prevlaka sa 1 mas. % lignina, pre i posle sinterovanja. Pretpostavlja se da biopolimer lignin omogućava formiranje kompaktne, dobro prijanjajuće i homogene prevlake zbog uspostavljanja četiri vrste vodoničnih veza između funkcionalnih grupa hidroksiapatita i lignina.
- Sa SEM i FE-SEM mikrofotografija prevlaka dopiranih srebrom, jasno je vidljivo da Ag/HAP prevlaka ima površinu pokrivenu pukotinama za razliku od Ag/HAP/Lig prevlake, ali da nakon ispitivanja bioaktivnosti obe površine budu pokrivene novim pločastim kristalima apatitne strukture. Takođe, kompaktna površina Ag/HAP/Lig prevlake ima manje hrapavu i bolje kvašljivu površinu, što je potvrđeno niskom vrednošću ugla kvašenja SBF tečnosti, u poređenju sa Ag/HAP prevlakom.
- Rezultati SEI metode su pokazali da su sinterovane HAP/Lig prevlake koroziono stabilnije u odnosu na nesinterovane HAP/Lig prevlake tokom produženog vremena delovanja SBF rastvora. Zaštitna svojstva nesinterovanih HAP/Lig prevlaka su znatno bolja nego čiste HAP prevlake tokom produženog vremena delovanja SBF rastvora.
- Elektrohemijska merenja su takođe potvrdila da i sinterovane Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake obezbeđuju dobru korozionu zaštitu u SBF rastvoru. Osim toga, povećanje otpornosti u porama prevlake i smanjenje kapacitivnosti prevlake tokom produženog vremena delovanja SBF rastvora takođe ukazuju na rast novog apatitnog sloja.
- Spontani rast novog apatitnog sloja sličnog koštanom tkivu na površinama Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka nakon 7 dana potapanja u SBF rastvor je potvrđen SEM, FE-SEM, XRD, ATR-FTIR i SEI analizama, što znači da Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlake poseduju dobru bioaktivnost. Ipak, ovaj apatitni sloj ne narušava proces otpuštanja srebra iz Ag/HAP i Ag/HAP/Lig

prevlaka i stoga se ovi materijali mogu smatrati za bioaktivne i antimikrobne što je neophodna osobina za uspešnu ugradnju implantata.

- Citotoksičnost je određena MTT testom i ukazuje da HAP/Lig prevlaka sa 1 mas. % lignina blago umanjuje preživljavanje zdravih imunokompetentnih PBMC stimulisanih na proliferaciju mitogenom. Zbog toga je HAP/Lig prevlaka sa 1 mas. % lignina obećavajući netoksični biomaterijal za tkivno inženjerstvo. Međutim, izostanak zone inhibicije rasta bakterija oko ispitane HAP/Lig prevlake sa 1 mas. % lignina ukazuje da prisustvo lignina nema značajan uticaj na antibakterijska svojstva hidroksiapatita.
- Metodom preživljavanja bakterija u rastvoru su ispitana antimikrobna svojstva Ag/HAP i Ag/HAP/Lig prevlaka u odnosu na bakterijski soj *S. aureus* u poređenju sa HAP i HAP/Lig prevlakama. Rezultati su pokazali da dolazi do potpune redukcije rasta bakterija nakon samo 24 h. MTT testom je potvrđeno da je Ag/HAP/Lig prevlaka sa 1 mas. % Lig u poređenju sa Ag/HAP/Lig prevlakom sa 10 mas. % Lig (maksimalna koncentracija lignina) netoksična prema PBMC ćelijama. Na osnovu svih navedenih rezultata može se smatrati da su Ag/HAP/Lig prevlake sa 1 mas. % Lig obećavajući kandidati kao bioaktivni materijali za budući razvoj novih koštanih implantata.

## 7. LITERATURA

- [1] B.L. Seal, T.C. Otero, A. Panitch, *Materials Science and Engineering R* **34** (2001) 147–230.
- [2] C.J. Koh, A. Atala, “Tissue Engineering Cells and Cloning: Current Concepts and Future Trends“, In: Ernst Schering Research Foundation. Workshop Supplement 11. Regenerative and Cell Therapy. Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings **11** (2005) 35–67.
- [3] A.W. Lloyd, *Medical Device Technology* **13** (2002) 18–21.
- [4] C.M. Agrawal, *Journal of Metals* **50** (1998) 31–35.
- [5] S.V. Dorozhkin, *Biomaterials* **31** (2010) 1465–1485.
- [6] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K.W. Leong, *Composites Science and Technology* **61** (2001) 1189–1224.
- [7] R. Singh, N.B. Dahotre, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **18** (2007) 725–751.
- [8] S.R. Paital, N.B. Dahotre, *Materials Science and Engineering R* **66** (2009) 1–70.
- [9] A.A.P. Mansur, H.S. Mansur, *Materials Science and Engineering C* **30** (2010) 288–294.
- [10] V. Olivier, C. Rivière, M. Hindié, J.-L. Duval, G. Bomila-Koradjim, M.-D. Nagel, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **33** (2004) 23–31.
- [11] H-M. Han, G.J. Phillips, S.V. Mikhalovsky, A.W. Lloyd, *New Carbon Materials* **23** (2008) 139–143.
- [12] A. Bigi, E. Boanini, B. Bracci, A. Facchini, S. Panzavolta, F. Segatti, L. Sturba, *Biomaterials* **26** (2005) 4085–4089.
- [13] D.D. Deligianni, N.D. Katsala, P.G. Koutsoukos, Y. F. Missirlis, *Biomaterials* **22** (2001) 87–96.
- [14] P.A. Ramires, A. Romito, F. Cosentino, E. Milella, *Biomaterials* **22** (2001) 1467–1474.
- [15] F. Watari, A. Yokoyama, M. Omori, T. Hirai, H. Kondo, M. Uo, T. Kawasaki, *Composites Science and Technology* **64** (2004) 893–908.
- [16] A.R. Costa-Pinto, R.L. Reis, N.M. Neves, *Tissue Engineering: Part B* **17** (2011) 1–18.
- [17] M. Ueda, *Inflammation and Regeneration* **31** (2011) 202–218.

