

Biomimetska sinteza i karakterizacija nanokompozita kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala

Erceg, Ina

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:261849>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ina Erceg

**BIOMIMETSKA SINTEZA I KARAKTERIZACIJA
NANOKOMPOZITA KALCIJEVIH FOSFATA I
TITANATNIH NANOMATERIJALA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica: dr. sc. Maja Dutour Sikirić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ina Erceg

**BIOMIMETIC SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION
OF CALCIUM PHOSPHATE AND TITANIUM
NANOMATERIALS NANOCOMPOSITES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Maja Dutour Sikirić, PhD

Zagreb, 2022



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



Rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-2018-01-1493 "Mehanizmi nastajanja kalcijevih fosfata na anorganskim nanomaterijalima. Biomimetski put pripreve multifunkcionalnih nanokompozita za regeneraciju čvrstih tkiva, CaPBiomimNanocomp" voditeljice dr. sc. Maje Dutour Sikirić.

Zahvale

Prva i najveća zahvala ide mojoj mentorici Maji od koje sam jako puno naučila, što o poslu, što o znanosti općenito. Hvala Vam što ste uvijek bili na raspolaganju i čuvali mi leđa, a ponajviše Vam hvala što ste stvorili okruženje u kojem je bio užitek izraditi doktorsku disertaciju.

Za rješavanje problema koji nisu toliko znanstvene koliko političke prirode, velika zahvala ide Dariji. Hvala ti što si uvijek bila tu, slušala me i usmjeravala. Hvala Vidi, mojoj cimerici, što je samnom podijelila svoja informatička znanja i uskratila me puno muka. Hvala i svim ostalim članicama Laboratorija za biokoloide i površinsku kemiju. Hvala Ljerki na pomoći oko same izrade ove doktorske disertacije. Posebna zahvala ide Ani i Suzani. Hvala vam što ste super tim i oslonac te uvijek imale originalne teme za razgovore.

Hvala i svim suradnicima koji su pomogli u izradi ove doktorske disertacije: dr. sc. Suzani Šegoti, dr. sc. Nadici Maltar Strmečki, dr. sc. Damiru Kralju, dr. sc. Jasminki Kontrec, dr. sc. Atiđi Selmani, dr. sc. Andreji Gajović, dr. sc. Ivani Panžić, dr. sc. Ivani Tartaro Bujak, dr. sc. Mariji Čurlin i dr. sc. Anne Leriche. Kolegama s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada te kolegama iz Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju zahvaljujem na pristupu instrumentima.

Hvala mojoj obitelji koja je bila uz mene 22 godine mog obrazovanja. Mislim da sam sada gotova. Hvala mami Mariji koja je proživljavala sve ovo puno emocionalnije od mene. Ovaj doktorat je i tvoj. Najslađa zahvala ide Darku i Emi. Hvala što ste mi bili gramatike i što ste se zbilja trudili shvatiti čime se točno bavim. Hvala Sandru što je vrlo ozbiljno shvaćao moje vrlo strane probleme oko doktorata, hvala ti što si prošao ovo samnom.

Hvala i svim mojim prijateljima, pogotovo mojoj znanstvenoj kumi. Onima koji su uz mene još od osnovne škole, ali i onima koji su se tek nedavno uključili. Hvala mojoj podršci iz drugih dijelova Hrvatske, ali i Europe pa sve do otoka. Hvala i mojim prijateljima koji misle da znam napraviti atomsku bombu što imaju tako visoko mišljenje o mom znanju. Hvala vam na svim kavama, razgovorima i zabavama. Užitek je i družiti se i raditi sa svima vama.

Ina

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Taložni procesi.....	4
2.1.1. Nukleacija	6
2.1.2. Rast kristala	9
2.1.3. Starenje kristala	12
2.1.4. Utjecaj aditiva.....	13
2.2. Kalcijevi fosfati.....	14
2.2.1. Vrste kalcijevih fosfata.....	14
2.2.1.1. Amorfni kalcijev fosfat.....	16
2.2.1.2. Kalcij – deficijentni hidroksiapatit	18
2.2.1.3. Hidroksiapatit.....	19
2.2.2. Stabilnost kalcijevih fosfata	20
2.2.3. Utjecaj aditiva na taloženje kalcijevih fosfata	21
2.2.3.1. Albumin iz govedjeg seruma.....	22
2.2.3.2. Kitozan	24
2.2.4. Biomimetska sinteza kalcijevih fosfata.....	25
2.3. Titanatni i TiO₂ nanomaterijali	27
2.3.1. Sinteza titanatnih nanomaterijala	29
2.3.2. Primjena titanatnih nanomaterijala.....	30
2.3.2.1. Titanatni biomaterijali	31
2.4. Adsorpcija proteina	33
2.4.1. Kinetika adsorpcije proteina.....	34
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	39
3.1. Materijali	39
3.1.1. Materijali za sintezu titanatnih nanomaterijala.....	39
3.1.2. Materijali za pripremu simulirane tjelesne tekućine.....	39
3.1.3. Materijali za taloženje kalcijevih fosfata	39
3.1.4. Materijali za adsorpciju albumina iz govedjeg seruma	39
3.2. Sinteze nanomaterijala, hidroksiapatita i priprema medija	40

3.2.1. Sinteza titanatnih nanožica	40
3.2.2. Sinteza titanatnih nanocjevčica.....	40
3.2.3. Sinteza TiO ₂ nanopločica.....	40
3.2.4. Priprema korigirane tjelesne tekućine	41
3.2.5. Sinteza hidroksiapatita.....	42
3.3. Eksperimentalni postupci.....	42
3.3.1. Taloženje kalcijevih fosfata iz simulirane tjelesne tekućine.....	42
3.3.2. Taloženje kalcijevih fosfata iz suspenzije.....	42
3.3.2.1. Taloženje kalcijevih fosfata u kontrolnom sustavu.....	43
3.3.2.2. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti TiNM i aditiva.....	43
3.3.3. Određivanje stabilnosti titanatnih nanomaterijala i aditiva u različitim medijima.....	44
3.3.4. Praćenje kinetike adsorpcije albumina na kalcijeve fosfate, titanatne nanomaterijale i njihove kompozite	44
3.3.5. Istraživanje međudjelovanja albumina s kalcijevim fosfatima, titanatnim nanomaterijalima i njihovim kompozitima spektroskopskim metodama	45
3.4. Eksperimentalne metode	45
3.4.1. Potencijometrija.....	45
3.4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom	45
3.4.3. Ramanova spektroskopija	46
3.4.4. Difrakcija rendgenskih zraka na praškastom uzorku.....	47
3.4.5. Termogravimetrijska analiza	47
3.4.6. Brunauer-Emmet-Teller metoda određivanja specifične površine	48
3.4.7. Elektronska paramagnetska rezonancija	49
3.4.8. Pretražna elektronska mikroskopija	49
3.4.9. Transmisijska elektronska mikroskopija.....	50
3.4.10. Mikroskopija atomskih sila	50
3.4.11. Dinamičko i elektroforetsko raspršenje svjetlosti	51
3.4.12. UV-Vis spektroskopija.....	53
3.4.13. Fluorescencijska spektroskopija	53
3.5. Obrada podataka	55
3.5.1. Potencijometrija.....	55
3.5.2. Kinetika adsorpcije albumina na kalcijeve fosfate, titanatne nanomaterijale i njihove kompozite	55
3.5.3. Spektroskopijsko istraživanje međudjelovanja kalcijevih fosfata, titanatnih nanomaterijala i njihovih kompozita s albuminom.....	55
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	57
4.1. Karakterizacija titanatnih nanomaterijala, aditiva i hidroksiapatita.....	57

4.1.1. Sastav, struktura i morfologija titanatnih nanomaterijala, aditiva i hidroksiapatita	57
4.1.1.1. TiO_2 nanočestice.....	57
4.1.1.2. TiO_2 nanopločice.....	60
4.1.1.3. Titanatne nanocjevčice.....	63
4.1.1.4. Titanatne nanožice	66
4.1.1.5. Albumin iz goveđeg seruma.....	69
4.1.1.6. Kitozan	70
4.1.1.7. Hidroksiapatit.....	72
4.1.2. Stabilnost titanatnih nanomaterijala, albumina i kitozana u različitim medijima.....	75
4.1.2.1. Stabilnost titanatnih nanomaterijala i aditiva u anionskoj komponenti taložnog sustava.....	76
4.1.2.2. Stabilnost titanatnih nanomaterijala u anionskoj komponenti taložnog sustava u prisutnosti albumina.....	80
4.1.2.3. Stabilnost titanatnih nanomaterijala u anionskoj komponenti taložnog sustava u prisutnosti kitozana.....	83
4.1.2.4. Stabilnost titanatnih nanomaterijala i albumina u fosfatnom puferu.....	86
4.1.2.5. Stabilnost titanatnih nanomaterijala u fosfatnom puferu s dodatkom albumina	89
4.1.2.6. Stabilnost titanatnih nanomaterijala i albumina u simuliranoj tjelesnoj tekućini	91
4.1.2.7. Stabilnost titanatnih nanomaterijala u simuliranoj tjelesnoj tekućini s dodatkom albumina ...	94
4.2. Biomimetska sinteza nanokompozita kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala taloženjem iz simulirane tjelesne tekućine.....	96
4.2.1. Biomimetska sinteza kalcijevih fosfata na titanatnim nanomaterijalima u simuliranoj tjelesnoj tekućini.....	97
4.2.2. Biomimetska sinteza kalcijevih fosfata na titanatnih nanomaterijala u simuliranoj tjelesnoj tekućini u prisutnosti albumina iz goveđeg seruma	103
4.3. Biomimetska sinteza nanokompozita kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala taloženjem iz suspenzije.....	108
4.3.1. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti titanatnih nanomaterijala.....	109
4.3.1.1. Utjecaj titanatnih nanomaterijala na kinetiku taloženja kalcijevih fosfata.....	109
4.3.1.2. Utjecaj titanatnih nanomaterijala na svojstva amorfnе faze.....	112
4.3.1.3. Utjecaj titanatnih nanomaterijala na svojstva kristalne faze.....	115
4.3.2. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti albumina iz goveđeg seruma.....	125
4.3.2.1. Utjecaj albumina i titanatnih nanomaterijala na kinetiku taloženja kalcijevih fosfata	125
4.3.2.2. Utjecaj albumina iz goveđeg seruma i titanatnih nanomaterijala na svojstva kristalne faze .	128
4.3.3. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti kitozana	133
4.3.3.1. Utjecaj kitozana i titanatnih nanomaterijala na kinetiku taloženja kalcijevih fosfata.....	134
4.3.3.2. Utjecaj kitozana i titanatnih nanomaterijala na svojstva istaložene kristalne faze	136
4.4. Međudjelovanje albumina iz goveđeg seruma s kalcijevim fosfatima, titanatnim nanomaterijalima i njihovim kompozitima s kalcijevim fosfatima	142

4.4.1. Kinetika adsorpcije albumina iz goveđeg seruma na kalcijeve fosfate, titanatne nanomaterijale i njihove kompozite s kalcijevim fosfatima	142
4.4.1.1. Utjecaj albumina iz goveđeg seruma na svojstva adsorbensa nakon adsorpcije.....	143
4.4.1.2. Praćenje kinetike adsorpcije albumina	150
4.4.2. Spektroskopsko istraživanje međudjelovanja albumina s kalcijevim fosfatima, titanatnim nanomaterijalima i njihovim kompozitima.....	157
§ 5. ZAKLJUČAK	163
§ 6. POPIS KRATICA.....	165
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	168
§ 8. DODATAK.....	XVI
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

Biomimetska sinteza i karakterizacija nanokompozita kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala

Ina Erceg
Institut Ruđer Bošković

Kompoziti kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala, zbog komplementarnih svojstava komponenti, privlače sve veću pažnju kao napredni materijali za regeneraciju čvrstih tkiva. Dosadašnja istraživanja takvih nanokompozita većinom su usmjerena na prekrivanje nanostrukturiranih TiO₂ površina kalcijevim fosfatima kako bi se poboljšala njihova bioaktivnost.

Cilj ovog doktorata sustavno je istražiti biomimetsko nastajanje nanokompozita kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala u uvjetima što bližim fiziološkim. Uspoređena su dva načina sinteze nanokompozita, inkubiranjem u simuliranoj tjelesnoj tekućini te taloženjem iz suspenzije. Također je određen utjecaj biološki aktivnih molekula, albumina iz goveđeg seruma (BSA) i kitozana, na nastajanje nanokompozita. Kako bi se dobio uvid u ponašanje sintetiziranih kompozita *in vivo*, određeni su parametri adsorpcije i vezanja albumina iz seruma, proteina koji se pri ugradnji prvi veže na površinu implantata.

Dobiveni rezultati ukazuju da je taloženje brza i svestrana metoda pripreme nanokompozita kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala u kojoj se, neovisno o vrsti titanatnih nanomaterijala, ne mijenja sastav niti struktura kalcijevih fosfata. Takvi nanokompoziti pokazuju poboljšana svojstva adsorpcije proteina u odnosu na čiste kalcijeve fosfate, što ukazuje na njihov potencijal u biomedicinskim primjenama.

(186 + XV stranica, 90 slika, 34 + XXVII tablica, 397 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: albumin iz goveđeg seruma/ kalcijevi fosfati/ kitozan/ nanokompoziti/ simulirana tjelesna tekućina/ taloženje/ titanatni nanomaterijali

Mentor: dr. sc. Maja Dutour Sikirić, v. zn. sur.

Rad prihvaćen: 7. rujna 2022.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Davor Kovačević, PMF, Zagreb
2. prof. dr. sc. Snežana Miljanić, PMF, Zagreb
3. dr. sc. Tanja Jurkin, v. zn. sur., IRB, Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

Biomimetic Synthesis and Characterization of Calcium Phosphates and Titanium Nanomaterials Nanocomposites

Ina Erceg
Ruđer Bošković Institute

Calcium phosphates and TiO₂ nanomaterials composites are attracting attention as advanced materials for bone regeneration due to the complementary properties of the components. Current studies of such composites focus on coating TiO₂ nanostructures with calcium phosphate layers to improve their bioactivity.

The aim of this doctoral thesis was to systematically investigate the biomimetic preparation of nanocomposites based on calcium phosphate and titania nanomaterials under physiological conditions. Two methods of nanocomposite synthesis were compared, immersion in simulated body fluid and precipitation from a suspension. In addition, the influence of biologically active molecules, bovine serum albumin and chitosan, was determined. To evaluate the *in vivo* behavior of the prepared composites, the adsorption and binding parameters of serum albumin were determined, since this protein is the first to interact with the implant materials after implantation.

The obtained results showed that precipitation from solution is a rapid and versatile method for preparing TiO₂ and calcium phosphate composites, in which no changes in the composition or structure of the calcium phosphate phase depending on the type of titanium nanomaterials was observed. Such composites exhibit improved protein adsorption properties, indicating their potential for biomedical applications.

(186 + XV pages, 90 figures, 34 + XXVII tables, 397 references, original in Croatian)

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

Keywords: bovine serum albumin / calcium phosphates / chitosan / nanocomposites / precipitation / simulated body fluid / titanate nanomaterials

Supervisor: Dr. Maja Dutour Sikirić, Senior Research Associate

Thesis accepted: 7th September 2022

Reviewers:

Dr. Davor Kovačević, Professor
Dr. Snežana Miljanić, Professor
Dr. Tanja Jurkin, Senior Research Associate

§ 1. UVOD

Različita kronična oboljenja, među kojima se posebno ističu oboljenja čvrstih tkiva odnosno kostiju i zuba, sve su značajniji problem modernog društva.^{1,2} Često se takva oboljenja mogu liječiti samo ugradnjom implantata kako bi se omogućila regeneracija oštećenog ili oboljelog tkiva. Zbog sve dužeg životnog vijeka pacijenata, sve češća je potreba zamijene implantata u svrhu održavanja funkcionalnosti oštećenog ili zamijenjenog tkiva.³ Kako bi se navedeni problem riješio, potrebno je razviti inovativne multifunkcionalne materijale poboljšanih svojstava. Uz sposobnost zamijene oštećenog tkiva i/ili omogućavanje njegove regeneracije, novi materijali trebali bi imati poboljšana mehanička svojstva, a po mogućnosti služiti i kao lokalni sustavi za kontroliranu isporuku lijekova.³⁻⁵ Uz navedeno, takvi materijali trebali bi biti proizvedeni na ekološki i ekonomski prihvatljiv način kako bi cjenovno bili prihvatljiviji što većem broju pacijenata.

Kalcijevi fosfati (CaP) posebno su zanimljivi u razvoju novih implant materijala za regeneraciju čvrstih tkiva zbog svoje sličnosti mineralnoj komponenti kostiju.^{6,7} U tkivima se javljaju prvenstveno u obliku nestehiometrijskog i slabo kristaliziranog hidroksiapatita poznatog kao biološki apatit.⁸ Općenito, CaP su biokompatibilni i biorazgradivi te zbog toga mogu poslužiti i kao sustavi za isporuku lijekova.⁴ No, glavni nedostatak korištenja CaP kao potencijalnih implant materijala njihova su vrlo slaba mehanička svojstva. Jedan od načina rješavanja ovog problema, korištenje je kompozitnih materijala kalcijevih fosfata i drugih (nano)materijala koji bi poboljšali njihova mehanička svojstva.⁹

Među različitim vrstama nanomaterijala, TiO₂ nanomaterijali (TiNM) privlače pažnju kao potencijalni implant materijali zbog odličnih mehaničkih svojstava i otpornosti na koroziju.¹⁰ Osnovni nedostatak titana i njegovih legura kao implant materijala njihova je bioinertnost. Kako bi se biološka svojstva poboljšala, primjenjuju se različite površinske modifikacije, morfološke i/ili (bio)kemijske.^{10,11} Najčešće se površina titanskih implantata presvlači slojem CaP različitim metodama.¹² TiO₂ nanomaterijali različitih dimenzionalnosti (nanočestice (TiNP), nanocjevčice (TiNT), nanožice (TiNW), nanopločice (TiNPI) postaju sve važniji u brojnim primjenama.¹³⁻¹⁶ Oni se, osim po morfologiji, razlikuju i po kristalnoj strukturi (anatas, rutil, amorfni TiO₂, titanati), a posljedično i po strukturi te svojstvima površine.

Smatra se da su kompoziti CaP s TiNM (CaP/TiNM) moguće rješenje glavnih problema koji se danas javljaju u primjeni materijala za regeneraciju čvrstih tkiva temeljenih na CaP kao što su loša mehanička svojstva keramika i cementa te slaba adhezija presvlaka na površini implantata.^{17,18} Ti materijali se koriste u obliku keramike, cementa ili presvlaka.^{2,17,19}

Prednost korištenja CaP/TiNM kompozita u biomedicinske svrhe, mogućnost je vrlo jednostavne biomimetske pripreme taloženjem iz suspenzije ili korištenjem simulirane tjelesne tekućine (SBF).^{20,21} Takve tekućine u svom sastavu sadrže sve glavne anorganske komponente krvne plazme, stoga mogu se koristiti i kao indikatori bioaktivnosti *in vivo*.²² No kako bi uopće došlo do nastajanja CaP na površini materijala, inkubacija CaP u SBF-u treba trajati od nekoliko dana pa do nekoliko tjedana. Taj problem se može riješiti povećanjem koncentracije SBF-a²³, modifikacijom površine supstrata²⁴ ili korištenjem drugih metastabilnih otopina koje sadrže kalcijeve i fosfatne ione^{25,26}. Jedan od načina na koji je moguće ubrzati nastajanje CaP iz SBF-a je taloženje iz prezasićenih otopina koje sadrže TiNM. Nanokompozite CaP i TiNM u obliku praha moguće je pripremiti različitim metodama kao što su hidrotermalne metode provedene pod utjecajem visoke gravitacije²⁷ ili mikrovalnog zračenja²⁸, *in situ* taloženje pri visokim temperaturama²⁹, mehanokemijske sinteze³⁰ te sol-gel metode^{31,32}. No, za biomimetsku pripremu takvih nanokompozita posebno su važne hidrotermalne sinteze pri relativno niskim temperaturama koje, osim što omogućuju sintezu CaP što sličniju onoj u biološkim sustavima, daju uvid i u utjecaj TiNM na taloženje CaP. Usporedba utjecaja TiNM različitih svojstava na taloženje CaP u istim eksperimentalnim uvjetima daje vrlo bitnu informaciju o utjecaju svojstava TiNM na taloženje CaP. Usporedba istraživanja nastajanja CaP na TiNM iz SBF-a i taloženjem iz prezasićenih otopina omogućuje razvoj racionalnog pristupa u dizajniranju novih biomaterijala te unapređivanje i pojednostavljenje metode sinteze. No, biomimetske sinteze kompozita CaP i TiNM vrlo su rijetke i često orijentirane na određivanje bioaktivnosti titanatnih nanomaterijala. Do sada su Ruso i suradnici pokazali da amorfnu kalcijev fosfat može nastati na nanočesticama anatas TiO₂ faze već nakon jednog dana inkubiranja u SBF-u.³³

Prema trenutno dostupnoj literaturi, sistematsko istraživanje strukture i svojstava TiNM na taloženje CaP do sada nije opisano. Stoga je cilj ove doktorske radnje sustavno istražiti međudjelovanje CaP i TiNM različite morfologije kako bi se utvrdio odnos između površinskih svojstava TiNM i svojstva CaP nastalih u uvjetima bliskim fiziološkim i time uspostavila biomimetska priprema njihovih kompozita. U tu svrhu, uspoređena su dva načina biomimetske sinteze CaP/TiNM, inkubiranjem u SBF-u i taloženjem iz suspenzije kako bi se odredio

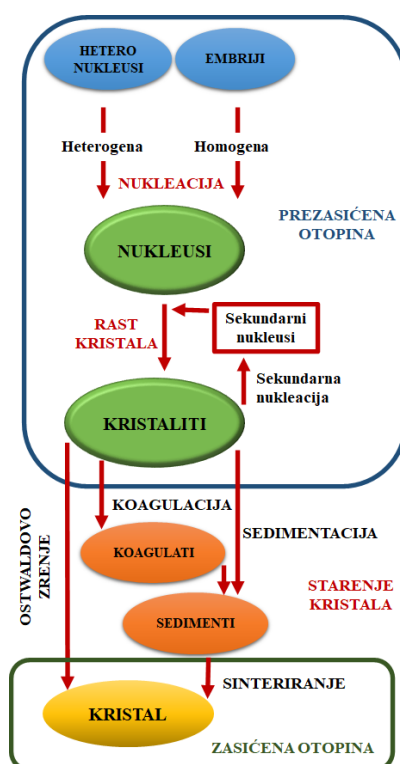
optimalan sintetski put. Pretpostavlja se da će istraživani TiNM koji se međusobno razlikuju po sastavu, morfologiji i gustoći površinskog naboja imati različiti utjecaj na sastav i svojstva nastalih CaP.

Također, određen je utjecaj biološki aktivnih molekula, albumina iz goveđeg seruma (BSA) i kitozana, na taloženje CaP pri jednakim eksperimentalnim uvjetima jer se pretpostavlja da u njihovom prisustvu nastaju CaP/TiNM kompoziti promijenjenih fizikalno-kemijskih svojstava. Nadalje, određeni su i parametri kinetike adsorpcije BSA na CaP, TiNM i CaP/TiNM te međudjelovanja BSA s navedenim materijalima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Taložni procesi

Taloženje je proces nastajanja čvrste faze iz prezasićene otopine.³⁴ Ukoliko je istaložena faza kristal, proces taloženja naziva se kristalizacija. Klasična teorija kristalizacije pretpostavlja da nukleacija i rast kristala započinju na česticama već prisutnim u otopini (heteronukleusi) ili udruživanjem elementarnih čestica (iona i molekula) prezasićenih otopina čime nastaju homonukleusi. Slijedi fazna transformacija i rast kristalita, a moguće je i nastajanje sekundarnih nukleusa zbog čega su u otopini prisutni kristali različite veličine. Proces taloženja završava starenjem kristala do veličine koja uzrokuje sedimentaciju čvrste faze. Opisani proces shematski je prikazan na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz procesa taloženja. Konstruirano prema referenci 35.

Iako je teorijsko objašnjenje kristalizacije krutina iz otopina dao Ostwald još 1897. godine³⁶, dok je termodinamiku procesa objasnio Gibbs³⁷ te čak i usprkos razvoju klasične

teorije kristalizacije, proces kristalizacije nije do kraja razjašnjen. Osnovni problem u teoriji nukleacije, definiranje je brzine nukleacije kao funkcije parametara koji kontroliraju kristalizaciju među kojima je najbitnija termodinamička pokretačka sila kristalizacije odnosno prezasićenje (S).³⁸

Kako bi se termodinamička svojstva taložnih sustava mogla modelirati, potrebno je poznavati produkte topljivosti (K_{sp}) svih čvrstih faza pri danoj temperaturi.³⁸ Za binarni elektrolit A_mB_n ionski produkt topljivosti (IAP) i njegova ravnotežna vrijednost odnosno produkt topljivosti^{38,39} dani su jednadžbama 1 i 2:

$$\text{IAP} = (a_{A^{n+}})^m \cdot (a_{B^{m-}})^n \quad (1)$$

$$K_{sp} = (a_{A^{n+}}^e)^m \cdot (a_{B^{m-}}^e)^n \quad (2)$$

pri čemu su a_i^e relativni aktiviteti u ravnoteži, a m i n su naboji.

Kemijski potencijal³⁹ vrste i dan je jednadžbom:

$$\mu_i = \mu_i^0 + k_B T \ln(a_i) \quad (3)$$

U jednadžbi 3 μ_i^0 predstavlja kemijski potencijal vrste i u standardnom stanju ($a_i = 1$).

Prezasićenje se tada definira jednadžbom:

$$\frac{\Delta\mu}{k_B T} = \ln \frac{a_i}{a_i^e} \quad (4)$$

te je često iskazano preko relativne prezasićenosti³⁹, σ , koja je definirana kao:

$$\sigma = \frac{a_i - a_i^e}{a_i^e} = \frac{a_i}{a_i^e} - 1 \quad (5)$$

Stoga se jednadžba 4 može zapisati kao:

$$\frac{\Delta\mu}{k_B T} = \ln(1 + \sigma) = \ln \frac{(a_{A^{n+}})^m \cdot (a_{B^{m-}})^n}{K_{sp}} = \ln \frac{\text{IAP}}{K_{sp}} \quad (6)$$

Relativna prezasićenost može se iskazati i kao:

$$\sigma = \frac{\text{IAP}}{K_{sp}} - 1 = S - 1 \quad (7)$$

Ukoliko je $S = 1$, mineral i otopina su u ravnoteži, ako je $S < 1$ otopina je nezasićena i mineral će se otopiti dok je u slučaju $S > 1$ otopina prezasićena te dolazi do kristalnog rasta. Najčešće korištena definicija prezasićenja³⁴ dana je jednadžbom 8:

$$S = \left(\frac{\text{IAP}}{K_{sp}} \right)^{1/v} \quad (8)$$

pri čemu je v broj jedinki u formuli spoja.

2.1.1. Nukleacija

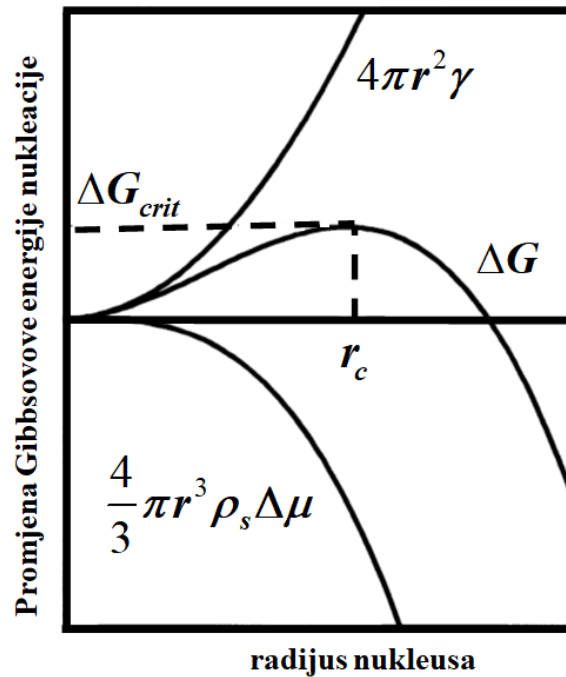
Nukleacija je proces nastajanja centara na kojima može doći do spontanog rasta kristala.⁴⁰ U procesu nastajanja taloga iz homogene otopine, nukleacija je prvi korak u kojemu je utrošak energije najveći. Kako bi se postigla energija potrebna za početak nukleacije, taloženi proces mora se odvijati u prezasićenoj otopini. Kada se taloženje odvija u zatvorenom sustavu, proces taloženja prati postepena promjena prezasićenja. No, u svakom procesu taloženja postoji vremenski period u kojemu nema promjene fizikalnih svojstava sustava te posljedično ne nastaje čvrsta faza. Vremenski period protekao od postizanja prezasićenja do nastajanja čvrste faze naziva se vrijeme indukcije, t_{ind} .⁴¹ Tijekom vremena indukcije dolazi do postizanja stabilnog stanja, formiranja kritičnog nukleusa i rasta kritičnog nukleusa do granice detekcije.

Nukleacija može biti homogena ili heterogena. Homogena nukleacija odnosi se na spontano nastajanje početnog nukleusa iz prezasićene otopine. Ukoliko veličina nastalih nukleusa ne dosegne kritičnu vrijednost, tzv. kritični nukleus, neće doći do kristalnog rasta.^{42,43} Izraženija stabilnost manjih nukleusa u odnosu na prezasićenu roditeljsku fazu objašnjena je klasičnom teorijom kristalizacije (engl. *crystal nucleation theory*, CNT). Smanjenje slobodne energije zbog prijenosa N čestica iz metastabilne otopine u čvrstu fazu aproksimirano je kao $N\Delta\mu$. Razlika kemijskih potencijala ($\Delta\mu$) odnosi se na razliku potencijala čvrste i tekuće faze ($\Delta\mu = \mu_s - \mu_l$, $\Delta\mu < 0$). Prema CNT, promjena slobodne energije koja prati nastajanje površine A nukleusa jednak je γA , pri čemu je γ površinska slobodna energija međupovršine čvrsto-tekuće.⁴⁴ Za nastajanje manjih nukleusa veći je utrošak slobodne energije jer oni imaju veći omjer površine s obzirom na volumen.

Prema CNT, ukupna promjena slobodne Gibbsove energije⁴²⁻⁴⁴ nastajanja sferičnog kristalita radijusa r iznosi:

$$\Delta G = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho_s \Delta\mu + 4\pi r^2 \gamma \quad (9)$$

U jednadžbi 9 ρ_s predstavlja površinsku gustoću aktivnih mjesta. Prvi član navedene jednadžbe predstavlja volumnu Gibbsovu energiju oslobođenu nastajanjem veza, a opisuje veću stabilnost čvrste faze u odnosu na prezasićenu otopinu. Taj dio je negativan i proporcionalan je volumenu kristalita. Drugi član jednadžbe odnosi se na rad utrošen na stvaranje površine, a u njemu je uračunato smanjenje slobodne energije nastajanja međufaze čvrsto-tekuće. Taj dio jednadžbe je pozitivan i proporcionalan je površini kristalita. Na slici 2 prikazana je ovisnost Gibbsove energije o radijusu nukleusa s naznačenim doprinosima.⁴⁵



Slika 2. Promjena Gibbsove energije nukleacije u ovisnosti o radijusu nukleusa. ΔG_{crit} označava visinu nukleacijske barijere potrebne da započne proces nukleacije, a r_c kritični radijus nukleusa. Konstruirano prema referenci 45.

Deriviranjem navedene jednadžbe moguće je odrediti maksimalni (kritični) radijus⁴², r_c , kojeg nukleus može dosegnuti:

$$r_c = \frac{2\gamma}{\rho_s |\Delta\mu|} \quad (10)$$

Za kritični radijus visina nukleacijske barijere iznosi:

$$\Delta G_{crit} = \frac{16\pi\gamma^3}{3(\rho_s |\Delta\mu|)^2} \quad (11)$$

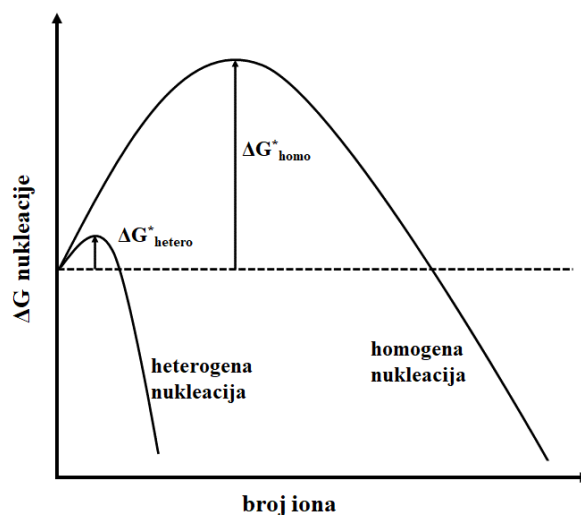
Brzina nukleacije (J) eksponencijalno ovisi o visini energetske barijere:

$$J = k \exp\left(\frac{-\Delta G_{crit}}{k_B T}\right) = k \exp\left[\frac{-\frac{16\pi}{3}\gamma^3}{(\rho_s |\Delta\mu|)^2}\right] \quad (12)$$

pri čemu je T apsolutna temperatura, k_B je Boltzmannova konstanta, a k je predeksponencijalni faktor. Predeksponencijalni faktor povezan je sa frekvencijom sudara iona i molekula u otopini. Njegova teorijska vrijednost iznosi $10^{39\pm 3} \text{ m}^{-3} \text{ s}^{-1}$. Iz jednadžbi 11 i 12 vidljivo je da je visina energetske barijere koju nukleusi trebaju dosegnuti prije rasta kristala proporcionalna $\gamma^3/|\Delta\mu|^2$ što ukazuje na to koliko brzina nukleacije ovisi o prezasićenju i međupovršinskoj energiji.

Direktno opažanje kristalnih nukleusa vrlo je teško jer je veličina potrebna za detekciju dosegnuta tek nakon što se postigne veličina kritičnog radijusa. Uvid u strukturu, oblik i svojstva nukleusa moguće je dobiti putem simulacija kao što su to napravili Auer i Frekel.⁴² Oni su pretpostavili da u koloidnim sustavima, u kojima su čestice dovoljno velike i amorfne strukture, neće doći do kristalizacije zbog povećanja međupovršinske slobodne energije površina-tekućina pri visokim prezasićenjima. Navedene simulacije potencijalno mogu objasniti zašto kristali CaP često talože putem manje stabilnih faza tokom kristalizacije.⁴⁶

Dodatak kristalnih sjemena prezasićenim otopinama uvelike ubrzava brzinu nukleacije kristala (slika 3). U takvim slučajevima govorimo o heterogenoj nukleaciji.



Slika 3. Shematski prikaz razlike homogene i heterogene nukleacije s obzirom na visinu nukleacijske barijere. Dodani supstrat u heterogenoj nukleaciji katalizira nukleaciju.

Konstruirano prema referenci 40.

Dodano sjeme može imati strukturu kao kristal koji taloži ili može biti različite strukture. Proces taloženja sa sjemenom jednake strukture kao i kristal bolje je poznat, makar na kvalitativnoj razini, dok je taloženje sa sjemenom strukture drugačije od kristalne faze koja se taloži i dalje nedovoljno istraženo.⁴⁷ CNT daje relativno jednostavno objašnjenje zašto sjeme ubrzava proces taloženja.⁴⁴ U odsustvu sjemena, spontane fluktuacije u otopini dovode do nastajanja nukleusa koji mora dosegnuti kritični radijus. No, kristalizacija se može odvijati spontano i ukoliko se u metastabilnu otopinu doda sjeme ili bilo kakav strani objekt koji je veće veličine od kritičnog radijusa. U prisustvu sjemena ili bilo kakvog stranog objekta (kao što su

to npr. organske molekule u procesu biomineralizacije), dolazi do smanjenja energije potrebne da se prijeđe nukleacijska barijera.^{48,49}

Brzina heterogene nukleacije dana je izrazom:

$$J = (R^S)^2 N^0 f''(m,x) [f(m,x)]^{\frac{1}{2}} B \exp \left[\frac{\Delta G_{\text{homo}}}{k_B T} f(m,x) \right] \quad (13)$$

gdje je N^0 broj jedinki, a B je kinetička konstanta. Zbog eksperimentalnih poteškoća u direktnom određivanju brzine nukleacije, razvijeni su drugi pristupi proučavanja početnih nukleacijskih događaja. Jedan od najčešće korištenih načina karakteriziranja kinetike nukleacije određivanje je vremena indukcije pri različitim prezasićenjima. Prema tome, brzina heterogene nukleacije tada se može definirati kao:

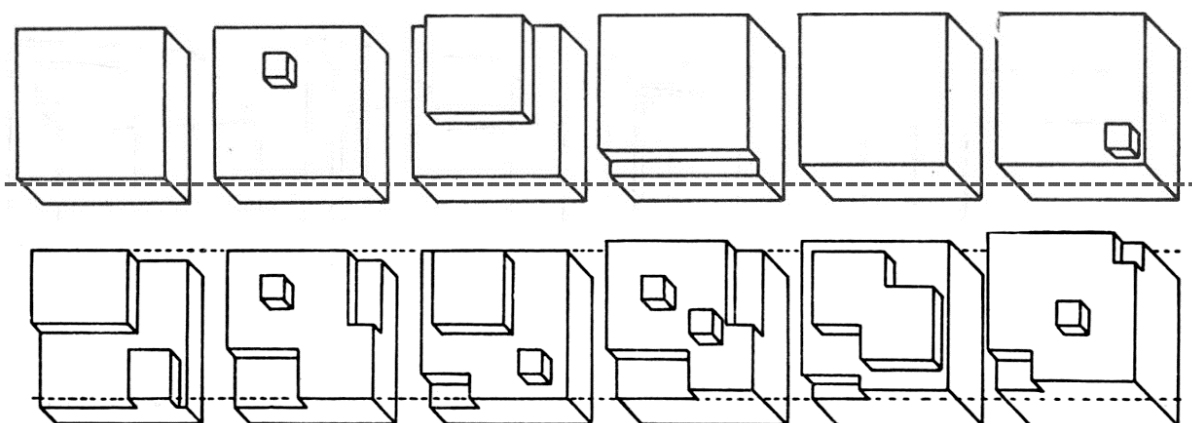
$$J = \frac{1}{t_{\text{ind}} V} \quad (14)$$

odnosno, kao recipročna vrijednost umnoška vremena indukcije i volumena taložnog sustava (V).

2.1.2. Rast kristala

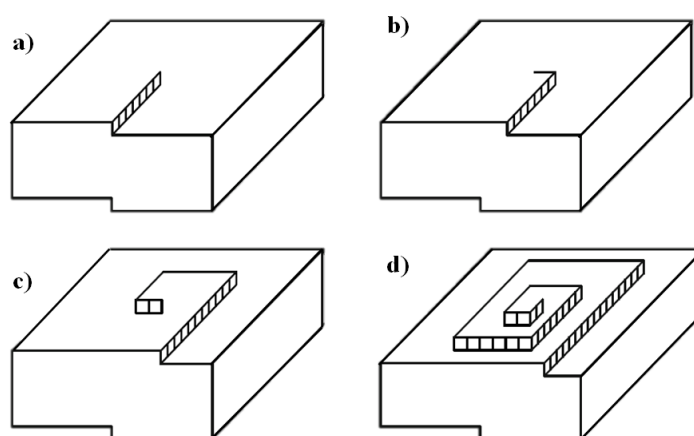
S mehanističkog stajališta, rast kristala može se smatrati kontinuiranim dodatkom slojeva molekula jedan iznad drugog. Može započeti sa savršene kristalne plohe mehanizmom mononuklearnog ili polinuklearnog rasta, a može započeti i s ploha koje nemaju savršenu površinu (hrapavih ploha).

Mononuklearni rast na savršenim kristalnim ploham započinje otapanjem embrija čime dolazi do rasta većih površinskih nukleusa.⁵⁰ Ukoliko je i prezasićenost taložnog sustava mala, doći će do vrlo spore površinske nukleacije. No, rast novog sloja bit će dovoljno brz da pokrije cijelu površinu prije nego što započne nukleacija i rast idućeg sloja. Pri većim koncentracijama, na površini kristala prisutno je više nukleusa čijim rastom dolazi do međusobnog srastanja. Takav način rasta kristala naziva se polinuklearnim rastom.³⁵ Kristalne plohe rezultirajućeg kristala jednako su savršene kao i u slučaju mononuklearnog rasta. Mehanizmi rasta na savršenim kristalnim ploham prikazani su na slici 4.



Slika 4. Mehanizam mononuklearnog (gornja slika) i polinuklearnog (donja slika) rasta na savršenoj kristalnoj plohi. Preuzeto iz reference 35.

Površine kristala nisu ravne plohe te kristali najčešće imaju defekte u strukturi koji se nazivaju dislokacije, a jedna od najčešćih je vijčana.⁵¹ Kristali takvih površinskih ploha mogu rasti u beskonačnost bez potrebe za površinskom nukleacijom jer dodatkom jedinica rasta dolazi do spiralnog rasta. Primjer spiralnog rasta putem vijčanih dislokacija dan je na slici 5.



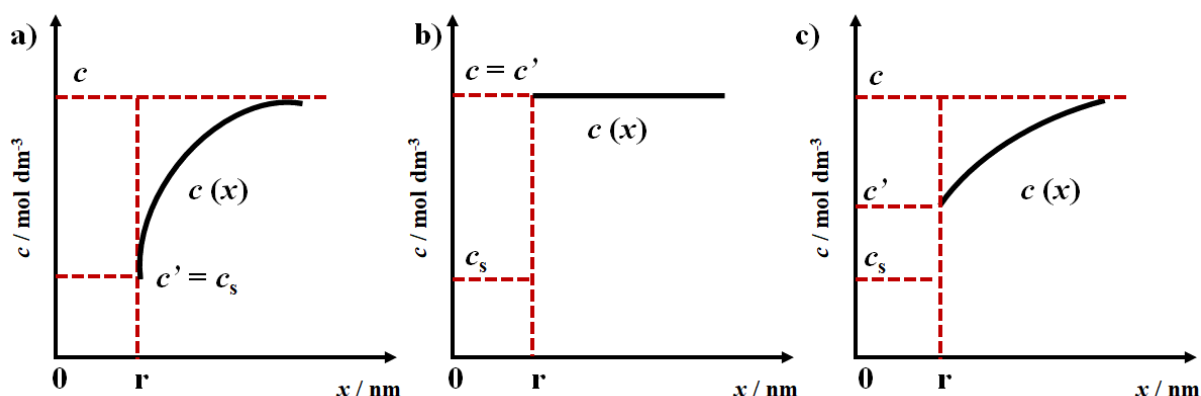
Slika 5. Shematski prikaz rasta kristala mehanizmom vijčanih dislokacija. Konstruirano prema referenci 51.

Mnoge bitne informacije o mehanizmu rasta kristala mogu se saznati istraživanjem kinetike navedenih procesa. Brzina rasta kristala definirana je kao brzina rasta određene kristalne plohe u smjeru okomitom na nju. Može biti određena procesima u otopini, kao što su kemijske reakcije i transport iona iz otopine na površinu kristala te procesima koji se odvijaju na površini kristala. Tijekom rasta kristala, događaju se najznačajnije promjene u sastavu matičnice

odnosno u količini istaložene faze. Ako se koncentraciju otopine proglašava c , koncentracija faze koja taloži c' i topljivost c_s , postoje tri moguća načina kristalnog rasta⁵²:

- (i) rast kontroliran transportom ($c' = c_s$),
- (ii) rast kontroliran površinom ($c' = c$),
- (iii) općeniti slučaj ($c_s < c' < c$).

Shematski prikaz tri moguća načina rasta kristala dan je na slici 6:



Slika 6. Kinetike rasta kristala: a) rast kontroliran transportom iona, b) rast kontroliran površinskim procesima i c) općeniti slučaj. Oznaka x -osi predstavlja udaljenost od centra kristala (uz pretpostavku da je kristal sferičan). Konstruirano prema referenci 52.

Kada se taloženje odvija pri velikim prezasićenjima, brzina rasta ovisi o transportu materijala kroz otopinu. Transport se može odvijati konvekcijom i/ili difuzijom.⁵² U procesima kontroliranim difuzijom, brzina rasta kristala proporcionalna je prezasićenosti, a obrnuto proporcionalna veličini čestice (ukoliko se kristalit aproksimira kao sfera). U tom slučaju, manji kristali rastu brže od velikih što rezultira jednolikom raspodjelom čestica. Brzina rasta kristala određena transportom iona ovisit će o miješanju suspenzije jer se uslijed miješanja koncentracija u blizini površine kristala izjednačava s onom u otopini što rezultira povećanjem brzine kristalnoga rasta.³⁵

Kada je rast kristala kontroliran površinskim procesima, koncentracija otopljene tvari može se smatrati jednakom u cijelom volumenu otapala koje okružuje tu otopljenu tvar. Procesi koji se odvijaju na površini uključuju⁴⁵:

- (i) adsorpciju jedinica rasta na površini kristala,
- (ii) migraciju jedinica rasta po površini,

- (iii) dehidraciju jedinica rasta,
- (iv) nastajanje dvodimenzionalnog nukleusa,
- (v) integraciju jedinica rasta u mjesta rasta.

2.1.3. Starenje kristala

Jednom nastale, čestice čvrste faze u kontaktu s matičnicom mogu biti podložene fizikalnim i kemijskim promjenama. Sve promjene posljedica su nastojanja sustava da uspostavi ravnotežu, odnosno smanji ukupnu Gibbsovu energiju što se postiže smanjenjem međupovršine između krute i tekuće faze procesima starenja. U njih se ubrajaju flokulacija (agregacija, koagulacija i aglomeracija), Ostwaldovo zrenje i transformacija metastabilnih faza.⁴⁵

Flokulacija čestica odnosi se na sudaranje čestica u suspenziji koje rezultira nastajanjem većih čestica ili razdvajanjem onih već koaguliranih. Uspješni sudari rezultiraju smanjenjem ukupnog broja čestica i posljedično redukcijom međupovršine čvrsto/tekuće. Flokulacije nukleusa nastalih homogenom nukleacijom najvjerojatnije započinju još za vrijeme procesa nukleacije ili odmah nakon njega, dok flokulacije u heterogenim procesima nukleacije ne započinju u prvim fazama taložnog procesa.⁵³

Zrenje je još jedan mehanizam smanjenja energije međupovršina kristal-tekuća faza otapanjem malih čestica i istovremenim rastom većih. S obzirom da manje čestice imaju veću specifičnu površinu te posljedično i veću Gibbsovu energiju, proces zrenja odvija se spontano. U takvim sustavima ravnoteža se uspostavlja tek kada svi kristali dosegnu uniformnu veličinu ili kada nastane jedan veći kristal. Prema Gibbs – Thomovoj jednadžbi koja opisuje ovisnosti veličine kristala o prezasićenju, suspenzija može biti u ravnoteži sa istaloženom fazom koja se sastoji samo od čestica iste veličine.⁴⁵ U slučaju polidisperznih taloga, suspenzija će biti nezasićena u odnosu na male čestice, a prezasićena u odnosu na veće. Posljedično, manje čestice će se otopiti, a veće će rasti.

Flokulacija i zrenje su procesi koji se gotovo uvijek događaju na početku taložnog procesa. Do procesa transformacije faza dolazi kada metastabilne faze transformiraju u termodinamički stabilniju fazu. Nastajanje stabilnih faza popraćeno je ili se odvija paralelno s nastajanjem onih manje stabilnih odnosno topivijih faza. Brzina nastajanja pojedinih faza određena je njihovom topljivosti te relativnom brzinom nukleacije i kristalnog rasta. Pri određenom prezasićenju, faza s manjom međupovršinskom napetošću, odnosno topivija i manje stabilna, dat će manje i

termodinamički stabilnije kritične nukleuse koji su energetski povoljniji. Stoga se može zaključiti da će kristalna faza čiji nukleusi imaju najmanju površinsku napetost prva istaložiti iz prezasićene otopine.⁴⁵

2.1.4. Utjecaj aditiva

Svi ioni ili molekule, osim konstituirajućih jedinki kristala te otapala, prisutnih u taložnom sustavu smatraju se nečistoćama. Ukoliko je nečistoća namjerno dodana u taložni sustav, tada se naziva aditivom. Čak i najmanja koncentracija aditiva u sustavu može značajno utjecati na kinetiku taložnog procesa, veličinu i oblik kristala, kemijski sastav ili kristalnu modifikaciju istaložene komponente te na mnoga druga svojstva. S obzirom na utjecaj koji imaju na svojstva čvrste faze, postoje dvije osnovne kategorije aditiva:

- (i) Aditivi koje se ugrađuju u kristalnu rešetku čime mogu narušiti strukturu kristalne rešetke te smanjiti ukupnu brzinu rasta kristala. U tu skupinu aditiva većinom se ubrajaju anorganski ioni i metalni kompleksi koji elektrostatski međudjeluju s kristalom.⁵⁴⁻⁵⁶ Takve vrste aditiva relativno su malih veličina i često djelotvorne tek u koncentracijama iznad 10^{-5} mol dm⁻³.
- (ii) Aditivi koje se adsorbiraju na površinu kristala i utječu na brzinu rasta određene ili svih kristalnih ploha. U tu skupinu aditiva ubrajaju se polielektroliti te manji organski spojevi koji stvaraju kemijske veze s ionima na površini kristala. Navedeni aditivi adsorbiraju se na specifična mjesta određenih kristalnih ploha čime smanjuju brzinu rasta cijelog kristala ili smanjuju rast u smjeru okomitom na plohu na koju se adsorbiraju.⁴⁵

Ne postoji općeniti mehanizam koji opisuje način na koji određena nečistoća djeluje na određeni taložni sustav. Međutim, postoji nekoliko modela koji opisuju mehanizam promjene habitusa i morfologije kristala te inhibiciju ili promociju rasta kristala u prisutnosti aditiva.^{50,57} Takvi modeli mogu se podijeliti ovisno o koncentraciji aditiva i tipu kristalne površine, glatkoj ili hrapavoj. Suprotno glatkim ploham, hrapave plohe sadrže znatno više mogućih mjesta na kojima može doći do adsorpcije aditiva. Upravo zbog toga, koncentracija aditiva potrebna za usporavanje rasta kristala mnogo je veća za hrapavu nego za glatku površinu. Mehanizam adsorpcije ponajviše ovisi o koncentraciji aditiva:

- (i) U slučaju male koncentracije aditiva, do adsorpcije može doći na bilo kojem specifičnom mjestu na površini kristala. Takva vrsta adsorpcije može biti reverzibilna jer ne postoje preferirana mjesta adsorpcije aditiva. Također, može biti ireverzibilna ukoliko dolazi do preferiranog vezanja molekula aditiva na određena vezna mjesta.⁵⁸
- (ii) Pri visokim koncentracijama aditiva, smanjenje brzine kristalnog rasta posljedica je nastajanja ili dvodimenzionalnog adsorpcijskog sloja ili trodimenzionalnih klastera aditiva.^{59,60} 2D adsorpcijski sloj može nastati kada postoji dobro strukturno slaganje između plohe rastućeg kristala i nastajućeg sloja nečistoća.

2.2. Kalcijevi fosfati

Kalcijevi fosfati (CaP) slabo su topljive soli fosfatne kiseline. Većina CaP u svojoj strukturi sadrži vodik, ili u obliku kiselih ortofosfatnih aniona kao što su HPO_4^{2-} ili H_2PO_4^- , ili u obliku inkorporirane vode.⁸

2.2.1. Vrste kalcijevih fosfata

U trokomponentnom sustavu $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{--H}_3\text{PO}_4\text{--H}_2\text{O}$ postoji 12, do sada definiranih, nesupstituiranih CaP faza u kojima omjer Ca^{2+} i PO_4^{3-} iona (Ca/P omjer) iznosi od 0,5 do 2,0.⁶¹ Najvažnije faze prikazane su u tablici 1. Važni parametri pri definiranju i razlikovanju faza CaP zasigurno su omjer Ca/P, topljivost te njihova kiselost odnosno bazičnost. Većina CaP slabo je topljiva u vodi, no gotovo svi su topljivi u kiselinama. Općenito, što je manji omjer Ca/P pojedine faze, izraženija je kiselost i topljivost te faze.⁶² Najmanje topljiva faza, hidroksiapatit (HAP), nastaje u neutralnim ili bazičnim uvjetima. U kiselim uvjetima talože kalcijev hidrogenfosfat dihidrat (DCPD) ili oktakalcijev fosfat (OCP). Taloženjem mogu nastati i nestehiometrijske faze poput kalcij – deficitarnog apatita (CaDHA).⁶³ Također, apatiti često talože preko prekursorskih faza koje mogu biti DCPD ili OCP u kiselim sredinama, ili amorfni kalcijev fosfat (ACP) u bazičnim i neutralnim uvjetima. Taloženje HAP-a preko prekursorskih faza dokazan je i u *in vivo* uvjetima.⁶³

Kalcijev hidrogenfosfat dihidrat (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) može se pripremiti kristalizacijom iz vodenih otopina koje sadrže HPO_4^{2-} i Ca^{2+} ione u omjeru $\sim 1,0$ i pH vrijednosti u području od 2,0 do 6,5.⁶⁴ Pri temperaturama iznad 80 °C, DCPD prelazi u anhidridnu formu (DCPA). Smatra

se da je DCPD međuprodukt tijekom mineralizacije kostiju i otapanja cakline.⁶⁵ Zbog svoje biokompatibilnosti i zastupljenosti u patološkim depozitima, DCPD se primjenjuje u zubnim pastama u koje se dodaje kao sredstvo za zaštitu od karijesa i kao lagano polirajuće sredstvo.⁶⁶ Za razliku od DCPD-a, DCPA se ne pojavljuje niti u normalnoj niti u patološkoj mineralizaciji, no može se koristiti u organizmu kao biokeramika.⁶⁷

Tablica 1. Svojstva i kristalografski podatci za neke biološki važne kalcijeve fosfate. Prema referenci 68.

Naziv	Formula	Ca/P omjer	$-\log(K_{sp})$ (25 °C)	Kristalni sustav	pH područje stabilnosti (25 °C, aq)
Monokalcijev fosfat monohidrat (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	1,1	Trikliniski (P1)	0 - 2,0
Monokalcijev fosfat anhidrid (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5	1,1	Trikliniski (P1)	
Kalcijev hidrogenfosfat dihidrat (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	6,6	Monokliniski (Ia)	2,0 - 6,0
Kalcijev hidrogenfosfat monohidrat (DCPA)	$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0	6,9	Trikliniski (P1)	
Oktakalcijev fosfat (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	96,6	Trikliniski (P1)	5,5 - 7,0
α -trikalcijev fosfat (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	25,5	Monokliniski (P2 _{1/a})	
β -trikalcijev fosfat (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	28,9	Romboedarski (R3C _h)	
Amorfni kalcijev fosfat (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n = 3 - 4,5$)	1,2 - 2,2			5 - 12
Kalcij – deficijentni hidroksiapatit (CaDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	1,5 - 1,67	85,1		6,5 - 9,5
Hidroksiapatit (HAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	116,8	Monokliniski (P2 _{1/b}) ili heksagonski (P6 _{3/m})	9,5 - 12

Oktakalcijev fosfat (OCP, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) često je metastabilna prekursorska faza tijekom taloženja termodinamički stabilnijih faza u vodenim otopinama. Može se pripremiti iz vodenih otopina koje sadrže Ca^{2+} i PO_4^{3-} ione u omjeru 1,33. Sastavni je dio ljudskog dentalnog i urinarnog kamenca.^{69,70} Također ima važnu ulogu u nastajanju

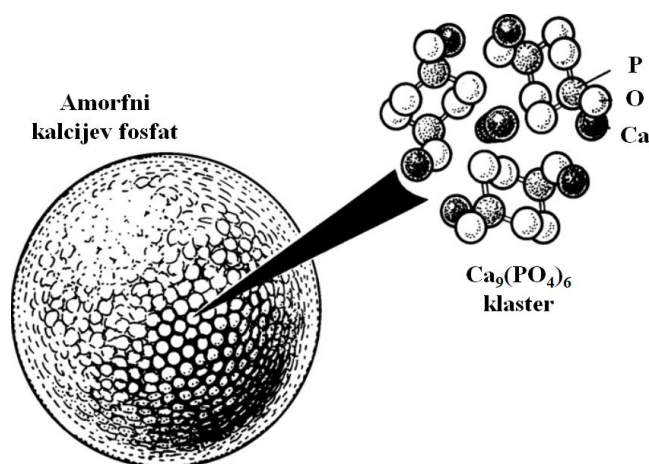
apatitnih biominerala *in vivo*.⁷¹ U medicini se OCP koristi kao implant materijal za čvrsta tkiva.⁷²

Trikalcijev fosfat (TCP) javlja se u obliku dva polimorfa, α - i β - faze. β -TCP se ne može pripremiti taloženjem iz vodenih otopina. Nestehiometrijski β -TCP nikad se ne javlja u biološkoj kalcifikaciji. U takvim procesima zastupljen je magnezijem supstituirani oblik β -TCMP. S obzirom da je β -TCMP manje topljiv od β -TCP-a, ova faza zastupljena je u dentalnim i urinarnim kamencima, karijesu, kamencima žlijezde slinovnice i hrskavicama.⁷³⁻⁷⁶ Poseban oblik α - polimorfa stabiliziran silicijem (točnije njegov kompozit sa HAP-om) komercijalno se koristi kao polazni materijal u proizvodnji biorazgradivih poroznih matrica koje se koriste kao implant materijali.^{77,78} Nakon implantacije, α -TCP se transformira u HAP čime se drastično smanjuje brzina degradacije.

S obzirom da su za ovu doktorsku radnju najbitnije vrste ACP, CaDHA i HAP, u daljnjem pregledu detaljnije će biti opisana njihova svojstva.

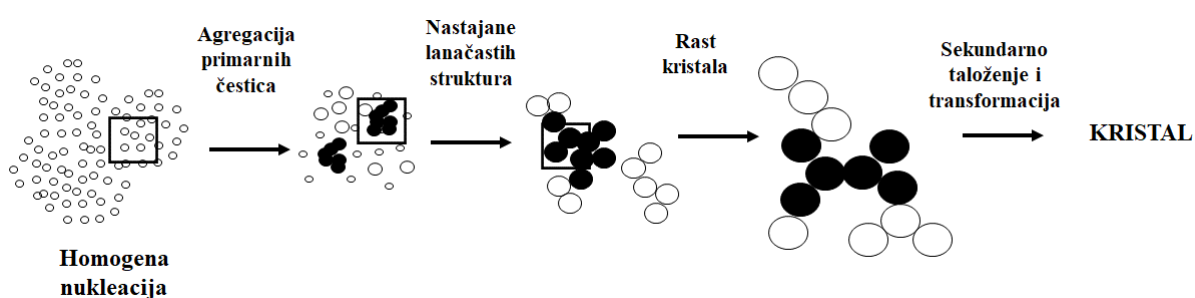
2.2.1.1. Amorfni kalcijev fosfat

Amorfni kalcijev fosfat (ACP) vrsta je CaP-a u čijoj strukturi ne postoji translacijska niti orijentacijska sredećenost dugog doseg.⁷⁹ Formula ACP-a može biti napisana kao $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n = 3 - 4,5$), pri čemu udio vode iznosi 15 – 20 %. Prekursorska je faza tijekom taloženja HAP-a iz neutralnih i bazičnih otopina koja je strukturno i kemijski različita od HAP-a.⁸⁰ Kemijskom analizom otkriveno je da se ACP sastoji od sferičnih klastera formula $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, tzv. Posnerovih klastera koji zajedno s molekulama H_2O tvore veće agregate (slika 7).^{81,82} Veličina Posnerovih klastera iznosi otprilike 9,5 Å, dok je veličina agregata Posnerovih klastera koji čine ACP čestice oko 30 – 100 nm. Posnerovi klasteri međusobno su povezani elektrostatskim i hidrofobnim međudjelovanjima te molekulama vode.



Slika 7. Model čestice amornog kalcijevog fosfata (ACP) koja je građena od Posnerovih klastera ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$). Konstruirano prema referenci 82.

Najjednostavniji način dobivanja ACP-a spontano je taloženje iz vodenih otopina koje sadrže kalcijeve i fosfatne ione.⁸³ ACP se može istaložiti brzim dodavanjem jakih baza (poput NaOH, KOH, itd.) u kiselu otopinu (pH 4 – 5) kalcijevih fosfata, poput DCPD-a. Povećavanjem pH vrijednosti taložnog sustava i snažnim miješanjem dolazi do nastanka ACP-a. Taložnje ACP-a iz otopina pH vrijednosti 6,0 – 6,5 postiže se dodavanjem stabilizatora poput Mg iona ili citrata.⁸⁴ No, vrlo brzo nakon taloženja, ACP je potrebno izolirati jer stajanjem u matičnici dolazi do transformacije u stabilnije faze kao što su OCP, DCPD, CaDHA i HAP.^{85–89} Nastajanje i transformacija čestica ACP-a u vodenim otopinama prikazana je na slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz nastajanja i transformacije čestica amornog kalcijevog fosfata (ACP). Konstruirano prema referenci 90.

Kemijski sastav ACP-a ovisi o pH vrijednosti otopine taložnog sustava pa je tako pri pH vrijednosti 6,6 moguće sintetizirati ACP u kojemu omjer Ca/P iznosi 1,18, dok pri pH 11,7 taj omjer iznosi 2,5.⁹¹ Također, dokazano je nastajanje dvije amorfne faze, ACP1 i ACP2, koji

imaju jednak sastav, no razlikuju se u morfologiji i topljivosti.^{88,92} Transformacija ACP1 u ACP2 fazu može se pratiti promjenom pH vrijednosti taložnog sustava u vremenu.⁹²

Na veličinu čestica ACP-a moguće je utjecati promjenom eksperimentalnih uvjeta. Općenito, sferične čestice ACP-a bit će manje ukoliko se talože pri velikim prezasićenjima i pH vrijednostima, dok je pri konstantnoj pH vrijednosti povećanjem temperature moguće dobiti veće čestice.⁹³ Starenje ACP-a u taložnom sustavu, pogotovo pri povišenim temperaturama, rezultira polaganom rekristalizacijom i nastajanjem kristalnih faza kao što su OCP, HAP i CaDHA.⁹⁴ Nestehiometrijski ACP (koji sadrži Na, Mg, karbonatne i pirofosfatne ione) prisutan je u patološkim kalcifikatima mekih tkiva.^{95,96} Zbog relativno dobre topljivosti i fiziološke pH vrijednosti, određeni mikroorganizmi koriste ACP u svojoj prehrani, stoga se ACP koristi kao dodatak medijima za stanične kulture. Također, ACP je komponenta sredstva za nagrizanje, koristi se pri proizvodnji stakala i keramike te određenih organskih fosfata.⁶

2.2.1.2. Kalcij – deficijenti hidroksiapatit

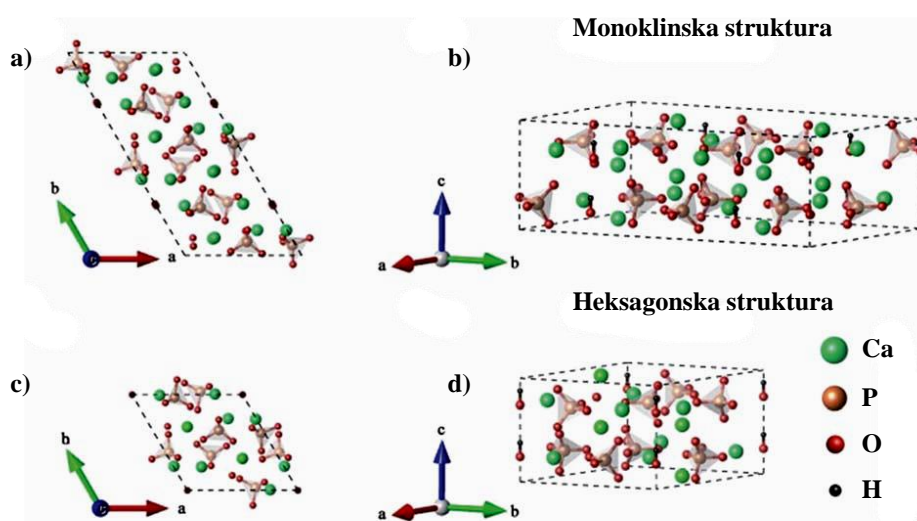
Kalcij – deficijenti hidroksiapatit (CaDHA , $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)) otkriven je još krajem 18. stoljeća kada su započela prva istraživanja sastava kostiju. Manjak Ca^{2+} iona u strukturi gotovo je uvijek popraćen i manjkom OH^- iona te protonacijom nekih od fosfatnih skupina uz paralelno nastajanje praznina u kristalnoj strukturi.⁹⁷ No, CaDHA često sadrži vezane molekule vode koji mogu ispuniti neke od tih praznina. CaDHA se može smatrati vrstom HAP-a u čijoj strukturi nedostaju određeni ioni.⁹⁸ Nadalje, dokazana je direktna korelacija između nedostatka Ca^{2+} iona i mehaničkih svojstava kristala: nedostatak kalcija dovodi do smanjenja modula elastičnosti do 80 % i smanjenja tvrdoće do 75 %.⁹⁹

CaDHA vrlo je jednostavno pripremiti iz vodenih otopina koje sadrže kalcijeve i fosfatne ione u omjeru 1,50 – 1,67.¹⁰⁰ Tijekom pripreme, početno nastali ACP restrukturira se i transformira u CaDHA. Drugi način dobivanja CaDHA hidrolizom je α -TCP-a.¹⁰¹ Zagrijavanjem pri temperaturama iznad ~ 700 °C, CaDHA s Ca/P omjerom 1,5 transformira u β -TCP dok se onaj s omjerom $1,5 < \text{Ca/P} < 1,67$ transformira u dvokomponentnu smjesu HAP-a i β -TCP-a.¹⁰² Nesupstituirani CaDHA ne postoji u biološkim sustavima. Svi normalni i patološki kalcifikati sastavljeni su od tzv. "biološkog apatita". U takvoj vrsti CaDHA Ca^{2+} ioni supstituirani su Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} ionima, PO_4^{3-} ili HPO_4^{2-} ioni CO_3^{2-} ionima, dok su OH^- ioni supstituirani F^- , Cl^- ili CO_3^{2-} ionima.^{94,96,103} CaDHA se koristi u proizvodnji koštanih implantata te kao lokalni sustav za isporuku lijekova.^{104,105}

2.2.1.3. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HAP, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), pentakalcijev hidroksid tris(ortofosfat), najstabilnija je i najmanje topljiva CaP faza. Stehiometrijski HAP kristalizira u monoklinskoj prostornoj grupi $P2_1/b$.¹⁰⁶ Pri temperaturama iznad ~ 250 °C monoklinski HAP transformira u heksagonski (prostorna grupa $P6_3/m$).^{106,107} Kristalne strukture monoklinskog i heksagonskog HAP-a prikazane su na slici 9.

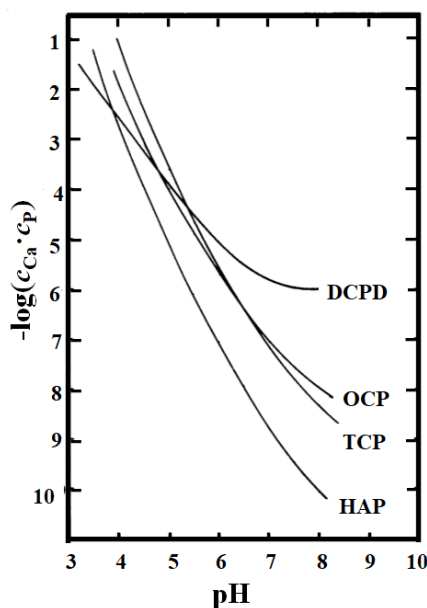
HAP može biti pripremljen na nekoliko načina, reakcijama u čvrstom stanju te taloženjem iz suspenzija, bilo hidrotermalnim sintezama bilo hidrolizom drugih faza CaP.¹⁰⁸ U vodenoj otopini, HAP se može pripremiti miješanjem kalcijevih i fosfatnih iona u omjerima 1,67 ili 1,00.⁶¹ Takvo pripremljenu suspenziju potrebno je zagrijavati pri temperaturi vrenja nekoliko dana u atmosferi bez CO_2 , nakon čega slijedi filtriranje, sušenje te sinteriranje pri temperaturi 1000 °C.¹⁰⁹ Starenje suspenzije jedan je od najvažnijih koraka u dobivanju HAP-a jer su početni talozi često metastabilni (ACP, CaDHA). Mehanokemijskim metodama, HAP je moguće pripremiti iz suhe smjese CaO i DCPD.¹¹⁰ Također, moguće ga je pripremiti i iz nevodnih medija kao što je etanol reakcijom $\text{Ca}(\text{OEt})_2$ (Et = etilna skupina) i H_3PO_4 .¹¹¹ Stehiometrijski HAP nikada se ne pojavljuje u biološkim sustavima. No, zbog svoje sličnosti biološkom apatitu, koristi se kao presvlaka u proizvodnji ortopedskih i dentalnih implant materijala.^{112,113}



Slika 9. a) i b) Kristalna struktura niskotemperaturne monoklinske faze hidroksiapatita i c) i d) visokotemperaturne faze. Konstruirano prema referenci 114.

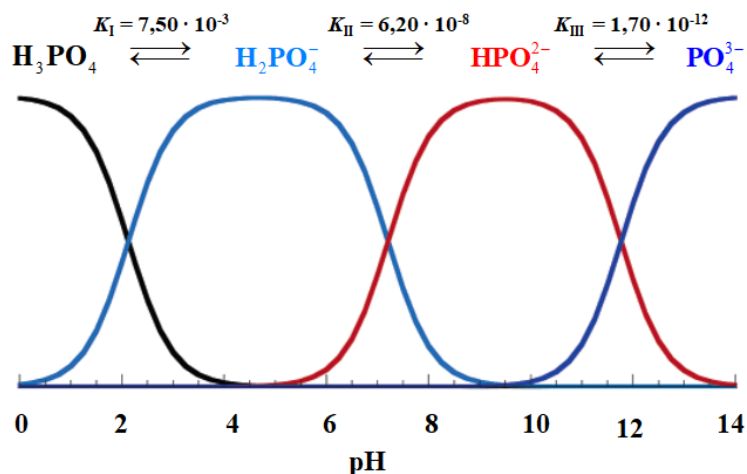
2.2.2. Stabilnost kalcijevih fosfata

Usporedbom izoterme topljivosti moguće je odrediti stabilnost pojedinih faza CaP-a pri određenim uvjetima. Na slici 10 prikazane su izoterme topljivosti kao funkcija logaritma umnoška ukupnih koncentracija kalcijevih i fosfatnih iona o pH vrijednosti vodene otopine. Iz grafa je vidljivo da je pri pH vrijednostima većim od 4 najstabilnija faza CaP-a HAP nakon koje slijedi TCP pa OCP. Pri pH vrijednostima manjim od 4, DCPD je stabilniji od HAP.¹¹⁵



Slika 10. Izoterme topljivosti različitih faza CaP pri 37 °C i ionskoj jakosti otopine 0,1 mol dm⁻³. Preuzeto iz reference 115.

Utjecaj pH vrijednosti na taloženje CaP posljedica je kompleksnog ponašanja fosfatnih iona u vodenoj otopini. Kako je fosforna kiselina troprotonska, promjena pH vrijednosti taložnog sustava utječe na relativne koncentracije aniona fosfatne kiseline (slika 11).¹¹⁶ Time promjena pH vrijednosti utječe na svojstva nastalog taloga.



Slika 11. Ovisnost koncentracije pojedinih iona fosforne kiseline o pH vrijednosti otopine.

Konstruirano prema referenci 116.

Upravo zbog takvog ponašanja fosfatnih vrsta, nije jednostavno predvidjeti istaloženu fazu niti kontrolirati taloženje. Navedeni problemi postaju izraženiji u taložnim procesima u kojima su prisutne bioorganske molekule jer u takvim slučajevima pH vrijednost otopine utječe na svojstva i anorganske i organske faze. Dok se utjecaj na anorgansku fazu iskazuje kroz promjene sastava, pH vrijednost otopine može promijeniti topljivost bioorganskih spojeva. Na taj se način može vršiti kontrola istaložene vrste jer pri jednoj pH vrijednosti CaP-i talože s bioorganskim spojevima tvoreći kompleksne spojeve, dok se pri drugoj pH vrijednosti talože na netopljivom bioorganskom supstratu.¹¹⁶

Suspenzije u kojima dolazi do taloženja CaP vrlo često su prezasićene s obzirom na više faza. U tom slučaju, uz termodinamičke, vrlo važnu ulogu imaju i kinetički parametri. Nastajanje HAP znatno je sporije od nastajanja OCP-a ili DCPD-a te se tijekom reakcije spontanog taloženja može detektirati kinetički preferirana faza iako je termodinamička pokretačka sila takve faze znatno manja.¹¹⁵ Stoga je odnos između kinetičkih i termodinamičkih parametara vrlo bitan faktor u određivanju toka taložnog procesa.

2.2.3. Utjecaj aditiva na taloženje kalcijevih fosfata

Na proces fazne transformacije CaP uvelike utječu aditivi koji su prisutni tijekom taloženja. Općenito, aditivi mogu utjecati na brzinu i/ili mehanizam nekih od glavnih koraka kristalizacije i starenja kristala, prvenstveno nukleaciju, rast kristala, agregaciju te faznu

transformaciju. Kao posljedica međudjelovanja aditiva i kristala koji taloži može doći do promjene habitusa kristala, veličine kristala, vrste istaložene faze, itd.¹¹⁷

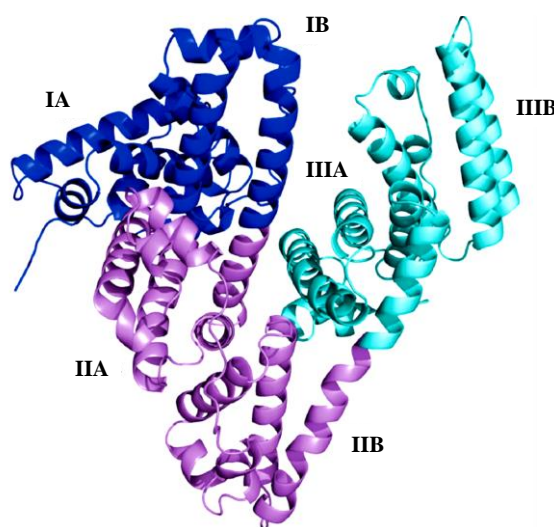
Do sada su istražena međudjelovanja CaP a velikim brojem različitih aditiva. Od onih malih molekulskih masa kao što su razne organske i anorganske molekule te aminokiseline i peptidi, sve do onih veće molekulske mase u koje se ubrajaju proteini i polimeri.¹¹⁸ Taloženje CaP u prisutnosti polimera i proteina iz vodenih suspenzija pri uvjetima bliskim fiziološkim vrlo je bitan proces za razvoj novih materijala za medicinske primjene. Mineralizacija CaP kontrolirana polimerima koristi se kao model procesa biomineralizacije, ali i za sintezu biokompatibilnih hibridnih materijala.¹¹⁸ Ovisno o koncentraciji u otopini, isti polimer može se ponašati kao promotor ili inhibitor kristalizacije. Pokazano je da njihov učinak ovisi o vrsti i molekulskoj masi. Pri malim koncentracijama molekule polimera reverzibilno se adsorbiraju u nasumičnoj konformaciji na površinu molekula ACP-a. Na taj način dolazi do stvaranja nabijenih čestica koje privlače kalcijeve i fosfatne ione iz otopine i na taj način stvaraju nova kristalizacijska mjesta. Posljedično, dolazi do ubrzavanja procesa kristalizacije CaP. Pri većim koncentracijama polimera dolazi do njihove adsorpcije na površini ACP-a u takvoj konformaciji da je površina čestice u potpunosti prekrivena slojem polimera. Takav način adsorpcije je ireverzibilan te blokira transport iona na površinu čestica ACP-a čime dolazi do stabilizacije te faze i inhibicije nukleacije kristalne faze.¹¹⁷

U ovome istraživanju kao aditivi prilikom sinteze CaP izabrani su biološki aktivne molekule albumin iz goveđeg seruma i kitozan.

2.2.3.1. Albumin iz goveđeg seruma

Serumski albumini (SA) najzastupljeniji su proteini u krvnoj plazmi sisavaca. Sintetiziraju se u jetri odakle se u neglikoziliranom obliku transportiraju u krvnu plazmu gdje njihova prosječna koncentracija iznosi $0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$.¹¹⁹ Relativno su veliki i negativno nabijeni proteini molekulske mase približno 66 kDa. Mogu biti izolirani iz krvne plazme različitih sisavaca poput ljudi, goveda, štakora, itd. Multifunkcionalni su proteini vrlo velikog kapaciteta vezanja liganda. Upravo zbog tih svojstava, jedna od njihovih osnovnih uloga je transport različitih vrsta metabolita, lijekova, nutrijenata te velikog broja drugih molekula.¹²⁰ Serumski albumini također su zaduženi za kontrolu koncentracije ioniziranog, biološki aktivnog, oblika Ca^{2+} i Mg^{2+} iona u organizmu.

