



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

DZIEDZINA Nauki inżynieryjno-techniczne
DYSCYPLINA Inżynieria Materiałowa

ROZPRAWA DOKTORSKA

*Funkcjonalizacja powierzchni stopu NiTi na drodze obróbki chemicznej
i wytwarzania powłok na bazie chitozanu z nanocząstkami metali*

*Surface functionalization of NiTi alloy using chemical treatment and
obtaining chitosan-based coatings with metal nanoparticles*

mgr inż. Piotr Franciszek Jabłoński

Promotor rozprawy: dr hab. inż. Karol Kyzioł, prof. AGH

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Fizykochemii i Modelowania Procesów

Kraków, 2023

Prace prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej były finansowane w ramach:

- 1) Projektu "Najlepsi z najlepszych! 3.0", (program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój nr 03.03.00-00-P011/18), zatytułowanego "Bioaktywne powłoki na aktywowanej plazmochemicznie powierzchni stopu NiTi", projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej.

Kierownik projektu: dr hab. inż. Karol Kyzioł, prof. AGH



Rzeczpospolita
Polska



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



- 2) Projektu realizowanego w ramach Działania 4 (program Inicjatywa Doskonałości Uczelnia Badawcza), zatytułowanego "Funkcjonalne układy multiwarstwowe biopolimer-biologicznie aktywne nanocząstki w modyfikacji powierzchni stopów z pamięcią kształtu".

Kierownik projektu: dr hab. inż. Karol Kyzioł, prof. AGH



Część prowadzonych badań zrealizowano w ramach stażu w ośrodkach Instituto Universitario de Investigación de Nanociencia de Aragón oraz CIBA: Centro de Investigación Biomédica de Aragón, sfinansowanego w ramach środków Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej w programie STER - umiędzynarodowienie szkół doktorskich, umowa nr PPI/STE/2020/1/00020/U/00001.



NARODOWA AGENCJA
WYMIANY AKADEMICKIEJ



PROGRAM
STER



KRAKOWSKA
INTERDYSCYPLINARNA
SZKOŁA DOKTORSKA

Dorobek naukowy Doktoranta pozwolił na pozyskanie w 2021 roku finansowania dla projektu badawczego ze środków Narodowego Centrum Nauki, w ramach projektu PRELUDIUM 20 (2021/41/N/ST8/02138) zatytułowanego: "Antybakteryjne i osteoindukcyjne multiwarstwy biopolimerowe zawierające biologicznie aktywne nanocząstki w modyfikacji powierzchni stopów z pamięcią kształtu". Kierownik projektu: mgr inż. Piotr Jabłoński.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Podziękowania

Dziękuję prof. dr hab. inż. Markowi Przybylskiemu za umożliwienie korzystania z bogatej oferty aparatury Akademickiego Centrum Materiałów i Nanotechnologii AGH.

Dziękuję dr inż. Marcie Gajewskiej (ACMiN, AGH) za umożliwienie przeprowadzenia badań morfologii nanocząstek.

Dziękuję dr inż. Mateuszowi Marcowi (ACMiN, AGH) za umożliwienie przeprowadzenia badań rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów i pomoc w ich interpretacji.

Dziękuję dr inż. Mariannie Marciszko-Wiąckowskiej (ACMiN, AGH) za umożliwienie przeprowadzenia badań składu fazowego.

Dziękuję dr inż. Kamili Kollbek (ACMiN, AGH) za pomoc w optymalizacji warunków otrzymywania nanocząstek i wsparcie merytoryczne z zakresu wykorzystania metody.

Dziękuję prof. dr hab. Halinie Krawiec (Wydział Odlewnictwa AGH) za umożliwienie przeprowadzenia badań korozyjnych i pomoc w ich interpretacji.

Dziękuję dr hab. inż. Magdalenie Ziąbce, prof. AGH (WIMiC, AGH) za wykonanie obrazowania powierzchni przeprowadzonych w pracy modyfikacji.

Dziękuję dr inż. Elżbiecie Długoń (WIMiC, AGH) za umożliwienie przeprowadzenia badań zwilżalności powierzchni.

Dziękuję dr hab. Agnieszce Kyzioł, prof. UJ (Wydział Chemii, UJ) za wykonanie badań biologicznych na liniach komórkowych i umożliwienie badań uwalniania nanocząstek oraz za opiekę merytoryczną podczas stażu naukowego.

Un agradecimiento especial al prof. Manuel Arruebo y prof. Victor Sebastian por recibirme en Zaragoza, su abertura y aceptarme en su equipo en Centro de Investigación Biomédica de Aragón y Instituto Universitario de Investigación de Nanociencia de Aragón.

Agradecimiento al dr Cristina Yus Argón para ayuda con pruebas antibacterianas y al prof. Sylva Inrusta por XPS pruebas.

Szczególne podziękowania kieruję do mojego promotora i opiekuna naukowego dr hab. inż. Karola Kyzioła, prof. AGH za nieocenioną pomoc otrzymaną w realizacji tej pracy, cenne wskazówki, opiekę merytoryczną i motywację do stawiania sobie ambitnych celów.

Ponadto chciałabym podziękować moim Rodzicom Halinie i Bogusławowi, którzy wspierają mnie i bez których moja edukacja nie byłaby możliwa.

Szczególne podziękowania kieruję również do mojej Żony Klaudii za wsparcie w okresie powstawania tej pracy, za motywację i dopingowanie w trudnych momentach. Dziękuję!

*Kraków – Olkusz – Jasło – Katowice
2022-2023*

Spis treści

1. Biomateriały metaliczne z pamięcią kształtu.....	10
1.1. Stopy na bazie niklu i tytanu	14
1.1.1. Nitinol.....	15
1.1.2. Stopy NiTi domieszkowane srebrem	15
1.1.3. Stopy NiTi domieszkowane niobem	16
1.2. Stopy na bazie tytanu i niobu	17
1.2.1. Stop TiNb	17
1.2.2. Stopy TiNb domieszkowane cyną.....	18
1.2.3. Stop TiNb domieszkowane tantalum.....	19
2. Wybrane metody modyfikacji powierzchni nitinolu do zastosowań biomedycznych.....	21
2.1. Obróbka mechaniczna	21
2.2. Obróbka w środowisku chemicznym	22
2.3. Obróbka cieplna.....	24
3. Funkcjonalizacja powierzchni stopów biopolimerami	26
3.1. Chitozan.....	27
3.2. Fibroina.....	29
3.3. Alginiany	29
4. Otrzymywanie nanomateriałów nieorganicznych metodami bottom-up.....	32
4.1. Metody chemii mokrej.....	33
4.1.1. Współstrącanie	34
4.1.2. Redukcja chemiczna.....	35
4.2. Metody próżniowe.....	35
4.2.1. Chemiczne osadzanie z fazy gazowej wspomagane aerozolem.....	36
4.2.2. Metoda kondensacji w obecności gazu obojętnego	37
4.3. Biosynteza nanomateriałów	38
5. Bioaktywne nanocząstki metali	41
5.1. Nanocząstki srebra	41
5.2. Nanocząstki złota	43
5.3. Nanocząstki miedzi	44
6. Uwalnianie czynników bioaktywnych.....	46
6.1. Modele kierowanego uwalniania.....	48
6.1.1. Era „makro”.....	48
6.1.2. Era „mikro”	49
6.1.3. Era „nano”	50

7. Cel naukowy oraz tezy pracy	52
8. Metodyka badawcza.....	54
8.1. Opis prac eksperymentalnych.....	54
8.1.1. Przygotowanie powierzchni stopu	56
8.1.2. Obróbka chemiczna.....	56
8.1.3. Obróbka w warunkach plazmy.....	57
8.1.4. Depozycja powłok bioaktywnych	57
8.1.4.1. Przygotowanie koloidów i synteza warstw na bazie koloidów	58
8.1.4.1.1. Koloid chitozanu z nanocząstkami złota.....	59
8.1.4.1.2. Koloid chitozanu z nanocząstkami srebra.....	59
8.1.4.1.3. Otrzymanie warstw na bazie koloidów	59
8.1.4.2. Otrzymywanie nanokompozytów warstwowych metodą hybrydową	60
8.1.4.2.1. Otrzymywanie warstw chitozanu.....	60
8.1.4.2.2. Otrzymywanie nanocząstek złota techniką IGC	61
8.1.4.2.3. Otrzymywanie nanocząstek srebra techniką IGC	66
8.1.4.2.4. Otrzymywanie nanocząstek miedzi techniką IGC	71
8.2. Metody badań	76
8.2.1. Badania z zakresu inżynierii powierzchni materiałów.....	76
8.2.2. Badania biologicznych	81
8.2.2.1. Badania cytotoksyczności.....	81
8.2.2.1. Badanie antybakteryjności	82
9. Wyniki badań wraz z dyskusją	84
9.1. Obróbka powierzchni nitinolu metodą trawienia w środowisku kwasowym.....	84
9.1.1. Morfologia powierzchni	84
9.1.2. Topografia powierzchni	94
9.1.3. Skład chemiczny	99
9.1.4. Budowa fazowa powierzchni	109
9.1.5. Zwilżalność i energia powierzchniowa	113
9.2. Warstwy bionanokompozytowe na bazie chitozanu i wybranych nanocząstek metali 120	
9.2.1. Morfologia nanocząstek wybranych metali	121
9.2.1.1. Nanocząstki złota	121
9.2.1.1.1. Koloid CS@AuNPs	122
9.2.1.1.2. Nanocząstki złota wytworzone metodą IGC.....	125
9.2.1.2. Nanocząstki srebra	127

9.2.1.2.1.	Koloid CS@AgNPs	127
9.2.1.2.2.	Nanocząstki srebra otrzymane metodą IGC.....	129
9.2.1.3.	Nanocząstki miedzi	132
9.2.2.	Mikrostruktura otrzymanych warstw	135
9.2.3.	Topografia i chropowatość otrzymanych warstw	137
9.2.4.	Skład chemiczny struktur warstwowych.....	141
9.2.5.	Budowa fazowa warstw	147
9.2.6.	Zwilżalność powierzchni i energia powierzchniowa warstw.....	149
9.2.7.	Badania korozyjne.....	153
9.2.7.1.	Woltamperometria liniowa	154
9.2.7.2.	Potencjał obwodu otwartego.....	156
9.2.8.	Badania biologiczne <i>in vitro</i>	159
9.2.9.	Schemat uwalniania nanocząstek	164
9.2.10.	Badania antybakteryjności	171
10.	Podsumowanie i wnioski.....	181
11.	Literatura	184

Wstęp

Współczesna inżynieria biomateriałów pozwala na ciągły rozwój medycyny między innymi w zakresie implantów medycznych, których celem jest ułatwienie i umożliwienie normalnego funkcjonowania ludzi dotkniętych dysfunkcjami. Jednym z ważniejszych kierunków prowadzonych prac jest projektowanie implantów ortopedycznych, których ciągły rozwój spowodowany jest koniecznością reagowania na potrzeby osób dotkniętych osteoporozą, czy też ofiar wypadków komunikacyjnych. W związku z tym duże wyzwanie stanowi obecnie otrzymywanie funkcjonalnych pokryw spełniających wymagania stawiane biomateriałom w zakresie właściwości fizykochemicznych, użytkowych i spełniających jednocześnie rolę bioaktywnych czynników stymulujących do zastosowań w coraz to bardziej wymagającym środowisku organizmu.

Jedną z szerzej stosowanych grup materiałów w aplikacjach ortopedycznych stanowią metale i ich stopy, zwykle na bazie tytanu, które charakteryzują się dobrą biokompatybilnością z tkanką kostną. Jednak niejednokrotnie, przez niewystarczające dopasowanie parametrów mechanicznych do tkanki kostnej, powodują one ekranowanie naprężeń i w rezultacie konieczność ponownych implantacji. Pewną alternatywą dla konwencjonalnych stopów metali jest stop NiTi, który ze względu na superelastyczność wykazuje znacznie lepszą biogodność mechaniczną z tkanką kostną. Nitinol, z uwagi na uzyskanie szeregu pożądanych właściwości dla zastosowania dla ortopedii, w tym ograniczenia obecności alergennego niklu oraz zachowania funkcjonalności powierzchni w zakresie odpowiedzi biologicznej i ochrony przed korozją, wymaga modyfikacji powierzchni. Pożądanym również dla tych aplikacji jest uzyskanie chropowatości powierzchni wspomagającej proces osteointegracji, przez co zespół stawianych wymagań w zakresie właściwości użytkowych wszczepu stanowi duże wyzwanie dla naukowców.

Z drugiej strony aktualny stan wiedzy w zakresie inżynierii powierzchni pozwala na intencjonalną implementację procesów i modyfikację powierzchni prowadzącą do zmiany funkcjonalnych parametrów materiałów dla bioinżynierii. W tym kontekście modyfikacje powierzchni stopu NiTi mogą stanowić procesy obróbki mechanicznej, termicznej lub trawienia chemicznego. Ostatni z wymienionych procesów wpływa skutecznie nie tylko na parametry powierzchni takie jak chropowatość, czy parametry zwilżalności, ale również jest w stanie skutecznie zmieniać jej reaktywność poprzez tworzenie warstw pasywacyjnych, np. złożonych z tlenków metali. Proces trawienia chemicznego jest również istotnym etapem przygotowania powierzchni w kontekście jej modyfikacji z otrzymaniem powłok. Modyfikacja

stopu poprzez uzyskanie pokryć pozwala na dodatkowe zabezpieczenie materiału, jak również uzyskanie na tej drodze dodatkowych funkcjonalności, zwykle pożądaných w nowoczesnych biomateriałach.

Powłoki, poza wymaganiami opisanymi dla powierzchni biomateriału metalicznego, mogą również pełnić rolę mobilizującą komórki organizmu do wzmożonej proliferacji i szybszej adaptacji wszczepu, wykazywać właściwości antybakteryjne niezbędne do ograniczenia skutków zapaleń i zakażeń po implantacji oraz pełnić funkcje nośników leków. Do grupy pokryć mogących spełniać znaczną większość wymienionych wymagań należą biopolimery, czyli polimery uzyskane ze źródeł naturalnych. Najbardziej reprezentatywnym przykładem takiego materiału jest chitozan, który sam w sobie spełnia wymogi do stosowania go jako biozgodnego z tkanką kostną. Ponadto wykazuje on (w ograniczonym zakresie) działanie antybakteryjne oraz charakteryzuje się wymaganą chropowatością i zwilżalnością w kontakcie z tkanką kostną, co ostatecznie wpływa na korzystne warunki do wzmożonej proliferacji komórek na jego powierzchni. Jednakże w kontekście uzyskania dodatkowo przez warstwy chitozanu działania bioaktywnego, umożliwiającego poprawę właściwości antybakteryjnych oraz pełnienia roli matrycy dla terapeutyku o kontrolowanej kinetyce jego uwalniania, wymagana jest jego dalsza modyfikacja. Przykładowo procesy te mogą następować poprzez włączenie w jego strukturę nanocząstek metali, które wykazują działanie antybakteryjne, a ich stężenie może być dodatkowo kontrolowane w czasie poprzez zaplanowany system dozowania. Do takich nanomateriałów należą m. in. nanocząstki złota, srebra oraz miedzi, które charakteryzują się działaniem bakteriostatycznym i/lub bakteriobójczym, na które (w przeciwieństwie do antybiotyków) bakterie nie wykazują tendencji do wykształcenia oporności. Istotnym celem w tym kierunku jest również dbałość o precyzyjne dozowanie czynników bioaktywnych w postaci nanocząstek, nie tylko w celach terapeutycznych, ale również w trosce o ograniczenie stosowania zbyt wysokich stężeń nanocząstek, które mogą w konsekwencji akumulować się w organizmie.

Niniejsza praca doktorska przedstawia **kolejne, intencjonalne etapy modyfikacji powierzchni stopu NiTi, umożliwiające w konsekwencji uzyskanie materiału spełniającego wymagania stawiane biomateriałom, jednocześnie o wzmożonym działaniu bioaktywnym.** W tym zakresie w części eksperymentalnej pracy zaproponowano m.in. procesy wstępnej obróbki stopu w środowiskach chemicznych, prowadzące do ograniczenia udziału wolnych metali na powierzchni tego stopu, przy zachowaniu pożądaných parametrów powierzchni do otrzymania w kolejnym etapie warstw na bazie chitozanu modyfikowanego

nanocząstkami złota, srebra i miedzi. Uzyskane nanomateriały wytwarzano dwoma technikami, w tym na drodze redukcji chemicznej oraz w reaktorze z działem magnetronowym w atmosferze gazu obojętnego. Uzyskane struktury zanalizowano z wykorzystaniem typowych metod dla inżynierii powierzchni oraz badań biomateriałów. Szczególną uwagę zwrócono na budowę, topografię, właściwości korozyjne, cytotoksyczność i antybakteryjność powierzchni, ale i również kinetykę uwalniania czynników bioaktywnych, a otrzymane rezultaty oraz wnioski opisano w niniejszej pracy doktorskiej.