- [18] H.H. Beherei, G.T. El-Bassoyouni, K.R. Mohamed, *Ceramics International* **34** (2008) 2091–2097.
- [19] I.D. Learmonth, *The Surgeon* **1** (2003) 1–8.
- [20] B. Vagaská, L. Bačáková, E. Filová, K. Balík, *Physiological Research* **59** (2010) 309–322.
- [21] R.Z. LeGeros, *Chemical Reviews* **108** (2008) 4742–4753.
- [22] Q. Chang, D.L. Chen, H.Q. Ru, X.Y. Yue, L. Yu, C.P. Zhang, *Biomaterials* **31** (2010) 1493–1501.
- [23] S.M. Best, A.E. Porter, E.S. Thian, J. Huang, *Journal of the European Ceramic Society* **28** (2008) 1319–1327.
- [24] B.-D. Hahn, J.-M. Lee, D.-S. Park, J.-J. Choi, J. Ryu, W.-H. Yoon, B.-K. Lee, D.-S. Shin, H.-E. Kim, *Acta Biomaterialia* **5** (2009) 3205–3214.
- [25] D. Kumar, J.P. Gittings, I.G. Turner, C.R. Bowen, A. Bastida-Hidalgo, S.H. Cartmell, *Acta Biomaterialia* **6** (2010) 1549–1554.
- [26] W. Cao, L.L. Hench, *Ceramics International* **22** (1996) 493–507.
- [27] L.Tan, X. Yu, P. Wan, K. Yang, *Journal of Materials Science and Technology* **29** (2013) 503–513.
- [28] S. Ali Poursamara, M. Azami, M. Mozafari, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **84** (2011) 310–316.
- [29] J.H. Kim, J.H. Oh, I. Han, H.-S. Kim, S.W. Chung, *Clinics in Orthopedic Surgery* **3** (2011) 191–201.
- [30] H. Dreesmann, „Ueber Knochenplombierung bei Hohlenformigen Defekten des Knochens“, *Bruns Beitr Klin Chir* **9** (1892) 804–810.
- [31] G.E. Levitt, P.H. Crayton, E.A. Monroe, R.A. Condrate, *Journal of Biomedical Materials Research* **3** (1969) 683–685.
- [32] H. Oonishi, L.L. Hench, J. Wilson, F. Sugihara, E. Tsuji, S. Kushitani, H. Iwaki, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **44** (1999) 31–43.
- [33] I. Balać at al.: „Biomaterijali“, edited by D. Raković and D. Uskoković, Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti: Društvo za istraživanje materijala,, Beograd, 2010.
- [34] T.V. Thamaraiselvi, S. Rajeswari, *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* **18** (2004) 9–17.

- [35] S.V. Dorozhkin, *Journal of Material Science* **44** (2009) 2343–2387.
- [36] M. Santin, G. Philips: „Biomimetic, bioresponsive, and Bioactive Materials: An introduction to Integrating Materials with Tissue“, Published by John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2012.
- [37] S.V. Dorozhkin, M. Epple, *Angewandte Chemie International Edition in English* **41** (2002) 3130–3146.
- [38] D.-M. Liu, Q. Yang, T. Troczynski, W.J. Tseng, *Biomaterials* **23** (2002) 1679–1687.
- [39] G. Ciobanu, G. Carja, O. Ciobanu, I. Sandu, A. Sandu, *Micron* **40** (2009) 143–146.
- [40] O. Albayrak, O. El-Atwani, S. Altintas, *Surface and Coatings Technology* **202** (2008) 2482–2487.
- [41] V. Rodríguez-Lugo, J. Sanchez Hernández, M.J. Arellano-Jimenez, P.H. Hernández-Tejeda, S. Recillas-Gispert, *Microscopy and Microanalysis* **11** (2005) 516–523.
- [42] S. Mann: „Biom mineralization-Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry“, Oxford, University Press, 2001.
- [43] W. Jiang, J. Cheng, D.K. Agrawal, A.P. Malshe, H. Liu, *Materials Research Society Symposium Proceedings* **1140** (2009) 140-HH03-03.
- [44] M. Yousefpour, A. Afshar, J. Chen, X. Zhang, *Materials Science and Engineering C* **27** (2007) 1482–1486.
- [45] D.J. Blackwood, K.H.W. Seah, *Materials Science and Engineering C* **29** (2009) 1233–1238.
- [46] J.L. Moreau, H.H.K. Xu, *Biomaterials* **30** (2009) 2675–2682.
- [47] C. Wang, J. Ma, W. Cheng, R. Zhang, *Materials Letters* **57** (2002) 99–105.
- [48] S.-H. Oh, R.R. Finones, C. Daraio, L.-H. Chen, S. Jin, *Biomaterials* **26** (2005) 4938–4943.
- [49] I. Braceras, J.I. Onate, L. Goikoetxea, J.L. Viviente, J.I. Alava, M.A. de Maeztu, *Surface and Coatings Technology* **196** (2005) 321–326.
- [50] J.Y. Han, Z.T. Yu, L. Zhou, *Applied Surface Science* **255** (2008) 455–458.
- [51] P. Cheang, K.A. Khor, *Biomaterials* **17** (1996) 537–544.
- [52] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, P. Thomas, *Biomaterials* **23** (2002) 1065–1072.

- [53] M. Vallet-Regi, E. Ruiz-Hernandez, *Advanced Materials* **23** (2011) 5177–5218.
- [54] W. Suchanek, M. Yoshimura, *Journal of Materials Research* **13** (1998) 94–114.
- [55] J. Liu, X. Ye, H. Wang, M. Zhu, B. Wang, H. Yan, *Ceramics International* **29** (2003) 629–633.
- [56] K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A. R. Boccaccini, *Biomaterials* **27** (2006) 3413–3431.
- [57] S. Bodhak, S. Bose, A. Bandyopadhyay, *Acta Biomaterialia* **6** (2010) 641–651.
- [58] S. Bodhak, S. Bose, A. Bandyopadhyay, *Acta Biomaterialia* **5** (2009) 2178–2188.
- [59] D. Aryal, S. Tripathi, R. Bhasti, *Journal of Dental Implantats* **2** (2013) 92–96.
- [60] J.Y. Martin, Z. Schwartz, T.W. Hummert, D.M. Schraub, J. Simpson, J. Lankford Jr., D.D. Dean, D.L. Cochran, B.D. Boyan, *Journal of Biomedical Materials Research* **29** (1995) 389–401.
- [61] K.A. Thomas, S.D. Cook, *Journal of Biomedical Materials Research* **19** (1985) 875–901.
- [62] D.N. Ungureanu, N. Angelescu, Z. Bacinschi, E.V. Stoian, C.Z. Rizescu, *International Journal of Biology and Biomedical Engineering* **5** (2011) 52–64.
- [63] S. Bhattacharyya: „Processing of Porous Hydroxyapatite Scaffold“, PhD thesis, National Institute of Technology Rourkela, India, 2009.
- [64] M. Mathew, S. Takagy, *Journal of Research - National Institute of Standards and Technology* **106** (2001) 1035–1044.
- [65] Z. Lou, Q. Zeng, X. Chu, F. Yang, D. He, M. Yanga, M. Xiang, X. Zhang, H. Fan, *Applied Surface Science* **258** (2012) 4911–4916.
- [66] H. Pan, B.W. Darvell, *Crystal Growth and Design* **10** (2010) 845–850.
- [67] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J.M. Kenny, *Polymer Degradation and Stability* **95** (2010) 2126–2146.
- [68] T.J. Webster, C.D. Ergun, R.W. Siegel, R. Bizios, *Biomaterials* **22** (2001) 1327–1333.
- [69] S. Kehoe: „Optimisation of Hydroxyapatite (HAp) for Orthopaedic Application via the Chemical Precipitation Technique“, PhD thesis, Dublin City University, Ireland, 2008.
- [70] L. Zhang, T.J. Webster, *Nano Today* **4** (2009) 66–80.