Velik broj istraživanja utjecaja SA-a na taloženje CaP-a rađen je na SA-a izoliranim iz goveđeg seruma (BSA), bilo da su dodani kao aditiv prilikom taloženja CaP iz otopine, ili sadržani u simuliranoj tjelesnoj tekućini. Struktura BSA prikazana je na slici 12. BSA se sastoji od 3 strukturno slične podjedinice, a svaka podjedinica sastoji se od 10 zavojnica koje se nadalje mogu podijeliti u dvije domene A i B koje sadrže četiri i šest zavojnica. Upravo prostori između podjedinica te njihovih domena omogućuju prostor za vezanje liganda.¹²¹



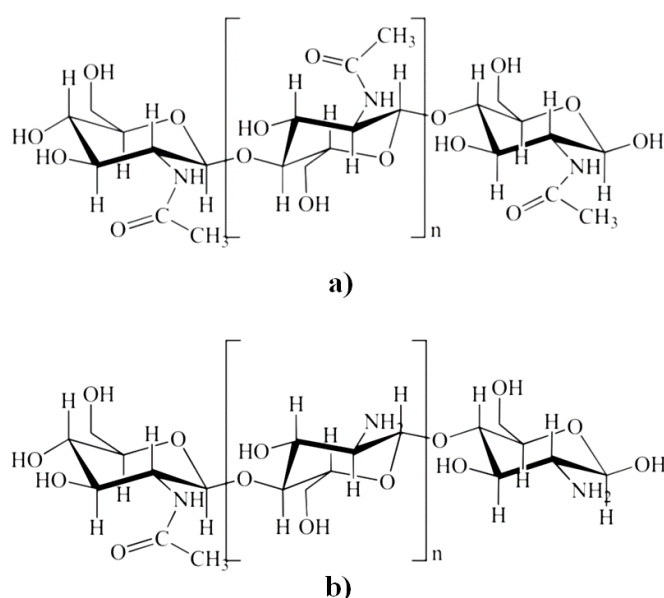
Slika 12. Struktura albumina iz goveđeg seruma (BSA). Preuzeto iz reference 121.

Prema trenutno dostupnoj literaturi, najveći broj istraživanja utjecaja serumskih albumina na taloženje CaP rađen je u SBF-u pri čemu je najčešće korišten albumin BSA. Proteini se mogu otopiti u SBF-u te se iz takve otopine može pratiti nastajanje CaP na različitim supstratima kao što su biostakla^{122,123}, keramike¹²⁴, titanijevi supstrati^{125,126}, itd. Općenito, u prisustvu proteina dolazi do inhibicije rasta i kristalizacije, ali ne i nukleacije CaP.^{122,127} Pretpostavlja se da većina CaP iz SBF-a nastaje preko amornog prekursora te da proteini inhibiraju transformaciju amorfne u kristalnu fazu CaP.¹²⁸ No, Areva i sur. pokazali su da učinak BSA ovisi o tome radi li se o proteinu otopljenom u SBF-u ili adsorbiranom na površini supstrata na kojemu se talože CaP-i.¹²⁹ Naime, inhibitori učinak na taloženje CaP-a manje je izražen ukoliko je protein adsorbiran na površinu, u ovome slučaju, titanijevog supstrata.

Osim induciranja taloženja CaP-a iz SBF-a, istraženo je i nastajanje CaP-a iz taložnih sustava koji sadrže albumin.^{105,130,131} Također, vrlo je velik broj istraživanja koja se bave istraživanjem adsorpcije BSA na CaP.^{132–134}

2.2.3.2. Kitozan

Kitozan je prirodan linearni polisaharid vrlo sličan hitinu, polimeru koji je široko rasprostranjen u životinjskom carstvu. Otkriven je još 1859. godine kada je ustanovljeno da se kuhanjem hitina u KOH može dobiti drugačija vrsta polimera koja je topljiva u organskim kiselinama. Hitin se može izolirati iz školjaka, insekata, gljiva, itd.¹³⁵ Kitozan se u prirodi nalazi jedino u određenim vrstama gljiva (*Mucoraceae*), no najčešće se sintetizira termokemijskom deacetilacijom hitina u prisutnosti alkalijskih metala.¹³⁶ Struktura kitozana i hitina prikazana je na slici 13. Vrlo je slična strukturi celuloze te se sastoji od nekoliko stotina pa do tisuću β -(1-4) povezanih lanaca D-glukoze¹³⁷, no na C-2 mjestu umjesto hidroksilne skupine, nalazi se acetamidna skupina. Kitozan, β -(1-4) povezana 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoza, deacetilirani je oblik hitina nastao zamjenom acetamidne skupine u primarnu amino grupu.¹³⁸ No, deacetilacija gotovo nikada nije potpuno dovršena, stoga kitozan i deacetilirani hitin u nekoj mjeri sadrže i acetamidne skupine.



Slika 13. Struktura a) hitina i b) kitozana. Preuzeto iz reference 139.

Kitozan je kemijski reaktivniji od hitina zbog prisutnosti primarne i sekundarne amino skupine na svakoj ponavljajućoj glukoznoj jedinici.¹³⁹ Upravo prisutnost amino skupina u strukturi kitozana i hitina omogućuje njihovu biološku primjenu. Kao biomaterijal koristi se zbog odlične biokompatibilnosti, biorazgradivosti, bioaktivnosti, netoksičnosti te odličnih

adsorpcijskih svojstava. Stoga, sve veću primjenu pronalazi u industriji kao potencijalna zamjena sintetičkim polimerima.^{140,141}

Za razliku od BSA, kitozan se ne može dodati u SBF kako bi inducirao nastajanje CaP jer je topljiv samo u kiselim medijima. No, može se koristiti kao supstrat na kojemu talože CaP. Ciono i sur. sintetizirali su konjugirani polimer kitozana i fluorescina koji je izlaganjem vidljivom svjetlu inducirao nastajanja apatitnog sloja na svojoj površini nakon 7 dana inkubacije u SBF-u.¹⁴² Kitozan se, u kombinaciji s CaP, može pripremiti i u obliku spužve. Spužve su pjene velike poroznosti koje mogu adsorbirati velike količine tekućine¹⁴⁰, a one na bazi kitozana koriste se kao materijali za zacjeljivanje rana te kao punila u inženjerstvu čvrstog tkiva.¹⁴³ Do sada su pripremljene spužve na bazi kitozana i TCP-a.^{143,144} U svrhu razvoja novih materijala za biomedicinske primjene, Rusu i sur. pripremili su kompozite kitozana i nanočestica HAP-a taloženjem CaP-a u vodenom mediju na matriksu biopolimera.¹⁴⁵ Osim za razvoj novih materijala, istraživanja međudjelovanja kitozana i CaP provode se u svrhu određivanja mehanizama taloženja anorganskih faza u prisutnosti makromolekula kako bi se bolje kontrolirali biomimetski sintetski putovi nastajanja materijala željenih svojstava.^{146,147}

2.2.4. Biomimetska sinteza kalcijevih fosfata

Biomimetikom se može smatrati primjena mehanizama i metoda otkrivenih proučavanjem prirode i prirodnih procesa u dizajniranju i razvoju novih materijala, kemijskih spojeva i moderne tehnologije.⁸ Biomimetska sinteza proces je dobivanja novih produkata kemijskim reakcijama kojima se oponašaju biološki procesi koristeći sudionike i reakcijske uvjete što sličnije onima u biološkim sustavima. Unatoč ogromnim uspjesima moderne znanosti i tehnologije, prirodan način sinteze čvrstih tkiva iz anorganskih komponenti do sada nije ponovljen u laboratoriju sintetičkim procedurama. S obzirom da su najzastupljenija anorganska komponenta čvrstih tkiva CaP, biomimetska sinteza materijala što sličnijih onima u organizmu pojavljuje se odnosi na sintezu CaP pri uvjetima što bližim fiziološkima. Na prvi pogled, najjednostavniji način takve sinteze bio bi miješanje otopina koje sadrže kalcijeve i ortofosfatne ione.^{94,148} No, takav način sinteze rezultira nastajanjem taloga znatno drugačijih svojstava od bioloških apatita (kemijski sastav, omjer Ca/P, razina kristalizacije, distribucija veličina čestica, itd.). Općenito, osnovne razlike *in vivo* i *in vitro* kristalizacije su:

- (i) U *in vitro* kristalizaciji smanjuje se pH vrijednost te koncentracija kalcijevih i ortofosfatnih iona dok koncentracija drugih iona i molekula prisutnih u taložnom

sustavu ostaje jednaka. Simulacija takvih uvjeta može se postići taloženjem CaP iz prezasićenih otopina, koristeći metode kontinuiranog toka ili konstantnog sastava (*constant composition techniques, CC*).^{62,149}

- (ii) Kemijska kristalizacija vrlo je brz proces koji traje od nekoliko minuta do nekoliko dana, dok je biološka vrlo spor proces koji traje od nekoliko tjedana pa godinama. Duljina trajanja kristalizacije može se usporiti difuzijom kalcijevih i ortofosfatnih iona iz suprotnih smjerova kao što je to primjerice u dvostruko-difuzijskim (*double diffusion, DD*) reaktorima za kristalizaciju ili u viskoznim gelovima.^{150,151}
- (iii) U biološkim tekućinama (krv, slina, serum) prisutni su mnogi organski, anorganski, biološki i polimerni spojevi koji se mogu ponašati kao inhibitori ili promotori taloženja te mogu poslužiti čak i kao kalup za rast bioloških apatita.¹⁵² Dodatak različitih iona i makromolekula u taložne sustave može se postići upotrebom odgovarajuće kristalizacijske otopine.¹⁵³ Najbolji način svakako bi bio provesti eksperimente u tjelesnim tekućinama (krvni serum, slina, limfa, itd.) što je vrlo teško zbog nestabilnosti takvih tekućina i promijene u njihovom sastavu te na kraju i skladištenja.

Danas su najčešće upotrebljavani biomimetski načini sinteze CaP korištenjem tzv. simuliranih medija koji su sastavom slični biološkim medijima. Prvenstveno se korištenjem takvih otopina nastoji oponašati sastav izvanstanične tekućine (*extracellular fluid, EFC*). Stoga su osnovne komponente svake takve otopine NaCl, KCl, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Na_2HPO_4 ili $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, $NaHCO_3$ i Na_2SO_4 . Prvi takav medij osmislio je Hank još 1949. godine, a sadrži ione kalcija i fosfata s anorganskim ionima i glukozom.¹⁵⁴ Sastav anorganske komponente Hankove otopine (*Hank's balanced salt solution, HBSS*) i drugih biomimetskih sustava u prikazan je tablici 2. U novije vrijeme, najkorištenija biomimetska otopina je acelularna simulirana tjelesna tekućina (*simulated body fluid, SBF*) koja u svom sastavu ne sadrži proteine, a koju je prvi put sintetizirao Kokubo.²² SBF je metastabilna otopina pH vrijednosti $\sim 7,40$ prezasićena s obzirom na HAP koja sadrži anorganske ione koncentracija približno jednakih onima u krvnoj plazmi. No, SBF također sadrži i tris/HCl pufer te hidrogenkarbonatne ione koncentracije $4,2 \text{ mmol dm}^{-3}$, puno manje u odnosu na koncentraciju u krvnoj plazmi koja iznosi $27,0 \text{ mmol dm}^{-3}$.²² Problem koncentracije hidrogenkarbonatnih iona riješen je razvojem sintetičke tjelesne tekućine, a potom i revidirane SBF (rSBF). Zbog sličnosti krvnoj plazmi, rSBF trenutno se smatra najboljom simuliranom tekućinom.

Tablica 2. Koncentracija anorganskih iona nekih od biomimetskih medija u usporedbi sa sastavom izvantjelesne tekućine (EFC): Hankova otopina (HBSS), simulirana tjelesna tekućina (SBF) i revidirana simulirana tjelesna tekućina (rSBF). Prema referenci 22.

	$c / \text{mmol dm}^{-3}$							
	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	HPO_4^{2-}	HCO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}
EFC	142,0	5,0	1,5	2,5	1,0	27,0	103,0	0,5
HBSS	141,6	5,81	0,81	1,26	0,78	4,065	144,8	0,81
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	1,0	4,2	147,8	0,5
rSBF	142,0	5,0	1,5	2,5	1,0	27,0	103,0	0,5

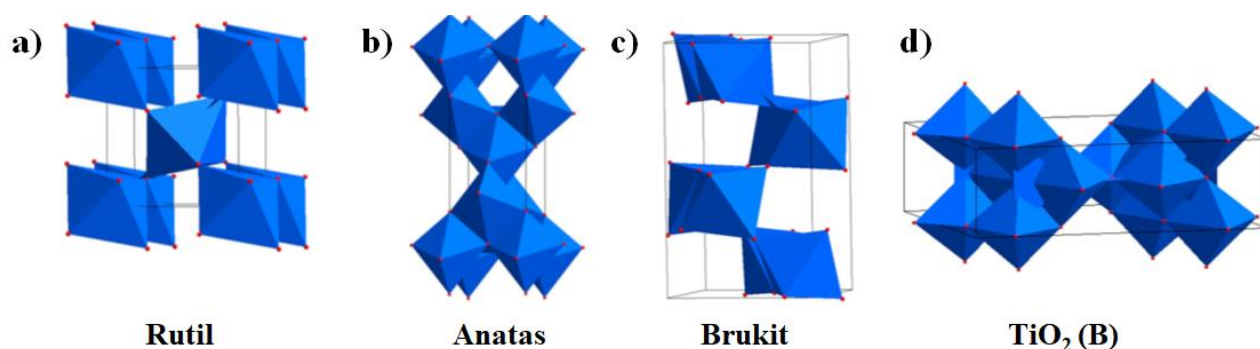
Osim za procjenu *in vivo* bioaktivnosti CaP, otopine na bazi SBF koriste se i za nanošenje CaP-a na bioinertne površine. Kako bi se proces ubrzao, moguće je koristiti dvostruko ili čak deseterostruko koncentriranije SBF otopine, no takav način sinteze nije preporučljiv jer promjenom koncentracije SBF otopine dolazi i do promijene kemijskog sastava taloga koja se ponajviše očituje u smanjenju koncentracije fosfatnih iona i povećanju koncentracije karbonatnih iona.¹⁵⁵

Korak dalje u biomimetskoj sintezi CaP-a bio bi taloženje u SBF otopini na kalupu kojeg čine proteini čime bi se kontrolirala organizacija kristala i njihova svojstva. Na primjer, CaP su uspješno sintetizirani na kolagenu čime se dobila struktura relativno slična strukturi kostiju te su trenutno u kliničkim istraživanjima.^{156,157} Druge matrice za CaP-a sintezu su želatina, kitozan, organski polielektroliti, titanij, polimeri, celuloza, samoorganizirani monoslojevi i drugi materijali.⁶

2.3. Titanatni i TiO_2 nanomaterijali

Od početka komercijalne primjene 20-tih godina 20. stoljeća, titanijev dioksid (TiO_2) široko se koristi kao pigment u kremama za sunčanje, bojama, pastama za zube, itd.^{158–160} Kada su 1972. godine Fujishima i Honda otkrili fenomen fotokatalize vode na TiO_2 elektrodi pod ultraljubičastim (UV) zračenjem, materijali temeljeni na TiO_2 počeli su se uvelike primjenjivati u području elektronike i senzora.^{161,162}

TiO₂ se javlja u obliku tri polimorfa, anatas, rutil i brukit. Također, može se pojaviti u obliku nekoliko metastabilnih polimorfa kao što su TiO₂(B), TiO₂ II i petrovskit koji su proizvedeni sintetičkim putevima.¹⁴ Najstabilniji polimorf TiO₂ je rutil. Pri visokim temperaturama, metastabilni polimorfi anatas, brukit i TiO₂(B) prelaze u rutil. Na slici 14 shematski je prikazana kristalna struktura četiri polimorfa TiO₂.

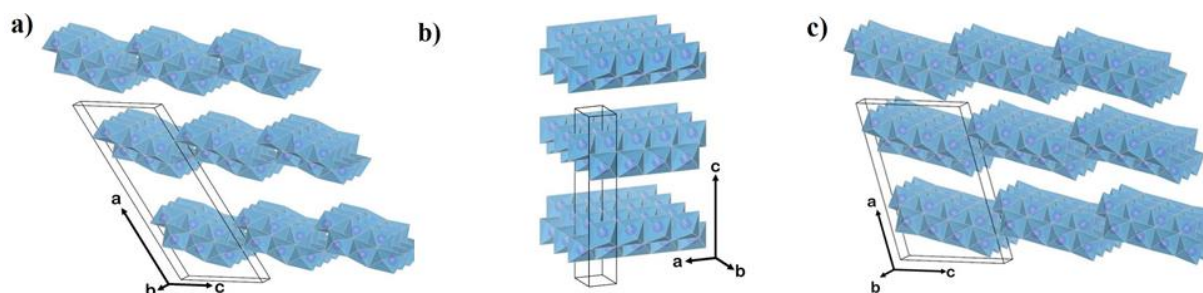


Slika 14. Shematski prikaz kristalne rešetke TiO₂ polimorfa: a) rutila, b) anatas, c) brukita i d) TiO₂ (B). Kao građevne jedinice prikazani su Ti-O oktaedri. Konstruirano prema referenci 14.

U drugoj polovini prošlog stoljeća, sve više istraživanja provodi se na nanomaterijalima TiO₂ (TiNM). Iako ne postoji službena i jedinstvena definicija nanomaterijala, Europska komisija je 2011. godine izdala neobvezujuće preporuke definicije nanomaterijala prema kojima se nanomaterijalom smatra onaj materijal koji sadrži najmanje 50 % čestica veličina 1 – 100 nm prema brojčanoj raspodjeli.¹⁶³ Zbog nesigurnosti u određivanju broja čestica, US Environmental Protection Agency preporučuje određivanje prema masi. Također, zbog nedovoljnih definicija i slobodne procijene, treba izbjegavati definiciju nanomaterijala kao čestica većih od 100 nm koje svejedno sadržavaju svojstva nano skale.¹⁶⁴

Smanjenjem veličine materijala povećava se specifična površina te omjer površine i volumena što rezultira promjenom fizikalnih i kemijskih svojstva pa tako TiNM posjeduju svojstva u potpunosti drugačija u odnosu na makroskopski materijal.¹⁶⁵ Za razliku od makroskopskih materijala, sintetizirani TiNM najčešće su anatas strukture^{166–168}, a gotovo uvijek ih je moguće dobiti iz otopina te nisko temperaturnom depozicijom. Visoko temperaturnom depozicijom i žarenjem najčešće nastaje rutil. TiNM TiO₂(B) faze teže je sintetizirati, no najčešći način dobivanja je kristalni rast u otopinama.¹⁴ Osim TiO₂, važno je spomenuti i titanate, anorganske spojeve koji se sastoje od titanijevih oksida. U tu skupinu

pripadaju protonirani oblici kao što je polititanatna kiselina $H_{2m}Ti_nO_{2n+m}$. Takve titanatne strukture sastoje se od 2D slojeva međusobno povezanih TiO_6 oktaedrima, pri čemu se kationi i neutralne molekule mogu smjestiti u prostor između slojeva.¹⁶⁹ S obzirom na kristalnu simetriju, polititanatne kiseline mogu se podijeliti u dvije podskupine: monoklinske i ortorombske. Strukture nekih polititanatnih kiselina prikazane su na slici 15.



Slika 15. Shematski prikaz kristalne strukture a) $H_2Ti_3O_7$ monoklinske strukture, b) $H_xTi_{(2-x/4)(x/4)}O_4$ ortorombske strukture i c) $H_2Ti_4O_7$ monoklinske strukture. Ljubičaste sfere predstavljaju Ti atome dok plavi oktaedri predstavljaju TiO_6 blokove u čijim su uglovima kisikovi atomi. Konstruirano prema referenci 169.

S obzirom na klasifikaciju materijala prema dimenzijama koje nisu u nano skali (> 100 nm), NM se mogu podijeliti na nuladimenzionalne (0D) u koje se ubrajaju nanočestice (NP), u 1D nanomaterijale u koje se ubrajaju nanožice (NW) i nanocjevi (NT), dvodimenzionalni (2D) nanomaterijali su nanoslojevi, dok 3D nanomaterijali nisu nano niti u jednoj dimenziji te uključuju disperzije nanočestica, nakupine NT ili NW te višeslojeve nanoskale.^{15,170}

2.3.1. Sinteza titanatnih nanomaterijala

Poput svih drugih nanomaterijala i titanatni nanomaterijali mogu se pripremiti metodama sinteze od dna prema vrhu ("*bottom up approach*") i vrha prema dnu ("*top down approach*"), odnosno od manjih čestica koje formiraju željeni materijal ili od makroskopskog ("*bulk*") materijala koji se razbije u manje čestice. Većina "*bottom-up*" metoda temelji se na kristalnom rastu iz otopine ili kondenzirane faze.^{171,172}

Jedan od načina pripreme TiNM je sol-gel metoda koja se već uvelike primjenjuje u sintezi različitih vrsta keramičkih materijala.^{173,174} Tijekom tipičnog sol-gel procesa, hidrolizom i polimerizacijom prekursora formira se koloidna suspenzija (sol). Prekursorski materijali

najčešće su soli metala, ili organske tvari koje sadrže metale poput alkoksida. Potpuna polimerizacija i gubitak otapala dovodi do transformacije iz sol (tekuće) u gel (čvrstu) fazu. TiO₂ nanomaterijali sintetiziraju se sol-gel metodama iz prekursora koji sadržavaju titanij. Navedeni procesi uobičajeno su potaknuti kiselom hidrolizom titanijeva(IV) alkoksida popraćenom kondenzacijom.^{166,175-178} Osim sol-gel metoda, TiNM se mogu pripremiti i sol metodama. U tom se slučaju pod pojmom sol sinteze podrazumijeva sol-gel sinteza bez prisutnosti otapala što se najčešće odnosi na reakciju titanijevog klorida s molekulama donorima kisika poput metalnih alkoksida ili etera.¹⁷⁹⁻¹⁸¹

Možda jedna od najpopularnijih metoda pripreme TiNM zasigurno je hidrotermalna sinteza. Takav način sinteze najčešće se provodi u čeličnom autoklavu s ili bez teflonskog uloška pri kontroliranoj temperaturi i/ili tlaku u vodenoj otopini. Temperatura i volumen otopine ponajviše utječu na interni tlak koji se stvara tokom reakcije u autoklavu. Na taj način moguće je sintetizirati TiO₂ nanočestice reakcijom titanijevog alkoksida u kiseloj smjesi vode i etanola.¹⁸² Osim TiNP, takvom vrstom sinteze moguće je pripremiti i druge TiNM oblike poput TiO₂ nanoštapića (TiNR) i TiO₂ nanožica (TiNW).¹⁸²⁻¹⁸⁴ Jedna od najvažnijih primjena hidrotermalne sinteze zasigurno je jednostavna i ekonomski isplativa priprema TiO₂ nanocjevčica (TiNT) koju je 1998. god. objavio Kasuga.¹⁸⁵

2.3.2. Primjena titanatnih nanomaterijala

Najvažnija primjena TiO₂ (nano)materijala zasigurno je kao poluvodiča.¹⁸⁶ TiNM posjeduju veću specifičnu površinu, više reakcijskih mjesta te mogu pokazivati efekt kvantne zatočenosti (*"quantum confinement effect"*) u odnosu na makroskopski materijal.¹⁴ Zbog navedenih svojstava, TiNM se upotrebljavaju u primjenama vezanim za energiju ili katalizu, u fotonaponskim uređajima i fotokatalizi, u sistemima za skladištenje energije, kao elektrokromni uređaji te kao senzori.^{187,188}

Fotokatalitička primjena TiNM temelji se na izvrsnoj stabilnosti, dobrim elektroničkim svojstvima i činjenici da su ekološki prihvatljivi materijali.^{189,190} No, jedan od nedostataka korištenja TiNM u navedenim primjenama apsorpcija je samo u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra, što osobito dolazi do izražaja u fotoelektrokemijskoj primjeni. Jedan od načina rješavanja ovog problema, dopiranje je TiNM s drugim elementima ili ionima, bilo oni anioni ili kationi.¹⁹¹

Zbog dobre elektroničke strukture, poboljšane sposobnosti apsorpiranja napona, smanjene optičke refleksije te efikasnije apsorpcije, TiO₂ materijali primjenjuju se i u fotonaponskim sustavima kao skupljači (kolektori) napona. Negativne strane korištenja TiNM su raspršenje s površine te hrapavost površine nanomaterijala kao i rekombinacija naboja.

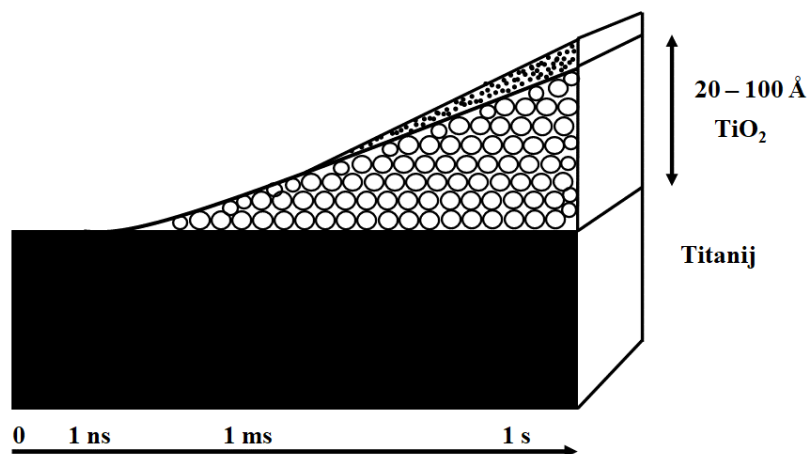
Nadalje, TiNM koriste se i u razvoju elektrokemijskih sustava nove generacije za skladištenje energije kao što su baterije i superkondenzatori. Trenutno se TiNM najviše istražuju kao građevne jedinice elektroda baterija.^{192,193} S obzirom da se litij može ugrađivati u TiO₂ strukture, u posljednjem se desetljeću TiO₂ materijali sve više istražuju kao anode u litij ionskim baterijama.¹⁹⁴ U ovoj se primjeni, među svim polimorfima TiO₂, najviše iskazao TiO₂(B) zbog najmanje gustoće te eksperimentalno dokazanog najmanjeg kapaciteta.

TiO₂ materijali posjeduju svojstvo elektrokromizma ukoliko se dopiraju nekim od monovalentnih iona. Elektrokromizam je fenomen u kojemu materijal mijenja boju uslijed redoks procesa (transfera elektrona) ili kao posljedica dovoljnog elektrokemijskog potencijala.¹⁹⁵ Upravo zbog toga TiNM se primjenjuju kao pametni prozori, ekrani, ogledala te sunčani paneli.

Uz navedene primjene, materijali na bazi titanija i njegovih legura imaju značajnu primjenu i u medicini.

2.3.2.1. Titanatni biomaterijali

Materijali TiO₂ struktura opsežno se istražuju kao biomaterijali zbog svoje izvrsne biokompatibilnosti i otpornosti na koroziju i eroziju te izrazite stabilnosti.¹⁹⁶ U biomedicinskim primjenama najčešće se koriste biomaterijali temeljeni na čistom titaniju te njegovoj leguri s aluminijem i vanadijem (Ti-6Al-4V). Otpornost na koroziju posljedica je stvaranja površinskog sloja oksida koji je vrlo snažno vezan na površini materijala. TiO₂ sloj stvara se već nakon 2 ns izlaganja površine implant materijala zraku ili vlazi kao što su fiziološke tekućine i tjelesna temperatura. Već nakon 1 s sloj TiO₂ doseže debljinu 20 – 100 Å (slika 16).¹⁹⁷ Biokompatibilnost titanijevih implantata posljedica je otpornosti na koroziju i nereaktivnosti elementarnog titanija, stoga je većina titanijevih implantata bioinertna.¹⁹⁸



Slika 16. Nastajanje netopljivog sloja TiO₂ na površini titanija. Konstruirano prema referenci 197.

Među implant materijalima temeljenim na metalima, implant materijali bazirani na titaniju i njegovim legurama pokazuju najveću sposobnost vezanja s kostima. To je posljedica stvaranja sloja titanata (Na₂TiO₃) na površini implantata uslijed izmjene iona. Daljnja izmjena iona između implantata i fiziološke tekućine rezultira stvaranjem CaP-a na površini koji induciraju vezanje kosti. Kako bi se poboljšalo vezanje kosti na implantate, na površinu titanijevih implantata često se nanosi sloj TiO₂ za koji je dokazano da potiče vezanje već nakon 8 tjedana od ugradnje implantata. Ukoliko TiO₂ sloj nije nanesen, do vezanja kosti dolazi 6 mjeseci nakon implantacije.¹⁹⁸

Titan materijali imaju sposobnost poboljšavanja adhezije osteoblasta i induciranja rasta stanica.¹⁹⁹ Bioaktivni materijali anatas i rutil struktura primjenjuju se u koštanom inženjerstvu zbog svoje sposobnosti stvaranja vrlo jakih međudjelovanja s koštanim tkivom stvarajući sloj apatita na svojoj površini.²⁰⁰⁻²⁰² Velik broj istraživanja usmjeren je ka razvoju CaP/TiO₂ kompozitnih materijala kao bioaktivnih presvlaka na titanijevim implantatima, koristeći HAP^{203,204} ili TCP^{30,205}. Sato i sur. te Hu i sur. pokazali su da u kontaktu sa HAP/TiO₂ kompozitima dolazi do adhezije stanice i proliferacije.²⁰⁴ Jednako ponašanje dokazano je i za TCP/TiO₂ kompozite.²⁰⁶ Osim dobre biokompatibilnosti, pokazano je i da takvi kompoziti pokazuju mehanička svojstva vrlo slična svojstvima kostiju.²⁰²

2.4. Adsorpcija proteina

Adsorpcija proteina ima vrlo značajnu ulogu u velikom broju prirodnih procesa kao što su provođenje signala između membrana i koagulacija krvi.^{207–209} Upravo zato, taj proces potrebno je vrlo dobro razumjeti za uspješan razvoj novih materijala u području biomedicinskog inženjerstva i biotehnologije.^{210,211} Nadalje, razumijevanje procesa adsorpcije proteina važno je za dizajniranje površina implant materijala s ciljem poboljšavanja njihove biokompatibilnosti, razumijevanja i kontroliranja procesa biomineralizacije te razvoja sustava za isporuku lijekova.²¹²

Za razliku od malih molekula koje se ponašaju kao rigidne čestice te se vežu za površinu određenom brzinom adsorpcije i desorpcije, proteini su molekule kompleksnije strukture i svojstava. Prilikom adsorpcije proteina dolazi do promjene njegove strukture, promjene afiniteta površine prema proteinu, međudjelovanja između molekula proteina vezanih na površinu, površinske agregacije, itd.²¹³ Na adsorpciju proteina, osim svojstava proteina i površine, utječu i reakcijski uvjeti pri kojima se odvija adsorpcija, prvenstveno temperatura, pH vrijednost otopine, ionska jakost i sastav otopine.

Temperatura utječe na ravnotežno stanje i brzinu adsorpcije proteina. Povećanjem temperature povećava se i difuzijski koeficijent proteina te posljedično i brzina adsorpcije. S obzirom da je osnovna pokretačka sila adsorpcije proteina povećanje entropije kao posljedica otpuštanja površinski vezane vode i iona, povećanjem temperature dolazi i do povećanja količine površinski vezanog proteina.^{214–216}

Elektrostatska svojstva proteina određuje i pH vrijednost otopine, prvenstveno njihov naboj. Pri pH vrijednostima nižima od vrijednosti izoelektrične točke proteina (pI , $pH < pI$) proteini su pozitivno nabijeni, dok su pri pH vrijednostima iznad pI ($pH > pI$) negativno nabijeni. Pri pH vrijednostima otopine koje odgovaraju pI , količina adsorbiranog proteina je najveća te je najveća i površinska prekrivenost površine jer dolazi do smanjenja elektrostatskih odbijanja između proteina.^{217,218}

Još jedan parametar koji utječe na adsorpciju proteina je ionska jakost. Pri većim vrijednostima ionske jakosti, elektrostatska međudjelovanja između nabijenih vrsta kraćeg su dosega. Posljedično, vezanje proteina ili njegove domene naboja jednakog kao i površine bit će poboljšano, dok će vezanje na površinu suprotnog naboja biti inhibirano.²¹⁹ Osim toga, pri većim ionskim jakostima dolazi do agregacije proteina.²²⁰

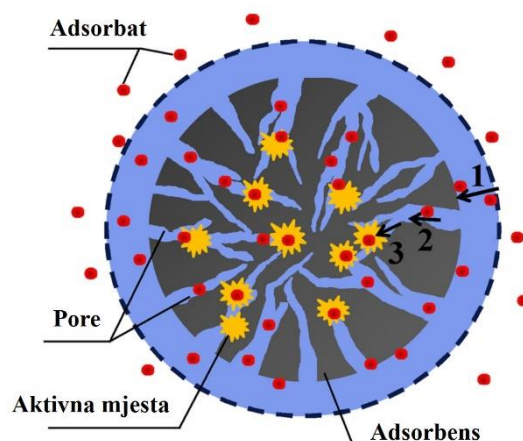
Na adsorpciju proteina utječu i svojstva samih proteina te površina na kojima dolazi do adsorpcije. Vežanjem na površinu, dolazi do promjene svojstava proteina. Dok se u otopini mogu slobodno rotirati, vežanjem na površinu proteini će zauzeti određenu orijentaciju tako da je neka domena proteina vezana na površinu, a druga izložena otopini. Ta orijentacija vrlo je bitna za svojstva poput enzimske aktivnosti ili bioaktivnosti.²¹³

Proteini u svojoj strukturi posjeduju hidrofobne i hidrofilne domene, koje mogu biti pozitivno ili negativno nabijene te neutralne. Orijentacija kojom se proteini vežu na površinu također ovisi o svojstvima površine. Vežanje proteina na nepolarne površine većinom je određeno hidrofobnim međudjelovanjima.²²¹ S obzirom da je tercijarna struktura proteina stabilizirana hidrofobnim međudjelovanjima, vežanjem proteina na nepolarne površine postoji velika vjerojatnost razmotavanja proteina te njegovog širenja po površini na način da su nepolarni aminokiselinski ostatci orijentirani prema površini. Vežanje proteina na polarne površine određeno je vodikovim vezama. S obzirom da protein i površina stvaraju vodikove veze s vodom, da bi došlo do adsorpcije proteina jedan set vodikovih veza mora biti prekinut, a drugi stvoren. Takva zamjena ne predstavlja promjenu ukupne energije vežanja te ne dolazi niti do promjene ukupne entropije sustava. S obzirom da protein stvara mnogo više vodikovih veza s površinom nego s okolnom vodom, takva vrsta vežanja je reverzibilna.²²¹

Na sličan način proteini se vežu i na nabijene površine. Kako bi došlo do vežanja, protein i površina prvo moraju otpustiti protuione vezane za njihove nabijene skupine. Takva vrsta međudjelovanja predstavlja proces izmjene iona koji je posljedica entropijskih, a ne energetskih doprinosa.^{222–224} Budući da se dio proteina naboja suprotnog od površine veže za nju, ovakva vrsta adsorpcije orijentacijski je specifična.

2.4.1. Kinetika adsorpcije proteina

Adsorpcija je proces transfera mase na čvrsti adsorbens, bilo iz tekuće ili plinovite faze.²²⁵ Istraživanja kinetike adsorpcije daju informacije o brzini adsorpcije, svojstvima adsorbensa i o mehanizmu transfera mase. Proces adsorpcije odvija se u tri koraka (slika 17). Prvi korak je korak vanjske difuzije u kojemu adsorbat prolazi kroz sloj tekućeg filma koji okružuje adsorbens. Osnovna pokretačka sila vanjske difuzije je razlika koncentracija u otopini i na površini adsorbensa. Sljedeći korak je unutarnja difuzija, odnosno transfer adsorbata u pore adsorbensa. Treći i posljednji korak je adsorpcija adsorbata u aktivna mjesta adsorbensa.²²⁵



Slika 17. Proces adsorpcije u 3 koraka: 1. vanjska difuzija, 2. unutrašnja difuzija i 3. adsorpcija na aktivna mjesta. Konstruirano prema referenci 225.

U svrhu opisivanja kinetike adsorpcije razvijeni su različiti kinetički modeli kao što su model pseudo-prvog reda (*pseudo-first-order model*, PFO), model pseudo-drugog reda (*pseudo-second-order model*, PSO), Elovichev model, modeli unutarčestične difuzije (*intraparticle diffusion model*, IPD), Avramijev model, itd. U primjeni tih modela javljaju se dva osnovna problema: PFO i PSO modeli nemaju specifično fizikalno značenje, dok su drugi teško primjenjivi. Procesi transfera mase ne mogu se istraživati PFO i PSO modelima. S druge strane, modeli čestične difuzije imaju fizikalno značenje, opisuju unutrašnju ili vanjsku difuziju, no metode rješavanja takvih modela poprilično su komplicirane. Još jedan od problema u korištenju navedenih modela je linearizacija parametara modela zbog pojednostavljenja rješavanja. No, na taj način se mijenjaju zavisna i nezavisna varijabla čime se može prouzročiti propagacijska greška što dovodi do netočne procijene parametara.²²⁵ S druge strane, nelinearne metode rješavanja navedenih modela omogućavaju točnu procjenu parametara.²²⁶

Procjena valjanosti kinetičkih modela može se iskazati koristeći različite statističke parametre kao što su R^2 , $\text{adj}R^2$, χ^2 , itd. Definicije parametara dane su jednadžbama 15 – 17.

$$R^2 = \frac{\sum (q_{\text{mean}} - q_{\text{cal}})^2}{\sum (q_{\text{mean}} - q_{\text{cal}})^2 - \sum (q_{\text{cal}} - q_{\text{exp}})^2} \quad (15)$$

$$\text{adj}R^2 = 1 - (1 - R^2) \frac{(N_{\text{exp}} - 1)}{(N_{\text{exp}} - N_{\text{para}} - 1)} \quad (16)$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(q_{\text{mean}} - q_{\text{cal}})^2}{(q_{\text{cal}})^2} \quad (17)$$

U navedenim jednadžbama q_{mean} , q_{cal} i q_{exp} predstavljaju srednju vrijednost adsorpcijskog kapaciteta (q_t), vrijednosti izračunate iz odabranog modela te dobivene eksperimentalnim mjerenjima, N je broj mjerenja. R^2 i $\text{adj}R^2$ trenutno su najkorišteniji statistički parametri. Čak preko 60 % trenutne literature koristi ova dva parametra za evaluaciju odgovarajućeg modela adsorpcije.²²⁵ No, s obzirom da vrijednosti statističkih parametara ponekad znaju biti vrlo bliske, preporuča se računanje više parametara kako bi se dobila odgovarajuća informacija o procjeni modela.

U većini adsorpcijskih eksperimenata, adsorpcijski parametri iskazuju se preko adsorpcijskog kapaciteta. Adsorpcijski kapacitet u vremenu t , dan je jednadžbom²²⁵:

$$q_t = \frac{(c_0 - c_t) \cdot V}{m_{\text{ads}}} \quad (18)$$

Pri čemu je c_0 početna koncentracija adsorbata, a c_t koncentracija adsorbata u vremenu t , V je ukupni volumen otopine, a m_{ads} predstavlja masu adsorbensa. U ravnoteži, adsorpcijski kapacitet (q_e) definiran je kao:

$$q_e = \frac{(c_0 - c_e) \cdot V}{m_{\text{ads}}} \quad (19)$$

Pri čemu je c_e ravnotežna koncentracija. Ukoliko je poznata specifična površina adsorbensa, S , moguće je izračunati i površinsku koncentraciju, Γ :

$$\Gamma_e = \frac{(c_0 - c_e) \cdot V}{m_{\text{ads}} S} \quad (20)$$

PFO model prvi je predložio Lagergren davne 1898. godine.²²⁷ Diferencijalni oblik jednadžbe PFO modela dan je jednadžbom 21:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1 (q_e - q_t) \quad (21)$$

Integracijom gornje jednadžbe u slučaju kada je $q_0 = 0$, dobije se nelinealizirani oblik PFO jednadžbe:

$$q_t = q_e (1 - e^{-k_1 t}) \quad (22)$$

Linearizirani oblik gornje jednadžbe glasi:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (23)$$

Pri čemu je k_1 koeficijent brzine reakcije pseudo-prvoga reda

Ho i McKay pokazali su da je PFO jednadžba primjenjiva jedino u početnim vremenima adsorpcije, prvih 20 – 30 min, a ne tijekom cijelog perioda adsorpcijskog procesa.²²⁸ Upravo zato, eksperimentalne podatke više neće biti moguće opisati PFO jednadžbom nakon 30 min

adsorpcijskog procesa. Prilikom opisivanja podataka PFO modelom, bitan je odabir odgovarajuće q_e vrijednosti koja ne može biti manja od vrijednosti q_t . Nadalje, q_e vrijednosti procijenjene iz eksperimenata često se ne poklapaju s onima izračunatim iz modela, što je još jedan od pokazatelja valjanosti PFO modela. Ukoliko se te dvije vrijednosti uvelike razlikuju, adsorpcijski proces ne može se opisati PFO modelom. Kako bi se izbjegli problemi vezani uz procjenu vrijednosti q_e parametara, preporuča se korištenje nelinearnog modela.²²⁹

Ovisno o koncentraciji adsorbata, svojstvima adsorbensa i vremenu, teorijski se može predvidjeti da će PFO model bolje opisivati podatke. PFO model primjenjuje se za opisivanje adsorpcijskog procesa u kojemu je početna koncentracija adsorbata relativno velika, odnosno veća od površinske koncentracije adsorbensa. Također, PFO model koristi se za opisivanje početnih koraka adsorpcijskog procesa te za opisivanje kinetike adsorpcije procesa na adsorbense koji sadrže manje aktivnih mjesta.²²⁵

PSO model prvi je primijenio Ho 1996 god. kako bi opisao adsorpciju olova na treset.²³⁰ Nakon toga, PSO model počeo se uvelike primjenjivati za opisivanje različitih adsorpcijskih procesa, a danas je jedan od najupotrebljavanijih modela koji opisuju procese adsorpcije.²²⁵ Brzina adsorpcije opisana PSO modelom dana je jednadžbom 24:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2 \quad (24)$$

Pri čemu je k_2 koeficijent brzine pseudo-drugog reda.

Integrirani oblik PSO jednadžbe glasi:

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (25)$$

A linearizirani oblik:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} \quad (26)$$

PSO model, u većini slučajeva, najbolje opisuje eksperimentalne podatke sustava u kojima je početna koncentracija adsorbata (c_0) relativno mala te one izmjerene u konačnim fazama adsorpcijskog procesa. Pokazano je da PSO model najbolje opisuje adsorpcijske procese adsorbensa koji imaju puno aktivnih mjesta.²²⁵

PFO i PSO modeli opisuju kinetiku adsorpcije, ali se njima ne mogu saznati informacije o mehanizmu samog procesa koje se mogu dobiti korištenjem modela unutarčestične difuzije. Prema modelu unutarčestične difuzije (IPD), pretpostavlja se da je difuzija adsorbata unutar pora adsorbensa najsporiji korak adsorpcije. Difuzija adsorbata u tekućem filmu i adsorpcija na

aktivna mjesta odvijaju se trenutačno. Tri najupotrebljavanija modela unutarčestične difuzije su Boydov model, Weber i Morrisom model te model unutrašnjeg transfera mase (engl. *internal mass transfer model*, IMT).²³¹

Linearizirana jednačba IPD–WM modela dana je jednačbom:

$$q_t = k_{id}\sqrt{t} + C \quad (27)$$

Pri čemu je k_{id} koeficijent brzine IPD modela, a konstanta C povezana je s debljinom međusloja. Veće vrijednosti konstante C upućuju na izraženiji utjecaj adsorpcije na međusloj adsorbent-tekućina.

Iako PFO i PSO modeli mogu opisati kinetiku adsorpcije, ne mogu dati informacije o mehanizmu. S druge strane, IPD modeli mogu odrediti korak mehanizam transfera mase koji određuje brzinu adsorpcije. U adsorpcijskim procesima između krute i tekuće faze, transfer adsorbata može biti određen difuzijom u filmu (vanjska difuzija), na površini i u porama adsorbensa ili kombinacijom difuzije na površini i u porama. Ukratko, ukoliko je graf ovisnosti q_t o $t^{0,5}$ linearan i prolazi kroz ishodište, adsorpcijski proces u potpunosti je kontroliran unutarčestičnom difuzijom. Suprotno tome, ukoliko navedeni graf daje višestruka linearna područja, tada je adsorpcijski proces kontroliran većim brojem adsorpcijskih koraka.²²⁵

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Materijali za sintezu titanatnih nanomaterijala

Za sintezu i fizikalno-kemijsku karakterizaciju korištene su kemikalije analitičke čistoće TiO₂ P25 čestice (Degussa, 75 % anatas, 25 % rutil), titanijev tetraizopropoksid (TIIP), fluorovodična kiselina (HF), natrijev hidroksid (NaOH) i klorovodična kiselina (HCl) proizvođača Sigma Aldrich. TiO₂ nanočestice (TiNP) kupljene su također od proizvođača Sigma Aldrich.

3.1.2. Materijali za pripremu simulirane tjelesne tekućine

Natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO₃), kalijev klorid (KCl), kalijev hidrogenfosfat trihidrat (K₂HPO₄·3H₂O), magnezijev klorid heksahidrat (MgCl₂·6H₂O), natrijev sulfat (Na₂SO₄), tris-hidroksimetil aminometan ((HOCH₂)₃CNH₂, Tris), klorovodična kiselina (HCl), natrijev hidroksid (NaOH), fosfatni pufer (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) kupljenje su od proizvođača Sigma Aldrich.

3.1.3. Materijali za taloženje kalcijevih fosfata

Kalcijev klorid dihidrat (CaCl₂·2H₂O), natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), albumin iz goveđeg seruma (BSA) i kitozan srednje molekulske mase kupljeni su od proizvođača Sigma Aldrich. Klorovodična kiselina (p.a.) kupljena je od proizvođača Kemika.

3.1.4. Materijali za adsorpciju albumina iz goveđeg seruma

Albumin iz goveđeg seruma i fosfatni pufer u obliku tableta kupljeni su od proizvođača Sigma Aldrich.

3.2. Sinteze nanomaterijala, hidroksiapatita i priprema medija

3.2.1. Sinteza titanatnih nanožica

Titanatne nanožice (TiNW) sintetizirane su alkalnom hidrotermalnom sintezom prema radu Selmani.²³² TiO₂ P25 čestice suspendirane su u 65 mL 10 mol dm⁻³ NaOH. Dobivena suspenzija podvrgnuta je djelovanju ultrazvuka u trajanju 2 sata radi homogeniziranja. Homogenizirana suspenzija prebačena je u autoklav s teflonskom reakcijskom posudom volumena 100 mL. Autoklaviranje je trajalo 24 sata pri temperaturi 180 °C. Dobivene TiNW isprane su MiliQ vodom te su inkubirane s 0,1 mol dm⁻³ HCl u trajanju 3 sata uz magnetsko miješanje, kako bi se asocirani Na⁺ ioni zamijenili s H⁺ ionima. Nakon inkubacije s HCl, TiNW su ispirane MiliQ vodom dok provodnost matičnice nije bila manja od 10 μS cm⁻¹. TiNW su zatim ofiltrirane preko Büchnerovog lijevka i sušene 8 sati pri 100 °C.

3.2.2. Sinteza titanatnih nanocjevčica

TiO₂ nanocjevčice (TiNT) pripremljene su alkalnom hidrotermalnom sintezom prema postupku Kasuge i sur.²³³ TiO₂ P25 čestice suspendirane su u 65 mL 10 mol dm⁻³ NaOH. Dobivena suspenzija podvrgnuta je djelovanju ultrazvuka u trajanju 2 sata radi homogeniziranja. Homogenizirana suspenzija prebačena je u autoklav s teflonskom reakcijskom posudom volumena 100 mL. Autoklaviranje je trajalo 48 h pri temperaturi 146 °C. Dobivene TiNT isprane su MiliQ vodom te su inkubirane 3 sata s 0,1 mol dm⁻³ HCl uz magnetsko miješanje, kako bi se asocirani Na⁺ ioni zamijenili s H⁺ ionima. Nakon inkubacije s HCl, TiNT su ispirane s MiliQ vodom dok provodnost matičnice nije bila manja od 10 μS cm⁻¹. TiNT su zatim ofiltrirane preko Büchnerovog lijevka i sušene 8 sati pri 100 °C.

3.2.3. Sinteza TiO₂ nanopločica

TiO₂ nanopločice (TiNPI) pripremljene su kiselom hidrotermalnom sintezom prema modificiranom postupku koji su opisali Sofianou i sur.²³⁴ 18 mL TIIP prebačeno je u teflonsku posudu u koju je polagano dokopavano 1,7 mL HF. Nakon hlađenja reakcijske smjese na sobnu temperaturu, teflonska posuda je stavljena u autoklav i zagrijavana 24 sata pri 180 °C. Nastali talog je filtriran i ispran deioniziranom vodom. Kako bi se uklonili F⁻ ioni, talog je inkubiran s

0,1 mol dm⁻³ NaOH 24 sata uz magnetsko miješanje. TiNPI su zatim ispirane MiliQ vodom dok provodnost matičnice nije bila manja od 10 µS cm⁻¹ te profiltrirane preko Büchnerovog lijevka i sušene 2 sata pri 500 °C.

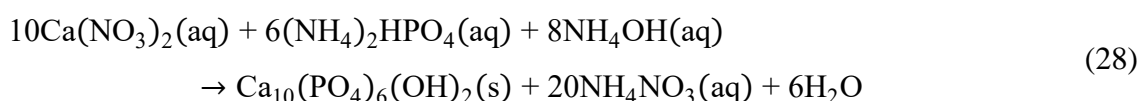
3.2.4. Priprema korigirane tjelesne tekućine

Korigirana tjelesna tekućina (SBF) pripremljena je prema proceduri koju su razvili Kokubo i Takadama.²² Prije pripreme, sve kemikalije osušene su u sušioniku, a prilikom sinteze korišteno je samo plastično posuđe. 700 mL MilliQ vode, zajedno sa magnetičem, uliveno je u plastičnu čašu volumena 1000 mL koja je stavljena na magnetsku miješalicu i prekrivena parafilmom. Voda je zagrijana na (36,5 ± 1,5) °C, uz magnetsko miješanje. Reagensi su dodani sljedećim redom u vodu: 8,035 g NaCl, 0,355 g NaHCO₃, 0,225 g KCl, 0,231 g K₂HPO₄ · 3H₂O, 0,311 g MgCl₂ · 6H₂O, 39 mL 0,1 mol dm⁻³ HCl, 0,292 g CaCl₂ i 0,072 g Na₂SO₄. Temperatura vode održavana je između 35 i 38 °C, a svaki idući reagens dodan je tek nakon što se prethodni u potpunosti otopio. Nakon otapanja navedenih reagensa, temperatura sustava ponovno je podešena na (36,5 ± 0,5) °C. U ovome koraku pH vrijednost otopine iznosi oko 2,0 ± 1,0 te je pH vrijednost potrebno postepeno povećavati dodajući u koracima Tris ukupne mase 6,118 g. No, kada pH vrijednost dosegne 7,45 ± 0,01 pri temperaturi (36,5 ± 0,5) °C dodaje se potreban volumen 1,0 mol dm⁻³ HCl kako bi se pH vrijednost smanjila na 7,42 ± 0,01 pazeći da pH ne padne ispod 7,40. Kada je pH vrijednost dosegla 7,42 ± 0,01 potrebno je otopiti preostali Tris dodajući ga u malim količinama, tako da pH otopine iznosi ≤ 7,45. Ako je ostalo još Tris-a, preostala količina i 1,0 mol dm⁻³ HCl naizmjenično se dodaju u otopinu, dok se ne otopi sva količina Tris, držeći pH u rasponu od 7,42 – 7,45. Kada se doda sva količina Tris-a, temperaturu otopine potrebno je namjestiti na (36,5 ± 0,2) °C, a pH na 7,42 ± 0,01 pri 36,5 ± 0,2 °C dodavanjem HCl u malim količinama. Na kraju dodavanja HCl, pH otopine treba iznositi 7,40 pri 36,5 °C. Konačni uvjeti moraju biti takvi da je promjena temperature manja od 0,1 °C min⁻¹. Tako pripremljena otopina prelije se u plastičnu odmjernu tikvicu od 1000 mL i vodom nadopuni do oznake. Nakon hlađenja, volumen se malo smanji što ne utječe na konačan rezultat. Nakon hlađenja, dodana je voda do oznake te je tikvica začepljena i omotana parafilmom. Tako pripremljen SBF čuvan je u frižideru te korišten u roku od 30 dana nakon pripreme.

SBF koji sadrži BSA pripremljen je direktnim otapanjem potrebne odvage BSA kako bi se dobila koncentracija 5 g L⁻¹.

3.2.5. Sinteza hidroksiapatita

Sinteza hidroksiapatita (HAP) napravljena je prema proceduri koji su opisali Chamary i sur.²³⁵ Ukratko, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ otopina dodavana je u otopinu $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ u staklenom reaktoru. Reakcijska smjesa mehanički je miješana. Otopina amonijaka održavala je lužnate pH uvjete (pH 8) koji su potrebni za odvijanje takve vrste reakcije. Reakcijska smjesa zagrijavana je pri 50 °C 20 sati. HAP nastaje prema jednadžbi 28. Na završetku reakcije, otopina je filtrirana i talog je sušen 48 h pri 90 °C.



3.3. Eksperimentalni postupci

3.3.1. Taloženje kalcijevih fosfata iz simulirane tjelesne tekućine

10 mg titanatnih nanomaterijala izvagano je u plastične posudice u 6 primjeraka po jednoj vrsti nanomaterijala. U posudice je dodan 1 mL otopine SBF ili 1 mL otopine SBF koja je sadržavala 5 g L⁻¹ BSA. Rađene su dvije vrste eksperimenata, s i bez prisutnosti BSA, kako bi se istražio utjecaj proteina na sposobnost TiNM da induciraju nastajanje CaP iz SBF-a.

Uzorci su termostimirani u vodenoj kupelji pri 25 °C tijekom 28 dana. SBF otopina redovno je mijenjana svaki dan. Za infracrvenu spektrofotometriju s Fourierovom transformacijom (FTIR) i difrakciju na polikristalnom uzorku (PXRD), uzorci su filtrirani nakon 1, 3, 7, 14, 21 i 28 dana na Milipore filter papiru promjera pora 0,45 μm, oprani 3 puta s MiliQ vodom, jednom s etanolom, osušeni u struji dušika i čuvani u eksikatoru do daljnje analize. Morfologija uzoraka određena je nakon 28 dana pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM).

3.3.2. Taloženje kalcijevih fosfata iz suspenzije

Kako bi se odredio mehanizam nastajanja CaP na TiNM te kako bi se odredio utjecaj pojedinih aditiva na taloženje CaP, potrebno je identificirati fazu i svojstva CaP istaloženih pri istim uvjetima, ali bez dodatka TiNM ili aditiva. Upravo zato, prvo je opisan postupak sinteze CaP iz suspenzije bez dodatka TiNM ili aditiva, tzv. kontrolnog sustava.

3.3.2.1. Taloženje kalcijevih fosfata u kontrolnom sustavu

Ishodne otopine $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i Na_2HPO_4 , koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pripremljene su otapanjem točne odvage kemikalija, prethodno sušenih 24 sata u vakuum sušioniku, u MilliQ vodi. Ishodnoj otopini Na_2HPO_4 , pH vrijednost namještena je na 7,4 koristeći koncentriranu i 1 mol dm^{-3} otopinu HCl . Otopine kationske i anionske komponente pripremljene su razrjeđivanjem odgovarajuće ishodne otopine na koncentraciju 8 mmol dm^{-3} . pH anionske komponente provjeren je i prema potrebi ponovo namješten na pH 7,4.

Taložni sustavi pripremljeni su brzim miješanjem ekvimolarnih koncentracija anionske (Na_2HPO_4) i kationske ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) komponente volumena 20 mL u reaktoru. Reaktor je staklena posuda s dvostrukim stijenkama ukupnog volumena 50 mL temperirana pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Taložni sustavi nisu dodatno miješani. Reakcija taloženja praćena je mjerenjem promijene pH vrijednosti u vremenu (potenciometrijom) Metrohm 701 pH/Ion metrom. Produkti dobiveni nakon 10 i 60 min reakcije filtrirani su na Millipore filter papiru promjera pora $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, oprani 3 puta MilliQ vodom, jednom s etanolom te osušeni u struji dušika. Uzorci su čuvani u eksikatoru do daljnje analize.

3.3.2.2. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti TiNM i aditiva

Kako bi se taloženjem iz suspenzije pripremili CaP/TiNM nanokompoziti, ishodne otopine titanatnih nanomaterijala (TiNM) koncentracije 1 g L^{-1} pripremljene su vaganjem odgovarajuće odvage TiNM i suspendiranjem u MilliQ vodi. Na taj način pripremljene suspenzije podvrgnute su djelovanju ultrazvuka u trajanju od 30 min neposredno prije korištenja. Ishodne suspenzije TiNM čuvane su u staklenim bocama zaštićene od direktnog kontakta sa svjetlošću. Potrebni volumeni ishodnih suspenzija TiNM dodani su u anionsku komponentu taložnog sustava kako bi se postigle koncentracije 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 100,0 i 200,0 mg L^{-1} . pH vrijednost anionske komponente ponovno je namještena na 7,4 koristeći $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopinu HCl . Anionska komponenta također je zaštićena od direktne izloženosti svjetlosti.

Kako bi se odredio utjecaj albumina iz goveđeg seruma, ishodna otopina BSA koncentracije 10 g L^{-1} pripremljena je otapanjem određene odvage BSA u MilliQ vodi. Ishodna otopina se lagano promiješa i ostaviti stajati oko 30 min pri sobnoj temperaturi kako bi se sav BSA otopio. Određeni alikvot ishodne otopine BSA razrijedi se i doda u anionsku komponentu (bez i uz prisustvo TiNM) kako bi se postigla koncentracija 100,0 i 200,0 mg L^{-1} . pH vrijednost anionske komponente prema potrebi ponovno se namjesti na 7,4.

Kitozan srednje molekulske mase topljiv je u kiselim medijima stoga je ishodna otopina kitozana koncentracije 200 mg L^{-1} pripravljena otapanjem odgovarajuće odvage kitozana u 1 mol dm^{-3} HCl. Tako pripravljenu smjesu potrebno je 2 sata suspendirati na ultrazvučnoj kupelji kako bi se sav kitozan u potpunosti otopio te ju je na kraju otapanja potrebno profiltrirati. Ishodna otopina kitozana dodaje se u anionsku otopinu, bez i u prisustvu TiNM. Koncentracije kitozana u anionskoj komponenti taložnog medija iznose 15,0, 20,0, 25,0 i $30,0 \text{ mg L}^{-1}$. Ukoliko su u taložni sustav istovremeno dodani TiNM i kitozan, koncentracija kitozana u anionskoj komponenti tada je iznosila $30,0 \text{ mg L}^{-1}$. Otopinu anionske komponente potrebno je ponovno namjestiti na 7,4 koristeći 10 mol dm^{-3} NaOH.

3.3.3. *Određivanje stabilnosti titanatnih nanomaterijala i aditiva u različitim medijima*

Raspodjela veličina i zeta potencijal titanatnih nanomaterijala (TiNM) i aditiva određena je metodama elektroforetskog i dinamičkog raspršenja svjetlosti. U tu svrhu pripravljena je suspenzija TiNM koncentracija dvostruko većih od onih u taložnom sustavu: 15, 10, 25, 30, 100 i 200 mg L^{-1} . Korištena otapala su MilliQ voda, otopina anionske komponente taložnog sustava (8 mmol dm^{-3} Na_2HPO_4), fosfatni pufer (PBS) i simulirana tjelesna tekućina (SBF). Suspenzije TiNM u anionskoj komponenti taložnog medija pripravljene su dodavanjem određenog alikvota ishodne suspenzije TiNM nakon čega je pH podešen na 7,4. U slučaju mjerenja u PBS i SBF, potrebna količina TiNM je izvagana i direktno suspendirana u navedenim medijima.

3.3.4. *Praćenje kinetike adsorpcije albumina na kalcijeve fosfate, titanatne nanomaterijale i njihove kompozite*

Ishodna otopina BSA koncentracije 10 g L^{-1} pripravljena je otapanjem potrebne količine BSA u PBS-u (pH 7,4). Tako pripravljena otopina, podijeljena je u manje količine i zaleđena. Potrebni volumen zaleđene ishodne otopine BSA termostatiran je pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ najmanje 1 sat prije mjerenja. Adsorpcijski eksperimenti provedeni su *in situ* koristeći UV-Vis spektrofotometar i proceduru sličnu kao D'Elia i sur.²³⁶ 10 mg adsorbensa (TiNM, CaDHA, HAP ili CaDHA/TiNM) odvagano je u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm . U kivetu je polako špricom dodano 3 mL otopine BSA koncentracije 1 g L^{-1} . Adsorpcija supernatanta

mjerena je svake 0,2 min pri valnoj duljini $\lambda = 278$ nm i pri 37 °C. Svi eksperimenti ponovljeni su 3 puta.

Kako bi se koncentracija adsorbiranog BSA mogla točno odrediti, baždarni pravci pripremljeni su i izmjereni svakodnevno. U tu svrhu, pripremljene su otopine BSA koncentracija 0,5, 0,75, 1,0, 1,25 i 1,5 g L⁻¹ u fosfatnom puferu.

3.3.5. *Istraživanje međudjelovanja albumina s kalcijevim fosfatima, titanatnim nanomaterijalima i njihovim kompozitima spektroskopskim metodama*

Fluorescencijske titracije provedene su pri konstantnoj koncentraciji BSA, 5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, te varirajući koncentraciju adsorbensa (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 i 150 mg L⁻¹). Uzorci za mjerenja pripremljeni su dodavanjem određenog volumena ishodne suspenzije adsorbensa suspendiranog u PBS-u otopini BSA te su inkubirani 10 min pri mjerenja. Mjerenja su provedena pri 37 °C u triplikatima.

3.4. Eksperimentalne metode

3.4.1. *Potenciometrija*

Uslijed promjene pH vrijednosti tokom taloženja CaP, napredovanje reakcije taloženja moguće je pratiti mjerenjem promjene pH vrijednosti u vremenu odnosno potenciometrijski. U tu svrhu korišten je Metrohm 913 pH–metar i staklena kombinirana Metrohm elektroda. Elektroda je prije svake upotrebe baždarena s 3 pufera pH vrijednosti 7, 4 i 9 proizvođača Merck. pH vrijednosti taložnog sustava mjerene su svaku minutu.

3.4.2. *Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom*

Infracrvena (IR) spektroskopija metoda je koja je bazirana na vibracijama atoma u molekulama. Prilikom apsorpcije IR zračenja dolazi do promjene električnog dipolnog momenta, što je izborno pravilo infracrvene spektroskopije.²³⁷ Infracrveni spektar može biti prikazan kao ovisnost apsorpcije ili transmitancije o valnom broju zračenja. Apscisa IR spektara predstavlja valni broj zračenja i koristi se za kvalitativnu analizu. Ordinata je intenzitet zračenja i može poslužiti za kvantitativnu analizu.

Infracrvena spektroskopija uz prigušenu totalnu refleksiju (*attenuated total reflectance infrared spectroscopy*, ATR) vrlo je brza i jednostavna metoda snimanja FTIR spektara koja se temelji na fenomenu totalne unutrašnje refleksije. Rezultirajuće prigušeno zračenje mjeri se kao funkcija valnog broja čime se dobiva apsorpcijski spektar karakterističan za uzorak.²³⁸ Prednosti ove metode su neosjetljivost na utjecaj čestica i mjehurića zraka u otopini te jednostavno snimanje referentnog spektra za koji može poslužiti i spektar zraka. No, jedan od glavnih nedostataka jest slaba mogućnost kvantitativnih mjerenja jer intenzitet apsorpcijskog maksimuma ovisi o indeksu loma uzorka koji se može promijeniti zbog promjene koncentracije uzorka ili temperature.

FTIR spektri snimljeni su na FTIR spektrofotometru opremljenom s modulom prigušene totalne refleksije (Tensor I, Bruker, Ettlingen, Njemačka). FTIR spektri snimljeni su u području $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ s razlučivanjem 1 cm^{-1} . Prikazani spektri prosjeci su 16 snimaka.

3.4.3. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija metoda je komplementarna FTIR spektroskopiji i zajedno s njom omogućuje potpunu vibracijsku karakterizaciju molekule, a bazira se na neelastičnom raspršenju svjetlosti.²³⁸ Izorno pravilo Ramanove spektroskopije je da je promjena polarizabilnosti različita od nule. Vibracijske vrpce u Ramanovim spektrima, kao i FTIR spektrima, karakterizirane su njihovom frekvencijom (energijom), intenzitetom (polarnim karakterom ili polarizabilnošću) i oblikom vrpce (okolina kemijske skupine).

Jedna od glavnih prednosti Ramanove spektroskopije je snimanje vodenih otopina jer voda slabo raspršuje Ramanovo zračenje. Taj problem uvelike je izražen u slučaju IR spektroskopije jer voda apsorbira IR zračenje. No, za induciranje Ramanovog efekta potrebna je upotreba lasera što može dovesti do fotodekompozicije uzorka, a neki uzorci pod djelovanjem lasera mogu fluorescirati.

Za snimanje Ramanovih spektara korišten je spektrometar Horiba Jobin-Yvon T64000 opremljen s Coherent INNOVA 400 argonskim laserom valne duljine 514,5 nm za pobudu Ramanskih modova. Instrument je radio u mikro-Raman konfiguraciji. Lasersko zračenje nominalne snage 20 mW usmjeren je na uzorke pomoću leća objektiva povećanja 50x (Olympus, Tokyo, Japan). Spektri su snimljeni pomoću programa LABSPEC.

3.4.4. Difrakcija rendgenskih zraka na praškastom uzorku

Difrakcija rendgenskih zraka na praškastom uzorku (*Powder X-Ray diffraction*, PXRD) neinvazivna je analitička tehnika koja daje informacije o kristalnoj strukturi, kemijskom sastavu i fizičkim svojstvima materijala.²³⁹ Polikristalni materijal se u praškastom obliku sastoji od više istovrsnih ili raznovrsnih kristala orijentiranih u različitim smjerovima. PXRD metodom mogu se analizirati uzorci u obliku praha, masivni uzorci i tanki filmovi od nanometarskih do mikrometarskih veličina kristala što ovu metodu čini široko primjenjivom.

Iz difraktograma praha moguće je identificirati pojedine faze u uzorku i kvantitativno analizirati uzorak. Položaj difrakcijskih maksimuma daje informacije o međuplošnom razmaku, parametrima jedinične ćelije te o mogućoj supstituciji atoma. Širina maksimuma daje informacije o veličini kristalita i deformaciji jedinične rešetke. Veći kristali daju oštre difrakcijske maksimume, dok su u slučaju kristala veličina manjih od 1 μm difrakcijski maksimumi prošireni. Također, široki difrakcijski maksimumi javljaju se i u difraktogramima amorfni uzoraka.²⁴⁰ PXRD metodom moguće je provesti i kvantitativnu analizu uzorka na temelju kalibracijske krivulje dobivene snimanjem smjesa poznatih uzoraka ili korištenjem standarda za određivanje ovisnosti omjera intenziteta o udjelu faze. Veličinu kristalita moguće je odrediti koristeći Debye-Scherrerovu jednadžbu²⁴¹:

$$\text{veličina kristalita} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (29)$$

Pri čemu K predstavlja Scherrerovu konstantu, odnosno bezdimenzionalni faktor koji ovisi o obliku kristalita iako se u većini slučajeva njegova vrijednost aproksimira na 0,9. λ je valna duljina zračenja, β je širina adsorpcijskog maksimuma najvećeg intenziteta na polovini njegove visine dok je 2θ difrakcijski kut.

Difraktogrami praškastih uzoraka snimljeni su na Panalytical Aeris Research Edition instrumentu u Bragg-Brentano geometriji koristeći $\text{CuK}\alpha$ zračenje. Difraktogrami su snimani u 2θ području 5° do 70° s korakom $0,02^\circ$ 2θ i brzinom snimanja 1° min^{-1} .

3.4.5. Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza temelji se na mjerenju promjene mase uzorka kao funkcije temperature ili kao funkcije vremena (pri konstantnoj temperaturi). Tijekom analize, uzorak se programirano zagrijava u uvjetima kontrolirane atmosfere (dušik, zrak, kisik). TGA koristi se

za karakterizaciju i identifikaciju materijala, određivanje sastava uzorka, određivanje udjela organskog otapala te anorganskog udjela u uzorku (pepeo), udio aditiva, određivanje mehanizma, praćenje kinetike razgradnje, određivanje stupanja umreženja i toplinske postojanosti materijala. U temperaturnom rasponu između 25 i 300 °C može se registrirati gubitak mase vezan za lako hlapive komponente (adsorbirana vlaga ili voda), zaostalo otapalo ili aditive niske molekulske mase te oligomere. U temperaturnom području između 100 i 250 °C mogu se detektirati produkti koji nastaju nakon reakcije umrežavanja fenolnih ili amino smola (voda i formaldehid). Pri temperaturama iznad 200 °C (< 800 °C) mogu se detektirati produkti razgradnje koji nastaju pucanjem lanaca polimera. Za točno određivanje temperature određene promjene može se koristiti i prva derivacija dobivene krivulje.

Termogrami uzoraka snimljeni su na Mettler TG 50 termo vagi s TC 10 TA procesorom. Uzorak je analiziran u temperaturnom području 25 – 800 °C uz brzinu zagrijavanja 10 °C min⁻¹ u struji zraka.

3.4.6. Brunauer-Emmet-Teller metoda određivanja specifične površine

BET metodom određuje se specifična površina čvrstog ili poroznog materijala te mnoga fizikalna svojstva materijala jer međudjelovanja krutog uzorka s okolinom ovise o njegovoj specifičnoj površini (S). Koristeći BET teoriju moguće je, osim S , na atomskoj razlučivosti odrediti i nepravilnosti površine te pore adsorpcijom nereaktivnog plina.²⁴² U klasičnom BET eksperimentu, temperatura uzorka drži se konstantnom (izotermalni uvjeti), a tlak ili koncentracija adsorbirajućeg plina se povećavaju dok u jednom trenutku površina uzorka ne postane u potpunosti prekrivena. Broj molekula plinovite faze računa se iz adsorbiranog volumena. S obzirom da je površina poprečnog presjeka adsorbensa poznata, moguće je računanje površine adsorbensa pristupačne adsorbatu. Iz dostupnih informacija i upotrebom BET jednadžbe, odredi se specifična površina uzorka.²⁴³ BET teorija može biti jednako primijenjena na porozne i neporozne uzorke, neovisno o veličini i obliku čestica. Upravo zbog takvih karakteristika, BET metoda upotrebljava se za istraživanje i proizvodnju raznih vrsta krutih materijala.

Specifična površina uzoraka određena je BET metodom pomoću instrumenta Micrometrics, Gemini 2380 u struji zraka.

3.4.7. Elektronska paramagnetska rezonancija

Elektronska paramagnetska rezonancija (*electronic paramagnetic resonance*, EPR) metoda je koja se koristi za proučavanje uzoraka koji posjeduju nesparene elektrone. Osnovni princip EPR tehnike sličan je nuklearnoj magnetskoj rezonanci (NMR), no umjesto spinova magnetskih jezgri pobuđuju se elektronski spinovi. EPR detektira prijelaze nesparenih elektrona u primijenjenom magnetskom polju.²⁴⁴ Zbog spina koji određuje magnetski moment, elektron u magnetskom polju može biti u dva stanja različitih energija. Početno se on nalazi u stanju niže energije, što odgovara usmjerenju magnetskog momenta u smjeru vanjskog magnetskog polja. Primjenom mikrovalnog zračenja točno određene frekvencije potrebno je primijeniti i magnetsko polje da bi se ostvario uvjet nužan za rezonantni prijelaz u stanje više energije, koji je dan jednadžbom 30:

$$h_B \nu = g \mu_B B_0 \quad (30)$$

Pri čemu je ν rezonantna frekvencija u vanjskom primijenjenom magnetskom polju B_0 , μ_B je Bohrov magneton, a h_B je Planckova konstanta. Uvjet je lako postići kontinuiranom promjenom magnetskog polja B_0 . EPR detektira paramagnetske uzorke koji su inače vrlo osjetljivi na lokalna okruženja, što omogućuje ispitivanje strukture molekule u blizini nesparenog elektrona. Također, stječe se uvid i u dinamičke procese koji rezultiraju promjenom EPR linija.

EPR mjerenja provedena su na instrumentu Varian E-109 X-band (frekvencije $\approx 9,5$ GHz) opremljenom s Bruker ER 041 XG mikrovalnim mostom i Bruker ER 4111 VT jedinicom za kontrolu temperature u struju dušika. Za EPR analizu spektri su snimljeni prije i poslije ozračivanja. Uzorci su ozračeni u zraku koristeći panoramski uređaj s ^{60}Co izvorom gama zračenja (Laboratorij za radijacijsku kemiju i dozimetriju, Institut Ruđer Bošković), do apsorbirane doze od 25 kGy, brzinom doze 25 kGy h⁻¹.²⁴⁵ Za kalibraciju magnetskog polja EPR spektrometra korišten je Mn²⁺/MgO standard. EPR spektri snimljeni su pri magnetskom polju u rasponu od 160 G, 1000 G i 5000 G radi detekcije radikala i kontrole sinteze. EPR spektri su simulirani programom razvijenim u MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA) koristeći EasySpin programski paket.²⁴⁶

3.4.8. Pretražna elektronska mikroskopija

Pretražna elektronska mikroskopija (*Scanning electron microscopy*, SEM) koristi se za određivanje strukture i mikrostrukture uzorka. Pomoću sustava elektromagnetskih leća

elektroni se usmjeravaju prema površini uzorka, a razlučivanje i dubina prodiranja (od nekoliko nm do nekoliko μm) ovise o naponu, vrsti uzorka i veličini spota (presjek snopa na mjestu dodira s uzorkom). Uzorci za SEM analizu mogu biti u bilo kojem stanju, no moraju biti vodljivi. Uzorke koje nisu vodljivi potrebno je naporiti vodljivim materijalom, najčešće oko 2 nm električnog vodiča (C, Au, Al ili Pt).²⁴⁷

Morfologija uzoraka određena je pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa FE-SEM; JEOL JSM-7000F. Suhi uzorak je nanesen na ljepljivu ugljičnu traku bez dodatnog naparavanja.

3.4.9. Transmisijska elektronska mikroskopija

Transmisijski elektronski mikroskop (*Transmission electron microscope*, TEM) kao izvor elektrona koristi termionski top (termička emisija) ili topove koje rade na principu emisije poljem. Ubrzavajući potencijal ove tehnike je 80 do 400 kV, a odgovarajuća razlučivost od 0,56 do 0,13 nm. U TEM se koriste transmitirani i difraktirani elektroni za dobivanje mikrografija i difraktograma, a emitirano rendgensko zračenje za kemijsku analizu. Za TEM analizu, uzorak mora biti jako tanka folija (100 nm). Osim krutih uzoraka, ovom tehnikom je moguće snimati i zamrznute tekuće uzorke.²⁴⁸

Morfologija i elektronska difrakcija u odabranom području (*Selected area electron diffraction*, SAED) određeni su na transmisijskim elektronskim mikroskopima LaB Philips CM200 TEM i Jeol JEM 1010 pri 80 kV. Suspenzija uzorka nanescna je na bakrenu mrežicu prekrivenu šupljikavom Formvar membranom i isprana 3 puta s kapljicom vode. Raspodjela veličina čestica iz TEM mikrografija određena je pomoću programa Image J 1.48v (dostupan na <http://imagej.nih.gov/ij/>). Dobivene veličine prosjeci su 50 mjerenja.

3.4.10. Mikroskopija atomskih sila

Mikroskop atomskih sila (*atomic force microscope*, AFM) svestran je i moćan alat za analizu topografskih svojstava površina u nanorezuluciji.²⁴⁹ AFM pripada skupini mikroskopa sa skenirajućom sondom te radi na principu skeniranja površine uzorka mjereći međudjelovanje oštrog šiljka (probe) pričvršćene na savitljivu polugu i površine uzorka. Na taj se način stvara slika površine i topografskih svojstava. Koristi se za mjerenja uzoraka na zraku, u tekućini ili vakuumu. AFM mjeri vrlo male sile između površine šiljka i površine uzorka ($< 1 \mu\text{N}$) te može

postići povećanja od 10^3 do 10^9 . Ta metoda ima veliku primjenu zbog jednostavnosti pripreme uzorka, određivanje površine na atomskoj rezoluciji, mogućnosti određivanja hrapavosti površine i tvrdoće materijala. AFM tehnikom moguće je i modificiranje nanostrukture, istraživanje defekata na površini materijala te istraživanje bioloških uzoraka.²⁵⁰

Za analizu uzoraka mikroskopijom atomskih sila, mala količina uzorka suspendirana je u MiliQ vodi. 5 μ L suspenzije nanoseno je na površinu hidrofilnog tinjca pričvršćenog za metalni nosač. Nakon 10 minuta inkubacije pri sobnoj temperaturi, uzorci su isprani MiliQ vodom radi uklanjanja neadsorbiranih čestica te osušeni na zraku, u mraku. Neposredno prije AFM oslikavanja, uzorak je osušen u struji N_2 . Morfologija uzoraka određena je s MultiMode probe mikroskopom opremljenim s Nanoscope IIIa kontrolnom jedinicom i „J“ pretraživalom (Veeco Instruments, Bruker, Santa Barbara, CA). Oslikavanje je vršeno u tapkajućem režimu rada korištenjem silikonskog tipa (R-TESPA-525, Bruker, nominalna frekvencija 525 kHz, nominalna konstanta opruge 100 N m^{-1}). Linearna brzina pretraživanja optimizirana je između 1,0 i 1,5 Hz pri kutu pretraživanja 0° . Mikrografije su procesirane i analizirane pomoću programa AFM NanoScope ver. 5.12r5. Uzorci su oslikani i na Nanowizard 4 (JPK, Berlin) AFM uređaju koristeći Quantitative Imaging (QI) mod i silikonski tip (ACLA-SS-20, AppNano, nominalna frekvencija 160 – 225 kHz, nominalna konstanta opruge 36 – 90 N m^{-1}) te JPK Data Processing program za obradu podataka. Brzina pretraživanja je iznosila $10 \mu\text{m s}^{-1}$ pri kutu pretraživanja -90° .