Część teoretyczna

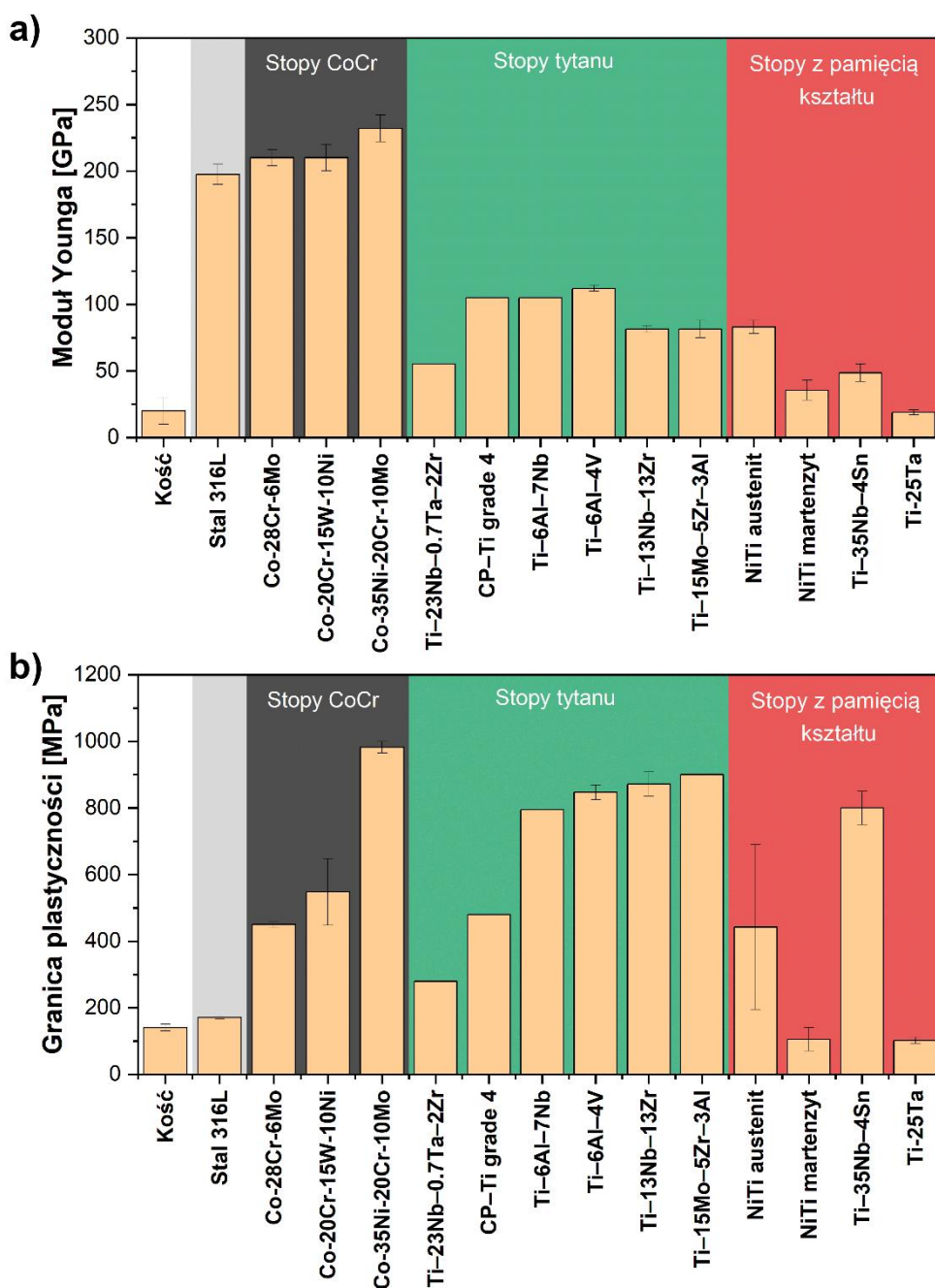
1. Biomateriały metaliczne z pamięcią kształtu

Na przestrzeni ostatnich dekad definicja biomateriałów ewoluowała, dostosowując się do aktualnego stanu wiedzy i nauki, najnowszą definicję zaproponowano podczas *Definitions in Biomaterials Conference* w Chengdu (Chiny), w 2019 roku. Zgodnie z nią jest to materiał zaprojektowany w taki sposób, aby poprzez jego interakcje z środowiskiem organizmu, można było kierować przebiegiem dowolnej procedury terapeutycznej lub diagnostycznej [1]. Wspomniana definicja określa bardzo ogólnie wymagania, które są stawiane biomateriałom, jednakże podkreśla dwie najważniejsze cechy każdego z nich. W pierwszej kolejności jest to zwrócenie uwagi na „interakcje z żywymi systemami”, które są bezpośrednim nawiązaniem do spełnienia wymogu biokompatybilności, czyli braku ograniczenia funkcjonowania komórek właściwych dla miejsca zastosowania biomateriału, w tym braku działania toksycznego w trakcie i po procesie implantacji [2]. Drugim aspektem jest zaznaczenie intencjonalności wprowadzenia biomateriału, który ma determinować przebieg procedury terapeutycznej lub diagnostycznej. W konsekwencji poszerza to listę wymagań stawianych tym materiałom, które powinny być dostosowane do specyfiki środowiska implantacji [3]. Zgodnie z opisanymi wyżej postulatami implanty ortopedyczne stawów, do których zalicza się m. in. protezy stawu biodrowego i kolanowego, również charakteryzują się specyficznymi wymaganiami ukierunkowanymi na jak najdłuższy czas życia w organizmie [4]. Ponadto wytyczne te związane są także ze stopniem skomplikowania operacji endoprotezoplastyki, kosztem implantu, potencjalnym ryzykiem infekcji oraz komfortem życia pacjenta [5,6].

Grupę materiałów, szeroko stosowaną w ortopedii, stanowią biomateriały metaliczne, charakteryzujące się szeregiem właściwości użytkowych wyróżniających je na tle polimerów, materiałów ceramicznych i kompozytów. Implanty wykonane z metali i ich stopów odznaczają się zwykle jednorodnością składu chemicznego, stosunkowo wysoką wartością modułu Younga (E), odpornością na zużycie ścierne, biogodnością z tkanką kostną (także hemokompatybilnością), zwykle dobrymi właściwościami elektrochemicznymi, odpornością na korozję oraz stosunkowo niskim kosztem produkcji [7]. Obecnie najszerzej stosowane metale implantologiczne to stal 316L, stopy kobaltu, stopy tytanu oraz stopy tantalu [8].

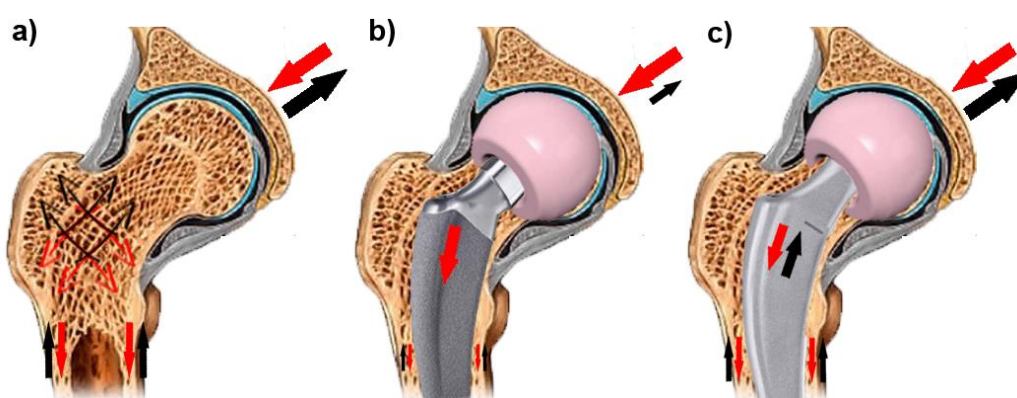
Warto dodać, że niektóre z tych cech mogą również stanowić niepożądane interakcje w procesie implantacji jak i funkcjonalności wszczepu. Do takich właściwości zalicza się między innymi zbyt wysokie wartości modułu Younga i granicy plastyczności ($\sigma_{0.2}$), co może w rezultacie prowadzić do efektu ekranowania naprężeń i tym samym naturalnej

demineralizacji kości, zwiększając ryzyko ponownego urazu [9,10]. Na Rysunku 1.1. przedstawiono porównanie wartości modułu Younga oraz granicy plastyczności dla wybranych stopów metali stosowanych w implantologii oraz tkanki kostnej.



Rys. 1.1. Zestawienie wartości: a) modułu Younga i b) granicy plastyczności, dla różnych grup stopów wykorzystywanych w implantologii (opracowanie własne na podstawie [2,11–20], odchylenie wartości parametrów obecne tylko w przypadkach, gdy wartości błędów były podane w artykułach naukowych)

Parametry mechaniczne naturalnej tkanki kostnej przenoszącej obciążenia w obrębie stawów kończyn dolnych charakteryzują się relatywnie niskimi wartościami modułu Younga oraz granicy plastyczności, odpowiednio 20 GPa i 140 MPa [12]. Porównując je do wartości obecnie stosowanych metalicznych materiałów implantologicznych można stwierdzić, że stal 316L oraz stopy na bazie kobaltu i chromu charakteryzują się o prawie rząd wyższą wartością modułu Younga, natomiast granica plastyczności, jedynie w przypadku stali 316L, jest zbliżona do parametrów kości. Znacznie lepszą kompatybilnością mechaniczną cechują się stopy na osnowie tytanu, których wartości modułu E i $\sigma_{0.2}$ są odpowiednio o około pięciokrotnie i sześciokrotnie wyższe niż w przypadku tkanki kostnej. Pewien wyjątek, o właściwościach bardziej zbliżonych do kości, stanowi stop Ti-23Nb-0.7Ta-2Zr, który zaliczany jest do grupy stopów superelastycznych (ang. *superelastic alloys*), dla którego wciąż prowadzone są prace badawcze w zakresie dostosowania jego parametrów użytkowych dla zastosowań w bioinżynierii, na przykład poprzez dodatek azotu [21,22] lub tlenu [23] do struktury stopu. Ostatnią grupą materiałów, która nie jest jeszcze szeroko stosowana w chirurgii ortopedycznej, są stopy z pamięcią kształtu, charakteryzujące się superelastycznością i pseudoplastycznością. Jak zilustrowano na Rys. 1.1, zarówno nitinol w fazie martenzytycznej, jak i stop Ti-25Ta, prezentują parametry mechaniczne na poziomie porównywalnym z tkanką kostną, co czyni je szczególnie atrakcyjnymi do aplikacji w ortopedii. Nie bez znaczenia jest również ich zachowanie w układzie dynamicznym, w zakresie analizy właściwości mechanicznych materiałów metalicznych - Rys. 1.2.



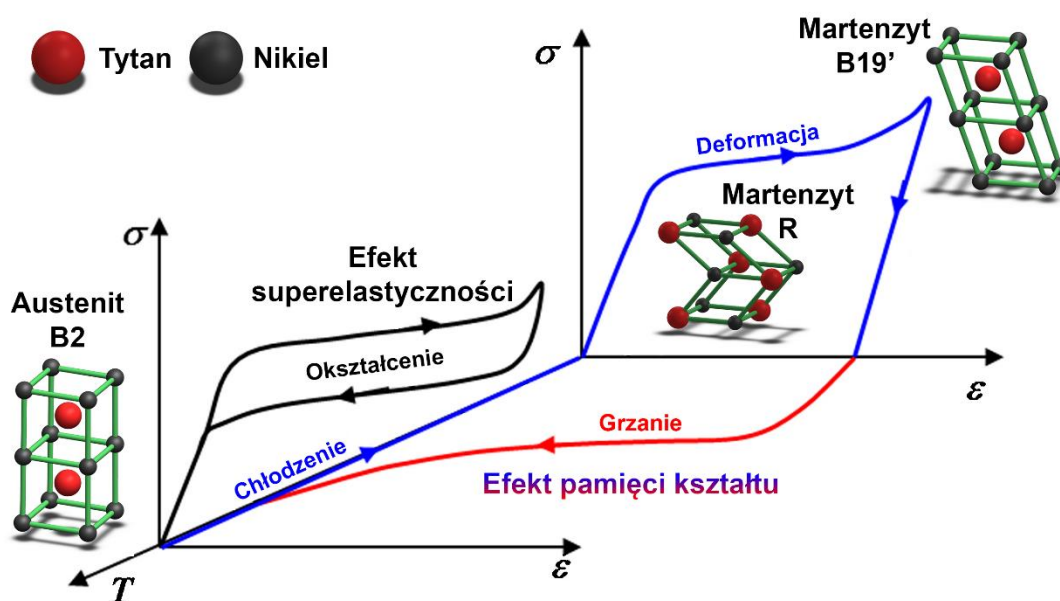
Rys. 1.2. Schemat ilustrujący kierunki naprężeń występujących podczas pracy stawu biodrowego w przypadku: a) zdrowego stawu biodrowego, b) stawu biodrowego z implantem metalicznym oraz c) stawu biodrowego z implantem na bazie stopu z pamięcią kształtu (opracowanie własne)

Prawidłowo funkcjonujący układ kostny stawu, zaprezentowany na Rys. 1.2.a, przenosi obciążenia wynikające z funkcjonowania organizmu i stanowi o właściwej ruchomości kończyn. Występujące wówczas naprężenia, np. podczas chodzenia, rozkładane są równomiernie w objętości kości gąbczastej, a następnie przekazywane na strukturę kości zwartej. Prawidłowe przenoszenie obciążeń sprzyja regeneracji komórek oraz właściwej mineralizacji kości [24]. Zaprezentowany z kolei na Rys. 1.2.b układ kostny z implantem charakteryzuje się zwykle znaczną różnicą w parametrach mechanicznych kości i implantów metalicznych, co w konsekwencji prowadzi do przenoszenia obciążeń niemal tylko przez implant. W rezultacie znajdująca się w otoczeniu implantu tkanka kostna nie uzyskuje wystarczających obciążeń. Opisany mechanizm jest niekorzystny i określany w literaturze przedmiotu efektem ekranowania naprężeń (ang. *stress shield effect*) [25]. Z czasem prowadzi to do demineralizacji tkanki kostnej, podobnie jak podczas osteoporozy [26]. Najczęściej efektem takiego osłabienia jest ponowne złamanie kości lub uszkodzenie tkanki kostnej drugiej kończyny. Dlatego po wszczepieniu jednego implantu stawu biodrowego, zwykle w perspektywie kilku lat, następuje rekonstrukcja drugiego stawu [27].

Uniknięcie wyżej opisanych, negatywnych skutków zastosowania materiałów o niedostosowanych parametrach mechanicznych jest możliwe poprzez zastosowanie odpowiednio zmodyfikowanych stopów. W przypadku najszerzej stosowanej grupy stopów Ti, wykorzystuje się zwykle występowanie dwóch faz tytanu (α oraz β), których udział jest odpowiedzialny m. in. za parametry mechaniczne. Wspomniane fazy wymagają stabilizacji, która jest zapewniana poprzez obecność pozostałych pierwiastków w stopie [28]. Zmniejszenie wartości modułu sprężystości stopu, bardziej dostosowanego do układu kostnego, może nastąpić poprzez zwiększenie zawartości β -stabilizatorów (np. dodatku tantalu, molibdenu lub niobu) [29] i jednoczesnym zmniejszeniu ilości α -stabilizatorów (np. dodatku tlenu, aluminium, germanu, węgla, azotu lub galu) [30,31]. Alternatywę stanowi również możliwość wykorzystania stopów z pamięcią kształtu (np. NiTi, TiTa), które cechują się również wspomnianą superelastycznością i pseudoplastycznością. Właściwości te oraz charakterystyczna pętla histerezy zależności naprężenia od wydłużenia materiału powoduje mniejsze przenoszenie obciążeń przez sam implant, co zostało zilustrowane na Rys. 1.2.c [32,33]. W poniższych podrozdziałach scharakteryzowano stopy z pamięcią kształtu, które mają znaczny potencjał aplikacyjny jako materiały do wykorzystania na implanty ortopedyczne.