- [71] L. Su, C.C. Berndt, K.A.Gross, *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition* **13** (2002) 977–990.
- [72] C. Shuai, Y. Nie, C. Gao, H. Lu, H. Hu, X. Wen, S. Peng, *Electronic Journal of Biotechnology* **15** (2012) 1–13.
- [73] A. Nather, H.J.C. Ong, Z. Aziz: “*Bone graft and bone substitute: Basic science and clinical application*“, Singapore: World scientific Publishing Company, Edited by Aziz Nather (National University of Singapore, Singapore), 2005, *Chapter I: Structure of bone*, p. 3–17.
- [74] U. Kneser, D.J. Schaefer, E. Polykandrotis, R.E.J. Horch, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **10** (2006) 7–19.
- [75] F. Sun, H. Zhou, J. Lee, *Acta Biomaterialia* **7** (2011) 3813–3828.
- [76] L. Chen, C.Y. Tang, C.P. Tsui, D.Z. Chen, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **22** (2013) 41–50.
- [77] A. Cardoso, J.A. Jansen, S.C.G. Leeuwenburgh, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **100B** (2012) 2316–2326.
- [78] X. Dong, M. Dong, Y. Lu, A. Turley, T. Jin, C. Wu, *Industrial Crops and Products* **34** (2011) 1629–1634.
- [79] M. Swetha, K. Sahithi, A. Moorthi, K. Ramasamy, N. Srinivasan, N. Selvamurugan, *International Journal of Biological Macromolecules* **47** (2010) 1–4.
- [80] G.A. Carlson, J.L. Dragoo, B. Samimi, D.A. Bruckner, G.W. Bernard, M. Hedrick, P. Benhaim, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **321** (2004) 472–478.
- [81] A.R. Boccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, I. Zhitomirsky, *Journal of the Royal Society Interface* **7** (2010) S581–S613.
- [82] X. Pang, I. Zhitomirsky, *International Journal of Nanoscience* **4** (2005) 409–418.
- [83] L. Song, L. Gan, Y.-F. Xiao, Y. Wu, F. Wu, Z.-W. Gu, *Materials Letters* **65** (2011) 974–977.
- [84] X.-J. Tang, L. Gui, X.-Y. Lü, *Biomedical Materials* **3** (2008) 044115.
- [85] D. Puppi, F. Chiellini, A.M. Piras, E. Chiellini, *Progress in Polymer Science* **35** (2010) 403–440.
- [86] Z. Gang, L. Yubao, Z. Li, L. Hong, W. Mingbo, C. Lin, W. Yuanyuan, W. Huanan, S. Pujiang, *Journal of Materials Science* **42** (2007) 2591–2597

- [87] A.L. Rossi, I.C. Barreto, W.Q. Maciel, F.P. Rosa, M.H. Rocha-Leão, J. Werckmann, A.M. Rossi, R. Borojevic, M. Farina, *Bone* **50** (2012) 301–310.
- [88] D. Alves Cardoso, J.J.J.P. van den Beucken, L.L.H. Both, J. Bender, J.A. Jansen, S. C.G. Leeuwenburgh, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2013) <http://doi/10.1002/jbm.a.34754/full>.
- [89] J. Feng, M. Chong, J. Chan, Z.Y. Zhang, S.H. Teoh, E.S. Thian, *Key Engineering Materials* **529-530** (2013) 34–39.
- [90] C.-C. Yu, J.-J. Chang, Y.-H. Lee, Y.-C. Lin, M.-H. Wu, M.-C. Yang, C.-T. Chien, *Materials Letters* **93** (2013) 133–136.
- [91] F.G. Torres, S. Commeaux, O.P. Troncoso, *Journal of Functional Biomaterials* **3** (2012) 864–878.
- [92] M. He, C. Chang, N. Peng, L. Zhang, *Carbohydrate Polymers* **87** (2012) 2512–2518.
- [93] L. Jiang, Y. Li, X. Wang, L. Zhang, J. Wen, M. Gong, *Carbohydrate Polymers* **74** (2008) 680–684.
- [94] Y. Ishikawa, J. Komotori, M. Senna, *Current Nanoscience* **2** (2006) 1–6.
- [95] J. Chen, Q. Yu, G. Zhang, S. Yang, J. Wu, Q. Zhang, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **93** (2012) 100–107.
- [96] H.S. Mansur, A.A.P. Mansur, S.M.C.M. Bicalho, *Key Engineering Materials* **284-286** (2005) 745–748.
- [97] M. Martinez, A. Pacheco, Vargas, M. *Rev. MVZ Córdoba* **14** (2009) 1624–1632.
- [98] J. Wang, J. De Boer, K. De Groot, *Journal of Dental Research* **83** (2004) 296–301.
- [99] C. Fox, „Chemical and thermal characterization of three industrial lignins and their corresponding lignin esters“, PhD Thesis, University of Idaho, 2006.
- [100] H. Palonen, „Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lognocellulose“, PhD thesis, Helsinki Institute of Technology, Finland, 2004.
- [101] R.J.A. Gosselink, A. Abächerli, H. Semke, R. Malherbe, P. Käuper, A. Nadif, J.E.G. van Dam, *Industrial Crops and Products* **19** (2004) 271–281.
- [102] J.C. Domínguez, M. Oliet, M.V. Alonso, M.A. Gilarranz, F. Rodríguez, *Industrial Crops and Products* **27** (2008) 150–156.