3.4.11. Dinamičko i elektroforetsko raspršenje svjetlosti

Dinamičko raspršenje svjetlosti eksperimentalna je metoda zasnovana na mjerenju vremenske autokorelacijske funkcije intenziteta svjetlosti raspršene na razrijeđenoj otopini makromolekula ili na razrijeđenoj disperziji čestica.²⁵¹ Pojednostavljeno, DLS metodom mjeri se brzina Brownovog gibanja čestica koja se može korelirati s njihovom veličinom, mjereći intenzitet fluktuacija raspršenog svjetla. Brownovo gibanje termički je uzrokovano nasumično gibanje čestica kao posljedica sudara s drugim česticama ili s molekulama otapala. Jedna od bitnih karakteristika Brownovog gibanja, važna za DLS metodu, je da se velike čestice gibaju sporije dok se male čestice gibaju brže.²⁵² Odnos između veličine čestice i njezine brzine uslijed Brownovog gibanja dan je Einstein-Stokesovom jednačbom:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_h} \quad (31)$$

Pri čemu je D difuzijski koeficijent, k_B Boltzmannova konstanta, T termodinamička temperatura, η viskoznost otapala, a d_h je hidrodinamički promjer čestice.²⁵³ Hidrodinamički promjer nesferične čestice definira se kao promjer ekvivalentne sfere koja ima jednak translacijski difuzijski koeficijent kao i sama čestica.²⁵⁴ Vrijednost difuzijskog koeficijenta ovisi ne samo o veličini same čestice (čestice bez solvacijske sfere), već i o ionskoj jakosti medija (kao i o vrsti prisutnih iona), strukturi površine i o obliku čestice. Ionska jakost medija i vrsta iona utječu na brzinu difuzije čestice tako da mijenjaju debljinu električkog međupovršinskog sloja; niska ionska jakost medija uzrokuje povećanje međupovršinskog sloja, zbog čega se smanjuje brzina difuzije i hidrodinamički promjer je veći. Velika ionska jakost smanjuje međupovršinski sloj i hidrodinamički promjer.²⁵⁵

Naboj na površini čestice utječe na distribuciju iona oko međupovršinskog sloja što rezultira povećanjem koncentracije protuiona na površini čestice. Na taj način formira se električni dvosloj oko čestice. Vodeni sloj koji okružuje česticu sastoji se od dva dijela: unutrašnji dio koji se naziva Sternov sloj gdje su ioni jako vezani i vanjski difuzijski sloj gdje su ioni slabije vezani oko čestice. Unutar difuzijskog sloja postoji pomična granica unutar koje ioni i čestica tvore stabilne vrste. Kada se čestica giba, ioni unutar tog sloja gibaju se zajedno s njom. No, svi ioni izvan tog sloja ne gibaju se s česticom. Takva granica naziva se klizna ploha, a potencijal klizne plohe naziva se zeta potencijal. Elektrodinamičkim raspršenjem svjetlosti moguće je odrediti zeta potencijal uzorka mjereći elektroforetsku mobilnost čestica. Elektroforetska pokretljivost je kretanje nabijene čestice pod utjecajem električnog polja prema elektrodi suprotnog naboja. Zeta potencijal moguće je odrediti iz elektroforetske pokretljivosti, U_E , pomoću Henryjeve jednadžbe:

$$U_E = \frac{2\zeta\epsilon f(K_a)}{3\eta} \quad (32)$$

gdje je ζ zeta potencijal, ϵ permitivnost otapala, η viskoznost, a $f(K_a)$ Henryjeva funkcija. K_a je omjer promjera čestice i debljine električnog međupovršinskog sloja (Debyeova duljina). Za Henryjevu funkciju obično se koriste dvije aproksimacije. Aproksimacija Smoluchowskog koristi se za čestice veće od 0,2 μm i čestice suspendirane u elektrolitu čija je množina veća od 10^{-3} mola, prema kojoj vrijednost Henryjeve funkcije iznosi 1,5. Hückelova aproksimacija koristi se za male čestice ili mjerenja koja se provode u nevodenim otapalima, a vrijednost funkcija iznosi 1,0.

Raspodjela veličine i zeta potencijal određeni su na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) opremljenog sa „zelenim“ laserom ($\lambda = 532 \text{ nm}$) pri temperaturi 25 °C. Intenzitet

raspršene svjetlosti mjereno je pri kutu 173° . Hidrodinamički promjer (d_h) određen je iz raspodjele po volumenu kao srednja vrijednost 10 mjerenja za svaku točku u vremenu. Zeta potencijal (ζ) izračunat je iz izmjerene elektroforetske pokretljivosti pomoću Henryeve jednadžbe koristeći aproksimaciju Smoluchowskog. Svaki uzorak mjereno je 3 puta. Podaci su obrađeni pomoću Zetasizer programskog paketa verzija 7.13 (Malvern Instruments).

3.4.12. UV-Vis spektroskopija

Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija je instrumentalna metoda analize koja proučava međudjelovanje ultraljubičastog (UV) i vidljivog (Vis) dijela elektromagnetskog zračenja s materijom. Djelovanjem UV-Vis zračenje s molekulom dolazi do pobuđivanja vanjskih (valentnih) elektrona iz osnovnog u pobuđena stanja. Organske funkcionalne skupine odgovorne za apsorpciju UV i Vis dijela EM spektra nazivaju se kromoforima. Osim za identifikaciju i određivanje kromofora brojnih organskih i anorganskih vrsta (kvalitativna analiza), UV-Vis spektroskopija primjenjuje se i za kvantitativnu analizu. Pri tome se koristi Lambert-Beerov zakon koji kaže da je apsorbancija proporcionalan koncentraciji uzorka c , duljini optičkog puta l i molarnom apsorpcijskom koeficijentu ε :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3.)$$

Adsorpcijski eksperimenti i titracije provedeni su *in situ* koristeći Varian Cary 4000 UV-Vis spektrofotometar opremljen s Carian Cary PCB Water Peltier sustavom za kontrolu temperature.

3.4.13. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencija je vrsta luminiscencije, emisije svjetlosti iz elektronski pobuđenih stanja.²⁵⁶ Luminiscencija se može podijeliti u dvije kategorije, fluorescenciju ili fosforescenciju, ovisno o vrsti pobuđenih stanja. Do fluorescencije dolazi emisijom fotona iz pobuđenih singletnih stanja, pri čemu je elektron u pobuđenoj orbitali suprotnog spina elektronu u osnovnoj. Takvi prijelazi su spinski dopušteni stoga se emisija fotona odvija vrlo brzo te je prosječna brzina fluorescencije 10^8 s^{-1} . Fosforescencija je emisija svjetla iz tripletnog pobuđenog stanja, pri čemu elektron u pobuđenoj orbitali ima spin jednake orijentacije kao i u osnovnoj orbitali. Prelazak u osnovno stanje tada je zabranjen proces stoga je brzina fosforescencije puno manja u odnosu na fluorescenciju (10^3 do 10 s^{-1}).²⁵⁶ Molekule koje imaju

aromatski prsten ili imaju konjugirane dvostruke veze najčešće pokazuju svojstvo fluorescencije. Fluorescencijski spektri općenito su prikazani kao spektri emisije. Fluorescencijski spektar prikaz je ovisnosti intenziteta fluorescencije o valnoj duljini (nm) ili valnom broju (cm^{-1}). Fluorescencijska spektroskopija može se koristiti kao analitička metoda kojom je moguće određivanje koncentracije fluorofora, a može dati informacije i o širokom rasponu molekulskih procesa kao što su međudjelovanja molekula otapala s fluoroforom, udaljenosti između mjesta u biomolekulama. Pomoću ove tehnike moguće je istraživanje konformacijskih promjena te određivane međudjelovanja tokom procesa vezanja.

No, prilikom snimanja fluorescencijskih spektara može doći do pogreške u određivanju koncentracije fluorofora kao posljedica učinka unutrašnjeg efekta (*inner-filter effect*).²⁵⁷ Unutrašnji efekt posljedica je apsorpcije dijela upadne svjetlosti prije nego što dođe do procesa fluorescencije, što se naziva primarnim unutrašnjim efektom (*primary inner-filter effect*). Također, unutrašnji efekt može biti posljedica reapsorpcije dijela emitirane svjetlosti prije nego što napusti kivetu, što se naziva sekundarnim unutrašnjim efektom (*secondary inner-filter effect*).^{257,258} Prisutnost efekta unutrašnjeg filtera provjerava se promatrajući ovisnost maksimuma fluorescencije pri 348 nm o valnoj duljini.²⁵⁹ U slučajevima kada taj pravac nije linearan, prisutan je efekt unutrašnjeg filtera. Ukoliko je potrebna korekcija, apsorbancije istraženih sustava izmjere se pri valnoj duljini ekscitacije i emisije, odnosno pri 278 nm i 348 nm. Vrijednosti maksimuma fluorescencije tada se korigiraju prema jednadžbi 34²⁶⁰:

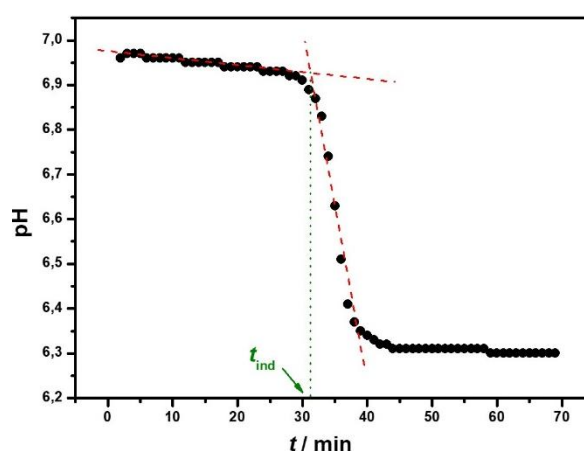
$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} e^{\frac{A_{\text{ex}} + A_{\text{em}}}{2}} \quad (34)$$

Fluorescencijska mjerenja izvršena su na Agilent Cary Eclipse fluorimetru koristeći kvarcne Hellma Analytics 105.253 – QS kivete veličine 10 x 2 mm (ekscitacija x emisija). Valna duljina pobude podešena je na 278 nm (apsorpcijski maksimum BSA), a spektri emisije snimani su u području 310 – 370 nm. Širina pukotine u slučaju mjerenja ekscitacije i emisija iznosila je 5 nm. Koncentracijski raspon nanočestica odabran je tako da se izbjegne učinak unutrašnjeg efekta. Prisutnosti unutrašnjeg efekta provjerena je snimanjem eksitacijskih i emisijskih spektara samih adsorbensa, koncentracija jednakih onima u fluorescencijskim mjerenjima.

3.5. Obrada podataka

3.5.1. Potencijometrija

Vrijeme indukcije sekundarnog taloženja (t_{ind}), vrijeme proteklo od iniciranja taložnog procesa do početka transformacije amornog kalcijevog fosfata (ACP), određuje se prateći promjenu pH vrijednosti taložnih sustava s vremenom. Dobivena krivulja sigmoidalnog je oblika, a vrijeme indukcije određuje se iz presjecišta dvaju pravaca dobivenih linearnom regresijom prva dva dijela krivulje različitog nagiba kao što je prikazano na slici 18.⁸⁵



Slika 18. Određivanje vremena indukcije iz potencijometrijske krivulje.

3.5.2. Kinetika adsorpcije albumina na kalcijeve fosfate, titanatne nanomaterijale i njihove kompozite

UV-Vis spektrofotometrom praćena je promjena apsorbancije (A) supernatanta (BSA) u vremenu. Pomoću Lambert-Beerovog zakona određena je promjena koncentracije BSA u vremenu, koja je zatim preračunata u adsorpcijski kapacitet prema jednadžbi 19. Izmjereni podatci uvrštavani su u nelinearnom obliku jednadžbi za model pseudo prvog i drugog reda te model unutarčestične difuzije te obrađeni u programu OriginPro verzija 2021b.

3.5.3. Spektroskopijsko istraživanje međudjelovanja kalcijevih fosfata, titanatnih nanomaterijala i njihovih kompozita s albuminom

Međudjelovanja BSA sa TiNM moguće je pratiti i mjerenjem gašenja fluorescencije BSA. Taj način praćenja nastajanja kompleksa moguć je jer su fluorescencijske karakteristike BSA

vrlo osjetljive na promjenu mikrookoliša kao što su promjene konformacije, vezanje drugih molekula ili denaturacija. Utišavanje fluorescencije BSA može se pratiti fluorescencijskim tehnikama jer BSA u svojoj strukturi sadrži Trp, Tyr i Phe.²⁶¹ Utišavanje fluorescencije opisano je Stern-Volmerovom jednadžbom²⁶²:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (35)$$

Pri čemu su F_0 i F intenziteti fluorescencije BSA bez i u prisutnosti TiNM, k_q je brzina utišavanja fluorescencije, τ_0 je prosječno vrijeme poluživota (BSA) a $[Q]$ je koncentracija molekule utišavača (*quencher*).

Fluorimetrijskim mjerenjima moguće je odrediti i konstantu vezanja te broj veznih mjesta.²⁶³ Ukoliko se pretpostavi da postoji n veznih mjesta dostupnih molekuli utišavaču (Q) na proteinu (BSA), tada se reakcija utišavanje fluorescencije može zapisati kao:



Za navedenu reakciju, konstanta vezanja može se iskazati kao:

$$K = \frac{[Q_n \cdots BSA]}{[Q]^n [BSA]} \quad (37)$$

Ukoliko je ukupna koncentracija BSA (vezanog ili nevezanog za protein) $[BSA]_0$, tada je $[BSA]_0 = [Q_n \cdots BSA] + [BSA]$. Pri čemu je $[BSA]$ koncentracija nevezanog BSA. Tada je omjer koncentracije vezanog i nevezanog proteina jednak omjeru F/F_0 pa se može pisati:

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K + n \log [Q] \quad (38)$$

Iz linearne ovisnosti logaritma omjera razlike intenziteta fluorescencije samog proteina i kompleksa te koncentracije molekule utišavača, moguće je odrediti konstantu vezanja i broj veznih mjesta. Navedeni parametri izračunati su u programu Excel i Origin Pro 2021b. Za svaki sustav provjerena je i prisutnost efekta unutrašnjeg filtera, objašnjenog u poglavlju 3.4.13.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karakterizacija titanatnih nanomaterijala, aditiva i hidroksiapatita

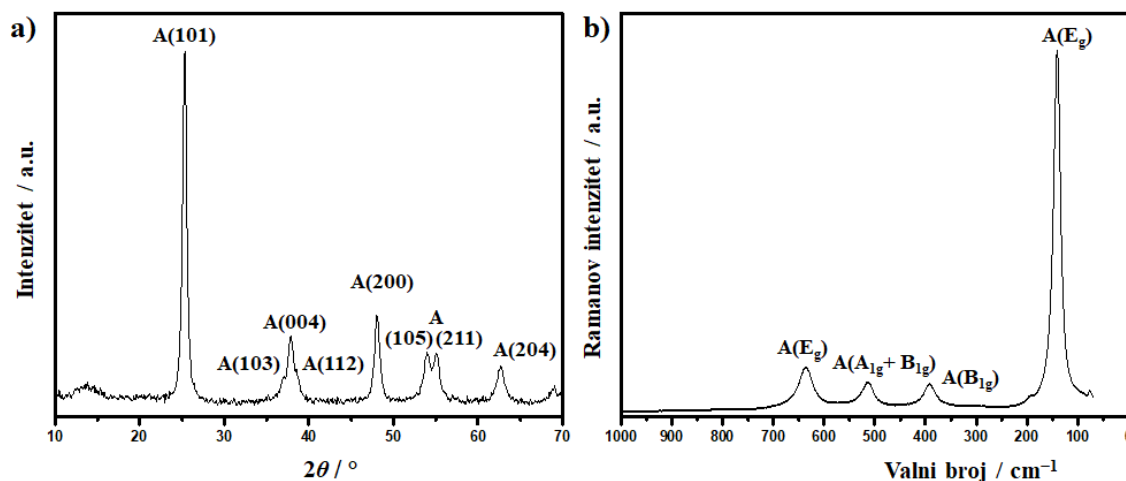
Titanatni nanomaterijali, albumin iz goveđeg seruma (BSA), kitozan i hidroksiapatit karakterizirani su PXRD, FTIR i Raman metodama kako bi se odredila struktura i sastav te su snimljene SEM, TEM i AFM mikrofografije u svrhu određivanja morfologije. Kako bi se evaluirala čistoća sintetiziranih TiNM i HAP napravljena je TGA i EPR analiza. Uz to, određena je i specifična površina BET metodom. Stabilnost TiNM i aditiva određena je u korištenim medijima mjereći hidrodinamički promjer i zeta potencijal DLS i ELS metodama.

4.1.1. Sastav, struktura i morfologija titanatnih nanomaterijala, aditiva i hidroksiapatita

4.1.1.1. TiO₂ nanočestice

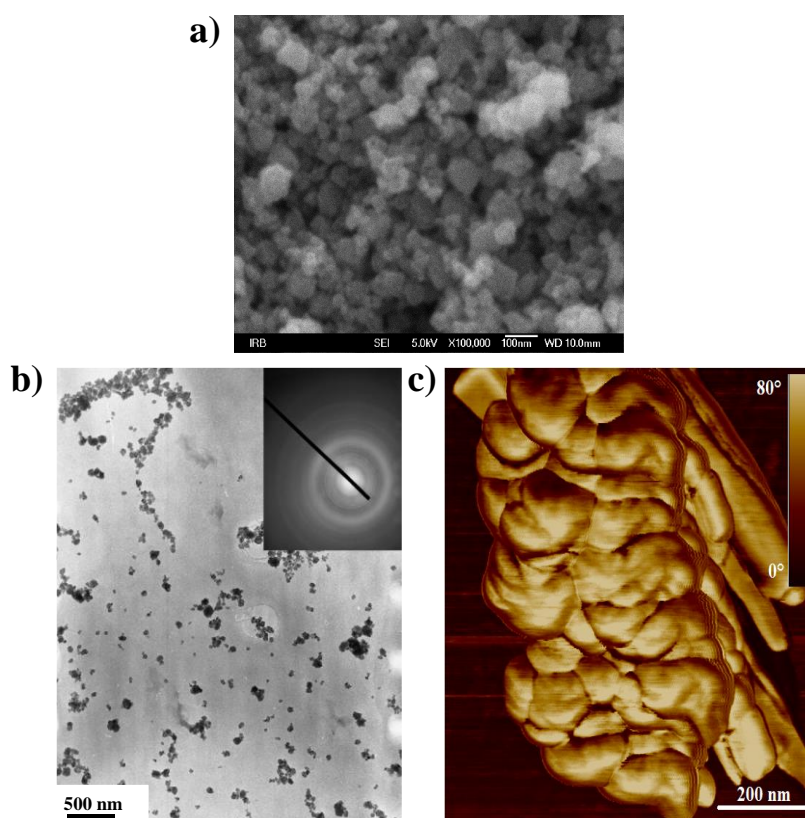
Titanatne nanočestice (TiNP) anatas faze i prosječne veličine čestica < 25 nm kupljene su od proizvođača Sigma Aldrich. Difraktogram praha i Ramanov spektar kupljenih TiNP prikazani su na slici 19. Difraktogram praha sadrži samo difrakcijske maksimume karakteristične za anatas fazu (JCPDS kartica 21-1272): 25,30°, 36,96°, 37,82°, 38,52°, 48,08°, 53,90°, 54,96° i 62,65°. Izostanak difrakcijskih maksimuma pri 27° i 31° dokaz je da uzorak ne sadrži rutil niti brukit.³³ Prema Trungu i sur. izostanak difrakcijskog maksimuma pri 30° ukazuje na središnjost dugog dosega u strukturi TiNP.²⁶⁴

Ramanov spektar TiNP karakterističan je za anatas. U Raman spektru aktivno je šest načina vibriranja: $A_{1g} + 2 B_{1g} + 3 E_g$.²⁶⁵ Vrpca pri 141 cm^{-1} najjačeg je intenziteta i karakteristična je za E_g način vibriranja, kao i vrpca pri 636 cm^{-1} . Vrpca pri 394 cm^{-1} pripada B_{1g} načinu vibriranja, dok je vrpca pri 512 cm^{-1} dublet A_{1g} i B_{1g} načina vibriranja.²⁶⁶

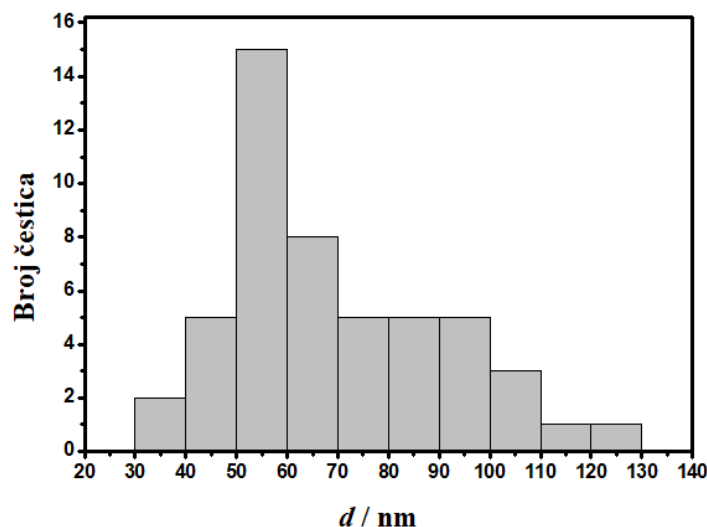


Slika 19. a) Difraktogram praha i b) Ramanov spektar TiO_2 nanočestica anatas faze.

SEM, TEM i AFM (slika 20) mikrografije pokazuju da su TiNP nepravilne sferične morfologije. Prosječna veličina čestica, određena iz SEM mikrografija, iznosi $69,6 \pm 21,0$ nm (slika 21). Prisustvo difrakcijskih točaka u elektronskoj difrakciji u odabranom području (SAED) potvrđuje da su čestice kristalinične (slika 20 b).

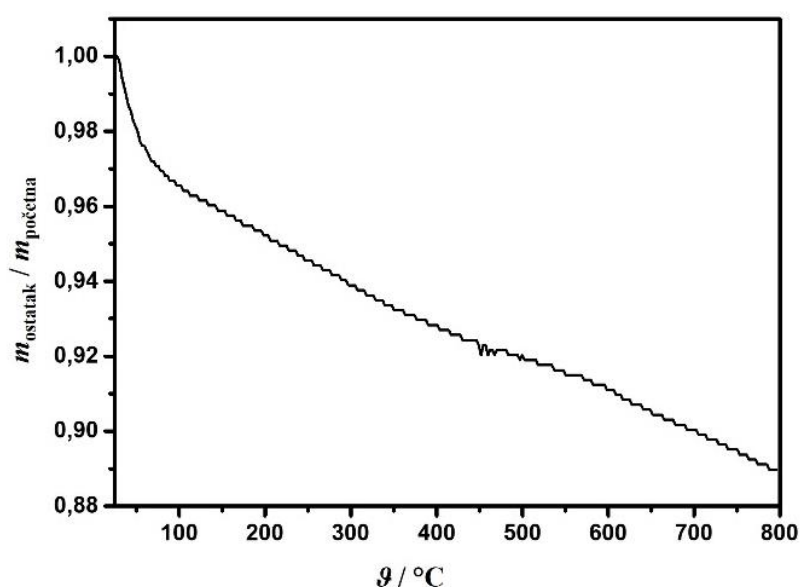


Slika 20. a) SEM, b) TEM i c) AFM mikrografije TiO_2 nanočestica.



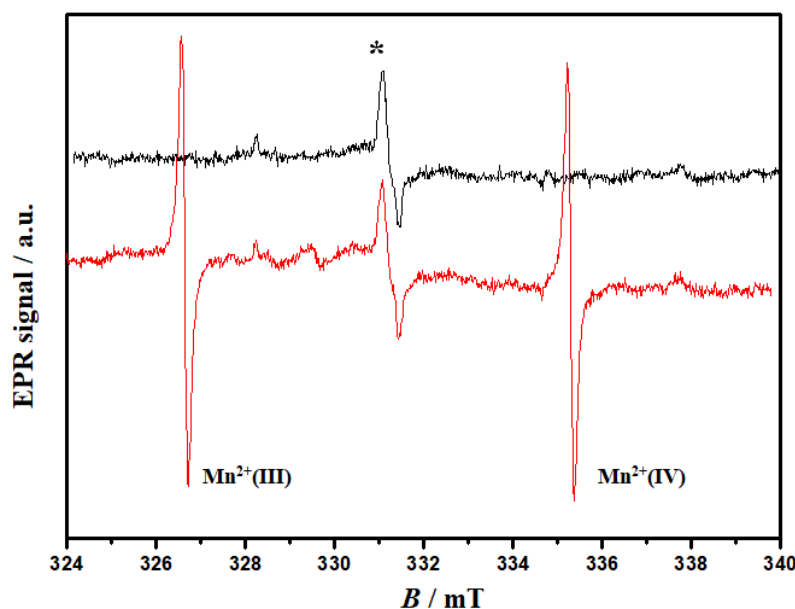
Slika 21. Raspodjela veličine TiO₂ nanočestica određena iz SEM mikrografija.

Specifična površina TiNP određena BET analizom iznosi 71,51 m² g⁻¹. TGA krivulja (slika 22) pokazuje nagli gubitak mase od 3 % do temperature 70 °C te kontinuirani sporiji gubitak mase od 8 % do temperature 800 °C. Termalni raspad TiNP u dva koraka opažen je i opisan u drugim radovima.^{267,268} Prvi gubitak mase do 3 % može se pripisati vodi adsorbiranoj na površini TiNP, dok se drugi sporiji gubitak mase može pripisati nusproduktima zaostalim nakon sinteze.²⁶⁸



Slika 22. TGA krivulja TiO₂ nanočestica.

Na slici 23 prikazani su EPR spektri prije (gornji) i poslije (donji) sterilizacije gama zračenjem. Osim dvije linije koje pripadaju standardu, u sredini se vidi linija označena s *, koja se može objasniti kao defekt kisika čija je koncentracija zanemarivo mala te time ne predstavlja svojstvo materijala. Nije opažen utjecaj gama zračenja na TiNP.

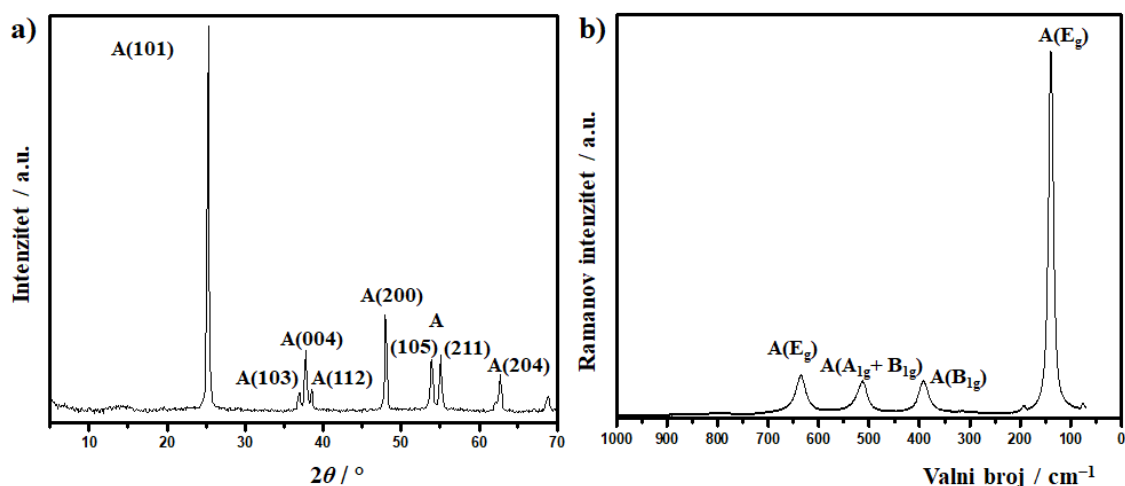


Slika 23. EPR spektar TiO₂ nanočestica prije (gornji spektar) i nakon (donji spektar) sterilizacije gama zračenjem.

4.1.1.2. TiO₂ nanopločice

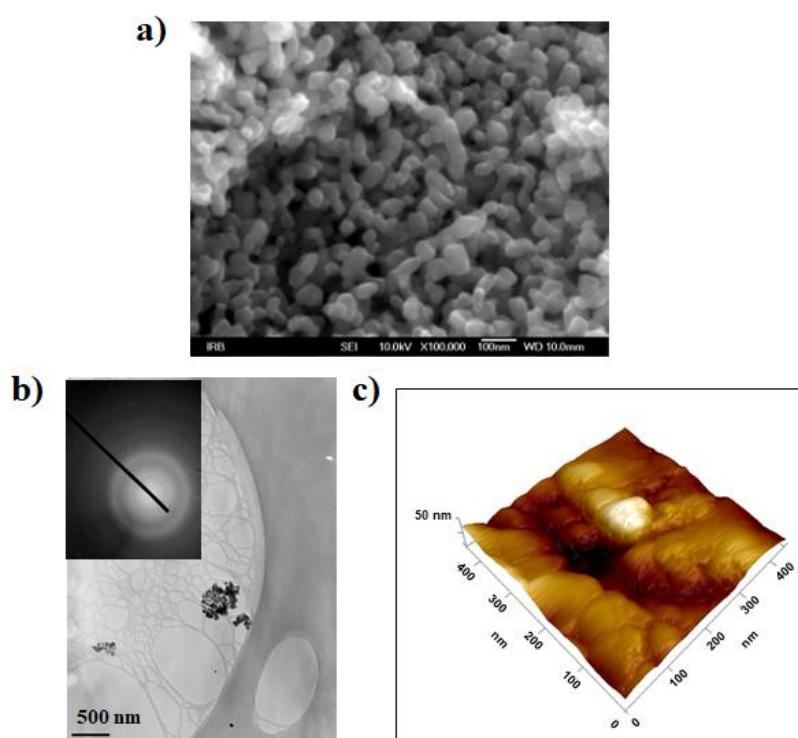
Sintetizirane TiNPI anatas su faze. Difraktogram praha (slika 24 a) sadrži samo difrakcijske maksimume koji odgovaraju anatas fazi (JCDPS kartica 21-1272). Točnije, difrakcijski maksimumi pri 25,2°, 36,9°, 37,9°, 38,5°, 48,1°, 53,8°, 55,1°, 62,7° i 68,5° odgovaraju refleksima sa (101), (103), (004), (112), (200), (105), (211), (204) i (116) kristalnih ploha.

U Ramanovom spektru TiNPI opažene su samo vibracije karakteristične za anatas (slika 24 b). Vrpce pri 140 i 635 cm⁻¹ karakteristične su za E_g način vibriranja, dok je vrpca pri 394 cm⁻¹ karakteristična B_{1g} načinu vibriranja. Vrpca pri 512 cm⁻¹ je dublet A_{1g} i B_{1g} načina vibriranja.²⁶⁵

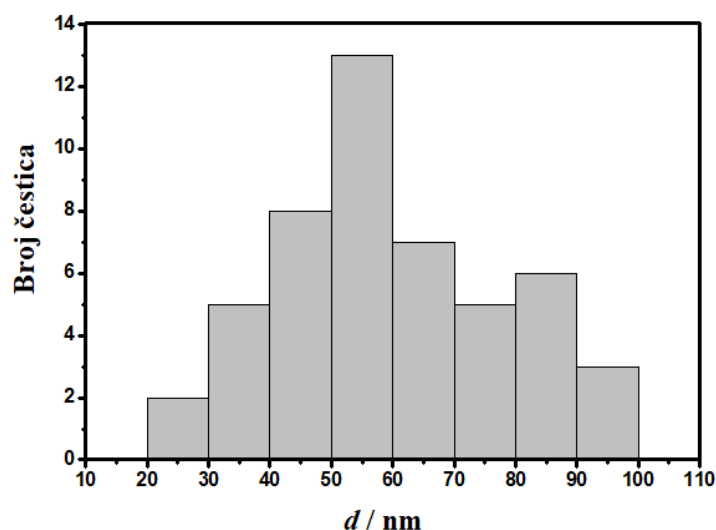


Slika 24. a) Difraktogram praha i b) Ramanov spektar TiO_2 nanpločica.

Na temelju SEM, TEM i AFM mikrografija (slika 25) ustanovljeno je da su sintetizirane pločice nepravilnog oblika kvadra. Prisustvo difrakcijskih točaka u SAED-u potvrđuje da su čestice kristalinične (slika 25 b). Prosječna veličina TiNPI iznosi $60,1 \pm 18,3$ nm (slika 26). Veličina i morfologija sintetiziranih TiNPI u skladu je s prethodnim istraživanjima u kojima su TiNPI sintetizirane sličnom procedurom.^{234,269} Gao i sur. pripremili su TiNPI također nepravilnog oblika prosječne veličine oko 100 nm.²⁶⁹

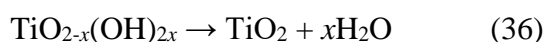


Slika 25. a) SEM, b) TEM i c) AFM mikrografije TiO_2 nanpločica.

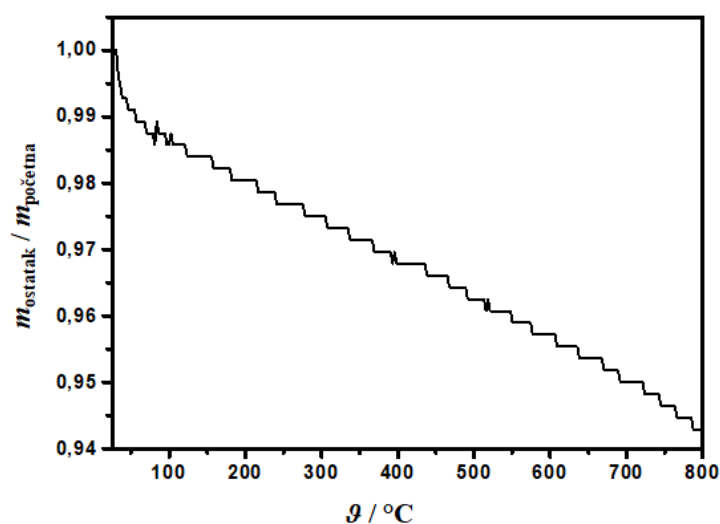


Slika 26. Raspodjela veličine TiO₂ nanopločica određena na temelju SEM mikrografija.

TGA krivulja (slika 27) pokazuje nagli gubitak 1,3 % mase do temperature 80 °C, nakon kojeg slijedi kontinuirani gubitak 3,4 % mase do temperature 800 °C. Prvi gubitak mase odgovara gubitku adsorbirane vode, dok drugi može uključivati gubitak vode adsorbirane između paralelnih TiNPI i dehidroksilaciju prema reakciji 36²³⁴:

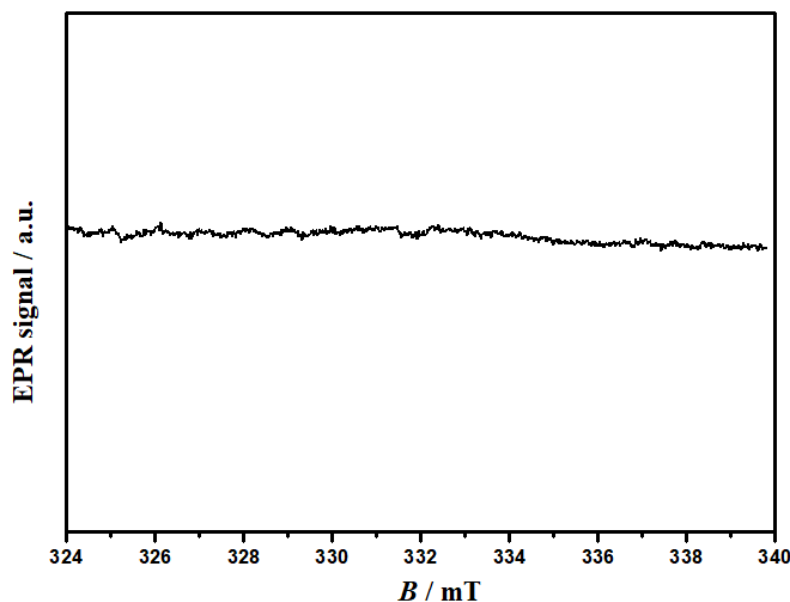


Specifična površina TiNPI iznosi 24,70 m² g⁻¹.



Slika 27. TGA krivulja TiO₂ nanopločica.

U EPR spektru TiNPl nije opažen signal neposredno nakon sinteze kao što je prikazano na slici 28. Također, nakon zračenja nisu uočene promjene u spektru. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da gama zračenje pri sterilizacijskim dozama nema utjecaja na strukturu TiNPl.

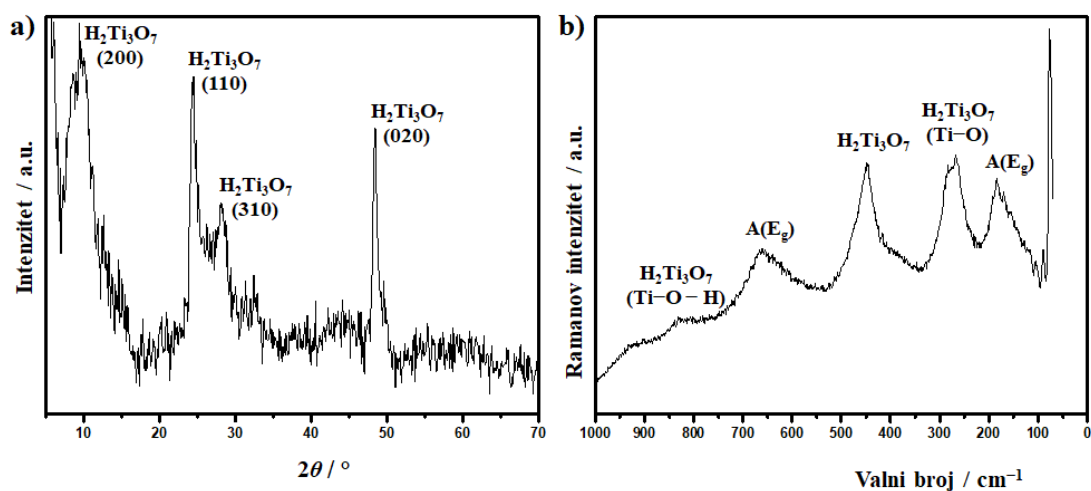


Slika 28. EPR spektar TiO₂ nanopločica.

4.1.1.3. Titanatne nanocjevčice

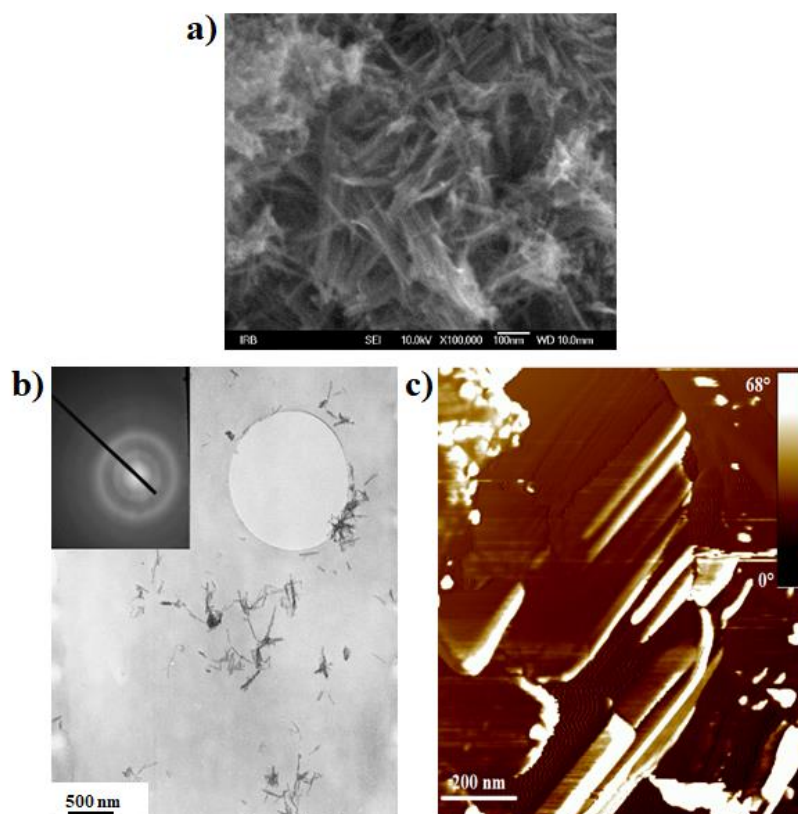
Difraktogram praha TiNT (slika 29 a) sadrži samo difrakcijske maksimume karakteristične za slojevite titanate, H₂Ti₃O₇, poput TiNT koje su sintetizirali Suzuki i sur. te Cortes-Jancome i sur.^{270,271} Kasuga i sur. predložili su mehanizam nastajanja TiNT prema kojemu nakon dehidracije s HCl dolazi do stvaranja Ti-O···H-O-Ti vodikovih veza što uzrokuje smatanje strukture.²³³ Difrakcijski maksimum pri 2θ 9,40° odgovara (200) plohi H₂Ti₃O₇ koja je proširena međuslojem vode, što znači da su prilikom smatanja strukture u međuslojevima zaostale molekule vode.²⁷⁰ Debljina sloja vode može se izračunati iz difrakcijskog maksimuma pri 9,40° prema Debye-Scherrerovoj jednadžbi (jednadžba 29) te iznosi 4,72 nm.

U Ramanovom spektru (slika 29 b), uz vrpce karakteristične za protonirane titanate na 267 i 467 cm⁻¹, javljaju se i vrpce pri 660 i 184 cm⁻¹ karakteristične za E_g način vibriranja anatasa te vrpca pri 827 cm⁻¹ karakteristična za Ti-O-H vibraciju.²⁷²⁻²⁷⁴

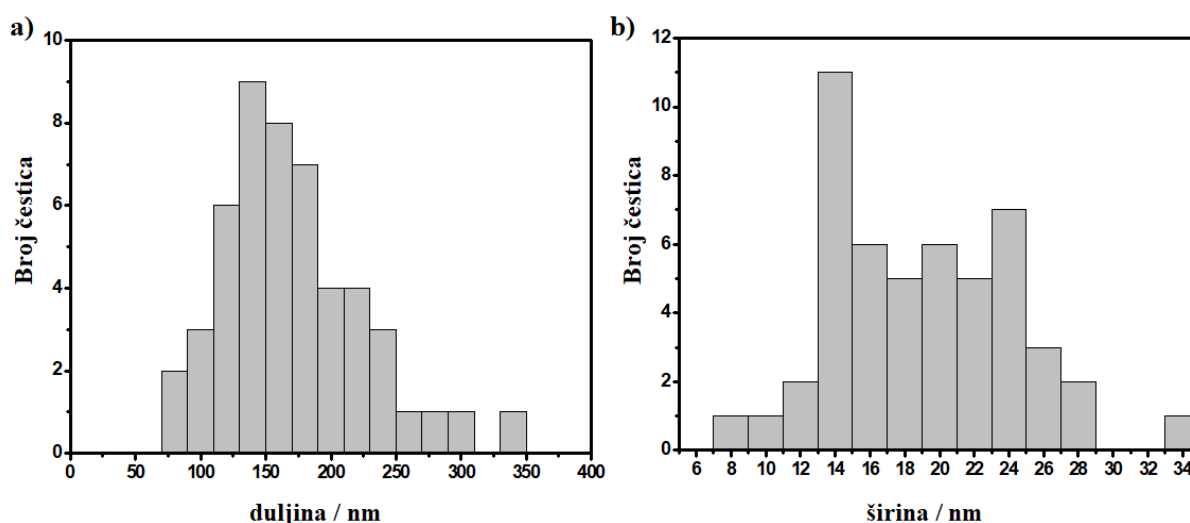


Slika 29. a) Difraktogram praha i b) Ramanov spektar titanatnih nanocjevčica.

Na temelju SEM i TEM (slika 30) mikrografija određeno je da prosječna duljina TiNT iznosi $169,9 \pm 55,0$ nm, a promjer $18,8 \pm 5,3$ nm (slika 31). Prisustvo difrakcijskih točaka u SAED-u potvrđuje da su TiNT kristalinične.



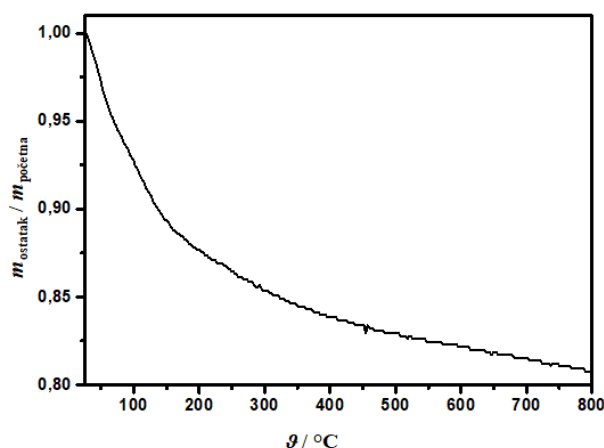
Slika 30. a) SEM, b) TEM i c) AFM mikrografije titanatnih nanocjevčica.



Slika 31. Raspodjela a) duljine i b) promjera titanatnih nanocjevčica određena na temelju SEM i TEM mikrografija.

TGA krivulja (slika 32) ukazuje na postojanje različito vezanih molekula vode u strukturi TiNT. Nagli gubitak mase od 12 % pri temperaturama do oko 150 °C može se pripisati gubitku adsorbirane vode. Polaganiji gubitak mase od 7 % pri temperaturama iznad 150 °C može se pripisati gubitku vode ugrađene između slojeva TiNT, čije je postojanje pokazano i PXRD analizom te je opaženo i u drugim radovima.²⁷⁰

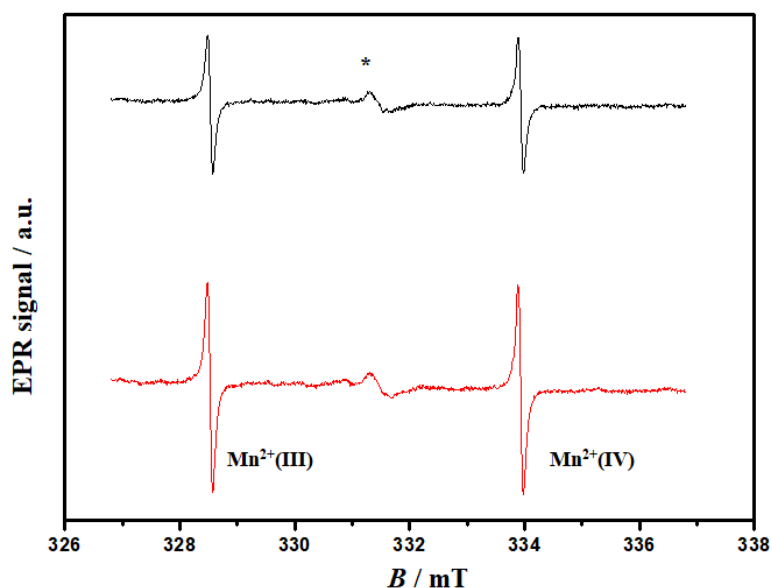
Specifična površina TiNT iznosi 170,97 m² g⁻¹.



Slika 32. TGA krivulja titanatnih nanocjevčica.

Na slici 33 prikazan je EPR spektar TiNT. Slično spektru TiNP, u uzorku TiNT nije uočena promjena nakon zračenja. Spektri TiNT prije (donji) i poslije zračenja (gornji) imaju jednaku

strukturu. Srednja linija ne prikazuje svojstvo molekule nego je defekt, ostatak od sinteze, vezan uz kisikove radikale ili TiO_2 , koji ima zanemarivu koncentraciju.

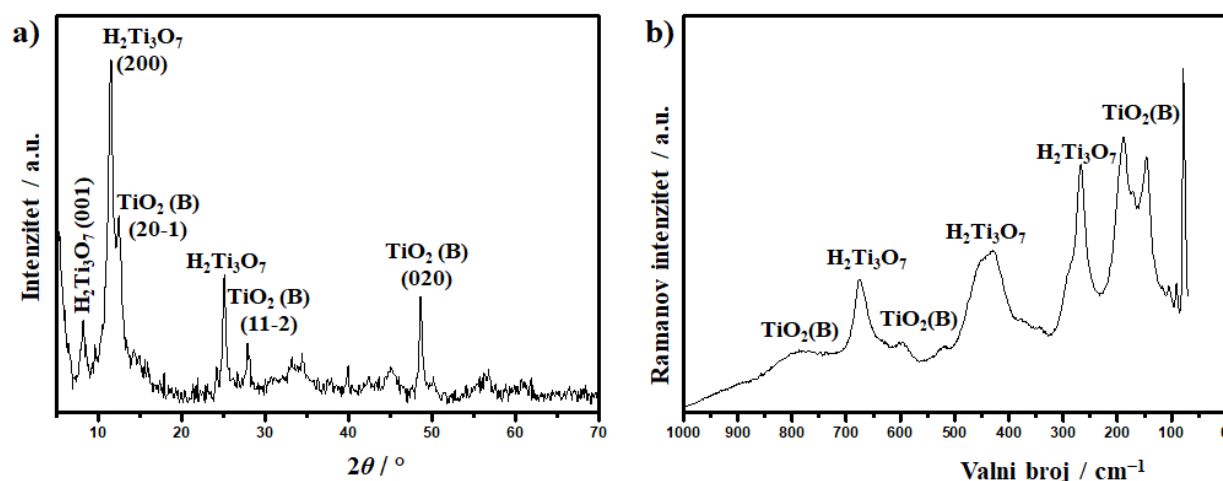


Slika 33. EPR spektar titanatnih nanocjevčica (TiNT) prije (gornji spektar) i nakon (donji spektar) sterilizacije gama zračenjem.

4.1.1.4. Titanatne nanožice

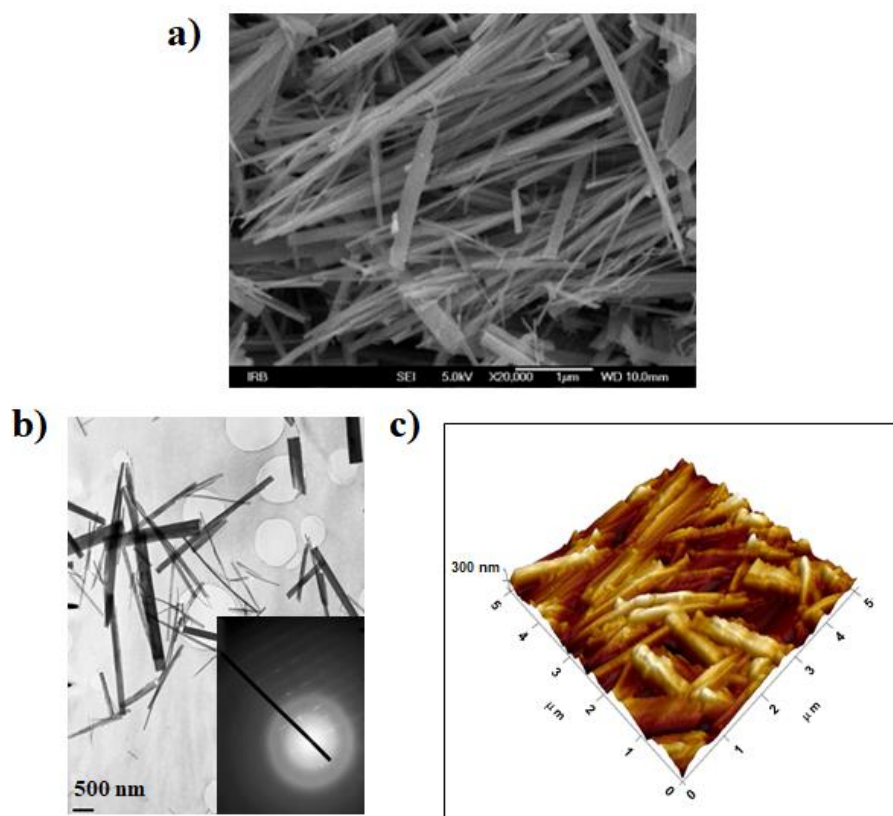
U difraktogramu praha TiNW (slika 34 a) uočeni su difrakcijski maksimumi karakteristični za $\text{TiO}_2(\text{B})$ i slojevite titanate, točnije trititanate. Difrakcijski maksimum pri 2θ $8,15^\circ$ odgovara refleksu (001) plohe trititanata.^{275–277} Međutim Suzuki i sur. smatraju da taj difrakcijski maksimum, s obzirom da se javlja pri manjoj vrijednosti 2θ kuta od one za trititanate, vjerojatnije potječe od nusprodukata, npr. hidratiziranih titanata.²⁷⁸ Difrakcijski maksimum pri 2θ $11,53^\circ$ odgovara (200) plohi slojevitih titanata.²⁷⁸ Također se i maksimum pri 2θ $25,17^\circ$ može pripisati trititanatima.²⁷⁶ Preostali opaženi difrakcijski maksimumi, pri 2θ $12,54^\circ$, $27,90^\circ$ i $48,58^\circ$, karakteristični su za $\text{TiO}_2(\text{B})$.²⁷⁹

Ramanov spektar (slika 34 b) potvrđuje rezultate PXRD analize.²⁸⁰ Vrpce pri 146, 189, 519, 597 i 785 cm^{-1} karakteristične su $\text{TiO}_2(\text{B})$ fazu dok su vrpce pri 267, 438, 676 cm^{-1} karakteristične za trititanate.^{232,276,280,281}

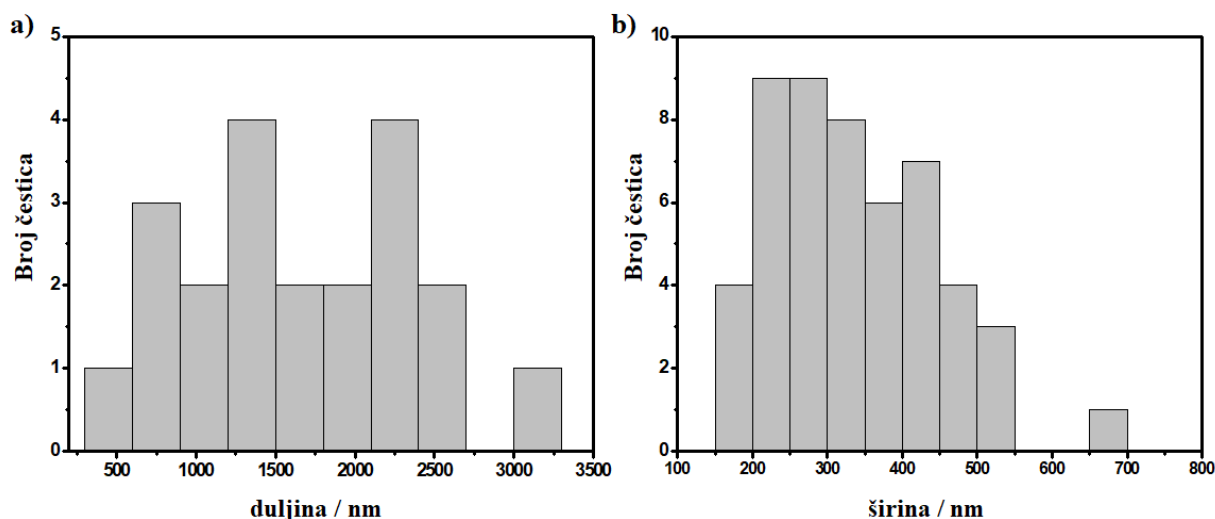


Slika 34. a) Difraktogram praha i b) Ramanov spektar titanatnih nanožica.

Na temelju SEM i TEM mikrografija (slika 35) određeno je da prosječna duljina TiNW iznosi $1677,2 \pm 746,1$ nm, a širina $340,0 \pm 112,5$ nm (slika 36). AFM mikrografija (slika 35 c) ukazuje i na postojanje manjih nanožica koje nastaju pucanjem TiNW prilikom sinteze i ispiranja. Kraće TiNW mogu se uočiti i na SEM mikrografijama. Prisustvo difrakcijskih točaka u SAED-u potvrđuje da su čestice kristalinične (slika 35 b).



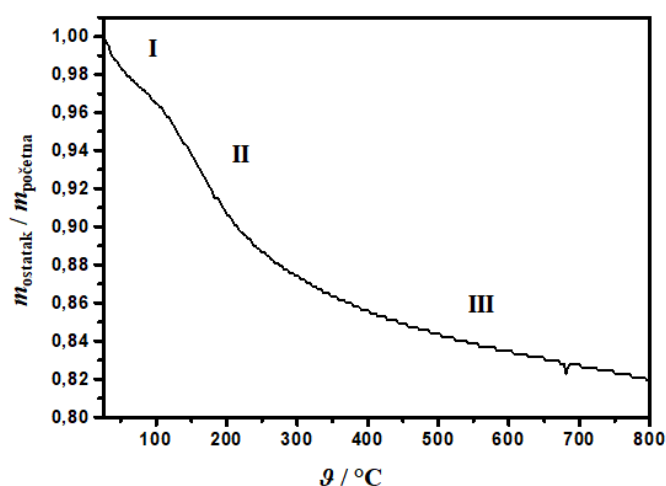
Slika 35. a) SEM, b) TEM i c) AFM mikrografije titanatnih nanožica.



Slika 36. Raspodjela a) duljine i b) širine titanatnih nanožica određena na temelju TEM mikrografija.

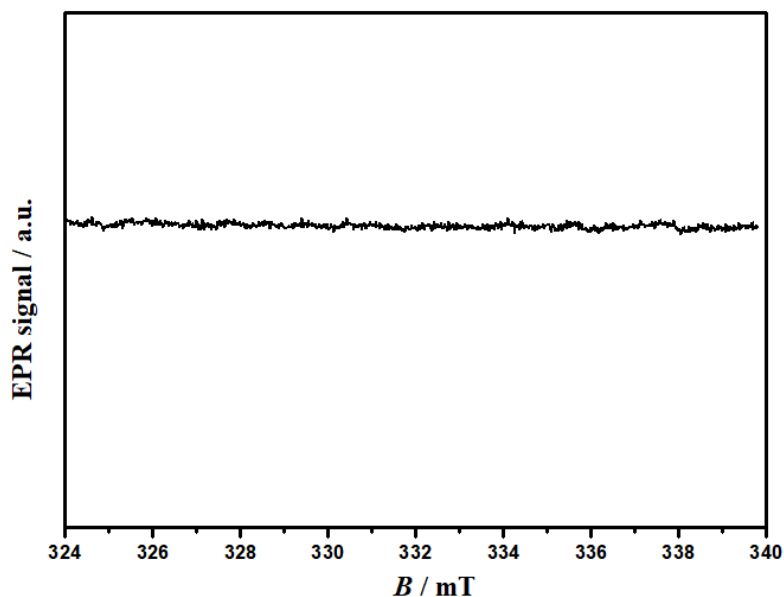
Na TGA krivulji vidljiva su 3 različita područja gubitka mase (slika 37). Pri temperaturama do 150 °C dolazi do brzog gubitka oko 4 % mase uzorka. Jednako kao i u slučaju drugih TiNM, početni gubitak mase odgovara vodi adsorbiranoj na površini nanomaterijala. U temperaturnom području 105 – 250 °C gubi se daljnjih 7 % mase, a daljnjim zagrijavanjem do 800 °C gubi se preostalih 7 %. Gubitak mase pri temperaturama iznad 105 °C može se pripisati gubitku vode u strukturi TiNW.²⁸²

Specifična površina TiNW iznosi 21,49 m² g⁻¹.



Slika 37. TGA krivulja titanatnih nanožica.

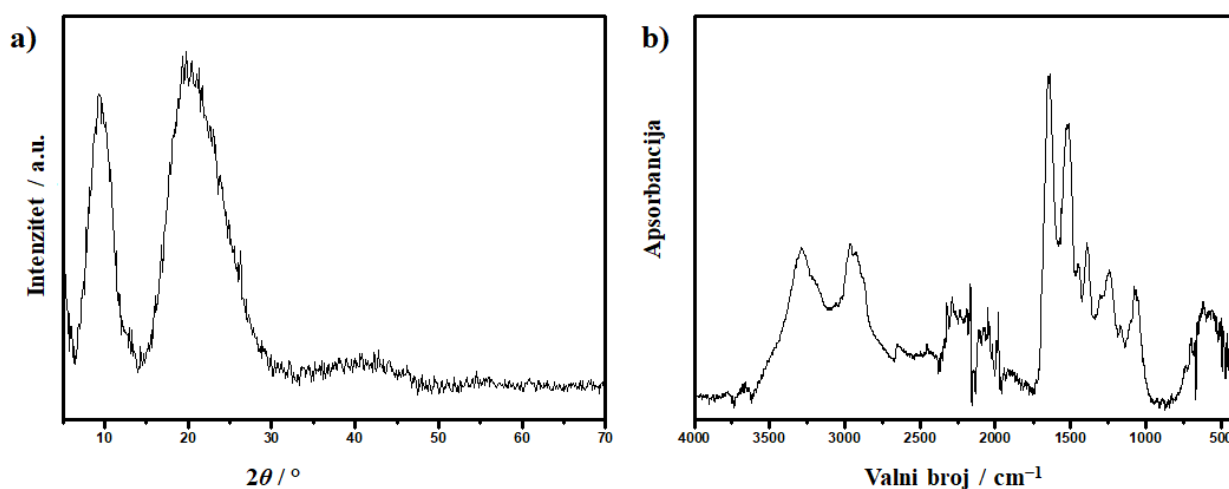
U slučaju TiNW nije opažen EPR signal neposredno nakon sinteze kao što je prikazano na slici 38. Također, nakon zračenja nije uočena nikakva promjena u spektru. Na temelju navedenog može se zaključiti da gama zračenja u sterilizacijskim dozama nema utjecaja na strukturu TiNW.



Slika 38. EPR spektar titanatnih nanožica.

4.1.1.5. Albumin iz goveđeg seruma

Difraktogram praha i FTIR spektar BSA dani su na slici 39. U difraktogramu praha javljaju se dva široka difrakcijska maksimuma pri 2θ 8,88° i 20,44°. U FTIR spektru vidljive su apsorpcijske vrpce karakteristične za sekundarnu strukturu i konformaciju BSA (tablica 3).^{283–285}

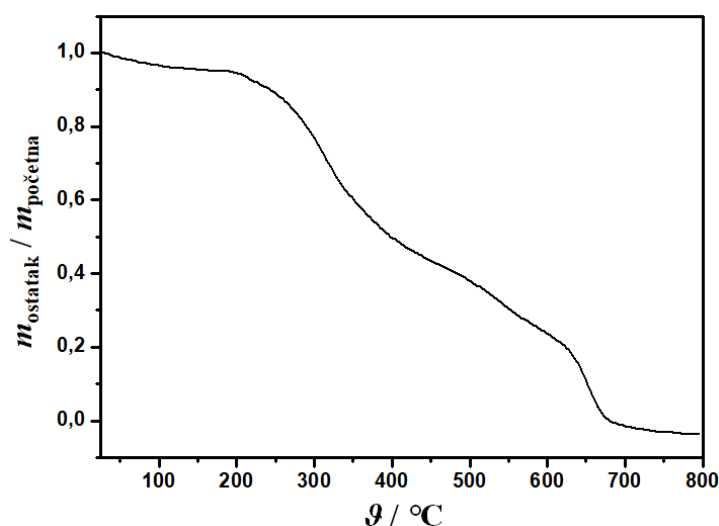


Slika 39. a) Difraktogram praha i b) FTIR spektar albumina iz goveđeg seruma.

Tablica 3. Asignacija vrpce FTIR spektra praha albumina iz goveđeg seruma. Prema referencama 283–285.

Valni broj / cm^{-1}	Asignacija
3611–2690	O-H istezanje (H_2O)
3287	N-H istezanje amid A
2944	amid B, N-H istezanje slobodnog NH_3^+ iona
1642	C=O istezanje amid I
1513	amid II, C-N istezanje i N-H savijanje
1453	amid II, C-N istezanje i N-H savijanje
1386	CH_2 savijanje
1247	amid III, C-N istezanje i N-H savijanje
699	amid V, NH savijanje

TGA krivulja ukazuje da se BSA u potpunosti razgrađuje do 714°C (slika 40) što je u skladu s prethodnim istraživanjima.²⁸⁶

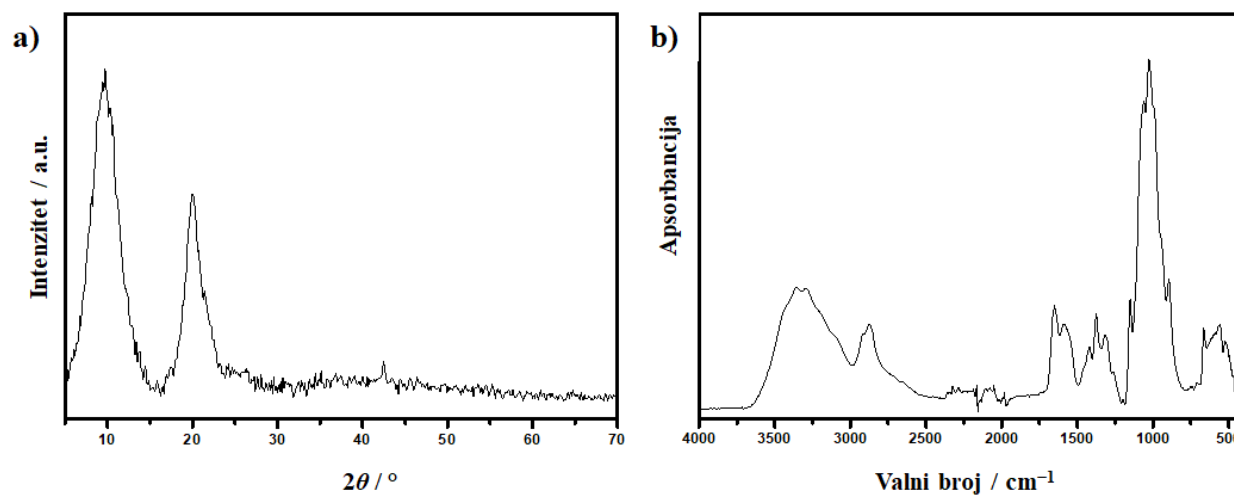


Slika 40. TGA krivulja albumina iz goveđeg seruma.

4.1.1.6. Kitozan

Difraktogram praha i FTIR spektar kitozana u skladu su s literaturnim podacima (slika 41).^{136,287–289} Difraktogram praha kitozana ukazuje na vrlo nizak stupanj kristaliničnosti materijala u kojemu se javljaju dva difrakcijska maksimuma pri 2θ $9,6^\circ$ i $20,0^\circ$ uočena i u prethodnim istraživanjima.^{290,291} U difraktogramima praha kitozana često je prisutan difrakcijski maksimum pri $23,0^\circ$. Izostanak navedenog maksimuma ukazuje da je komercijalni kitozan u jednom trenutku pripreme i pročišćavanja otapan u kiselinama. Također, omjer dva

uočena difrakcijska maksimuma ovisi o podrijetlu hitina te o njegovoj kristaliničnosti. Najveća kristaliničnost pokazuje hitin izoliran iz lignje, a najmanju hitin izoliran iz gljivica.²⁹¹ FTIR analizom potvrđeno je prisustvo amino, amidne i hidroksilne skupine, a uočeni su i apsorpcijski maksimumi koji odgovaraju vibraciji saharoznog prstena kitozana (tablica 4).



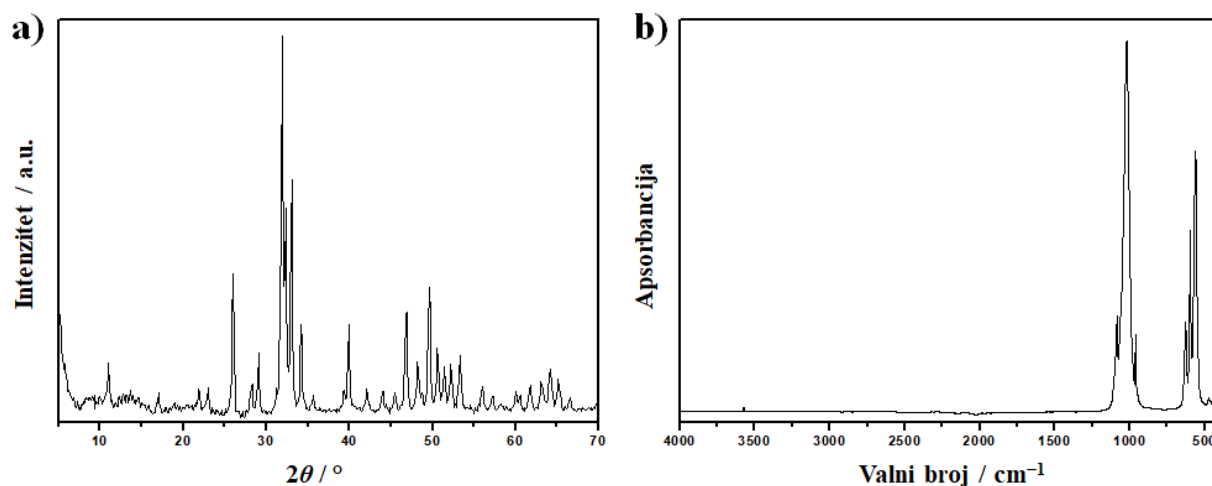
Slika 41. a) Difraktogram praha i b) FTIR spektar praha kitozana.

Tablica 4. Asignacija vrpce FTIR spektra praha kitozana prema referencama 136,287–289,292.

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

4.1.1.7. Hidroksiapatit

Difraktogram praha i FTIR spektar HAP-a prikazani su na slici 42. Difraktogram praha sadrži niz oštih difrakcijskih maksimuma karakterističnih za HAP koji su asignirani u tablici 5.²⁹³ FTIR spektar sadrži vibracijske vrpce karakteristične za vibracije hidroksilne i fosfatne skupine u HAP asignirane u tablici 6.²⁹³



Slika 42. a) Difraktogram praha i b) FTIR spektar hidroksiapatita.

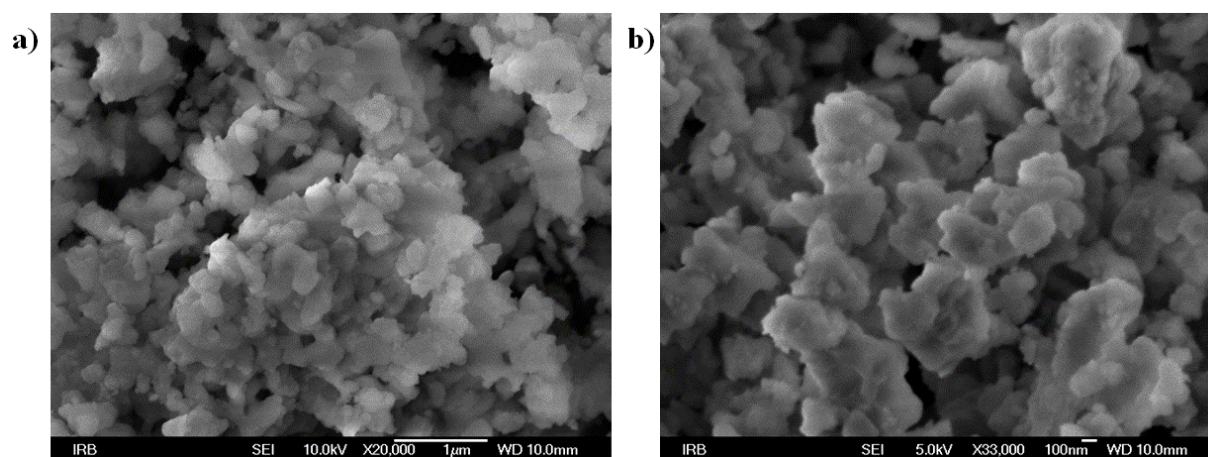
Tablica 5. Asignacija difrakcijskih maksimuma praha hidroksiapatita. Prema referenci 293.

$2\theta / ^\circ$	hkl	$2\theta / ^\circ$	hkl
10,91	(100)	49,64	(213)
17,07	(101)	50,55	(321)
21,87	(200)	51,44	(410)
22,93	(111)	52,20	(402), (303)
26,07	(002)	53,40	(004), (411)
28,19	(102)	56,10	(322), (223)
29,08	(210)	57,15	(313)
31,78	(211)	58,20	(501), (204)
33,14	(300)	60,15	(420)
34,19	(202)	60,45	(331)
35,69	(301)	61,80	(214), (421)
39,88	(310)	63,00	(502)
42,14	(311)	65,10	(332)
44,10	(113)	66,46	(422)
45,60	(203)		
46,64	(222)		

Tablica 6. Asignacija vibracijskih vrpca u FTIR spektru hidroksiapatita (HAP). Prema referenci 293.

Valni broj / cm^{-1}	Asignacija
3570	ν_s istežanje O–H skupine
1085	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istežanje P–O veze (PO_4^{3-})
1026	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istežanje P–O veze (PO_4^{3-})
944	ν_1 nedegenerirano simetrično istežanje P–O veze (PO_4^{3-})
630	ν_L istežanje O–H skupine
605	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
563	ν_{4c} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
473	ν_{2b} dvostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})

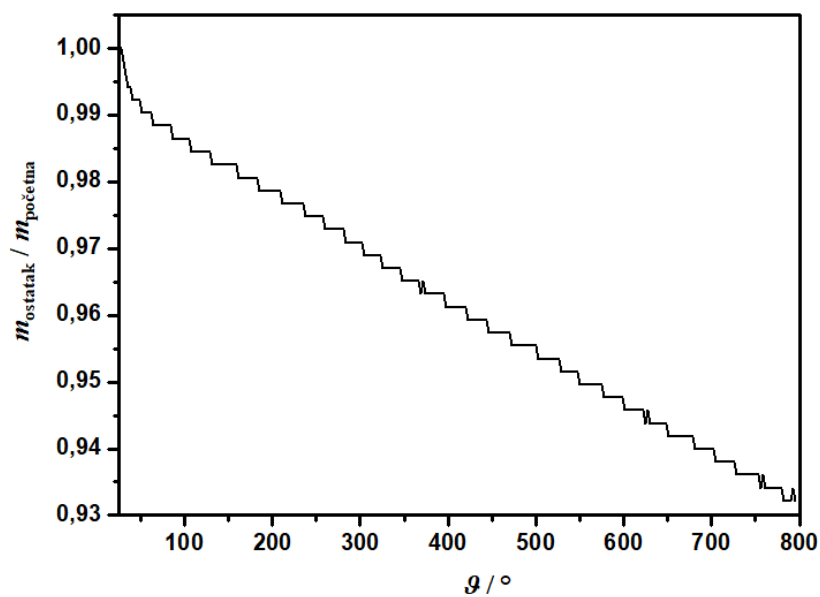
SEM mikrografije (slika 43) pokazuju da HAP kristalizira u obliku nepravilnih pločastih kristala.



Slika 43. SEM mikrografija hidroksiapatita pri a) manjem i b) većem povećanju.

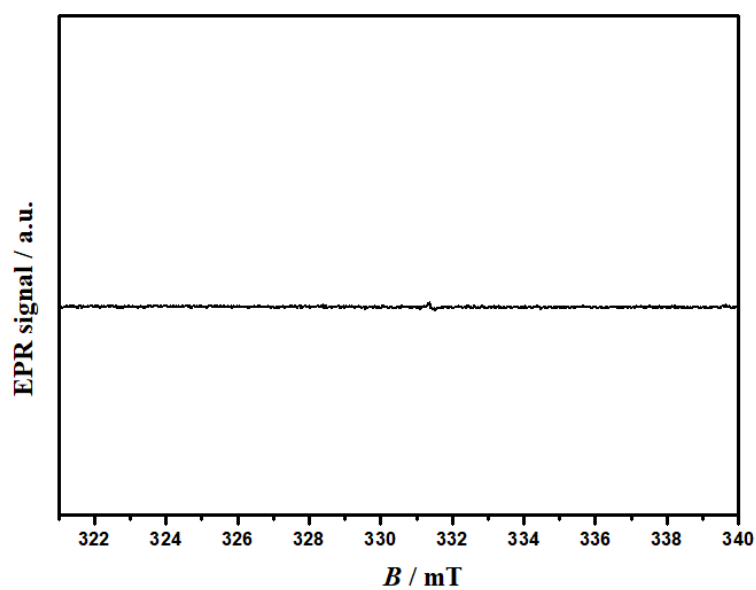
U TGA krivulji (slika 44) početni nagli gubitak mase od 1 % do temperature 47 °C odgovara gubitku adsorbirane vode. Daljnji gubitak mase od 6 % odgovara gubitku intersticijske vode, razgradnji HPO_4^{2-} i mogućoj reakciji pirofosfata koja se odvija pri temperaturama iznad 700 °C.²⁹⁴

Specifična površina kristala HAP određena BET analizom iznosi $12,0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.



Slika 44. TGA krivulja hidroksiapatita.

EPR spektar neozračenog HAP-a (slika 45) ne sadrži nikakve signale što potvrđuje čistoću uzorka i ukazuje da u uzorku nisu prisutni metali niti ioni u tragovima.