1.1. Stopy na bazie niklu i tytanu

Najszerszą grupą stopów wykazującą pamięć kształtu oraz superelastyczność jest rodzina stopów zawierająca w składzie Ni oraz Ti. Właściwości te wynikają ze zdolności do termoelastycznej przemiany fazy austenitu o strukturze B2 do jednoskośnie zniekształconej sieci rombowej (B19') lub bliźniaczej przejściowej romboedrycznej (R) fazy martenzytycznej [34], których strukturę zilustrowano na Rys. 1.3.



Rys. 1.3. Wykres ilustrujący efekt superslastyczności (czarna linia) oraz efekt temperaturowej pamięci kształtu (linie czerwona i niebieska) wraz z obrazowaniem towarzyszących im zmianom struktury NiTi (opracowanie własne na podstawie [35–37])

Dla wspomnianych stopów to biokompatybilność i zespół właściwości mechanicznych stanowią o dużym potencjale aplikacyjnym tych struktur, w tym szerokim wykorzystywaniu jako stenty w kardiologii. Jednak warto wspomnieć, że dużym wyzwaniem w zastosowaniu materiałów z udziałem niklu są właściwości elektrochemiczne i uwalnianie jonów tego pierwiastka do organizmu pacjenta, co może wpływać na odrzucenie implantu oraz reakcje alergiczne [38].

1.1.1. Nitinol

Najbardziej perspektywicznym stopem z pamięcią kształtu do implantacji jest nitinol, dla którego efekt ten występuje, gdy zawartość Ni zawiera się w granicach 53÷57% at. Stop ten pamięć kształtu zawdzięcza przemianie martenzytycznej zachodzącej w określonych warunkach temperaturowych (60÷100°C), co zobrazowano na Rys. 1.3. Zaprezentowana struktura austenitu B2 pod wpływem obciążenia deformowana jest do przejściowej struktury zbliżonego martenzytu (R), a następnie do fazy martenzytu B19'. Pamięć kształtu następuje po ogrzaniu materiału (linia czerwona), który wraca do podstawowej struktury austenitu B2. Natomiast efekt superelastyczności, zobrazowany linią czarną, charakteryzuje się nieliniową sprężystością materiału, który poddany obciążeniu odkształca się plastycznie, natomiast po usunięciu obciążenia wraca do swojego pierwotnego kształtu [39,40]. Stop ten charakteryzuje się również stosunkowo niską, w porównaniu do parametrów mechanicznych kości, wartością modułu Younga ($40 \div 83$ GPa). Charakterystyczny kształt pętli histerezy, w układzie naprężenie – odkształcenie, obserwowalny dla NiTi [41] jest zbliżony do kształtu wspomnianej pętli dla tkanki kostnej [42]. Do głównych zagrożeń związanych z wykorzystaniem tego stopu w organizmie należy wspomniany we wstępie wysoki udział alergennego i genotoksycznego niklu [43], co zgodnie z aktualnym stanem wiedzy wiąże się z koniecznością dodatkowej modyfikacji powierzchni implantów.

1.1.2. Stopy NiTi domieszkowane srebrem

Domieszkowanie stopów cechujących się pamięcią kształtu ma zwykle na celu poprawę ich funkcjonalności. Stop NiTi modyfikuje się między innymi srebrem w ilości do 1% wagowych. [44]. Dodatek ten wpływa korzystnie na biokompatybilność stopu oraz aktywność antybakteryjną w kontakcie z gronkowcem złocistym (*Staphylococcus aureus*) [45]. Dodatkowo srebro ma korzystny wpływ na poprawę parametrów mechanicznych, poprzez zwiększenie plastyczności i wytrzymałości stopu na rozciąganie [46] oraz odporności korozyjnej [47]. Domieszkowanie stopu NiTi srebrem w ilości większej niż 1% wag. stanowi wyzwanie technologiczne związane z różnymi temperaturami topnienia (962 °C) i wyższym ciśnieniem par tego pierwiastka w porównaniu do niklu (1455 °C) oraz tytanu (1668 °C) [48]. Udane próby uzyskania stopu z wyższą zawartością srebra przeprowadził i opisał Y.F. Zheng, *et al.* [45] wykorzystując metodę topienia łukowego w próżni, z dodatkowym modulem chłodzącym, osiągając udział wagowy tego pierwiastka na poziomie 2.86 %. Kolejne próby z wykorzystaniem tej metody doprowadziły do uzyskania 4% udziału wagowego Ag w nitinolu,

natomiast Autorzy pracy [49] sugerują, że wyższy udział jest możliwy do uzyskania przy zmniejszeniu ilości procesów topnienia, których mniejsza ilość, w przeciwieństwie do powszechnie obserwowanego wpływu ilości cykli topienia, wpływa pozytywnie na homogeniczność stopu. Przykładowo rezultaty symulacji przeprowadzonych przez Priyang, *et al.* [50] określają limit trwałości mechanicznej stopu przy dodatku 5% wag. srebra. Ograniczenie to nie dotyczy natomiast otrzymywania warstw o budowie wspomnianego stopu, które można otrzymać techniką jednoczesnego napyłania magnetronowego z dwóch źródeł (ang. *co-sputtering*). Wykorzystując tę metodę C. Zamponi, *et al.* [51] otrzymali warstwę $Ti_{49}Ni_{42}Ag_9$, zawierającą niemal 17% wag. srebra. Warto jednak zaznaczyć, że nie można bezpośrednio porównywać właściwości materiałów warstwowych (powłok) oraz stopów. Podsumowując przywołane prace należy zaznaczyć, że dodatek srebra w ilości przekraczającej 3% wag. prowadzi wprawdzie do poprawy właściwości antybakteryjnych stopu, ale skutkuje również zmniejszeniem odporności na pękanie oraz odporności na korozję wspomnianych implantów [52].

1.1.3. Stopy NiTi domieszkowane niobem

Domieszkowanie struktury nitinolu niobem w ilości do 25% at. pozwala na zachowanie pamięci kształtu stopu, i jednocześnie może poprawić właściwości użytkowe w kontekście aplikacji w bioinżynierii [53]. Dodatek niobu skutkuje bowiem obniżeniem temperatury przemiany martenzytycznej poniżej temperatury pokojowej, co poprawia zachowanie kształtu stopu w fazie martenzytu, który charakteryzuje się zbliżonymi do tkanki kostnej parametrami mechanicznymi. Ze względu na opisane właściwości stopu TiNiNb przez S. Sampath, *et al.* [54] klasyfikuje się go jako niskotemperaturowy stop z pamięcią kształtu. Cechuje go m. in. szeroka pętla histerezy w układzie naprężenie – odkształcenie, co skutkuje również poprawą biokompatybilności mechanicznej z tkanką kostną w układzie dynamicznym [55]. Niewątpliwie zmniejszenie udziału niklu obniża ryzyko wywołania reakcji alergicznej, ale obserwuje się również działanie antybakteryjne wspomnianego stopu w kontakcie z bakteriami z rodziny gronkowców, np. *Staphylococcus epidermidis* [56]. Dodatkowo zwiększenie udziału niobu w strukturze NiTi poprawia właściwości korozyjne. Prace prowadzone przez S. Mohammed, *et al.* [57] potwierdziły, że udział Nb w strukturze NiTi w ilości 21% at. ÷ 24% at., spowodował spadek wartości potencjału korozji ($E_{kor.}$), odpowiednio od 0.091 V do -0.216 V.

Jednakże stop ten nie został jeszcze kompleksowo opisany w literaturze w kontekście zastosowań implantologicznych. Za niskie zainteresowanie tym perspektywnym stopem mogą odpowiadać wysokie koszty związane z wykorzystaniem niobu oraz długotrwały i energochłonny proces jego wytwarzania [55].

1.2. Stopy na bazie tytanu i niobu

Rozwój technologii otrzymywania stopów z pamięcią kształtu, które mogą być wykorzystywane w medycynie wiązał się głównie z poszukiwaniem pierwiastków, które cechują się wysoką biokompatybilnością z tkanką kostną. Innym istotnym parametrem był dobór odpowiedniej ilości jak i rodzaju dodatków stopowych oraz metody wytwarzania, od których zależy mikrostruktura i zachowanie mechaniczne metastabilnych β stopów tytanu [58,59]. Dla wspomnianego stopu dodatkiem stabilizującym fazę β jest niob, który udział w ilości do 30% at. pozwala na uniknięcie tworzenia się martenzytu w trakcie chłodzenia stopu [60]. Po poddaniu metastabilnego stopu β Ti–Nb przesyceniu fazą β , a następnie szybkiemu schłodzeniu do temperatury pokojowej, uzyskana zostaje mikrostruktura (utworzona przez fazę β), która jest odpowiedzialna za obniżoną wartość wytrzymałości mechanicznej i niski moduł sprężystości, dochodzący do ok. 50 GPa [59,61]. Ponadto w przeciwieństwie do szeroko stosowanego nitinolu i innych materiałów na bazie NiTi, opisanych w poprzednim rozdziale, stopy tytanu z niobem nie zawierają pierwiastków potencjalnie niebezpiecznych i powodujących reakcje alergiczne [62]. Warto również wspomnieć, że stop TiNb może być domieszkowany w zależności od stawianych mu wymagań. Struktura stopu może być modyfikowana np. cyną, która zapewnia poprawę osteoindukcyjności [72]; tantalem – wpływającym na zwiększenie biokompatybilności mechanicznej z tkanką kostną [63]; srebrem oraz galem i miedzią –potencjalnie korzystnie wpływającymi na działanie antybakteryjne [64,65].

1.2.1. Stop TiNb

Główną grupą stopów z pamięcią kształtu na bazie tytanu i niobu, są właśnie stopy tych pierwiastków z udziałem 16-30 % at. Nb [66]. Pamięć kształtu oraz superelastyczność tych stopów przypisuje się termoelastycznej przemianie martenzytycznej z fazy regularnej (β) do rombowej fazy martenzytu (α'') i jej transformacji odwrotnej [67], jednak warto zwrócić uwagę

na niższą zdolność materiału do zmiany kształtu w porównaniu ze stopem NiTi. Ponadto stopy te posiadają dobrą biokompatybilność z tkanką kostną, a komórki wykazują bardzo dobrą proliferację na jego powierzchni, co pozawala w rezultacie na zwiększenie prawdopodobieństwa pożądanej osteointegracji implantu [68]. Dodatkowo stop ten nie uwalnia toksycznych pierwiastków i charakteryzuje się stosunkowo niską wartością modułu Younga, poniżej 50 GPa [67]. Badania porównawcze stopów NiTi (50.8% at. Ni, 49.2% at. Ti) i TiNb (74% at. Ti, 26% at. Nb) wskazują również na niewielką poprawę właściwości korozyjnych w roztworze 1M NaCl na rzecz TiNb, jednakże w środowisku roztworu Hanks'a trend ten jest odwrotny [69]. Praca opublikowana przez S. N. Saud, *et al.* [70] również wskazuje na niski potencjał korozyjny ($E_{\text{corr}} = -151.36 \text{ mV vs. SCE}^1$) oraz wysoką szybkość korozji ($R_i = 2.099 \text{ mm/rok}$). Zaproponowana we wspomnianej pracy strategia poprawy parametrów korozyjnych opierała się na otrzymaniu warstwy tlenku grafenu, po wcześniejszej mikrostrukturyzacji powierzchni wiązką lasera, co w rezultacie zwiększyło wartość potencjału korozji do $-33.75 \text{ mV vs. SCE}$ i obniżyło szybkość korozji do 0.00278 mm/rok . Dodatkowo Autorzy wykonali badanie antybakteryjności stopu i proponowanej modyfikacji, które dowiodło powstaniu strefy zahamowania rozwoju bakterii *Escherichia coli* (ATCC11229) w przypadku modyfikacji, ale również wykazało jej obecność dla samego stopu.

1.2.2. Stopy TiNb domieszkowane cyną

Innym przykładem stopów na bazie tytanu i niobu są stopy z dodatkiem cyny (zwykle do 6% wag.), stabilizującej fazę α [71], przy jednoczesnym ograniczeniu wytrącania się metastabilnej fazy β . Stopy te charakteryzują się niskim modułem Younga, poniżej 50 GPa, co wpływa na większą trwałość połączenia z tkanką kostną [72,73]. Co ważne, dodatek cyny poprawia wytrzymałość na ściskanie stopu o około 2.5 - krotnie, względem stopu Ti-45Nb [30,65]. Dodatkowo w pracach prowadzonych przez K. Miura, *et al.* [74] stop Ti-Nb-Sn, względem szeroko stosowanego stopu Ti6Al4V, wykazywał o ok. 20% wyższą biokompatybilność z liniami L929 (komórek mysiej tkanki łącznej) i MC3T3-E1 (komórek osteoblastów myszy). Ponadto w badaniach *in vivo* zaobserwowano zdolność do indukcji nowej tkanki kostnej do 2 mm^2 w ciągu 12 tygodni oraz przebudowy starych tkanek w obszarze wszczepu w zakresie 40%. Kolejną zaletą dodatku cyny do materiału stopowego jest potencjalne działanie antybakteryjne samego dodatku stopowego, ale również jego tlenku,

¹ ang. *saturated calomel electrode* – elektroda kalomelowa

zatem pierwiastek ten może wspomagać działanie bioaktywne stopu w zakresie aktywności antybakteryjnej [75]. Jak wspomniano we wstępie do tego rozdziału kolejnym ważnym aspektem jest zjawisko korozji powstałe w wyniku reakcji wszczepionego implantu z płynami ustrojowymi organizmu. Przykładową pracę koncentrującą się na tym zagadnieniu w odniesieniu do stopu Ti-30Nb-XSn (X= 0, 2, 4, 6, 8 i 10 wag.%) opublikował P. Moraes, *et al.* [59], w której wykazano, że odporność korozyjna wspomnianego stopu z Sn w roztworze Ringera poprawia się o ok. 50% względem odporności korozyjnej stopu Ti-30Nb, a najlepsze rezultaty obserwowane są dla dodatku cyny w ilości 6% wagowych.

1.2.3. Stopy TiNb domieszkowane tantalem

Innym stosowanym pierwiastkiem stopowym jest tantal, którego dodatek do struktury stopu TiNb powoduje dodatkową stabilizację fazy β , która następuje już poprzez dodatek niobu. Warto jednak zaznaczyć, że tantal stabilizując β -Ti, skuteczniej niż dodatek niobu, obniża wartość modułu Younga stopu [63]. Rezultaty badań mechanicznych dla stopu Ti-34Nb-13Ta, opisane przez W. Kong, *et al.* [63], wykazały wartości modułu E w zakresie 47 ± 2 GPa oraz $\sigma_{0.2}$ w zakresie 569 ± 2 MPa. Wartości te są tylko dwukrotnie wyższe niż odpowiadające im parametry dla kości korowej. Nieco wyższymi parametrami mechanicznymi (moduł E 71 GPa oraz $\sigma_{0.2}$ 530.7 MPa) charakteryzuje się stop Ti-30Nb-17.6Ta, natomiast jego odporność korozyjna jest blisko dziesięciokrotnie wyższa w porównaniu ze stopem Ti-6Al-4V, ponadto nie wykazuje on cytotoksyczności w kontakcie z linią komórkową HeLa [76]. Innym perspektywicznym materiałem jest stop Ti-20Nb-10Ta, przykładowo badania prowadzone przez A. Kolmakov, *et al.* [77] pod kątem odporności korozyjnej w środowiskach o różnym pH (w zakresie od ok. 3.5 do 9.2) wykazały znaczne ograniczenie uwalniania jonów, co skutkowało bardzo dobrym zachowaniem wspomnianego stopu w tych warunkach eksperymentalnych.