- [103] A.L. Macfarlane, „Organosolv delignification of willow: Kinetics, recovery and use“, PhD Thesis, The University of Auckland Auckland, Auckland, New Zealand, 2009.
- [104] G. Henriksson, „Lignin. In Ljungberg Textbook. Pulp and Paper Chemistry and Technology“, Book 1. Wood Chemistry and Wood Biotechnology, Edited by M. Ek, G. Gellerstedt and G. Henriksson, Fiber and Polymer technology, KTH, Stockholm, 2007, 125–148.
- [105] E. Sjöström, „Lignin. In Wood Chemistry, Fundamentals and Applications“, Edited by E. Sjöström, Academic Press, San Diego, 1993b, 71–89.
- [106] M. Oliet, J. Garcia, F. Rodriguez, M.A. Gilarranz, *Chemical Engineering Journal* **87** (2002) 157–162.
- [107] V.F. Felicetta, A. Ahola, J.L. McCarthy, *Journal of the American Chemical Society* **78** (1956) 1899–1900.
- [108] A. Tejado, C. Peña, J. Labidi, J.M. Echeverria, I. Mondragon, *Bioresource Technology* **98** (2007) 1655–1663.
- [109] E. Sjöholm, K. Gustavsson, A. Colmsjö, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* **22** (1999) 663–1685.
- [110] M. González Alriols, A. Tejado, M. Blanco, I. Mondragon, J. Labidi, *Chemical Engineering Journal* **148** (2009) 106-114.
- [111] J.C.F. Walker, „Primary Wood Processing: Principles and Practice“, 2<sup>nd</sup> Edition, Springer, Netherland, 2012, p. 43.
- [112] G. Jiang, D.J. Nowakowski, A.V. Bridgwater, *Thermochimica Acta* **498** (2010) 61–66.
- [113] A.-M. Boudet, *Plant Physiology and Biochemistry* **38** (2000) 81-96.
- [114] I. E. Raschip, C. Vasile, D. Ciolacu, G. Cazacu, *High Performance Polymers* **19** (2007) 603–620.
- [115] Y. Park, W.O.S. Doherty, P. J. Halley, *Industrial Crops and Products* **27** (2008)163–167.
- [116] X. Pan, J. F. Kadla, K. Ehara, N. Gilkes, J. N. Saddler, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** (2006) 5806–5813.
- [117] H.-L. Liu, S.A. Dai, K.-Y. Fu, S.-H. Hsu, *International Journal of Nanomedicine* **5** (2010) 1017–1028.

- [118] J.P. Chen, *Journal of Invasive Cardiology* **19** (2007) 395–400.
- [119] B. J. Nablo, A. R. Rothrock, M. H. Schoenfisch, *Biomaterials* **26** (2005) 917–924.
- [120] A. Simchi, E. Tamjid, F. Pishbin, A.R. Boccaccini, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **7** (2011) 22–39.
- [121] L.G. Harris, R.G. Richards, *Injury-international Journal of The Care of The Injured* **37** (2006) S3–S14.
- [122] <http://colloidalsilversecrets.blogspot.com/2011/03/experts-its-silver-ion-that-gives.html>
- [123] X. Pang, I. Zhitomirsky, *Surface and Coatings Technology* **202** (2008) 3815–3821.
- [124] Y.W. Song, D.Y. Shan, E.H. Han, *Materials Letters* **62** (2008) 3276–3279.
- [125] R.-J. Chung, M.-F. Hsieh, C.-W. Huang, L.-H. Perng, H.-W. Wen, T.-S. Chin, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **76B** (2006) 169–178.
- [126] N. Rameshbabu, T.S. Sampath Kumar, T.G. Prabhakar, V.S. Sastry, K.V.G.K. Murty, K. Prasad Rao, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **80** (2007) 581–591.
- [127] M. Montazeri, C. Dehghanian, M. Shokouhfar, A. Baradaran, *Applied Surface Science* **257** (2011) 7268–7275.
- [128] H.-J. Song, S.-H. Park, S.-H. Jeong, Y.-J. Park, *Journal of Materials Processing Technology* **209** (2009) 864–870.
- [129] M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, A.K. Gogia, *Progress in Materials Science* **54** (2009) 397–425.
- [130] X. Liu, P. K. Chu, C.Ding, *Materials Science and Engineering* **R47** (2004) 49–121.
- [131] A. Scislowska-Czarnecka, E. Menaszek, B. Szaranie, E. Kolaczowska, *Tissue and Cell* **44** (2012) 391–400.
- [132] S. Bauer, P. Schmuki, K. von der Mark, J. Park, *Progress in Materials Science* **58** (2013) 261–326.
- [133] L. Duta, F.N. Oktar, G.E. Stan, G. Popescu-Pelin, N. Serban, C. Luculescu, I.N. Mihailescu, *Applied Surface Science* **265** (2013) 41–49.