Slika 45. EPR spektar hidroksiapatita.

4.1.2. Stabilnost titanatnih nanomaterijala, albumina i kitozana u različitim medijima

Stabilnost materijala vrlo je bitan parametar za njihovu upotrebu. Za neke primjene bitno je razviti materijal stabilan u određenom mediju dok je u drugim slučajevima agregacija čestica poželjna pojava. U vodenom mediju, amfoterne površinske skupine nanomaterijala mogu biti protonirane ili deprotonirane, ovisno o pH vrijednosti otopine. Na taj način dolazi do vezanja iona suprotnog naboja te stvaranje električnog dvosloja.²⁹⁵ Prema klasičnoj Derjaguin-Landau-Verveey-Overbeek (DLVO) teoriji, stabilnost NM određena je dvama doprinosima, odbojnim međudjelovanjima električnog dvosloja i privlačnim međudjelovanjima van der Waalsovih sila.²⁹⁶ Stabilizacijom NM, prosječan hidrodinamički radijus može biti smanjen dok se zeta potencijal može povećati. Kada su čestice dispergirane u određenom mediju, odbojne sile između difuzijskog dvosloja onemogućit će agregaciju čestica. Prema DLVO teoriji, debljina difuzijskog sloja, a samim time i maksimum ukupne energije koji sprječava agregaciju čestica smanjuje se povećanjem koncentracije elektrolita. Stoga se stabilnost koloidne suspenzije smanjuje povećanjem kompleksnosti medija.²⁹⁷

Kako bi se taloženjem iz suspenzije ili inkubiranjem u otopini SBF-a mogli pripremiti CaDHA/TiNM kompoziti te odrediti utjecaj aditiva na njihovo nastajanje, potrebno je odrediti stabilnost pojedinih komponenti taložnih sustava u medijima koji se koriste u pripremanju nanokompozita. U anionskoj komponenti taložnog sustava određena je stabilnost TiNM, BSA i kitozana jer se TiNM i/ili aditivi dodaju u anionsku komponentu. U fosfatnom puferu određena je stabilnost TiNM i BSA jer se kinetika i međudjelovanja TiNM s BSA određivala u PBS-u, dok se u SBF-u inducira nastajanje CaP na TiNM s ili bez prisutnosti BSA.

Iako je mjerenje hidrodinamičkog promjera česta eksperimentalna procedura u karakterizaciji titanatnih nanomaterijala, određivanje d_h u različitim medijima, a samim time i praćenje agregacije, vrlo je rijetko. Mjerenje stabilnosti u navedenim otopinama omogućuje praćenje utjecaja kompleksnosti medija, izražene kroz ionsku jakost I_c . Anionska komponenta taložnog sustava otopina je Na_2HPO_4 koncentracije 8 mmol dm^{-3} . Fosfatni pufer nešto je složeniji medij koji sadrži $137 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $2,7 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ KCl}$ te 10 mmol dm^{-3} otopine $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{KH}_2\text{PO}_4$.²⁹⁸ SBF je, u ovome slučaju najkompleksniji medij čiji je sastav dan u tablici 2. Ionske jakosti navedenih medija dane su u tablici 7.

Tablica 7. Ionske jakosti anionske komponente taložnog medija ($c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 8 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$), fosfatnog pufera (PBS) i simulirane tjelesne tekućine (SBF).

Medij	$I_c / \text{mol dm}^{-3}$
Na_2HPO_4	0,02
PBS	0,15
SBF	0,30

Poznato je da kalcijevi i fosfatni ioni utječu na stabilnost TiNM. I dok kalcijevi ioni uzrokuju agregaciju TiNM, čak i u prisutnosti organskih tvari koje ih mogu stabilizirati, utjecaj fosfatnih iona manje je izražen.²⁹⁹ Upravo kako bi se izbjegla agregacija, TiNM i ostali aditivi dodani su u anionsku komponentu taložnog sustava u eksperimentima taloženja CaP iz suspenzije.

Iako se DLS metoda prvenstveno koristi za određivanje veličine sferičnih čestica, vrlo se često ovom metodom određuje hidrodinamički promjer uzoraka koji nisu sferne geometrije kao što su žice, cjevčice, diskovi, itd.³⁰⁰⁻³⁰⁷ U tom se slučaju ne uzima apsolutna vrijednost hidrodinamičkog promjera, već se u većini slučajeva uspoređuju veličine u vremenu kako bi se odredila stabilnost materijala.

4.1.2.1. Stabilnost titanatnih nanomaterijala i aditiva u anionskoj komponenti taložnog sustava

Reprezentativne raspodjele veličina TiNM i aditiva (BSA i kitozan) u anionskoj otopini kontrolnog sustava odnosno 8 mmol dm^{-3} otopini Na_2HPO_4 prikazane su na slici 46, dok su vrijednosti hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala dane u tablicama 8 i 9.

Raspodjela veličine TiNP u anionskoj komponenti taložnog sustava je bimodalna (slika 46 a). Hidrodinamički promjer (d_h) dominantne populacije iznosi oko 135 nm dok d_h veće populacije čestica iznosi oko 5000 nm i ne mijenja se značajnije tijekom 24 sata. Veličina TiNP određena SEM analizom iznosi $69,5 \pm 21,0 \text{ nm}$, stoga se može pretpostaviti da se TiNP u otopini anionske komponente nalaze u obliku agregata manjeg broja nanočestica.

U otopini anionske komponente taložnog medija u prvih sat vremena prisutne su tri populacije TiNPI, tri različite vrste TiNPI agregata (slika 46 b). Najzastupljenija je populacija oko 200 nm koja, slično kao i u slučaju TiNP, predstavlja agregate manjeg broja čestica čiji se

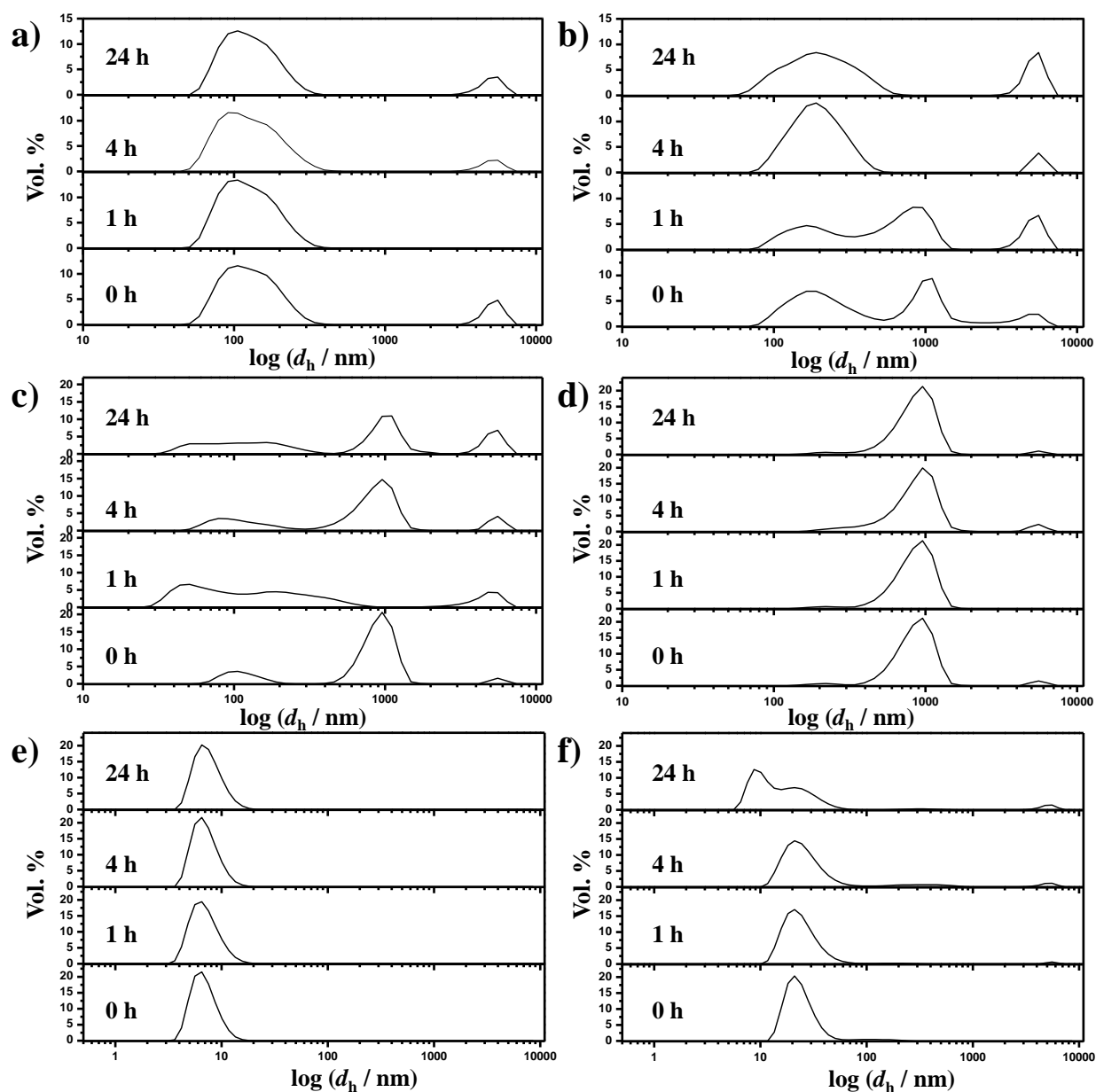
udio s vremenom povećava. Volumni udio manjih i većih agregata s vremenom se povećava. Zeta potencijal je ostao gotovo nepromijenjen, s vrijednošću od $-53,0$ do $-50,8$ mV.

Raspodjela veličina TiNT u otopini anionske komponente taložnog medija je trimodalna (slika 46 c). S obzirom na veličinu određenu na temelju SEM i TEM mikrografija može se zaključiti da su TiNT u anionskoj komponenti taložnog medija zastupljene kao pojedinačne čestice te u obliku agregata većeg i manjeg broja čestica. S vremenom se veličina TiNT smanjuje dok zeta potencijal ostaje gotovo nepromijenjen tijekom 24 sata.

Raspodjela veličina TiNW u otopini anionske komponente je bi- ili trimodalna (slika 46 d). Dominantna populacija čestica (oko 95 Vol. %) veličine je oko 870 nm te odgovara veličini pojedinih TiNW. Populacija manje veličine posljedica je pucanja TiNW prilikom dispergiranja. Manje TiNW uočene su i na SEM te AFM mikrografijama. Veličina i udio pojedine populacije čestica kao i zeta potencijal ne mijenjaju se značajnije s vremenom.

Tokom 24 sata ne dolazi do promjene veličine niti zeta potencijala BSA i kitozana, osim nakon 24 sata u slučaju kitozana. Veličina BSA u 8 mmol dm^{-3} otopini Na_2HPO_4 iznosi oko 7 nm, dok veličina kitozana iznosi oko 25 nm.

Sve vrste TiNM, BSA i kitozan stabilni su tijekom 24 sata u anionskoj komponenti taložnog sustava jer ne dolazi do značajnije promjene veličine niti zeta potencijala.



Slika 46. Reprezentativne raspodjele veličine a) TiO_2 nanočestica, b) TiO_2 nanopločica, c) titanatnih nanocjevčica, d) titanatnih nanožica, e) albumina iz govedjeg seruma koncentracija 200 mg L^{-1} i f) kitozana koncentracije 30 mg L^{-1} suspendiranih u 8 mmol dm^{-3} otopini Na_2HPO_4 pH 7,4 nakon 0, 1, 4 i 24 h pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 8. Hidrodinamički promjer (d_h) i volumni udio (Vol. %) TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT), titanatnih nanožica (TiNW), albumina iz goveđeg seruma (BSA) koncentracije koncentracija 200 mg L^{-1} i kitozana koncentracije 30 mg L^{-1} suspendiranih u 8 mmol dm^{-3} otopini Na_2HPO_4 pH 7,4 nakon 0, 1, 4 i 24 h pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Uzorak	t / h	Pik I		Pik II		Pik III	
		d_h / nm	Vol. %	d_h / nm	Vol. %	d_h / nm	Vol. %
TiNP	0	$134,9 \pm 3,5$	$88,7 \pm 5,7$	$5251,2 \pm 72,2$	$11,3 \pm 5,7$		
	1	$133,9 \pm 2,2$	100				
	4	$136,7 \pm 3,5$	$91,0 \pm 1,8$	$5126,6 \pm 67,7$	$9,0 \pm 1,8$		
	24	$133,6 \pm 3,9$	$87,6 \pm 6,6$	$5196,8 \pm 143,6$	$12,4 \pm 6,6$		
TiNPI	0	$216,2 \pm 3,5$	$57,0 \pm 14,9$	$1076,1 \pm 170,7$	$31,1 \pm 14,6$	$4743,7 \pm 343,4$	$11,9 \pm 2,4$
	1	$179,2 \pm 18,2$	$32,3 \pm 4,9$	$742,1 \pm 35,5$	$55,0 \pm 10,7$	$5207,3 \pm 95,6$	$12,8 \pm 6,3$
	4	$216,8 \pm 14,2$	$85,6 \pm 5,4$			$5109,3 \pm 689,9$	$14,4 \pm 5,0$
	24	$214,1 \pm 17,8$	$80,8 \pm 8,4$			$5181,7 \pm 74,8$	$19,2 \pm 8,4$
TiNT	0	$112,6 \pm 2,8$	$21,9 \pm 9,6$	$880,4 \pm 76,7$	$75,4 \pm 12,4$	$5590 \pm 112,8$	$2,7 \pm 3,6$
	1	$73,7 \pm 9,7$	$37,6 \pm 13,9$	$235,8 \pm 32,9$	$27,7 \pm 11,5$	$4673 \pm 83,4$	$4,6 \pm 7,2$
	4	$115,3 \pm 8,3$	$21,2 \pm 7,2$	$903,8 \pm 95,7$	$68,9 \pm 12,0$	$5385,8 \pm 113,2$	$9,9 \pm 6,3$
	24	$55,0 \pm 1,3$	$5,0 \pm 5,9$	$129,4 \pm 17,3$	$24,6 \pm 5,9$	$980,8 \pm 90,9$	$62,2 \pm 17,5$
TiNW	0	$235,5 \pm 32,1$	$1,4 \pm 2,1$	$874,8 \pm 34,3$	$93,2 \pm 2,4$	$5496,0 \pm 100,0$	$5,3 \pm 3,6$
	1	$224,8 \pm 40,0$	$1,5 \pm 1,9$	$862,2 \pm 30,7$	$96,6 \pm 1,1$	$5568,3 \pm 32,6$	$1,9 \pm 1,7$
	4			$875,6 \pm 32,6$	$94,1 \pm 1,8$	$5328,5 \pm 250,1$	$5,9 \pm 1,8$
	24	$221,9 \pm 6,0$	$0,9 \pm 1,4$	$862,3 \pm 59,0$	$94,4 \pm 3,7$	$5473,4 \pm 121,8$	$4,7 \pm 4,2$
BSA	0	$7,06 \pm 0,36$	100				
	1	$7,19 \pm 0,18$	100				
	4	$7,22 \pm 0,52$	100				
	24	$7,77 \pm 0,12$	100				
Kitozan	0			$23,7 \pm 3,5$	$90,9 \pm 12,2$		
	1			$25,0 \pm 2,3$	$97,6 \pm 1,4$		
	4			$26,3 \pm 5,4$	$91,8 \pm 3,2$		
	24	$9,94 \pm 0,84$	$25,6 \pm 3,4$	$24,7 \pm 2,6$	$69,9 \pm 29,7$		

Tablica 9. Zeta potencijal (ζ) TiO₂ nanočestica (TiNP), TiO₂ nanopločica (TiNPl) titanatnih nanocjevčica (TiNT), titanatnih nanožica (TiNW), albumina iz goveđeg seruma (BSA) koncentracije koncentracija 200 mg L⁻¹ i kitozana koncentracije 30 mg L⁻¹ suspendiranih u 8 mmol dm⁻³ otopini Na₂HPO₄ pH 7,4 nakon 0, 1, 4 i 24 h pri 25 °C.

Uzorak	t / h	0	1	4	24
TiNP	ζ / mV	-45,9 ± 2,2	-47,1 ± 1,8	-42,6 ± 2,2	-50,9 ± 1,6
TiNPl		-53,0 ± 2,5	-53,2 ± 2,5	-53,0 ± 2,3	-50,8 ± 8,1
TiNT		-40,5 ± 1,6	-40,0 ± 1,6	-41,5 ± 1,2	-39,6 ± 2,0
TiNW		-55,0 ± 2,0	-55,4 ± 2,8	-55,3 ± 2,5	-54,4 ± 2,2
BSA		-15,9 ± 4,7	-14,9 ± 0,7	-16,8 ± 4,3	-24,1 ± 3,8
Kitozan		-0,04 ± 0,11	0,12 ± 0,32	0,14 ± 0,39	1,01 ± 0,16

4.1.2.2. Stabilnost titanatnih nanomaterijala u anionskoj komponenti taložnog sustava u prisutnosti albumina

S obzirom da je istražena kinetika taloženja CaP u taložnim sustavima u kojima je istovremeno dodan BSA i TiNM, određena je i stabilnost TiNM u otopini anionske komponente u prisutnosti BSA. Utjecaj BSA na taloženje CaP u prisutnosti TiNM istražen je pri koncentraciji nanomaterijala 50 i 100 mg mL⁻¹ te pri koncentraciji proteina 50 mg mL⁻¹. Kako se aditivi dodaju u anionsku komponentu taložnog sustava u koncentraciji dvostruko većoj od istraživane, stabilnost TiNM istražena je u 8 mmol dm⁻³ otopini Na₂HPO₄ koji sadrži 100 mg mL⁻¹ BSA te 200 mg mL⁻¹ TiNM. Na slici 47 prikazane su raspodjele veličina TiNM u 8 mmol dm⁻³ Na₂HPO₄ koji sadrži 200 mg mL⁻¹ BSA, dok je veličina TiNM u navedenom mediju dana u tablici 10, a zeta potencijal u tablici 11.

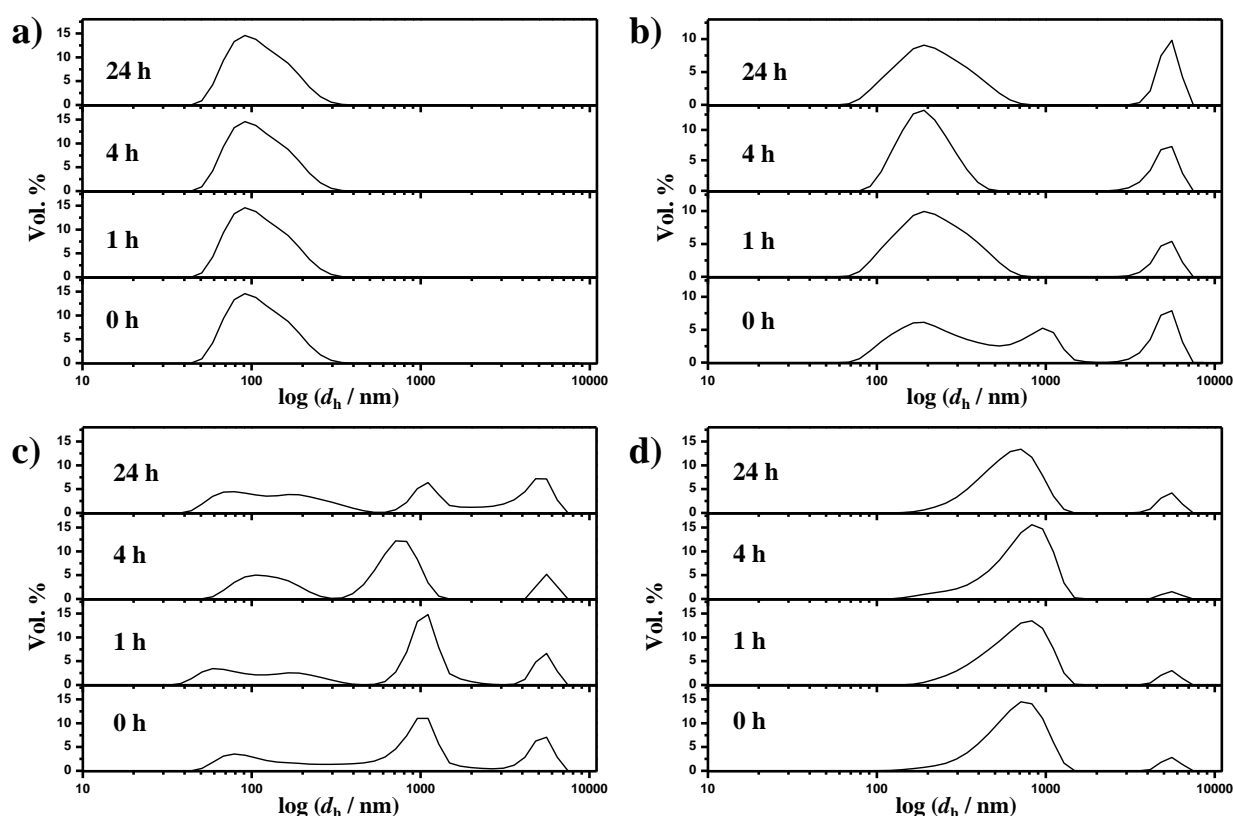
U anionskoj komponenti taložnog medija u kojoj je prisutan BSA hidrodinamički promjer i zeta potencijal TiNP ne mijenjaju se s vremenom što ukazuje na to da su TiNP stabilne (slika 47 a). Vrijednost hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala manje su od vrijednosti dobivenih u taložnim medijima bez prisustva BSA što ukazuje da se BSA adsorbirao na TiNP.

TiO₂ nanopločice zastupljene su u anionskoj komponenti taložnog medija s dodatkom BSA kao agregati veličine oko 230 nm (slika 47 b), što je ponašanje vrlo slično onome u sustavu bez dodatka BSA. Osim agregata manjeg broja čestica, TiNPl su zastupljene i u obliku većih

agregata čiji se volumni udio tokom vremena povećava. Tokom 24 sata, ne dolazi do promjene zeta potencijala čija je vrijednost nešto manja u odnosu na sustav bez BSA.

U slučaju TiNT dominantna je populacija d_h oko 880 – 1100 nm (slika 47 c), a detektirane su i pojedinačne čestice te, u najmanjem udjelu, veći agregati TiNT veličine oko 5000 nm. Zeta potencijal se ne mijenja s vremenom što ukazuje da su TiNT stabilne. Kao i u slučaju TiNP, vrijednost zeta potencijala manja je u odnosu na sustav bez BSA.

U anionskoj komponenti taložnog medija koja sadrži BSA dominantna je populacija TiNW d_h oko 750 nm (slika 47 d). Za razliku od sustava bez BSA, ne pojavljuju se TiNW manje veličine. Također, tokom vremena povećava se udio populacije veličine oko 5000 nm, što ukazuje na agregaciju. I u slučaju TiNW smanjuje se vrijednosti zeta potencijala u odnosu na sustav bez BSA.



Slika 47. Repräsentative raspodjele veličine a) TiO₂ nanočestica, b) TiO₂ nanopločica, c) titanatnih nanocjevčica i d) titanatnih nanožica koncentracije 200 mg L⁻¹ suspendiranih u otopini 8 mmol dm⁻³ Na₂HPO₄ i 100 mg L⁻¹ albumina iz goveđeg seruma nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i 25 °C.

Tablica 10. Hidrodinamički promjer (d_h) i volumni udio (Vol. %) TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracije 200 mg L^{-1} suspendiranih u otopini 8 mmol dm^{-3} Na_2HPO_4 i 100 mg L^{-1} albumina iz goveđeg seruma (BSA) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Uzorak	t / h	Pik I		Pik II		Pik III	
		d_h / nm	Vol. %	d_h / nm	Vol. %	d_h / nm	Vol. %
TiNP	0	$118,6 \pm 1,48$	100				
	1	$121,6 \pm 2,36$	100				
	4	$119,9 \pm 0,89$	100				
	24	$125,3 \pm 10,56$	100				
TiNPI	0	$231,3 \pm 19,4$	$65,2 \pm 23,9$	$981,0 \pm 191,8$	$17,3 \pm 6,8$	$477,3 \pm 512,5$	$23,1 \pm 5,4$
	1	$239,3 \pm 22,0$	$87,3 \pm 6,1$			$4940,8 \pm 406,0$	$14,1 \pm 6,3$
	4	$233,9 \pm 35,5$	$91,1 \pm 0,9$			$5141,0 \pm 149,8$	$11,4 \pm 5,5$
	24	$238,4 \pm 30,3$	$89,8 \pm 2,3$			$5240,1 \pm 112,3$	$10,2 \pm 6,3$
TiNT	0	$115,4 \pm 5,9$	$26,7 \pm 3,7$	$881,8 \pm 65,9$	$54,4 \pm 2,6$	$5123 \pm 81,1$	$18,9 \pm 1,6$
	1	$181,9 \pm 18,5$	$24,1 \pm 15,9$	$11232 \pm 76,6$	$39,2 \pm 17,0$	$5335,7 \pm 448,5$	$14,3 \pm 13,2$
	4	$125, \pm 10,6$	$31,6 \pm 7,1$	$713,6 \pm 163,9$	$46,6 \pm 12,1$	$5457,2 \pm 139,0$	$20,1 \pm 13,6$
	24	$218,1 \pm 11,8$	$20,7 \pm 5,0$	$936,6 \pm 311,4$	$24,2 \pm 4,2$	$5527,3 \pm 56,8$	$10,8 \pm 4,3$
TiNW	0	$753,6 \pm 68,9$	$94,6 \pm 2,1$	$5363 \pm 54,6$	$6,5 \pm 2,0$		
	1	$763,6 \pm 40,4$	$95,8 \pm 2,6$	$5375,4 \pm 111,2$	$4,9 \pm 2,3$		
	4	$738,5 \pm 64,1$	$80,2 \pm 10,3$	$5255,0 \pm 240,2$	$20,1 \pm 7,3$		
	24	$761,2 \pm 55,3$	$83,4 \pm 12,5$	$5410,8 \pm 105,3$	$20,2 \pm 9,5$		

Tablica 11. Zeta potencijal (ζ) TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracije 200 mg L^{-1} suspendiranih u otopini 8 mmol dm^{-3} Na_2HPO_4 i 100 mg L^{-1} albumina iz goveđeg seruma (BSA) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Uzorak	t / h	0	1	4	24
TiNP	ζ / mV	$-32,6 \pm 1,3$	$-31,7 \pm 1,3$	$-32,4 \pm 1,5$	$-30,0 \pm 1,5$
TiNPI		$-34,3 \pm 2,0$	$-33,8 \pm 1,6$	$-35,0 \pm 1,0$	$-33,6 \pm 1,2$
TiNT		$-31,2 \pm 1,7$	$-31,2 \pm 1,7$	$-31,3 \pm 1,8$	$-29,9 \pm 1,6$
TiNW		$-39,5 \pm 1,9$	$-39,5 \pm 2,1$	$-39,2 \pm 2,3$	$-39,3 \pm 2,0$

S obzirom da je zeta potencijal svih vrsta TiNM manji u odnosu na vrijednost u anionskoj komponenti taložnog sustava bez BSA, može se zaključiti da se BSA adsorbira na površinu TiNM. U slučaju TiNP i TiNPI, uočeno je da su u prisutnosti BSA čestice manje agregirane.

4.1.2.3. Stabilnost titanatnih nanomaterijala u anionskoj komponenti taložnog sustava u prisutnosti kitozana

Osim BSA, kao aditivi prilikom sinteze CaP dodan je i kitozan. Koncentracija kitozana u taložnim sustavima u kojima su prisutni TiNM iznosila je 15 mg mL^{-1} dok je koncentracija TiNM, kao i u slučaju dodatka BSA, iznosila 50 i 100 mg mL^{-1} . Stabilnost TiNM koncentracije 200 mg mL^{-1} određena je u 8 mmol dm^{-3} otopini Na_2HPO_4 te u prisutnosti 30 mg mL^{-1} kitozana. Reprezentativne raspodjele veličine prikazane na slici 48, dok su vrijednosti hidrodinamičkog promjera i volumnog udjela TiNM te zeta potencijala u anionskoj komponenti taložnog medija s dodatkom kitozana dane u tablicama 12 i 13.

U anionskoj komponenti taložnog medija u prisutnosti kitozana hidrodinamički promjer i zeta potencijal TiNP ne mijenjaju se s vremenom, a raspodjela veličine TiNP je monomodalna. Vrijednost d_h kreće se od 750 do 840 nm (slika 48 a). U anionskoj komponenti taložnog medija u prisutnosti kitozana dolazi do izraženije agregacije u odnosu na sustav bez aditiva i bez BSA. Nadalje, zeta potencijal je pozitivan, oko 3 mV.

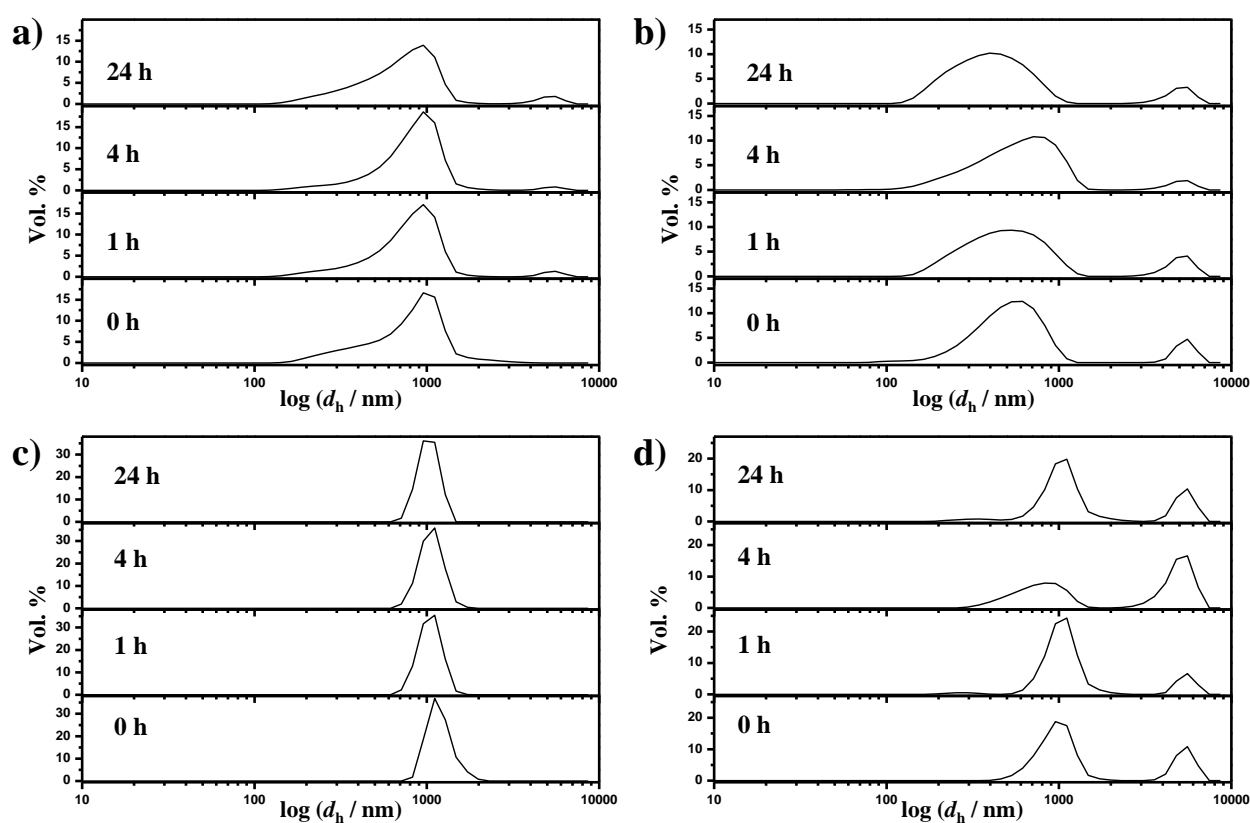
Vrijednost hidrodinamičkog promjera dominantne populacije TiNPI (više od 90 Vol. %) unutar prva 4 sata povećava se s 500 na 610 nm, a zatim nakon 24 sata smanjuje na 450 nm. Istovremeno se veličina i udio čestica hidrodinamičkog promjera većeg od 5000 nm smanjuju (slika 48 b). Vrijednost hidrodinamičkog promjera dominantne populacije čestica veća je od vrijednosti određene u anionskoj komponenti taložnog medija bez kitozana. Zeta potencijal TiNPI u prisutnosti kitozana iznosi oko 3 mV.

Hidrodinamički promjer (slika 48 c) i zeta potencijal TiNT u prisutnosti kitozana ne mijenjaju se s vremenom. Raspodjela veličine čestica je monomodalna, a vrijednost hidrodinamičkog promjera se kreće od 1000 do 1200 nm. U slučaju u kojem u anionskoj komponenti taložnog medija nije dodan kitozan, detektirane su tri populacije čestica. Kao i u prethodnim slučajevima, zeta potencijal postaje pozitivan.

Raspodjela veličine TiNW u anionskoj komponenti taložnog medija u prisutnosti kitozana je bimodalna (slika 48 d). Hidrodinamički promjer dominantne populacije čestica (oko 70 vol. %) iznosi od 884 do 1116 nm, dok hidrodinamički promjer većih čestica iznosi 5098 do

5524 nm. Hidrodinamički promjer dominantne populacije čestica u prisutnosti kitozana veći je u odnosu na sustav bez kitozana. Također u prisutnosti kitozana nije detektirana populacija čestica veličine oko 230 nm, a udio čestica većih od 5000 nm je veći. Zeta potencijal TiNW u prisutnosti kitozana je pozitivan.

Zeta potencijal svih TiNM u anionskoj komponenti taložnog medija u prisutnosti kitozana je pozitivan što znači da se kitozan adsorbirao na površinu TiNM. Nastali agregati su veći u odnosu na čistu otopinu anionske komponente te onu s dodatkom BSA. Na temelju navedenih opažanja može se zaključiti da kitozan uzrokuje veću agregaciju čestica od BSA.



Slika 48. Reprezentativne raspodjele veličine a) TiO₂ nanočestica, b) TiO₂ nanopločica, c) titanatnih nanocjevčica i d) titanatnih nanožica koncentracije 200 mg L⁻¹ u otopini koja sadrži 30 mg L⁻¹ kitozana i 8 mmol dm⁻³ otopini Na₂HPO₄ nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i 25 °C.

Tablica 12. Hidrodinamički promjer (d_h) i volumni udio (Vol. %) TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracije 200 mg L^{-1} suspendiranih u otopini koja sadrži $8 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ i 30 mg L^{-1} kitozana nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Uzorak	t / h	Pik I		Pik II	
		d_h / nm	Vol. %	d_h / nm	Vol. %
TiNP	0	$826,68 \pm 63,51$	$98,00 \pm 2,78$		
	1	$746,58 \pm 104,37$	$94,88 \pm 5,91$		
	4	$839,68 \pm 55,06$	$98,10 \pm 3,76$		
	24	$723,40 \pm 92,82$	$94,98 \pm 4,93$		
TiNPI	0	$504,0 \pm 47,6$	$90,2 \pm 6,1$	$5349 \pm 128,8$	$9,85 \pm 4,13$
	1	$566,3 \pm 79,6$	$92,2 \pm 4,7$	$5177 \pm 327,6$	$7,84 \pm 4,68$
	4	$611,1 \pm 55,2$	$93,3 \pm 3,3$	$5108 \pm 150,0$	$6,75 \pm 3,3$
	24	$450,9 \pm 87,7$	$92,2 \pm 5,6$	5138 ± 107	$7,82 \pm 4,62$
TiNT	0	$1203,5 \pm 150,5$	$86,87 \pm 17,38$		
	1	$1058,7 \pm 197,4$	$87,07 \pm 22,18$		
	4	$1231,0 \pm 195,6$	$91,20 \pm 16,60$		
	24	$957,3 \pm 133,6$	$98,55 \pm 1,96$		
TiNW	0	$999,1 \pm 135,8$	$79,88 \pm 12,42$	5299 ± 315	$17,58 \pm 14,3$
	1	$1116 \pm 160,3$	$88,82 \pm 13,18$	5524 ± 93	$5,20 \pm 1,70$
	4	$884,0 \pm 252,6$	$56,52 \pm 23,57$	$5098 \pm 437,9$	$41,8 \pm 25,1$
	24	$1115 \pm 197,9$	$71,65 \pm 20,53$	$5329 \pm 205,5$	$23,18 \pm 18,36$

Tablica 13. Zeta potencijal (ζ) TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracije 200 mg L^{-1} suspendiranih u otopini koja sadrži $8 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ i 200 mg L^{-1} kitozana nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Uzorak	t / h	0	1	4	24
TiNP	ζ / mV	$3,13 \pm 0,56$	$3,33 \pm 0,53$	$3,71 \pm 0,55$	$3,16 \pm 0,13$
TiNPI		$3,61 \pm 1,22$	$2,94 \pm 0,03$	$3,38 \pm 0,26$	$3,13 \pm 0,22$
TiNT		$3,01 \pm 0,46$	$3,50 \pm 0,14$	$3,71 \pm 0,05$	$3,72 \pm 0,03$
TiNW		$3,50 \pm 0,14$	$3,50 \pm 0,20$	$3,41 \pm 0,56$	$3,47 \pm 0,3$

4.1.2.4. Stabilnost titanatnih nanomaterijala i albumina u fosfatnom puferu

Stabilnost u fosfatnom puferu (PBS) određena je pri najvećoj koncentraciji TiNM korištenih u taložnim eksperimentima, odnosno 200 mg mL^{-1} . Raspodjela veličine prikazana je na slici 49, dok su vrijednosti hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala dane u tablicama 14 i 15. S obzirom da su eksperimenti s kitozonom rađeni samo u taložnim sustavima, stabilnost kitozana određena je samo u otopini anionske komponente taložnog sustava.

Veličina dominantne populacije TiNP u PBS raste nakon 24 sata (slika 49 a) te dolazi do porasta volumnog udjela veće populacije čestica (oko 5000 nm), što ukazuje na izraženiju agregaciju TiNP u PBS u odnosu na otopinu anionske komponente taložnog medija. Također je i zeta potencijal TiNP u PBS manji od vrijednosti u otopini anionske komponente, ali se s vremenom značajno ne mijenja.

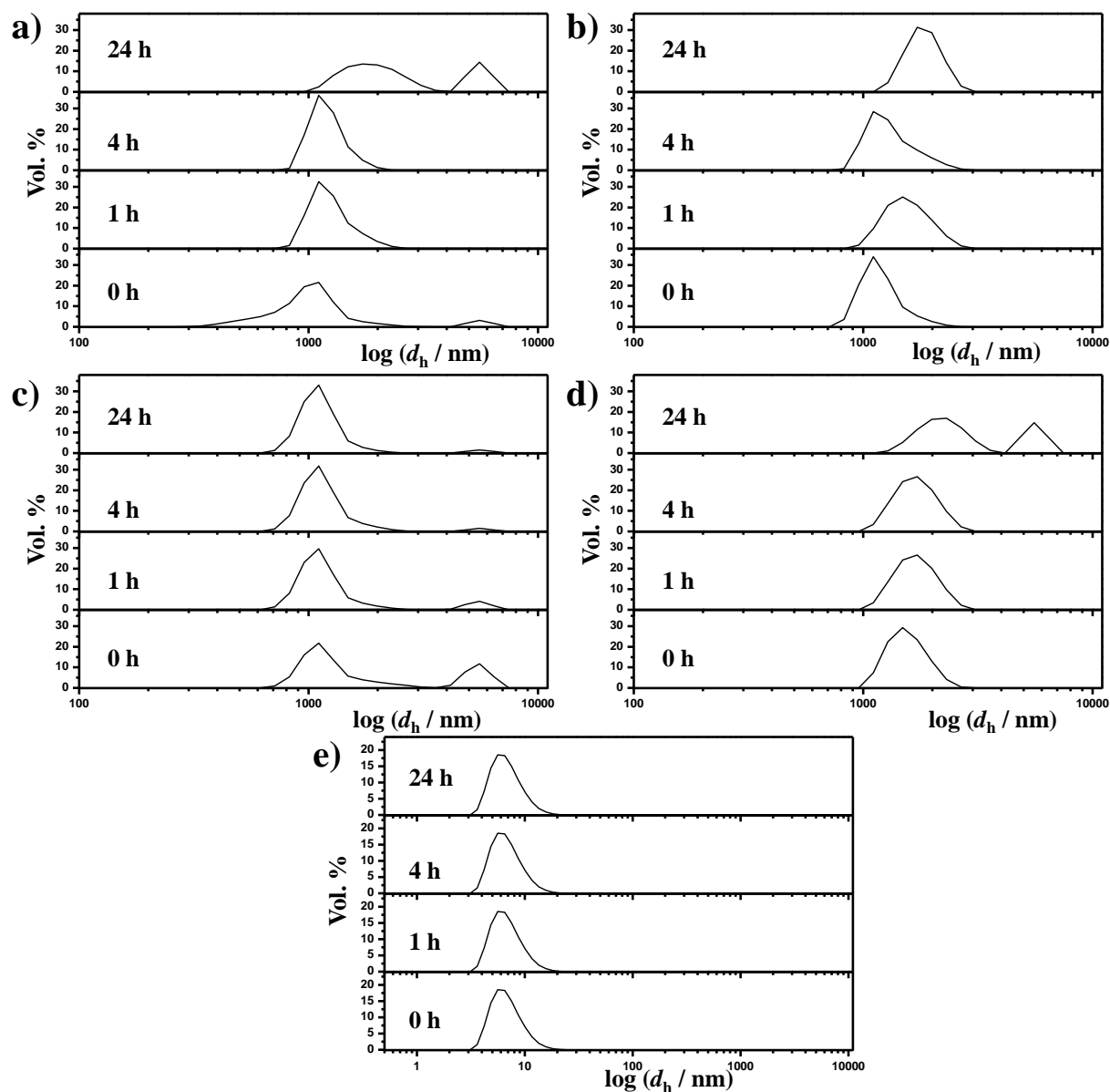
U PBS-u je detektirana samo jedna populacija TiNPI čija se veličina povećala tijekom 24 sata s 1199 nm na 1805 nm (slika 49 b). Zeta potencijal se s vremenom nije značajnije promijenio, a vrijednost mu se kretala oko -25 mV .

TiNT imaju najveći hidrodinamički promjer u PBS-u u odnosu na sve druge medije. Raspodjela veličina je biomodalna s maksimumima veličine oko 1120 i 5300 nm (slika 49 c). Veličina čestica s vremenom znatnije se ne mijenja, ali se smanjuje udio većih čestica. Također, ne dolazi do značajnije promijene niti zeta potencijala.

U PBS-u u kraćim vremenskim razdobljima, 1 – 4 sata, prisutna je samo jedna populacija TiNW čiji se hidrodinamički promjer povećava od 1554 do 2864 nm (slika 49 d). Nakon 24 sata, uz dominantnu populaciju, detektirana je i populacija veličine oko 5500 nm. Zeta potencijal je s vremenom postao neznatno negativniji.

Izmjereni hidrodinamički promjer svih nanomaterijala veći je u otopini PBS u odnosu na anionsku komponentu taložnog sustava, odnosno u PBS-u dolazi do izraženije agregacije. Posljedica je to i veće ionske jakosti PBS-a, što je u skladu s DLVO teorijom. Za razliku od anionske komponente taložnog medija u kojoj su dominantna odbojna međudjelovanja, u PBS-u dominiraju van der Waalsova privlačna međudjelovanja te dolazi do agregacije čestica. U skladu s tim dolazi i do smanjenja zeta potencijala. Kobayashi i sur. istraživali su optimalnu proceduru i medije za uspješno dispergiranje TiO_2 nanočestica, te su sukladno našim istraživanjima uočili agregaciju TiO_2 nanočestica u otopini PBS. Za razliku od PBS-a, u vodi ne dolazi do agregacije čestica.³⁰⁸

BSA je stabilan u PBS-u tijekom 24h te ne dolazi do značajnije promijene hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala u odnosu na anionsku komponentu.



Slika 49. Reprezentativna raspodjela veličina a) TiO₂ nanočestica, b) TiO₂ nanopločica (TiNPI), c) titanatnih nanocjevčica i d) titanatnih nanožica koncentracija 200 mg L⁻¹ i e) albumina iz goveđeg seruma koncentracija koncentracije 40 mg mL⁻¹ suspendiranih u fosfatnom puferu (PBS) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri 25 °C i pH 7,4.

Tablica 14. Hidrodinamički promjer (d_h) i volumni udio (Vol. %) TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracija 200 mg L^{-1} i albumina iz goveđeg seruma koncentracija koncentracije 40 mg mL^{-1} suspendiranih u fosfatnom puferu (PBS) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i pH 7,4.

Uzorak	t / h	Pik I		Pik II	
		d_h / nm	Vol. %	d_h / nm	Vol. %
TiNP	0	$1019,8 \pm 39,7$	$97,3 \pm 2,3$	$5578,2 \pm 25,3$	$2,7 \pm 2,1$
	1	$1227,6 \pm 134,3$	100		
	4	$1262,3 \pm 66,5$	100		
	24	$1812,3 \pm 159,1$	$62,1 \pm 12,7$	$5548,0 \pm 31,1$	$37,9 \pm 12,7$
TiNPI	0	$1199,0 \pm 96,6$	100		
	1	$1519,3 \pm 95,4$	100		
	4	$1381,5 \pm 138,3$	100		
	24	$1805,0 \pm 104,4$	100		
TiNT	0	$1121,4 \pm 142$	$78,2 \pm 11,9$	$5355,5 \pm 208,9$	$21,4 \pm 11,4$
	1	$1111,5 \pm 55,3$	$91,9 \pm 11,2$	$5269,5 \pm 289,2$	$8,1 \pm 11,2$
	4	$1150,2 \pm 54,9$	$96,9 \pm 4,6$	$5530,3 \pm 103,3$	$3,9 \pm 4,9$
	24	$1177,3 \pm 40,7$	$73,8 \pm 32,9$	$5329,5 \pm 368,4$	$8,4 \pm 14,8$
TiNW	0	$1554,3 \pm 274,8$	100		
	1	$1674,8 \pm 141,3$	100		
	4	$2864,7 \pm 274,6$	100		
	24	$2297,8 \pm 85,8$	$85,8 \pm 16,4$	$5561,0 \pm 50,2$	$12,0 \pm 15,1$
BSA	0	$6,03 \pm 0,79$	100		
	1	$6,25 \pm 0,15$	100		
	4	$6,20 \pm 0,17$	100		
	24	$6,15 \pm 0,15$	100		

Tablica 15. Zeta potencijal (ζ) TiO₂ nanočestica (TiNP), TiO₂ nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracija 200 mg L⁻¹ i e) albumina iz goveđeg seruma koncentracije 40 mg mL⁻¹ suspendiranih u fosfatnom puferu (PBS) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i 25 °C.

Uzorak	t / h	0	1	4	24
TiNP	ζ / mV	-25,3 ± 0,9	-23,2 ± 1,0	-22,2 ± 1,0	-20,5 ± 0,6
TiNPI		-26,4 ± 0,8	-24,5 ± 1,5	-25,5 ± 1,1	-24,2 ± 0,7
TiNT		-22,7 ± 1,0	-21,4 ± 1,2	-21,4 ± 1,2	-23,1 ± 0,7
TiNW		-21,2 ± 1,0	-21,2 ± 0,9	-21,8 ± 1,7	-23,2 ± 1,5
BSA		-8,07 ± 0,45	-9,09 ± 1,32	-7,43 ± 1,68	-8,81 ± 1,35

4.1.2.5. Stabilnost titanatnih nanomaterijala u fosfatnom puferu s dodatkom albumina

Kao i u slučaju anionske komponente taložnog medija, određena je stabilnost TiNM u PBS-u u prisutnosti BSA. U tom slučaju koncentracija TiNM iznosila je 200 mg L⁻¹ dok je koncentracija BSA iznosila 40 mg mL⁻¹. Vrijednosti hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala u tablici 16 i tablici 17.

Koncentracije BSA toliko su velike da su u DLS i ELS mjerenjima TiNP, TiNT i TiNPI vidljive samo čestice BSA. U slučaju TiNW, uz dominantnu populaciju BSA, detektirana je i populacija većih čestica. Za razliku od vrijednosti d_h u otopini PBS u kojemu prosječna veličina TiNW iznosi od oko 1500 do 2300 nm, u otopini PBS koja sadrži BSA, TiNW su manje agregirane te im je prosječna veličina oko 800 nm. Zeta potencijali svih nanomaterijala približno su jednaki vrijednostima zeta potencijala BSA u PBS. U slučaju TiNM u otopini PBS i BSA dane su samo vrijednosti hidrodinamičkih polumjera i zeta potencijala.

Tablica 16. Hidrodinamički promjer (d_h) i volumni udio (Vol. %) TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracija 100 mg L^{-1} suspendiranih u fosfatnom puferu (PBS) koji sadrži 40 mg L^{-1} albumina iz goveđeg seruma (BSA) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Uzorak	t / h	Pik I		Pik II	
		d_h / nm	Vol. %	d_h / nm	Vol. %
TiNP	0	$6,19 \pm 0,85$	100		
	1	$6,38 \pm 0,29$	100		
	4	$6,36 \pm 0,17$	100		
	24	$6,65 \pm 0,28$	100		
TiNT	0	$6,38 \pm 0,39$	100		
	1	$6,42 \pm 0,17$	100		
	4	$6,28 \pm 0,65$	100		
	24	$6,49 \pm 0,12$	100		
TiNW	0	$7,18 \pm 0,17$	$98 \pm 0,3$	$809,7 \pm 56,5$	$1,8 \pm 0,2$
	1	$7,10 \pm 0,37$	$98 \pm 0,3$	$329,3 \pm 66,3$	$2 \pm 0,3$
	4	$6,99 \pm 0,18$	$98 \pm 0,3$	$788,6 \pm 50,0$	$2 \pm 0,2$
	24	$7,34 \pm 0,4$	91 ± 19	$758,1 \pm 149,6$	$2 \pm 0,8$
TiNPI	0	$7,05 \pm 0,40$	100		
	1	$6,90 \pm 0,14$	100		
	4	$6,82 \pm 0,14$	100		
	24	$6,56 \pm 0,28$	100		

Tablica 17. Zeta potencijal (ζ) TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracija 100 mg L^{-1} suspendiranih u fosfatnom puferu (PBS) koji sadrži 40 mg L^{-1} albumina iz goveđeg seruma (BSA) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Uzorak	t / h	0	1	4	24
TiNP	ζ / mV	$-9,92 \pm 0,78$	$-10,25 \pm 0,75$	$-9,73 \pm 0,69$	$-9,42 \pm 0,63$
TiNPI		$-9,50 \pm 0,45$	$-11,30 \pm 0,32$	$-11,10 \pm 0,53$	$-11,13 \pm 1,01$
TiNT		$-9,31 \pm 0,84$	$-10,08 \pm 0,70$	$-9,82 \pm 0,43$	$-9,45 \pm 0,78$
TiNW		$-11,22 \pm 0,47$	$-10,96 \pm 0,51$	$-11,45 \pm 0,93$	$-10,98 \pm 0,64$

4.1.2.6. Stabilnost titanatnih nanomaterijala i albumina u simuliranoj tjelesnoj tekućini

Na slici 50 prikazane su raspodjele veličine TiNM i BSA u SBF-u, dok su vrijednosti d_h i zeta potencijala dani u tablicama 18 i 19.

U SBF detektirane su dvije populacije TiNP (slika 50 a). U prvih 4 sata veličina dominantne populacije povećava se do oko 950 nm, a također se povećava i udio populacije većih čestica na 9,1 Vol. %. Nakon 24 sata detektirane su samo čestice veličine oko 890 nm. TiNP u SBF-u imaju najmanji negativni zeta potencijal. Rezultati ukazuju da su agregati TiNP nastali u SBF-u relativno stabilni.

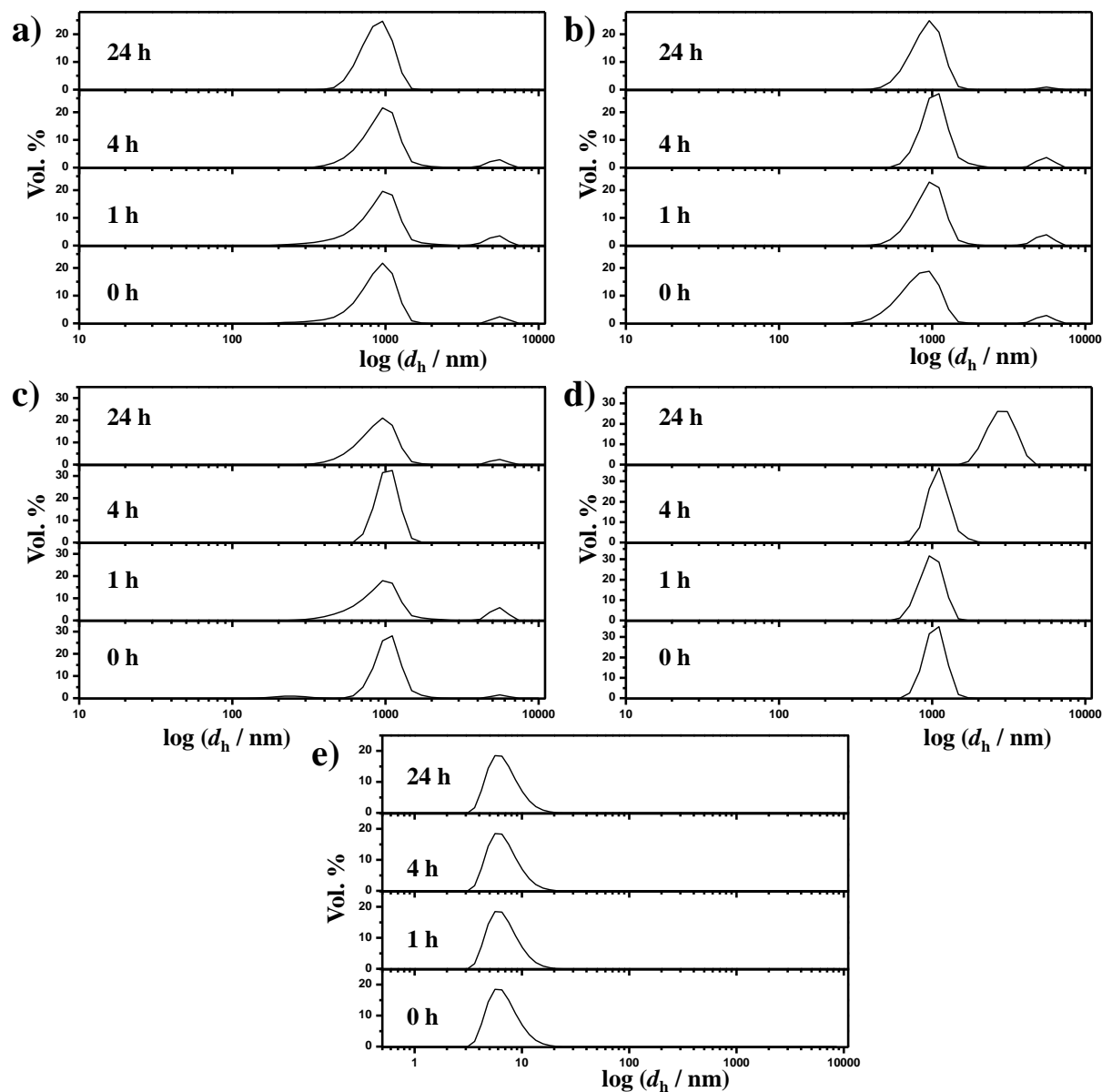
Slično kao i u slučaju TiNP, u SBF-u su detektirane dvije populacije čestica TiNPI (slika 50 b). Veličina i udio dominantne populacije mijenjali su se s vremenom. Veličina je rasla s 848 nm u početnom vremenu do 1052 nm nakon 4 sata, a zatim se smanjila na 879 nm nakon 24 sata. Veličina veće populacije čestica mijenjala se od 5358 do 5590 nm tijekom 24 sata, a njezin udio se smanjio. Zeta potencijal se s vremenom nije značajnije promijenio, vrijednost mu se kretala oko -10 mV.

Hidrodinamički promjer dominantne populacije TiNT čestica u SBF iznosi oko 900 – 990 nm (slika 50 c). Vrijednost d_h izmjerenih u SBF-u slične su vrijednostima dominantne populacije u otopini anionske komponente. U uzorcima je prisutna i mala količina čestica veličina iznad 5000 nm, dok su samo u najranijem vremenu detektirane i male čestice d_h oko 250 nm u malom postotku (3 Vol. %). Zeta potencijal TiNT u SBF se s vremenom gotovo ne mijenja i iznosi oko -11 mV.

Raspodjela hidrodinamičkog promjera TiNW u SBF-u je monomodalna (slika 50 d). U prvih 4 sata veličina ostaje gotovo nepromijenjena (oko 1080 nm), a do naglog povećanja d_h dolazi nakon 24 h, kad su detektirane čestice veličine 2822 nm. Zeta potencijal tijekom 24 sata se znatnije ne mijenja.

Iako je otopina SBF najveće ionske jakosti u odnosu na sva 3 istraživana medija te dvostruko veće I_c u odnosu na PBS, u SBF-u ne dolazi do značajnije agregacije TiNM. Navedeno opažanje može biti posljedica i različitog sastava medija. Singh i sur. pokazali da valencija kationa zastupljenih u otopini elektrolita ima utjecaj na agregaciju čestica, odnosno da divalentni kationi imaju izraženiji utjecaj na brzinu agregacije od monovalentnih kationa iste soli.³⁰⁹

U slučaju BSA, unutar 24 sata ne dolazi do promjene d_h koji je jednak veličini u anionskoj komponenti taložnog medija i u PBS-u. Ne dolazi ni do promjene zeta potencijala koji je sličan vrijednosti zeta potencijala u PBS-u, ali niži od vrijednosti u anionskoj komponenti.



Slika 50. Reprezentativne raspodjele veličine a) TiO₂ nanočestica, b) TiO₂ nanopločica, c) titanatnih nanocjevčica i d) titanatnih nanožica koncentracija 100 mg L⁻¹ i e) albumina iz goveđeg seruma (BSA) koncentracije 5 mg mL⁻¹ suspendiranih u korigiranoj tjelesnoj tekućini (SBF) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri 25 °C i pH 7,4.

Tablica 18. Hidrodinamički promjer (d_h) i volumni udio (Vol. %) TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracija 100 mg L^{-1} i albumina iz goveđeg seruma koncentracija koncentracije 5 mg mL^{-1} suspendiranih u korigiranoj tjelesnoj tekućini (SBF) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i pH 7,4.

Uzorak	t / h	Pik I		Pik II	
		d_h / nm	Vol. %	d_h / nm	Vol. %
TiNP	0	$888,7 \pm 18,0$	$92,5 \pm 4,3$	$5492,3 \pm 89,3$	$7,5 \pm 2,7$
	1	$916,5 \pm 45,8$	$92,7 \pm 3,5$	$5398,5 \pm 89,5$	$7,3 \pm 1,6$
	4	$950,9 \pm 27,2$	$90,9 \pm 5,3$	$5261,2 \pm 266,3$	$9,1 \pm 4,2$
	24	$887,4 \pm 70,0$	100		
TiNPI	0	$847,8 \pm 32,0$	$92,0 \pm 5,2$	$5357,8 \pm 137,8$	$8,1 \pm 5,2$
	1	$985,3 \pm 19,6$	$91,9 \pm 3,8$	$5293,3 \pm 186,8$	$8,1 \pm 3,8$
	4	$1052,3 \pm 15,4$	$89,8 \pm 4,0$	$5439,8 \pm 47,8$	$10,2 \pm 4,0$
	24	$879,1 \pm 68,2$	$99,2 \pm 1,0$	$5590,2 \pm 112,9$	$0,7 \pm 0,3$
TiNT	0	$987,1 \pm 53,9$	$95,0 \pm 2,4$	5590,0	$2,1 \pm 1,8$
	1	$930,6 \pm 33,5$	$85,8 \pm 3,5$	$5230,0 \pm 406,2$	$14,2 \pm 3,5$
	4	$973,6 \pm 65,0$	100,0		
	24	$894,6 \pm 27,3$	$97,0 \pm 3,6$	$5446,0 \pm 21,2$	$3,0 \pm 3,6$
TiNW	0	$1078,0 \pm 56,3$	100		
	1	$1011,1 \pm 108,7$	100		
	4	$1081,8 \pm 101,8$	100		
	24	$2822,0 \pm 261,3$	100		
BSA	0	$7,08 \pm 0,15$	100		
	1	$7,70 \pm 0,44$	100		
	4	$7,18 \pm 0,06$	100		
	24	$7,01 \pm 0,25$	100		

Tablica 19. Zeta potencijal (ζ) TiO₂ nanočestica (TiNP), TiO₂ nanopločica (TiNPl), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracija 100 mg L⁻¹ i albumina iz goveđeg seruma koncentracije 5 mg mL⁻¹ suspendiranih u korigiranoj tjelesnoj tekućini (SBF) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i 25 °C.

Uzorak	<i>t</i> / h	0	1	4	24
TiNP	ζ / mV	-10,03 ± 1,05	-10,22 ± 0,78	-11,04 ± 0,66	-10,62 ± 0,38
TiNPl		-10,51 ± 0,15	-9,78 ± 0,64	-10,12 ± 0,96	-10,34 ± 0,37
TiNT		-10,38 ± 1,41	-11,40 ± 1,20	-10,41 ± 0,69	-10,82 ± 0,14
TiNW		-8,94 ± 0,65	-9,44 ± 0,58	-10,06 ± 1,14	-8,69 ± 0,21
BSA		-7,91 ± 0,70	-10,39 ± 1,88	-7,25 ± 2,05	-10,83 ± 0,76

4.1.2.7. Stabilnost titanatnih nanomaterijala u simuliranoj tjelesnoj tekućini s dodatkom albumina

S obzirom da se u eksperimentima biomimetske sinteze iz SBF-a, u taložni medij dodavao BSA, određena je stabilnost TiNM u SBF u kojem je dodan BSA koncentracije 5 mg mL⁻¹, pri čemu koncentracija TiNM iznosi 200 mg L⁻¹. Koncentracija BSA jednaka je koncentraciji korištenoj u eksperimentima taloženja iz SBF-a. Vrijednosti hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala dani su u Tablicama 20 i 21.

Osim u slučaju TiNW, detektirana je samo dominantna populacija čestica BSA veličine oko 7 nm. I zeta potencijal sustava koji sadrže TiNP, TiNT te TiNPl odgovara vrijednosti BSA u otopini SBF, ~ -10 mV. S druge strane, u sustavu koji je sadržavao TiNW detektirana je populacija čestica veličine oko 700 nm koje odgovaraju pojedinačnim česticama. Jednako ponašanje uočeno je i u PBS-u. No, veličina TiNW detektirana u prisutnosti BSA u SBF-u, nešto manja je u odnosu na sustav u kojemu BSA nije prisutan. Stoga, može se zaključiti da prisutnost BSA smanjuje agregaciju TiNW.

Tablica 20. Hidrodinamički promjer (d_h) i volumni udio (Vol. %) TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) koncentracija 200 mg L^{-1} suspendiranih u simuliranoj tjelesnoj tekućini (SBF) koja sadrži 5 mg mL^{-1} albumina iz goveđeg seruma (BSA) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Uzorak	t / h	Pik I	
		d_h / nm	Vol. %
TiNP	0	$7,21 \pm 0,75$	100
	1	$7,05 \pm 0,85$	100
	4	$7,58 \pm 0,71$	100
	24	$7,06 \pm 0,20$	100
TiNPI	0	$8,13 \pm 0,30$	100
	1	$7,99 \pm 0,30$	100
	4	$6,92 \pm 0,10$	100
	24	$6,56 \pm 0,30$	100
TiNT	0	$7,03 \pm 0,52$	100
	1	$7,36 \pm 0,65$	100
	4	$7,21 \pm 0,49$	100
	24	$7,10 \pm 0,25$	100
TiNW	0	$760,8 \pm 51,1$	100
	1	$687,8 \pm 99,1$	100
	4	$714,1 \pm 56,7$	100
	24	$864,8 \pm 101,9$	100

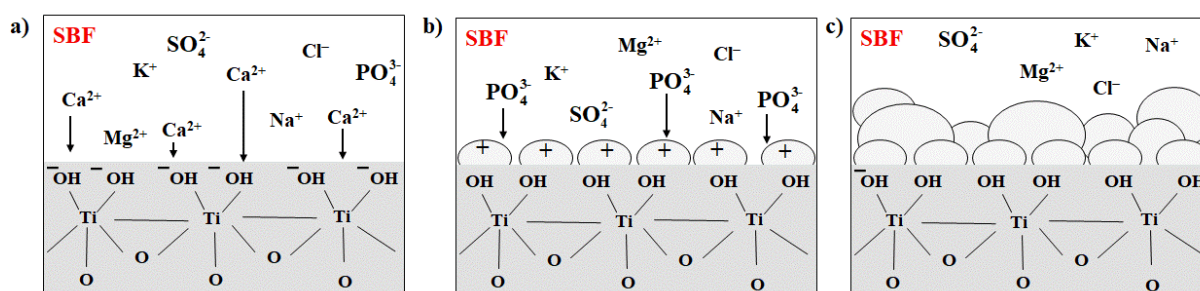
Tablica 21. Zeta potencijal (ζ) TiO_2 nanočestica (TiNP), titanatnih nanocjevčica (TiNT), titanatnih nanožica (TiNW) i TiO_2 nanopločica (TiNPI) koncentracija 100 mg L^{-1} suspendiranih u simuliranoj tjelesnoj tekućini (SBF) koja sadrži 5 mg L^{-1} albumina iz goveđeg seruma (BSA) nakon 0, 1, 4 i 24 h pri pH 7,4 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Uzorak	t / h	0	1	4	24
TiNP	ζ / mV	$-8,26 \pm 0,86$	$-8,26 \pm 0,86$	$-9,62 \pm 0,52$	$-10,15 \pm 0,35$
TiNPI		$-11,27 \pm 0,55$	$-10,67 \pm 0,47$	$-11,10 \pm 0,53$	$-11,13 \pm 1,01$
TiNT		$-9,78 \pm 0,52$	$-10,18 \pm 0,42$	$-9,65 \pm 0,55$	$-10,15 \pm 0,4$
TiNW		$-10,78 \pm 0,65$	$-10,33 \pm 0,84$	$-10,19 \pm 0,62$	$-10,35 \pm 0,76$

4.2. Biomimetska sinteza nanokompozita kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala taloženjem iz simulirane tjelesne tekućine

Sposobnost induciranja nastajanja CaP različitih potencijalnih biomaterijala za regeneraciju čvrstih tkiva u c-SBF obično se koristi kao pokazatelj njihove bioaktivnosti *in vivo*.²² Kako SBF sadrži samo glavne anorganske ione prisutne u krvnoj plazmi, a ne i biološke makromolekule, te rezultate treba pažljivo interpretirati.³¹⁰ S obzirom da je cilj ovog dijela doktorata uspostava procedure biomimetske pripreve kompozita kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala (CaDHA/TiNM), mineralizacija u SBF-u koristila se samo za određivanje sposobnosti TiNM da induciraju nastajanje CaP, a ne kao pokazatelj bioaktivnosti. Stoga su eksperimenti vršeni pri temperaturi 25 °C kako bi bili usporedivi s eksperimentima spontanog taloženja i kako bi se moglo odrediti koji je postupak dobivanja CaDHA/TiNM kompozita bolji.

Mehanizam nastajanja CaP iz SBF-a na titanijevim supstratima predložio je Kokubo.³¹¹ Ključni korak je međudjelovanje površinskih Ti-OH grupa s pozitivno nabijenim kalcijevim ionima pri čemu nastaje kalcijev titanat.³¹² Zbog adsorpcije kalcijevih iona, površina postaje pozitivno nabijena i reagira s fosfatnim ionima. Pri tome nastaje metastabilni ACP koji se s vremenom transformira u stabilnije, kristalne CaP (slika 51). Da bi induciranje nastajanja CaP bilo uspješno, Ti-OH grupe trebaju biti specifično raspoređene.



Slika 51. Shematski prikaz nastajanja kalcijevih fosfata na supstratu titanija u simuliranoj tjelesnoj tekućini (SBF): a) nastajanje negativno nabijenih Ti-OH skupina na koje se vežu Ca²⁺ ioni, b) stvaranje kalcijevog titanata na koji se vežu fosfatni ioni i c) nastajanje ACP faze koja će se dalje transformirati u stabilnije faze. Konstruirano prema referenci 312.

4.2.1. Biomimetska sinteza kalcijevih fosfata na titanatnim nanomaterijalima u simuliranoj tjelesnoj tekućini

Difraktogrami praha (slika 52) i FTIR spektri (slika 53) uzoraka dobivenih nakon različitih vremena inkubacije u SBF (1-28 dana) ukazuju na malu sposobnost istraženih TiNM da induciraju nastajanje CaP. Ovisno o vrsti TiNM, sporadično su uočeni difrakcijski i apsorpcijski maksimumi koji odgovaraju CaP.

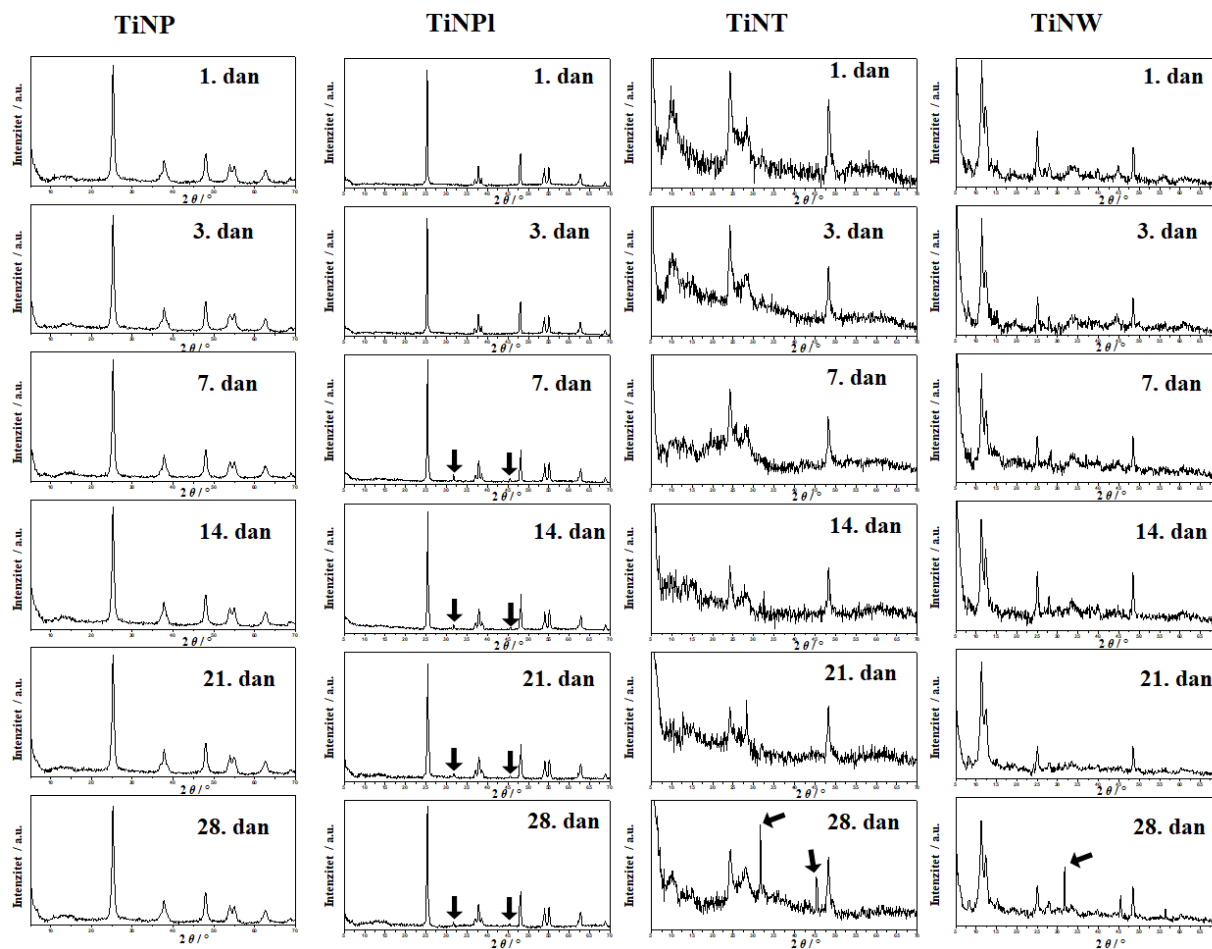
Nakon 28 dana inkubacije TiNP u SBF-u nisu opaženi difrakcijski maksimumi koji odgovaraju CaP. To je moguća posljedica male količine nastalih CaP, njihove slabe kristaliničnosti i preklapanja difrakcijskih maksimuma s izraženim maksimumima TiNP. FTIR metoda pokazala se osjetljivijom za detekciju nastalog CaP. Već nakon prvog dana inkubacije vrpce pri 2916 i 2851 cm^{-1} koje odgovaraju Ti-OH vibracijama nisu više vidljive. Nakon 28 dana umakanja pojavljuje se vrpca na oko 1030 cm^{-1} koja odgovara ν_{3c} trostruko degeneriranom asimetričnom istezanju P-O.²⁹³

U difraktogramima praha TiNPI difrakcijski maksimumi javljaju se nakon 7 dana inkubacije. Difrakcijski maksimumi karakteristični za CaP javljaju se pri 2θ 32° i 45° što ukazuje na nastanak kalcij – deficitarnog hidroksiapatita (CaDHA).^{79,313} Promjene u sastavu taloga vidljivije su u FTIR spektrima već nakon 14 dana. Osim vrpce pri oko 810 i 660 cm^{-1} karakterističnih za TiNPI, nakon 14 dana pojavljuje se vrpca pri oko 1100 i 1030 cm^{-1} karakteristične za degenerirano savijanje $-\text{O}_3\text{PO}-\text{H}\cdots\text{O}-\text{PO}_3$ grupe.²⁹³ Nakon 21. dan dolazi do cijepanja vrpce pri 660 cm^{-1} te pojavljivanja novih vrpce pri 560 cm^{-1} koja odgovara trostruko degeneriranom savijanju O-P-O veze u PO_4^{3-} skupini. Nakon 28 dana pojavljuje se i vrpca na 3182 cm^{-1} . Navedene vrpce nisu detektirane nakon 14 i 21 dan, što može i ukazivati na transformaciju metastabilnog CaP. Nakon 28 dana javlja se niz oštih vrpce slabog intenziteta karakterističnih za hidroksiapatit i karbonatapatit: vrpca pri 1550 cm^{-1} karakteristična je za vibraciju savijanja CO_3^{2-} grupe u A-tipu karbonat apatita, vrpca pri 1453 cm^{-1} karakteristična za vibraciju savijanja CO_3^{2-} grupe u B-tipu karbonat apatita.²⁹³

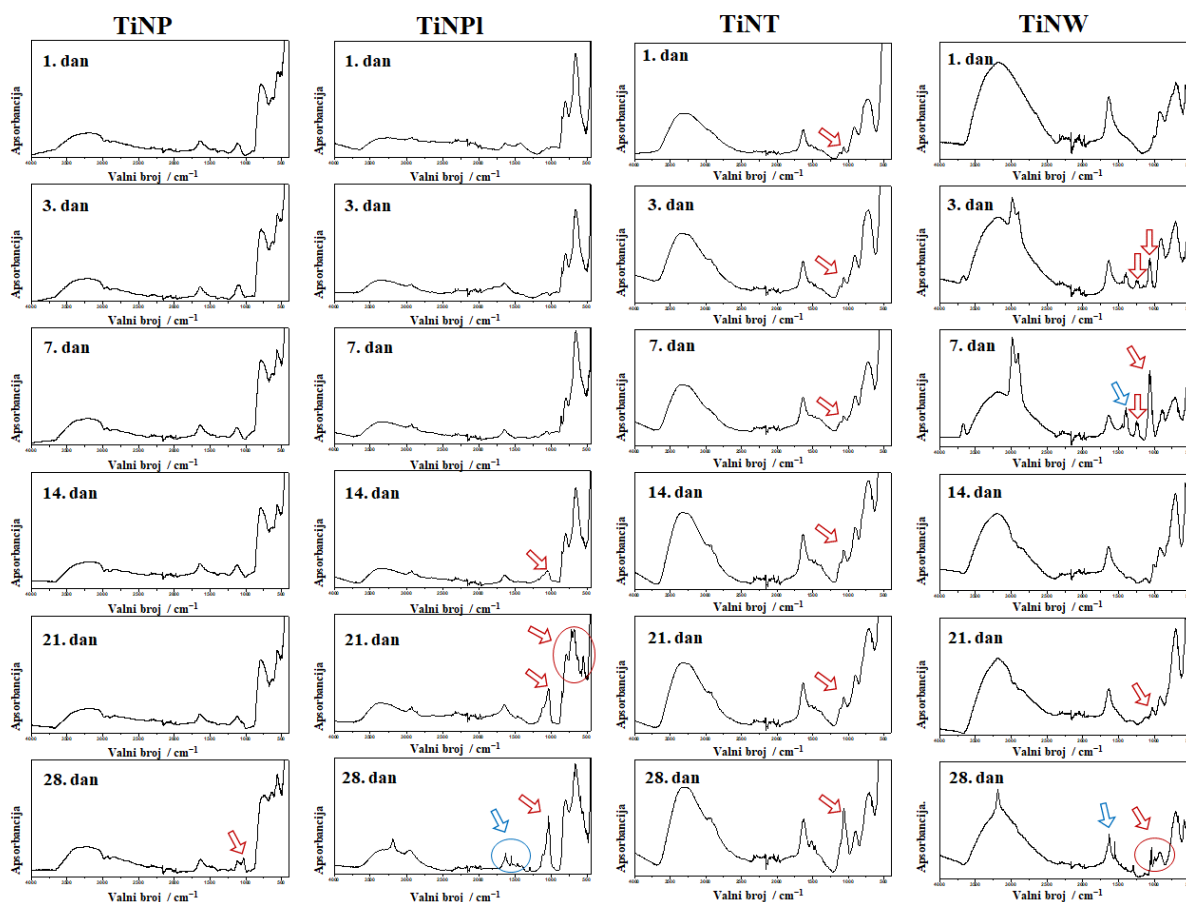
U difraktogramu praha TiNT u SBF-u difrakcijski maksimumi slabog intenziteta pri 2θ 32° i 46° karakterističan za kalcij – deficitarni hidroksiapatit (CaDHA) detektirani su nakon 28 dana inkubacije, što ukazuje na slabu sposobnost TiNT da induciraju taloženje CaP u SBF-u. U FTIR spektru taloga dobivenog nakon 1 dan inkubacije TiNT u SBF vidljiva je vrpca pri 1060 cm^{-1} . Ta vrpca može biti karakteristična ili za vibraciju HPO_4^{2-} grupe u hidroksiapatitu²⁹³

ili za ν_3 vibraciju istezanja PO_4^{3-} grupe u oktakalcijevom fosfatu³¹⁴ te je dokaz da CaP nastaje na TiNT već nakon 1 dana inkubiranja u SBF-u.