Podsumowując, można stwierdzić, że wiodącą korzyścią wykorzystania stopów z pamięcią kształtu do konstrukcji implantów ortopedycznych jest poprawa ich biokompatybilności z tkanką kostną w zakresie parametrów mechanicznych. Opisane powyżej stopy (np. NiTi w fazie austenitycznej) charakteryzują się około dwukrotnie wyższym modułem Younga i ok. 2.5-krotnie wyższą granicą plastyczności w porównaniu do parametrów tkanki kostnej. Wspomniane wartości oczywiście odbiegają od wzorcowego dopasowania biomechanicznego materiałów (tkanki kostnej i implantu), jednakże w porównaniu ze stosowanymi obecnie

stopami tytanu (ok. 4-5-rotnie wyższe wartości E i $\sigma_{0.2}$), stanowią realną alternatywę ograniczającą wpływ zjawiska ekranowania naprężeń i jego konsekwencji w postaci demineralizacji tkanek w obszarze wszczepu. Dodatkowo możliwość funkcjonalizacji stopów domieszkami pozwala na wydłużenie czasu użytkowania implantów (poprawa właściwości korozyjnych), skrócenia czasu adaptacji i regeneracji tkanki kostnej lub wzmożenia ich antybakteryjnego charakteru.

Warto jednak również zwrócić uwagę na wyzwania związane z wprowadzeniem tych stopów do powszechnej praktyki implantologicznej. Problemami w wykorzystaniu stopów z grupy TiNb są wysokie koszty pierwiastków składowych oraz zwykle wymagająca i kosztochłonna technologia ich otrzymania. Wspominane ograniczenia w mniejszym stopniu dotyczą stopów na bazie NiTi, które w praktyce implantologicznej są już wykorzystywane w zastosowaniach innych niż ortopedia. Niemniej jednak stopy te, ze względu na obecność niklu, wymagają dodatkowej modyfikacji powierzchni. Jest to związane z niekorzystnym wpływem tego pierwiastka (zależnie od jego koncentracji) na organizm człowieka, w tym potencjalne działanie nowotworowe, teratogenne i mutagenne.

2. Wybrane metody modyfikacji powierzchni nitinolu do zastosowań biomedycznych

Użyteczność stopów na bazie niklu i tytanu, opisanych w Rozdziale 1.1., jest bardzo szeroka ze względu na dobre dostosowanie mechaniczne materiału do układu kostnego człowieka. Dodatkowe cechy, takie jak supersprężystość i pamięć kształtu, mogą również wpływać pozytywnie na adaptację implantu przy dynamicznym obciążeniu stawu biodrowego lub kolanowego, przenoszących znaczne siły związane z regularnym funkcjonowaniem w organizmie. Mimo wspomnianych zalet nitinol nie powinien być stosowany bez odpowiedniej obróbki powierzchni, co jest związane między innymi z procesami elektrochemicznymi stopu w organizmie człowieka. Warunki panujące w organizmie charakteryzują się bowiem obojętnym pH, które zwykle po implantacji obniża się do wartości ok. 5.3 - 5.6, dodatkowo wysoką wilgotnością oraz temperaturą w zakresie 35÷42°C. Ponadto środowisko organizmu jest bogate w aniony Cl^- , PO_4^{3-} i CO_3^{2-} oraz kationy Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i Mg^{2+} [78]. W tych warunkach odporność implantu na korozję powinna być możliwie jak najwyższa, co jest związane z tym, że nie powinien on powodować niekorzystnych elektrochemicznie połączeń z innymi częściami wszczepu. Co ważne, jego powierzchnia powinna znacznie ograniczać uwalnianie do organizmu jonów metali, mogących powodować metalozę [79,80]. W obliczu tych wymagań stosowane są różne strategie wstępnego przygotowania powierzchni stopu NiTi. W związku z tym, w dalszej części opisano wybrane procesy modyfikacji powierzchni ograniczające dyfuzję jonów stopu przy jednoczesnym zachowaniu funkcji użytkowych biomateriału.

2.1. Obróbka mechaniczna

Podstawowa obróbka mechaniczna powierzchni biomateriałów metalicznych obejmuje polerowanie mechaniczne oraz elektropolowanie, wykorzystywane do otrzymania powierzchni o niskich wartościach parametrów chropowatości. Zastosowanie obróbki mechanicznej stanowi zwykle proces wstępnego przygotowania powierzchni do dalszych modyfikacji, w tym nanoszenia warstw i powłok. Stosowanie obróbki mechanicznej nie może jednak być jedynym procesem modyfikacji powierzchni ze względu na niską powtarzalność tego procesu objawiającą się brakiem zachowania jednolitych wartości parametru chropowatości [81]. Ponadto, S. Nagaraja, *et al.* [82] zwracają uwagę na niską odporność na korozję oraz niekontrolowane uwalnianie jonów z powierzchni stopu poddanego jedynie obróbce mechanicznej. Dodatkowo często obserwuje się brak powtarzalności składu

chemicznego powierzchni stopu, który związany jest z zanieczyszczeniami pochodzącymi z past i zawiesin polerskich. Do zalet tych metod obróbki można zaliczyć ogólną dostępność oraz niski stopień zaawansowania technologicznego procesu. Warto zauważyć, że odpowiednio wieloetapowa i precyzyjna obróbka mechaniczna z zaadaptowaniem procesów niskotemperaturowej obróbki cieplnej (nieprowadzących do wymuszonej oksydacji) może również prowadzić do dobrych rezultatów, jakimi jest przykładowo uwalnianie jonów Ni^+ w ilości 283 ± 25 ng oraz wartość potencjału korozji 767 ± 226 mV, przy bardzo niskiej ilości wżerów w materiale [83,84].

2.2. Obróbka w środowisku chemicznym

Jednym ze sposobów na ograniczenie uwalniania niklu do środowiska organizmu jest trawienie powierzchni stopu NiTi w środowiskach o różnym składzie chemicznym (zatem i odczynie pH). Jest to możliwe poprzez różnice wartości entalpii tworzenia się tlenków niklu (-240.0 kJ/mol) oraz tytanu (-945.0 kJ/mol), która promuje powstawanie TiO_2 na powierzchni stopu [85,86]. Kontakt powierzchni implantu z stosunkowo agresywną mieszaniną powoduje również zmianę parametrów chropowatości, co może mieć korzystny wpływ na adhezję i proliferację komórek, jednocześnie nieodpowiedni dobór składu chemicznego może doprowadzić do powstania głębokich wżerów, promujących jednocześnie zwiększoną aktywność korozyjną [87]. Modyfikacja w wybranych środowiskach może prowadzić do zwiększenia wartości kąta zwilżania dla wody do wartości hydrofobowych, skutecznie ograniczających wzrost biofilmu na powierzchni [88,89]. Jednakże, jak już wcześniej wspomniano, ochrona korozyjna powierzchni stopu po obróbce chemicznej jest przeważnie słabsza niż stopu niemodyfikowanego [90]. Dla porównania w Tabeli 2.1 zaprezentowano krótki przegląd środowisk chemicznych wykorzystywanych do trawienia powierzchni stopu NiTi wraz z wartościami wybranych parametrów użytkowych.

Tabela 2.1. Przegląd wybranych środowisk chemicznych wykorzystywanych w procesie obróbki powierzchni stopu NiTi oraz wybrane wartości parametrów użytkowych powierzchni

Skład chemiczny	Czas trawienia [min]	Temperatura obróbki [°C]	Chropowatość [nm]	Wartość potencjału [mV vs. SCE]	Lit.
10% HNO ₃	1440	RT	R _q = 424	-	[91]
7.5% HCl/ 20% HNO ₃	3	RT	-	-	[92,9 3]
7.5% HF/ 20% HNO ₃	3	RT	R _a = 1630	522 ± 48	[94]
1HF/ 4NHO ₃ / 5H ₂ O	4	RT	-	440	[95]
	4	RT	-	-	[96]
	2	RT	R _q = 1.351	-	[97]
	1	RT	R _q = 1.963	-	
1HF/ 5NHO ₃ / 4H ₂ O	2	RT	R _q = 4.535	-	
	1	RT	R _q = 6.679	-	

Niekompletność zestawionych danych parametrów użytkowych związana jest z wykorzystaniem tego etapu obróbki jedynie jako składowej w procesie technologicznym modyfikacji, bez szerszego opisu zjawisk występujących podczas trawienia. Jednak można zauważyć, że w danych literaturowych przeważają mieszaniny kwasu fluorowodorowego i azotowego(V). Kwasy te stosowane są głównie w trawieniu szkła oraz krzemu, ale również skutecznie trawią metale [98–100]. Zaprezentowane wyniki chropowatości w pracy D. Batalu, *et al.* [97] wskazują na wyższą skuteczność trawienia mieszanin o większej zawartości kwasów, ale również warto zauważyć, że wraz z czasem trawienia parametr R_a maleje niezależnie od wykorzystanej mieszaniny.

Warto dodać, że zauważalna w publikacjach naukowych lakoniczność informacji dotyczących warunków trawienia chemicznego oraz jego wpływu na powierzchnię wspomnianego stopu może wskazywać na niewystarczającą analizę i ocenę tego procesu na kolejne etapy prowadzonych modyfikacji. Zatem ważnym z technologicznego punktu widzenia staje się poszukiwanie optymalnych warunków w zakresie trawienia powierzchni nitinolu.

2.3. Obróbka cieplna

Kolejną, stosowaną modyfikacją powierzchni stopu NiTi stanowi obróbka cieplna, która polega na działaniu podwyższonej temperatury w celu jego wygrzania lub wyżarzenia. Proces ten może odbywać się w różnych atmosferach, w tym powietrza, argonu, tlenu, w zależności od oczekiwanych rezultatów. Głównym celem prowadzenia tych procesów jest modyfikacja składu fazowego stopu w warstwie wierzchniej, w rezultacie prowadząca do ograniczenia uwalniania niklu z powierzchni [101]. Właściwie dobrane parametry procesu wygrzewania pozwalają na oksydację powierzchni stopu i wyeliminowanie metalicznych wtrąceń na powierzchni, jednakże mogą prowadzić również do tworzenia się faz podpowierzchniowych wolnych pierwiastków metalicznych, które w razie uszkodzenia zewnętrznej warstwy ochronnej prowadzą do niekontrolowanego uwalniania metalu do organizmu [102]. Wspomniane procesy wygrzewania można podzielić na trzy zakresy temperaturowe. Pierwszy z nich stanowi wyżarzanie w $600\div 700^{\circ}\text{C}$, które przeważnie prowadzi do otrzymywania przewagi faz tlenkowych na powierzchni, ale również podpowierzchniowych obszarów metalicznych [103]. Drugi proces obejmuje formowanie w zakresie $450\div 550^{\circ}\text{C}$, co jest optymalne w nadawaniu pamięci kształtu oraz supersprężystości, ale prowadzi również do otrzymywania, poza fazami NiTi i Ti_xO_y , metalicznego niklu [104], którego uwalnianie zostało wykorzystane przez N. Ohtsu, *et al.* [105] w celu uzyskania właściwości antybakteryjnych powierzchni dla przedmiotów użytkowych. Ostatnim etapem jest obróbka cieplna poniżej 300°C , gdzie w tych warunkach na powierzchni może pojawiać się wolny nikiel [106]. Analizując przykładowo wyniki prac E. Marchenko, *et al.* [103], który badał właściwości porowatego NiTi w zależności od temperatury wygrzewania można stwierdzić, że potwierdzają one opisane powyżej zmiany na powierzchni nitinolu, poszerzając zakres temperatur wygrzewania do $600\div 1000^{\circ}\text{C}$. W tym zakresie obserwuje się zwiększanie wraz z temperaturą udziału faz tlenku tytanu(IV) oraz niklu metalicznego. Jednakże analiza składu chemicznego powierzchni wskazuje na ograniczenie udziału niklu do wartości poniżej 5% wag. dla temperatury wygrzewania 1000°C . Badania cytotoksyczności względem linii MCF-7 (komórek raka piersi) wskazują również na najwyższą przeżywalność komórek ($\sim 75\%$) dla wygrzewania stopu w temperaturze 600°C .

Mając na uwadze powyższe metody obróbki stopu NiTi można stwierdzić, że obróbka cieplna oraz obróbka w środowisku chemicznym stanowią powtarzalne techniki przygotowania powierzchni stopu. Metody te w określonych warunkach procesu mogą doprowadzić do uzyskania powierzchni wolnej od wtrąceń metalicznych pierwiastków stopowych. Warto

jednak zauważyć, że żadna z opisanych metod nie powinna być stosowana samodzielnie, a najlepszą skuteczność można osiągnąć poprzez połączenie kilku procesów przygotowania powierzchni, w zależności wymagań aplikacyjnych materiału.

3. Funkcjonalizacja powierzchni stopów biopolimerami

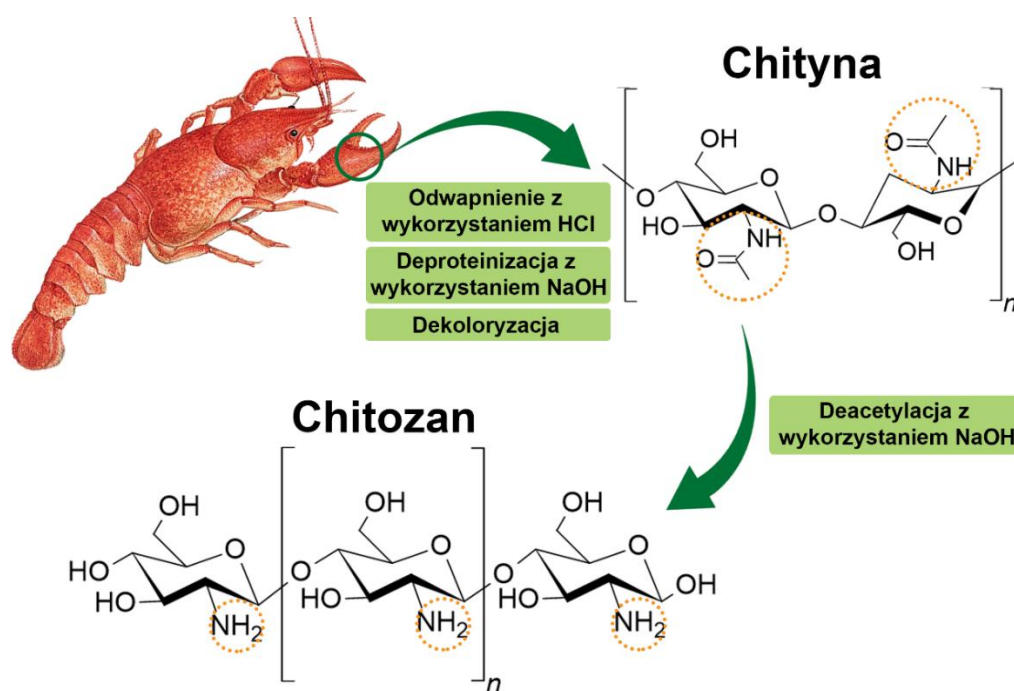
W ostatnich dekadach szczególną uwagę zwracano na modyfikację powierzchni stopów medycznych na drodze otrzymywania warstw i powłok. W zastosowaniach ortopedycznych i stomatologicznych warto wyszczególnić dwie grupy materiałów wykorzystywanych w celu modyfikacji powierzchni, mianowicie bioceramikę i polimery. Pierwszą grupę stanowią materiały ceramiczne, które można podzielić na dwie istotne podgrupy: powłoki bioinertne oraz bioaktywne. Te pierwsze stanowią zwykle tlenki i azotki pierwiastków takich jak cynk, cyrkon, tytan oraz warstwy DLC (ang. *Diamond-Like Carbon*). Materiały te charakteryzują się wysoką biokompatybilnością i zwykle bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi, w tym odpornością na ścieranie. Ceramikę bioinertną stosuje się głównie jako pokrycia na elementy trące implantów, które nie wymagają szczególnych właściwości bioaktywnych [107]. Druga podgrupa to bioaktywne powłoki ceramiczne, w tym m. in. warstwy na bazie węglanów i fosforanów wapnia (w tym hydroksyapatyt) i bioszklą. Charakteryzują się wyraźnie gorszymi parametrami mechanicznymi od ceramiki bioinertnej, natomiast posiadają właściwości stymulujące korzystne oddziaływania biochemiczne pomiędzy tkanką kostną, a implantem, wzmagając adhezję pokryć do powierzchni wszczepu [108].