- [134] Y. Liu, G. Wu, K. de Groot, *Journal of the Royal Society Interface* **7** (2010) S631–S647.
- [135] P. Ducheyne, W. Van Raemdonck, J. C. Heughebaert, M. Heughebaert, *Biomaterials* **7** (1986) 97–103.
- [136] Y.-Q. Wang, J. Tao, L. Wang, P.-T. He, T. Wang, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* **18** (2008) 631–635.
- [137] R. Bareille, M.H. Lafage-Proust, C. Faucheux, N. Laroche, R. Wenz, M. Dard, J. Amédée, *Biomaterials* **21** (2000) 1345–1352.
- [138] I. Zhitomirsky, L. Gal-Or, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **8** (1997) 213–219.
- [139] A. Fritsche, M. Haenle, C. Zietz, W. Mittelmeier, H.-G. Neumann, F. Heidenau, B. Finke, R. Bader, *Journal of Materials Science* **44** (2009) 5544–5551.
- [140] J.A. Roether, A.R. Boccaccini, L.L. Hench, V. Maquet, S. Gautier, R. Jerome, *Biomaterials* **18** (2002) 3871–3878.
- [141] M.S. Djošić, V.B. Mišković-Stanković, Đ.T. Janačković, Z.M. Kačarević-Popović, R.D. Petrović, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **274** (2006) 185–191.
- [142] M.S. Djošić, V.B. Mišković-Stanković, Z.M. Kačarević-Popović, B.M. Jokić, N. Bibić, M. Mitrić, S.K. Milonjić, R. Jančić-Heinemann, J. Stojanović, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **341** (2009) 110–117.
- [143] M.S. Djošić, V.B. Mišković-Stanković, S. Milonjić, Z.M. Kačarević-Popović, N. Bibić, J. Stojanović, *Materials Chemistry and Physics* **111** (2008) 137–142.
- [144] M.S. Djošić, N. Bibić, M.N. Mitrić, M. Šiljegović, J.N. Stojanović, B. Jokić, Dj.T. Janačković, V.B. Mišković-Stanković, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **11** (2009) 1848–1854.
- [145] I. Corni, M.P. Ryan, A.R. Boccaccini, *Journal of the European Ceramic Society* **28** (2008) 1353–1367.
- [146] M. Ammam, *RSC Advances* **2** (2012) 7633–7646.
- [147] P. Sarkar, P.S. Nicholson, *Journal of the American Ceramic Society* **79** (1996) 1987–2002.
- [148] M.S. Djošić, V.B. Mišković-Stanković, V.V. Srdić, *Journal of the Serbian Chemical Society* **72** (2007) 275–287.

- [149] P.C. Hiemenz: „Principles of Colloid and Surface Chemistry“, Marcel Dekker Inc., New York, 1977, p. 396.
- [150] I. Zhitomirsky, A. Petric, *American Ceramic Society Bulletin* **80** (2001) 41–46.
- [151] S. Radice, H. Dietsch, S. Mischler, J. Michler, *Surface and Coatings Technology* **204** (2010) 1749–1454.
- [152] C. Kaya, I. Singh, A.R. Boccaccini, *Advanced Engineering Materials* **10** (2008) 131–138.
- [153] H. Abdoli, M. Zarabian, P. Alizadeh, S.K. Sadrnezhad, *Ceramics International* **37** (2011) 313–319.
- [154] C.T. Kwok, P.K. Wong, F.T. Cheng, H.C. Man, *Applied Surface Science* **255** (2009) 6736–6744.
- [155] M. Javidi, S. Javadpour, M.E. Bahrololoom, J. Ma, *Materials Science and Engineering C* **28** (2008) 1509–1515.
- [156] A. Stoch, A. Brozek, G. Kmita, J. Stoch, W. Jastrzebski, A. Rakowska, *Journal of Molecular Structure* **596** (2001) 191–200.
- [157] L. Besra, M. Liu, *Progress in Materials Science* **52** (2007) 1–61.
- [158] A.R. Boccaccini, J. Cho, T. Subhani, C. Kaya, F. Kaya, *Journal of the European Ceramic Society* **30** (2010) 1115–1129.
- [159] J.M.J. den Toonder, C.W. Rademaker, C.-L. Hu, *Journal of Electronic Packaging* **125** (2003) 506–511.
- [160] I. Zhitomirsky, *Surface Engineering* **27** (2011) 403–406.
- [161] W.-C. Lin, C.-H. Chen, H.-Y. Tang, Y.-C. Hsiao, J. R. Pan, C.-C. Hu, C. Huang, *Applied Catalysis B: Environmental* **140–141** (2013) 32–41.
- [162] T. Ipeksac, F. Kaya, C. Kaya, *Materials Letters* **100** (2013) 11–14.
- [163] N.P. Benekohal, M.A. Gomez, R. Gauvin, G.P. Demopoulos, *Electrochimica Acta* **87** (2013) 169–179.
- [164] M.M. Hossain, A.H.A. Mamun, J.R. Hahn, *Journal of Physical Chemistry C* **116** (2012) 23153–23159.
- [165] H. Hadraba, D. Drdlik, Z. Chlup, K. Maca, I. Dlouhy, J. Cihlar, *Journal of the European Ceramic Society* **33** (2013) 2305–2312.
- [166] J. Cihlar, D. Drdlik, Z. Cihlarova, H. Hadraba, *Journal of the European Ceramic Society* **33** (2013) 1885–1892.

- [167] B.A. Horri, C. Selomulya, H. Wang, *International journal of hydrogen energy* **37** (2012) 19045–19054.
- [168] J.S. Cherng, M.Y. Ho, T.H. Yeh, W.H. Chen, *Ceramics International* **38S** (2012) S477–S480.
- [169] H. Abdoli, P. Alizadeh, *Materials Letters* **80** (2012) 53–55.
- [170] R. Hadar, D. Golodnitsky, H. Mazor, T. Ripenbein, G. Ardel, Z. Barkay, A. Gladkikh, E. Peled, *Journal of Physical Chemistry B* **117** (2013) 1577–1584.
- [171] M.S. Ata, Y. Sun, X. Li, I. Zhitomirsky, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **398** (2012) 9–16.
- [172] S.D. Seo, I.S. Hwang, S.H. Lee, H.W. Shim, D.W. Kim, *Ceramics International* **38** (2012) 3017–3021.
- [173] Y.-Q. Zhao, D.-D. Zhao, P.-Y. Tang, Y.-M. Wang, C.-L. Xu, H.-L. Li, *Materials Letters* **76** (2012) 127–130.
- [174] J. Ding, X. Yan, Q. Xu, *Materials Chemistry and Physics* **133** (2012) 405–409.
- [175] H. Zhang, X. Zhang, D. Zhang, X. Sun, H. Lin, C. Wang, Y. Ma, *Journal of Physical Chemistry B* **117** (2013) 1616–1627.
- [176] W. Wang, C. Li, J. Li, J. Fan, X. Zhou, *Journal of Rare Earths* **31** (2013) 289–295.
- [177] H. Maleki-Ghaleha, M. Rekabeslami, M.S. Shakeri, M.H. Siadati, M. Javidi, S.H. Talebian, H. Aghajani, *Applied Surface Science* **280** (2013) 666–672.
- [178] C. Ren, Y. He, D. Wang, *Applied Surface Science* **258** (2012) 5739–5745.
- [179] A. Borrell, M. Dolores Salvador, V.G. Rocha, A. Fernández, T. Molina, Rodrigo Moreno, *Journal of Alloys and Compounds* **577** (2013) 195–202.
- [180] H. Jafari, N. Ehsani, S.A. Khalifeh-Soltani, M. Jalaly, *Applied Surface Science* **264** (2013) 128–132.
- [181] J.-F. Huang, B. Wang, H.-J. Li, M. Liu, L.-Y. Cao, C.-Y. Yao, *Corrosion Science* **53** (2011) 834–839.
- [182] T. Uchikoshi, C. Matsunaga, T.S. Suzuki, Y. Sakka, M. Matsuda, *Journal of the Ceramic Society of Japan* **121** (2013) 370–372.
- [183] A.A. Sadeghi, T. Ebadzadeh, B. Raissi, S. Ghashghaie, *Ceramics International* **39** (2013) 7433–7438.