U difraktogramima praha TiNW nakon inkubacije u SBF promjena je vidljiva tek nakon 28 dana, što može ukazivati da promjene vidljive u FTIR spektrima uzorka dobivenih nakon 3 i 7 dana inkubiranja u SBF mogu biti posljedica nastajanja male količine amorfnog/metastabilnog CaP. Kao i slučaju TiNP i TiNT, promjene u sastavu taloga su vidljivije u FTIR spektrima. Već nakon 3 dana pojavljuju se nove vrpce na 1237 cm^{-1} i 1060 cm^{-1} . Vrpca na 1237 cm^{-1} karakteristična je za nedegenerirano savijanje $-\text{O}_3\text{PO}-\text{H}\cdots\text{O}-\text{PO}_3$ grupe, a vrpca na 1060 cm^{-1} za vibracije HPO_4^{2-} grupe u strukturi hidroksiapatita s prisutnim hidroksi ili dihidroksi fosfatima u kristalnoj rešetki.²⁹³ Ostale vrpce nije bilo moguće asignirati kao vrpce kalcijevih fosfata, iako je moguće da je zbog rasta na TiNW došlo do pomaka vrijednosti valnih brojeva pri kojima se javljaju. Nakon 7 dana pojavljuje se i vrpca na 1450 cm^{-1} karakteristična za vibraciju savijanja CO_3^{2-} grupe u B-tipu karbonat apatita.²⁹³ Navedene vrpce nisu detektirane nakon 14 i 21 dan, što može ukazivati na transformaciju metastabilnog CaP. Nakon 28 dana u spektru je vidljiv niz oštrih vrpce slabog intenziteta karakterističnih za hidroksiapatit i karbonatapatit: vrpca pri 1550 cm^{-1} karakteristična je za vibraciju savijanja CO_3^{2-} grupe u A-tipu karbonat apatita, vrpca pri 1465 cm^{-1} karakteristična za vibraciju savijanja CO_3^{2-} grupe u B-tipu karbonat apatita, vrpca pri 1055 cm^{-1} karakteristična je za ν_{3b} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze u PO_4^{3-} grupi i vrpca pri 1035 cm^{-1} karakteristična je za ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze u PO_4^{3-} grupi.²⁹³

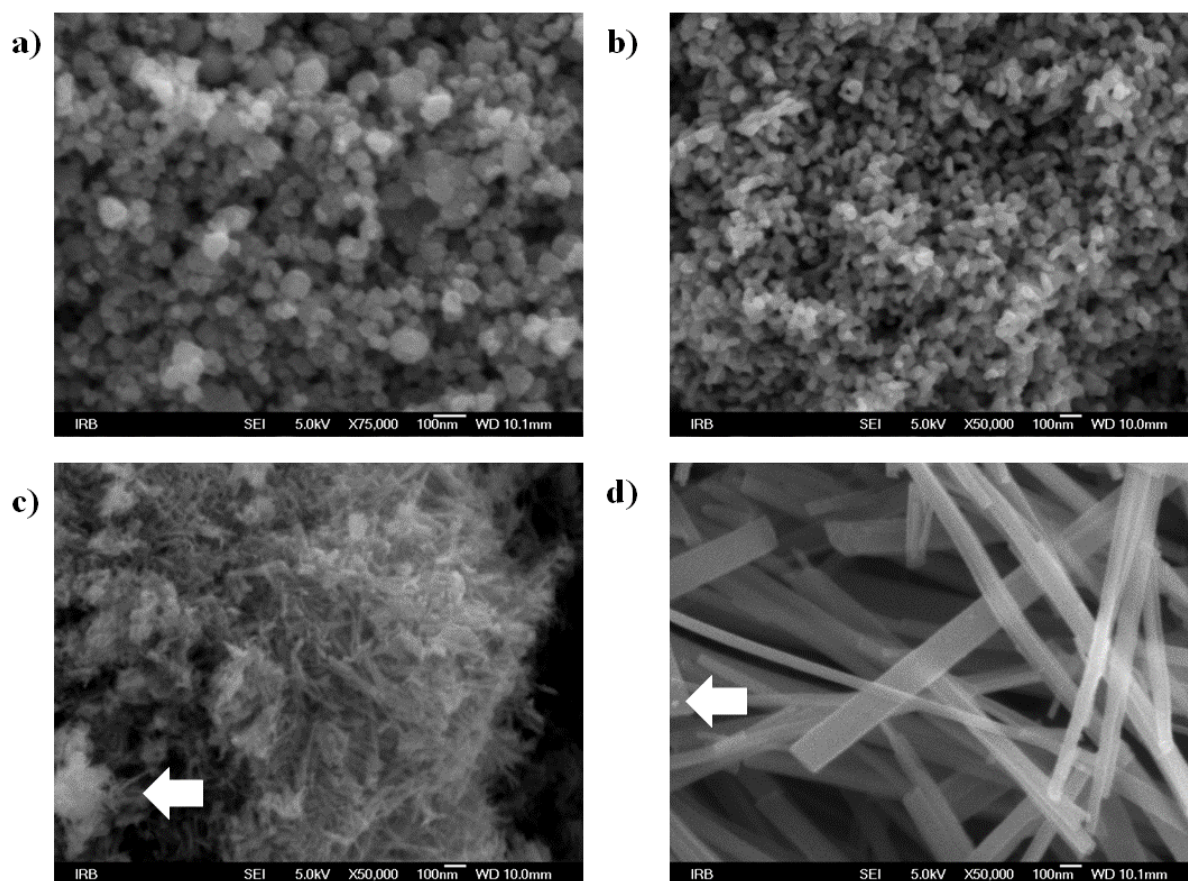


Slika 52. Difraktogrami praha TiO₂ nanočestica (TiNP), TiO₂ nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) nakon 1, 3, 7, 14, 21 i 28 dana inkubacije u SBF-u pri 25 °C. Strelicama su označeni difrakcijski maksimumi koji pripadaju kalcijevim fosfatima.



Slika 53. FTIR spektri TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) nakon 1, 3, 7, 14, 21 i 28 dana inkubacije u SBF-u pri 25 °C. Crvene strelice označuju apsorpcijske maksimume koji pripadaju kalcijevim fosfatima, a plave kalcijevim karbonatima.

Na SEM mikrografijama taloga nastalog nakon 28 dana inkubacije TiNP i TiNPI u SBF (slika 54 a i b) nisu primijećeni CaP. SEM mikrografije potvrđuju rezultate FTIR i PXRD analize te ukazuje da TiNP i TiNPI nisu sposobni inducirati nastajanje CaP u danim uvjetima. SEM mikrografije taloga nastalog nakon 28 dana inkubacije TiNT u SBF-u (slika 54 c) potvrđuju rezultate PXRD i FTIR analize. Listićavi kristali sporadično su uočeni na površini TiNT. Jednak trend uočen je i na SEM mikrografijama taloga nastalog nakon 28 dana inkubacije TiNW u SBF-u, gdje su uočeni sferični agregati CaDHA (slika 54 d).



Slika 54. SEM mikrografije a) TiO_2 nanočestica (TiNP), b) TiO_2 nanopločica (TiNPl), c) titanatnih nanocjevčica (TiNT) i d) titanatnih nanožica (TiNW) nakon 28 dana inkubacije u SBF pri 25 °C. Strelicama su označeni kalcijevi fosfati.

Na temelju PXRD, FTIR, i SEM analize moguće je zaključiti da izduženi titanatni nanomaterijali TiNT i TiNW imaju slabu sposobnost induciranja nastajanja CaP iz SBF-a. S druge strane, 1D TiO_2 nanomaterijali anatas strukture manjih dimenzija, TiNP i TiNPl, ne mogu inducirati nastajanje CaP u SBF-u. Iako postoje naznake na FTIR spektrima da potencijalno dolazi do nastajanja CaP, na SEM mikrografijama nisu uočeni CaP. Ukoliko i dolazi do nastajanja CaP na TiNP i TiNPl, nastala količina je toliko mala da se sposobnost ta dva nanomaterijala da induciraju nastajanje CaP iz SBF-a može zanemariti.

Prethodno objavljeni rezultati ukazuju da anatas ima najveću sposobnost induciranja nastajanja CaP. Dosadašnja istraživanja taloženja CaP iz SBF-a pokazala su da CaP ne nastaju na gelu amornog TiO_2 , dok gelovi anatas i rutil strukture induciraju nastajanje apatitnih faza na njihovoj površini. U tom slučaju, taloženje apatitnih faza izraženije je na gelovima anatas strukture nego na rutilnim.³¹⁵ Li i sur. predložili su mehanizam prema kojemu je nastajanje

apatita na titanatnim gelovima inducirano Ti–OH skupinama.³¹⁶ Upravo zato, amorfni materijali koji imaju manje Ti–OH skupina ne induciraju nastajanje apatita. Wu i Nancollas istraživali su nukleaciju različitih vrsta CaP na metalnim oksidima iz metastabilnih otopina. Slično kao Li i sur., pokazali su da anatas faza ima veću sposobnost induciranja taloženja apatita od rutila, čak i u otopinama koje nisu SBF.³¹⁷ Ta razlika posljedica je različitih površinskih svojstava anatas i rutil faze TiO₂. Točnije, anatas posjeduje veću vrijednost parametra površinske napetosti Lewisove baze. Upravo ovaj parametar smanjuje nukleacijsku barijeru potrebnu za nastajanje CaP na površini metala, stoga se CaP na površini anatasa taloži brže i u većoj količini. Ruso i sur. pokazali su da je za nastajanje apatitnih slojeva na TiO₂ nanočesticama bitna i orijentacija reaktivne kristalne plohe.³³ Naime, u slučaju TiO₂ materijala anatas faze, teorijski i eksperimentalno je dokazano da su {001} plohe u ravnotežnom stanju izrazito reaktivne.³¹⁸ No, one su zastupljene u manjem broju od manje reaktivnih {101}. Stoga su Ruso i sur. sintetizirali dekaedarske TiO₂ nanočestice anatas faze s visokim udjelom reaktivnih {001} ploha koje su favorizirale biomimetski rast amornog trikalcijevog fosfata već nakon prvog dana inkubacije u SBF.

Osim na nanočesticama, istraživanja induciranja taloženja CaP na TiNM napravljena su i na drugim oblicima. U novije vrijeme površina titanskih implantata modificira se slojem TiNT okomitih na površinu kako bi se poboljšala bioaktivnost implantata.^{20,21,24} Oh i sur. sintetizirali su hidroksiapatit (HAP) na kemijski modificiranim TiO₂ nanocjevčicama (TiNT).³¹⁹ Anodizacijom su pripremili sloj vertikalno orijentiranih TiNT na površini titanijeve pločice. Navedene TiNT tretirali su s NaOH kako bi im se povećala bioaktivnost čime na njihovoj površini nastaje sloj vlaknastih struktura natrijevih titanata koje induciraju nastajanje HAP iz SBF-a već nakon prvog dana. Inkubacija u duljem vremenskom periodu (2 - 5 dana) rezultira potpunom površinskom prekrivenosti HAP-om. Ukoliko se TiNT ne tretiraju s NaOH, vrijeme potrebno za nastajanje HAP-a produljuje se na 7 dana. U našim istraživanjima pokazano je da su TiNT pripremljene hidrotermalnom sintezom sposobne inducirati nastajanje CaP iz SBF-a već nakon prvog dana, bez potrebe za kemijskom modifikacijom TiNT kojom se povećava njihova bioaktivnost. No, nedostatak ovakvog načina taloženja je vrlo mala dobivena količina HAP. Međutim, do danas nije istražena i mineralizacija samih TiNT SBF-u.

Iako u znatno manjoj mjeri u odnosu na TiNP te TiNT, i TiNW se koriste u pripravi novih implantata za regeneraciju čvrstih tkiva, bilo kao površinska modifikacija^{320,321} ili kao 3D potporanj (engl. *scaffold*)³²². Istraživanja induciranja taloženja CaP na površinskom sloju

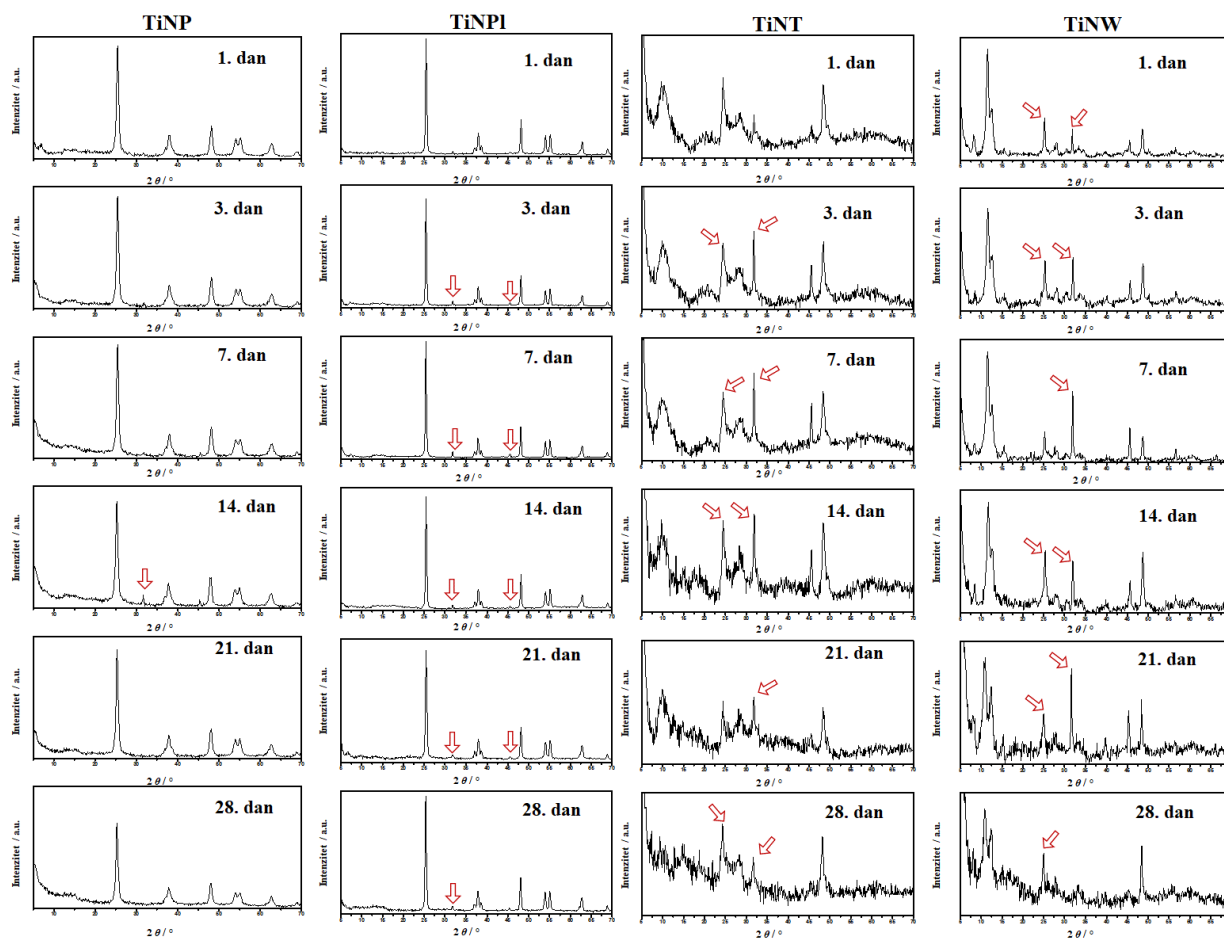
TiNW pokazala su da CaP nastaju nakon 12 h na TiNW anatas faze, ali taloženje nije primijećeno na titanatnim NW.³²¹ Istraživanja mineralizacije samih TiNW ili TiNPI u SBF-u nisu opisana u dostupnoj literaturi.

Dobiveni rezultati ukazuju na to da, osim kristalne faze TiNM, bitan parametar koji utječe na sposobnost TiNM da induciraju nastajanje CaP je i njihova morfologija. Izduženi titanatni nanomaterijali pokazuju vrlo slabu sposobnost induciranja nastajanja CaP u SBF-u. Slaba sposobnost induciranja nastajanja CaP može biti posljedica i vrlo malog zeta potencijala TiNM u SBF koji nije dovoljan za induciranje taloženja.

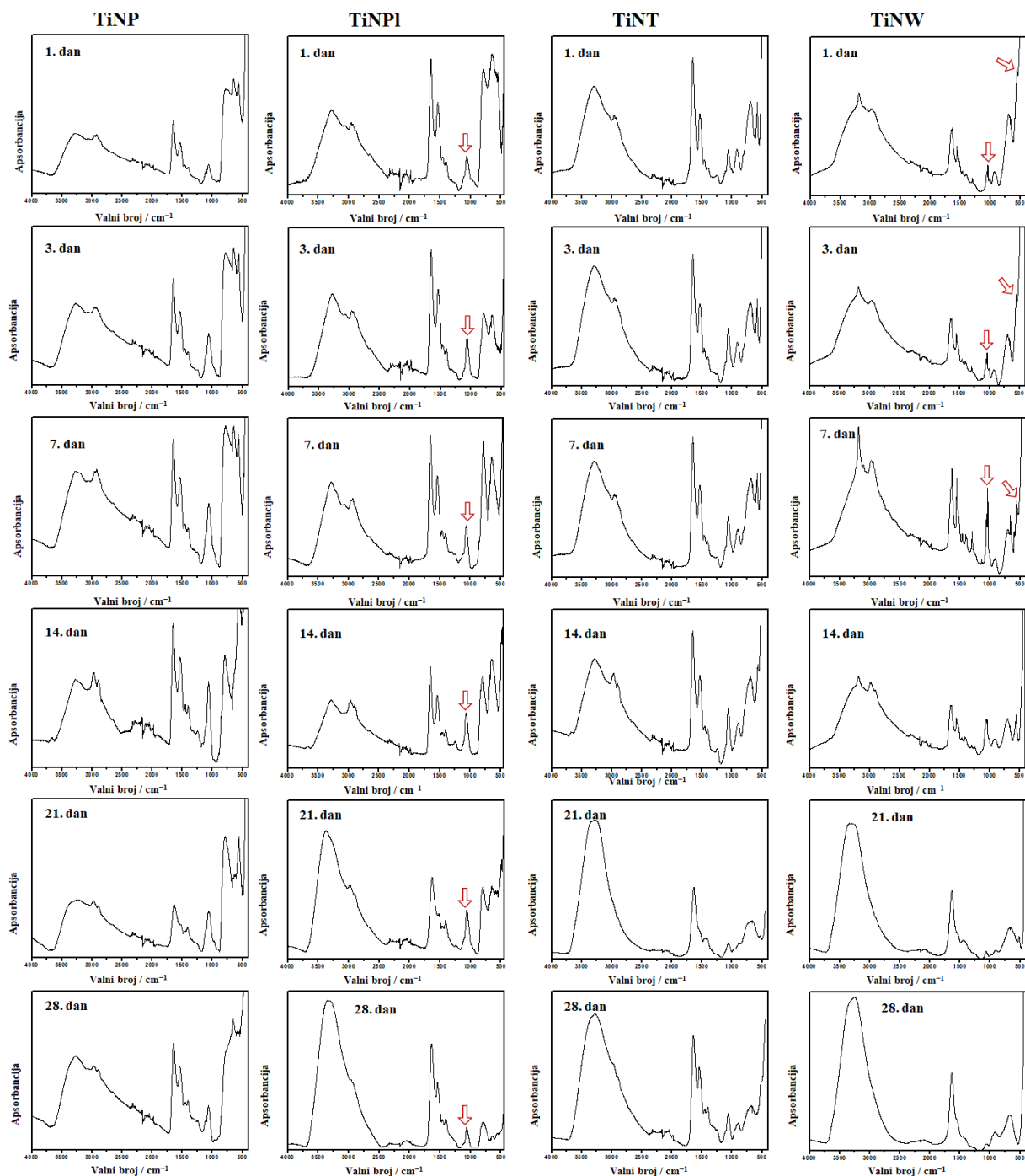
4.2.2. *Biomimetska sinteza kalcijevih fosfata na titanatnih nanomaterijala u simuliranoj tjelesnoj tekućini u prisutnosti albumina iz goveđeg seruma*

S obzirom da SBF sadrži samo anorganske ione krvne plazme, dodatak proteina korak je u približavanju fiziološkim uvjetima. Difraktogrami praha uzoraka dobivenih nakon različitih vremena inkubacije TiNM u SBF koji sadrži 5 g L⁻¹ BSA (1-28 dana) prikazani su na slici 55. Difraktogrami praha taloga nastalog nakon umakanja TiNP u SBF-u sadrže samo difrakcijske maksimume karakteristične za TiNP. U difraktogramima praha uzoraka dobivenih nakon različitih vremena inkubacije TiNPI i TiNT u SBF-u, difrakcijski maksimumi na oko 2θ 32° i 45°, karakterističan za CaDHA^{88,313}, pojavljuje se već nakon 3 dana. Navedeni difrakcijski maksimum se u difraktogramima praha dobivenih inkubacijom TiNW u SBF-u, javlja već nakon prvog dana inkubacije.

FTIR spektri taloga nastalog umakanjem TiNM u SBF koji sadrži BSA prikazani su na slici 56. FTIR spektri TiNP i TiNT sadrže samo vibracijske vrpce karakteristične za BSA (oko 1640, 1530, 1400, 1060 cm⁻¹). U FTIR spektrima taloga TiNPI nakon inkubiranja u SBF koji sadrži BSA pojavljuju se vibracijske vrpce karakteristične za BSA (oko 3280, 2950, 1630, 1540, 1400 cm⁻¹) i TiNPI (oko 790 i 660 cm⁻¹), a već nakon prvog dana uranjanja u SBF-u primjećuje se i vrpca pri oko 1060 cm⁻¹ karakteristična za CaDHA. Spektri taloga nastalog umakanjem TiNW u SBF s dodatkom BSA sadrže vibracijske vrpce karakteristične za BSA (oko 1640, 1560, 1420 cm⁻¹) i TiNW (oko 922 i 680 cm⁻¹). U FTIR spektrima već nakon prvog danja uranjanja u SBF-u primjećuje se apsorpcijski maksimumi CaDHA. Vrpca pri oko 560 cm⁻¹ karakteristična je za trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze, dok se nakon 14 dana javlja vrpca pri oko 1050 cm⁻¹ koja odgovara trostruko degeneriranom asimetričnom istezanju P–O.

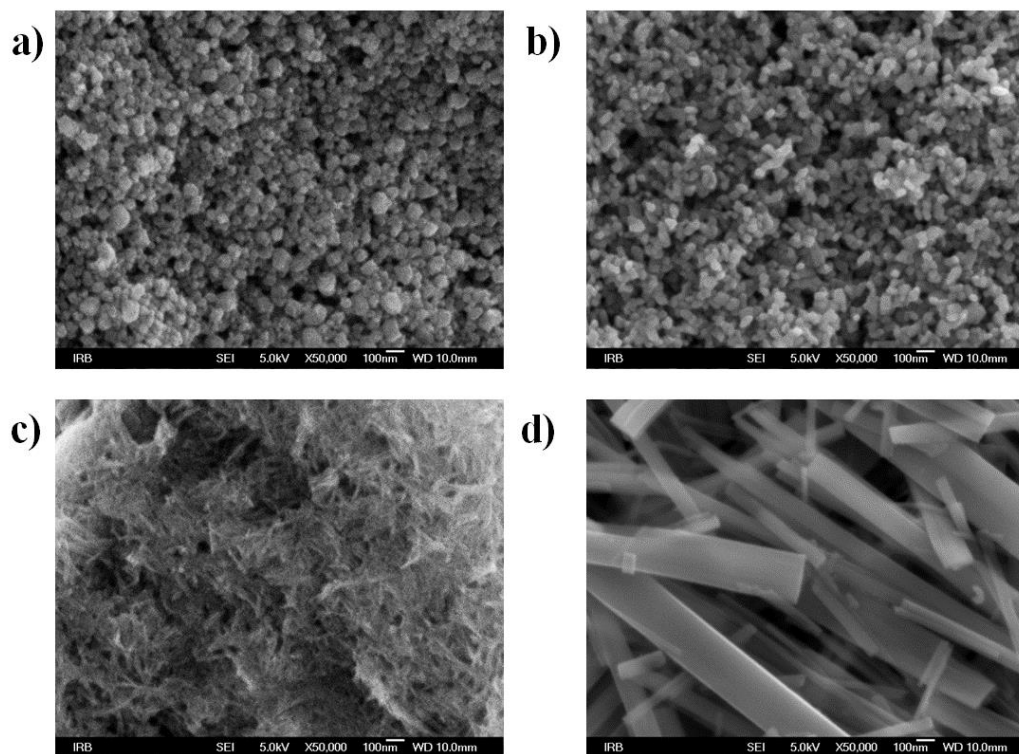


Slika 55. Difraktogrami praha TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) nakon 1, 3, 7, 14, 21 i 28 dana inkubacije u SBF-u koji sadrži 5 g L^{-1} albumina iz goveđeg seruma (BSA) pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Crvene strelice označuju difrakcijske maksimume koji pripadaju kalcijevim fosfatima.



Slika 56. FTIR spektri prahova TiO₂ nanočestica (TiNP), TiO₂ nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW) nakon 1, 3, 7, 14, 21 i 28 dana inkubacije u SBF-u koji sadrži 5 g L⁻¹ albumina iz goveđeg seruma pri 25 °C. Crvene strelice označuju apsorpcijske maksimume koji pripadaju kalcijevim fosfatima.

Na SEM mikrografijama taloga nastalog nakon 28 dana inkubacije TiNM u SBF-u koji sadrži 5 g L^{-1} BSA (slika 57) nisu vidljivi kristali CaP. Na temelju toga može se zaključiti da BSA ne doprinosi nastajanju CaP na TiNM u SBF-u.



Slika 57. SEM mikrografije a) TiO_2 nanočestica (TiNP), b) TiO_2 nanopločica (TiNPI), c) titanatnih nanocjevčica (TiNT) i d) titanatnih nanožica (TiNW) nakon 28 dana inkubacije u SBF koji sadrži 5 g L^{-1} albumina iz goveđeg seruma (BSA) pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Za razliku od induciranja taloženja CaP iz čiste otopine SBF, u modificiranoj verziji SBF-a koji sadrži BSA, SEM mikrografije nisu ukazale na prisutnost CaP čak niti na TiNT i TiNW. Stoga se može zaključiti da BSA ne doprinosi nastajanju CaP na TiNM iz SBF-a.

Inhibiranje taloženja CaP, uočeno je i u taložnim eksperimentima koji su uključivali revidirane tjelesne tekućine (rSBF). Dorozhkin i Dorozhkina proučavali su taloženje CaP do kojeg dolazi miješanjem rSBF otopina koje sadrže Ca^{2+} i PO_4^{3-} ione te promjene do kojih dolazi dodatkom BSA u rSBF.³²³ Taloženjem u SBF-u kojem nije dodan BSA, nastaju sferične čestice CaP-a. Dodatkom BSA dolazi do promjena u morfologiji CaP-a koje su najizraženije pri najvećim koncentracijama BSA. Osim promjene u morfologiji, i kristaliničnost dobivenih

taloga značajno se smanjuje te dolazi do paralelnog taloženja organske faze, odnosno BSA, na površini CaP.

Prema Kokubu, najvažniji korak u nastajanju CaP iz SBF-a je formiranje površinskih Ti-OH skupina koje međudjeluju s pozitivno nabijenim kalcijevim ionima.³¹¹ S obzirom da je BSA u otopini SBF pozitivno nabijena, moguće je da dolazi i do adsorpcije BSA na površinu TiNM što ometa nastajanje CaP. Adsorpcija BSA na površinu TiNM dokazana je FTIR analizom (slika 56) jer su na većini FTIR spektara vidljivi apsorpcijski maksimumi BSA. Osim toga, DLS i ELS analizom potvrđeno je da u SBF-u dolazi do adsorpcije proteina na površinu TiNM (tablica 21).

4.3. Biomimetska sinteza nanokompozita kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala taloženjem iz suspenzije

Nanokompoziti CaP i TiNM mogu se pripraviti induciranjem taloženja CaP iz SBF-a. No, korištenje ove metode sinteze CaDHA/TiNM ima nekoliko nedostataka što je pokazano u prethodnom poglavlju. Prvenstveno količinu istaloženog materijala i duljinu trajanja sinteze. Da bi se navedeni problemi riješili, CaDHA/TiNM kompozite moguće je pripremiti i taloženjem iz suspenzije. Za pripremu CaDHA/TiNM kompozita u obliku praha, mogu se koristiti različite metode. Među njima, posebno se ističu hidrotermalne sinteze provedene pod utjecajem visoke gravitacije²⁷ ili mikrovalnog zračenja²⁸, *in situ* taloženje pri visokim temperaturama²⁹, mehanokemijske sinteze³⁰ te sol-gel metode^{31,32}. No, navedene metode odvijaju se pri vrlo visokom temperaturama ili su vremenski vrlo duge te se ne odvijaju na ekološki prihvatljiv način.^{29,324} Salarian i sur. razvili su sol-gel metodu pripreme nanokompozita CaP i TiNM obradom superkritičnog fluida ugljikovim dioksidom čime se postiže rast nanopločica HAP-a na površini jednodimenzionalnih titanatnih štapića.³²⁴ U novije vrijeme sinteze koje se odvijaju pri temperaturama ispod 100 °C privlače pažnju za sintezu materijala temeljenih na CaP. Takve metode omogućuju bolju kontrolu istaložene faze CaP-a u koju se mogu ugraditi i biološki aktivne molekule, koriste jednostavne eksperimentalne postavke te su niske cijene.³²⁵ Sintezom pri niskim temperaturama te pH i I_c vrijednostima što bližim fiziološkim moguće je u nekoj mjeri oponašati nastajanje čvrstih tkiva u organizmima što se smatra dodatnom prednosti u razvoju optimalnog sintetskog puta.³²⁵ No, do sada su samo Enayatti-Jazi i sur. pripremili HAP/TiO₂ nanokompozite *in situ* taloženjem pri temperaturi 70 °C.²⁹

U prethodnom poglavlju pokazano je da induciranjem taloženja CaP iz SBF-a na TiNM niti nakon 28 dana inkubacije nije nastala dovoljna količina taloga. Stoga je u ovom poglavlju istražen drugi mogući biomimetski sintetski put, taloženje CaP u prisutnosti TiNM pri 25 °C. Kako se u fiziološkoj tekućini nalaze i druge organske molekule¹⁵⁵, u taložne sustave dodan je albumin iz goveđeg seruma kako bi se odredio utjecaj i biološki aktivnih molekula. S druge strane, u razvoju materijala za regeneraciju čvrstih tkiva često se koriste i polimeri kako bi se poboljšala njihova mehanička svojstva. U svrhu istraživanja utjecaja aditiva korištenih u proizvodnji implant materijala korišten je prirodni polimer, kitozan. Utjecaj aditiva, BSA i

kitozana, ispitan je i istovremenim dodatkom TiNM te se na taj način odredio utjecaj dvije vrste aditiva na kinetiku taloženja i svojstva nastale faze CaP.

Prema trenutno dostupnoj literaturi, istraživanja nastajanja kompozita CaP i TiNM pripremljenih taloženjem iz suspenzije pri sobnoj temperaturi nisu dostupna, dok istraživanja nastajanja CaP na različitim vrstama TiNM gotovo i nema. Stoga je u ovom poglavlju istražen utjecaj TiNM na taloženje CaP u vodenim otopinama pri sobnoj temperaturi. Određen je utjecaj TiNM na kinetiku taloženja te na svojstva istaloženog CaP na početku i na kraju taložnog procesa. Na taj se način postiže razumijevanje svakog koraka taložnog procesa.

4.3.1. Talozenje kalcijevih fosfata u prisutnosti titanatnih nanomaterijala

4.3.1.1. Utjecaj titanatnih nanomaterijala na kinetiku taloženja kalcijevih fosfata

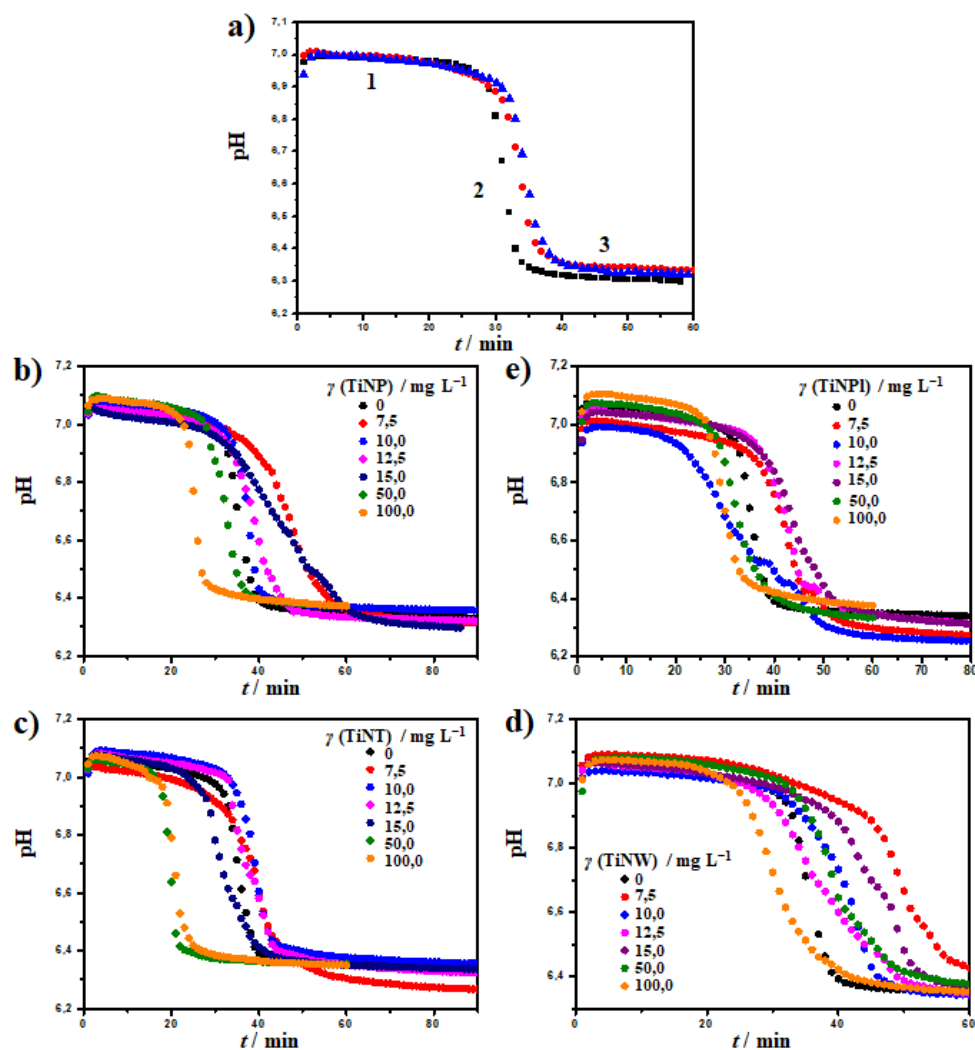
Napredovanje taloženja CaP-a moguće je, barem (semi)kvantitativno, pratiti mjereći promjenu pH vrijednosti taložnog sustava u vremenu. Na slici 58 prikazane su promijene pH vrijednosti taložnih sustava u vremenu za kontrolni sustav i za sustave u kojima su dodane različite koncentracije TiNM. Sve krivulje imaju karakterističan sigmoidalan oblik na kojima se mogu razlučiti tri karakteristična koraka taloženja koja su naznačena na slici 58 a.^{85,326,327}

U fazi 1 dolazi do neznatnog smanjenja pH vrijednosti za vrijeme čega nastaje amorfni prekursor. Pri tim reakcijskim uvjetima, pretpostavlja se da je prekursorska faza amorfni kalcijev fosfat (ACP), što je u skladu s prethodnim istraživanjima.^{85,328} Za vrijeme nastajanja prekursorske faze ne dolazi do značajnije promjene niti pH vrijednosti niti koncentracije kalcijevih iona.¹¹⁷ U fazi 2 dolazi do naglog pada pH vrijednosti što je posljedica deprotonacije H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} iona povezane s nastajanjem taloga, odnosno sekundarnim taloženjem kristalne faze.³²⁹ U posljednjem koraku dolazi do rasta i fazne transformacije pri čemu se pH vrijednost neznatno mijenja (Faza 3.).

Sve pH krivulje dobivene u prisutnosti TiNM imaju sličan sigmoidalan oblik kao i ona dobivena u kontrolnom sustavu što znači da prisutnost TiNM ne utječe na mehanizam nastajanja kristalne faze.^{88,330} Dobiveni rezultati u skladu su s nedavnim istraživanjima nastajanja i transformacije ACP-a u prisutnosti različitih aditiva u kojima je pokazano da se mehanizam nastajanja kristalne faze ne mijenja u prisustvu aminokiselina (Asp, Lys i Gly), magnezijevih i citratnih iona, kationskih i anionskih polielektrolita, fosforiliranih peptida, osteopontina itd.^{85,329,331,332} Primjer aditiva koji mogu utjecati na promjenu mehanizma

transformacije su površinski aktivne tvari (PAT).³²⁶ Razlika u ponašanju pripisana je činjenici da, za razliku od malih molekula čije je međudjelovanje s nastajućom čvrstom fazom primarno elektrostatske prirode, u slučaju PAT hidrofobna međudjelovanja također imaju značajnu ulogu.³²⁶

Razlika u brzini promjene pH vrijednosti u prisutnosti ACP i nastajanju kristalne faze omogućuje određivanje vremena indukcije sekundarnog taloženja (t_{ind}). Ta veličina koristi se kao indikator stabilnosti ACP faze. Smatra se da što je t_{ind} veće i ACP faza je stabilnija.^{85,332} Vremena indukcije kontrolnog sustava i sustava s različitim koncentracijama TiNM dana su u tablici 22. TiNM pokazuju zanimljiv utjecaj na vrijeme indukcije kontrolnog sustava. U prisutnosti svih TiNM u rasponu koncentracija 7,5 – 15,0 mg L⁻¹ dolazi do povećanja t_{ind} vrijednosti u odnosu na kontrolni sustav. U takvim slučajevima TiNM se ponašaju kao inhibitori taložnog procesa te stabiliziraju amorfnu fazu. No, pri većim koncentracijama, 50 i 100 mg L⁻¹, TiNM postaju promotori taložnog procesa, ubrzavaju nastajanje kristalne faze na što ukazuje manja vrijednost t_{ind} . Takvo ponašanje suprotno je ponašanju opaženom u slučaju dodatka polielektrolita, koji pri manjim koncentracijama promoviraju, a pri većim inhibiraju transformaciju ACP.^{117,330,333} Dvojako ponašanje posljedica je njihove fleksibilne strukture. Smatra se da se pri malim koncentracijama polielektroliti reverzibilno adsorbiraju na čestice ACP-a u nasumičnoj konformaciji. Na taj način nastaje velik broj čestica ACP-a velikog naboja na čiju se površinu adsorbiraju kalcijevi ili fosfatni ioni suprotnog naboja čime nastaju učinkovita mjesta sekundarne nukleacije.¹¹⁷ Pri velikim koncentracijama polielektroliti omotavaju čestice ACP-a sprječavajući transport iona, a time i sekundarnu nukleaciju. Za razliku od polielektrolita, TiNM nisu fleksibilni već je njihova struktura rigidna.



Slika 58. Reprezentativne pH krivulje a) kontrolnog sustava i sustava u kojima su dodane b) TiO_2 nanočestice (TiNP), b) TiO_2 nanopločice (TiNPI), c) titanatne nanocjevčice (TiNT) i d) titanatne nanožice (TiNW). $c_{\text{poč}}(\text{CaCl}_2) = c_{\text{poč}}(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.

Ukoliko se usporedi utjecaj pojedinih TiNM na kinetiku taloženja CaP (tablica 22) može se primijetiti kako su TiNT najučinkovitiji promotori transformacije amorfnе faze. Razlike između ostalih TiNM nisu značajne što ukazuje na moguću utjecaj specifične površine. Zeta potencijal svih vrsta TiNM u anionskoj komponenti taložnog medija relativno je sličan (tablica 9). No, TiNT imaju najveću specifičnu površinu što posljedično znači da imaju i puno više reakcijskih skupina na svojoj površini u odnosu na druge nanomaterijale. Dobiveni rezultati ukazuju na utjecaj površinskih svojstava TiNM na kinetiku taloženja CaP.

Tablica 22. Vrijeme indukcije (t_{ind}) u kontrolnom sustavu i sustavima s različitim koncentracijama TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPl), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW). $c_{\text{poč}}(\text{CaCl}_2) = c_{\text{poč}}(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.

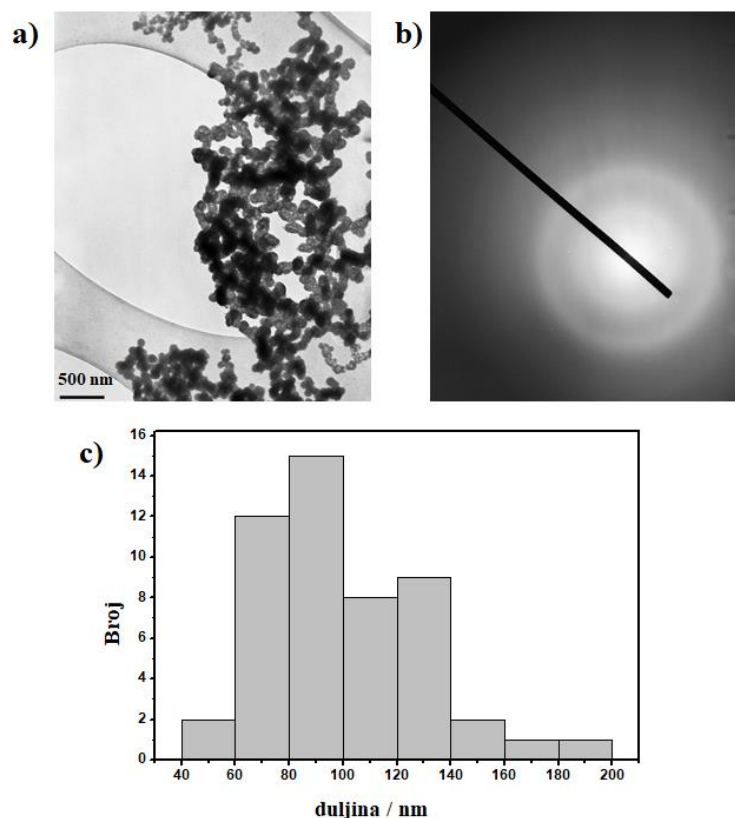
$\gamma(\text{TiNM}) / \text{mg L}^{-1}$	$t_{\text{ind}} / \text{min}$			
	TiNP	TiNPl	TiNT	TiNW
0*	29,4±3,2			
7,5	38,8±1,3	36,4±2,0	33,8±0,5	36,4±4,0
10,0	30,6±4,0	35,0±4,8	35,8±3,1	33,7±2,4
12,5	32,6±1,4	35,8±2,7	32,0±3,0	24,1±4,5
15,0	32,6±2,5	36,1±1,0	26,6±2,0	36,9±2,3
50,0	28,4±0,8	27,1±0,6	17,4±0,9	29,2±1,3
100,0	22,4±1,2	25,3±0,9	17,9±2,0	23,2±1,6

*kontrolni sustav, bez dodatka TiNM

4.3.1.2. Utjecaj titanatnih nanomaterijala na svojstva amorfne faze

Potenciometrijskim praćenjem napredovanja taložne reakcije, ustanovljeno je da se taloženje CaP odvija preko prekursorske faze. Kako bi se odredila svojstva te faze, analiziran je sastav taloga dobivenog nakon 10 min taloženja. S obzirom da nakon tako kratkog vremena nastaje samo vrlo mala količina taloga, provedena je samo TEM i SEAD analiza.

U kontrolnom sustavu nastali su lančasti agregati sferičnih čestica tipični za ACP (slika 59 a).^{85,326,334} Elektronskom difrakcijom s odabrane površine (SAED) potvrđeno je da se radi o amorfnom CaP (slika 59 b). Prosječna veličina sferičnih čestica ACP iznosi $99,5 \pm 29,4 \text{ nm}$ (slika 59 c).



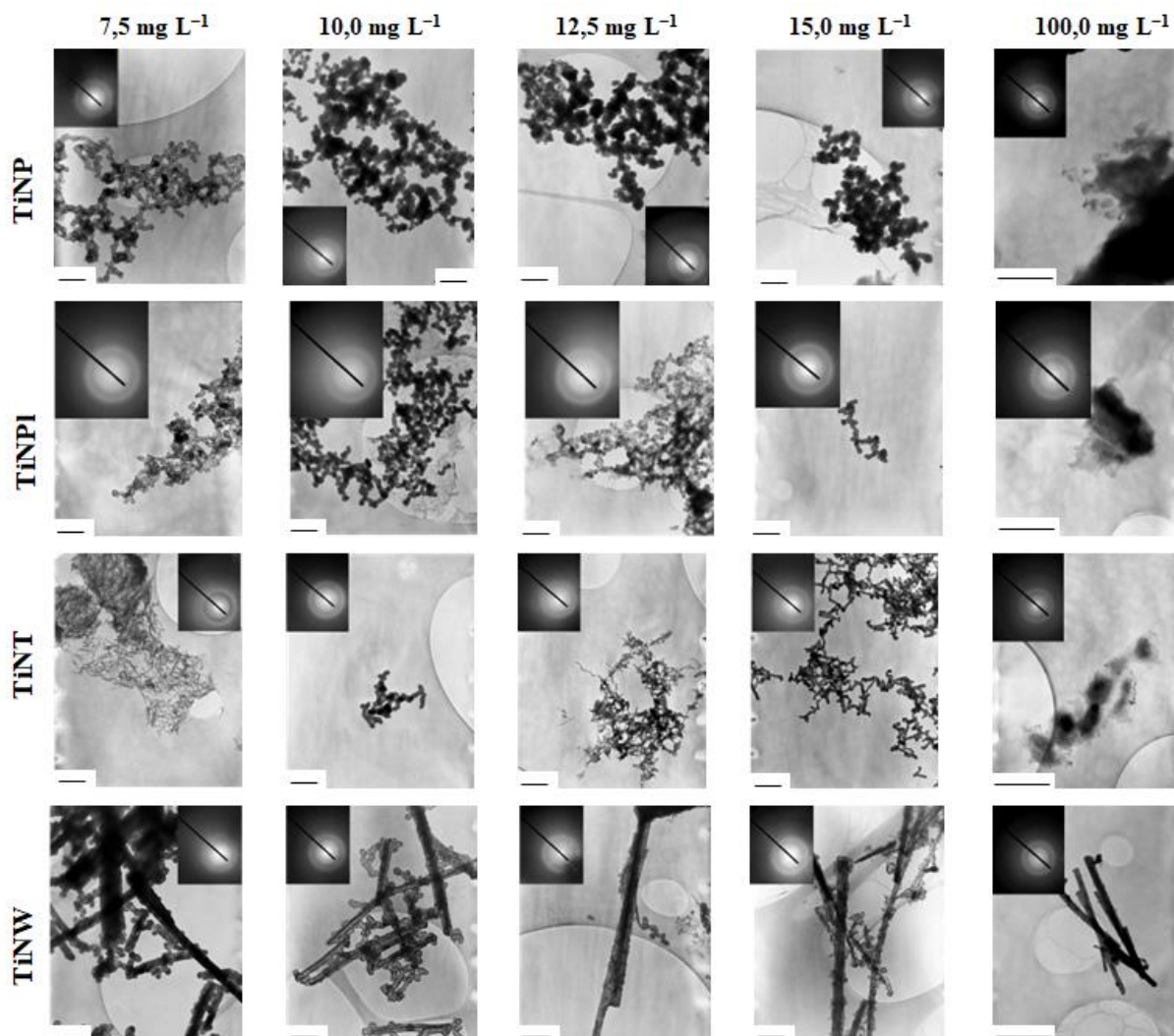
Slika 59. a) TEM mikrografije, b) elektronska difrakcija u odabranom području (SAED) i c) raspodjela veličina čestica ACP nastalih nakon 10 minuta u kontrolnom sustavu: $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.

Na slici 60 prikazane su TEM mikrografije taloga nastalih nakon 10 min u sustavima u prisutnosti TiNM koncentracija 7,5 do 100 mg L^{-1} . Pri svim istraženim koncentracijama TiNP i TiNPI nastali su lančasti agregati sferičnih čestica ACP. Pri nižim koncentracijama postaje vidljivo da su TiNP i TiNPI ugrađene u nastale agregate, dok pri najvećoj istraženoj koncentraciji sferične čestice ACP-a nastaju na njihovoj površini (slika 60 a i b). SAED je potvrdio da pri najmanjim koncentracijama TiNP i TiNPI nastaje ACP. Pri većim koncentracijama TiNP na SAED-ima je vidljiva difrakcija s nanomaterijala.

Pri najmanjim istraženim koncentracijama TiNT i TiNW vidljive su cjevčice i žice s pojedinačnim sferičnim česticama ACP (slika 60 c i d). Pri svim većim istraženim koncentracijama TiNT nastaju lančasti agregati izduženih čestica, a pojedinačne sferične čestice ili njihovi agregati nisu vidljivi. To ukazuje da ACP gotovo isključivo nastaje na površini TiNT. ACP nastaje i na površini TiNW, ali s obzirom na veličinu TiNW, pojavljuje se u obliku pojedinačnih sferičnih čestica na površini. SAED je potvrdio da pri najmanjim

koncentracijama TiNT i TiNW nastaje ACP, dok je pri većim koncentracijama vidljiva difrakcija s nanomaterijala. Također, zbog vrlo male vrijednosti t_{ind} , moguće je da je na TEM slikama u prisutnosti 100 mg L^{-1} već uočena transformacija ACP-a u stabilniju fazu. Treba primijetiti da koncentracije pri kojima dolazi do nastajanja ACP-a na površini TiNM na TEM mikrografijama, odgovaraju koncentracijama pri kojima se počinju ponašati kao promotori transformacije ACP faze.

Transformacija ACP-a u stabilnije faze CaP može se odviti različitim mehanizmima⁷⁹ kao što su otapanje ACP-a i taloženje kristalne faze, preuređenjem strukture^{335–338}, sređivanjem dugog dosega strukture bez promjene u lokalnoj okolini Ca^{2+} iona³³⁹ nastajanjem kristalne faze direktno unutar ACP faze³⁴⁰ ili samoudruživanjem te površinskom transformacijom ACP-a^{341,342}. Također, neki od navedenih procesa mogu se odvijati istovremeno.⁷⁹ Nedavno su Wang i sur. dokazali da se kristalne domene razvijaju iz ionskih parova i/ili klastera na više mjesta unutar amorfne čestice.³⁴⁰ Na temelju TEM mikrografija može se zaključiti da su pri manjim koncentracijama TiNM dispergirane unutar lančastih agregata sferičnih čestica ACP. Navedeno opažanje može upućivati na to da se TiNM ponašaju kao inhibitori sprječavajući kristalizaciju unutar ACP čestica nastalih u otopini. Pri većim koncentracijama, čestice ACP-a prvenstveno nastaju na površini TiNM te se oni ponašaju kao promotori. Također, površina TiNM može biti dobar supstrat za rast kristalne faze zbog velikog negativnog zeta potencijala kojeg TiNM čestice posjeduju u anionskoj komponenti taložnog medija.



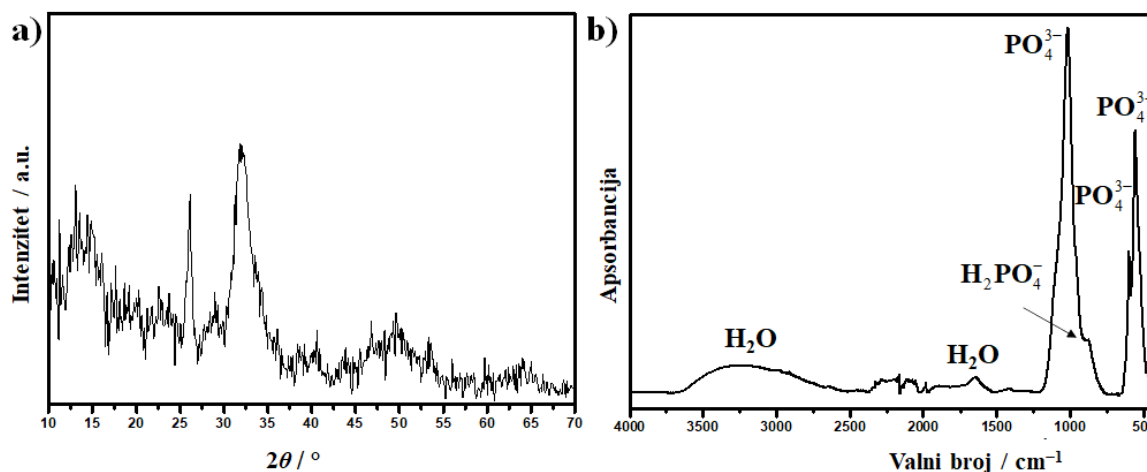
Slika 60. TEM mikrografije taloga nastalih nakon 10 min u sustavima koji sadrže TiO_2 nanočestice (TiNP), TiO_2 nanopločice (TiNPI), titanatne nanocjevčice (TiNT) i titanatne nanožice (TiNW). Skala na mikrografijama koncentracija do 15 mg L^{-1} iznosi 500 nm , a na mikrografijama koncentracije 100 mg L^{-1} iznosi $1 \mu\text{m}$.

4.3.1.3. Utjecaj titanatnih nanomaterijala na svojstva kristalne faze

Iz pH krivulja (slika 58) vidljivo je da je transformacija ACP-a u kristalnu fazu u potpunosti završena nakon 60 min. Da bi se odredila svojstva kristalne faze, talog nastao nakon 60 min odfiltriran je i analiziran FTIR, PXRD, SEM, TGA i EPR metodama.

Difraktogram praha i FTIR spektar taloga nastalog u kontrolnom sustavu nakon 60 minuta dani su na slici 62, a asignacije opaženih vibracijskih vrpca dane su u tablici D.8.1. U difraktogramu praha opažena su dva difrakcijska maksimuma pri 2θ $26,00^\circ$ i $32,09^\circ$ karakteristična za kalcij – deficijentni hidroksiapatit (CaDHA , $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$,

$0 < x < 1$).^{79,313} FTIR spektar sadrži vrpce karakteristične za istežanje fosfatnih grupa i molekula vode. Vrpce asimetričnog istežanja PO_4^{3-} grupe opažene su pri 1104 i 1017 cm^{-1} , a vrpce vibracija savijanja pri 592 i 561 cm^{-1} . Vrpca pri 868 cm^{-1} odgovara vibraciji $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ grupe. Široka vrpca pri 3631 – 2518 cm^{-1} i vrpca pri 1636 cm^{-1} odgovaraju vibracijama molekula vode.²⁹³

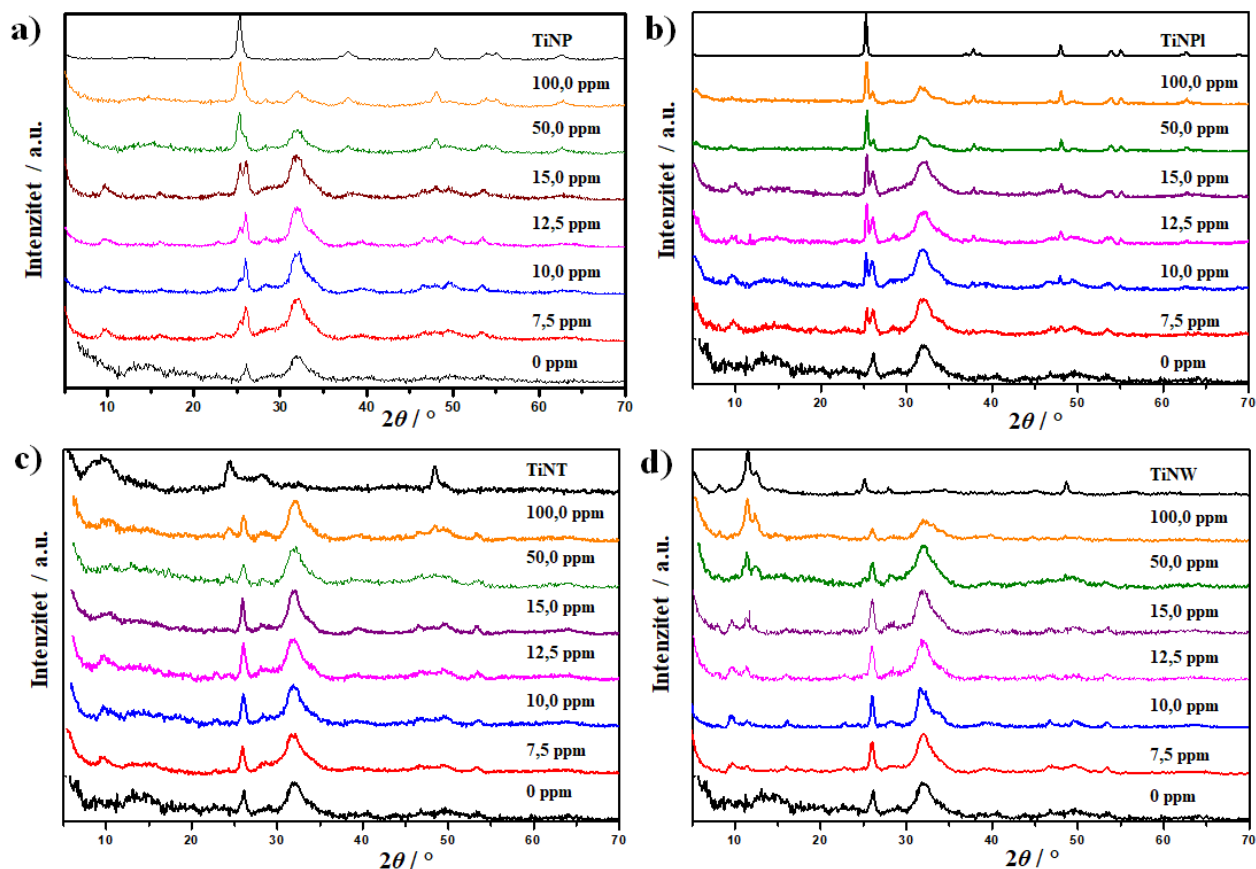


Slika 61. a) Difraktogram praha i b) FTIR spektar taloga nastalog nakon 60 min u kontrolnom sustavu: $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.

U difraktogramima praha taloga nastalih u prisutnosti TiNM nakon 60 minuta (slika 62, tablica D.8.2., D.8.4, D.8.6. i D.8.8.) javljaju se difrakcijski maksimumi karakteristični za CaDHA pri 2θ oko 26,0° i 32,0°. Osim navedenih, pojavljuju se i difrakcijski maksimumi pri 2θ oko 28,6°, 39,1°, 46,7°, 49,6° i 53,5° također karakteristični za CaDHA.^{79,313} To ukazuje da je CaDHA nastao u prisutnosti TiNM više kristaliničan od onog nastalog u kontrolnom sustavu.

Uz navedene difrakcijske maksimume CaDHA, u difraktogramima praha TiNP i TiNPI javljaju se i maksimumi karakteristični za anatas pri 2θ oko 25,3°, 38,0°, 48,0°, 53,9°, 55,2° i 62,7°.³³ U difraktogramima praha taloga nastalih u prisutnosti TiNT nakon 60 minuta, uz difrakcijske maksimume CaDHA, vidljivi su difrakcijski maksimumi karakteristični za slojevite titanate. Široki difrakcijski maksimum pri 2θ oko 9,75° karakterističan za TiNT detektiran je i pri najnižim koncentracijama, dok su maksimumi pri 2θ oko 24,4°, 28,6° i 48,4°, također karakteristični za TiNT, opaženi samo pri većim koncentracijama. U difraktogramima praha taloga nastalih u prisutnosti TiNW nakon 60 minuta, uz difrakcijske maksimume CaDHA, vidljivi su i difrakcijski maksimumi karakteristični za TiNW, odnosno $\text{TiO}_2(\text{B})$ fazu.

Difrakcijski maksimumi pri 2θ oko $11,2^\circ$ i $12,4^\circ$ karakteristični za TiNW detektirani su u difraktogramima praha taloga nastalog u prisutnosti najvećih koncentracija TiNW.



Slika 62. Difraktogrami praha taloga nastalih nakon 60 min u sustavima koji su sadržavali različite koncentracije a) TiO_2 nanočestica (TiNP), b) TiO_2 nanopločica (TiNPI), c) titanatnih nanocjevčica (TiNT) i d) titanatnih nanožica (TiNW). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25°C .

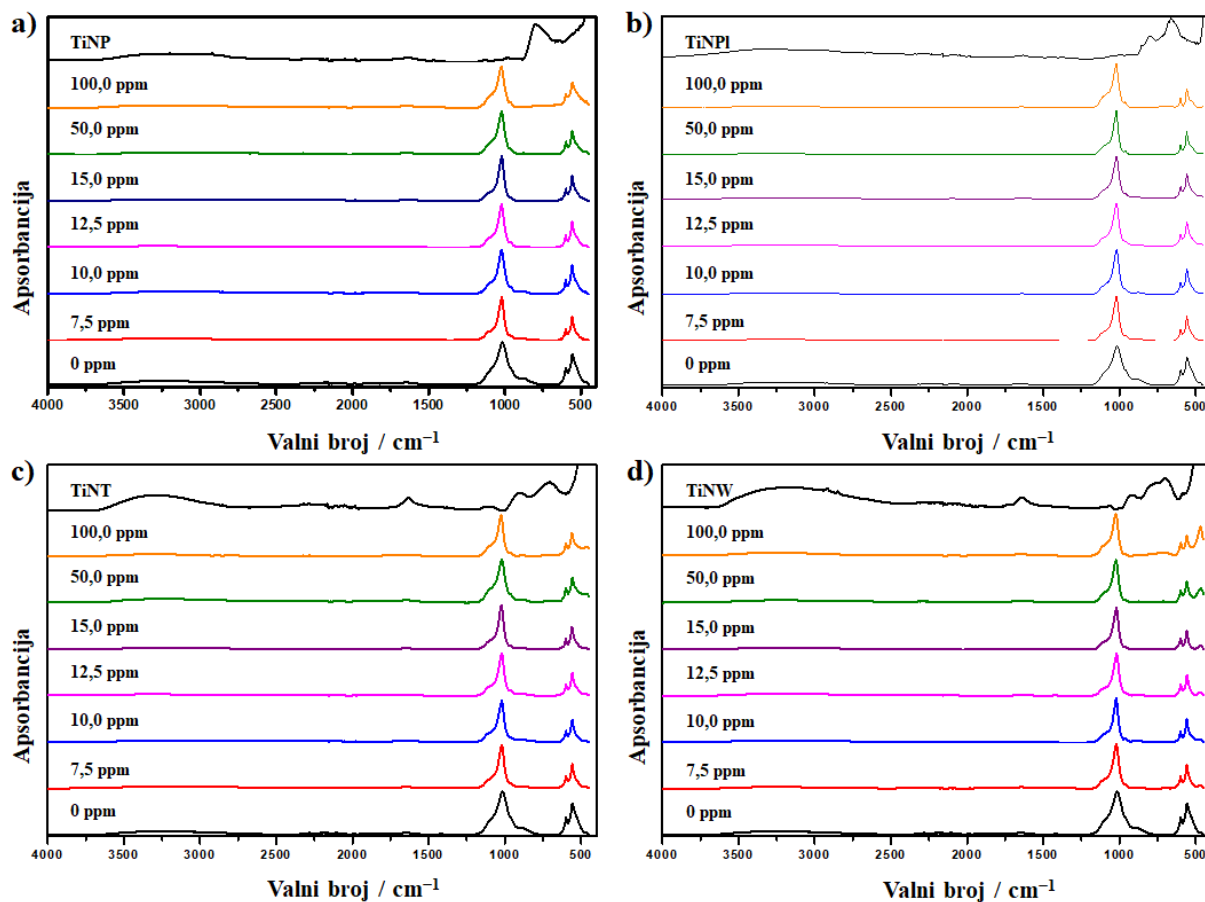
Iz difraktograma praha kompozita dobivenih pri različitim koncentracijama TiNM, moguće je izračunati i veličinu kristalita. U prisutnosti svih nanomaterijala, dolazi do povećanja veličine kristalita u odnosu na kontrolni sustav (tablica 23). Kristaliti najvećih dimenzija nastali su u prisustvu anatas TiNM. Zanimljivo, u slučaju TiNP najveća veličina kristalita određena je pri koncentracijama $10,0 - 15,0 \text{ mg L}^{-1}$, a u slučaju TiNPI pri koncentracijama 50 i 100 mg L^{-1} što ukazuje na različit utjecaj morfologije TiNM.

Tablica 23. Veličina kristalita kalcij – deficijentnog hidroksiapatita (CaDHA) nastalog u kontrolnom sustavu i u sustavima s različitim koncentracijama TiO₂ nanočestica (TiNP), TiO₂ nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

$\gamma(\text{TiNM}) / \text{mg L}^{-1}$	Veličina kristalita / nm			
	TiNP	TiNPI	TiNT	TiNW
0		2,70		
7,5	3,98	2,90	2,74	3,35
10,0	5,11	3,00	3,21	4,16
12,5	4,58	3,22	3,43	3,21
15,0	4,32	2,98	4,50	3,97
50,0	3,79	4,73	3,19	2,95
100,0	2,92	4,50	3,45	2,63

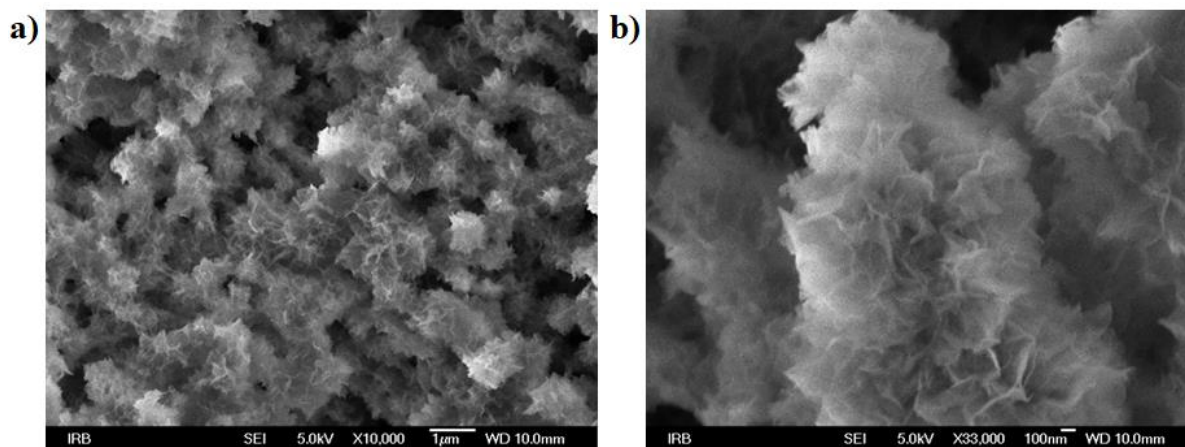
FTIR spektri taloga nastalih nakon 60 min u prisutnosti TiNM prikazani su na slici 63, dok je asignacija FTIR spektara dana u tablicama D.8.3, D.8.5., D.8.7. i D.8.9. FTIR analiza potvrđuje rezultate PXRD, TiNM ne utječu na sastav istaloženih CaP. Uz vrpce karakteristične za vibracije fosfatne grupe i molekule vode opažene u FTIR spektrima kontrolnog sustava (slika 61 b), opažena su i vrpce pri 957 cm^{-1} karakteristična za ν_1 nedegenerirano simetrično istežanje P–O veze (PO_4^{3-}).²⁹³

Osim utjecaja na svojstva i strukturu istaložene faze, za razumijevanje nastajanja kompozitnih materijala CaP i TiNM vrlo je bitno odrediti i utjecaj TiNM na morfologiju CaP. Upravo zato snimljene su SEM mikrografije istaloženih nanokompozita, pri različitim koncentracijama TiNM.



Slika 63. FTIR spektri praha taloga nastalih nakon 60 min u sustavima koji su sadržavali različite koncentracije a) TiO_2 nanočestica (TiNP), b) TiO_2 nanopločica (TiNPI), c) titanatnih nanocjevčica (TiNT) i d) titanatnih nanožica (TiNW). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

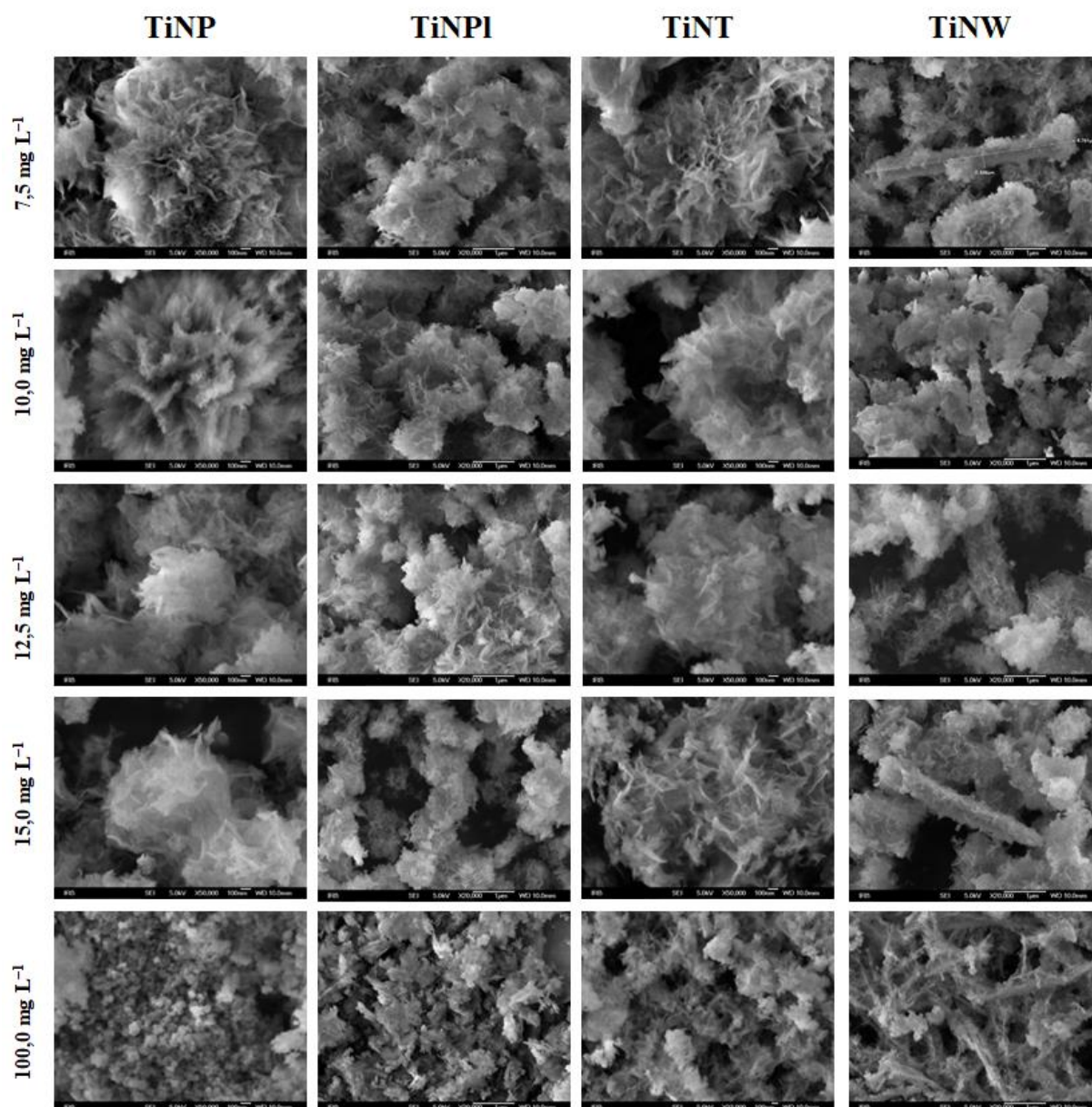
SEM mikrografije kontrolnog sustava (slika 64) pokazuju da su nastali sferični agregati tankih listićavih kristala tipičnih za CaDHA.³⁴³ Iako je moguće pripremiti CaDHA različitih morfologija poput nanožica i nanocjevčica metodom elektrodepozicije³⁴⁴, CaDHA sintetiziran biomimetskim metodama morfologije je listićavih kristala.³⁴⁵



Slika 64. SEM mikrofografije pri a) manjem i b) većem povećanju taloga nastalog nakon 60 min u kontrolnom sustavu: $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.

SEM mikrofografije (slika 65) pokazuju da su listićavi kristali CaDHA nastali na površini TiNM što ukazuje da TiNM mogu biti heterogeni nukleusi za nastajanje CaP i u skladu je s TEM mikrofografijama taloga nastalih nakon 10 minuta. U slučaju taloženja u prisutnosti TiNP i TiNT kristali CaDHA manje su agregirani nego u kontrolnom sustavu već pri najmanjim koncentracijama. No, za razliku od kontrolnog sustava, nastaju veći agregati. SEM mikrofografije taloga nastalog u prisutnosti TiNW i TiNPI pokazuju da su, ovisno o mjestu nastajanja, kristali CaDHA istaložili u dvije morfologije. U otopini nastaju sferični agregati listićavih kristala CaDHA slični onima nastalim u kontrolnom sustavu. Na površini TiNW i TiNPI nastaje sloj listićavih kristala CaDHA. Očekivano, s povećanjem koncentracije TiNW i TiNPI, smanjuje se količina kristala CaDHA nastalih u otopini.

Delima i sur. pripremili su kompozitne materijale kalcijevih fosfata (smjesa HAP i β -TCP faze) te TiO_2 nanočestica različitih masenih udjela, 1 i 5 %.³⁴⁶ Na temelju PXRD i SEM analize dobili su rezultate slične prikazanim u ovom poglavlju. Naime, TiO_2 nanočestice nisu utjecale na sastav istaložene faze kalcijevih fosfata, koja je i u prisutnosti TiO_2 nanočestica bila smjesa HAP i β -TCP faze. SEM mikrofografije nisu ukazale na utjecaj TiO_2 nanočestica na morfologiju CaP.