Drugą grupą materiałów szeroko stosowaną jako pokrycia implantów metalicznych stanowią polimery, które są znacznie bardziej podatne na modyfikacje chemiczne względem ceramiki i pozwalają na osiąganie interesujących właściwości terapeutycznych, służąc między innymi jako matryce do kontrolowanego uwalniania leków oraz podobnie jak ceramika bioaktywna mogą wspierać rekonstrukcję tkanek. Z drugiej strony polimery charakteryzują się znacznie niższą odpornością mechaniczną i stabilnością chemiczną w porównaniu do bioceramiki, na co wskazuje ich zdolność do biodegradacji na drodze rozpadu w środowisku wodnym lub rozkład wskutek działania enzymów [109]. Dla wybranych aplikacji polimery powinny wykazywać wymagany poziom właściwości mechanicznych, możliwości modyfikacji struktury, a produkty uboczne powstałe w wyniku ich degradacji nie mogą być toksyczne dla organizmów żywych. Tę grupę materiałów definiuje się jako organiczne substancje polimerowe pozyskiwane z materii żywej w formie natywnej lub po wyodrębnieniu oczekiwanego związku chemicznego z materii organicznej. Do metod izolacji biopolimerów można zaliczyć między innymi rozpuszczanie prekursora biopolimeru w odpowiednim środowisku (np. rozpuszczanie pulpy manioku w HNO_3 w celu otrzymania celulozy [110]), separację triboelektryczną skrobi [111], czy proces deacetylacji, na drodze którego uzyskuje się chitozan [112]. Stanowią one z jednej strony materiały pochodzenia naturalnego względem polimerów otrzymywanych

z substancji ropopochodnych, które w przeciwieństwie do biopolimerów znacznie dłużej ulegają biodegradacji, a z drugiej strony są w pełni biogodne i nie generują zagrożeń dla środowiska [113]. Można jednoznacznie stwierdzić, że należą one obecnie do jednych z najintensywniej badanych grup materiałów pod kątem przydatności jako powłok bioaktywnych. Naturalne polimery, w tym chitozan, alginian, kwas hialuronowy i fibroina, wykazują wysoki potencjał aplikacyjny, na co z pewnością wpływa ich wysoka biokompatybilność, łatwość tworzenia powłok, stosunkowo nieskomplikowany proces modyfikacji struktury oraz zdolność do tworzenia kompozytów [114].

3.1.Chitozan

Chitozan jest odnawialnym, naturalnym polisacharydem zasadowym otrzymywanym przez częściową deacetylację chityny – Rys. 3.1., występującej naturalnie w pancerzach skorupiaków oraz owadów.



Rys. 3.1. Schemat procesu otrzymywania chitozanu z pancerzy skorupiaków oraz wzory strukturalne chityny oraz chitozanu (opracowanie własne na podstawie [115] z wykorzystaniem grafiki CC-BY², www.rawpixel.com/image/2650815).

Polimer ten jest zbudowany z dwóch grup polimerowych, N-acetylo-D-glukozaminy i D-glukozaminy, które łączą się wiązaniami β-(1→4)-glikozydowymi [116]. Ponadto chitozan

² ang. *Creative Commons* – otwarta licencja użytkowania grafiki z uznaniem autorstwa

może zawierać różne grupy aktywne i struktury krystaliczne (α -, β - i γ). Ich obecność, ilość, oraz masa cząsteczkowa i stopień deacetylacji są kluczowymi czynnikami wpływającymi na jego właściwości fizykochemiczne [117]. Chitozan jest nierozpuszczalny w wodzie oraz w większości rozpuszczalników organicznych. Modyfikacja chemiczna grup funkcyjnych chitozanu (-OH oraz -NH₂) pozwala na otrzymanie pochodnych, które są łatwiej rozpuszczalne. Ponadto wspomniana modyfikacja może poprawić właściwości fizyczne i chemiczne chitozanu oraz rozszerzyć zakres zastosowań [118].

Z uwagi na nietoksyczne działanie biokompatybilność i biodegradowalność cechuje się wyjątkowymi właściwościami biologicznymi, w tym działaniem przeciwzapalnym, przeciwbakteryjnym, przeciwnowotworowym, przeciwgrzybiczym, hemostatycznym i przeciwbólowym [119,120]. Jego działanie antybakteryjne przypisywane jest kationowej naturze (dodatkowo naładowanej grupie amidowej), która umożliwia interakcję pomiędzy ujemnie naładowanymi lipidami i białkami obecnymi w ścianie komórkowej bakterii. Kontakt chitozanu z błoną komórkową przyczynia się do zakłócenia przepuszczalności błony, co ostatecznie powoduje wyciek części cytoplazmatycznej i śmierć komórki bakteryjnej [121,122]. Biopolimer ten wykazuje również potencjał osteoindukcyjny oraz osteointegracyjny. Ponadto o jego uniwersalności świadczy łatwość modyfikacji chemicznej oraz wysoka, jak na biopolimer, wytrzymałość na rozciąganie *ca.* 15 MPa oraz moduł Younga *ca.* 1 GPa [123]. Dodatkowo chitozan jest powszechnie wykorzystywany do tworzenia bionanokompozytów z nanocząstkami metali, dla których jest stabilizatorem, ale również układów warstwowych biopolimerami o charakterze anionowym w procesie samoorganizacji elektrostatycznej [124].

Powyższe cechy powodują, że chitozan jest często stosowany w modyfikacji powierzchni implantów polimerowych i metalicznych [125], ale również jako materiał stanowiący rusztowania komórkowe (scaffoldy) [126], w tym do regeneracji tkanek [127], przygotowania opatrunków [128] oraz systemów dostarczania leków [129]. Ponadto, wraz z rozwojem nanotechnologii chitozan i jego pochodne są wykorzystywane do wytwarzania nanomateriałów, w tym zawierających nanocząstki, hydrożele, mikrosfery i micelle, które stosowane są jako nośniki efektywnego i ukierunkowanego dostarczania leków, a także jako adiuwanty i nośniki szczepionek [130].

3.2. Fibroina

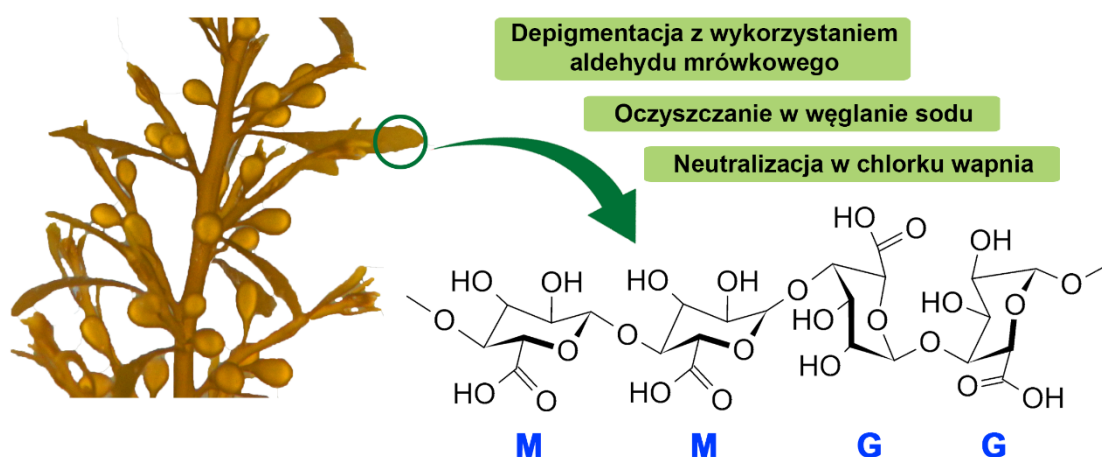
Fibroina, otrzymywana z kokonów jedwabników *Bombyx Mori*, wyróżnia się spośród innych biopolimerów znakomitymi właściwościami mechanicznymi, w tym modulem Younga ($12.4 \div 17.9$ GPa), wytrzymałością na rozciąganie ($450 \div 700$ MPa) oraz wydłużeniem ($12 \div 24\%$) [131]. Ponadto fibroina charakteryzuje się hierarchiczną budową, biokompatybilnością, regulowaną biodegradacją i zdolnością do dostarczania leków [132]. Najbardziej interesująca z punktu inżynierii regeneracyjnej jest budowa tego polimeru, który składa się z łańcucha ciężkiego (H-) (390 kDa) i lekkiego (L-) (26 kDa), połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi i tworzących kompleks H-L [131]. Lekkie łańcuchy odpowiadają za elastyczność i hydrofilowość, a ciężkie za sztywność materiału. Budowa ta jest bliźniaczo podobna do struktury kości, gdzie zwarta tkanka odpowiada za sztywność, podczas gdy tkanka gąbczasta zapewnia elastyczność [133]. Zgodnie z tymi właściwościami fibroina jest określana jako materiał biomimetyczny, o dużym potencjale do regeneracji tkanki kostnej [114,134]. Biopolimer ten ze względu na brak cytotoksyczności jest obecnie wykorzystywany również jako alternatywa dla kolagenu w budowaniu skafoldów w postaci porowatych rusztowań [135], ale i elektroprzędzonych włókien fibroiny [136,137]. Wytworzenie i implantacja takich struktur wpływa pozytywnie na proliferację osteoblastów, co zwiększa szanse na prawidłowy proces implantacji oraz działanie osteoindukcyjne, pozwalające na odbudowę tkanki kostnej na powierzchni implantu. Warto dodać, że elektroprzędzone nanowłókna fibroiny modyfikowane czynnikami bioaktywnymi mogą być także szeroko stosowane jako materiały opatrunkowe [138].

3.3. Alginiany

Alginiany są naturalnie występującymi anionowymi i hydrofilowymi polisacharydami. Głównym ich źródłem są wodorosty i algi z rodziny *Sargassum*, zdolność do jego produkcji mają również wybrane szczepy bakterii, w tym *Pseudomonas* oraz *Azotobacter* [139]. Najszerzej stosowanym alginianem jest alginian sodu, który należy do grupy liniowych polisacharydów anionowych pochodzenia naturalnego.

Z punktu widzenia chemii alginiany są kopolimerami składającymi się głównie z kwasu β -d-mannuronowego (M) i jego reszt epimeru kwasu α -l-gulonowego (G) C5, połączonych

wiązaniem 1,4-glikozydowym w nieregularny, blokowy sposób. Zazwyczaj bloki składają się z trzech różnych postaci segmentów polimeru: segmentów połączonych szeregowo reszt G, segmentów połączonych szeregowo reszt M i łączących je segmentów MG [140], co zaprezentowano na Rys. 3.3. Miejsce łączeń, ilość komponentów M i G oraz ich proporcje są różne w zależności od pochodzenia prekursora alginianu [141]. Alginiany otrzymywane z alg są polidispersyjne i charakteryzują się wysoką masą cząsteczkową, przeważnie w zakresie $10^4 \div 10^6$ Da, co odpowiada $500 \div 5000$ komponentów w łańcuchu.



Rys. 3.3. Schemat procesu otrzymywania alginianu z alg oraz wzór strukturalny alginianu (opracowanie własne na podstawie [142] z wykorzystaniem grafiki CC BY-SA 4.0, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sargassum_muticum_Yendo_Fensholt_1955_Lamiot_WimmerHautsDeFrance_Estran_Juillet_2016a8.jpg).

Alginiany charakteryzują się aktywnością biologiczną i bardzo dobrą biokompatybilnością z tkankami miękkimi organizmu człowieka. Niską adsorpcję protein oraz przyłączanie się do nich komórek alginiany zawdzięczają dużej zawartości wody, ujemnemu ładunkowi i brakowi rozpoznania molekularnego (ang. *molecular recognition*), czyli właściwości selektywnego przyłączania specyficznych substancji np. przez receptory powierzchniowe komórek. Ponadto alginiany są nietoksyczne, nie są trombogenne i immunogenne [143]. Dodatkowo, te z przewagą reszt typu G (>50%) nie powodują odpowiedzi immunologicznej organizmu, mogą pobudzać produkcję cytokin oraz reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) [144]. Warto również wspomnieć o zdolności alginianów do biodegradacji, która pozwala na dostarczanie składników aktywnych do środowiska organizmu oraz zdolności chelatowania dzięki, której możliwe jest tworzenie żelów i zoli, przeważnie na drodze reakcji z dwuwartościowymi kationami (np. Ca^{2+} , Mg^{2+}). Alginian będąc naturalnym polisacharydem wykazuje zależny od pH charakter anionowy, w związku z tym wykazuje zdolność do interakcji

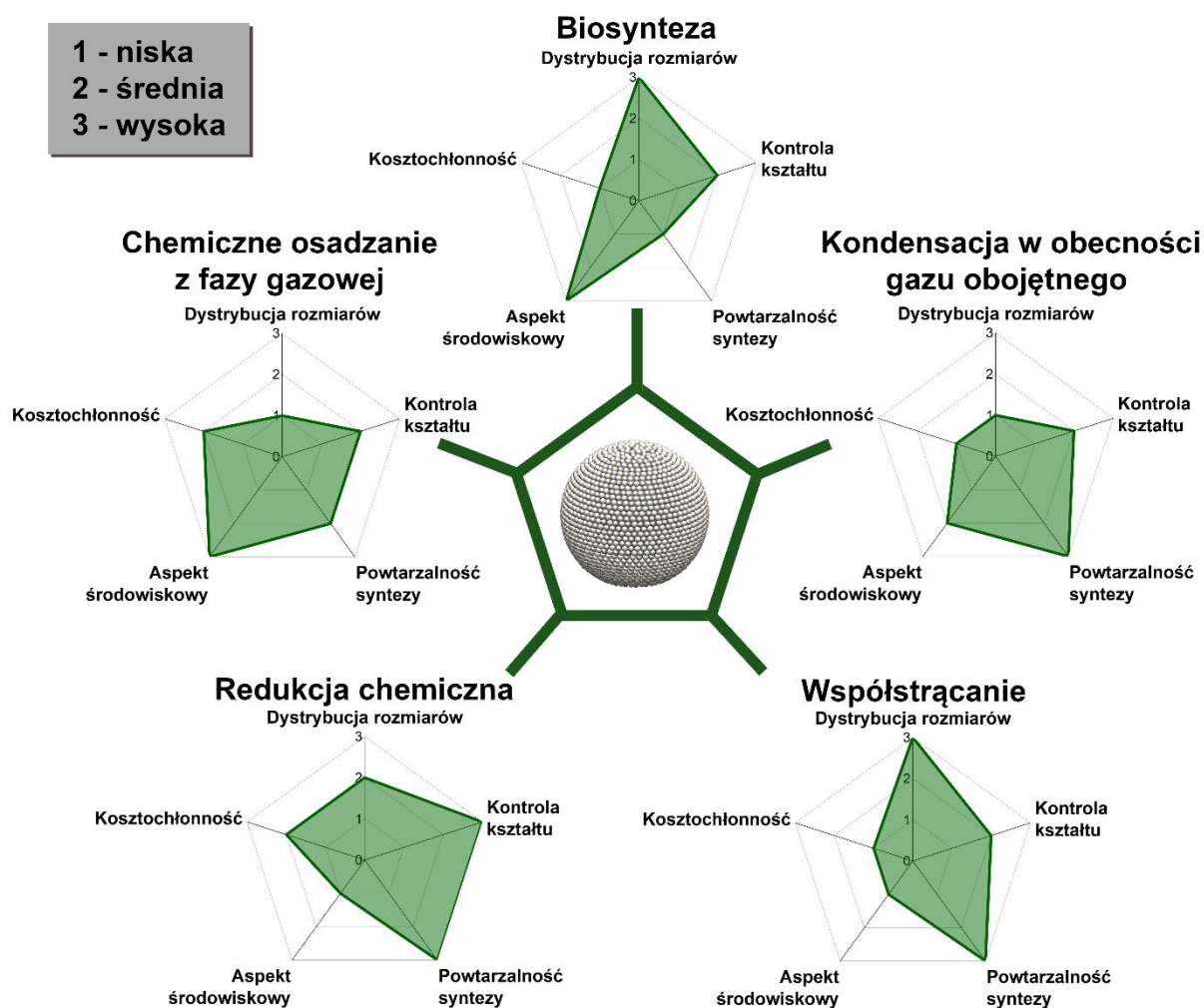
z kationowymi polielektrolitami i proteoglikanami. Mając to na uwadze, poprzez wykorzystanie prostych oddziaływań elektrostatycznych można na bazie alginianów wytwarzać łatwo sterowalne systemy uwalniania leków [140].