- [184] Y. Sun, Y. Wang, I. Zhitomirsky, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **418** (2013) 131–138.
- [185] L.A. Ma, T.L. Guo, *Ceramics International* **39** (2013) 6923–6929.
- [186] L.C.-K. Liao, Y.-P. Chen, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **429** (2013) 121–128.
- [187] B. Fori, P.-L. Taberna, L. Arurault, J.-P. Bonino, C. Gazeau, P. Bares, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **415** (2012) 187–194.
- [188] A. Chávez-Valdez, M. Herrmann, A.R. Boccaccini, *Journal of Colloid and Interface Science* **375** (2012) 102–105.
- [189] M. F. De Riccardis, D. Carbone, A. Rizzo, *Journal of Colloid Interface Science* **307** (2007) 109–115.
- [190] M.I. Espitia-Cabrera, H.D. Orozco-Hernandez, M.A. Espinosa-Medina, L. Martinez, M.E. Contreras-Garcia, *Advanced Materials Research* **68** (2009) 152–158.
- [191] E. Askari, M. Mehrali, I.H.S.C. Metselaar, N.A. Kadri, Md.M. Rahman, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **12** (2012) 144–150.
- [192] Y. Wang, I. Deen, I. Zhitomirsky, *Journal of Colloid and Interface Science* **362** (2011) 367–371.
- [193] T. Yoshioka, A. Chávez-Valdez, J.A. Roether, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, *Journal of Colloid and Interface Science* **392** (2013) 167–171.
- [194] M. Erol-Taygun, K. Zheng, A.R. Boccaccini, *International Journal of Applied Glass Science* **4** (2013) 136–148.
- [195] F. Pishbin, V. Mouriño, J.B. Gilchrist, D.W. McComb, S. Kreppel, V. Salih, M.P. Ryan, A.R. Boccaccini, *Acta Biomaterialia* **9** (2013) 7469–7479.
- [196] K. Prem Ananth, S. Suganya, D. Mangalaraj, J.M.F. Ferreira, A. Balamurugan, *Materials Science and Engineering C* **33** (2013) 4160–4166.
- [197] Q. Chen, L. Cordero-Arias, J.A. Roether, S. Cabanas-Polo, S. Virtanen, A.R. Boccaccini, *Surface and Coatings Technology* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2013.01.042>.
- [198] E.R. Wise, S. Maltsev, M.E. Davies, M.J. Duer, C. Jaeger, N. Loveridge, R.C. Murray, D.G. Reid, *Chemistry of Materials* **19** (2007) 5055–5057.
- [199] F. Gebhardt, S. Seuss, M.C. Turhan, H. Hornberger, S. Virtanen, A.R. Boccaccini, *Materials Letters* **66** (2012) 302–304.



- [200] S. Mahmoodi, L. Sorkhi, M. Farrokhi-Rad, T. Shahrabi, *Surface and Coatings Technology* **216** (2013) 106–114.
- [201] F. Batmanghelich, M. Ghorbani, *Ceramics International* **39** (2013) 5393–5402.
- [202] I. Deen, I. Zhitomirsky, *Journal of Alloys and Compounds* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2013.01.088>.
- [203] R. Ma, I. Zhitomirsky, *Journal of Alloys and Compounds* **509S** (2011) S510–S513.
- [204] M. Cheong, I. Zhitomirsky, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **328** (2008) 73–78.
- [205] D. Zhitomirsky, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, I. Zhitomirsky, *Journal of Materials Processing Technology* **209** (2009) 1853–1860.
- [206] P. Li, Z. Huang, X. Xiao, *Journal of the Chinese Ceramic Society* **37** (2009) 1864–1868.
- [207] P. Parente, A.J. Sanchez-Herencia, M.J. Mesa-Galan, B. Ferrari, *Journal of Physical Chemistry B* **117** (2013) 1600–1607.
- [208] V.B. Mišković-Stanković: „Organske zaštitine prevlake“, Savez inženjera i tehničara za zaštitu materijala Srbije (SITZAM), Beograd, 2001, p. 105.
- [209] S. Voyutsky: „*Colloid Chemistry*“, Mir Publishers, Moscow, 1978, p. 220.
- [210] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler, *Electrophoresis* **23** (2002) 367–374.
- [211] R.A. Andrievskii, *Poroshkovaya Metallurgiya* **229** (1982) 37–42.
- [212] M.N. Rahaman: „*Ceramic Processing and Sintering (Materials Engineering)*“, Marcel Dekker Inc., New York, 2005.
- [213] S. Eraković, Dj. Veljović, P.N. Diouf, T. Stevanović, M. Mitrić, S. Milonjić, V. Mišković-Stanković, *International Journal of Chemical Reactor Engineering* **7** (2009) A62.
- [214] E. Palcevskis, A. Dindune, L. Kuznecova, A. Lipe, Z. Kanepe, *Latvian Journal of Chemistry* **2** (2005) 128–138.
- [215] Dj. Veljovic, B. Jokic, R. Petrovic, E. Palcevskis, A. Dindune, I.N. Mihailescu, Dj. Janackovic, *Ceramics International* **35** (2009) 1407–1413.
- [216] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, T. Yamamuro, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **3** (1992) 79–83.
- [217] T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods* **65** (1983) 55–63.