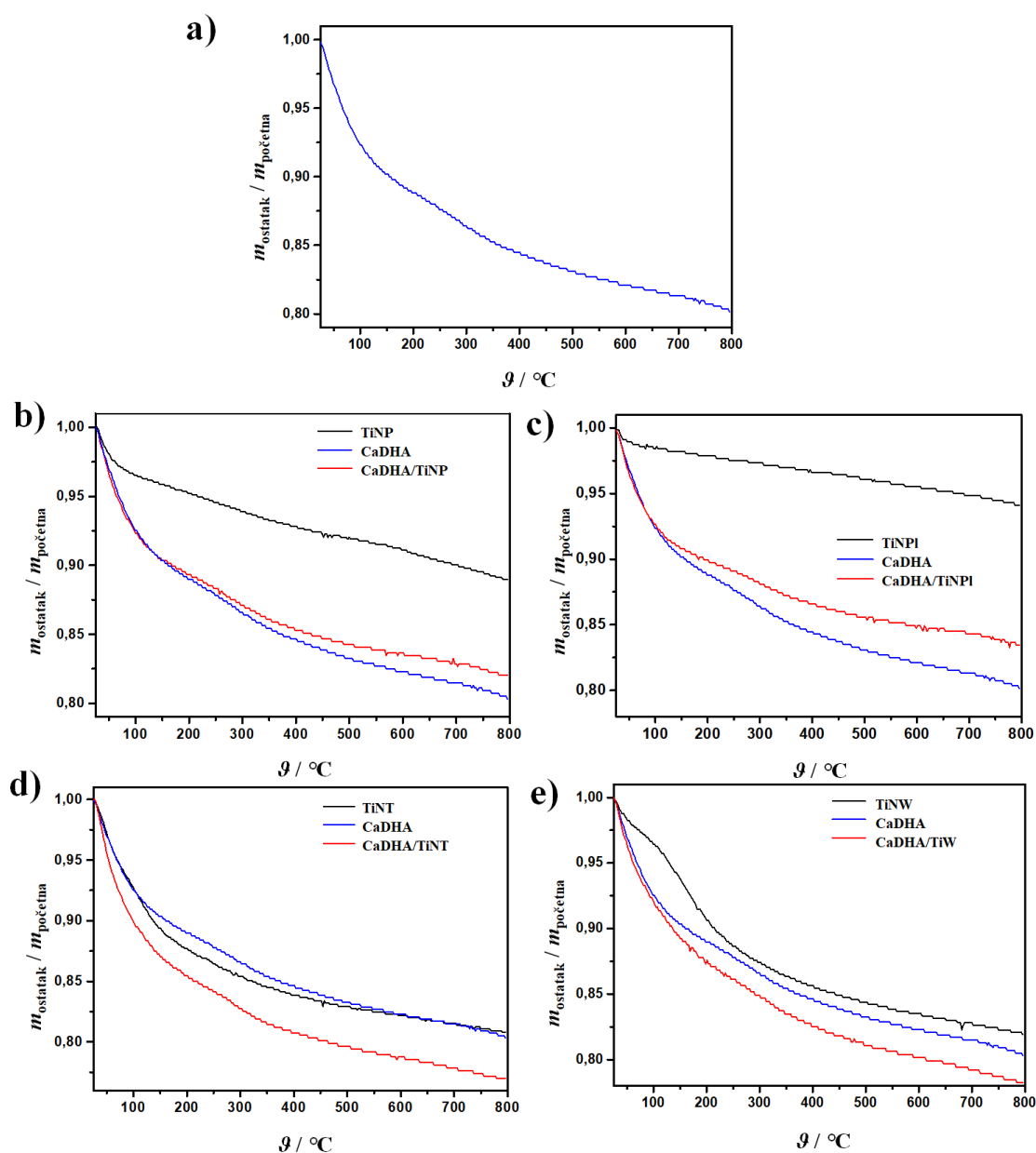
Slika 65. SEM mikrografije taloga nastalih nakon 60 min u sustavima koji sadrže TiO₂ nanočestice (TiNP), TiO₂ nanopločice (TiNPI), titanatne nanocjevčice (TiNT) i titanatne nanožice (TiNW).

Kako bi se u potpunosti okarakterizirali CaDHA/TiNM kompoziti i time što detaljnije odredio utjecaj TiNM na taloženje CaP, napravljene su BET, TGA i EPR analize. Za navedene analize odabrani su CaDHA/TiNM kompoziti dobiveni u prisutnosti najveće koncentracije TiNM kako bi količina CaDHA istaloženog u otopini bila što manja.

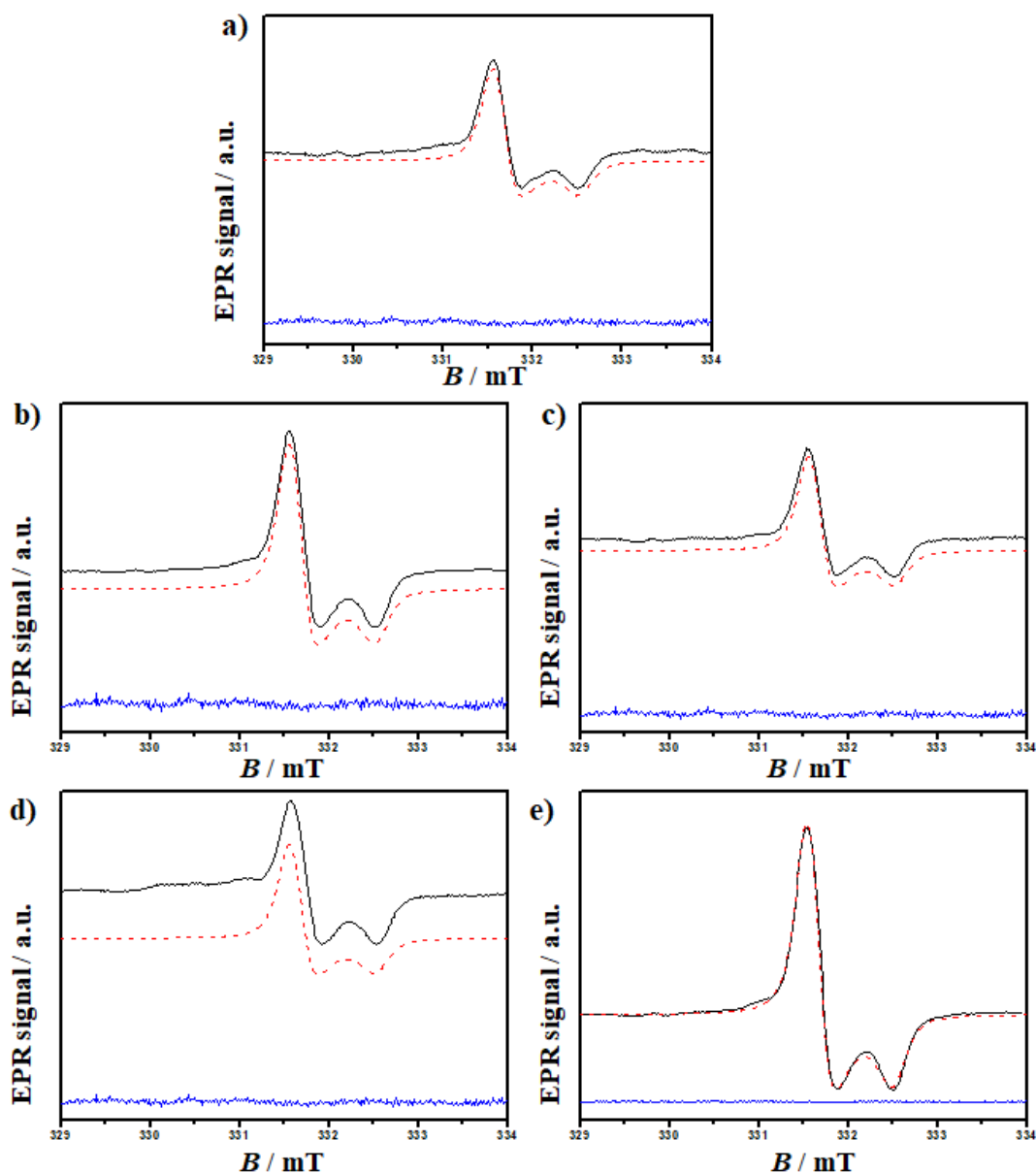
TGA krivulja kontrolnog sustava (slika 66 a) ukazuje na 3 područja različite brzine gubitka mase. Gubitak mase od 9 % do 126 °C može se pripisati gubitku vode, dok se daljnja dva gubitka pri višim temperaturama (5 % do 323 °C i 6 % do 800 °C) mogu pripisati razgradnji CaDHA. Razgradnja CaDHA odvija se u dva koraka čime u konačnici nastaje smjesa HAP i β -TCP.^{347,348}

TGA krivulje taloga nastalog nastalih nakon 60 minuta u sustavima s dodatkom 100 mg L⁻¹ TiNM prikazane su slici 66. Oblikom su slične krivulji CaDHA. U termogramu uzoraka koji sadrže TiNP i TiNPI, do odstupanja dolazi pri temperaturama iznad 150 °C. Također je i ukupni gubitak mase manji od onog za CaDHA, što ukazuje na prisutnost TiNP ili TiNPI u uzorku. Ukupni gubitak uzorka koji sadrži TiNT i TiNW pokazuje gubitak mase za 3 % odnosno 2 % veći u odnosu na CaDHA. Navedeno može biti posljedica veće količine vode adsorbirane tokom taloženja koja je vidljiva u FTIR spektrima nanokompozita koncentracija 100 mg L⁻¹.

EPR spektri CaDHA/TiNM kompozita su snimljeni kako bi se detektirala promjena lokalne strukture CaDHA kao posljedice taloženja u prisutnosti TiNM. Očekivano, prije zračenja kontrolni sustav ne pokazuje EPR signal kao što je prikazano na slici 67 a. Izostanak EPR signala također pokazuje da CaDHA dobiven u kontrolnom sustavu ne sadrži nečistoće u obliku metalnih iona ili radikala. Kako bi se pratila promjena u mikrookolišu uzoraka, korišteni su zračenjem inducirani EPR centri. EPR spektar kontrolnog sustava sastoji se od aksijalno simetričnog signala koji pripada CO₂ koji se može opisati sljedećim vrijednostima g tenzora: ($g_{\perp}=2.0025$ i $g_{\parallel}=1.9971$). To je pokazano i simulacijom koja odgovara eksperimentalnom spektru. Prije zračenja CaDHA/TiNM kompozita nastalih nakon 60 minuta u prisutnosti 100 mg L⁻¹ TiNM ne opaža se EPR signal kao što je vidljivo iz donjih spektara na slici 67. Eksperimentalni EPR spektri CaDHA/TiNM kompozita ne razlikuju se od spektra kontrolnog sustava te se mogu modelirati jednakim parametrima (jednakim vrijednostima g tenzora). Jednaki signali u EPR spektrima kontrolnog sustava i kompozita ukazuju da su u spektrima prisutni doprinosi jednake vrste paramagnetskih centara. Stoga se može zaključiti da dodatak TiNM ne uzrokuje promjene u strukturi CaDHA. Također, EPR analizom pokazano je da ozračivanjem uzoraka ne nastaju radikali što je bitno za njihovu primjenu. Dobiveni rezultati od posebnog su značaja za biomimetsku pripremu CaDHA/TiNM kompozita jer ukazuju da se kompozitni materijali točno određene faze i svojstava CaP mogu pripremiti na različitim vrstama TiNM bez potrebe za promjenom eksperimentalnih uvjeta.



Slika 66. TGA krivulje taloga nastalih nakon 60 min u sustavima koji sadrže a) TiO_2 nanočestice (TiNP), b) TiO_2 nanopločice (TiNPI), c) titanatne nanocjevčice (TiNT) i d) titanatne nanožice (TiNW). Prikazane su usporedbe nanokompozita s kontrolnim sustavom (CaDHA) i odgovarajućim nanomaterijalom. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri 25°C i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.



Slika 67. EPR spektri taloga nastalih nakon 60 min u sustavima koji sadrže a) TiO_2 nanočestice (TiNP), b) TiO_2 nanopločice (TiNPI), c) titanatne nanocjevčice (TiNT) i d) titanatne nanožice (TiNW). Donji spektri su prije ozračivanja uzoraka. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri 25°C i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.

Za primjenu CaDHA/TiNM važan parametar je i njihova specifična površina koja je dana u tablici 24. Specifična površina određena BET metodom, S_{BET} , pokazuje da CaDHA istaložen iz kontrolnog sustava posjeduje relativno veliku specifičnu površinu u odnosu na druge nanomaterijale i druge nanokompozite. U slučaju TiNW i TiNPI, kompoziti posjeduju veću specifičnu površinu u odnosu na polazni nanomaterijal.

Tablica 24. Specifična površina određena BET metodom kalcij – deficijentnog hidroksiapatita (CaDHA), TiO₂ nanočestica (TiNP), TiO₂ nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT), titanatnih nanožica (TiNW), te njihovih nanokompozita s kalcijevim fosfatima (CaDHA/TiNP, CaDHA/TiNT, CaDHA/TiNW i CaDHA/TiNPI).

Materijal	S _{BET} / m ² g ⁻¹
TiNP	71,51
TiNPI	24,70
TiNT	170,97
TiNW	21,49
CaDHA	81,81
CaDHA/TiNP	53,32
CaDHA/TiNPI	51,66
CaDHA/TiNT	111,14
CaDHA/TiNW	35,80

4.3.2. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti albumina iz govedeg seruma

Taloženje CaP u prisutnosti proteina može se koristiti kao modelni sustav biomineralizacije čiji su produkt novi biokompatibilni hibridni organsko/anorganski materijali za velik broj primjena. Iako se taloženja CaP u prisutnosti proteina uvelike istražuju, do danas nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi utjecaja proteina na taloženje CaP.¹¹⁸ Do sada je istražen utjecaj velikog broja proteina na taloženje različitih faza CaP, među kojima su ipak najzastupljenije faze strukturno najsličnije sastavu kosti, HAP i CaDHA. No, s obzirom na različite eksperimentalne postavke, vrste reaktanata, a i samim svojstvima i vrsti proteina, općeniti zaključak o njihovom utjecaju nemoguće je izvesti. Yang i sur. pokazali su da amelogenin ubrzava nukleaciju HAP, smanjujući vrijeme indukcije kristalne faze.³⁴⁹ S druge strane, Azzopardi i sur. dokazali su da osteopontin inhibira *in vitro* mineralizaciju HAP i drugih biominerala.³⁵⁰ Usprkos važnosti BSA, njegov utjecaj na taloženje CaP malo je istražen, a istraživanja su uglavnom rađena u SBF-u.

4.3.2.1. Utjecaj albumina i titanatnih nanomaterijala na kinetiku taloženja kalcijevih fosfata

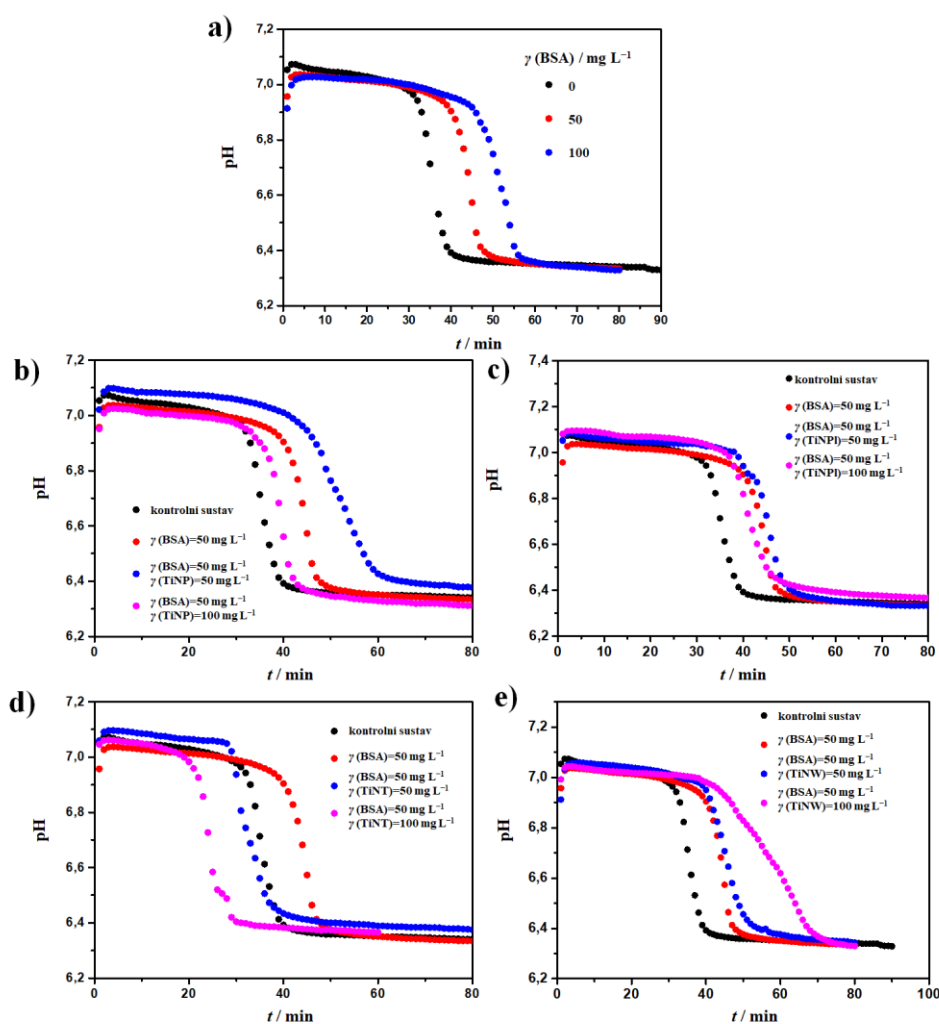
Kako bi se mogao razlučiti utjecaj BSA na kinetiku taloženja CaP i svojstva nastale faze, određen je utjecaj BSA na spontano taloženje CaP bez dodatka TiNM. U prvom koraku istražen

je utjecaj dvije koncentracije BSA, 50 i 100 mg L⁻¹. Navedene koncentracije odabrane su kako bi bile usporedive koncentracijama TiNM. Istražen je i utjecaj manjih koncentracija BSA koje odgovaraju koncentracijama TiNM, 7,5 – 10 mg L⁻¹. No, pri tim koncentracijama BSA nije uočen utjecaj na taloženje CaP.

I u prisustvu BSA pH krivulje imaju tipičan sigmoidalan oblik (slika 68 a) u kojem se razlikuju tri područja taloženja, što ukazuje da niti BSA ne utječe na mehanizam nastajanja CaP. Vrijeme indukcije sekundarne faze na nastalom amorfnom kalcijevom fosfatu (ACP) povećava se s koncentracijom BSA (tablica 25), što znači da BSA inhibira transformaciju ACP u CaDHA. Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima za utjecaj polielektrolita i proteina na vrijeme indukcije.^{85,117}

Nadalje, praćene su i kinetike taloženja CaP u prisutnosti BSA i TiNM. Potenciometrijske krivulje prikazane su na slici 68 dok su vremena indukcije dana u tablici 26. U eksperimentima u kojima se istovremeno određuje utjecaj BSA i TiNM, koncentracija BSA iznosi 50 mg L⁻¹, a koncentracija TiNM 50 i 100 mg L⁻¹. U prisutnosti TiNP, TiNPI i TiNW, istovremeni utjecaj BSA i TiNM stabilizira amorfnu fazu te inhibira transformaciju u kristalnu fazu što se očituje povećanjem vremena indukcije. S obzirom da dodatak TiNP, TiNPI i TiNW koncentracija 50 i 100 mg L⁻¹ inducira transformaciju ACP faze i smanjuje vrijeme indukcije, može se zaključiti da istovremenim dodatkom BSA i nekih od navedenih TiNM dominantan utjecaj ima BSA. Situacija je nešto drugačija u taložnim sustavima u kojima su istovremeno dodani BSA i TiNT gdje je t_{ind} manje u odnosu na kontrolni sustav. Smanjenje vremena indukcije uočeno je prilikom dodatka TiNT stoga se može zaključiti da, u ovom slučaju, dominantan utjecaj imaju TiNT.

Damen i sur. istovremeno su istraživali utjecaj TiO₂ praha i BSA na taloženje CaP iz otopina koje su sadržavale jednake koncentracije CaCl₂ i KH₂PO₄ (2 mmol dm⁻³).³⁵¹ Ukoliko je u taj sustav dodan samo BSA koncentracije 40 mg mL⁻¹, taložna otopina ostala je stabilna tokom 24 h. No dodatkom TiO₂ čestica anatas faze u navedeni sustav, do taloženja CaP dolazi već nakon 15 h. Suprotno od navedenih rezultata, u njihovim taložnim sustavima dominantan utjecaj imaju TiNP.



Slika 68. Reprezentativne pH krivulje a) sustava koji sadrži samo albumin iz goveđeg seruma (BSA) i sustava u kojima su, uz BSA, dodane b) TiO_2 nanočestice (TiNP), c) TiO_2 nanopločice (TiNPI), d) titanatne nanocjevčice (TiNT) i e) titanatne nanožice (TiNW).

$$c_{\text{poč}}(\text{CaCl}_2) = c_{\text{poč}}(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{ pri } 25 \text{ }^\circ\text{C i } \text{pH}_{\text{poč}} = 7,4.$$

Tablica 25. Vrijeme indukcije (t_{ind}) u taložnim sustavima s različitim koncentracijama albumina iz goveđeg seruma BSA. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$

$\gamma(\text{BSA}) / \text{mg L}^{-1}$	$t_{\text{ind}} / \text{min}$
0	$29,4 \pm 3,2$
50	$39,7 \pm 1,0$
100	$45,1 \pm 0,9$

Tablica 26. Vrijeme indukcije (t_{ind}) u kontrolnom sustavu ($c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$), sustavima s različitim koncentracijama albumina iz goveđeg seruma (BSA) i sustavima s različitim koncentracijama BSA i titanatnim nanomaterijalima: TiO $_2$ nanočesticama (TiNP), TiO $_2$ nanopločicama (TiNPI), titanatnim nanocjevčicama (TiNT) i titanatnim nanožicama (TiNW) pri 25 °C. Vremena indukcije kontrolnog sustava i taložnih sustava u kojima je prisutan samo BSA dani su u tablici 25.

$\gamma(\text{TiNM}) / \text{mg L}^{-1}$	$\gamma(\text{BSA}) / \text{mg L}^{-1}$	TiNP	TiNPI	TiNT	TiNW
50	0	28,4 ± 0,8	27,1 ± 0,6	17,4 ± 0,9	29,2 ± 1,3
	50	40,7 ± 5,3	37,9 ± 2,5	28,2 ± 1,1	37,3 ± 1,7
100	0	22,4 ± 1,2	25,3 ± 0,9	17,9 ± 2,0	23,2 ± 1,6
	50	34,9 ± 0,5	35,9 ± 1,0	20,3 ± 1,5	38,8 ± 4,2

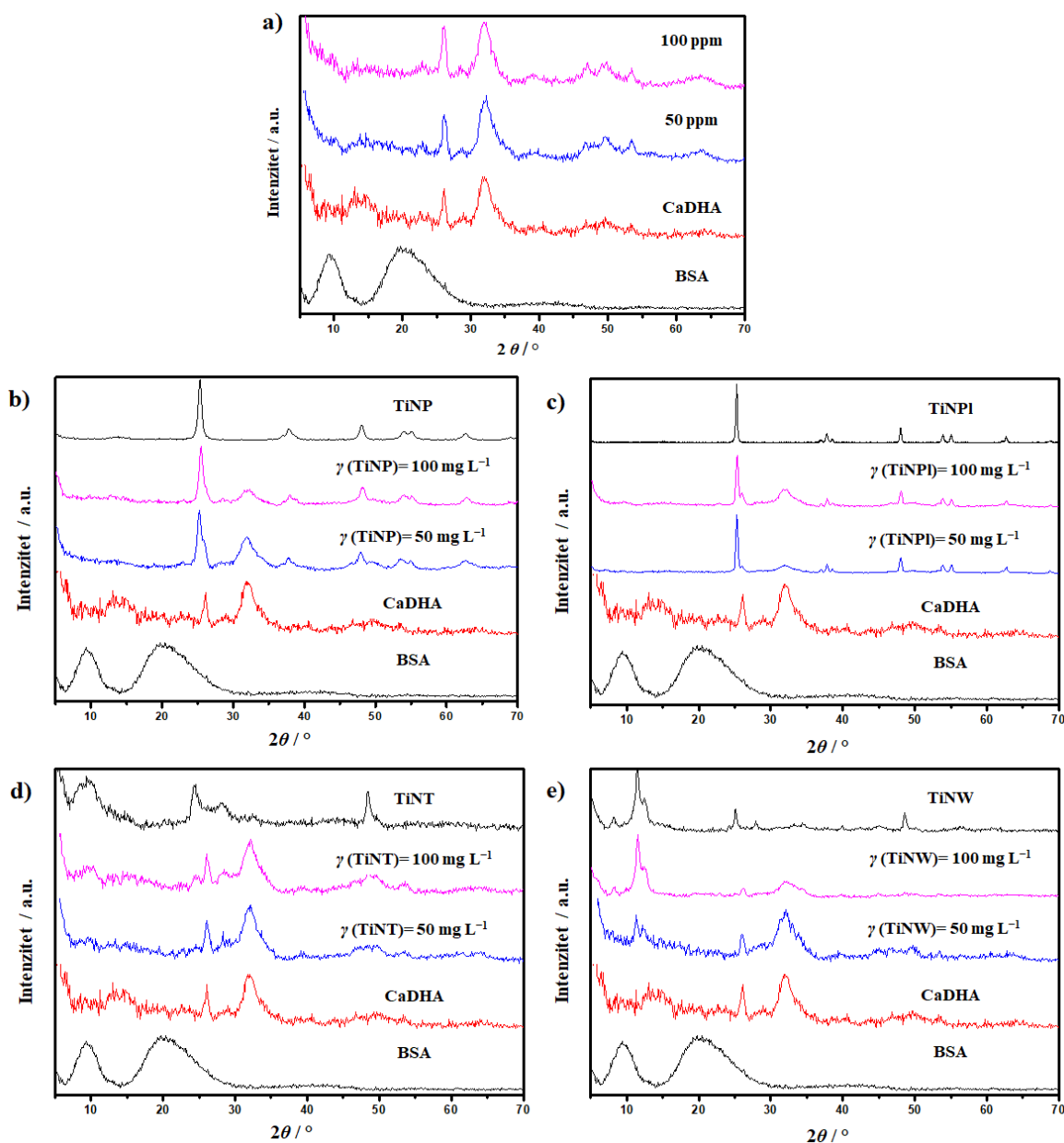
4.3.2.2. Utjecaj albumina iz goveđeg seruma i titanatnih nanomaterijala na svojstva kristalne faze

Difraktogrami praha i FTIR spektri taloga nastalih u kontrolnom sustavu i sustavima s BSA nakon 60 minuta dani su na slikama 69 a i 70 a. Asignacije opaženih vibracijskih vrpce dane su u tablici D.8.10. U difraktogramu praha taloga nastalih u prisustvu BSA pojavljuju se dva difrakcijska maksimuma velikog intenziteta pri 2θ oko 26,00° i 32,09° karakteristična za CaDHA. Za razliku od kontrolnog sustava, pri obje koncentracije BSA, javljaju se i difrakcijski maksimumi manjih intenziteta pri većim 2θ kutovima oko 47,00°, 49,64° i 53,59° također karakteristični za CaDHA.^{79,313} To ukazuje na povećanu kristaliničnost taloga nastalog u prisutnosti BSA u odnosu na kontrolni sustav. FTIR spektri sadrže vrpce karakteristične za istežanje fosfatnih grupa i molekula vode te karakteristične vrpce BSA, što ukazuje da se BSA adsorbirao na CaDHA.²⁹³

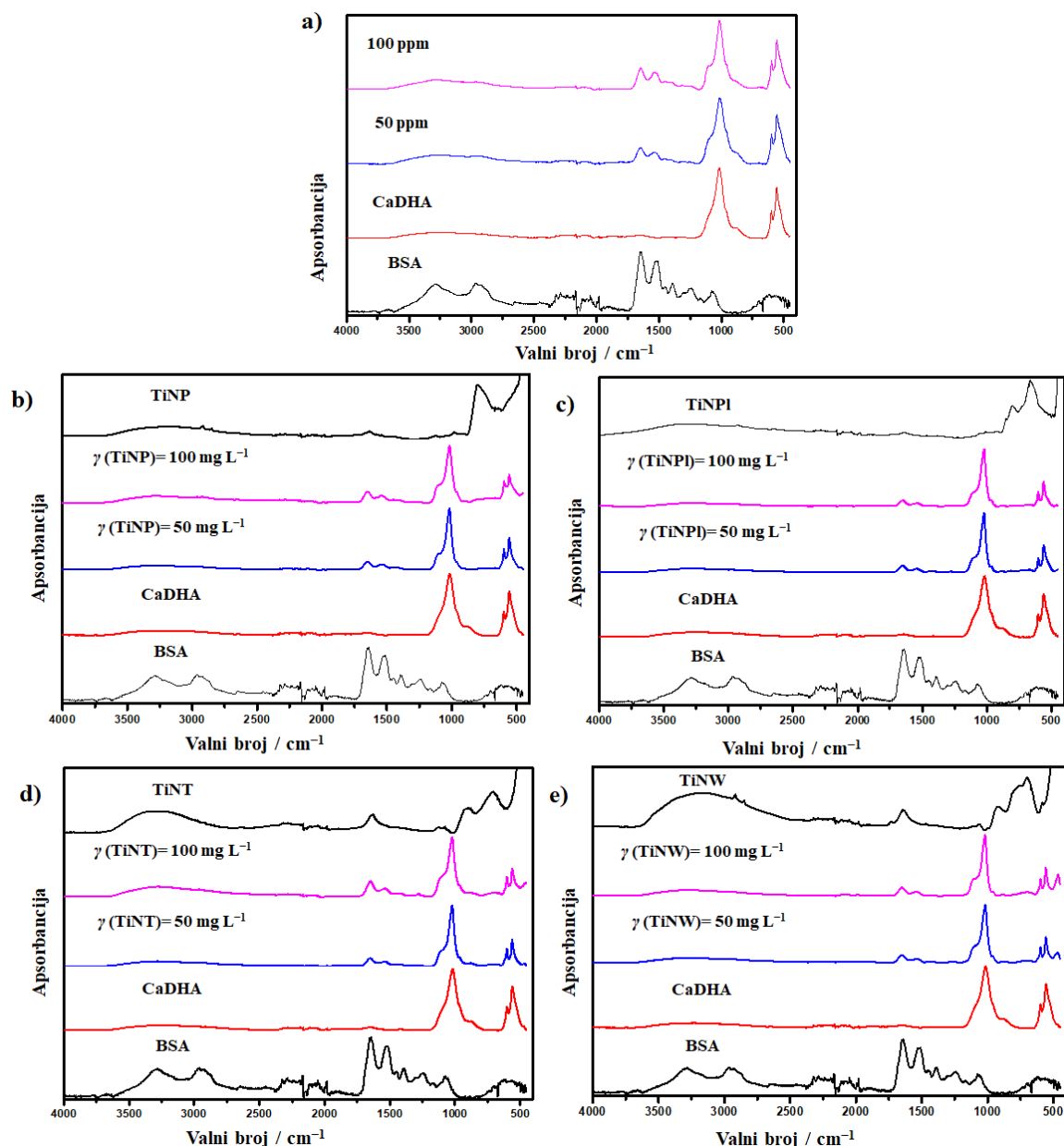
Kato i sur. također su pokazali da BSA ne utječe na sastav i strukturu istaložene CaP faze. Naime, u svojim su istraživanjima pripremali kompozitne materijale temeljene na CaP u kojima su proteini (BSA) ugrađeni u strukturu CaP pomoću peptida te su na taj način pripremljeni BSA/peptid/CaP kompoziti.¹³⁰ PXRD analizom ustanovili su da BSA ne utječe na sastav istaložene CaP faze jer u oba slučaja nastaje HAP. No, u slučaju takve pripreme kompozita, taloženjem u prisutnosti BSA smanjuje se kristaliničnost HAP.

U difraktogramima praha taloga dobivenih u prisutnosti TiNM opaženi su difrakcijski maksimumi CaDHA i difrakcijski maksimumi karakteristični za pojedine TiNM (slika 69). U FTIR spektrima opažene su vrpce karakteristične za CaDHA, BSA i TiNM (slika 70). Asignacije opaženih difrakcijskih i apsorpcijskih maksimuma dane su u tablicama D.8.11. – D.8.18. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da CaDHA/TiNM nanokompoziti nastaju u prisutnosti BSA te da dolazi do ugradnje BSA u navedene kompozite. BSA ne utječe na sastav niti strukturu istaložene CaP faze.

Osim istovremenog taloženja CaP u suspenzijama koje sadrže BSA i TiNM, jedan od načine pripreme kompozitnih materijala je i sinteza CaP u prisutnosti BSA na titanatnim legurama. Liu i sur. su biomimetskim taloženjem pripremali prevlake na bazi CaP te njihovih kompozita s BSA na titanijevim legurama.¹²⁵ CaP istaloženi bez prisustva BSA bili su OCP faze, dok je taloženjem u prisutnosti BSA došlo do fazne promjene čime je nastala smjesa OCP-a i karbonatnog apatita. No, dodatkom BSA ne dolazi do promjene u morfologiji prevlaka. Nadalje, dokazano je i da BSA nije samo adsorbiran na površini CaP već je ugrađen u kristalnu rešetku. Općenito, adsorpcija proteina na CaP određena je elektrostatskim međudjelovanjima s kalcijevih i fosfatnih iona s različitim funkcionalnim skupinama proteina.^{131,352} No, mehanizam kojim se proteini ugrađuju u strukturu CaP vrlo je slabo objašnjen. Pretpostavlja se da proteini sudjeluju u stvaranju kristalne rešetke ili barem utječu na rast i strukturu istaložene faze. Nadalje, mogu se ponašati kao aditivi koji se vežu na kristale CaP ili mogu služiti kao nukleacijski centri tokom kristalizacije CaP.^{353,354}

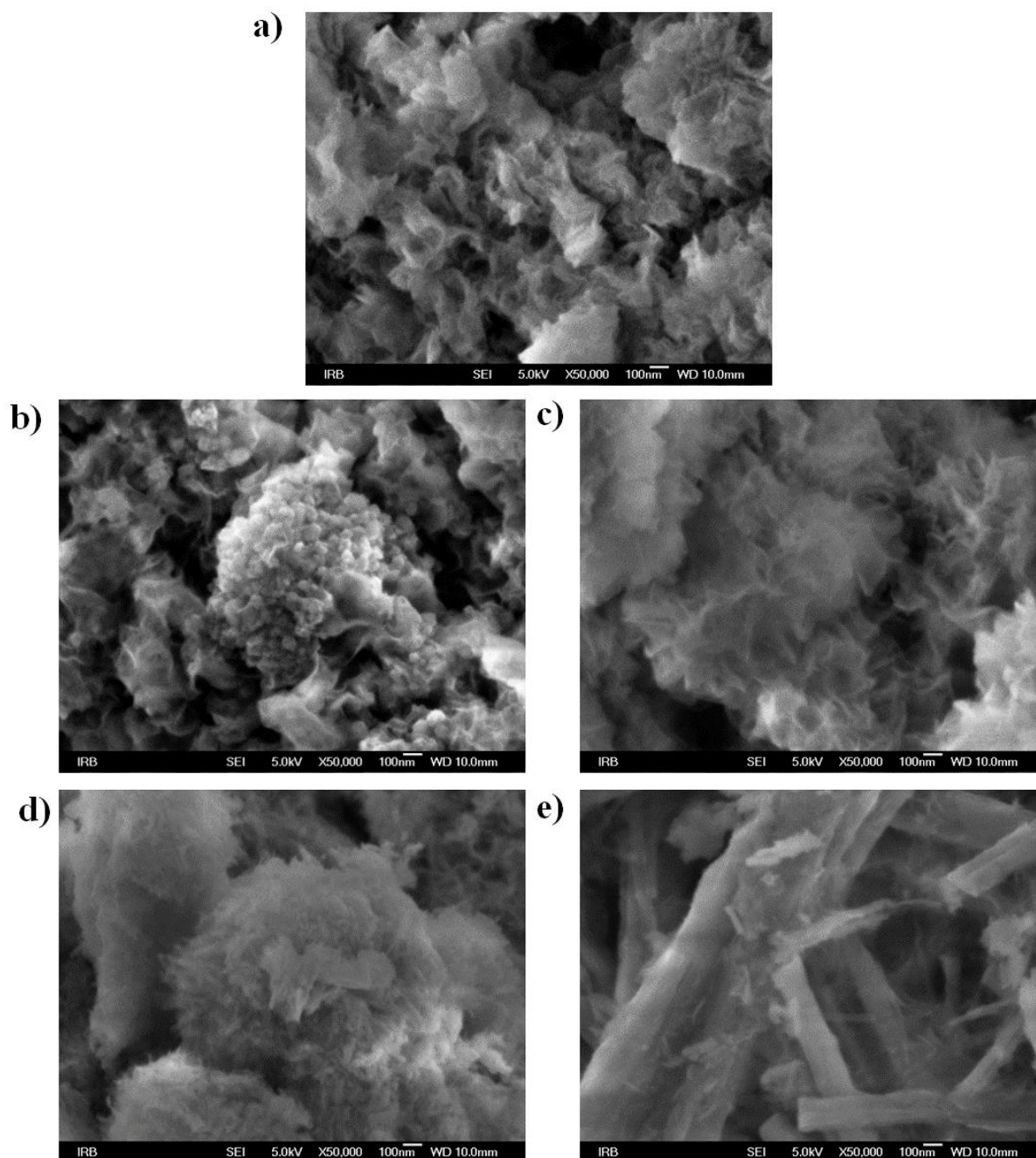


Slika 69. Difraktogrami praha sustava koji sadrže a) albumin iz goveđeg seruma (BSA) i sustava koji sadrže 50 mg L⁻¹ BSA i b) TiO₂ nanočestice (TiNP), c) TiO₂ nanopločice (TiNPI), d) titanatne nanocjevčice (TiNT) i e) titanatne nanožice (TiNW) ofiltrirani nakon 60 minuta taloženja. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.



Slika 70. FTIR spektri prahova sustava koji sadrže a) albumin iz goveđeg seruma (BSA) te sustava koji sadrže 50 mg L⁻¹ BSA i b) TiO₂ nanočestice (TiNP), c) TiO₂ nanopločice (TiNPI), d) titanatne nanocjevčice (TiNT) i e) titanatne nanožice (TiNW) ofiltrirani nakon 60 minuta taloženja. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

Na slici 71 prikazane su SEM mikrografije CaDHA istaloženog samo u prisutnosti BSA (slika 71 a) te CaDHA nastalog u taložnim sustavima gdje su istovremeno dodani BSA i TiNM.



Slika 71. SEM mikrografije prahova sustava koji sadrže a) albumin iz goveđeg seruma (BSA) koncentracije 50 mg L^{-1} BSA te sustava koji sadrže 50 mg L^{-1} BSA i b) TiO_2 nanočestice (TiNP), c) TiO_2 nanopločice (TiNPl), d) titanatne nanocjevčice (TiNT) i e) titanatne nanožice (TiNW) izoliranih nakon 60 minuta taloženja. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

SEM mikrografije taloga nastalih samo u prisutnosti BSA ukazuju da su nastali agregati tankih listićavih kristala tipičnih za CaDHA. Agregati su gušće pakirani za razliku od onih nastalih u kontrolnom sustavu.³⁴³

BSA utječe na morfologiju nastalog CaDHA u sustavima u kojima su dodane TiNM koncentracije 100 mg L^{-1} . U sustavima s TiNP nastali su sferični agregati nepravilnih kristala CaDHA. Pojedinačne kristale teže je razaznati u odnosu na one nastale u kontrolnom sustavu. U taložnom sustavu u kojem su prisutne TiNPI na površini su nastali slojevi listićastih kristala CaDHA, toliko veliki da se na SEM mikrografijama vide samo sferični agregati listićastih kristala CaDHA koji su gušće pakirani u odnosu na kontrolni sustav. U taložnom sustavu u kojem su prisutni TiNT nastali su sferični agregati listićastih kristala CaDHA na površini TiNT. Pojedinačni kristali su pravilniji u odnosu na one nastale u kontrolnom sustavu. SEM mikrografije pokazuju da su u sustavu s TiNW nastali slojevi listićastih kristala CaDHA na površini TiNW. U slučaju taloženja u prisutnosti BSA, površinska prekrivenost TiNW s CaDHA mnogo je manja.

4.3.3. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti kitozana

Razumijevanje načina na koji makromolekule međudjeluju s anorganskom fazom, ključno je za razvoj biomimetskih sintetskih putova kojima se mogu razviti novi materijali vrlo širokog spektra primjena.^{355,356} Međudjelovanjem kalcijevih i fosfatnih iona u ljudskom tijelu u prisutnosti mnogih makromolekula te polielektrolita nastaju kompozitni materijali koji pokazuju svojstva keramike i biopolimera.¹⁴⁶ Takvi kompoziti posjeduju velik potencijal za biomedicinske primjene, pogotovo one koje se odnose na regeneraciju oštećenog tkiva.¹⁴⁷ U tom pogledu, od posebnog interesa su kompozitni materijali temeljeni na CaP i biopolimerima koji mogu biti sintetizirani taloženjem CaP u suspenziji biopolimera, slično načinu kojim se odvija biomineralizacija. Jedan od takvih polimera je kitozan, biokompatibilan i biorazgradiv polisaharid čija su svojstva već opisana u poglavlju 2.1.4.

Osim dodatka kitozana u taložni sustav u kojem nastaju CaP, kompozitni materijali CaP i kitozana mogu nastati i dodatkom kitozana u SBF. Na taj se način kompoziti CaP i kitozana mogu pripremiti kao prevlake na titanijevim supstratima.³⁵⁷ Osim što se može dodati direktno u SBF ili u taložne sustave, kitozan je moguće koristiti i kao matriks na kojemu taloži CaP. Rusu i sur. sintetizirali su HAP nanočestice kontroliranih veličina taloženjem iz vodenih medija na matriksu kitozana.¹⁴⁵ Pokazano je da se povećavanjem udjela kitozana smanjuje prosječna

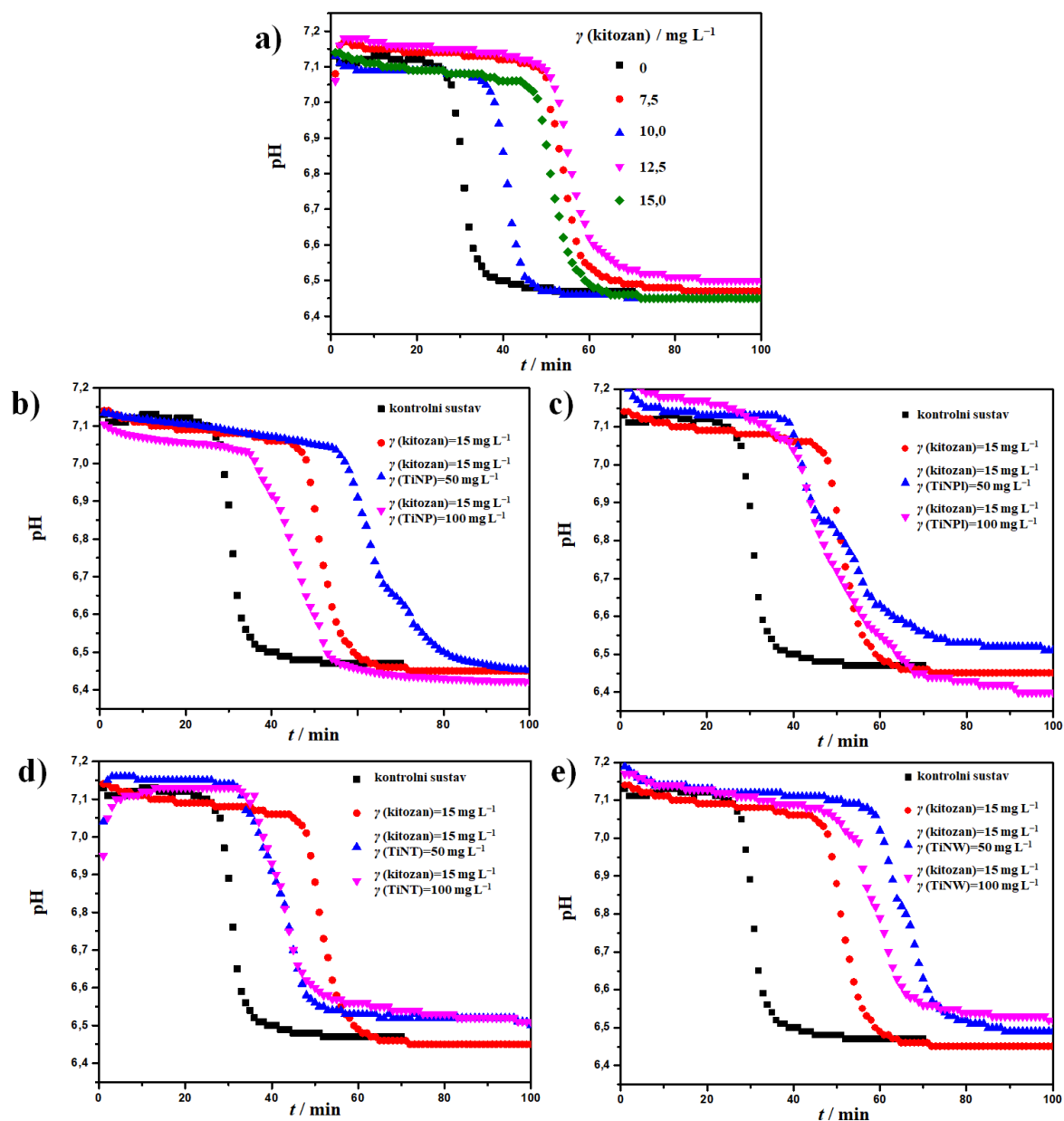
veličina čestica HAP. Kompoziti HAP-a pripremljen na taj način slabo su kristalinični, baš kao i biološki apatit.

4.3.3.1. Utjecaj kitozana i titanatnih nanomaterijala na kinetiku taloženja kalcijevih fosfata

Utjecaj kitozana na taloženje CaP bez dodatka TiNM određen je pri koncentracijama kitozana 7,5, 10,0, 12,5 i 15,0 mg L⁻¹. Pri većim koncentracijama, 50 mg L⁻¹, kitozan inhibira transformaciju ACP u kristalnu fazu te niti nakon 24 sata ne dolazi do nastajanja taloga.

U prisustvu kitozana pH krivulje imaju tipičan sigmoidalan oblik (slika 72 a) u kojem se razlikuju tri područja taloženja, što ukazuje da ni kitozan ne utječe na mehanizam nastajanja CaDHA.^{88,330} U tablici 27 dana su vremena indukcije određena u prisutnosti kitozana različitih koncentracija. U prisutnosti kitozana vrijeme indukcije kristalne faze na nastalom amorfnom kalcijevom fosfatu (ACP) se povećava, što znači da kitozan stabilizira ACP te usporava njegovu transformaciju. Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima za utjecaj polielektrolita i proteina na vrijeme indukcije.^{85,117}

Na slici 72 b – e prikazane su reprezentativne pH krivulje taloženja CaP u prisutnosti kitozana i TiNM. Sve krivulje klasičnog su sigmoidalnog oblika što znači da istovremeno prisustvo kitozana i TiNM ne utječe na mehanizam taloženja CaP. U tablici 28 dana su vremena indukcije određena u takvim taložnim sustavima. U prisutnosti kitozana i TiNM vremena indukcije duža su od onih određenih u sustavima bez kitozana. S obzirom da u vremena indukcije u sustavima u kojima su samo dodani TiNM koncentracije 50 i 100 mg mL⁻¹ veća u odnosu na kontrolni sustav, može se zaključiti da u sustavima u kojima su istovremeno prisutni kitozan i TiNM, kitozan ima dominantan utjecaj na kinetiku taloženja CaP. Jednako ponašanje uočeno je i u sustavima koji su istovremeno sadržavali BSA i TiNM. No, pokazano je da je kitozan jači inhibitor od BSA, što je moguće posljedica različitih oblika molekula. S obzirom da je kitozan polimer, moguće je da njegovi lanci pokriju površinu ACP-a i na taj način učinkovitije inhibiraju njegovu transformaciju. BSA i kitozan fleksibilne su molekule koje su veličinom manje od TiNM u anionskoj komponenti taložnog sustava. TiNM su rigidne molekule te se već mogu smatrati površinama na kojima može doći do nukleacije. Upravo zato se TiNM ponašaju kao promotori transformacije ACP-a, dok su kitozan i BSA inhibitori.



Slika 72. Reprezentativne pH krivulje a) sustava koji sadrži samo kitozan i sustava u kojima su, uz 15 mg mL⁻¹ kitozana, dodane b) TiO₂ nanočestice (TiNP), c) TiO₂ nanopločice (TiNPI), d) titanatne nanocjevčice (TiNT) i e) titanatne nanožice (TiNW) koncentracije 50 i 100 mg mL⁻¹. $c_{\text{poč}}(\text{CaCl}_2) = c_{\text{poč}}(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.

Tablica 27. Vrijeme indukcije (t_{ind}) u kontrolnom sustavu i sustavima s različitim koncentracijama kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

$\gamma(\text{kitozan}) / \text{mg L}^{-1}$	$t_{\text{ind}} / \text{min}$
0	$29,4 \pm 3,2$
7,5	$45,1 \pm 2,1$
10,0	$34,9 \pm 1,2$
12,5	$49,1 \pm 1,1$
15,0	$46,4 \pm 1,1$

Tablica 28. Vrijeme indukcije (t_{ind}) u kontrolnom sustavu ($c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$), sustavima s različitim koncentracijama kitozana i sustavima s kitozanim i titanatnim nanomaterijalima, TiO_2 nanočesticama (TiNP), TiO_2 nanopločicama (TiNPI), titanatnim nanocjevčicama (TiNT) i titanatnim nanožicama (TiNW) pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

$\gamma(\text{TiNM}) / \text{mg L}^{-1}$	$\gamma(\text{kitozan}) / \text{mg L}^{-1}$	TiNP	TiNPI	TiNT	TiNW
50	0	$28,4 \pm 0,8$	$27,1 \pm 0,6$	$17,4 \pm 0,9$	$29,2 \pm 1,3$
	15	$55,6 \pm 2,1$	$37,5 \pm 1,4$	$31,9 \pm 0,9$	$57,6 \pm 2,3$
100	0	$22,4 \pm 1,2$	$25,3 \pm 0,9$	$17,9 \pm 2,0$	$23,2 \pm 1,6$
	15	$37,0 \pm 1,1$	$34,0 \pm 1,6$	$33,4 \pm 1,5$	$50,2 \pm 0,3$

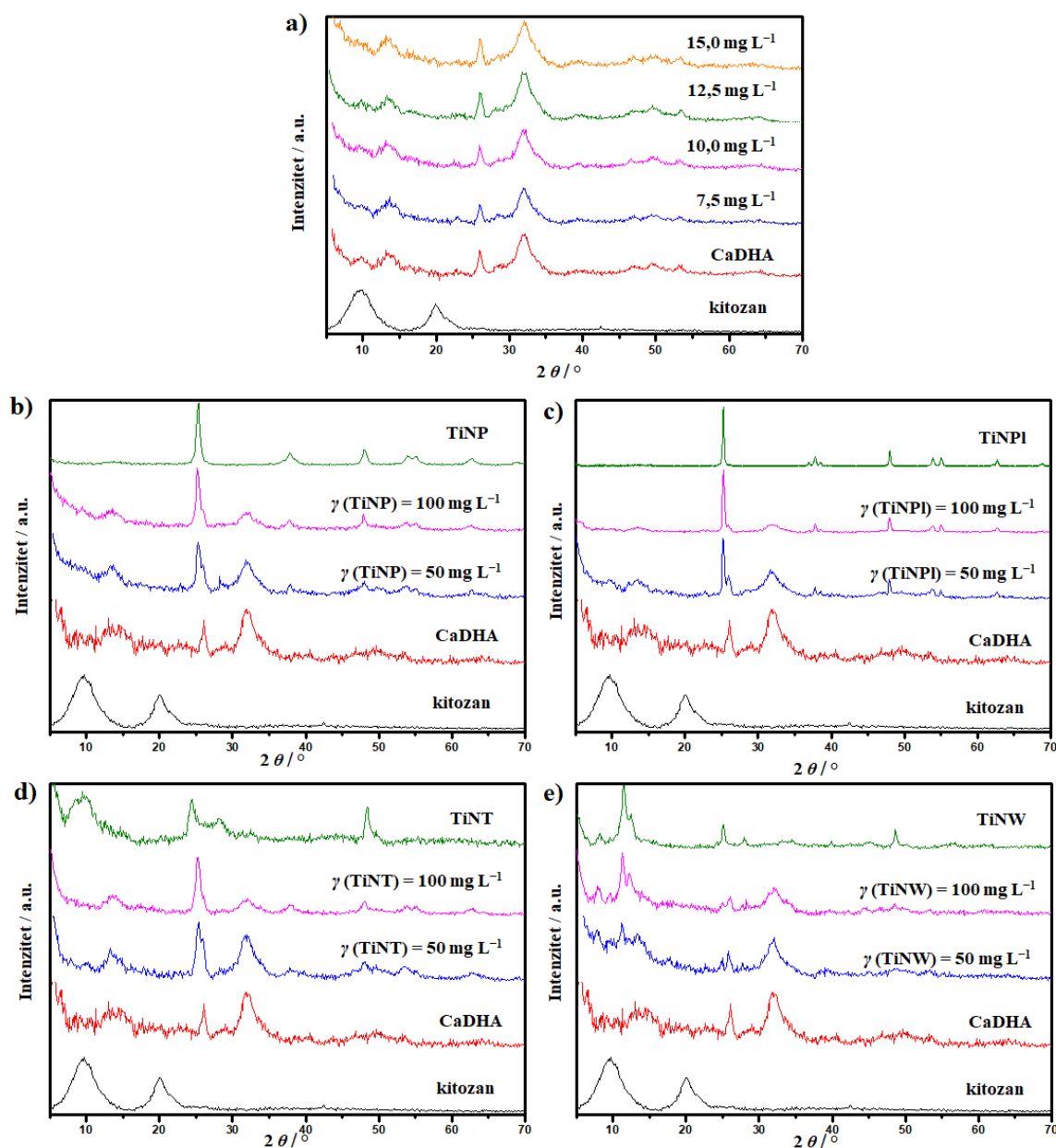
4.3.3.2. Utjecaj kitozana i titanatnih nanomaterijala na svojstva istaložene kristalne faze

Difraktogrami praha i FTIR spektri taloga nastalih u kontrolnom sustavu i u sustavima s kitozanim nakon 120 minuta prikazani su na slikama 73 a i 74 a. Assignacije opaženih difrakcijskih maksimuma i vibracijskih vrpca dane su u tablicama D.8.19. U difraktogramima praha taloga nastalih u kontrolnom sustavu i u prisustvu kitozana pojavljuju se dva difrakcijska maksimuma velikog intenziteta pri 2θ oko $26,00^\circ$ i $32,09^\circ$ karakteristična za CaDHA, kao i maksimumi manjih intenziteta pri većim kutevima, 2θ oko $46,50^\circ$, $49,60^\circ$ i $53,20^\circ$, također karakteristični za CaDHA.^{79,313} Difrakcijski maksimumi karakteristični za kitozan nisu detektirani. Dobiveni rezultati ukazuju da kitozan ne utječe na sastav nastalog taloga. FTIR spektri sadrže vrpce karakteristične za istežanje fosfatnih grupa i molekula vode.²⁹³ Vrpce

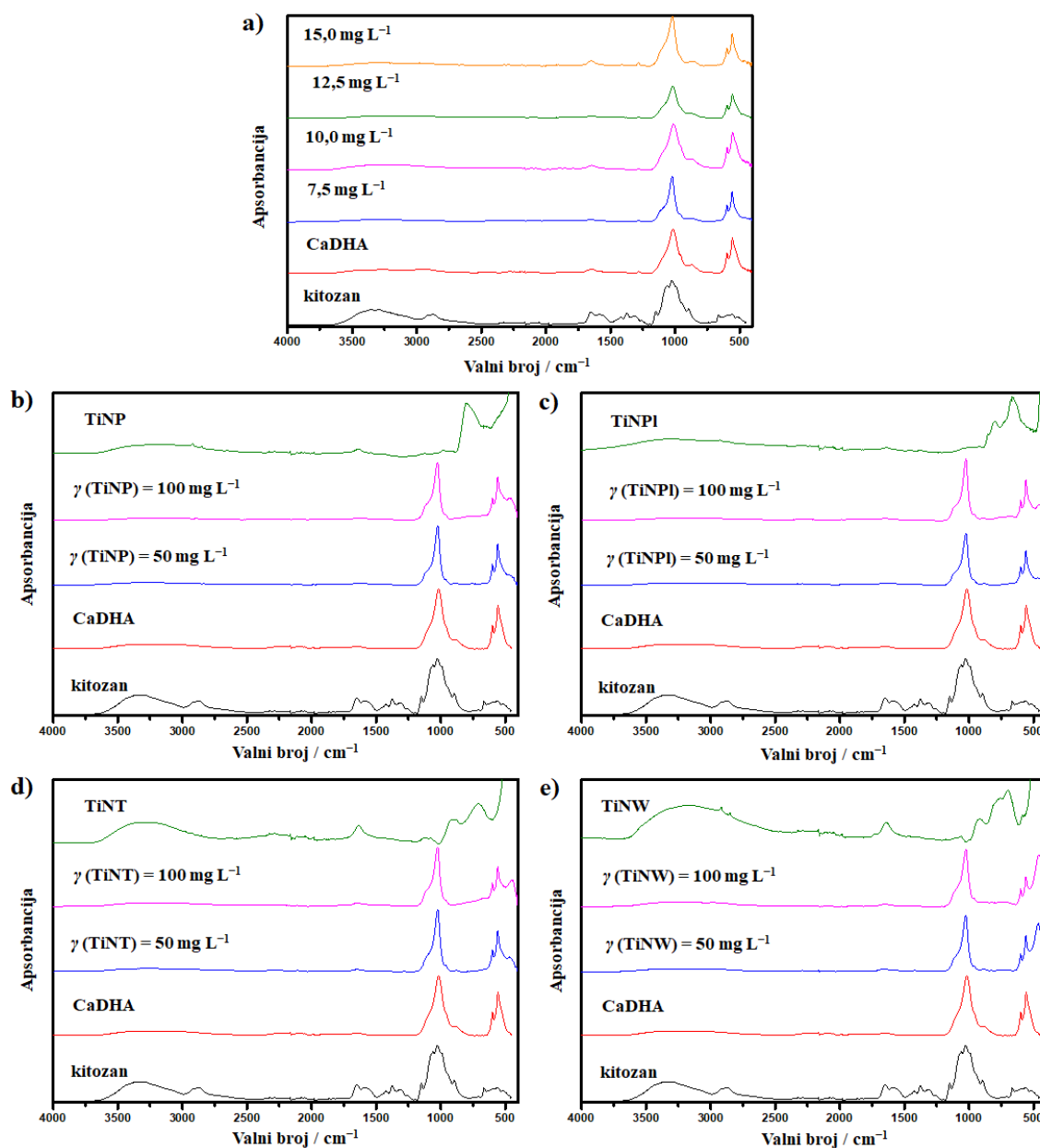
karakteristične za kitozan nisu vidljive, iako se vrpce na oko 1650 cm^{-1} i 1022 cm^{-1} mogu asignirati i kao C=O istezanje amida i vibracija C–O u COH, COC i CH₂OH.^{136,287,288,292,358,359}

Aimoli i sur. istraživali su utjecaj biopolimera, kitozana, na biomimetsko taloženje CaP.¹⁴⁶ Pokazali su da kitozan ne utječe na sastav nastalog taloga te da u oba slučaja nastaje smjesa DCPD-a i DCPA. No, prisutnost kitozana utječe na omjere tih dviju faza, kristaliničnost i orijentaciju. Da prisustvo kitozana u taložnom sustavu ne mijenja vrstu istaložene faze, uočili su Fadeeva i sur.¹⁴⁷ Mjenjanjem omjera reaktanata, odnosno omjera Ca/P, omogućio im je taloženje DCPD ili ACP faze. Dodatkom kitozana ne dolazi do promjene sastava niti jedne od tih faza, no veličina kristalne faze se smanjuje.

U difraktogramima praha dobivenih taloga u prisutnosti kitozana i TiNM opaženi su difrakcijski maksimumi karakteristični za CaDHA i TiNM (slike 73 b – e., tablica D.8.20., D.8.22., D.8.24. i D.8.26.). U spektrima koji sadrže TiNT, pojavljuju se maksimumi koji se ne pojavljuju u difraktogramima kompozita sa TiNT na 2θ $38,05^\circ$, $55,17^\circ$ i oko $62,70^\circ$ što ukazuje na moguću promjenu sastava. U FTIR spektrima opažene su vrpce karakteristične za CaP i kitozan (slike 74 b – e, tablice D.8.21., D.8.23., D.8.25. i D.8.27.).^{136,287,288,292,293,358,359}



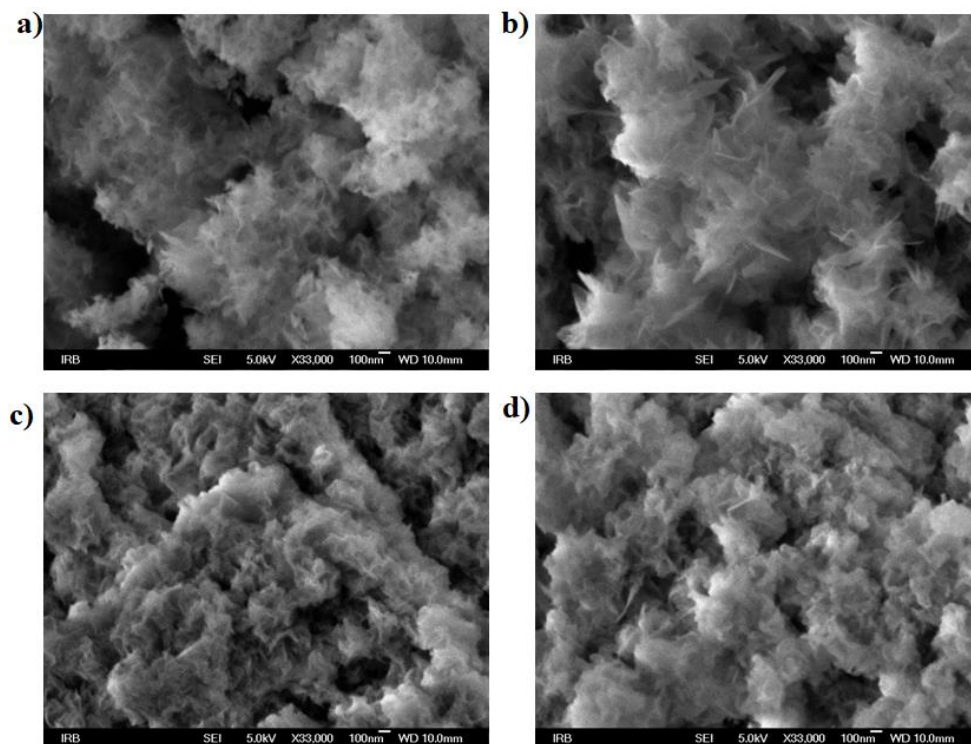
Slika 73. Difraktogrami praha sustava koji sadrže a) kitozan koncentracija 7,5 – 15,0 mg L⁻¹ i sustava koji sadrže 15,0 mg L⁻¹ kitozana i b) TiO₂ nanočestice (TiNP), c) TiO₂ nanopločice (TiNPI), c) titanatne nanocjevčice (TiNT) te e) titanatne nanožice (TiNW) koncentracija 50 i 100 mg L⁻¹ nakon 60 minuta. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.



Slika 74. FTIR spektri praha sustava koji sadrže a) kitozan koncentracija 7,5 – 15,0 mg L⁻¹ i sustava koji sadrže 15,0 mg L⁻¹ kitozana i b) TiO₂ nanočestice (TiNP), c) TiO₂ nanopločice (TiNPI), c) titanatne nanocjevčice (TiNT) te e) titanatne nanožice (TiNW) koncentracija 50 i 100 mg L⁻¹ nakon 60 minuta. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

SEM mikrografije prahova CaP istaloženih u prisustvu kitozana (slika 75) pokazuju da su u prisutnosti kitozana nastali agregati tankih lističavih kristala tipičnih za CaDHA, čija je veličina manja u odnosu na kontrolni sustav. Navedeno opažanje potkrepljeno je i veličinom kristalita

izračunatih iz difraktograma praha (tablica 29). Jednako opažanje promijene veličine taloga uočili su i Fadeeva i sur., koji su navedenu pojavu objasnili kao posljedicu međudjelovanja kitozana s CaP.¹⁴⁷

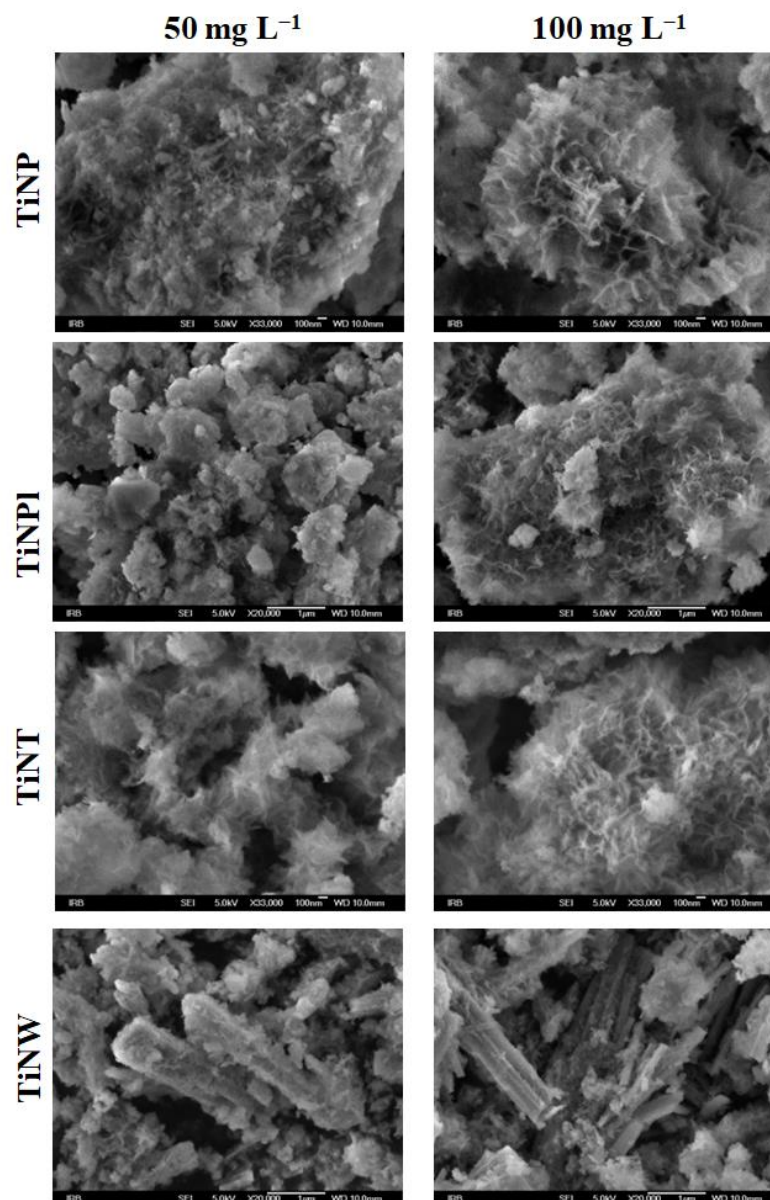


Slika 75. SEM mikrografije taloga nastalog nakon 120 minuta u sustavima s a) 7,5, b) 10,0, c) 12,5 i d) 15,0 mg L⁻¹ kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

Tablica 29. Veličina kristalita kalcij – deficijantnog hidroksiapatita (CaDHA) nastalog u kontrolnom sustavu i u sustavima s različitim koncentracijama kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

γ (kitozan) / mg L ⁻¹	Veličina kristalita / nm
0	3,19
7,5	3,03
10,0	3,12
12,5	2,81
15,0	3,03

SEM mikrografije sustava koji sadrže TiNM i kitozan pokazuju da kitozan utječe na morfologiju nastalog CaDHA (slika 76). U sustavu s 100 mg L^{-1} TiNP, TiNT i TiNPI nastali su sferični agregati nepravilnih kristala CaDHA, veći su od onih nastalih u taložnom sustavu s nanomaterijalima bez prisutnosti kitozana i kompaktniji od onih u kontrolnom sustavu. U prisutnosti kitozana detektiran je veći broj sferičnih agregata kristala CaDHA koji nisu nastali na TiNW.



Slika 76. SEM mikrografije taloga nastalog nakon 60 minuta u sustavima koji su sadržavali $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ kitozana te 50 i 100 mg L^{-1} TiO_2 nanočestica (TiNP), TiO_2 nanopločica (TiNPI), titanatnih nanocjevčica (TiNT) i titanatnih nanožica (TiNW). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4. Međudjelovanja albumina iz goveđeg seruma s kalcijevim fosfatima, titanatnim nanomaterijalima i njihovim kompozitima s kalcijevim fosfatima

Jedan od glavnih faktora koje treba uzeti u obzir pri dizajniranju novih implant materijala, procesi su koji se odvijaju u prvim trenucima nakon implantacije. Odmah nakon implantacije dolazi do adsorbiranja topljivih proteina krvne plazme na površinu implant materijala.^{360,361} Ovisno o načinu na koji su proteini adsorbirani, implantacija može biti uspješna ili može doći do odbacivanja implantata.^{362–364} Proteini adsorbirani na površni materijala utječu na početni odgovor i adheziju stanica, diferencijaciju i proizvodnju izvanstaničnog matriksa.^{200,365–368} Najvažniji i najzastupljeniji proteini krvne plazme o kojima ovisi sudbina implant materijala u tijelu su albumin, imunoglobulin G i fibrinogen.³⁶⁹ Od navedenih, u krvnoj plazmi je u najvećoj koncentraciji prisutan albumin.³⁷⁰

4.4.1. Kinetika adsorpcije albumina iz goveđeg seruma na kalcijeve fosfate, titanatne nanomaterijale i njihove kompozite s kalcijevim fosfatima

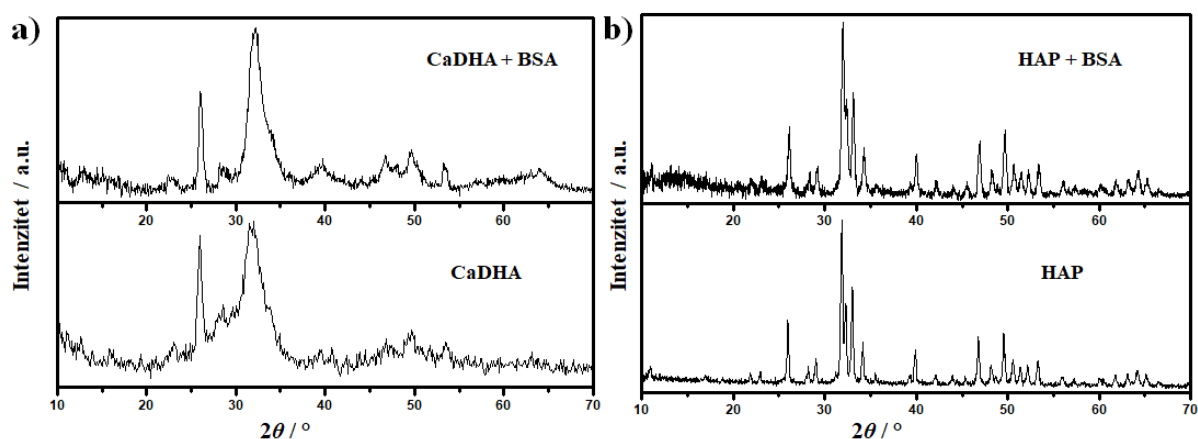
Većina istraživanja međudjelovanja proteina iz skupine albumina s CaP i TiNM napravljena je s albuminom iz goveđeg seruma (BSA) zbog njegove sličnosti albuminu iz ljudskog seruma (HSA) te lakše dostupnosti.³⁷¹ Navedena istraživanja prvenstveno su usmjerena na određivanje adsorpcijskih izoterma^{372–375} i konformacijskih promjena proteina do kojih dolazi uslijed adsorpcije^{376,377}. S obzirom da se vrlo brzo po implantaciji adsorbiraju na površinu implantata, istraživanjem kinetike adsorpcije može se dobiti uvid o mehanizmu transfera mase i svojstvima adsorbensa.²²⁵

Usprkos važnosti takvih istraživanja, samo su D'Elia i sur.²³⁶ usporedili kinetiku adsorpcije BSA na TiO₂ i HAP pri jednakim uvjetima. Kako bi doprinijeli razumijevanju adsorpcije BSA na dvije najčešće korištene vrste materijala u izradi koštanog tkiva, u ovome poglavlju opisana je kinetika adsorpcije BSA na dvije vrste kalcijevih fosfata, četiri vrste titanatnih nanomaterijala i njihovih nanokompozita s kalcijevim fosfatima. U svrhu određivanja karakterističnih parametara kinetike adsorpcije, eksperimentalni podaci obrađeni su modelima pseudo-prvog reda (PFO), pseudo-drugog reda (PSO) i Weber-Morrisovim modelom unutarčestične difuzije (IPD-WM). Navedeni modeli kinetike adsorpcije opisani su u Poglavlju 2.4. Kako bi se odredio

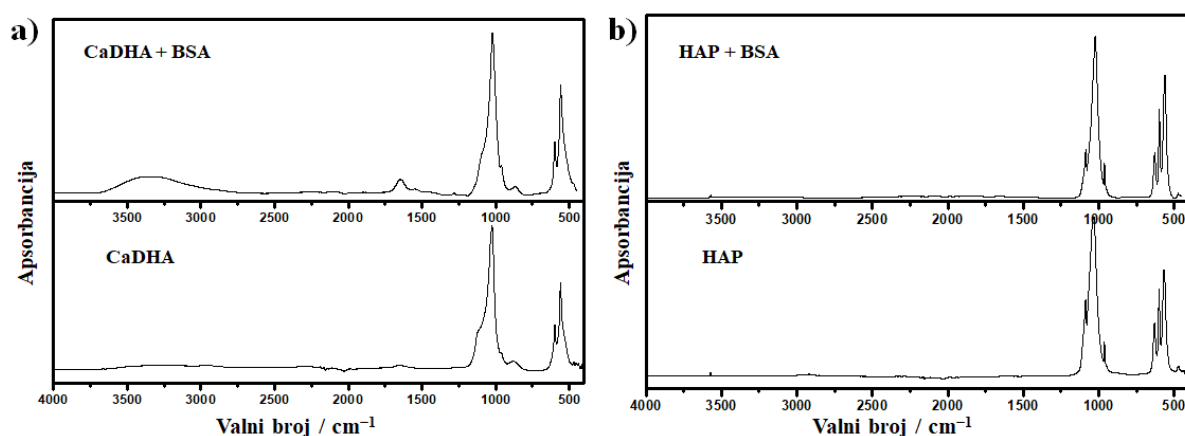
utjecaj BSA na čvrstu fazu, adsorbens, određena su svojstva adsorbensa prije i nakon adsorpcije BSA.

4.4.1.1. Utjecaj albumina iz goveđeg seruma na svojstva adsorbensa nakon adsorpcije

Utjecaj BSA na sastav, strukturu i morfologiju adsorbensa određen je usporedbom rezultata PXRD, FTIR i SEM analize prije i nakon 24 sata inkubacije s BSA u PBS-u 37 °C. Na slici 77 i 78 prikazani su difraktogrami praha i FTIR spektri CaDHA i HAP prije i nakon 24 sata inkubacije s BSA.



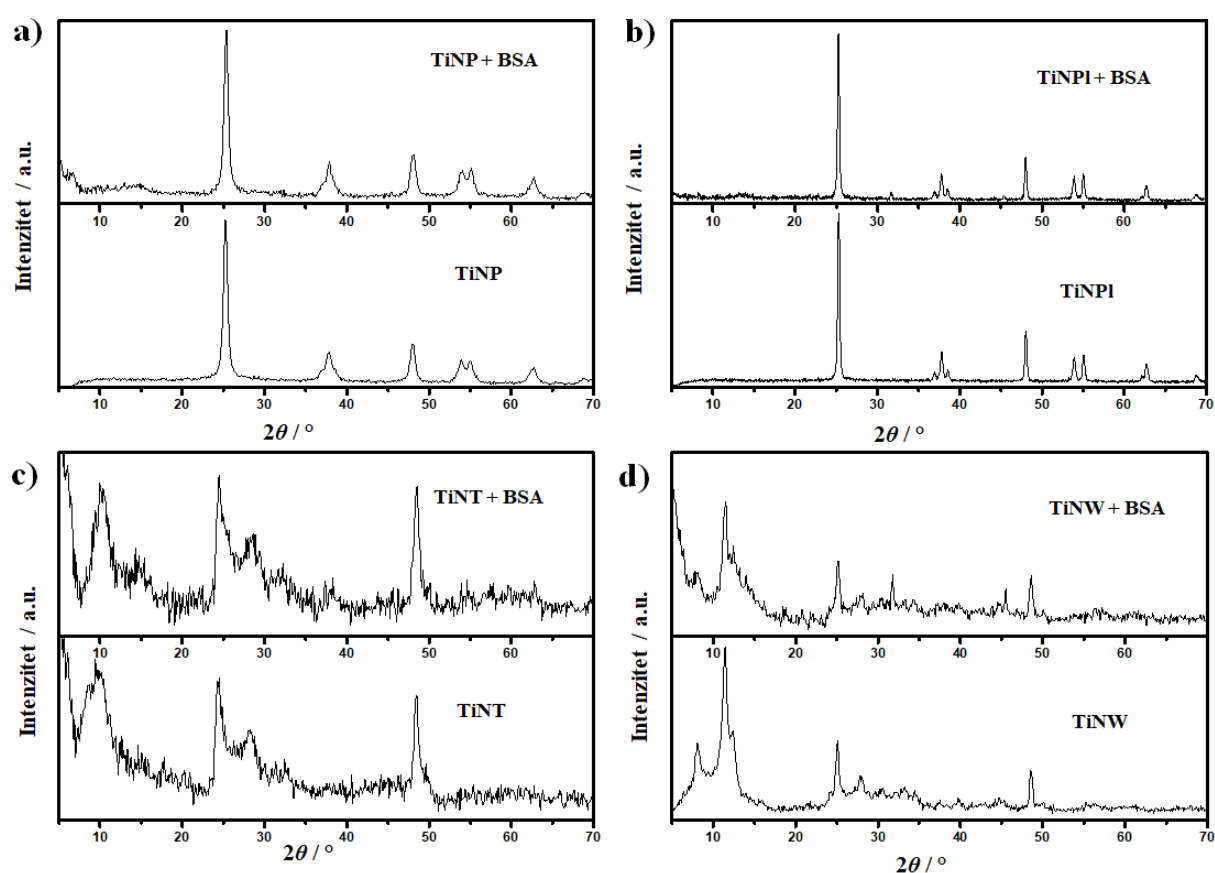
Slika 77. Difraktogram praha prije (donja slika) i nakon (gornja slika) 24 h inkubacije a) kalcij – deficijentnog hidroksiapatita (CaDHA) i b) hidroksiapatita (HAP) s albuminom iz goveđeg seruma (BSA) pri 37 °C.