Biozgodność i wielofunkcyjność alginianów pozwala na tworzenie z nich warstw [145], hydrożeli [146], mikrosfer [141] i porowatych rusztowań kompozytowych [147]. Szczególnie interesująca jest zdolność otrzymywania żeli, co umożliwia otrzymywanie biodegradowalnych mikrokapsulek na bazie alginianu, które są w stanie dostarczać odpowiednie leki, białka, lub inne małocząsteczkowe czynniki aktywne. Alginiany, poza zastosowaniem w kontrolowanych systemach dostarczaniu leków, są stosowane do produkcji opatrunków, rusztowań do regeneracji tkanek kostnych i chrząstek stawowych. Materiały te mogą być otrzymywane na drodze elektroprzędzenia lub druku 3D [148].

Podsumowując, można stwierdzić że biopolimery stanowią perspektywiczną grupę materiałów, która jest już stosowana w bioinżynierii, w tym jako warstwy na implanty ortopedyczne. Ze względu na ich naturalne pochodzenie charakteryzują się wysoką biozgodnością z komórkami, w tym osteoblastami, co pozwala na tworzenie rusztowań propagujących wzrost i odbudowę tkanek wokół wszczepów. Spośród opisanych powyżej biopolimerów szczególne właściwości, w kontekście otrzymywania bionanokompozytów, posiada chitozan, który jest stabilizatorem nanomateriałów i zapobiega ich agregacji oraz utlenieniu. Nie bez znaczenia jest również jego tendencja do biodegradacji, która predestynuje go do wykorzystania w warstwach uwalniających czynniki aktywne do środowiska organizmu.

4. Otrzymywanie nanomateriałów nieorganicznych metodami bottom-up

Nanocząstki nieorganiczne zaliczane są do nanomateriałów, wśród których wyróżnia się nanocząstki metaliczne, nanomateriały na bazie węgla, krzemu oraz polistyrenu, kropki kwantowe oraz materiały hybrydowe powstałe z połączenia nanocząstek powyższych grup. Klasyczne metody otrzymywania nanomateriałów można podzielić w zależności od mechanizmu ich powstawania na dwie grupy, mianowicie „top-down” oraz „bottom-up”. Podejście „top-down” wykorzystuje materiały w skali makro w celu redukcji ich rozmiarów do wymiarów docelowych. Do takich metod należy m. in. mielenie, nanolitografia i ablacja laserowa. Natomiast podejście „bottom-up”, którego wybrane metody otrzymywania zostały opisane w tym rozdziale, do budowania wykorzystuje skalę atomową i obejmuje procesy nukleacji i wzrostu określonych nanomateriałów. W tym rozdziale metody otrzymywania nanomateriałów zostały podzielone na te syntezowane metodami chemii mokrej (ang. *wet chemistry*), metodami próżniowymi oraz na drodze biosyntezy. Na Rysunku 4.1. scharakteryzowano ważniejsze cechy otrzymywania nanomateriałów metodami współstrącania, redukcji chemicznej, chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD, ang. *Chemical Vapour Deposition*), kondensacji w obecności gazu obojętnego (IGC, ang. *Inert Gas Condensation*) i biosyntezy. Schemat ten wskazuje na użytkowe cechy metod otrzymywania nanomateriałów, które mogą być wykorzystywane nie tylko w skali laboratoryjnej, ale również przemysłowej. Aspekty kontroli kształtu, rozmiaru oraz powtarzalności danego procesu są szczególnie istotne w kontekście skalowania technologii wytwarzania nanomateriałów. W tym zakresie najlepiej sprawdzają się techniki próżniowe wykorzystujące otrzymywanie w fazie gazowej, CVD oraz IGC. Również w ich przypadku kosztocłonność procesów jednostkowych jest stosunkowo niska, ale należy jednak pamiętać o wysokich kosztach inwestycji poczynionych na początku produkcji związanych z zakupem infrastruktury próżniowej. W przypadku metod chemii mokrej i biosyntezy koszt ten jest znacznie niższy, natomiast zwykle metody te nie pozwalają na łatwą kontrolę i precyzyjne skalowanie procesów otrzymywania. Warto dodać, że metody te cechuje bardzo wysoka powtarzalność, czego nie można stwierdzić w przypadku biosyntezy, która jest zależna od składu chemicznego wykorzystywanych składników naturalnych. Z uwagi jednak na wykorzystanie w tej ostatniej metodzie surowców pochodzenia naturalnego, stanowi ona najbardziej ekologiczną metodą spośród zaprezentowanych.



Rys. 4.1. Schemat ilustrujący wybrane metody otrzymywania nanomateriałów, w kontekście istotnych parametrów syntezy, wraz z oceną: 1 – niska (w przypadku dystrybucji rozmiarów wąskiej), 2 – średnia oraz 3 – wysoka (w przypadku dystrybucji rozmiarów szerokiej). Aspekt środowiskowy rozumiany jest przez ekologiczność procesu (opracowanie własne).

4.1. Metody chemii mokrej

Metody chemii mokrej charakteryzują się warunkami realizacji syntez w środowisku roztworów i zwykle prowadzą do uzyskania pożądanej wielkości i kształtu nanocząstek w powtarzalny sposób. Wynika to w dużej mierze ze zrozumienia mechanizmów zarodkowania poszczególnych struktur w danych warunkach syntezy, które zależą zarówno od mechanizmu konwersji prekursora, czynnika aktywującego syntezę oraz obecności stabilizatorów reakcji w układzie. Skalowalność procesów otrzymywania nanomateriałów w metodach chemii mokrej nie jest w pełni oczywista ze względu na licznosc i złożoność czynników wpływających na poszczególne procesy technologiczne, które w małej objętości zachodzą w bardziej kontrolowany sposób, natomiast w większej skali z reguły stanowią bardziej złożone układy

dla krystalizacji tych struktur. Do takich czynników zalicza się między innymi limity mieszania w objętości mieszaniny reakcyjnej i związany z nimi transport masy i ciepła [149]. Dodatkowym aspektem, określającym wykorzystanie tych metod, jest zwykle niska ekologiczność procesów, które bardzo często wykorzystują odczynniki chemiczne trudne do zutylizowania oraz wymagają dużych nakładów energii do reakcji w wysokich temperaturach [150]. Do grupy metod chemii mokrej otrzymywania nanomateriałów zalicza się m. in. metodę hydrotermalną, procesy zol-żel, fotoredukcję, dekompozycję termiczną oraz opisane szczegółowiej w dalszej części pracy współstrącanie i redukcję chemiczną.

4.1.1. Współstrącanie

Metoda otrzymywania nanomateriałów przez współstrącanie wykorzystuje zjawisko przesunięcia równowagi w roztworze z prekursorem materiału, który oczekuje się otrzymać na drodze przesylenia roztworu. W takim układzie jednocześnie zachodzą procesy nukleacji, wzrostu zarodka oraz dojrzewania Ostwalda i agregacji cząstek. W wyniku strącenia otrzymuje się wspomniane nanomateriały, których morfologia i rozkład wielkości struktur zależy przede wszystkim od szybkości procesu zarodkowania oraz etapu dojrzewania [151]. Dodatkowo procesy te mogą być aktywowane przez wykorzystanie ultradźwięków, co ma miejsce np. podczas syntezy Ag_2TiO_3 wykorzystywanego do kontrolowanego uwalniania bakteriobójczego metronidazolu [152]. Z kolei aktywacja z wykorzystaniem mikrofal jest stosowana podczas syntezy struktur bimetalicznych Au-Ag, które modyfikowane glukanem o strukturze potrójnej helisy mają działanie przeciwgrzybiczne [153]. Do zalet wspomnianej metody należy raczej niski stopień złożoności technologicznej procesu wytwarzania, wysoka efektywność i niska kosztocłonność. Natomiast stosunkowo szeroki zakres rozmiarów otrzymywanych cząstek, konieczność stosowania odpowiednich filtrów do separacji produktów i utylizacji często toksycznych odpadów, zdecydowanie należą do jej wad [154]. Do biologicznie aktywnych materiałów otrzymywanych tą metodą należą głównie struktury wykorzystywane do obrazowania medycznego np. nanocząstki Fe_2O_3 [155], nanocząstki Fe_3O_4 [156], nanocząstki NiO dotowane neodymem [157], nanocząstki CuS [158] lub nanocząstki AgFe [159].

4.1.2. Redukcja chemiczna

Jedną z częściej stosowanych metod do otrzymywania nanocząstek nieorganicznych jest redukcja chemiczna, wykorzystująca zjawisko różnicy potencjałów zachodzących pomiędzy prekursorem materiału a reduktorem. W środowisku wodnym, pod wpływem działania elektronów pochodzących z reduktora, jony prekursora przechodzą do stanu obojętnego, co inicjuje procesy zarodkowania oraz dojrzewanie Ostwalda, prowadzące do otrzymania wspomnianych struktur. Warto dodać, że istotnym czynnikiem w procesie redukcji chemicznej jest dobór stabilizatorów (np. surfaktantów lub polimerów), które zapobiegają agregacji nanocząstek poprzez wprowadzenie sił odpychających między nimi [160]. Synteza nanomateriałów tą techniką zależy również od temperatury, prędkości mieszania oraz czasu syntezy, które w znacznym stopniu wpływają na szybkość zarodkowania nanocząstek. Jednocześnie wspomniane czynniki wpływają negatywnie na skalowalność procesu w skali przemysłowej, a potrzeba stosowania kosztownych w użyciu odczynników chemicznych dodatkowo limituje wykorzystywanie tej metody. Tym niemniej otrzymywanie nanomateriałów metodą redukcji daje bardzo dobre efekty powtarzalności syntez przy zachowaniu precyzji w doborze warunków prowadzonych procesów oraz dobrą kontrolę nad kształtem otrzymywanych struktur o rozmiarach nanometrycznych [161]. W rezultacie syntezy przeprowadzane tą metodą pozwalają na otrzymywanie bioaktywnych nanocząstek metali, w tym srebra [162], złota [163], miedzi [164], ale również ich kombinacji w postaci AuAgNPs [165], CuAgNPs [166] oraz nanocząstek niemetalicznych, np. tlenku cynku [167], tlenku magnezu [168] lub selenu [169].

4.2. Metody próżniowe

Otrzymywanie nanomateriałów metodami próżniowymi stanowi dobrą alternatywę dla syntez prowadzonych w roztworach. Techniki te wykorzystują zjawiska zachodzące w warunkach obniżonego ciśnienia, a więc przy wydłużonej średniej drodze swobodnej cząstek. Metody te pozwalają również na precyzyjną kontrolę nad dozowanymi prekursorami, co w rezultacie sprawia warunki do wzbudzenia wspomnianych cząstek w stan plazmy. Ponadto procesy próżniowe, ze względu na brak kontaminacji pochodzących np. z powietrza, charakteryzują się bardzo dobrą kontrolą składu chemicznego nanostruktur. W kontekście otrzymywania nanomateriałów można podzielić je na dwie główne grupy, mianowicie metody fizycznego i chemicznego osadzania z fazy gazowej. Pierwsza z nich, do kondensacji par gazu,

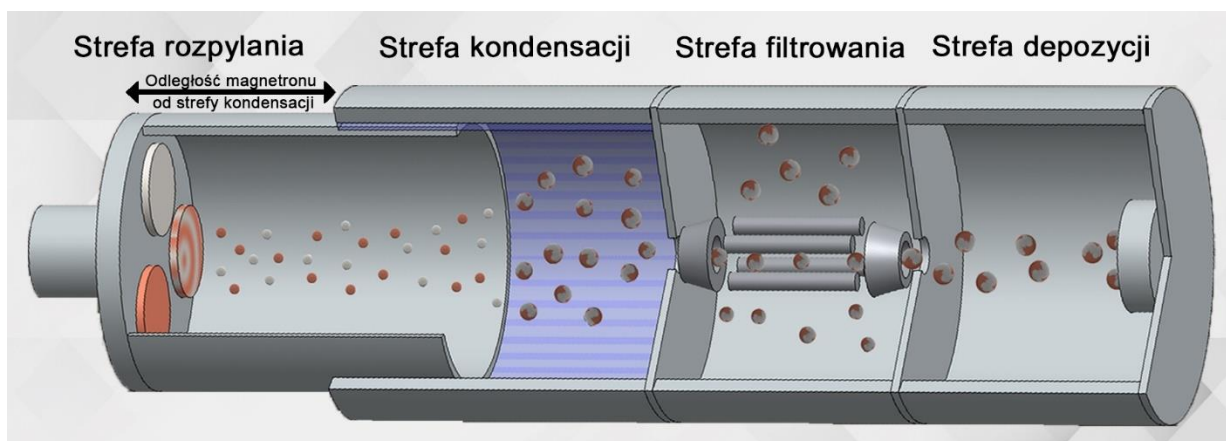
procesów zarodkowania i wzrostu struktur wykorzystuje zjawiska fizyczne. Natomiast metoda chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD) wykorzystuje prekursory w fazie gazowej, które wchodzi w reakcje i tworzą związki chemiczne na powierzchni podłoża. Z reguły obydwie grupy technik są wykorzystywane do otrzymywania nanomateriałów 2D, czyli warstw [170,171]. Jednak wśród opracowanych rozwiązań można wyróżnić użyteczne techniki do syntezy nanocząstek bioaktywnych, w tym na przykład chemiczne osadzanie z fazy gazowej wspomagane aerozolem lub metoda kondensacji w obecności gazu obojętnego, które zostały opisane w kolejnych rozdziałach.

4.2.1. Chemiczne osadzanie z fazy gazowej wspomagane aerozolem

Chemiczne osadzanie z fazy gazowej wspomagane aerozolem (AA CVD, ang. *Aerosol-Assisted Chemical Vapour Deposition*) jest techniką wykorzystującą rozproszenie prekursora w postaci drobnych kropli w strumieniu gorącego gazu nośnego, które trafiają na podgrzewane podłoże, na którym z kolei zachodzą reakcje chemiczne. Przy doborze odpowiednich warunków dla danego procesu należy zwrócić uwagę aby w trakcie rozpylania pod wpływem temperatury rozpuszczalnik przechodził w stan gazowy, a prekursor reagował z pozostałymi reagentami oraz powierzchnią podłoża, co w konsekwencji prowadzi do nukleacji i tworzenia nanoncząstek. Technika AA CVD charakteryzuje się szerszą gamą dostępnych prekursorów (w przeciwieństwie do konwencjonalnych technik CVD), które nie muszą całkowicie przechodzić w fazę gazową na etapie ich dozowania do reaktora oraz cechują się niższą temperaturą atomizacji, nie prowadzą do rozkładu prekursora [172]. Ponadto procesy prowadzone z wykorzystaniem tej metody są relatywnie tanie, skalowalne do skali przemysłowej i charakteryzują się wysoką czystością otrzymywanych produktów [173]. Tym niemniej dobór warunków otrzymywania nanomateriałów jest skomplikowany, struktury muszą być deponowane na podłożach, z którym się wiążą, problematyczna jest także toksyczność par reagentów stanowiących produkty po procesie [174]. Do nanomateriałów otrzymywanych tą metodą można zaliczyć antybakteryjne nanocząstki miedzi na poli(dimetylosiloksanie) [175], nanostrukturyzowany TiO_2 [176], tlenek cynku modyfikowany tlenkiem miedzi(II) i tlenkiem żelaza(III) o właściwościach superhydrofobowych [177], ale również nanocząstki organiczne zawierające antybiotyki, na przykład polietylen z wankomycyną [178] lub polietylen z gentamycyną i lizozymem [179].

4.2.2. Metoda kondensacji w obecności gazu obojętnego

Metoda kondensacji w obecności gazu obojętnego (IGC) atomów wzbudzonych z wykorzystaniem techniki rozpylania magnetronowego (MS, ang. *Magnetron Sputtering*) jest techniką z grupy fizycznego osadzania z fazy gazowej (PVD, ang. *Physical Vapour Deposition*). Przykładowy schemat otrzymywania nanocząstek (aparatura firmy Mantis) przedstawiono na Rys. 4.2.



Rys. 4.2. Schemat komory procesowej dla techniki *Inert Gas Condensation* z podziałem na strefy reaktora dla procesu formowania nanocząstek, ACMIN AGH (opracowanie własne).