- [218] M. Ohno, T. Abe, *Journal of Immunological Methods* **145** (1991) 199–203.
- [219] S. Gomez-Ruiz, G.N. Kaluderovic, S. Prashar, D. Polo-Ceron, M. Fajardo, Z. Zizak, T.J. Sabo, Z.D. Juranic, *Journal of Inorganic Biochemistry* **102** (2008) 1558–1570.
- [220] M. Vujaskovic, B. Radosavljevic, *Serbian Dental Journal* **53** (2006) 104–112.
- [221] P.C. Rath, L. Besra, B.P. Singh, S. Bhattacharjee, *Ceramics International* **38** (2012) 3209–3216.
- [222] K.-C. Kung, T.-M. Lee, T.-S. Lui, *Journal of Alloys and Compounds* **508** (2010) 384–390.
- [223] J-U. Kim, Y-H. Jeong, H.-C. Choe, *Thin Solid Films* **520** (2011) 793-799.
- [224] Y. Wang, X. Zhang, J. Yan, Y. Xiao, M. Lang, *Applied Surface Science* **257** (2011) 6233-6238.
- [225] C. Vasilescu, P. Drob, E. Vasilescu, I. Demetrescu, D. Ionita, M. Prodana, S.I. Drob, *Corrosion Science* **53** (2011) 992–999.
- [226] J. Costa-Rodrigues, A. Fernandes, M.A. Lopes, M.H. Fernandes, *Acta Biomaterialia* **8** (2012) 1137–1145.
- [227] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, *Journal of the European Ceramic Society* **20** (2000) 2377–2387.
- [228] N.Y. Mostafa, *Materials Chemistry and Physics* **94** (2005) 333–341.
- [229] J. Ma, C.H. Liang, L.B. Kong, C. Wang, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14** (2003) 797–801.
- [230] S. Eraković, Dj. Veljović, P.N. Diouf, T. Stevanović, M. Mitrić, Dj. Janačković, I.Z. Matić, Z.D. Juranić, V.B. Mišković-Stanković, *Progress in Organic Coatings* **75** (2012) 275–283.
- [231] H.Z. Ye, X.Y. Liu, H.P. Hong, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **20** (2009) 843–850.
- [232] M.J. Filiaggi, R.M. Pilliar, N.A. Coombs, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **27** (1993) 191–198.
- [233] A. Janković, S. Eraković, A. Dindune, Dj. Veljović, T. Stevanović, Dj. Janačković, V. Mišković-Stanković, *Journal of Serbian Chemical Society* **77** (2012) 1609–1623.

- [234] S. Eraković, A. Janković, Dj. Veljović, E. Palcevskis, M. Mitrić, T. Stevanović, Dj. Janačković, V. Mišković-Stanković, *Journal of Physical Chemistry B* **117** (2013) 1633–1643.
- [235] H. Ye, X.Y. Liu, H. Hong, *Materials Science and Engineering C* **29** (2009) 2036–2044.
- [236] P. Siriphannon, Y. Kameshima, A. Yasumori, K. Okada, S. Hayashi, *Journal of the European Ceramic Society* **22** (2002) 511–520.
- [237] K. Grandfield, I. Zhitomirsky, *Materials Characterization* **59** (2008) 61–67.
- [238] S.Z. Fu, G. Guo, C.Y. Gong, S. Zeng, H. Liang, F. Luo, X.N. Zhang, X. Zhao, Y.Q. Wei, Z.Y. Qian, *Journal of Physical Chemistry B* **113** (2009) 16518–16525.
- [239] N. Roy, A. K. Bhowmick, *Journal of Physical Chemistry C* **116** (2012) 8763–8772.
- [240] C. Garcia, S. Cere, A. Duran, *Journal of Non-Crystalline Solids* **352** (2006) 3488–3495.
- [241] R. Sun, M. Li, Y. Lu, A. Wang, *Materials Characterization* **56** (2006) 250–254.
- [242] H.P. Yang, R. Yan, H.P. Chen, C.G. Zheng, D.H. Lee, D.T. Liang, *Energy and Fuels* **20** (2006) 388–393.
- [243] S.J. Kalita, S. Verma, *Materials Science and Engineering C* **30** (2010) 295–303.
- [244] J. Zhao, X. Lu, K. Duan, L.Y. Guo, S.B. Zhou, J. Weng, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **74** (2009) 159–166.
- [245] A-N.A. El-Hendawy, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **75** (2006) 159–166.
- [246] X. Bai, S. Sandukas, M. R. Appleford, J. L. Ong, A. Rabiei, *Acta Biomaterialia* **5** (2009) 3563–3572.
- [247] E.V. Pecheva, L.D. Pramatarova, M.F. Maitz, M.T. Pham, A.V. Kondyuirin, *Applied Surface Science* **235** (2004) 176–181.
- [248] S. Eraković, A. Janković, I.Z. Matić, Z.D. Juranić, M. Vukašinović-Sekulić, T. Stevanović, V. Mišković-Stanković, *Materials Chemistry and Physics* (2013), <http://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2013.07.047>.
- [249] Q. Yuana, L.K. Sahub, N.A. D'Souza, T.D. Golden, *Materials Chemistry and Physics* **116** (2009) 523–526.

- [250] K.P. Sanosh, M.-C. Chu, A. Balakrishnan, Y.-J. Lee, T.N. Kim, S.-J. Cho, *Current Applied Physics* **9** (2009) 1459–1462.
- [251] L.-N. Wang, J.-L. Luo, *Materials Science and Engineering C* **31** (2011) 748–754.
- [252] P.C. Rodrigues, M.P. Cantao, P. Janissek, P.C.N. Scarpa, A.L. Mathias, L.P. Ramos, M.A.B. Gomes, *European Polymer Journal* **38** (2002) 2213–2217.
- [253] B. Scholze, D. Meier, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **60** (2001) 41–54.
- [254] P. Mousavioun, W.O.S. Doherty, G. George, *Industrial Crops and Products* **32** (2010) 656–661.
- [255] S. Kubo, J.F. Kadla, *Biomacromolecules* **4** (2003) 561–567.
- [256] L.C. Mendes, R.C. Rodrigues, E. P. Silva, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **101** (2010) 899–905.
- [257] A. Stoch, W. Jastrzebski, A. Brozek, B. Trybalska, M. Cichocinska, E. Szarawara, *Journal of Molecular Structure* **511–512** (1999) 287–294.
- [258] Z.Q. Yao, Yu. Ivanisenko, T. Diemant, A. Caron, A. Chuvilin, J. Z. Jiang, R. Z. Valiev, M. Qi, H.-J. Fecht, *Acta Biomaterialia* **6** (2010) 2816–2825.
- [259] A. Roguska, M. Pisarek, M. Andrzejczuk, M. Dolata, M. Lewandowska, M. Janik-Czachor, *Materials Science and Engineering C* **31** (2011) 906–914.
- [260] C. Battistoni, M.P. Casaletto, G.M. Ingo, S. Kaciulis, G. Mattogno, L. Pandolfi, *Surface and Interface Analysis* **29** (2000) 773–781.
- [261] A. Dupraz, T.P. Nguyen, M. Richard, G. Daculsi, N. Passuti, *Biomaterials* **20** (1999) 663–673.
- [262] C. Viornerly, Y. Chevolut, D. Leonard, B.-O. Aronsson, P. Pechy, H. J. Mathieu, P. Descouts, M. Gratzel, *Langmuir* **18** (2002) 2582–2589.
- [263] K.M. Watling, J.F. Parr, L. Rintoul, C.L. Brown, L.A. Sullivan, *Spectrochimica Acta A* **80** (2011) 106–111.
- [264] M.M. Popović, B.N. Grgur, V.B. Mišković-Stanković, *Progress in Organic Coatings* **52** (2005) 359–365.
- [265] M. Sluyters-Rehbach, *Pure and Applied Chemistry* **66** (1994) 1831–1891.
- [266] V.D. Jović, B.M. Jović, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **541** (2003) 1–11.
- [267] R.D. Surudžić, S.G. Eraković, V.B. Mišković-Stanković, *Hemijaska industrija* **66**, 2 (2012) 187–192.