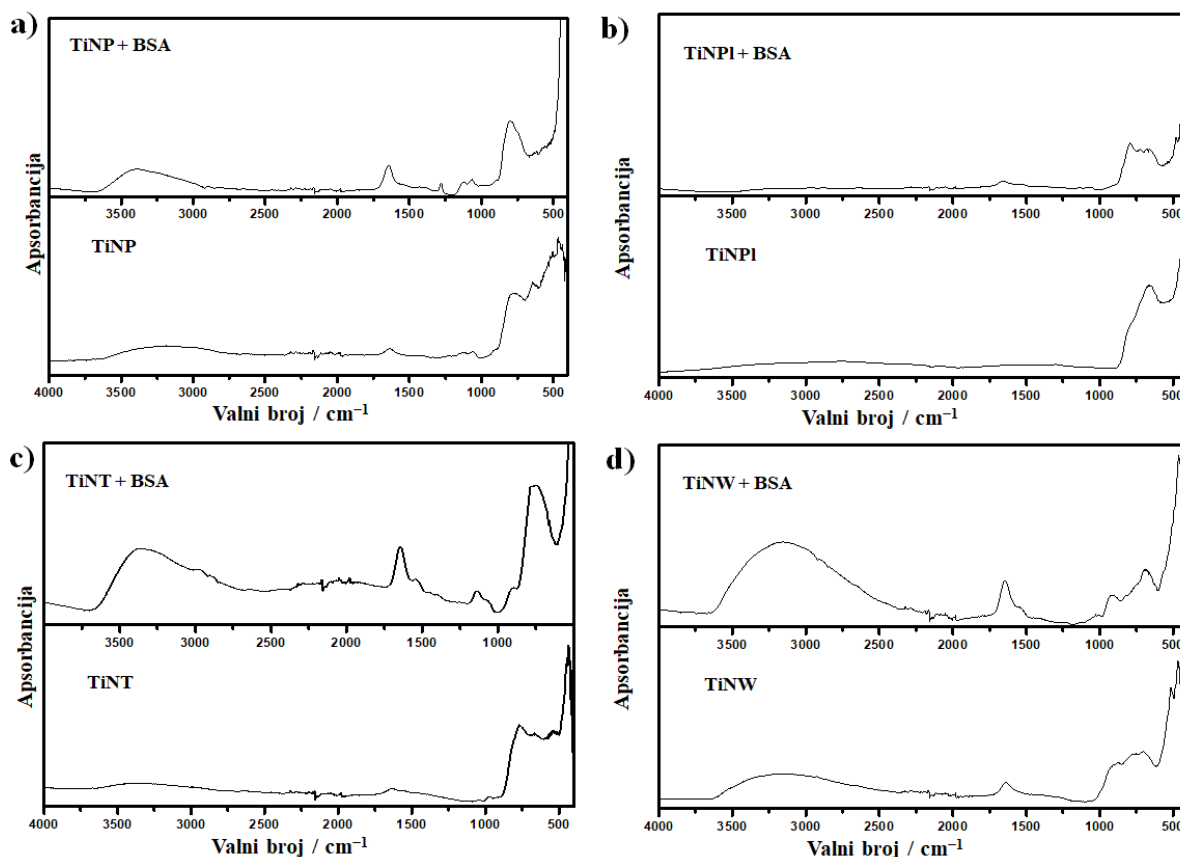
Slika 78. FTIR spektri prije (donja slika) i nakon (gornja slika) 24 h inkubacije a) kalcij – deficijentnog hidroksiapatita (CaDHA) i b) hidroksiapatita (HAP) s albuminom iz goveđeg seruma (BSA) pri 37 °C.

Prema dobivenim difraktogramima praha može se zaključiti da adsorpcija BSA ne utječe na sastav CaDHA i HAP jer nije uočena promjena u difraktogramima. Rezultati PXRD analize potvrđeni su FTIR analizom. U slučaju CaDHA pojava vrpce karakterističnih za istežanja BSA pri oko 1543 cm^{-1} i/ili 1275 cm^{-1} koji odgovaraju istežanjima amid II, amid III i C–N te N–H savijanju ukazuju na adsorpciju BSA (slika 77 a).^{283,284} Na temelju PXRD i FTIR analize može se zaključiti da BSA ne utječe na sastav niti jedne od navedenih faza.

Difraktogrami praha i FTIR spektri čistih TiNM nakon 24 sata inkubacije s BSA pri 37 °C prikazani su na slikama 79 i 80.



Slika 79. Difraktogrami praha taloga dobivenog prije (donja slika) i nakon (gornja slika) 24 h inkubacije a) TiO_2 nanočestica (TiNP), b) TiO_2 nanopločica (TiNPI), c) titanatnih nanocjevčica (TiNT) i d) titanatnih nanožica (TiNW) s albuminom iz goveđeg seruma (BSA) pri 37 °C .

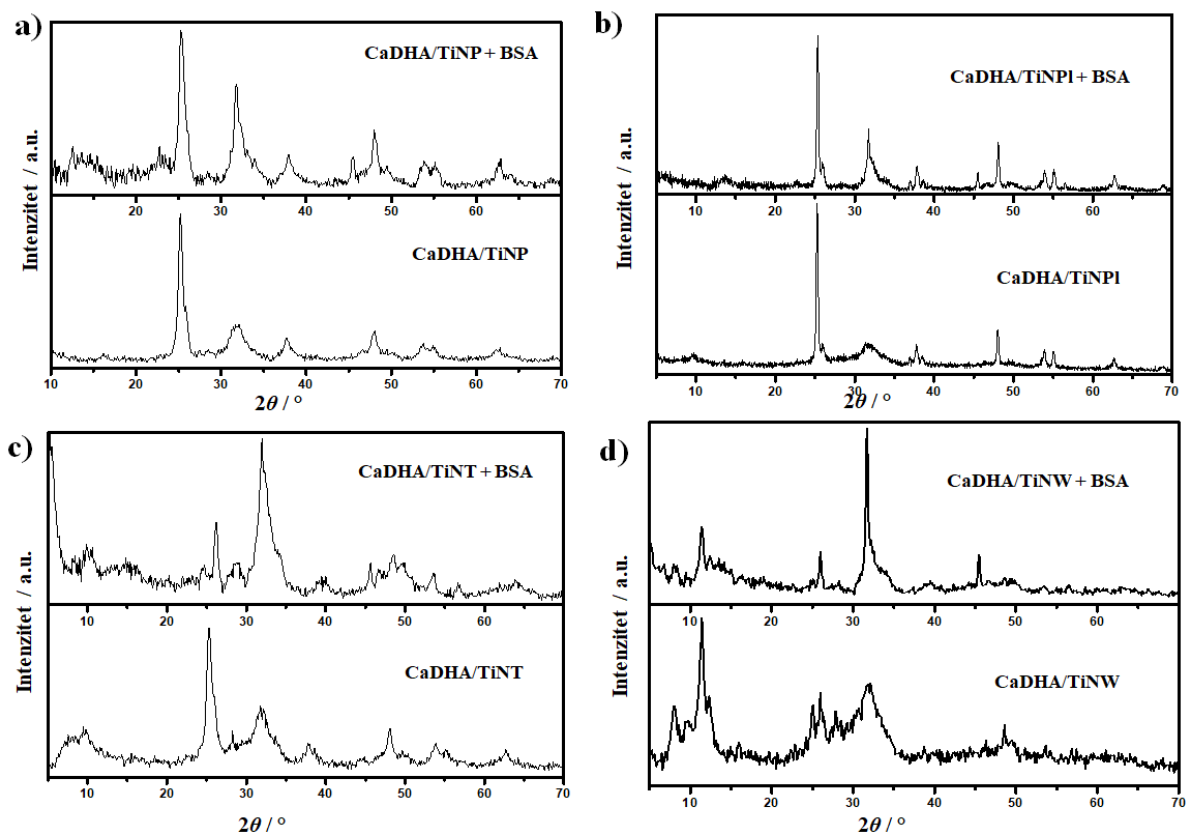


Slika 80. FTIR spektri taloga dobivenih prije (donja slika) i nakon (gornja slika) 24 h inkubacije a) TiO_2 nanočestica (TiNP), b) TiO_2 nanopločica (TiNPI), c) titanatnih nanocjevčica (TiNT) i d) titanatnih nanožica (TiNW) s albuminom iz goveđeg seruma (BSA) pri 37°C .

Očekivano, u difraktogramima praha nisu uočene promjene osim u slučaju TiNW. Nakon inkubiranja TiNW s BSA dolazi do proširivanja difrakcijskih maksimuma što je moguće posljedica mijenjanja površinskih svojstava nakon 24 h inkubacije. Na FTIR spektrima se, uz vrpce karakteristične za TiNM i istežanja fosfatne i hidroksilne skupine, javljaju i apsorpcijski maksimumi slabog intenziteta karakteristični za BSA pri oko 2895 , 1540 i 680 cm^{-1} koji odgovaraju istežanju N–H skupine amida, C–N istežanju i N–H savijanju amid II te N–H savijanju amid V.^{283–285}

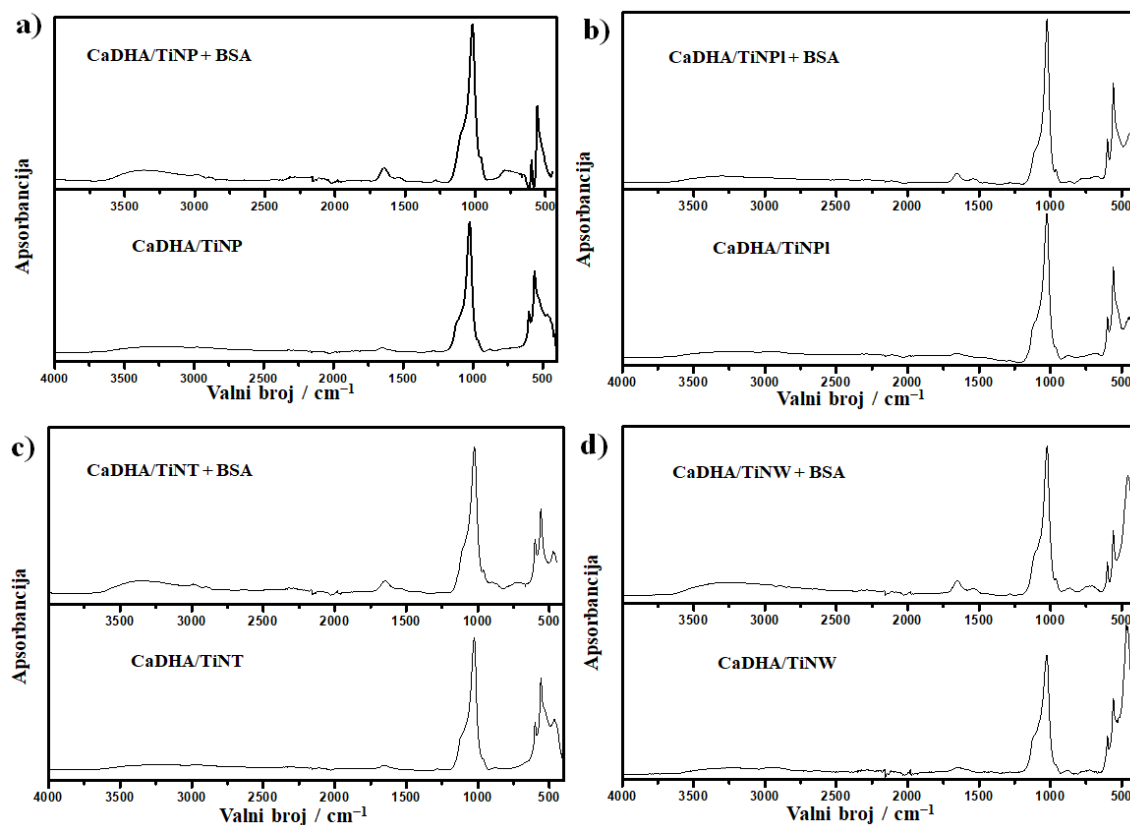
Na slikama 81 i 82 prikazani su difraktogrami praha i FTIR spektri nakon 24 sata inkubacije CaDHA/TiNM kompozita s BSA. Jednako kao i u slučaju TiNM, na difraktogramima praha nisu uočene promjene. U svim slučajevima prisutni su difrakcijski maksimumi karakteristični

za TiNM te CaDHA pri oko 26° i 32° što ukazuje da adsorpcijom BSA ne dolazi do promjene sastava CaDHA.



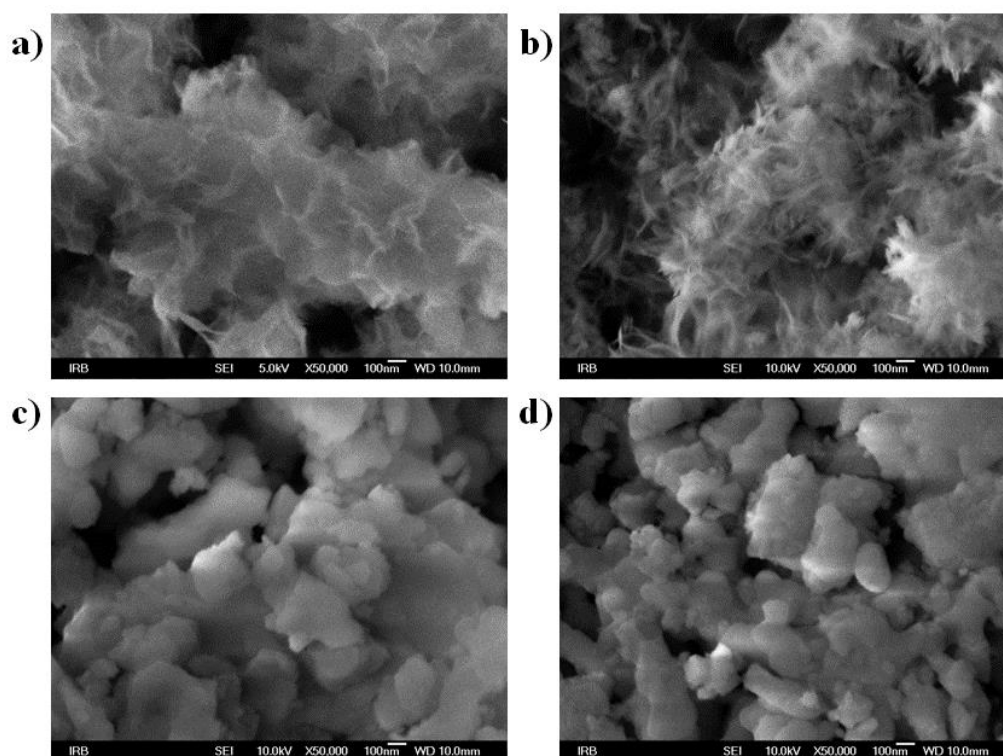
Slika 81. Difraktogrami praha uzoraka dobivenih prije (donja slika) i nakon (gornja slika) 24 h inkubacije nanokompozita kalcijevih fosfata i a) TiO_2 nanočestica (TiNP), b) TiO_2 nanopločica (TiNPI), c) titanatnih nanocjevčica (TiNT) i d) titanatnih nanožica (TiNW) pri 37°C albuminom iz goveđeg seruma (BSA).

FTIR spektri potvrđuju da je došlo do adsorpcije BSA jer su vidljive vrpce C–N istežanja i N–H savijanja amid II i III skupina između 1300 i 1500 cm^{-1} . U slučaju CaDHA/TiNT kompozita javljaju se apsorpcijski maksimumi slabog intenziteta pri oko 2900 cm^{-1} koji odgovaraju N–H savijanju slobodnog amonijevog iona.



Slika 82. FTIR spektri taloga dobivenih prije (donja slika) i nakon (gornja slika) 24 h inkubacije nanokompozita kalcijevih fosfata i a) TiO₂ nanočestica (TiNP), b) TiO₂ nanopločica (TiNPl), c) titanatnih nanocjevčica (TiNT) i d) titanatnih nanožica (TiNW) s albuminom iz goveđeg seruma (BSA) pri 37 °C.

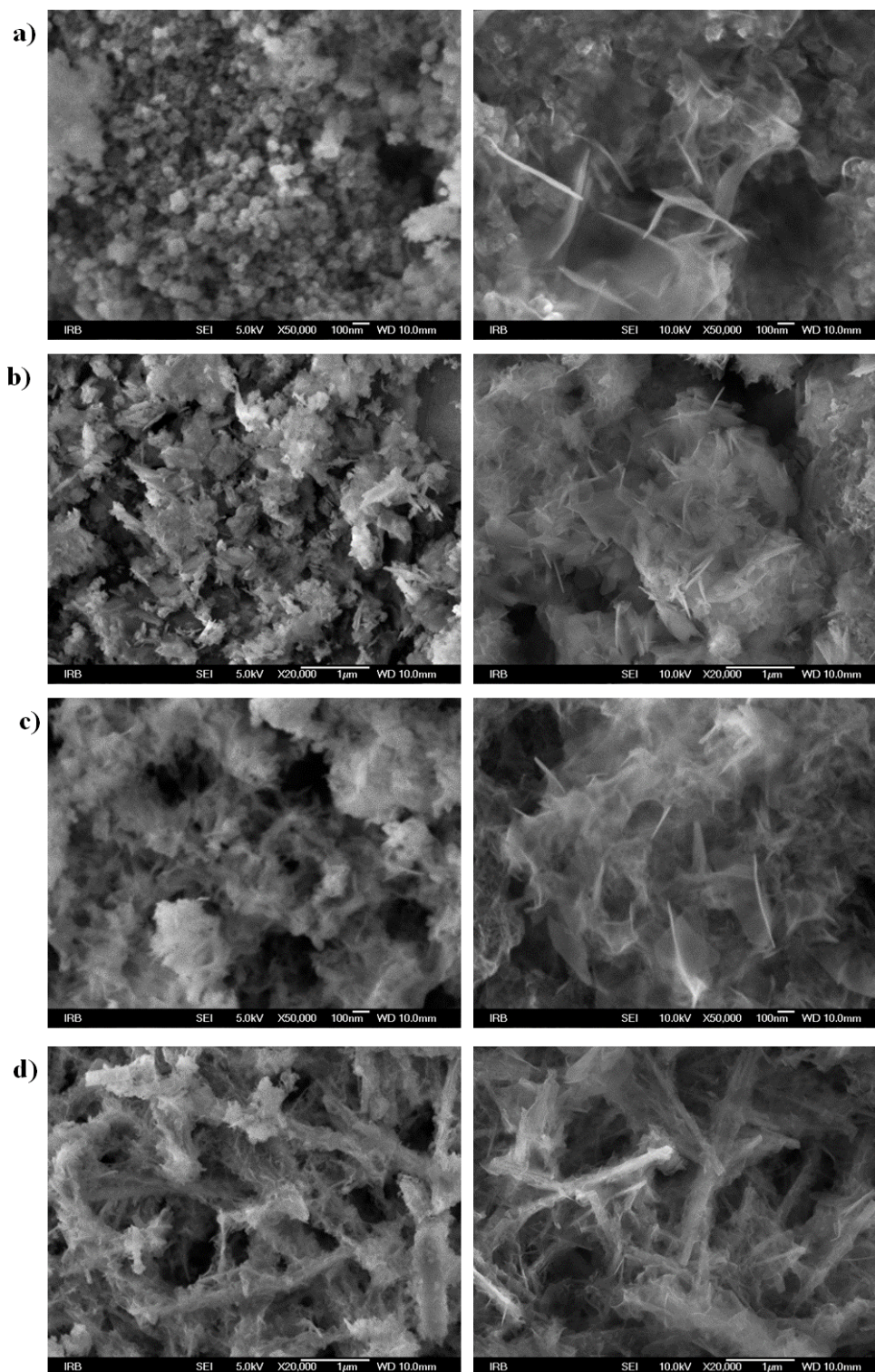
Iako ne utječe na sastav i strukturu, adsorpcija BSA utječe na morfologiju CaDHA u čijem prisustvu nastaju izduženi kristali CaDHA kompaktnije pakirani u odnosu na kontrolni sustav (slika 83 a i b). HAP taloži u obliku nejednakih prizmatičnih čestica čiji rubovi postaju zaobljeni u prisustvu BSA (slika 83 c i d).



Slika 83. SEM mikrografije prije (a i c) i nakon (b i d) 24 h adsorpcije albumina iz goveđeg seruma (BSA) na: a) i b) kalcij – deficijenti hidroksiapatit (CaDHA) i c) i d) hidroksiapatit (HAP) pri 37 °C.

Na TiNM se ne očekuje nikakva promjena u strukturi nakon adsorpcije BSA stoga je SEM analiza napravljena još na CaDHA/TiNM kompozitima. SEM mikrografije CaDHA/TiNM prije i nakon 24 sata inkubacije s BSA prikazane su na slici 84. BSA utječe na morfologiju svih kompozita u čijem su prisustvu primijećeni listićavi kristali veći nego prije adsorpcije.

Na temelju navedenih podataka može se zaključiti da inkubacija s BSA u trajanju od 24 sata ne utječe na svojstva CaDHA i CaDHA/TiNM što omogućava praćenje kinetike takvih procesa.



Slika 84. SEM mikrografije prije (lijeve slike) i nakon (desne slike) 24 h inkubacije nanokompozita kalcijevih fosfata i a) TiO₂ nanočestica (TiNP), b) TiO₂ nanopločica (TiNPl), c) titanatnih nanocjevčica (TiNT) i d) titanatnih nanožica (TiNW) s albuminom iz govedjeg seruma (BSA) pri 37 °C.

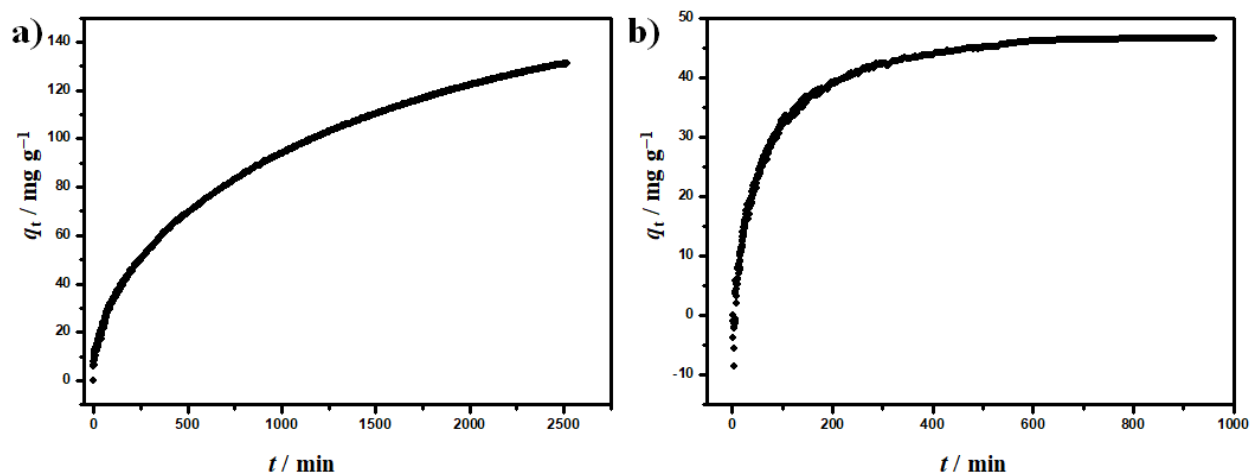
4.4.1.2. Praćenje kinetike adsorpcije albumina

Na slikama 85 – 87 prikazane su krivulje kinetike adsorpcije BSA na CaDHA, HAP, TiNM te CaDHA/TiNM. Motiv određivanja kinetike adsorpcije BSA na CaDHA i HAP, usporedba je dvije vrste CaP koje se navode kao faze najsličnije anorganskoj komponenti kostiju. Iako se u većini istraživanja koristi stehiometrijski HAP, CaDHA je zanimljiv jer je nestehiometrijska faza, kakav je i biološki apatit.

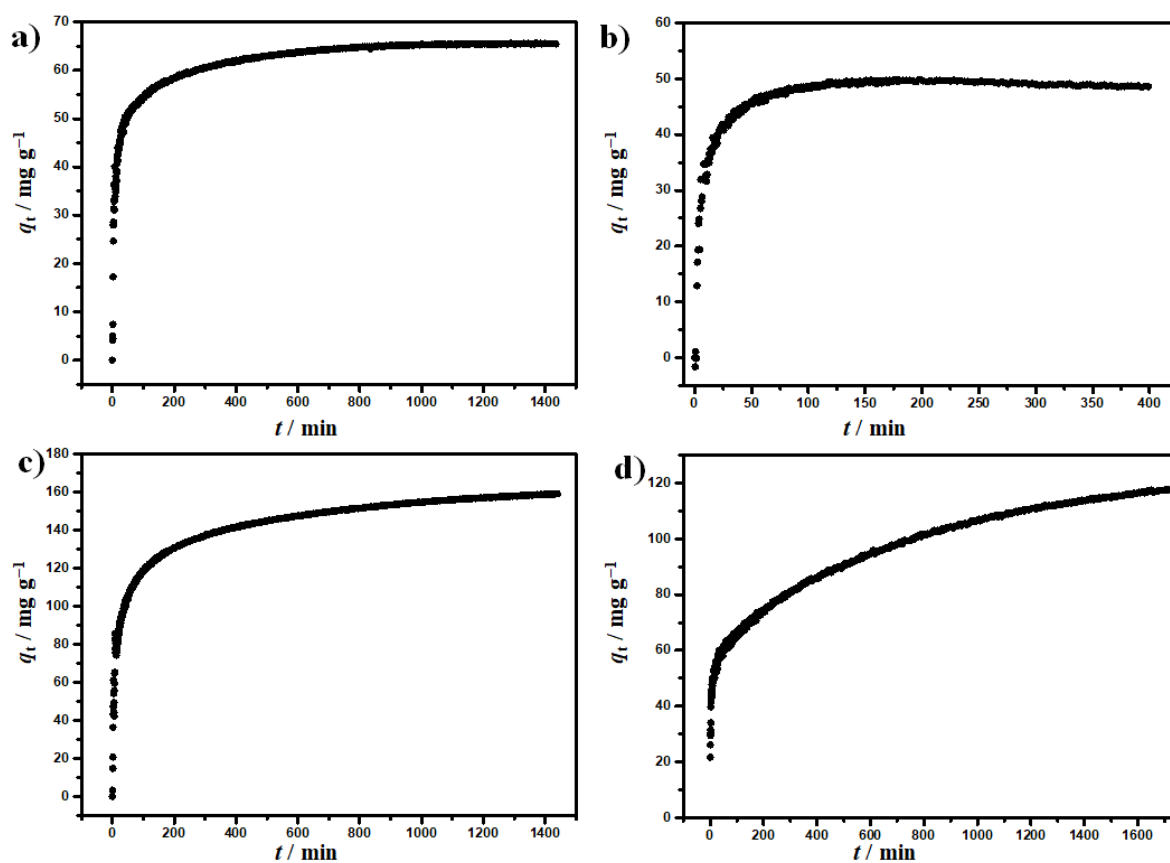
Pri eksperimentalnim uvjetima korištenim u ovim istraživanjima, BSA i sve vrste adsorbensa negativno su nabijene (tablica 15). U takvim slučajevima adsorpcija je posljedica posebnih međudjelovanja proteina sa supstratom, a popraćena je promjenama konformacije ili selektivne orijentacije proteina.^{236,378}

Tablica 30. Specifična površina određena BET metodom i zeta potencijal u otopini fosfatnog pufera (PBS-a) kalcij – deficitarnog hidroksiapatita (CaDHA), hidroksiapatita (HAP), TiO₂ nanočestica (TiNP), TiO₂ nanopločica (TiNPl), titanatnih nanocjevčica (TiNT), titanatnih nanožica (TiNW) te njihovih nanokompozita s kalcijevim fosfatima (CaDHA/TiNP, CaDHA/TiNPl, CaDHA/TiNT i CaDHA/TiNW).

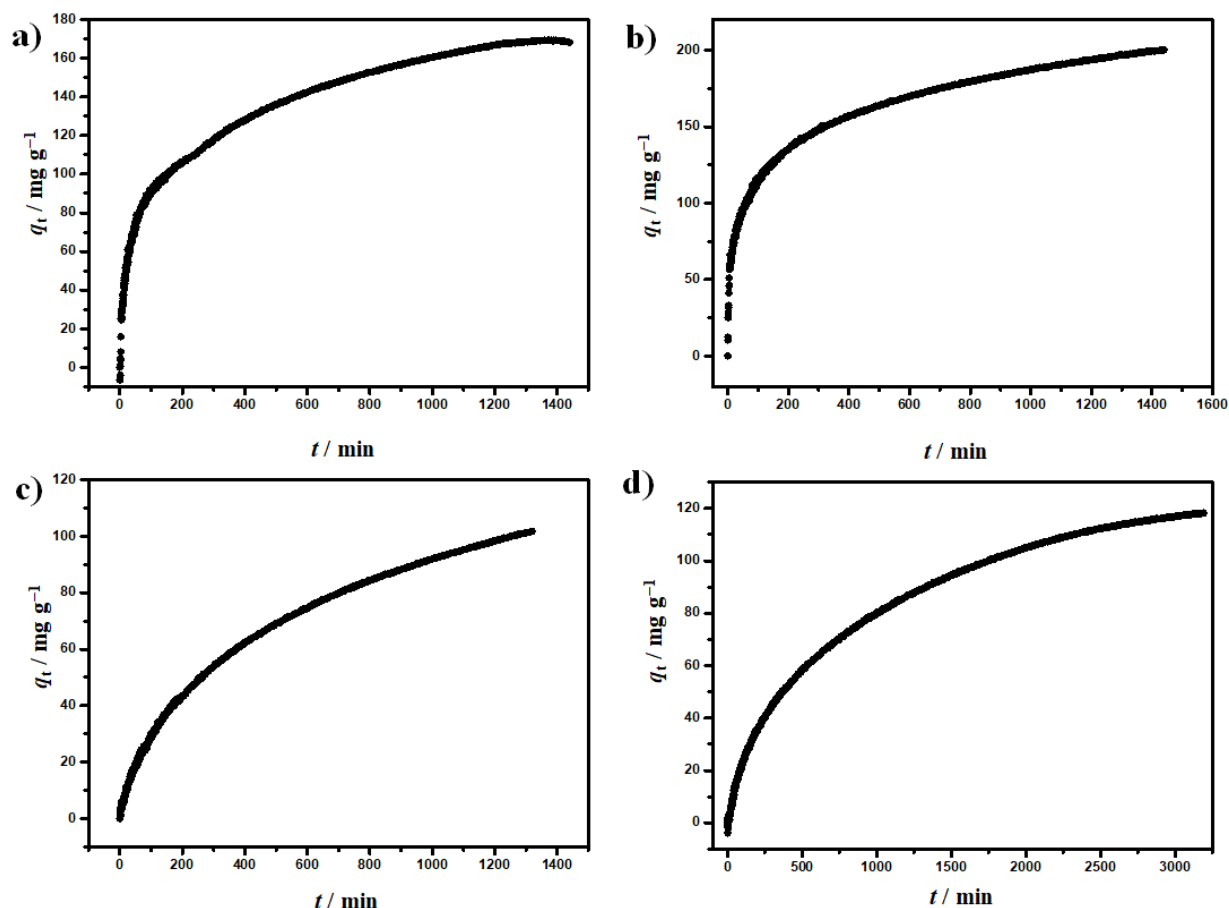
Materijal	S _{BET} / m ² g ⁻¹	ζ / mV
TiNP	71,51	-23,2 ± 1,0
TiNPl	24,70	-24,5 ± 1,5
TiNT	170,97	-21,4 ± 1,2
TiNW	21,49	-21,2 ± 0,9
CaDHA	81,81	-12,6 ± 0,6
HAP	12,00	-19,9 ± 1,2
CaDHA/TiNP	53,32	-12,4 ± 0,5
CaDHA/TiNPl	51,66	-12,0 ± 0,8
CaDHA/TiNT	111,14	-13,6 ± 1,1
CaDHA/TiNW	35,80	-12,3 ± 0,9



Slika 85. Kinetika adsorpcije albumina iz goveđeg seruma na: a) kalcij – deficijenti hidroksiapatit i b) hidroksiapatit pri 37 °C.



Slika 86. Kinetika adsorpcije albumina iz goveđeg seruma na: a) TiO₂ nanočestice, b) TiO₂ nanopločice, c) titanatne nanocjevčice i d) titanatne nanožice pri 37 °C.



Slika 87. Kinetika adsorpcije albumina iz goveđeg seruma na nanokompozite kalcijevih fosfata i a) TiO_2 nanočestica, b) TiO_2 nanopločica, c) titanatnih nanocjevčica i d) titanatnih nanožica pri 37°C .

Rezultati su prikazani kao ovisnost adsorpcijskog kapaciteta (q_t) o vremenu. Na svim istraživanim materijalima, adsorpcija se odvija u dva koraka. Prvi korak je brza početna adsorpcija koju prati drugi sporiji korak ili korak u kojemu se postiže ravnoteža. U slučaju CaDHA, TiNW te svih vrsta kompozita ne uspostavlja se ravnoteža, već krivulja q_t u ovisnosti o t konstantno raste. Takvo ponašanje uočeno je i u prethodnim istraživanjima adsorpcije BSA na HAP nanožice³⁷⁸ i na granule dvofazne keramike kalcijevih fosfata³⁷⁹. Slično ponašanje u slučaju CaDHA i kompozita može se pripisati potpunoj prekrivenosti površine CaDHA, odnosno činjenici da je sastav površine na koji se BSA veže u tim slučajevima jednak. Razlika u trajanju uspostave ravnoteže između CaDHA i HAP može biti posljedica razlike u strukturi. HAP je stehiometrijska faza koja ima sređenu strukturu površine na koju dolazi do adsorpcije BSA.

Vrijeme uspostave ravnoteže na HAP iznosi 600 min. Ravnoteža se najbrže uspostavlja prilikom adsorpcije BSA na TiNPI, nakon 150 min, dok u slučaju adsorpcije na TiNP i TiNT ta vremena iznose oko 800 min. Prethodnim istraživanjima pokazano je da vrijeme uspostave ravnoteže za istu vrstu adsorbensa ovisi o specifičnoj površini, morfologiji i veličini. Pri sličnim eksperimentalnim uvjetima, ravnoteža se prije uspostavila u slučaju adsorpcije BSA na HAP i titanijeve prevlake³⁸⁰ nego na odgovarajuće nanomaterijale.^{236,381} Zeng i sur. istraživali su kinetiku adsorpcije BSA na površinu HAP premaza dobivenog ionskim raspršivanjem.³⁸⁰ U tom slučaju, ravnoteža je postignuta za manje od 15 minuta. Ukoliko se BSA adsorbira na HAP nanožice, vremena potrebna da se postigne ravnoteža mnogo su dulja te ovise o veličini nanožica. U slučaju HAP nanožica duljine 28 nm, navedeno vrijeme iznosi 1 sat.²³⁶ Ukoliko se koriste HAP nanožice duljine 96 nm, vrijeme uspostave ravnoteže nije postignuto čak niti nakon 30 sati.³⁷⁸

Dobiveni rezultati obrađeni su PFO, PSO i IPD modelom. Parametri određeni prema navedenim modelima, kao i odgovarajuće vrijednosti ajdR^2 parametara, eksperimentalno određenih i izračunatih vrijednosti q_e i Γ_e dani su u tablicama 31 – 33. Kinetika adsorpcije BSA na sve vrste adsorbensa najbolje se može opisati PSO modelom. Thakur i sur. proučavali su kinetiku adsorpcije BSA na TiNP pripremljene sol-gel metodama i sušenih pri različitim temperaturama.³⁷⁷ Kinetika adsorpcije u svim slučajevima najbolje se mogla modelirati PFO modelom. Slično navedenom istraživanju, Kopac i sur. istraživali su kinetiku adsorpcije BSA na TiO₂ nanočestice različitih specifičnih površina dobivenih tretmanima pri različitim temperaturama. Jednako kao i Thakur i sur. zaključili su da se kinetika adsorpcije najbolje može opisati PFO modelom.³⁸¹ S druge strane, Ranjan i sur. pokazali su da se kinetika adsorpcije BSA na TiNP nano veličine, može najbolje opisati PSO modelom.³⁸² Navedena istraživanja rađena su pri različitim eksperimentalnim uvjetima što otežava usporedbu dobivenih rezultata.

Wang i Guo uspoređivali su karakteristike PFO i PSO modela te su zaključili da PSO model najbolje opisuje podatke u slučaju kada adsorbens sadrži puno aktivnih mjesta na kojima može doći do adsorpcije i kada je početna koncentracija adsorbata vrlo mala. Matematička analiza pokazala je da je PFO poseban oblik PSO modela koji dobro opisuje početne stadije adsorpcije. Također je pokazano da, tokom vremena, adsorpcijski koeficijent modeliran PFO parametrima doseže plato, dok u slučaju PSO krivulje rastu ne dosežući plato.³⁸³ Upravo takvo ponašanje primijećeno je u svim vrstama kompozitnih materijala kao i CaDHA što potvrđuje valjanost PSO modela.

Tablica 31. Vrijednosti parametara modela-prvog-reda (PFO), pseudo-drugog-reda (PSO) i unutarčestične difuzije (IPD) za kinetiku adsorpcije albumina iz goveđeg seruma (BSA) na kalcij-deficijentni hidroksiapatit (CaDHA) i hidroksiapatit (HAP) pri 37 °C. $q_{e,exp}$ je eksperimentalno određena maksimalna vrijednost adsorpcijskog kapaciteta, $\Gamma_{e,exp}$ je eksperimentalno određena maksimalna vrijednost površinske koncentracije, k_1 , k_2 i k_{id} su koeficijenti brzine PFO, PSO i IPD modela, a C je konstanta IPD modela koja govori o debljini međupovršinskog sloja.

Model	Parametar	CaDHA	HAP
	$q_{e,exp} / \text{mg g}^{-1}$	$130,59 \pm 16,17$	$46,55 \pm 3,21$
	$\Gamma_{e,exp} / \text{mg m}^{-2}$	$1,60 \pm 0,20$	$3,88 \pm 0,27$
PFO	$10^{-2} k_1 / \text{min}^{-1}$	$3,89 \pm 0,68$	$1,54 \pm 0,34$
	$q_e / \text{mg g}^{-1}$	$119,28 \pm 14,52$	$44,30 \pm 3,72$
	adjR ²	0,96	0,98
PSO	$10^{-4} k_2 / \text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$	$3,32 \pm 0,09$	$3,15 \pm 0,35$
	$q_e / \text{mg g}^{-1}$	$145,09 \pm 6,68$	$50,31 \pm 2,15$
	adjR ²	0,98	0,99
IPD	$k_{id} / \text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0,5}$	$2,62 \pm 0,04$	$1,36 \pm 0,02$
	$C / \text{mg g}^{-1}$	$7,19 \pm 0,18$	$14,76 \pm 0,22$
	adjR ²	0,99	0,75

Tablica 32. Vrijednosti parametara modela pseudo-prvog reda (PFO), pseudo-drugog reda (PSO) i unutarčestične difuzije (IPD) za kinetiku adsorpcije albumina iz goveđeg seruma (BSA) na TiO₂ nanočestice (TiNP), titanatne nanocjevčice (TiNT), titanatne nanožice (TiNW) i TiO₂ nanopločice (TiNPI) pri 37 °C. $q_{e,exp}$ je eksperimentalno određena maksimalna vrijednost adsorpcijskog kapaciteta, $\Gamma_{e,exp}$ je eksperimentalno određena maksimalna vrijednost površinske koncentracije, k_1 , k_2 i k_{id} su koeficijenti brzine PFO, PSO i IPD modela, a C je konstanta IPD modela koja govori o debljini međupovršinskog sloja.

Model	Parametar	TiNP	TiNPI	TiNT	TiNW
	$q_{e,exp} / \text{mg g}^{-1}$	65,48 ± 7,13	41,54 ± 2,58	158,58 ± 20,05	117,83 ± 10,22
	$\Gamma_{e,exp} / \text{mg m}^{-2}$	0,92 ± 0,10	1,93 ± 0,10	0,93 ± 0,12	5,48 ± 0,48
PFO	$10^{-2} k_1 / \text{min}^{-1}$	5,73 ± 0,69	7,76 ± 3,72	2,78 ± 0,41	1,16 ± 0,31
	$q_e / \text{mg g}^{-1}$	59,46 ± 5,45	48,20 ± 2,63	139,48 ± 13,48	99,03 ± 6,12
	adjR ²	0,69	0,92	0,69	0,52
PSO	$10^{-4} k_2 / \text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$	20,07 ± 6,60	31,18 ± 7,38	3,58 ± 0,36	2,39 ± 0,67
	$q_e / \text{mg g}^{-1}$	63,01 ± 5,13	50,89 ± 3,97	150,04 ± 10,03	106,49 ± 6,91
	adjR ²	0,91	0,98	0,90	0,93
IPD	$k_{id} / \text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0,5}$	0,69 ± 0,01	1,26 ± 0,02	2,17 ± 0,04	1,84 ± 0,03
	$C / \text{mg g}^{-1}$	45,16 ± 0,74	33,54 ± 0,52	90,59 ± 1,12	47,07 ± 0,81
	adjR ²	0,63	0,45	0,78	0,98

Tablica 33. Vrijednosti parametara modela pseudo-prvog reda (PFO), pseudo-drugog reda (PSO) i unutarčestične difuzije (IPD) za kinetiku adsorpcije albumina iz goveđeg seruma (BSA) na nanokompozite kalcijevih fosfata i TiO₂ nanočestica (CaDHA/TiNP), titanatnih nanocjevčica (CaDHA/TiNT), titanatnih nanožica (CaDHA/TiNW) i TiO₂ nanopločica (CaDHA/TiNPI) pri 37 °C. $q_{e,exp}$ je eksperimentalno određena maksimalna vrijednost adsorpcijskog kapaciteta, $\Gamma_{e,exp}$ je eksperimentalno određena maksimalna vrijednost površinske koncentracije, k_1 , k_2 i k_{id} su koeficijenti brzine PFO, PSO i IPD modela, a C je konstanta IPD modela koja govori o debljini međupovršinskog sloja.

Model	Parametar	CaDHA/TiNP	CaDHA/TiNPI	CaDHA/TiNT	CaDHA/TiNW
	$q_{e,exp} / \text{mg g}^{-1}$	168,92 ± 33,32	199,62 ± 12,11	100,89 ± 7,22	117,62 ± 16,69
	$\Gamma_{e,exp} / \text{mg m}^{-2}$	3,17 ± 0,62	3,86 ± 0,23	0,91 ± 0,06	3,28 ± 0,47
PFO	$10^{-2} k_1 / \text{min}^{-1}$	2,51 ± 0,45	1,11 ± 0,08	0,35 ± 0,06	2,90 ± 1,08
	$q_e / \text{mg g}^{-1}$	148,58 ± 15,21	172,68 ± 13,44	94,67 ± 6,68	112,16 ± 9,35
	adjR ²	0,84	0,77	0,98	0,77
PSO	$10^{-4} k_2 / \text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$	0,86 ± 0,16	0,92 ± 0,00	0,24 ± 0,02	2,52 ± 0,07
	$q_e / \text{mg g}^{-1}$	165,58 ± 14,02	188,86 ± 9,99	122,17 ± 12,88	138,42 ± 11,15
	adjR ²	0,94	0,90	0,99	0,99
IPD	$k_{id} / \text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0,5}$	3,63 ± 0,05	3,78 ± 0,05	2,98 ± 0,04	2,26 ± 0,04
	$C / \text{mg g}^{-1}$	48,54 ± 0,76	72,21 ± 1,16	/	1,94 ± 0,03
	adjR ²	0,93	0,93	0,99	0,98

Eksperimentalno određena maksimalna površinska koncentracija ($\Gamma_{e,exp}$) CaDHA manja je u odnosu na HAP. Manja vrijednost površinske koncentracije može biti posljedica puno sporije uspostave ravnoteže. U slučaju adsorpcije na nanomaterijale, najveća vrijednost $\Gamma_{e,exp}$ određena je za TiNW što je u skladu s prethodnim istraživanjima koja ukazuju na značaj veličine čestica adsorbensa.^{236,378} Uspoređujući vrijednosti TiNP i TiNPI, pokazano je da je $\Gamma_{e,exp}$ vrijednost određena za TiNPI za red veličine veća u odnosu na TiNP. Takvo ponašanje, slično je razlici CaDHA i HAP te može biti posljedica puno brže uspostave ravnoteže na TiNPI. Eksperimentalno određene površinske koncentracije BSA na TiNP i TiNPI manje su od vrijednosti dobivene za njihove kompozite. U slučaju izduženih titanatnih nanomaterijala, TiNW i TiNT, takav trend nije uočen. Općenito, najmanja vrijednost površinske koncentracije određena je za CaDHA/TiNT kompozite što može biti posljedica razlike u orijentaciji kristala.

Iako se eksperimentalno određene površinske koncentracije CaDHA i HAP značajno razlikuju, koeficijenti brzine kojoj se BSA adsorbira na njihove površine gotovo je jednaka. Ta vrijednost vrlo je slična brzini adsorpcije na jednodimenzionalne izdužene nanomaterijale, TiNT i TiNW. S druge strane, koeficijent brzine adsorpcije pseudo – drugog reda u slučaju TiNP i TiNPI za red veličine veći je u odnosu na TiNT i TiNW. Koeficijenti brzine adsorpcije BSA na CaDHA/TiNM manji su u odnosu na TiNM i CaDHA.

Kao što je opisano u Poglavlju 2.4., adsorpcija je rezultat nekoliko koraka. Općenito, koeficijenti brzine adsorpcije određeni PSO ili PFO modelima rezultat su i utjecaja kemijskih reakcija i difuzije adsorbata te se iz njih ne mogu dobiti informacije o mehanizmu adsorpcije. Kako bi se dobilo više informacija o mehanizmu adsorpcije, eksperimentalni podatci obrađeni su modelom IPD, točnije Weber i Morrisovim opisom IPD modela. Ukoliko je unutarčestična difuzija korak koji određuje brzinu reakcije, linearna regresija dat će pravac koji prolazi kroz ishodište (0). Ukoliko IPD nije korak koji određuje brzinu reakcije, mogu se razlikovati dijelovi krivulje različitih nagiba.^{382,384} U slučaju CaDHA, TiNW i svih kompozita eksperimentalni podaci mogu se opisati IPD modelom. S obzirom da u slučaju navedenih adsorbensa, osim CaDHA/TiNT, navedeni pravci ne prolaze kroz ishodište, IPD nije jedini korak koji određuje brzinu reakcije.^{236,382}

4.4.2. Spektroskopsko istraživanje međudjelovanja albumina s kalcijevim fosfatima, titanatnim nanomaterijalima i njihovim kompozitima

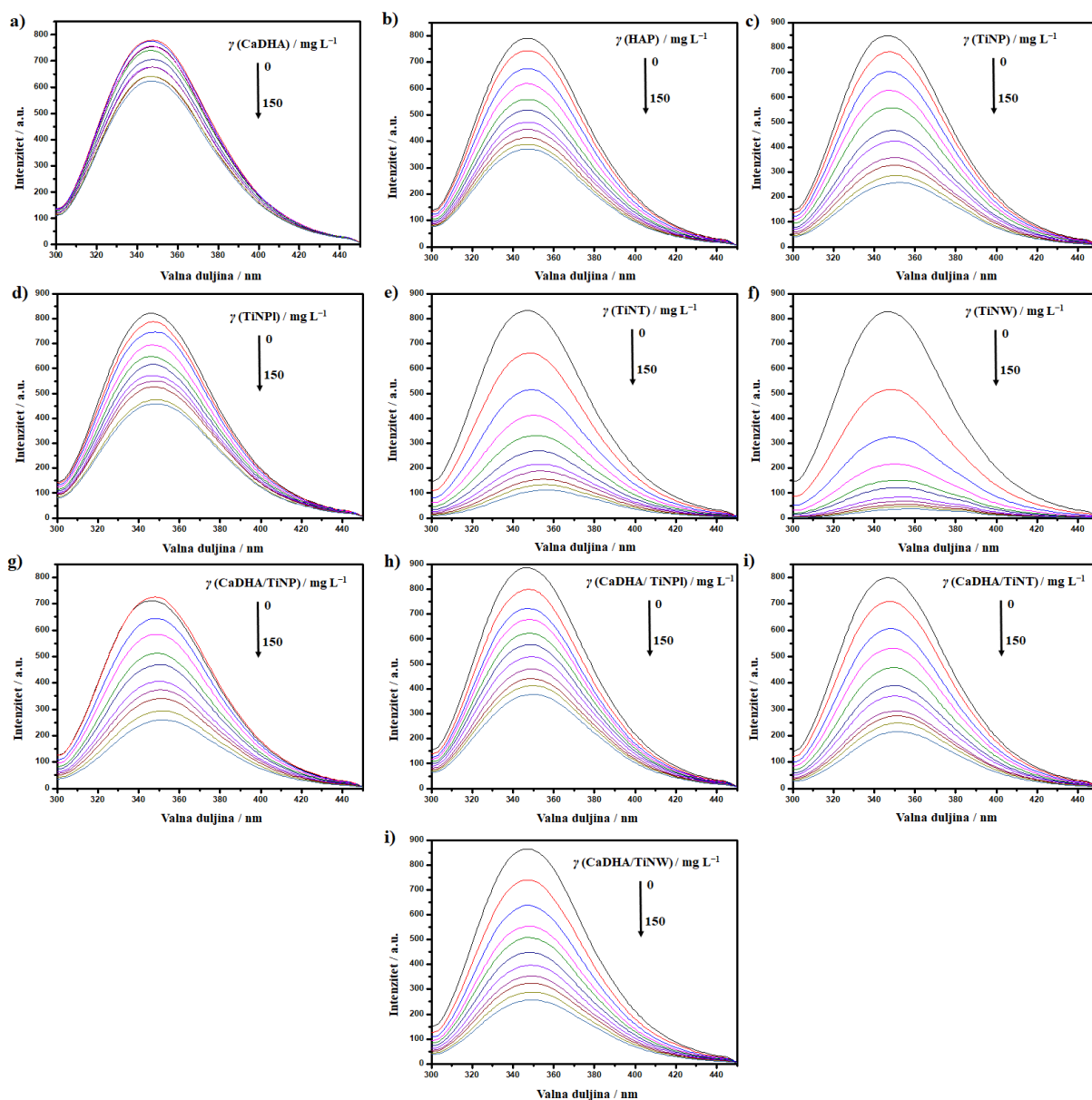
Serumski proteini zbog već objašnjenih svojstava i uloge u ljudskom organizmu vrlo su bitni spojevi u razvoju novih materijala za primjenu u regeneraciji koštanog tkiva. Osim adsorpcije takvih proteina, bitno je proučavati njihovo međudjelovanje s materijalima od interesa. Vrlo se često u ovakvim vrstama istraživanja koristi albumin iz seruma i to najčešće goveđeg podrijetla (BSA). BSA može reverzibilno vezati vrlo velik broj molekula. Do sada su se istraživala međudjelovanja BSA s različitim lijekovima, flavonoidima, bojama, itd.^{385–389}. U novije vrijeme istraživanja su usmjerena na određivanje međudjelovanja s nanočesticama, prvenstveno sa srebrnim.^{260,263,390,391}

U današnje doba, fluorescencijska mjerenja koriste se za dobivanje informacija o vezanju makromolekula na čestice.³⁹² Istraživanje međudjelovanja BSA s odabranim materijalima moguće je pratiti mjerenjem fluorescencijskih spektara jer su fluorescencijska svojstva serumskih albumina vrlo ovisna o mikrookolišu.²⁶¹ Gašenje fluorescencije posljedica je i

najmanje promjene u lokalnom okruženju serumskih albumina, kao što su konformacijski prijelazi, vezanja drugih molekula i denaturacija.²⁶³ Prema trenutno dostupnoj literaturi, jedino su Kathiravan i Renganathan te Pandit i Kundu *in situ* istraživali međudjelovanje koloidnih nanočestica TiO₂ s BSA.^{393,394} Kathiravan i Renganathan fluorescencijskim mjerenjima odredili su broj veznih mjesta (n) i prividnu konstantu vezanja BSA na TiO₂. U svojim mjerenjima koristili su TiNP u rasponu koncentracija $1 - 6 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ te su u takvom slučaju izmjerili konstantu vezanja $5,25 \cdot 10^5$ mol⁻¹ dm³, dok je broj veznih mjesta 1,04.³⁹³

Fluorescencijski spektri BSA i BSA u prisutnosti CaDHA, HAP, TiNM i CaDHA/TiNM prikazani su na slici 88. Maksimum intenziteta emisije BSA u fluorescencijskom spektru nalazi se na 348 nm pri valnoj duljini ekscitacije 278 nm. Dodatkom CaDHA, HAP, TiNM ili CaDHA/TiNM dolazi do smanjenja intenziteta emisije odnosno do njezinog gašenja (engl. *quenching*). Općenito, gašenje fluorescencije posljedica je međudjelovanja fluorofora s molekulom utišavača različitim mehanizmima poput međudjelovanja pobuđenih stanja, molekularnih reorganizacija, transfera energije, kolizije te stvaranja kompleksa osnovnog stanja.³⁹² Kolizijom, odnosno dinamičkim utišavanjem, fluorofor i utišavač međudjeluju tijekom poluživota pobuđenog stanja, dok se statičko utišavanje odnosi na nastajanje kompleksa osnovnog stanja fluorofora i molekule utišavača.³⁹²

Prilikom fluorescencijskih mjerenja, potrebno je provjeriti prisutnost efekta unutrašnjeg filtera. U odabranim sustavima, efekt unutrašnjeg filtera uočen je jedino u sustavima koji su sadržavali TiNW, stoga su vrijednosti maksimuma fluorescencije u takvim sustavima korigirane prema jednadžbi 34.

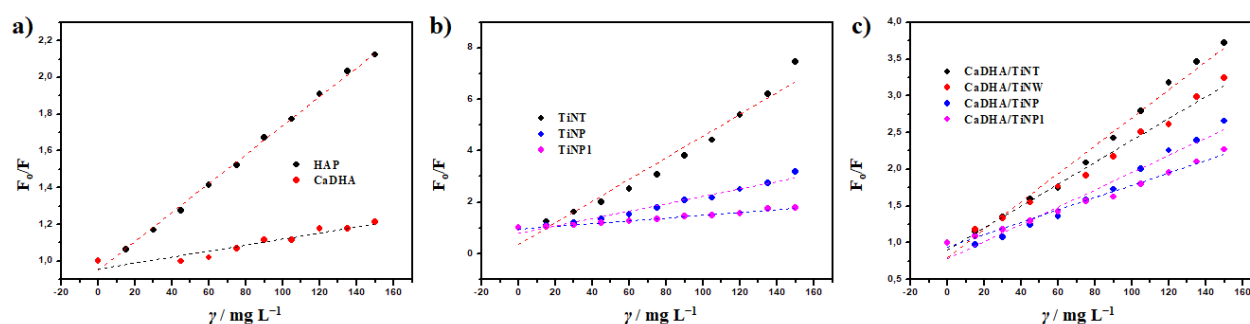


Slika 88. Fluorescencijski spektri (od vrha prema dnu) albumina iz goveđeg seruma (BSA) i BSA u prisutnosti 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 i 150 mg L^{-1} a) kalcij – deficijentnog hidroksiapatita (CaDHA), b) hidroksiapatita (HAP), c) TiO_2 nanočestica (TiNP), d) TiO_2 nanopločica (TiNPI), e) titanatnih nanocjevčica (TiNT), f) titanatnih nanožica (TiNW) te nanokompozita kalcijevih fosfata i g) TiNP (CaDHA/TiNP), h) TiNPI (CaDHA/TiNPI), i) TiNT (CaDHA/TiNT) i j) TiNW (CaDHA/TiNW) pri 37 °C.

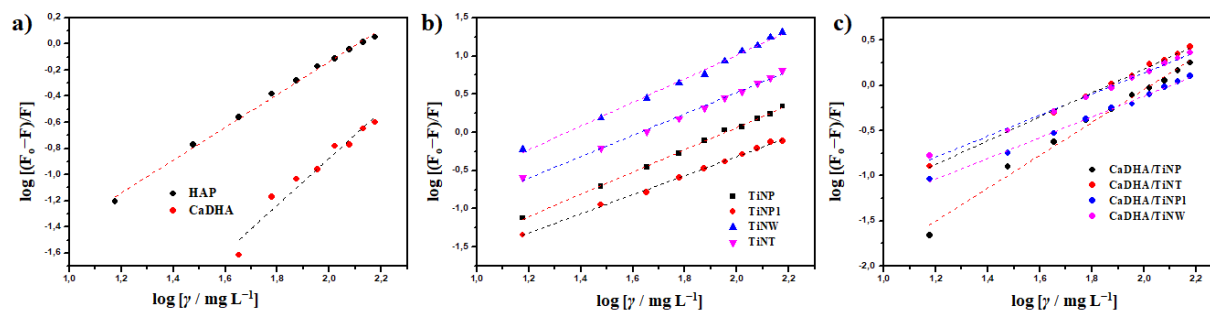
Povećanjem koncentracije adsorbensa maksimum intenziteta fluorescencije pomiče se prema manjim vrijednostima valne duljine. Pomak valne duljine maksimuma fluorescencije dokaz je da dolazi do međudjelovanja proteina sa odabranim materijalom. Pomak prema

manjim vrijednostima valne duljine naziva se plavi pomak i posljedica je pomaka Trp aminokiselinskog ostatka u hidrofobnije okruženje. Suprotno tome, pomak prema veći vrijednostima valnih duljina naziva se crveni pomak i posljedica je veće izloženosti Trp otapalu. Plavi pomak ukazuje na moguće promjene tercijarne strukture proteina kada se veže na površinu CaDHA, HAP, TiNM ili CaDHA/TiNM.³⁹⁵ Pandit i sur. u svom istraživanju međudjelovanja TiNP s BSA uočili su crveni pomak maksimuma fluorescencije.³⁹⁴

Obradom podataka dobivenih fluorimetrijskim mjerenjima moguće je dobiti nekoliko informacija: Stern-Volmerovu konstantu (K_{sv}), konstantu vezanja (K_b) i broj veznih mjesta (n). Dani pravci prikazani su na slikama 89 i 90. Ovisnost F_0/F o γ u slučaju TiNT nije linearna što je posljedica utišavanja fluorescencije nastajanjem kompleksa višeg stanja i kolizije čestica, odnosno istovremene prisutnosti statičkog i dinamičkog utišavanja.³⁹² U svim drugim slučajevima, utišavanje fluorescencije posljedica je kolizije čestice fluorofora i utišavača, dinamičkog utišavanja.³⁹⁴



Slika 89. Određivanje Stern-Volmerove konstante (K_{sv}) međudjelovanja albumina iz goveđeg seruma (BSA) i a) kalcij – deficijentnog hidroksiapatita (CaDHA) i hidroksiapatita (HAP), b) TiO_2 nanočestica (TiNP), titanatnih nanocjevčica (TiNT), titanatnih nanožica (TiNW) i TiO_2 nanopločica (TiNPI) te c) njihovih kompozita s kalcijevim fosfatima CaDHA/TiNP, CaDHA/TiNT CaDHA/TiNW i CaDHA/TiNPI pri 37 °C.



Slika 90. Određivanje konstante vezanja (K_b) i broja veznih mjesta (n) za reakciju međudjelovanja albumina iz goveđeg seruma (BSA) i a) kalcij – deficijentnog hidroksiapatita (CaDHA) i hidroksiapatita (HAP), b) TiO_2 nanočestica (TiNP), titanatnih nanocjevčica (TiNT), titanatnih nanožica (TiNW) i TiO_2 nanopločica (TiNPI) te c) njihovih kompozita s kalcijevim fosfatima CaDHA/TiNP, CaDHA/TiNT CaDHA/TiNW i CaDHA/TiNPI pri 37 °C.

Vrijednosti konstanti K_{sv} i K_b kao i broj veznih mjesta dani su u tablici 34.

Tablica 34. Prividna konstanta asocijacije (K_{app}), Stern-Volmerova konstanta (K_{sv}), konstanta vezanja (K_b) i broj veznih mjesta (n) za međudjelovanje albumina iz goveđeg seruma (BSA) i kalcij – deficijentnog hidroksiapatita (CaDHA), hidroksiapatita (HAP), TiO_2 nanočestica (TiNP), titanatnih nanocjevčica (TiNT), titanatnih nanožica (TiNW), TiO_2 nanopločica (TiNPI) te njihovih kompozita s kalcijevim fosfatima CaDHA/TiNP, CaDHA/TiNT CaDHA/TiNW i CaDHA/TiNPI pri 37 °C.

Uzorak	$K_{sv} / \text{L g}^{-1}$	$K_b / \text{L g}^{-1}$	n
CaDHA	$1,71 \pm 0,08$	$4,26 \pm 0,45$	1,51
HAP	$7,82 \pm 0,06$	$13,88 \pm 1,45$	1,26
TiNP	$14,94 \pm 0,52$	$34,13 \pm 1,23$	1,46
TiNPI	$5,49 \pm 0,07$	$8,95 \pm 0,38$	1,27
TiNT	$42,32 \pm 0,13$	$81,34 \pm 2,02$	1,39
TiNW	$15,97 \pm 0,82$	$8,57 \pm 0,25$	1,55
CaDHA/TiNP	$11,74 \pm 0,05$	$58,88 \pm 1,85$	1,83
CaDHA/TiNPI	$8,69 \pm 0,22$	$11,19 \pm 0,53$	1,15
CaDHA/TiNT	$18,82 \pm 0,81$	$30,31 \pm 1,70$	1,28
CaDHA/TiNW	$15,21 \pm 0,30$	$18,66 \pm 1,25$	1,13

Iz vrijednosti Stern-Volmerovih konstanti (K_{sv}) moguće je odrediti i vrijednost brzine gašenja fluorescencije (k_q) jer je $K_{sv}=k_q \cdot \tau_0$. Vrijeme poluživota BSA, τ_0 , iznosi $1 \cdot 10^{-8}$ s.³⁹⁶ Određivanje brzine gašenja fluorescencije omogućuje uvid o mehanizmu samog procesa. S obzirom da maksimum brzine difuzijski kontroliranog gašenja fluorescencije iznosi $10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, vrijednosti k_q iznad navedene ukazuje na statičko gašenje fluorescencije, a niže na difuzijski kontroliran proces.³⁹⁵ Kada se prema navedenim jednadžbama, i koristeći relativne molekulske mase HAP i TiO_2 , izračunaju k_q vrijednosti za navedene sustave, izračunate vrijednosti iznose od $1,71 \cdot 10^8$ do $4,23 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Izračunate k_q vrijednosti ukazuju da je gašenje fluorescencije difuzijski kontrolirano. To znači da je mnogo manje vjerojatno da će molekula i ligand prići jedno drugome nego što će međudjelovati kada budu na dovoljnoj udaljenosti jedno od drugoga. Drugim riječima, gašenje fluorescencije ovisi o frekvenciji sudara liganda i molekule koja fluorescira.

Veća vrijednost konstante vezanja, K_b , izmjerena je za HAP u odnosu na CaDHA. Općenito, konstanta vezanja BSA na CaDHA najmanja je među svim istraženim materijalima. No, izmjerene vrijednosti K_b konstante mnogo su veće za CaDHA/TiNM u odnosu na sam CaDHA. Od čistih nanomaterijala, BSA se najbolje veže na TiNT, što ukazuje na utjecaj specifične površine.

Broj veznih mjesta daje informaciju o vrsti kooperativnosti između liganda i receptora. Ukoliko je $n < 1$ vezanje je negativno kooperativno, a za slučajeve $n > 1$ vezanje je pozitivno kooperativno.³⁹⁷ Kooperativno vezanje odnosi se na slučajeve kada je broj veznih mjesta receptora koji su zauzeta ligandima nelinearna funkcija koncentracije liganda. Kooperativnost može biti pozitivna (vezanje molekule liganda povećava afinitet receptora i na taj način povećava mogućnost vezanja iduće molekule liganda) ili negativna (vezanje liganda smanjuje afinitet receptora prema ligandu i na taj način smanjuje mogućnost vezanja idućeg liganda). Kooperativno vezanje liganda može se definirati samo za one receptore koji imaju više od jednog veznog mjesta. Ukoliko receptor ima više veznih mjesta, no vezanje liganda na određeno vezno mjesto ne utječe drugo vezno mjesto, govorimo o nekooperativnom vezanju.³⁹⁷ Broj veznih mjesta za sve vrste materijala korištenih u ovom doktoratu veći je od 1, što znači da je vezanje BSA na CaDHA, HAP, TiNM i CaDHA/TiNM pozitivno kooperativno. Jednaku vrstu vezanja uočili su i Pandit i sur. prilikom vezanja BSA na TiO_2 nanočestice.³⁹⁴

§ 5. ZAKLJUČAK

S ciljem doprinosa razumijevanju utjecaja TiNM na nastajanje CaP i u svrhu unaprjeđivanja dizajna novih biomaterijala te pojednostavljenja njihove biomimetske pripreme, istražena su dva biomimetska načina sinteze kompozitnih materijala CaP i TiNM, induciranje taloženja iz simulirane tjelesne tekućine (SBF) te taloženje CaP iz suspenzije u prisutnosti TiNM.

TiNM imaju zanemarivo malu sposobnost induciranja nastajanja CaP iz SBF-a tokom 28 dana. Iako su CaP detektirani FTIR i PXRD metodama na svim istraživanim TiNM, na SEM mikrografijama male količine CaDHA vidljive su samo u prisutnosti TiNT i TiNW nakon 28 dana. U prisutnosti BSA u SBF-u dolazi do potpune inhibicije nastajanja CaP na TiNM. S obzirom na prihvaćeni mehanizam nastajanja CaP na površini titanata, slaba moć induciranja taloženja CaP može biti posljedica vrlo male apsolutne vrijednosti zeta potencijala TiNM u SBF-u.

Taloženjem CaP u prisutnosti TiNM moguće je pripremiti kompozite CaP i TiNM (CaDHA/TiNM) već nakon sat vremena. Prisutnost TiNM u manjim koncentracijama u taložnom sustavu stabilizira amorfnu fazu i inhibira njezinu transformaciju u kalcij – deficijenti hidroksiapatit (CaDHA), dok se pri većim koncentracijama TiNM ponašaju kao promotori transformacije ACP-a. Pri manjim koncentracijama, TiNM onemogućavaju kristalizaciju unutar čestica ACP dok pri većim koncentracijama ACP dominantno nastaje na površini TiNM što ubrzava njegovu transformaciju. PXRD i FTIR analize pokazale su da TiNM ne utječu na sastav i svojstva kristalne faze, a EPR analizom dokazano je da ne dolazi niti do promjene u lokalnoj strukturi CaDHA. SEM mikrografije pokazuju da kristali CaDHA rastu na površini TiNM. Dodatkom biološki aktivnih molekula u taložne sustave, BSA i kitozan, također ne dolazi do promjene sastava i strukture CaDHA, a uočljive su promjene u morfologiji istaložene faze. Dobiveni rezultati ukazuju na stabilnost CaDHA u prisutnosti različitih aditiva što može omogućiti jednostavnu pripremu njegovih kompozita.

Adsorpcija BSA na HAP, CaDHA, TiNM i CaDHA/TiNM prati kinetiku pseudo – drugog reda. U slučaju TiNM, površinska koncentracija i koeficijent brzine adsorpcije proteina ovise o morfologiji i specifičnoj površini. Pokazano je da je površinska koncentracija BSA na TiNP i TiNPI znatno manja nego na njihovim kompozitima, dok je u slučaju izduženih TiNM

površinska koncentracija na kompozitima manja od one na nanomaterijalima. Također, koeficijent brzine adsorpcije BSA na nanomaterijale anatas faze znatno veći je od koeficijenta brzine određene za izdužene TiNM. Najmanji koeficijenti brzine adsorpcije određeni su za kompozite, osim u slučaju CaDHA/TiNW. To može biti posljedica različite orijentacije kristala CaDHA na različitim TiNM.

Fluorescencijska istraživanja pokazala su da u prisutnosti svih istraživanih materijala dolazi do dinamičkog utišavanja fluorescencije. U fluorescencijskim spektrima uočen je plavi pomak što znači da vezanjem BSA na materijale dolazi do pomicanja Trp aminokiselinskog ostataka. Nadalje, pokazano je da je vezanje BSA na sve vrste materijala pozitivno kooperativno. Konstanta vezanja BSA na adsorbense ponajprije ovisi o specifičnoj površini TiNM i veća je što je specifična površina veća. Vrijednost konstante vezanja BSA na kompozite veća je od vrijednosti određene za TiNM, osim u slučaju CaDHA/TiNPI. S obzirom da se CaP biomaterijali funkcionaliziraju s BSA kako bi im se poboljšao biološki odgovor, dobiveni rezultati ukazuju na dobar potencijal kompozita za primjenu u biomedicini.

Sistematskog istraživanja optimalnog sintetskog puta i nastajanja kompozitnih materijala kalcijevih fosfata na različitim vrstama titanatnih nanomaterijala do sada još nije proučeno. Većina istraživanja na takvim kompozitima rađena je u SBF-u. No, ovim istraživanjem pokazano je da je taloženjem CaP u prisutnosti TiNM moguće u većoj količini pripremiti CaDHA/TiNM kompozite koristeći jednostavniji medij, a i priprema kompozita traje mnogo kraće. Taloženje CaP u prisutnosti TiNM cjenovno je prihvatljivija metoda dobivanja kompozita koja je samim time i dostupna većem broju ljudi. Nadalje, pokazano je da vrsta TiNM te prisutnost aditiva ne mijenjaju sastav istaložene faze te da ne dolazi niti do promjene njezine lokalne strukture. To ukazuje da se, suprotno početnim pretpostavkama, kompoziti CaDHA s različitim TiNM mogu pripremiti u sličnim uvjetima.

Dobiveni rezultati omogućuju racionalni pristup u dizajnu i biomimetskoj sintezi multifunkcionalnih nanokompozita temeljenih na kalcijevim fosfatima i titanatnim nanomaterijalima.

§ 6. POPIS KRATICA

ACP – amorfni kalcijev fosfat,

AFM – mikroskopija atomskih sila,

Asp – asparaginska kiselina,

ATR – infracrvena spektroskopija uz prigušenu totalnu refleksiju,

BET – Brunauer-Emmett-Teller metoda,

BSA – albumin iz goveđeg seruma,

CaDHA – kalcij – deficitantni hidroksiapatit,

CaDHA/TiNM – kompoziti kalcij – deficitantnog hidroksiapatita i titanatnih nanomaterijala,

CC – *constant composition technique*,

CaP – kalcijevi fosfati,

CaP/TiNM – kompoziti kalcijeva fosfata i titanatnih nanomaterijala,

CNT – *crystal nucleation theory*,

DCPA – kalcijev hidrogenfosfat monohidrat,

DCPD – kalcijev hidrogenfosfat dihidrat,

DD – *double diffusion*,

d_h – hidrodinamički promjer,

DLVO – Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek teorija,

DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti,

EBBS – Hakova otopina,

EFC – izvanstanična tekućina,

ELS – elektroforetsko raspršenje svjetlosti,

EPR – elektronska paramagnetska rezonancija,

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom,

Γ_e – ravnotežna površinska koncentracija,

Γ – površinska koncentracija,

Gly – glicin,

HAP – hidroksiapatit,

HSA – albumin iz ljudskog seruma,

IAP – ionski produkt,

IMT – model unutrašnjeg transfera mase,
IPD – model unutarčestičnog transfera mase,
J – brzina nukleacije,
 k_1 – koeficijent brzine pseudo-prvog reda,
 k_2 – koeficijent brzine pseudo-drugog reda,
 K_b – konstanta vezanja,
 k_{id} – koeficijent brzine modela unutarčestične difuzije,
 k_q – koeficijent brzine gušenja fluorescencije,
 K_{sv} – Stern-Volmerova konstanta,
 K_{sp} – konstanta produkta topljivosti,
Lys – lizin,
MCP – monokalcijev fosfat dihidrat,
MCPA – monokalcijev fosfat anhidrid,
 n – broj veznih mjesta,
NMR – nuklearna magnetska rezonancija,
OCP – oktakalcijev fosfat,
PAT – površinski aktivna tvar,
PBS – fosfatni pufer,
pI – izoelektrična točka,
PFO – model pseudo-prvog reda,
PSO – model pseudo-drugog reda,
PXRD – difrakcija rendgenskih zraka na praškastom uzorku,
 r_c – kritični radijus,
rSBF – revidirana simulirana tjelesna tekućina,
Q – utišavač,
 q_t – adsorpcijski kapacitet,
 q_e – ravnotežni adsorpcijski kapacitet,
S – specifična površina,
SA – serumski albumin,
SBF – simulirana tjelesna tekućina,
SEAD – elektronska difrakcija u odabranom području,
SEM – pretražna elektronska mikroskopija,

TCP – trikalcijev fosfat,

TEM – transmisijska elektronska mikroskopija,

t_{ind} – vrijeme indukcije,

TiNM – titanatni nanomaterijali,

TiNP – TiO₂ nanočestice,

TiNPI – TiO₂ nanopločice,

TiNR – titanatni nanoštapići,

TiNT – titanatne nanocjevčice,

TiNW – titanatne nanožice,

τ_0 – vrijeme poluživota,

ζ – zeta potencijal.

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. L. Moroni, A. Nandakumar, F. B.- de Groot, C. A. van Blitterswijk, P. Habibovic, *J Tissue Eng Regen Med* **9** (2015) 745–759.
2. R. Kargupta, S. Bok, C. M. Darr, B. D. Crist, K. Gangopadhyay, S. Gangopadhyay, S. Sengupta, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **6** (2014) 475–495.
3. J. Raphael, M. Holodniy, S. B. Goodman, S. C. Heilshorn, *Biomaterials* **84** (2016) 301–314.
4. S. Bose, S. Tarafder, *Acta Biomater* **8** (2012) 1401–1421.
5. E. J. Tobin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **112** (2017) 88–100.
6. S. V. Dorozhkin, *Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics and Biocomposites*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2016.
7. N. Reznikov, R. Shahar, S. Weiner, *Acta Biomater* **10** (2014) 3815–3826.
8. S. V. Dorozhkin, *Journal of Materials Science* **42** (2007) 1061–1095.
9. J. M. Berthelot, *Composite Materials*, Springer, New York, 1999.
10. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons (ur.), *Biomaterials science*, Elsevier Academic Press, San Diego, 2004.
11. T. Hanawa, K. Asami, K. Asaoka, *J Biomed Mater Res* **40** (1997) 530–538.
12. B. León, J. Jansen (ur.), *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, Springer, New York, 2009.
13. K. Lee, A. Mazare, P. Schmuki, *Chem. Rev.* **114** (2014) 9385–9454.
14. X. Wang, Z. Li, J. Shi, Y. Yu, *Chem. Rev.* **114** (2014) 9346–9384.
15. D. Fattakhova-Rohlfing, A. Zaleska, T. Bein, *Chem. Rev.* **114** (2014) 9487–9558.
16. Y. Ma, X. Wang, Y. Jia, X. Chen, H. Han, C. Li, *Chem. Rev.* **114** (2014) 9987–10043.
17. C. Canal, M. P. Ginebra, *J Mech Behav Biomed Mater* **4** (2011) 1658–1671.
18. S. Dorozhkin, *Materials* **2** (2009) 399–498.
19. B. Ben-Nissan, I. Macha, S. Cazalbou, A. H. Choi, *Nanomedicine* **11** (2016) 531–544.
20. J. Kunze, L. Müller, J. M. Macak, P. Greil, P. Schmuki, F. A. Müller, *Electrochim. Acta* **53** (2008) 6995–7003.

21. Y. Liu, S. Kim, J. A. McLeod, J. Li, X. Guo, T.-K. Sham, L. Liu, *Appl. Surf. Sci.* **396** (2017) 1212–1219.
22. T. Kokubo, H. Takadama, *Biomaterials* **27** (2006) 2907–2915.
23. F. Barrere, M. M. E. Snel, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot, P. Layrolle, *Biomaterials* **25** (2004) 2901–2910.
24. S. Oh, S. Jin, *Mater. Sci. Eng. C* **26** (2006) 1301–1306.
25. B. Bracci, S. Panzavolta, A. Bigi, *Surf. Coat. Technol.* **232** (2013) 13–21.
26. M. D. Sikirić, C. Gergely, R. Elkaim, E. Wachtel, F. J. G. Cuisinier, H. Füredi-Milhofer, *J Biomed Mater Res A* **89A** (2009) 759–771.
27. J. Nathanael, D. Mangalaraj, P. C. Chen, N. Ponpandian, *Compos Sci Technol* **70** (2010) 419–426.
28. S. Pushpakanth, B. Srinivasan, B. Sreedhar, T. P. Sastry, *Mater. Chem. Phys.* **107** (2008) 492–498.
29. M. Enayati-Jazi, M. Solati-Hashjin, A. Nemat, F. Bakhshi, *Superlattices Microstruct.* **51** (2012) 877–885.
30. W. Que, K. Khor, J. Xu, L. G. Yu, *J. Eur. Ceram. Soc.* **28** (2008) 3083–3090.
31. T. Giannakopoulou, N. Todorova, G. Romanos, T. Vaimakis, R. Dillert, D. Bahnemann, C. Trapalis, *Mater. Sci. Eng. B* **177** (2012) 1046–1052.
32. E. Milella, F. Cosentino, A. Licciulli, C. Massaro, *Biomaterials* **22** (2001) 1425–1431.
33. J. M. Ruso, V. Verdinelli, N. Hassan, O. Pieroni, P. V. Messina, *Langmuir* **29** (2013) 2350–2358.
34. J. W. Mullin, *Crystallization*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2001.
35. A. E. Nielsen, *Croatia Chemica Acta* **42** (1970) 15.
36. W. Ostwald, *Zeitschrift Für Physikalische Chemie* **22U** (1897) 289–330.
37. J. W. Gibbs, H. A. Bumstead, R. G. Van Name, W. R. Longley, *The collected works of J. Willard Gibbs*, Longmans, Green & Co., New York, 1928.
38. L. Wang, G. H. Nancollas, *Dynamics of Biomineralization and Biodemineralization*, in *Biomineralization: From Nature to Application*, John Wiley & Sons, Chichester, 2008.
39. X. Y. Liu, J. J. De Yoreo (ur.), *Nanoscale Structure and Assembly at Solid-Fluid Interfaces*, Springer, Boston, 2004.
40. W. Stumm, J. J. Morgan, *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, John Wiley & Sons, Toronto, 2012.
41. A. G. Walton, *Nucleation in Liquids and Solutions*, u *Nucleation*, A. C. Zettlemoyer (ur.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1969.