W strefie rozpylania, na drodze bombardowana powierzchni rozpylanego materiału (targetu) zjonizowanym gazem, dochodzi do wzbudzenia atomów do stanu plazmy. Wzbudzone atomy materiału transportowane są następnie do strefy kondensacji chłodzonej ciekłym azotem, w której dochodzi do ich zderzeń, co tym samym prowadzi do obniżenia ich energii kinetycznej, nukleacji i kondensacji atomów do postaci nanocząstek. W dalszej kolejności nanocząstki trafiają do strefy filtrowania wyposażonej w spektrometr masowy, który umożliwia analizę ich masy, a po uwzględnieniu parametrów właściwych materiału pozwala na określenie rozkładu średnic syntezowanych nanocząstek. Dodatkowo spektrometr masowy umożliwia selekcję wartości średnic nanocząstek poprzez wykorzystanie filtra kwadrupolowego. Po odfiltrowaniu nanocząstek o zadanych rozmiarach, trafiają one do strefy depozycji, gdzie osadzają się na wybranym podłożu. Układ wyposażony jest w system kontroli parametrów nanocząstek (w tym ich rozmiarów), co w pierwszej kolejności zależy od nastaw parametrów prądowych zasilających dany magnetron, różnicy ciśnień pomiędzy strefą rozpylania i kondensacji, jak i składu mieszaniny gazów nośnych, które wpływają na wartość drogi swobodnej i czas przebywania w strefie kondensacji [180,181]. Nanocząstki otrzymywane tą metodą charakteryzują się jednorodnością składu chemicznego, stosunkowo

niewielkimi rozmiarami i niewielkim rozrzutem rozmiarów, dobrą powtarzalnością procesów oraz możliwością skalowania procesu. Do wad tej metody można zaliczyć stosunkowo niewielką ilość otrzymywanych nanocząstek w stosunku do czasu prowadzonego procesu oraz, podobnie jak w metodzie CVD, konieczność osadzania nanomateriałów na danym podłożu. Główną grupą materiałów otrzymywanych tą metodą są nanocząstki metali i ich stopy, w tym CuNPs [182], AgNPs [183], AuNPs [184], ZnNPs [185], ZnFeNPs[186], FeAuNCs [187], AuPdNPs [188] ale również tlenki, np. Fe₃O₄ [189].

4.3. Biosynteza nanomateriałów

Ostatnią opisywaną grupą metod jest synteza nanomateriałów do zastosowań biomedycznych z wykorzystaniem naturalnych czynników redukujących. Mechanizm otrzymywania nanocząstek jest w tym przypadku analogiczny do redukcji chemicznej opisanej w rozdziale 4.1.2., natomiast rolę reduktora pełnią w tym przypadku organizmy żywe, takie jak rośliny, grzyby, glony, bakterie lub wirusy [190]. Metoda ta, wykorzystująca naturalne czynniki bioredukujące, staje się coraz bardziej popularna i zyskała miano zielonej chemii (ang. *green chemistry*). Podając za bazą SciVal (Elsevier), ilość doniesień literaturowych dotyczących zielonej syntezy samych nanocząstek srebra (T.161) za okres ostatnich sześciu lat, to blisko 16.5 tys., przy czym w 2022 roku opublikowano aż czterokrotnie więcej prac niż w roku 2017. Do głównych czynników wpływających na przebieg syntez, poza wykorzystanym czynnikiem, należy temperatura, pH oraz stężenie wykorzystywanych reagentów [191]. Wykorzystanie zasobów naturalnych jako czynników bioredukujących w syntezie nanocząsteczek niweluje problem utylizacji reagentów występujących przy metodach chemii mokrej, jest przy tym niskokosztowe, a jednocześnie pozwala na płynne przejście ze skali laboratoryjnej do skali przemysłowej. Z drugiej jednak strony zdanie się na żyjące i nadal ewoluujące organizmy, na które ma wpływ wiele czynników zewnętrznych, wpływa negatywnie na powtarzalność wyników syntez oraz generuje rozbieżności w morfologii oraz rozmiarach otrzymywanych nanomateriałów [192,193]. Niewątpliwie jednak biosynteza nanomateriałów będzie nadal rozwijana, a sam proces udoskonalany, ponieważ jej potencjał ekologiczny jest bardzo wysoki. Uwagę zwraca szeroki zakres możliwości otrzymywania nanocząstek bioaktywnych tą metodą, jego wybrane przykłady zostały przedstawiono w Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Zestawienie wybranych nanomateriałów otrzymywanych na drodze biosyntezy. Nazwy czynnika bioredukcującego podano zgodnie z taksonomią oraz nazwą polską (jeżeli występuje)

Material	Czynnik bioredukcujący	Rozmiar i kształt	Lit.
Au	Krocień ogoniasty <i>Croton Caudatus Geisel</i>	20÷50 nm nanocząstki sferyczne	[194]
Au	Fibroina pochodzenia jedwabnika morwowego <i>Bombyx mori</i>	30÷80 nm kształty niejednolite: sferyczne, pręty, nanopryzmy	[195]
Ag	<i>Lysiloma acapulcensis</i>	8÷16 nm nanocząstki sferyczne	[196]
Ag	<i>Pseudoduganella eburnea</i>	8÷24 nm nanocząstki sferyczne	[197]
Cu	Cytryna zwyczajna <i>Citrus Limon</i>	10÷50 nm nanocząstki sferyczne	[198]
Se	<i>Ceropegia bulbosa</i>	35÷65 nm nanocząstki sferyczne	[199]
CuO	Rozchodnik karpacki <i>Hylotelephium telephium</i>	26÷54 nm kształty nieregularne	[200]
ZnO	<i>Deverra tortuosa</i>	9÷31 nm nanocząstki heksagonalne	[201]
TiO₂	Miodla indyjska <i>Azadirachta indica</i>	15÷45 nm nanocząstki sferyczne	[202]
NiO	Szałwia hiszpańska <i>Salvia hispanica L.</i>	14÷49 nm nanocząstki sferyczne	[203]
Fe₂O₃	<i>Withania coagulans</i>	50÷250 nm (Ø15÷20 nm) nanopręty	[204]
Cr₂O₃	<i>Abutilon indicum</i>	15÷45 nm nanocząstki sferyczne	[205]

Zebrane w Tabeli 4.1. dane wskazują na szerokie możliwości otrzymywania tą metodą zarówno nanocząstek metalicznych jak i tlenków metali. Zestawione materiały zostały otrzymane głównie z wykorzystaniem reduktorów pochodzenia roślinnego, ale również z użyciem bakterii (*Pseudoduganella eburnea*) oraz reduktorów pochodzenia zwierzęcego, mianowicie fibroiny. Warto również zwrócić uwagę na różnorodność kształtów otrzymanych nanomateriałów, wśród których znajdują się zarówno nanocząstki sferyczne, nanopręty i formy heksagonalne. Mnogość dostępnych czynników redukujących i ich jeszcze niepoznany wpływ na morfologię otrzymywanych materiałów wskazuje na duży potencjał badawczy metody biosyntezy nanomateriałów w przyszłości.

Podsumowując można stwierdzić, że opisane metody bottom-up otrzymywania nanomateriałów nieorganicznych umożliwiają precyzyjnie zaplanowaną syntezę nanomateriałów aktywnych biologicznie. Metody chemii mokrej oraz biosynteza pozwalają z kolei na otrzymywanie materiałów zdyspergowanych w środowisku roztworów, metody próżniowe w środowisku gazowym, ograniczając wpływ czynników środowiskowych. Istotnym problemem, z punktu widzenia przemysłu, w przypadku metod mokrych jest skalowalność procesów otrzymywania, natomiast metody próżniowe wymagają większego startowego nakładu inwestycyjnego na początku produkcji. W kontekście formy uzyskiwanych nanomateriałów ważnym jest aby metodę otrzymywania dobrać właściwie do typu otrzymywanych struktur i ich aplikacji, prognozowanej morfologii oraz modelu uwalniania czynników bioaktywnych, związanych z usytuowaniem nanocząstek w obrębie nanokompozytu.

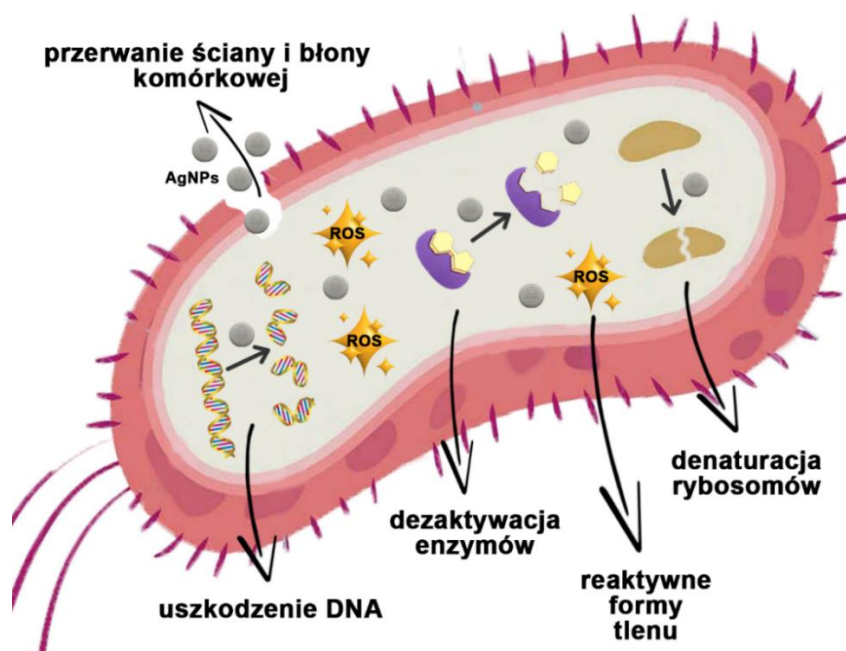
5. Bioaktywne nanocząstki metali

Perspektywy rozwoju powłok na bazie polimerów naturalnych są ściśle związane z poprawą ich funkcjonalności oraz możliwością otrzymywania kompozytów na osnowie biopolimerowej. Główną funkcjonalnością, która jest szeroko badana w tego typu układach jest możliwość kontrolowanego uwalniania leków w celu terminowego dostarczania precyzyjnych dawek substancji czynnych. Dodatkowo modyfikacje z wykorzystaniem czynników aktywnych powinny być skoncentrowane na optymalizacji wartości parametrów użytkowych opracowywanych układów. W przypadku implantów dla ortopedii, w ich zakres wchodzi symultaniczne działanie antybakteryjne i osteointegracyjne, uzyskane zwykle poprzez nadanie warstwie odpowiedniej chropowatości powierzchni, oraz poprawą biokompatybilności z tkanką kostną. Obecne rozwiązania, pomimo dużej liczby testowanych powłok bioaktywnych, rzadko przechodzą do fazy badań klinicznych, a jeszcze rzadziej do praktyki klinicznej [206]. W ostatnich latach rozwój powłok z wykorzystaniem matryc biopolimerowych łączy się z otrzymywaniem bionanokompozytów i najczęściej polega na łączeniu biopolimerów z bioaktywnymi nanocząstkami i/lub antybiotykami.

5.1. Nanocząstki srebra

Srebro, w postaci metalicznej lub jego roztworów, od czasów antycznych było stosowane jako środek przeciwbakteryjny, co tłumaczy fakt zwrócenia się w stronę otrzymywania nanocząstek srebra wraz z rozwojem nanotechnologii. Wysoki potencjał antybakteryjny AgNPs doprowadził do licznych prac badawczych, dzięki którym nanocząstki srebra uważane są za jedne z najlepiej scharakteryzowanych nanomateriałów [207]. Struktury te wykazują unikalne właściwości elektryczne, optyczne i katalityczne, które mogą być z powodzeniem wykorzystywane do wytwarzania m. in. systemów kontrolowanego dostarczania leków oraz obiektów użytecznych w diagnostyce (obrazowanie i biosensoryka) [208]. Jednak to wyjątkowa aktywność antybakteryjna i przeciwgrzybicza nanocząstek srebra spowodowały szerokie zastosowanie tego materiału w bioinżynierii [209], ale i również w kosmetyce [210], konserwacji żywności [211] oraz otrzymywaniu powłok funkcjonalnych [212].

Mechanizm aktywności antybakteryjnej nanocząstek srebra nie jest jednoznacznie określony, istnieje kilka teorii według których AgNPs mogą wpływać na śmierć bakterii. Opisane w literaturze mechanizmy zostały schematycznie przedstawione na Rys. 5.1.



Rys. 5.1. Schemat mechanizmów aktywności antybakteryjnej nanocząstek srebra (opracowanie własne, na podstawie [213]).

Pierwszą z opisywanych w literaturze strategii antybakteryjności stanowią oddziaływania elektrostatyczne dodatnio naładowanych nanocząstek i jonów srebra ze ścianą komórkową, która charakteryzuje się ładunkiem ujemnym. Podczas kontaktu następuje infiltracja ściany i błony komórkowej przez AgNPs, skutkująca przerwaniem jej ciągłości. Powoduje to wypłynięcie cytoplazmy oraz wewnętrznych struktur komórkowych i w konsekwencji śmierć bakterii [214]. Powyższy mechanizm obserwowany jest częściej w przypadku bakterii Gram-ujemnych ze względu na mniejszą grubość ściany komórkowej (3-4 nm) względem bakterii Gram-dodatnich (30 nm) [215]. Istotnym parametrem wpływającym na antybakteryjność jest również średnica nanocząstek srebra, im mniejsza tym zapewnia łatwiejsze przenikanie ściany i błony komórkowej.

Pozostałe strategie są związane z zaburzeniami kluczowych wewnątrzkomórkowych procesów bakterii, do których zalicza się (i) zakłócanie replikacji oraz defragmentację łańcuchów DNA [216]; (ii) denaturację rybosomów powodującą zahamowanie translacji i syntezy białek [213]; (iii) oddziaływanie na gospodarkę enzymatyczną, co przyczynia się do hamowania wewnątrzkomórkowych funkcji biologicznych [217] oraz (iv) inaktywację dehydrogenaz łańcucha oddechowego powodowaną przez wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS), która hamuje oddychanie i wzrost bakterii [218].

Co ważne, antybakteryjność charakterystyczna dla nanocząstek nie podlega antybiotykooporności, co umożliwia szerokie i długotrwałe stosowanie ich jako terapeutyków [219]. Na uwagę zasługuje jednak również konieczność rozważnego dozowania AgNPs ze względu na ich działanie cytotoksyczne *in vivo* w zbyt wysokich stężeniach [220].

5.2. Nanocząstki złota

Wykorzystanie nanocząstek złota w aplikacjach biomedycznych można podzielić na trzy obszary, mianowicie wsparcia diagnostycznego, działania terapeutycznego i aktywności immunologicznej [221]. Działania diagnostyczne prowadzą do wykorzystania złota w obrazowaniu *in vivo* jako kontrastu, w tym w rezonansie magnetycznym, pozytonowej tomografii emisyjnej lub połączeniu tych technik [222]. Dodatkowo struktury te, z uwagi na występowanie powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. *Surface Plasmon Resonance*), wykorzystywane są do tworzenia biosensorów. Zmiana rezonansu powierzchniowego w kontakcie z analitem prowadzi do jego detekcji i możliwości prowadzenia pomiarów jakościowych i ilościowych do rozdzielczości attomolowych [223].

Nanocząstki złota wykorzystywane są również w prowadzeniu terapii fototermicznej, w efekcie której precyzyjnie dozowane nanocząstki, najczęściej modyfikowane w kierunku terapii celowanych, lokalizują się w obszarze komórek nowotworowych, a ich immobilizacja, zwykle na drodze promieniowania elektromagnetycznego z zakresu 650÷900 nm (zwanego „oknem biologicznym”), prowadzi do lokalnego zwiększenia drgań oraz osiągnięcia temperatury śmiertelnej dla komórek o zaburzonym cyklu [224]. Drugą strategią wykorzystania AuNPs w leczeniu nowotworów jest ablacja prądem o częstotliwości radiowej. Metoda ta również wykorzystuje lokalny wzrost temperatury generowany przez nanocząstki wzbudzone przez prąd przemienny średniej częstotliwości. Podczas zabiegu do guza z dostarczonymi wcześniej nanocząstkami wprowadza się sondę przypominającą igłę, która jest źródłem prądu wpływającego na nanocząstki [225]. Jednakże dokładny mechanizm zachowania AuNPs pod wpływem prądu o częstotliwości radiowej nie jest znany. W literaturze można znaleźć opisane trzy możliwe sposoby działania: (i) ogrzewanie joulowskie lub indukcyjne, (ii) ogrzewanie magnetyczne lub (iii) ogrzewanie elektroforetyczne. Każdy z tych mechanizmów jest silnie zależny od częstotliwości zastosowanego promieniowania, ale również wielkości i kształtu nanocząstek złota [226].