- [268] G. Manivasagam, D. Dhinasekaran, A. Rajamanickam, *Recent Patents in Corrosion Science* **2** (2010) 40–54.
- [269] J.-H. Park, D.-Y. Lee, K.-T. Oh, Y.-K. Lee, K.-M. Kim, K.-N. Kim, *Materials Letters* **60** (2006) 2573–2577.
- [270] Y. Chen, X. Zheng, Y. Xie, H. Ji, C. Ding, H. Li, K. Dai, *Surface and Coatings Technology* **205** (2010) 1892–1896.
- [271] K. Jamuna-Thevi, S. A. Bakar, S. Ibrahim, N. Shahab, M. R. M. Toff, *Vacuum* **86** (2011) 235–241.
- [272] V. Ugartondo, M. Mitjans, M. Pilar Vinardell, *Bioresource Technology* **99** (2008) 6683–6687.
- [273] G. Sjogren, G. Sletten, J.E. Dahl, *The Journal of Prosthetic Dentistry* **84** (2000) 229–236.
- [274] Y. Li, J. Ho, C. P. Ooi, *Materials Science and Engineering C* **30** (2010) 1137–1144.
- [275] V. Stanic, S. Dimitrijevic, J. Antic-Stankovic, M. Mitric, B. Jokic, I.B. Plecas, S. Raicevic, *Applied Surface Science* **256** (2010) 6083–6089.

## **Biografija autora**

Sanja Eraković je rođena 06.12.1981. godine, u Beogradu. Završila je VI beogradsku gimnaziju u Beogradu. Na Tehnološko-metalurški fakultet upisala se 2000. godine, a diplomirala je 2006. godine sa srednjom ocenom 8,68. Školske 2006/07 upisala je doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu.

Sanja Eraković je bila stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, od 2008. godine, a od 2011. godine zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta kao istraživač na projektu III 45019 u okviru podprojekta 2, čiji je rukovodilac prof. dr Vesna Mišković-Stanković. Takođe, učestvuje na jednom međunarodnom projektu i jednom bilateralnom projektu saradnje Republika Srbija/Republika Slovenija.

Oblast naučno-istraživačkog rada Sanje Eraković obuhvata elektrohemijske postupke taloženja i karakterizacije biokeramičkih i novih biokompozitnih prevlaka hidroksiapatita i biopolimera lignina, kao i proučavanje njihove korozijske stabilnosti i biokativnosti.

Sanja Eraković je koautor osam radova u naučnim časopisima, od čega 5 radova u časopisima međunarodnog značaja i 2 rada u časopisima nacionalnog značaja, kao i 19 naučnih saopštenja u zbornicima međunarodnih (14) i nacionalnih skupova (5)

Provela je tri meseca na studijskom boravku tokom 2011. godine, na izradi eksperimentalnog dela doktorske disertacije u CRB laboratoriji na Laval Univerzitetu u Kvebeku, Kanada, kao deo dugogodišnje naučne saradnje na problematici Biokeramičkih prevlaka. Takođe, bila je na studijskom boravku tokom 2012. godine, u NILPRP-The Laser-Surface-Plasma Interactions Laboratory, National Institute for Laser, Plasma and Radiation Physics u Bukureštu, Rumunija, u okviru projekta REGPOT-FP7.

Sanja Eraković je član Srpskog hemijskog društva, Međunarodnog društva za elektrohemiju i Srpskog društva istraživača raka.

Služi se engleskim, ruskim i nemačkim jezikom.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана                      Сања Ераковић  
број индекса                    ДС - 2006/41

### Изјављујем

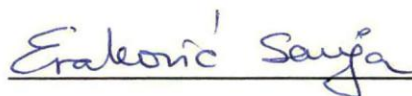
да је докторска дисертација под насловом

### ЕЛЕКТРОФОРЕТСКО ТАЛОЖЕЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ХИДРОКСИАПАТИТ/ЛИГНИН И СРЕБРО/ХИДРОКСИАПАТИТ/ЛИГНИН ПРЕВЛАКА НА ТИТАНУ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, 2. јула 2013. године

Потпис докторанда



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора  
Број индекса  
Студијски програм  
Наслов рада

Сања Ераковић  
ДС - 2006/41  
Хемија и хемијска технологија

**ЕЛЕКТРОФОРЕТСКО ТАЛОЖЕЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА  
ХИДРОКСИАПАТИТ/ЛИГНИН И СРЕБРО/ХИДРОКСИАПАТИТ/ЛИГНИН  
ПРЕВЛАКА НА ТИТАНУ**

Ментор др Весна Мишковић-Станковић, редовни професор ТМФ

Потписана Сања Ераковић

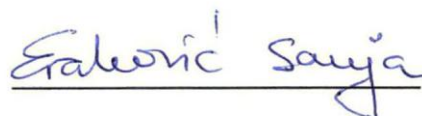
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 2. јула 2013. године





### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

### **ЕЛЕКТРОФОРЕТСКО ТАЛОЖЕЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ХИДРОКСИАПАТИТ/ЛИГНИН И СРЕБРО/ХИДРОКСИАПАТИТ/ЛИГНИН ПРЕВЛАКА НА ТИТАНУ**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

**Потпис докторанда**

У Београду, 2. јула 2013. године