42. S. Auer, D. Frenkel, *Nature* **409** (2001) 1020–1023.
43. S. Auer, D. Frenkel, *Nature* **413** (2001) 711–713.
44. K. F. Kelton, *Solid State Physics*, Academic Press, 2001.
45. L. Brečević, D. Kralj, *Kinetics and Mechanisms of Crystal Growth in Aqueous Systems, u Interfacial Dynamics*, N. Kallay (ur.), Marcel Dekker, Inc., 2000, pp. 435–474.
46. G. H. Nancollas (ur.), *Biological Mineralization and Demineralization*, Springer, Berlin, 1982.
47. A. Cacciuto, S. Auer, D. Frenkel, *Nature* **428** (2004) 404–406.
48. X. Y. Liu, *Langmuir* **16** (2000) 7337–7345.
49. X. Y. Liu, S. W. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 888–895.
50. G. W. Sears, *J. Chem. Phys.* **29** (1958) 1045–1048.
51. F. Meng, S. A. Morin, S. Jin, *Growth of Nanomaterials by Screw Dislocation, u Springer Handbook of Nanomaterials*, R. Vajtai (ur.), Springer, Berlin, 2013, pp. 639–664.
52. A. E. Nielsen, J. Christoffersen, *The Mechanisms of Chrystal Growth and Dissolution, u Biological Mineralization and Demineralization*, G. H. Nancollas (ur.), Springer, Berlin, 1982.
53. F. Concha A., *Particle Aggregation by Coagulation and Flocculation, u Solid-Liquid Separation in the Mining Industry*, Springer International Publishing, Cham, 2014.
54. N. T. Barrett, G. M. Lamble, K. J. Roberts, J. N. Sherwood, G. N. Greaves, R. J. Davey, R. J. Oldman, D. Jones, *J. Cryst. Growth* **94** (1989) 689–696.
55. L. Brečević, V. Nöthig-Laslo, D. Kralj, S. Popović, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **92** (1996) 1017–1022.
56. A. Gutjahr, H. Dabringhaus, R. Lacmann, *J. Cryst. Growth* **158** (1996) 310–315.
57. K. Sangwal, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **32** (1996) 3–43.
58. R. J. Davey, J. W. Mullin, *J. Cryst. Growth* **26** (1974) 45–51.
59. B. Simon, R. Boistelle, *J. Cryst. Growth* **52** (1981) 779–788.
60. I. Owczarek, K. Sangwal, *J. Cryst. Growth* **102** (1990) 574–580.
61. S. V. Dorozhkin, *Prog Biomater* **5** (2016) 9–70.
62. P. Koutsoukos, Z. Amjad, M. B. Tomson, G. H. Nancollas, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 1553–1557.
63. L. Wang, G. H. Nancollas, *Chem. Rev.* **108** (2008) 4628–4669.
64. R. Hamai, T. Toshima, M. Tafu, T. Masutani, T. Chohji, *Key Eng. Mater.* **529–530** (2012) 55–60.

65. P. W. Brown, B. Constantz, eds., *Hydroxyapatite and related materials*, CRC, Boca Raton, 1994.
66. S. V. Dorozhkin, *J Mater Sci Mater Med* **24** (2013) 1335–1363.
67. F. Tamimi, J. Torres, D. Bassett, J. Barralet, E. L. Cabarcos, *Biomaterials* **31** (2010) 2762–2769.
68. E. Fernandez, F. J. Gil, M. P. Ginebra, F. C. M. Driessens, J. A. Planell, S. M. Best, *J Mater Sci Mater Med* **10** (1999) 169–176.
69. L. C. Chow, E. D. Eanes, *Octacalcium phosphate*, Karger, Basel, 2001.
70. M. Kakei, T. Sakae, M. Yoshikawa, *J. Electron Microsc.* **58** (2009) 393–398.
71. O. Suzuki, *J Oral Biosci* **52** (2010) 6–14.
72. O. Suzuki, *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **49** (2013) 58–71.
73. J. D. Reid, M. E. Andersen, *Atherosclerosis* **101** (1993) 213–224.
74. T. Kodaka, K. Debari, S. Higashi, *J. Electron Microsc.* **37** (1988) 73–80.
75. C. H. P'ng, R. Boadle, M. Horton, M. Bilous, F. Bonar, *Pathology* **40** (2008) 539–540.
76. C. A. Scotchford, S. Y. Ali, *Ann. Rheum. Dis.* **54** (1995) 339–344.
77. M. Sayer, A. D. Stratilatov, J. Reid, L. Calderin, M. J. Stott, X. Yin, M. MacKenzie, T. J. N. Smith, J. A. Hendry, S. D. Langstaff, *Biomaterials* **24** (2003) 369–382.
78. J. W. Reid, A. Pietak, M. Sayer, D. Dunfield, T. J. N. Smith, *Biomaterials* **26** (2005) 2887–2897.
79. S. V. Dorozhkin, *Acta Biomater* **6** (2010) 4457–4475.
80. E. D. Eanes, I. H. Gillessen, A. S. Posner, *Nature* **208** (1965) 365–367.
81. A. S. Posner, F. Betts, *Acc. Chem. Res.* **8** (1975) 273–281.
82. A. L. Boskey, *J Dent Res* **76** (1997) 1433–1436.
83. M. L. Watson, R. A. Robinson, *Am. J. Anat.* **93** (1953) 25–59.
84. C. Holt, M. J. J. M. Van Kemenade, L. S. Nelson, D. W. L. Hukins, R. T. Bailey, J. E. Harries, S. S. Hasnain, P. L. De Bruyn, *Mater. Res. Bull.* **24** (1989) 55–62.
85. P. Bar-Yosef Ofir, R. Govrin-Lippman, N. Garti, H. Füredi-Milhofer, *Cryst. Growth Des.* **4** (2004) 177–183.
86. Lj. Brečević, H. Füredi-Milhofer, *Calc. Tis Res.* **10** (1972) 82–90.
87. R. Despotović, N. Filipović-Vinceković, H. Füredi-Milhofer, *Calc. Tis Res.* **18** (1975) 13–26.
88. J. Christoffersen, M. R. Christoffersen, W. Kibalczyk, F. A. Andersen, *J. Cryst. Growth* **94** (1989) 767–777.

89. H. Pan, X. Y. Liu, R. Tang, H. Y. Xu, *Chem. Commun.* **46** (2010) 7415–7417.
90. Lj. Brečević, V. Hlady, H. Füredi-Milhofer, *Colloids Surf.* **28** (1987) 301–313.
91. S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (2002) 3130–3146.
92. M. R. Christoffersen, J. Christoffersen, W. Kibalczyk, *J. Cryst. Growth* **106** (1990) 349–354.
93. N. C. Blumenthal, A. S. Posner, J. M. Holmes, *Mater. Res. Bull.* **7** (1972) 1181–1189.
94. R. Z. LeGeros, *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*, u *Monographs in Oral Science*, H. M. Myers (ur.), Krager, New York, 1994.
95. R. Z. LeGeros, *Z Kardiol* **90** (2001) 116–124.
96. W. C. O'Neill, *Kidney Int.* **72** (2007) 792–796.
97. R. M. Wilson, J. C. Elliott, S. E. P. Dowker, L. M. Rodriguez-Lorenzo, *Biomaterials* **26** (2005) 1317–1327.
98. P. W. Brown, R. I. Martin, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 1671–1675.
99. B. Viswanath, V. V. Shastry, U. Ramamurty, N. Ravishankar, *Acta Mater.* **58** (2010) 4841–4848.
100. A. Sinha, S. Nayar, A. Agrawal, D. Bhattacharyya, P. Ramachandrarao, *J. Am. Ceram. Soc.* **86** (2003) 357–359.
101. C. Durucan, P. W. Brown, *J Mater Sci Mater Med* **11** (2000) 365–371.
102. S. V. Dorozhkin, *Acta Biomater* **8** (2012) 963–977.
103. C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, *Int. A. Adv. Sci. Technol.* **49** (2006) 27–36.
104. B. Bourgeois, O. Laboux, L. Obadia, O. Gauthier, E. Betti, E. Aguado, G. Daculsi, J.-M. Bouler, *J Biomed Mater Res A* **65A** (2003) 402–408.
105. T. Liu, S. Chen, D. Liu, S. Liou, *J. Control Release* **107** (2005) 112–121.
106. J. C. Elliott, P. E. Mackie, R. A. Young, *Science* **180** (1973) 1055–1057.
107. N. Rangavittal, A. R. Landa-Cánovas, J. M. González-Calbet, M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.* **51** (2000) 660–668.
108. H. El Briak-Benabdeslam, M. P. Ginebra, M. Vert, P. Boudeville, *Acta Biomater* **4** (2008) 378–386.
109. L. L. Hench, *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, 1993.
110. B. Yeong, X. Junmin, J. Wang, *J. Am. Ceram. Soc.* **84** (2001) 465–67.
111. P. Layrolle, A. Lebugle, *Chem Mater* **8** (1996) 134–144.
112. G. Willmann, *Adv. Eng. Mater.* **1** (1999) 95–105.
113. R. Geesink, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **395** (2002) 53–65.

114. H. Shunbo, F. Jia, C. Marinescu, C. Fanica, Y. Qi, Y. Tao, A. Stroppa, W. Ren, *RSC Adv.* **7** (2017) 21375–21379.
115. M. S. A. Johnsson, G. H. Nancollas, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **3** (1992) 61–82.
116. A. K. Lynn, W. Bonfield, *Acc. Chem. Res.* **38** (2005) 202–207.
117. H. Füredi-Milhofer, S. Sarig, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **32** (1996) 45–74.
118. K. Bleek, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **9** (2013) 6283–6321.
119. K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor, *Mol Immunol* **52** (2012) 174–182.
120. F. A. de Wolf, G. M. Brett, *Pharmacol Rev* **52** (2000) 207–236.
121. A. Bujacz, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68** (2012) 1278–1289.
122. H. H. Lu, S. R. Pollack, P. Ducheyne, *J. Biomed. Mater. Res.* **54** (2001) 454–461.
123. J. Mei, R. M. Shelton, P. M. Marquis, *J Mater Sci Mater Med* **6** (1995) 703–707.
124. P. Ducheyne, S. Radin, L. King, *J. Biomed. Mater. Res.* **27** (1993) 25–34.
125. Y. Liu, P. Layrolle, J. de Bruijn, C. van Blitterswijk, K. de Groot, *J. Biomed. Mater. Res.* **57** (2001) 327–335.
126. L. Huang, B. Zhou, H. Wu, L. Zheng, J. Zhao, *Mater. Sci. Eng. C* **70** (2017) 955–961.
127. S. Radin, P. Ducheyne, B. Rothman, A. Conti, *J. Biomed. Mater. Res.* **37** (1997) 363–375.
128. S. Radin, P. Ducheyne, *J. Biomed. Mater. Res.* **30** (1996) 273–279.
129. S. Areva, T. Peltola, E. Säilynoja, K. Laajalehto, M. Lindén, J. B. Rosenholm, *Chem. Mater.* **14** (2002) 1614–1621.
130. K. Kato, S. Lee, F. Nagata, *Molecules* **25** (2020) 2312.
131. C. Combes, C. Rey, M. Freche, *J Mater Sci Mater Med* **10** (1999) 153–160.
132. H. Rao, Z. Lu, W. Liu, Y. Wang, H. Ge, P. Zou, H. He, *Surf. Interface Anal.* **48** (2016) 1048–1055.
133. B. Mueller, M. Zacharias, K. Rezwani, *Adv. Eng. Mater.* **12** (2010) B53–B61.
134. M. Boix, S. Eslava, G. Costa Machado, E. Gosselin, N. Ni, E. Saiz, J. De Coninck, *J Biomed Mater Res A* **103** (2015) 3493–3502.
135. W. S. Wan Ngah, L. C. Teong, M. A. K. M. Hanafiah, *Carbohydr. Polym.* **83** (2011) 1446–1456.
136. M. Darder, M. Colilla, E. Ruiz-Hitzky, *Chem. Mater.* **15** (2003) 3774–3780.
137. M. A. R. Bhuiyan, A. Shaid, M. A. Khan, *Chem Mater. Eng.* **2** (2014) 96–100.

138. I. Aranaz, M. Mengíbar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, Á. Heras, *Curr. Chem. Biol.* **3** (2009) 203–230.
139. S. Islam, M. A. R. Bhuiyan, M. N. Islam, *J Polym Environ* **25** (2017) 854–866.
140. F. Croisier, C. Jérôme, *Eur. Polym. J.* **49** (2013) 780–792.
141. H. Tan, C. R. Chu, K. A. Payne, K. G. Marra, *Biomaterials* **30** (2009) 2499–2506.
142. V. Chiono, P. Gentile, F. Boccafoschi, I. Carmagnola, M. Ninov, V. Georgieva, G. Georgiev, G. Ciardelli, *Biomacromolecules* **11** (2010) 309–315.
143. Y. M. Lee, Y. J. Park, S. J. Lee, Y. Ku, S. B. Han, P. R. Klokkevold, S. M. Choi, C. P. Chung, *J. Periodontol.* **71** (2000) 410–417.
144. A. R. Costa-Pinto, R. L. Reis, N. M. Neves, *Tissue. Eng. Part B Rev.* **17** (2011) 331–347.
145. V. Rusu, C. Ng, M. Wilke, B. Tiersch, P. Fratzl, M. Peter, *Biomaterials* **26** (2005) 5414–5426.
146. C. G. Aimoli, D. O. de Lima, M. M. Beppu, *Mater. Sci. Eng. C* **28** (2008) 1565–1571.
147. I. V. Fadeeva, S. M. Barinov, A. Yu. Fedotov, V. S. Komlev, *Dokl Chem* **441** (2011) 387–390.
148. Z. Amjad, ed., *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*, Springer, New York, 2013.
149. I. Izquierdo-Barba, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.* **51** (2000) 191–199.
150. R. Kniep, S. Busch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **35** (1996) 2624–2626.
151. H. Tlatlik, P. Simon, A. Kawska, D. Zahn, R. Kniep, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 1905–1910.
152. M. Vallet-Regí, J. M. González-Calbet, *Prog. Solid. State Ch.* **32** (2004) 1–31.
153. S. V. Dorozhkin, E. I. Dorozhkina, M. Epple, *Cryst. Growth Des.* **4** (2004) 389–395.
154. J. H. Hanks, R. E. Wallace, *Exp. Biol. Med.* **71** (1949) 196–200.
155. E. I. Dorozhkina, S. V. Dorozhkin, *J Biomed Mater Res A* **67A** (2003) 578–581.
156. Y. Fan, K. Duan, R. Wang, *Biomaterials* **26** (2005) 1623–1632.
157. D. Lickorish, J. A. M. Ramshaw, J. A. Werkmeister, V. Glattauer, C. R. Howlett, *J. Biomed. Mater. Res. A* **68A** (2004) 19–27.
158. G. Pfaff, P. Reynders, *Chem. Rev.* **99** (1999) 1963–1982.
159. J. H. Braun, A. Baidins, R. E. Marganski, *Prog. Org. Coat.* **20** (1992) 105–138.

160. C. Rempelberg, M. B. Heringa, G. van Donkersgoed, J. Drijvers, A. Roos, S. Westenbrink, R. Peters, G. van Bommel, W. Brand, A. G. Oomen, *Nanotoxicology* **10** (2016) 1404–1414.
161. A. Fujishima, K. Honda, *Nature* **238** (1972) 37–38.
162. A. Fujishima, T. N. Rao, D. A. Tryk, *J. Photochem. Photobiol. C* **1** (2000) 1–21.
163. Definicija nanomaterijala, *Nat. Nanotechnol.* **14** (2019) 193–193.
164. M. Miernicki, T. Hofmann, I. Eisenberger, F. von der Kammer, A. Praetorius, *Nat. Nanotechnol.* **14** (2019) 208–216.
165. A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 13226–13239.
166. M. A. Anderson, M. J. Gieselmann, Q. Xu, *J. Membr. Sci.* **39** (1988) 243–258.
167. G. Oskam, A. Nellore, R. L. Penn, P. C. Searson, *J. Phys. Chem. B* **107** (2003) 1734–1738.
168. A. Zaban, S. T. Aruna, S. Tirosh, B. A. Gregg, Y. Mastai, *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 4130–4133.
169. Y. Zhang, Z. Jiang, J. Huang, L. Y. Lim, W. Li, J. Deng, D. Gong, Y. Tang, Y. Lai, Z. Chen, *RSC Adv.* **5** (2015) 79479–79510.
170. F. Trotta, A. Mele, *Nanomaterials: Classification and Properties*, u *Nanosponges*, F. Trotta, A. Mele (ur.), Wiley-VCH, Weinheim, 2019.
171. J. C. Lee, K. S. Park, T. G. Kim, H. J. Choi, Y. M. Sung, *Nanotechnology* **17** (2006) 4317–4321.
172. Y. Guo, N. H. Lee, H. J. Oh, C. R. Yoon, K. S. Park, H. G. Lee, K. S. Lee, S. J. Kim, *Nanotechnology* **18** (2007) 295608.
173. Z. Lu, E. Lindner, H. A. Mayer, *Chem. Rev.* **102** (2002) 3543–3578.
174. A. C. Pierre, G. M. Pajonk, *Chem. Rev.* **102** (2002) 4243–4266.
175. E. Barringer A., K. Bowen H., *Langmuir* **1** (1985) 414–420.
176. J. Livage, M. Henry, C. Sanchez, *Prog. Solid. State Ch.* **18** (1988) 259–341.
177. D. Vorkapic, T. Matsoukas, *J. Colloid Interface Sci.* **214** (1999) 283–291.
178. D. Vorkapic, T. Matsoukas, *J. Am. Ceram. Soc.* **81** (2005) 2815–2820.
179. V. Lafond, P. H. Mutin, A. Vioux, *Chem. Mater.* **16** (2004) 5380–5386.
180. J. Tang, F. Redl, Y. Zhu, T. Siegrist, L. E. Brus, M. L. Steigerwald, *Nano Lett.* **5** (2005) 543–548.
181. M. Niederberger, M. H. Bartl, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 13642–13643.

182. S. Y. Chae, M. K. Park, S. K. Lee, T. Y. Kim, S. K. Kim, W. I. Lee, *Chem. Mater.* **15** (2003) 3326–3331.
183. Q. Zhang, L. Gao, *Langmuir* **19** (2003) 967–971.
184. M. Wei, Y. Konishi, H. Zhou, H. Sugihara, H. Arakawa, *Chem. Phys. Lett.* **400** (2004) 231–234.
185. T. Kasuga, M. Hiramatsu, A. Hoson, T. Sekino, K. Niihara, *Langmuir* **14** (1998) 3160–3163.
186. R. Sanjinés, H. Tang, H. Berger, F. Gozzo, G. Margaritondo, F. Lévy, *J. Appl. Phys.* **75** (1994) 2945–2951.
187. M. Grätzel, *Nature* **421** (2003) 586–587.
188. A. I. Hochbaum, P. Yang, *Chem. Rev.* **110** (2010) 527–546.
189. X. Zhang, A. J. Du, P. Lee, D. D. Sun, J. O. Leckie, *J. Membr. Sci.* **313** (2008) 44–51.
190. H. J. Yun, H. Lee, J. B. Joo, W. Kim, J. Yi, *J. Phys. Chem. C* **113** (2009) 3050–3055.
191. M. Xu, P. Da, H. Wu, D. Zhao, G. Zheng, *Nano Lett.* **12** (2012) 1503–1508.
192. M. Winter, R. J. Brodd, *Chem. Rev.* **104** (2004) 4245–4270.
193. Y. Wang, G. Cao, *Adv. Mater.* **20** (2008) 2251–2269.
194. G. Armstrong, A. R. Armstrong, P. G. Bruce, P. Reale, B. Scrosati, *Adv. Mater.* **18** (2006) 2597–2600.
195. R. J. Mortimer, *Annu. Rev. Mater. Res.* **41** (2011) 241–268.
196. G. He, J. Hu, S. C. Wei, J. H. Li, X. H. Liang, E. Luo, *Appl. Surf. Sci.* **255** (2008) 442–445.
197. K. Turzo, *Surface Aspects of Titanium Dental Implants, u Biotechnology - Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*, R. Sammour (ut.), IntechOpen, Rijeka, 2012.
198. Q. Chen, G. Thouas, *Biomaterials: A Basic Introduction*, CRC Press, Boca Raton, 2015.
199. H. Li, K. A. Khor, P. Cheang, *J. Am. Ceram. Soc.* **81** (1998) 1705–1728.
200. P. Ducheyne, Q. Qiu, *Biomaterials* **20** (1999) 2287–2303.
201. L. . Gerhardt, G. M. R. Jell, A. R. Boccaccini, *J Mater Sci Mater Med* **18** (2007) 1287–1298.
202. L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.* **81** (1998) 1705–1728.
203. H.-W. Kim, Y.-H. Koh, L.-H. Li, S. Lee, H.-E. Kim, *Biomaterials* **25** (2004) 2533–2538.

204. M. Sato, A. Aslani, M. A. Sambito, N. M. Kalkhoran, E. B. Slamovich, T. J. Webster, *J Biomed Mater Res A* **84A** (2008) 265–272.
205. H. Hu, X. Liu, C. Ding, *J. Alloys Compd.* **498** (2010) 172–178.
206. S. Nath, R. Tripathi, B. Basu, *Mater. Sci. Eng. C* **29** (2009) 97–107.
207. A. Hinderliter, S. May, *J. Phys.: Condens. Matter* **18** (2006) S1257–S1270.
208. A. Hinderliter, P. F. F. Almeida, C. E. Creutz, R. L. Biltonen, *Biochemistry* **40** (2001) 4181–4191.
209. A. Hinderliter, R. L. Biltonen, P. F. F. Almeida, *Biochemistry* **43** (2004) 7102–7110.
210. S. J. Geelhood, T. A. Horbett, W. K. Ward, M. D. Wood, M. J. Quinn, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **81B** (2007) 251–260.
211. D. G. Castner, B. D. Ratner, *Surf. Sci.* **500** (2002) 28–60.
212. R. A. Latour, *Colloids Surf. B* **191** (2020) 110992.
213. M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.* **162** (2011) 87–106.
214. M. Malmsten, *J. Colloid Interface Sci.* **207** (1998) 186–199.
215. C. A. Haynes, W. Norde, *Colloids Surf. B* **2** (1994) 517–566.
216. P. G. Koutsoukos, W. Norde, J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.* **95** (1983) 385–397.
217. M. G. E. G. Bremer, J. Duval, W. Norde, J. Lyklema, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **250** (2004) 29–42.
218. S. Demaneche, J.-P. Chapel, L. J. Monrozier, H. Quiquampoix, *Colloids Surf. B* **70** (2009) 226–231.
219. K. L. Jones, C. R. O’Melia, *J. Membr. Sci.* **165** (2000) 31–46.
220. M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *Nature* **449** (2007) 555–555.
221. R. A. Latour, *Biomaterials: Protein–Surface Interactions*, u *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, G. Wnek, G. Bowlin (ur.), CRC Press, Boca Raton, 2008.
222. J. G. E. M. Fraaije, R. M. Murriss, W. Norde, J. Lyklema, *Biophys. Chem.* **40** (1991) 303–315.
223. J. G. E. M. Fraaije, W. Norde, J. Lyklema, *Biophys. Chem.* **40** (1991) 317–327.
224. J. G. E. M. Fraaije, W. Norde, J. Lyklema, *Biophys. Chem.* **41** (1991) 263–276.
225. J. Wang, X. Guo, *J. Hazard. Mater.* **390** (2020) 122156.
226. M. I. El-Khaiary, G. F. Malash, Y.-S. Ho, *Desalination* **257** (2010) 93–101.
227. S. K. Lagergren, *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* **24** (1898) 1–39.
228. Y. S. Ho, G. McKay, *Chem. Eng. J.* **70** (1998) 115–124.

229. H. N. Tran, S. J. You, A. Hosseini-Bandegharai, H. P. Chao, *Water Res.* **120** (2017) 88–116.
230. Y. S. Ho, D. A. J. Wase, C. F. Forster, *Water SA* **22** (1996).
231. W. J. Weber, J. C. Morris, *J. Sanit. Eng. Div.* **89** (1963) 31–59.
232. A. Selmani, J. Lützenkirchen, K. Kučanda, D. Dabić, E. Redel, I. D. Marion, D. Kralj, D. D. Jurašin, M. D. Sikirić, *Beilstein J. Nanotechnol.* **10** (2019) 1024–1037.
233. T. Kasuga, M. Hiramatsu, A. Hoson, T. Sekino, K. Niihara, *Adv. Mater.* **11** (1999) 1307–1311.
234. M. V. Sofianou, V. Psycharis, N. Boukos, T. Vaimakis, J. Yu, R. Dillert, D. Bahnemann, C. Trapalis, *Appl. Catal. B* **142–143** (2013) 761–768.
235. S. Chamary, D. Hautcoeur, J. C. Hornez, A. Leriche, F. Cambier, *J. Eur. Ceram. Soc.* **37** (2017) 5321–5327.
236. N. L. D’Elia, N. Gravina, J. M. Ruso, J. L. Marco-Brown, J. M. Sieben, P. V. Messina, *J. Colloid Interface Sci.* **494** (2017) 345–354.
237. B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2004.
238. P. Larkin, *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral interpretation*, Elsevier, Waltham, 2011.
239. S. Kurajica, *Rendgenska difrakcija na prahu*, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020.
240. R. W. James, *The optical principles of the diffraction of X-rays*, Cornell University Press, Ithaca, 1967.
241. A. O. Bokuniaeva, A. S. Vorokh, *J. Phys.: Conf. Ser.* **1410** (2019) 012057.
242. S. Lowell, J. E. Shields, M. A. Thomas, M. Thommes, *Surface Area Analysis from the Langmuir and BET Theories*, u *Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density*, S. Lowell, J. E. Shields, M. A. Thomas, M. Thommes (ur.), Springer Netherlands, Dordrecht, 2004.
243. S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **60** (1938) 309–319.
244. V. Jokanović, *Instrumentalne metode: Ključ razumevanja nanomedicine i nanotehnologije*, Institut za nuklearne nauke Vinča, Beograd, 2016.
245. M. Majer, M. Roguljić, Ž. Knežević, A. Starodumov, D. Ferencšek, V. Brigljević, B. Mihaljević, *Appl. Radiat. Isot.* **154** (2019) 108824.
246. S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **178** (2006) 42–55.
247. K. D. Vernon-Parry, *III-Vs Review* **13** (2000) 40–44.

248. B. Fultz, J. M. Howe, *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*, Springer Science & Business Media, 2012.
249. E. E. Flater, G. E. Zacharakis-Jutz, B. G. Dumba, I. A. White, C. A. Clifford, *Ultramicroscopy* **146** (2014) 130–143.
250. P. Eaton, P. West, *Atomic Force Microscopy*, Oxford University Press, Oxford, 2010.
251. M. Rogošić, *Kem. Ind.* **66** (2017) 381–401.
252. Anton Paar (2021). <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>. Published September 12, 2021. Accessed December 9, 2021.
253. P. A. Hassan, S. Rana, G. Verma, *Langmuir* **31** (2015) 3–12.
254. M. Rogošić, tran., *Kem. Ind.* **66** (2017) 267–278.
255. W. I. Goldburg, *Am. J. Phys.* **67** (1999) 10.
256. J. R. Lakowicz (ur.), *Introduction to Fluorescence*, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Boston, 2006.
257. C. A. Parker, W. T. Rees, *Analyst* **87** (1962) 83–111.
258. M. Kubista, R. Sjöback, S. Eriksson, B. Albinsson, *Analyst* **119** (1994) 417–419.
259. A. V. Fonin, A. I. Sulatskaya, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, *PLoS ONE* **9** (2014) e103878.
260. J. Mariam, P. M. Dongre, D. C. Kothari, *J Fluoresc* **21** (2011) 2193–2199.
261. A. Sułkowska, *J. Mol. Struct.* **614** (2002) 227–232.
262. W. R. Ware, *J. Phys. Chem.* **66** (1962) 455–458.
263. A. Manivel, S. Anandan, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **395** (2012) 38–45.
264. T. Trung, C. S. Ha, *Mater. Sci. Eng. C* **24** (2004) 19–22.
265. W. Ma, Z. Lu, M. Zhang, *Appl. Phys. A* **66** (1998) 621–627.
266. W. P. Griffith, *Raman Spectroscopy of Minerals*, u *The Infrared Spectra of Minerals*, Mineralogical Society of Great Britain and Ireland, 1974.
267. A. Sharma, R. K. Karn, S. K. Pandiyan, *J. Basic Appl. Eng. Res* **1** (2014) 1–5.
268. J. V. M. Zoccal, F. O. Arouca, J. A. S. Gonçalves, *Synthesis and Characterization of TiO₂ Nanoparticles by the Method Pechini*, in *Materials Science Forum*, 2010, pp. 385–390.
269. Z. Gao, Z. Cui, S. Zhu, Y. Liang, Z. Li, X. Yang, *J Nanopart Res* **16** (2014) 2191.
270. Y. Suzuki, S. Yoshikawa, *J. Mater. Res.* **19** (2004) 982–985.

271. M. A. Cortés-Jácome, G. Ferrat-Torres, L. F. F. Ortiz, C. Angeles-Chávez, E. López-Salinas, J. Escobar, M. L. Mosqueira, J. A. Toledo-Antonio, *Catal. Today* **126** (2007) 248–255.
272. A. Gajović, I. Friščić, M. Plodinec, D. Iveković, *J. Mol. Struct.* **924–926** (2009) 183–191.
273. T. Gao, H. Fjellvåg, P. Norby, *Inorg. Chem.* **48** (2009) 1423–1432.
274. X.-Y. Liu, N. J. Coville, *S. Afr. J. Chem.* (2005) 6.
275. D. V. Bavykin, F. C. Walsh, *J. Phys. Chem. C* **111** (2007) 14644–14651.
276. M. Darányi, Á. Kukovecz, E. Horváth, Z. Kónya, I. Kiricsi, *Chem. Phys. Lett.* **460** (2008) 191–195.
277. Y. V. Kolen'ko, K. A. Kovnir, A. I. Gavrilov, A. V. Garshev, J. Frantti, O. I. Lebedev, B. R. Churagulov, G. Van Tendeloo, M. Yoshimura, *J. Phys. Chem. B* **110** (2006) 4030–4038.
278. Y. Suzuki, S. Pavasupree, S. Yoshikawa, R. Kawahata, *J. Mater. Res.* **20** (2005) 1063–1070.
279. J. Li, W. Wan, H. Zhou, J. Li, D. Xu, *Chem. Commun.* **47** (2011) 3439.
280. A. R. Armstrong, G. Armstrong, J. Canales, P. G. Bruce, *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004) 2286–2288.
281. M. Ben Yahia, F. Lemoigno, T. Beuvier, J. S. Filhol, M. Richard-Plouet, L. Brohan, M. L. Doublet, *J. Chem. Phys.* **130** (2009) 204501.
282. A. M. Nor, M. F. Achoi, M. H. Mamat, M. M. Zabidi, S. Abdullah, M. R. Mahmood, *Jpn. J. Appl. Phys.* **51** (2012) 06FG08 1–4.
283. E. Bronze-Uhle, B. C. Costa, V. F. Ximenes, P. N. Lisboa-Filho, *Nanotechnol. Sci. Appl. Volume 10* (2016) 11–21.
284. J. Kong, S. Yu, *Acta Biochim Biophys Sinica* **39** (2007) 549–559.
285. S. S. Rohiwal, R. K. Satvekar, A. P. Tiwari, A. V. Raut, S. G. Kumbhar, S. H. Pawar, *Appl. Surf. Sci.* **334** (2015) 157–164.
286. M. H. Çalımlı, Ö. Demirbaş, A. Aygün, M. H. Alma, M. S. Nas, F. Şen, *Appl Water Sci* **8** (2018) 209.
287. C. Paluszkiwicz, E. Stodolak, M. Hasik, M. Blazewicz, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **79** (2011) 784–788.
288. Q. Yuan, J. Shah, S. Hein, R. D. K. Misra, *Acta Biomater* **6** (2010) 1140–1148.
289. C. Gartner, B. L. López, L. Sierra, R. Graf, H. W. Spiess, M. Gaborieau, *Biomacromolecules* **12** (2011) 1380–1386.

290. J. Grant, C. Allen, *Chitosan as a Biomaterial for Preparation of Depot-Based Delivery Systems*, u *Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications*, R. H. Marchessault, F. Ravenelle, X. X. Zhu (ur.), American Chemical Society, Washington, DC, 2006.
291. M. Jaworska, K. Sakurai, P. Gaudon, E. Guibal, *Polym. Int.* **52** (2003) 198–205.
292. R. H. Marchessault, F. Ravenelle, X. X. Zhu, eds., *Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications*, American Chemical Society, Washington, DC, 2006.
293. S. Koutsopoulos, *J. Biomed. Mater. Res.* **62** (2002) 600–612.
294. S. Lazić, *J. Cryst. Growth* **147** (1995) 147–154.
295. W. Stumm, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **120** (1997) 143–166.
296. E. J. W. Verwey, J. Th. G. Overbeek, *Theory of the stability of lyophobic colloids*, Elsevier Publishing Company, Netherlands, 1948.
297. S. García-García, S. Wold, M. Jonsson, *Appl. Clay. Sci.* **43** (2009) 21–26.
298. J. Hao, S. K. Li, *J Pharm Sci* **97** (2008) 5186–5197.
299. R. F. Domingos, N. Tufenkji, K. J. Wilkinson, *Environ. Sci. Technol.* **43** (2009) 1282–1286.
300. M. Lotya, A. Rakovich, J. F. Donegan, J. N. Coleman, *Nanotechnology* **24** (2013) 265703.
301. L. Reinert, M. Zeiger, S. Suárez, V. Presser, F. Mücklich, *RSC Advances* **5** (2015) 95149–95159.
302. M. Zhang, S. A. Bradford, J. Šimunek, H. Vereecken, E. Klumpp, *Water Res.* **109** (2017) 358–366.
303. A. Nelson, T. Cosgrove, *Langmuir* **20** (2004) 10382–10388.
304. Z. Saunders, C. W. Noack, D. A. Dzombak, G. V. Lowry, *J Nanopart Res* **17** (2015) 140.
305. C. Kinnear, H. Dietsch, M. J. D. Clift, C. Endes, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52** (2013) 1934–1938.
306. P. Arenas-Guerrero, Á. V. Delgado, K. J. Donovan, K. Scott, T. Bellini, F. Mantegazza, M. L. Jiménez, *Sci Rep* **8** (2018) 9502.
307. Y. Boluk, C. Danumah, *J Nanopart Res* **16** (2013) 2174.
308. K. Kobayashi, H. Kubota, R. Hojo, M. Miyagawa, *J. Toxicol. Sci.* **44** (2019) 515–521.
309. N. Singh, E. Tiwari, N. Khandelwal, G. Darbha, *Environ. Sci. Nano* **6** (2019).
310. A. A. Zadpoor, *Mater. Sci. Eng. C* **35** (2014) 134–143.

311. T. Kokubo, ed., *Bioceramics and their Clinical Applications*, Woodhead Publishing, Boca Raton, 2008.
312. H. Takadama, H.-M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura, *J. Biomed. Mater. Res.* **55** (2001) 185–193.
313. S. C. Liou, S. Y. Chen, H. Y. Lee, J. S. Bow, *Biomaterials* **25** (2004) 189–196.
314. B. O. Fowler, M. Markovic, W. E. Brown, *Chem. Mater.* **5** (1993) 1417–1423.
315. M. Uchida, H.-M. Kim, T. Kokubo, S. Fujibayashi, T. Nakamura, *J. Biomed. Mater. Res.* **64A** (2003) 164–170.
316. P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, K. de Groot, *J. Biomed. Mater. Res.* **28** (1994) 7–15.
317. W. Wu, G. H. Nancollas, *J. Colloid Interface Sci.* **199** (1998) 206–211.
318. X. Q. Gong, A. Selloni, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 19560–19562.
319. S. Oh, R. Finones, C. Daraio, L. Chen, S. Jin, *Biomaterials* **26** (2005) 4938–4943.
320. P. Ming, S. Shao, J. Qiu, J. Yang, Y. Yu, J. Chen, W. Zhu, C. Tang, *Appl. Surf. Sci.* **416** (2017) 790–797.
321. L. Wang, B. Zhou, X. Huang, L. Dong, K. Cheng, W. Weng, *RSC Adv.* **7** (2017) 33606–33613.
322. H. Zhao, W. Dong, Y. Zheng, A. Liu, J. Yao, C. Li, W. Tang, B. Chen, G. Wang, Z. Shi, *Biomaterials* **32** (2011) 5837–5846.
323. S. V. Dorozhkin, E. I. Dorozhkina, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **215** (2003) 191–199.
324. M. Salarian, W. Z. Xu, Z. Wang, T. K. Sham, P. A. Charpentier, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6** (2014) 16918–16931.
325. K. Duan, R. Wang, *J. Mater. Chem.* **16** (2006) 2309–2321.
326. A. Selmani, I. Coha, K. Magdić, B. Čolović, V. Jakanović, S. Šegota, S. Gajović, A. Gajović, D. Jurašin, M. Dutour Sikirić, *CrystEngComm* **17** (2015) 8529–8548.
327. L. Wang, G. H. Nancollas, *Dalton Trans.* (2009) 2665–2672.
328. I. Erceg, J. Kontrec, V. Strasser, A. Selmani, D. Domazet Jurašin, M. Čurlin, B. N. Džakula, N. Matijaković Mlinarić, S. Šegota, D. M. Lyons, D. Kralj, M. Dutour Sikirić, *Minerals* **12** (2022) 208.
329. S. Li, L. Wang, *CrystEngComm* **14** (2012) 8037.
330. W. J. E. M. Habraken, J. Tao, L. J. Brylka, H. Friedrich, L. Bertinetti, A. S. Schenk, A. Verch, V. Dmitrovic, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, J. Laven, P. van der Schoot, B. Aichmayer, G. de With, J. J. DeYoreo, N. A. J. M. Sommerdijk, *Nat Commun* **4** (2013) 1507.

331. X. Yang, B. Xie, L. Wang, Y. Qin, Z. J. Henneman, G. H. Nancollas, *CrystEngComm* **13** (2011) 1153–1158.
332. Y. Chen, W. Gu, H. Pan, S. Jiang, R. Tang, *CrystEngComm* **16** (2014) 1864–1867.
333. M. D. Sikirić, H. Füredi-Milhofer, *Adv. Colloid Interface Sci.* **128–130** (2006) 135–158.
334. I. Buljan Meić, J. Kontrec, D. Domazet Jurašin, A. Selmani, B. Njegić Džakula, N. Maltar-Strmečki, D. M. Lyons, M. Plodinec, M. Čeh, A. Gajović, M. D. Sikirić, D. Kralj, *CrystEngComm* **20** (2018) 35–50.
335. F. Abbona, A. Baronnet, *J. Cryst. Growth* **165** (1996) 98–105.
336. S. Kim, H. S. Ryu, H. Shin, H. S. Jung, K. S. Hong, *Mater. Chem. Phys.* **91** (2005) 500–506.
337. K. Onuma, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **52** (2006) 223–245.
338. S. Somrani, M. Banu, M. Jemal, C. Rey, *J. Solid. State. Chem.* **178** (2005) 1337–1348.
339. J. E. Harries, D. W. L. Hukins, C. Holt, S. S. Hasnain, *J. Cryst. Growth* **84** (1987) 563–570.
340. C. G. Wang, J. W. Liao, B. D. Gou, J. Huang, R. K. Tang, J. H. Tao, T. L. Zhang, K. Wang, *Cryst. Growth Des.* **9** (2009) 2620–2626.
341. C. Combes, C. Rey, *Acta Biomater* **6** (2010) 3362–3378.
342. J. Puech, J. C. Heughebaert, G. Montel, *J. Cryst. Growth* **56** (1982) 20–25.
343. I. B. Meić, J. Kontrec, D. D. Jurasi, D. M. Lyons, M. D. Sikirić, D. Kralj, *Cryst. Growth Des.* **17** (2017) 1103–1117.
344. S. Beaufils, T. Rouillon, P. Millet, J. Le Bideau, P. Weiss, J.-P. Chopart, A.-L. Daltin, *Mater. Sci. Eng. C* **98** (2019) 333–346.
345. M. P. Ginebra, M. Espanol, Y. Maazouz, V. Bergez, D. Pastorino, *EFORT Open Rev.* **3** (2018) 173–183.
346. S. A. Delima, N. H. A. Camargo, J. C. P. Souza, E. Gemelli, *Synthesis and characterization of nanocomposite powders of calcium phosphate/titanium oxide for biomedical applications*, in Brazil, 2009.
347. M. Mir, S. Anwar Siddiqi, T. Hussain, A. Anwar Chaudhry, I. Ur Rehman, A. S. Khan, G. Abbas, *Ceram. Int.* **40** (2014) 10719–10725.
348. K. Tõnsuaadu, K. A. Gross, L. Plūduma, M. Veiderma, *J Therm Anal Calorim* **110** (2012) 647–659.
349. X. Yang, L. Wang, Y. Qin, Z. Sun, Z. J. Henneman, J. Moradian-Oldak, G. H. Nancollas, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 2293–2300.

350. P. V. Azzopardi, J. O'Young, G. Lajoie, M. E. J. Karttunen, H. A. Goldberg, G. K. Hunter, *PLoS ONE* **5** (2010) e9330-1/11.
351. J. J. M. Damen, J. M. Ten Cate, J. E. Ellingsen, *J Dent Res* **70** (1991) 1346–1349.
352. L. Y. Huang, K. W. Xu, J. Lu, *J Mater Sci Mater Med* **11** (2000) 667–673.
353. M. Shirkhazadeh, G. Liu, *Mater. Lett.* **21** (1994) 115–118.
354. Y. Liu, E. B. Hunziker, N. X. Randall, K. de Groot, P. Layrolle, *Biomaterials* **24** (2003) 65–70.
355. J. Peña, I. Izquierdo-Barba, A. Martínez, M. Vallet-Regí, *Solid State Sci.* **8** (2006) 513–519.
356. S. V. Dorozhkin, *J. Mater. Chem. B* **7** (2019) 7471–7489.
357. K. H. Park, S. J. Kim, Y. H. Jeong, H. J. Moon, H. J. Song, Y. J. Park, *Mater. Sci. Eng. C* **90** (2018) 113–118.
358. J. F. Mano, D. Koniarova, R. L. Reis, *J Mater Sci Mater Med* **14** (2003) 127–135.
359. S. M. L. Silva, C. R. C. Braga, M. V. L. Fook, C. M. O. Raposo, L. H. Carvalho, E. L. Canedo, *Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites*, in T. Theophanides (Ed.), *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, InTech, Rijeka, 2012.
360. M. S. Lord, M. Foss, F. Besenbacher, *Nano Today* **5** (2010) 66–78.
361. C. Valero Vidal, A. Igual Muñoz, *Electrochim Acta* **55** (2010) 8445–8452.
362. N. Barnthip, P. Parhi, A. Golas, E. A. Vogler, *Biomaterials* **30** (2009) 6495–6513.
363. A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nature Mater* **8** (2009) 543–557.
364. S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S. K. Knauer, R. H. Stauber, *Nature Nanotech* **8** (2013) 772–781.
365. S. A. Bender, J. D. Bumgardner, M. D. Roach, K. Bessho, J. L. Ong, *Biomaterials* **21** (2000) 299–305.
366. C. Combes, C. Rey, *Biomaterials* **23** (2002) 2817–2823.
367. E. Jia, X. Zhao, Y. Lin, Z. Su, *Appl. Surf. Sci.* **529** (2020) 146986.
368. Z. Schwartz, B. D. Boyan, *J. Cell. Biochem.* **56** (1994) 340–347.
369. G. Khang, *Biosurface Biotribology* **1** (2015) 202–213.
370. A. Farrugia, *Transfus Med. Rev.* **24** (2010) 53–63.
371. R. Maier, M. R. Fries, C. Buchholz, F. Zhang, F. Schreiber, *Cryst. Growth Des.* **21** (2021) 5451–5459.

372. I. Jurgelane, A. Buss, M. Putnina, D. Loca, J. Locs, *Mater. Lett.* **282** (2021) 128858.
373. E. Mavropoulos, A. M. Costa, L. T. Costa, C. A. Achete, A. Mello, J. M. Granjeiro, A. M. Rossi, *Colloids Surf. B* **83** (2011) 1–9.
374. S. K. Swain, D. Sarkar, *Appl. Surf. Sci.* **286** (2013) 99–103.
375. D. T. H. Wassell, R. C. Hall, G. Embery, *Biomaterials* **16** (1995) 697–702.
376. Z. Xu, V. H. Grassian, *J. Phys. Chem. C* **121** (2017) 21763–21771.
377. S. Thakur, N. Hashim, S. Neogi, A. K. Ray, *Sep. Sci. Technol.* **52** (2017) 421–434.
378. R. Rial, B. Tichnell, B. Latimer, Z. Liu, P. V. Messina, J. M. Ruso, *Langmuir* **34** (2018) 2471–2480.
379. I. Jurgelane, A. Buss, D. Loca, *Key Eng. Mater.* **721** (2016) 197–201.
380. H. Zeng, K. K. Chittur, W. R. Lacefield, *Biomaterials* **20** (1999) 377–384.
381. T. Kopac, K. Bozgeyik, *Colloids Surf. B* **76** (2010) 265–271.
382. S. Ranjan, N. Dasgupta, P. Srivastava, C. Ramalingam, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **161** (2016) 472–481.
383. H. Moussout, H. Ahlafi, M. Aazza, H. Maghat, *Karbala Int. J. Mod. Sci.* **4** (2018) 244–254.
384. N. Delgado, A. Capparelli, A. Navarro, D. Marino, *J. Environ. Manage.* **236** (2019) 301–308.
385. N. Zhou, Y. Z. Liang, P. Wang, *J. Photochem. Photobiol. A* **185** (2007) 271–276.
386. B. Zhou, Z. D. Qi, Q. Xiao, J. X. Dong, Y. Z. Zhang, Y. Liu, *J. Biochem. Biophys. Methods* **70** (2007) 743–747.
387. H. Zhao, M. Ge, Z. Zhang, W. Wang, G. Wu, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **65** (2006) 811–817.
388. Y. B. Yin, Y. N. Wang, J. B. Ma, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **64** (2006) 1032–1038.
389. L. Birla, A. M. Cristian, M. Hillebrand, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **60** (2004) 551–556.
390. W. Zhang, Q. Zhang, F. Wang, L. Yuan, Z. Xu, F. Jiang, Y. Liu, *Luminescence* **30** (2015) 397–404.
391. M. S. Ali, M. Altaf, H. A. Al-Lohedan, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **173** (2017) 108–119.
392. Y. Q. Wang, H. M. Zhang, R. H. Wang, *Colloids Surf. B* **65** (2008) 190–196.
393. A. Kathiravan, R. Renganathan, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **324** (2008) 176–180.

-
394. S. Pandit, S. Kundu, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **628** (2021) 127253.
395. L. Shang, Y. Wang, J. Jiang, S. Dong, *Langmuir* **23** (2007) 2714–2721.
396. J. R. Lakowicz, ed., *Protein Fluorescence*, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, 2006, pp. 529–575.
397. M. I. Stefan, N. L. Novère, *PLoS Comput. Biol.* **9** (2013) e1003106.

§ 8. DODATAK

Tablica D.8.1. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalog nakon 60 min u kontrolnom sustavu: $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.

Valni broj / cm^{-1}	Asignacija
3631-2518	O–H istezanje (H_2O)
1636	H–O–H deformacija (H_2O)
1104	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
1017	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
868	HPO_4^{2-}
592	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
561	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})

Tablica D.8.2. Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u difraktogramima praha taloga nastalih nakon 60 min u sustavima s različitim koncentracijama TiO_2 nanočestica (TiNP). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.

$2\theta / ^\circ$	$\gamma(\text{TiNP}) / \text{mg L}^{-1}$						Faza
	7,5	10,0	12,5	15,0	50,0	100,0	
					25,5	25,0	TiNP
	26,0	26,1	25,9	26			CaDHA
		28,8	28,6				CaDHA
	32,2	32,0	32,0	31,2	32,0	32,3	CaDHA
					37,8	38,3	TiNP
	39,1	39,2	39,6	38,4			CaDHA
	46,8	46,5	46,7				CaDHA
				48,1	48,1	48,1	TiNP
	49,6	49,6	49,6	49,6			CaDHA
	53,5	53,5	53,5				CaDHA
				53,8	54,0	53,7	TiNP
					55,4	55,1	TiNP
					62,9	63,0	TiNP

Tablica D.8.3. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektrima taloga nastalih nakon 60 min u sustavima s različitim koncentracijama TiO₂ nanočestica (TiNP). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$.

	$\gamma(\text{TiNP}) / \text{mg L}^{-1}$						Asignacija
	7,5	10,0	12,5	15,0	50,0	100,0	
Valni broj / cm^{-1}	3643–	3670–	3632–	3643–	3669–	3649–	O–H istezanje (H ₂ O)
	2610	2567	2588	2572	2770	2780	H–O–H deformacija (H ₂ O)
	1640	1643	1639	1639	1646	1640	v _{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	1114	1109	1109	1109	1102	1109	v _{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	1014	1020	1020	1021	1024	1026	v ₁ nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	956	956	967	956	957	961	HPO ₄ ²⁻
	860	867	872	872	874		v _{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	560	560	599	599	602	601	v _{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	553	548	557	557	560	559	

Tablica D.8.4. Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u difraktogramima praha taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiNPI. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNPI}) / \text{mg L}^{-1}$						Faza
	7,5	10,0	12,5	15,0	50,0	100,0	
2 θ / °	25,2	25,4	25,3	25,3	25,1	25,1	TiNPI
	26,1	26,0	26,0	26,1	26,1	26,2	CaDHA
	31,9	31,9	32,0	32,0	31,8	31,0	CaDHA
				37,0	36,9	37,1	TiNPI
		37,8	37,8	38,0	37,9	37,8	TiNPI
		48,0	48,0	48,0	48,0	48,1	TiNPI
	53,5	53,9	53,7	53,9	53,9	54	TiNPI
		54,9	55,1	55,1	55,1	55,0	TiNPI
				62,8	62,8	62,9	TiNPI

Tablica D.8.5. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiO₂ nanopločica (TiNPI). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNPI}) / \text{mg L}^{-1}$						Asignacija
	7,5	10,0	12,5	15,0	50,0	100,0	
Valni broj / cm^{-1}	3640–	3636–	3680–	3687–	3662–	3693–	O–H istezanje (H ₂ O)
	2587	2574	2542	2530	2714	2618	H–O–H deformacija (H ₂ O)
	1639	1640	16400	1639	1639	1639	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	1118	1108	1114	1102	1102	1108	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	1026	1020	1026	1026	1026	1026	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	961	961	961	961	961	961	HPO ₄ ²⁻
	875	875	876	872	879	875	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	690	595	590	590	690	595	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	545	545	547	548	545	545	

Tablica D.8.6. Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u difraktogramima praha taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiNT. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNT}) / \text{mg L}^{-1}$						Faza
	7,5	10,0	12,5	15,0	50,0	100,0	
2 θ / °	9,71	9,83	9,84			9,84	TiNT
					24,3	24,6	TiNT
	26,1	26,1	26,0	26,2	26,0	26,0	CaDHA
			28,4	28,9	28,6	28,8	TiNT
	31,6	31,8	31,8	32,0	32,0	32,3	CaDHA
			38,9	39,4	39,4	39,8	CaDHA
	46,7	46,6	46,5	46,6		46,41	CaDHA
					48,4	48,3	TiNT
	49,4	49,6	49,5	49,6			CaDHA
	53,4	53,4	53,4	53,2	53,4	53,6	CaDHA

Tablica D.8.7. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama titanatnih nanocjevčica (TiNT). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

	$\gamma(\text{TiNT}) / \text{mg L}^{-1}$						Asignacija
	7,5	10,0	12,5	15,0	50,0	100,0	
Valni broj / cm^{-1}	3463– 2579	3705– 2730	3674– 2700	3685 – 2710	3633 – 2780	3649 – 2842	O–H istezanje (H_2O)
	1640	1640	1648	1629	1640	1643	H–O–H deformacija (H_2O)
	1125	1125	1125	1115	1124	1115	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	1022	1022	1013	1031	1018	1028	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	956	947	947	952	961	961	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	878	878	883	868	878	866	HPO_4^{2-}
	599	610	606	599	601	607	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
	557	553	557	557	558	568	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})

Tablica D.8.8. Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u difraktogramima praha taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiNW. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

	$\gamma(\text{TiNW}) / \text{mg L}^{-1}$						Faza	
	7,5	10,0	12,5	15,0	50,0	100,0		
$2\theta / ^\circ$					11,2	11,3	TiNW	
					12,4	12,4	TiNW	
		31,2	31,7	32,0	31,8	31,9	31,9	CaDHA
		39,4	39,1	39,8	39,6			CaDHA
		47,2	46,8	46,7	46,7			CaDHA
		49,4	49,5	49,8	49,7	49,1		CaDHA
		53,5	53,6	53,6				CaDHA

Tablica D.8.9. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama titanatnih nanožica (TiNW). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

	$\gamma(\text{TiNW}) / \text{mg L}^{-1}$						Asignacija
	7,5	10,0	12,5	15,0	50,0	100,0	
Valni broj / cm^{-1}	3648–	3643–	3659–	3643–	3640–	3666–	O–H istezanje (H_2O)
	2572	2579	2703	2688	2871	2834	H–O–H deformacija (H_2O)
	1634	1644	1640	1634	1637	1637	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	1114	1109	1109	1114	1102	1127	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	1020	1020	1025	1025	1026	1020	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
		956	956	956	957	957	HPO_4^{2-}
	878	872	883	872	881	875	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
	601	595	595	606	603	604	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
	557	553	557	548	560	566	ν_{2b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
	463	464	448	448			

Tablica D.8.10. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama albumina iz goveđeg seruma (BSA). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

	$\gamma(\text{BSA}) / \text{mg L}^{-1}$			Asignacija
	0	50	100	
Valni broj / cm^{-1}	3631-2518	3634-2815	3666-2836	O–H istezanje (H_2O)
		2955	2945	amid B, N–H istezanje slobodnog NH_3^+ iona
		1654	1649	C=O istezanje amida I
	1636			H–O–H deformacija (H_2O)
		1513	1513	amid II, C–N istezanje i N–H savijanje
		1457	1441	amid II, C–N istezanje i N–H savijanje
		1405	1304	CH_2 savijanje
	1104	1114	1109	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	1017	1006	1010	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
		954	960	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	868	865	881	HPO_4^{2-}
	592	601	601	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
561	554	554	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	

Tablica D.8.11. Assignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u difraktogramima praha taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiO₂ nanočestica (TiNP) i 50 mg L⁻¹ BSA. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNP}) / \text{mg L}^{-1}$		Faza
	50	100	
$2\theta / ^\circ$	25,32	25,33	TiNP
		28,18	
	32,06	32,06	CaDHA
	37,66	37,77	TiNP
	47,99	48,29	TiNP
	53,69	53,99	CaDHA
	55,03	55,03	TiNP
	63,15	62,85	TiNP

Tablica D.8.12. Assignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim TiO₂ nanočestica (TiNP) i 50 mg L⁻¹ BSA. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNP}) / \text{mg L}^{-1}$		Assignacija
	50	100	
$2\theta / ^\circ$	3646 - 2811	3659 - 2795	O-H istezanje (H ₂ O)
	2954	2960	amid B, N-H istezanje slobodnog NH ₃ ⁺ iona
		2922	
	1644	1652	C=O istezanje amida I
	1533	1536	amid II, C-N istezanje i N-H savijanje
	1459		amid II, C-N istezanje i N-H savijanje
	1411		CH ₂ savijanje
	1107	1107	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	1017	1029	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	964	958	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	597	607	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	555	555	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO ₄ ³⁻)

Tablica D.8.13. Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u rendgenogramima praha taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiO₂ nanopločica (TiNPI) i 50 mg L⁻¹ albumina iz govedjeg seruma (BSA). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³, pH_{poč} = 7,4, pri 25 °C

	$\gamma(\text{TiNPI}) / \text{mg L}^{-1}$		Faza
	50	100	
$2\theta / ^\circ$	25,3	25,3	TiNPI
	26,0	26,0	CaDHA
	32,1	31,9	CaDHA
	36,9	36,9	TiNPI
	37,8	37,9	TiNPI
	38,6	38,5	TiNPI
	48,0	48,1	TiNPI
	53,9	53,9	TiNPI
	55,1	55,1	TiNPI
	62,8	62,8	TiNPI

Tablica D.8.14. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiO₂ nanopločica (TiNPI) i 50 mg L⁻¹ albumina iz govedjeg seruma (BSA). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³, pH_{poč} = 7,4, pri 25 °C

	$\gamma(\text{TiNPI}) / \text{mg L}^{-1}$		Asignacija
	50	100	
$2\theta / ^\circ$	3660 - 2573	3666-2605	O-H istezanje (H ₂ O)
	2963	2960	Ti-OH, TiNPI
	1652	1652	C=O istezanje amida I
	1537	1545	amid II, C-N istezanje i N-H savijanje
	1112	1109	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	1023	1023	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P-O veze(PO ₄ ³⁻)
	962	962	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	596	597	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	552	558	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO ₄ ³⁻)

Tablica D.8.15. Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u rendgenogramima praha taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama titanatnih nanocjevčica (TiNT) i 50 mg L⁻¹ albumina iz goveđeg seruma. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

$2\theta / ^\circ$	$\gamma(\text{TiNT}) / \text{mg L}^{-1}$		Faza
	50	100	
		24,42	TiNT
	26,11	26,19	CaDHA
	28,40	28,34	TiNT
	32,14	32,01	CaDHA
	39,40	39,29	CaDHA
	46,90		CaDHA
	48,29	48,53	TiNT
	49,78		CaDHA
	53,47	53,73	CaDHA

Tablica D.8.16. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama titanatnih nanocjevčica (TiNT) i 50 mg L⁻¹ albumina iz goveđeg seruma. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

$2\theta / ^\circ$	$\gamma(\text{TiNT}) / \text{mg L}^{-1}$		Asignacija
	50	100	
	3653 - 2988	3673-2835	O-H istezanje (H ₂ O)
	2944		amid B, N-H istezanje slobodnog NH ₃ ⁺ iona
	1653	1647	C=O istezanje amida I
	1537	1531	amid II, C-N istezanje i N-H savijanje
	1455	1442	amid II, C-N istezanje i N-H savijanje
	1409	1417	CH ₂ savijanje
		1275	HPO ₄ ²⁻
	1122	1129	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	1020	1020	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	962	968	ν_1 nede degenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	866		HPO ₄ ²⁻
	604	598	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	555	553	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)

Tablica D.8.17. Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u rendgenogramima praha taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama titanatnih nanožica (TiNW) i 50 mg L⁻¹ albumina iz goveđeg seruma (BSA). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³, pH_{poč} = 7,4, pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNW}) / \text{mg L}^{-1}$		Faza
	50	100	
$2\theta / ^\circ$	11,4	11,6	TiNW
		12,3	TiNW
	26,0	26,2	CaDHA
	32,0	32,0	CaDHA
	53,6	53,5	CaDHA

Tablica D.8.18. Asignacija opaženih vibracijskih vrpce u FTIR spektru taloga nastalih nakon 60 minuta u sustavima s različitim koncentracijama titanatnih nanožica (TiNW) i 50 mg L⁻¹ albumina iz goveđeg seruma (BSA). $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³, pH_{poč} = 7,4, pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNW}) / \text{mg L}^{-1}$		Asignacija
	50	100	
$2\theta / ^\circ$	3658 - 2354	3651-2545	O–H istezanje (H ₂ O)
	2923	2948	Ti-OH, TiNW
	1651	1651	C=O istezanje amida I
	1536	1530	amid II, C-N istezanje i N-H savijanje
	1101	1114	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	1019	1019	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
		961	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	884	871	HPO ₄ ²⁻
	697	692	amid V, NH savijanje
	590	596	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	558	558	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)

Tablica D.8.19. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 120 minuta u sustavima s različitim koncentracijama kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

	$\gamma(\text{kitozan}) / \text{mg L}^{-1}$					Asignacija
	0	7,5	10,0	12,5	15,0	
Valni broj / cm^{-1}	3692-2721	3649-2630	3387-2730	3387-2730	3526-2829	O–H istezanje (H_2O)
	1649	1650	1654	1651	1649	H_2O ili C=O istezanje amida I
	1281	1279	1281	1281	1281	
	1105	1098	1100	1106	1119	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
						ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	1022	1014	1018	1018	1020	ili vibracija C–O u COH, COC i CH_2OH
	963					ν_1 nedeGenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	869	873	878	878	854	HPO_4^{2-}
	599	599	599	599	599	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
	559	556	557	557	557	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})

Tablica D.8.20. Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u rendgenogramima praha taloga nastalih nakon 110 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiO_2 nanočestica (TiNP) i 15 mg L^{-1} kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

	$\gamma(\text{TiNP}) / \text{mg L}^{-1}$		Faza
	50	100	
$2\theta / ^\circ$	25,4	25,2	TiNP
	31,9	31,9	CaDHA
	38,0	37,8	TiNP
	48,1	48,0	TiNP
	53,9		CaDHA
	54,9		TiNP
	63,8		TiNP

Tablica D.8.21. Assignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 120 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiO₂ nanočestica (TiNP) i 15 mg L⁻¹ kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNP}) / \text{mg L}^{-1}$		Asignacija
	50	100	
Valni broj / cm ⁻¹	3300-2980	3582-2980	O–H istezanje (H ₂ O)
	1646		H ₂ O ili C=O istezanje amida
		1598	vibracije protonirane amino grupe
	1115	1122	v _{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	1022	1024	v _{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻) ili vibracija C–O u COH, COC i CH ₂ OH
	963	962	v ₁ nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	873	867	HPO ₄ ²⁻
	599	599	v _{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	558	558	v _{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)

Tablica D.8.22. Assignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u rendgenogramima praha taloga nastalih nakon 120 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiO₂ nanopločica i 15 mg L⁻¹ kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNPI}) / \text{mg L}^{-1}$		Faza
	50	100	
2 θ /°	25,33	25,37	TiNPI
	26,05	26,05	CaDHA
	31,87	31,76	CaDHA
	37,79	37,70	TiNPI
	48,04	48,04	TiNPI
	53,85	53,98	CaDHA
	54,96	55,05	TiNPI
	62,78	62,77	TiNPI

Tablica D.8.23. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 120 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiO₂ nanopločica i 15 mg L⁻¹ kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNPl}) / \text{mg L}^{-1}$		Asignacija
	50	100	
$2\theta / ^\circ$	3635 – 2642	3637 - 2700	O–H istezanje (H ₂ O)
	1649	1646	H ₂ O ili C=O istezanje amida
	1122	1122	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	1022	1023	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻) ili vibracija C–O u COH, COC i CH ₂ OH
	963	962	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	877	874	HPO ₄ ²⁻
	599	599	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)
	559	558	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO ₄ ³⁻)

Tablica D.8.24. Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u rendgenogramima praha taloga nastalih nakon 120 minuta u sustavima s različitim TiO₂ nanocjevčica i 15 mg L⁻¹ kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$, pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNT}) / \text{mg L}^{-1}$		Faza
	50	100	
$2\theta / ^\circ$	25,45	25,33	CaDHA
	31,99	32,11	CaDHA
	38,05	38,05	
	48,04	48,15	TiNT
	53,50	53,85	CaDHA
		55,17	
	62,66	62,77	

Tablica D.8.25. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 120 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiO₂ nanocjevčica i 15 mg L⁻¹ kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pH_{poč} = 7,4, pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNT}) / \text{mg L}^{-1}$		Asignacija
	50	100	
Valni broj / cm ⁻¹	3643 - 2814	3647 - 2360	O-H istežanje (H ₂ O)
	1650	1647	H ₂ O ili C=O istežanje amida I
	1122	1120	v _{3a} trostruko degenerirano asimetrično istežanje P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	1022	1015	v _{3c} trostruko degenerirano asimetrično istežanje P-O veze (PO ₄ ³⁻) ili vibracija C-O u COH, COC i CH ₂ OH
	963	967	v ₁ nedegenerirano simetrično istežanje P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	875		HPO ₄ ²⁻
	599	600	v _{4a} trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	558	560	v _{4b} trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO ₄ ³⁻)
	455	455	Ti-O

Tablica D.8.26. Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u rendgenogramima praha taloga nastalih nakon 120 minuta u sustavima s različitim koncentracijama titanatnih nanožica (TiNW) i 15 mg L⁻¹ kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pH_{poč} = 7,4 pri 25 °C.

	$\gamma(\text{TiNW}) / \text{mg L}^{-1}$		Faza
	50	100	
2 θ / °	11,20	11,31	TiNW
	25,82	26,05	TiNW
	32,11	32,23	CaDHA
	44,97	44,35	
		46,57	CaDHA
	48,58	48,39	TiNW
	53,23	53,23	CaDHA

Tablica D.8.27. Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektru taloga nastalih nakon 120 minuta u sustavima s različitim koncentracijama TiO_2 nanožica (TiNW) i 15 mg L^{-1} kitozana. $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{poč}} = 7,4$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

	$\gamma(\text{TiNW}) / \text{mg L}^{-1}$		Asignacija
	50	100	
$2\theta / ^\circ$	3611 - 2746	3628 - 2684	O–H istezanje (H_2O)
	1649	1647	H_2O ili C=O istezanje amida
	1120	1117	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	1024	1022	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-}) ili vibracija C–O u COH, COC i CH_2OH
	962	961	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})
	599	599	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
	559	558	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})
	463	455	Ti–O

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Ina Erceg
Datum rođenja: 1.2.1994.
Mjesto rođenja: Slavonski Brod
email: ierceg@irb.hr

Obrazovanje:

2017. – 2022. Poslijediplomski studij kemije – smjer fizikalna kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Mentor: dr. sc. Maja Dutour Sikirić, v. zn. sur.

2015. – 2017. Diplomski studij kemije – istraživački smjer, grane fizikalna i anorganska kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Mentor: dr. sc. Maja Dutour Sikirić, v. zn. sur.

2012. – 2015. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2008. – 2012. Opća gimnazija "Matija Mesić"

2000. – 2008. Osnovna glazbena škola "Ivan pl. Zajc", Slavonski Brod

2000. – 2008. Osnovna škola "Ivan Goran Kovačić", Slavonski Brod

Zaposlenje:

2018. – Asistent, Laboratorij za biokoloide i površinsku kemiju, Zavod za fizičku kemiju, Institut Ruđer Bošković

2018. – 2020. Asistent, Zavod za fizikalnu kemiju Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Kolegij: Praktikum fizikalne kemije 2

Objavljeni znanstveni radovi:

14. M. Vidotto, T. Grego, B. Petrović, N. Somers, T. Antonić Jelić, D. Kralj, N. Matijaković Mlinarić, A. Leriche, M. Dutour Sikirić, **I. Erceg***, N. Maltar.Strmečki, *Crystals*, **12** (2022) 297.

13. **I. Erceg**, J. Kontrec, V. Strasser, A. Selmani, D. Domazet Jurašin, M. Čurlin, B. Njegić Džakula, N. Matijaković Mlinarić, S. Šegota, D. M. Lyons, D. Kralj, M. Dutour Sikirić, *Minerals*, **12** (2022) 208-227.

12. L. Mandić, A. Sadžak, **I. Erceg**, G. Baranović, S. Šegota, *Antioxidans* **10** (2021) 1212-1231.

11. **I. Erceg**, N. Maltar-Strmečki, D. Domazet Jurašin, V. Strasser, M. Čurlin, D. M. Lyons, B. Radatović, N. Matijaković Mlinarić, D. Kralj, M. Dutour Sikirić, *Crystals*, **11** (2021) 1-16.

10. **I. Erceg**, A. Selmani, A. Gajović, B. Radatović, S. Šegota, M. Ćurlin, V. Strasser, J. Kontrec, D. Kralj, N. Maltar-Strmečki, R. Barbir, B. Pem, I. Vinković Vrček, M. Dutour Sikirić, *Nanomaterials*, **11** (2021) 1523
9. N. Maltar-Strmečki, M. Vidotto, S. Della Monaca, **I. Erceg**, P. Fattibene, M. Vojnić Kortmiš, M. C. Quattrini, E. Bortolini, *Front. Public Health*, **9** (2021) 661376.
8. A. Testa, C. Patrono, V. Palma, L. Kenzhina, A. Mamyrbayeva, D. Biakhmetova, F. Zhamaldinov, S. Della Monaca, P. Fattibene, M. C. Quattrini, N. Maltar-Strmečki, **I. Erceg**, M. Vojnić Kortmiš, M. Vidotto, E. Bortolin, *II Nuovo cimento C*, **43C** (2020) 153.
7. E. Galić, K. Ilić, S. Hartl, C. Tetyczka, K. Kasemets, I. Kurvet, M. Milić, R. Barbir, B. Pem, **I. Erceg**, M. Dutour Sikirić, I. Pavičić, E. Roblegg, A. Kahru, I. Vinković Vrček, *Food Chem. Toxicol.*, **144** (2020) 111621.
6. A. Sadžak, J. Mravljak, N. Maltar-Strmečki, Z. Arsov, G. Baranović, **I. Erceg**, M. Kriechbaum, V. Strasser, J. Pribyl, S. Šegota, *Antioxidans*, **9** (2020) 430-460.
5. **I. Erceg**, A. Selmani, A. Gajović, I. Panžić, D. Iveković, F. Faraguna, S. Šegota, M. Ćurlin, V. Strasser, J. Kontrec, D. Kralj, N. Maltar-Strmečki, M. Dutour Sikirić, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **593** (2020) 124615.
4. A. Selmani, L. Ulm, K. Kasemets, I. Kurvet, **I. Erceg**, R. Barbir, B. Pem, P. Santini, I. Delač Marion, T. Vinković, A. Krivohlavek, M. Dutour Sikirić, A. Kahru, I. Vinković Vrček, *Chemosphere*, **250** (2020) 126265.
3. M. Varga, J. Horvatić, L. Barišić, Z. Lončarić, M. Dutour Sikirić, **I. Erceg**, A. Kočić, I. Štolfa Čamagajevac *Aquat. Toxicol.*, **207** (2019) 52-62.
2. V. Čadež, **I. Erceg**, A. Selmani, D. Domazet Jurašin, S. Šegota, D. M. Lyons, M. Dutour Sikirić, *Crystals*, **8** (2018) 254.
1. S. Šafranko, D. Goman, F. Bolić, M. Sekulić, A. Stanković, N. Matijaković, **I. Erceg**, B. Marković, *Kem. u ind.*, **67** (2018) 73-83.

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

Ina Erceg sudjelovala je na 34 znanstvena skupa, od kojih je na 12 sudjelovala kao prvi autor, a na 22 je koautor. Na 12 skupova na kojima je sudjelovala kao prvi autor, održala je 8 usmenih izlaganja od kojih je 5 održano na znanstvenim skupovima s međunarodnim sudjelovanjem.

1. I. Erceg, A. M. Milisav, V. Strasser, M. Dutour Sikirić, *Simultaneous influence of titanate nanomaterials and chitosan on precipitation of calcium phosphate*, 4th Croatian Microscopy Congress, 18. – 20.5.2022., Poreč, Hrvatska (usmeno izlaganje)
2. I. Erceg, S. Šegota, M. Dutour Sikirić, *The kinetics of bovine serum adsorption onto CaP/TiO₂ nanocomposites*, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, 5. – 8.10.2021., Veli Lošinj, Hrvatska (postersko izlaganje)
3. I. Erceg, V. Strasser, M. Dutour Sikirić, *Comparison of Chitosan and Albumin influence on Calcium Phosphate formation on TiO₂ nanomaterials*, 35th Conference of the European Colloid & Interface Society, Atena, Grčka, 5. – 10.9.2021. (postersko izlaganje).

4. I. Erceg, I. Panžić, A. Selmani, M. Ćurlin, A. Gajović, M. Dutour Sikirić, *The influence of albumin on biomimetic formation of calcium phosphates / TiO₂ nanowires composites*, 3rd Workshop on Characterization and Analysis of Nanomaterials, 3. – 5.2.2021., University of Aveiro, Portugal (online, [usmeno izlaganje](#))
5. I. Erceg, S. Šegota, N. Maltar – Strmečki, M. Dutour Sikirić, *Evaluating the impact of gamma sterilization on calcium phosphates composites with different TiO₂ nanomaterials*, 45th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, 13. – 17.9.2020. Lund, Sweden (online, postersko izlaganje)
6. I. Erceg, V. Strasser, A. Selmani, J. Kontrec, D. Kralj, I. Tartaro Bujak, B. Mihaljević, M. Dutour Sikirić, *The kinetics of bovine serum albumine adsorption on calcium phosphate and TiO₂ nanoparticles or nanotubes nanocomposites*, Xmas Biophysics Workshop, 9. – 10.12.2019., Gradisca d'Isonzo, Italija ([usmeno izlaganje](#))
7. I. Erceg, A. Selmani, M. Dutour Sikirić, *Formation of calcium phosphates on TiO₂ nanotubes in the presence of albumine: insight in formation of multifunctional nanocomposites*, 14th Multinational Congress on Microscopy, 15. – 20.9.2019., Beograd, Srbija ([usmeno izlaganje](#))
8. I. Erceg, A. Selmani, M. Dutour Sikirić, *Biomimetic synthesis of calcium phosphate and TiO₂ nanomaterials nanocomposites*, Solid-State Science & Research Meeting, 27. – 29.6.2019., Zagreb, Hrvatska (postersko izlaganje)
9. I. Erceg, A. Selmani, M. Ćurlin, D. Domazet Jurašin, D. Kralj, M. Dutour Sikirić, *Effect of liposome composition on calcium phosphate precipitation*, 14th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics, 23.8. – 1.9.2018., Split, Hrvatska (postersko izlaganje)
10. I. Erceg, A. Selmani, M. Ćurlin, D. Domazet Jurašin, V. Čadež, D. Kralj and M. Dutour Sikirić, *Effect of liposome composition on calcium phosphates formation and transformation*, 4th International Scientific Meeting and 5th MC Meeting of COST Action CM1306 Understanding Movement and Mechanism in Molecular Machines, 21. – 24.3.2018., Zagreb, Hrvatska (postersko i [usmeno izlaganje](#)).
11. I. Erceg: *Insight into the initial stages of biomineralization: investigation of amorphous calcium phosphate formation by dynamic light scattering and laser diffraction*, Simpozij studenata kemičara, 28.10.2017., Zagreb, Hrvatska ([usmeno izlaganje](#))

Stručna usavršavanja

Training course 35th Conference of the European Colloid & Interface Society, 3. – 4.9.2021., Atena, Grčka.

Online ljetna škola i radionica "Supramolecular and Colloid Chemistry and Physics for the Life Sciences", 27. – 29.7.2020, Sveučilište u Rijeci, Hrvatska.

Studijski boravak u "Laboratoire des Materiaux Ceramiques et Procèdes Associes", Maubeuge, France (Stipendija vlade Republike Francuske).

14th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics, 23.8. – 1.9.2018., Sveučilište u Splitu, Hrvatska.

Cost CM1306 Training School: Bio-imaging using advanced microscopy methods, Centre for free electron laser Science, 23. – 27.4.2018., Hamburg, Germany.

Suradnica na projektima:

2021. – Hrvatsko–francuski bilateralni projekt "Systematic investigation of adsorption of proteins on calcium phosphate based bioceramics for bone tissue engineering", Cogito
Voditelj: dr.sc. Maja Dutour Sikirić
2020. – NATO SPS project G5684 " Novel biological and physical methods for triage in radiological and nuclear (r/n) emergencies (BioPhyMeTRe)"
Voditelj: dr. sc. Nadica Maltar Strmečki
- 2019.–2022. Hrvatsko–srpski bilateralni projekt "Ionski supstituirani hidroksiapatiti za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva, Ministarstvo znanosti i obrazovanja"
Voditelj: dr. sc. Maja Dutour Sikirić
2018. – "Mehanizmi nastajanja kalcijevih fosfata na anorganskim nanomaterijalima. Biomimetski put pripreve multifunkcionalnih nanokompozita za regeneraciju čvrstih tkiva (CaPBiomimNanocomp)", Hrvatska zaklada za znanost
Voditelj: dr. sc. Maja Dutour Sikirić

Nagrade i priznanja:

2019. Nagrada za najbolje postersko izlaganje, Solid-State Science & Research Meeting, Zagreb
2017. Nagrada Kemijskog odsjeka za znanstveni rad
2017. Rektorova nagrada za znanstveno istraživanje
2007. Global Virtual Classroom Contest 2006/2007, Second prize