Znaczna skuteczność terapeutyczna nanocząstek, w porównaniu z typowymi terapiami, zależy od ich bioaktywności, znacznego rozwinięcia powierzchni i wysokiego potencjału do modyfikacji powierzchni. Nanocząstki złota w bezpośrednim działaniu nie mają właściwości antybakteryjnych, wymagają bowiem obecności środowiska lub substancji, która aktywuje ich potencjał bakteriobójczy [227]. Dodatkowo, AuNPs mogą pełnić rolę nośników leków i terapii genowych, ze szczególnym uwzględnieniem terapii celowanych lub systemów kontrolowanego dostarczania leku [228,229]. Połączenie czynnika aktywnego z nanocząstkami złota ma na celu przede wszystkim poprawę jego stabilności i zmniejszenie jego skutków ubocznych. Połączenie można osiągnąć wykorzystując modyfikację powierzchniową nanocząstek i utworzenie wiązań kowalencyjnych lub niekowalencyjnych z przenoszoną substancją czynną. Wiązania niekowalencyjne obejmują głównie modyfikację elektrostatyczną, wiązania van der Waalsa, wiązania π - π oraz efekty hydrofobowe [230]. Jednakże tego typu oddziaływania charakteryzują się słabą selektywnością i małą siłą adsorpcji, która zwykle powoduje oddzielanie się czynników aktywnych od AuNPs pod wpływem środowiska organizmu (np. zmiennego pH) [231]. Skutkować to może uwolnieniem leku przed miejscem jego planowanej aktywności terapeutycznej, niekiedy przyspiesza metabolizowanie leku oraz może prowadzić do toksycznego działania. Wyższą stabilność zapewnia wykorzystanie wiązań kowalencyjnych utworzonych między AuNPs, a np. grupami siarczkowymi lub azotkowymi [232]. Czynniki aktywnymi, którymi najczęściej modyfikowane są nanocząstki złota są antybiotyki, w tym gentamycyna, wankomycyna, streptomycyna, penicylina lub ampicylina [233].

5.3. Nanocząstki miedzi

W ostatnich latach potencjał przeciwnowotworowy i antybakteryjny materiałów na bazie nanocząstek metali, w tym złota, srebra i miedzi, był przedmiotem badań wielu naukowców w świecie. Nanocząstki miedzi to szczególna grupa nanocząstek metalicznych, wytwarzanych przy użyciu nowoczesnych technologii, o korzystnych właściwościach fizykochemicznych, biologicznych i mechanicznych [234]. Niższy koszt miedzi, w porównaniu ze złotem i srebrem, skutkuje lepszym rozwojem nanocząstek miedzi jako środków terapeutycznych. Synteza wspomnianych nanocząstek obejmuje stosunkowo krótkie i proste procedury doświadczalne, jednocześnie zapewnia wysoką wydajność ich wytwarzania w porównaniu z innymi rodzajami nanocząstek metalicznych [235]. Stosunkowo szeroki zakres rozmiarów wspomnianych cząstek miedzi oraz korzystny stosunek powierzchni do objętości wpływają na ich skuteczność jako środków terapeutycznych [236]. Ponadto wykazano, że miedź i CuNPs

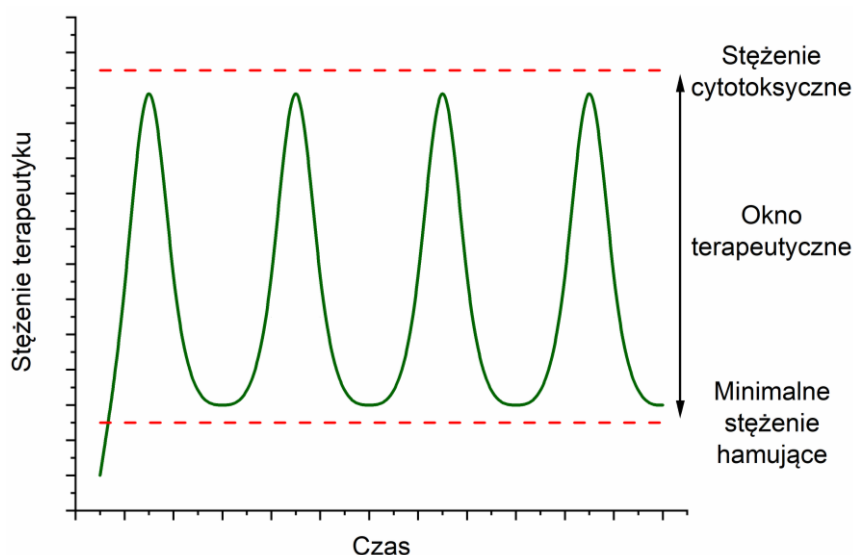
wykazują zwiększoną toksyczność wobec różnych mikroorganizmów, stając się w ten sposób skutecznym środkiem antybakteryjnym, przeciwgrzybicznym i przeciwwirusowym [237,238]. Proponowane w literaturze mechanizmy antybakteryjności są analogiczne do tych opisanych dla nanocząstek srebra w rozdziale 5.1. z wyłączeniem strategii niszczenia błony i ściany komórkowej, przez które CuNPs przenikają [239]. W przypadku mechanizmu działania przeciwwirusowego rola CuNPs nie jest wciąż znana, natomiast niektóre prace wskazują na możliwe ograniczenie przez nanocząstki przedostawania się, przyłączania się i replikacji wirusa [240,241]. Mechanizm aktywności przeciwgrzybiczej również nie jest jednoznacznie zbadany, natomiast badania wobec kropidlaka czarnego (*Aspergillus niger*) wykazały zaburzenia jego wzrostu poprzez zmiany aktywności metabolicznej [242]. Z kolei prace przeprowadzone przez Shende, *et al.* [243] na grzybach z rodziny *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. graminearum* i *F. culmorum*) wskazują na zakłócanie mechanizmów replikacji i transkrypcji DNA, oraz inaktywację białek poprzez interakcję z grupami –SH. Nie ulega jednak wątpliwości, że miedź jest jednym z najsłabiej zbadanych materiałów pod względem mechanizmów biobójczych ze względu na zwiększoną niestabilność z uwagi na utlenianie oraz fakt, że często tworzy kompleksy z cząsteczkami wody w środowisku wodnym.

Ponadto nanocząstki miedzi mogą być stosowane jako środki rozszechniające DNA i silne środki przeciwnowotworowe. Wynika to z ich zdolności do wiązania z biocząsteczkami i modyfikowania ich właściwości powierzchniowych, co dotyczy również enzymów i białek [244]. Warto również zauważyć, że nanocząstki miedzi mogą też pełnić rolę skutecznych nanopreparatów dostarczających leki i molekularnych systemów dawkowania, pełniąc rolę regulatorów wzrostu komórek nowotworowych [245].

Podsumowując ten rozdział można stwierdzić, że potencjał, którym charakteryzują się nanocząstki złota, srebra oraz miedzi w kontekście zastosowań w biomateriałach jest ogromny. Wszystkie z opisanych powyżej nanomateriałów mogą wspierać lub aktywnie działać antybakteryjne, przeciwgrzybiczo oraz przeciwwirusowo, co wpływa korzystnie na adaptację implantów szczególnie w pierwszych etapach po operacji oraz ograniczać niepożądane odrzucenie wszczepu. Ponadto nanocząstki metali mogą być modyfikowane powierzchniowo, co zwiększa ich potencjał w zastosowaniach diagnostycznych oraz terapeutycznych. Wykorzystanie nośników w postaci nanocząstek, na które mikroorganizmy nie wykształciły oporności otwiera możliwości stosowania terapii celowanych oraz precyzyjnego dozowania czynników aktywnych do organizmu wymagającego interwencji medycznej.

6. Uwalnianie czynników bioaktywnych

Czynniki o działaniu bioaktywnym, stanowiące części składowe biomateriałów, aby mogły spełnić swoją funkcję, muszą zostać uwolnione w odpowiednim momencie. Opisane w Rozdziale 5 nanocząstki bioaktywne stanowią przykład czynników, których głównym celem jest aktywność terapeutyczna po implantacji oraz bioaktywność prowadząca do minimalizacji ryzyka odrzucenia implantu przez organizm. Uwalnianie czynnika powinno być zatem zaplanowane w możliwie jak najbardziej precyzyjny sposób, w kontekście zarówno wartości stężeń terapeutyków, jak i czasu ich dozowania. Dla przykładu na Rysunku 6.1 zaprezentowano schemat modelowej kinetyki uwalniania leku.



Rys. 6.1. Schemat modelowej kinetyki dozowania leków, niezbędnej do utrzymania okna terapeutycznego (opracowanie własne).

Pożądane dozowanie leku do organizmu powinno być realizowane w ilości powyżej minimalnego stężenia hamującego (MIC, ang. *Minimum Inhibitory Concentration*), a jednocześnie poniżej stężenia cytotoksycznego. Zakres ten nazwany jest oknem terapeutycznym, a wspomniane działanie pozwala na skuteczne eliminowanie bakterii, przy jednoczesnym braku zagrożenia dla pacjenta. Poza pożądanymi zakresami stężeń istotny jest również interwał pomiędzy kolejnymi dawkami terapeutyków. Zbyt długi czas może prowadzić do spadku stężenia poniżej MIC, co zwykle umożliwia namnażanie się bakterii, natomiast zbyt częste dozowanie leku doprowadza do utrzymywania się jego stężenia na wysokim poziomie, i w rezultacie sprzyja adaptacji bakterii i wytworzenia oporności na jego działanie, ich

namnażania się i pogłębiania infekcji. Opisany mechanizm określa się antybiotykoopornością (AMR, ang. *Antimicrobial Resistance*) i niewątpliwie jest wyzywaniem, przed którym staje współczesna medycyna i wszelkie nauki pokrewne, ze względu na coraz szybsze adaptowanie się bakterii do nowych leków [246]. Prognozowane konsekwencje antybiotykooporności opisane zostały również w raporcie WHO (ang. *World Health Organization*) i OECD (ang. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) [247]. Opracowania wskazują, że do 2050 roku AMR będzie najczęstszą przyczyną śmierci, prognozuje się aż 10 mln zgonów z powodu AMR, wobec 8.2 mln zgonów spowodowanych nowotworami.

W kontekście tematyki niniejszej pracy należy również zwrócić uwagę na rolę nanotechnologii będącej obecnie nieodłączną częścią medycyny. W szczególności, jak to zostało opisane w Rozdziale 5, wykorzystuje się ją do projektowania biomateriałów oraz obrazowania medycznego. W świetle obecnych badań nanomateriały jako niezależne terapeutyki lub sprzężone z antybiotykami w kontakcie z bakteriami, będącymi zagrożeniem dla ludzi, nie wykształcają w nich mechanizmu antybiotykooporności [248,249]. Warto jednak zwrócić uwagę na występujące w przyrodzie bakterie, które wykształciły oporność na wysokie stężenia jonów metali, w tym miedzi (szczepy *Sphingomonas* i *Stenotrophomonas*) [250] lub metali ciężkich, w tym kadmu i ołowiu (szczepy *Klebsiella* i *Enterobacter*) [251,252].

Nanotechnologia pomimo znakomych efektów antybakteryjnych może nieść pewne zagrożenia, o których wspomina m. in. A. Hasan, *et al.* [253]. Głównym problemem jest nieznany na ten czas długofalowy efekt zachowania nanocząstek w ludzkim organizmie. Najbardziej niebezpieczne skutki mogą być związane z możliwym działaniem rakotwórczym, teratogennym i cytotoksycznością. Ryzyko zmian zależy w dużej mierze od dawki i czasu ekspozycji nanocząstek na organizm, dlatego zastosowanie bionanomateriałów powinno odbywać się w sposób celowy i racjonalny. Warto również wspomnieć o aspekcie środowiskowym syntezy i wykorzystywania nanomateriałów. Zrównoważone podejście do wytwarzania związków chemicznych oraz gospodarki odpadami chemicznymi powoduje promowanie zielonych metod otrzymywania [254,255], do których zalicza się m. in. metoda IGC-MS (ang. *Inert Gas Condensation – Magnetron Sputtering*). Ponadto duże znaczenie ma przedostawanie się nanomateriałów do środowiska, co ma miejsce po spełnieniu przez nie zakładanej roli, stanowi to temat licznych badań w obrębie zanieczyszczenia środowiska wodnego [256], lokalnych ekosystemów [257] oraz wtórnego wpływu tych struktur na zdrowie ludzi [258]. W tym aspekcie projektowanie nanokompozytów wymaga również odpowiedniego i intencjonalnego gospodarowania ryzykiem.

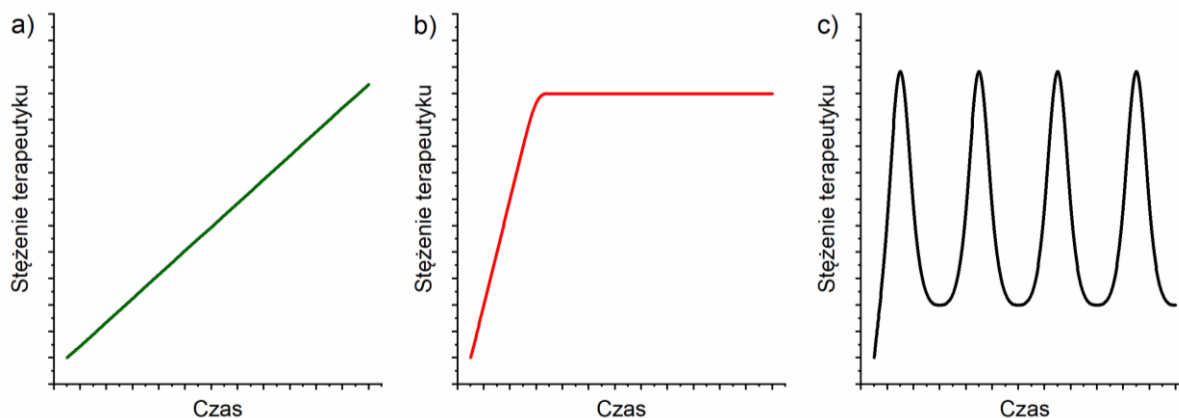
6.1. Modele kierowanego uwalniania

Model uwalniania leku umożliwia dostarczenie aktywnego składnika (leku) w celu uzyskania pożądanej odpowiedzi terapeutycznej. Konwencjonalne systemy dostarczania leków (tabletki, kapsułki, syropy, maści itp.) charakteryzują się brakiem aktywnego dozowania i wahaniami stężeń leku w osoczu. Bez kierowanego mechanizmu uwalniania cały proces terapeutyczny może być nieskuteczny ze względu na brak zachowania reżimu szybkości i precyzyjnego, miejscowego dozowania. Systemy kontrolowanego dostarczania leków opracowuje się w celu zwalczania problemów związanych z konwencjonalnym dostarczaniem terapeutyków. Istotny rozwój w zakresie modeli kierunkowego uwalniania leków miał miejsce od lat sześćdziesiątych XX w., począwszy od ery „makro” i „mikro”, aż po inteligentne ukierunkowane dostarczanie, zwane erą „nano”.

6.1.1. Era „makro”

Jak wspomniano, idea kontrolowanego dostarczania terapeutyków do organizmu towarzyszy naukowcom od lat sześćdziesiątych XX w., kiedy pierwsze udane próby kontrolowanego uwalniania leku przyjmowanego oralnie poczynił Smith K. Beecham, proponując dozowanie dekstroamfetaminy wykorzystując technologię Spansule® [259]. Granulki stymulanta, ówczśnie stosowanego na ograniczenia łaknienia, a obecnie przy leczeniu zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD, ang. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*), były uwalniane przez 12 godzin z kapsułki wykonanej ze stopniowo rozpuszczającego się materiału [260]. Jeszcze w tej samej dekadzie kontrolowane uwalnianie zostało zaadaptowane przy wytwarzaniu biomateriałów przez Alexa Zaffaroni, założyciela firmy Alza Corporation, obecnie będącej częścią korporacji Jonsons & Jonson [261]. Zaffaroni opracował dwa pierwsze biomateriały z kontrolowanym uwalnianiem leku, Ocusert® - implant okulistyczny aplikowany na spojówkę oka z pilokarpiną wykorzystywaną w leczeniu jaskry [262] oraz Progestesert® - wewnątrzmaciczna wkładka uwalniająca działający antykoncepcyjnie progesteron [263]. Opracowanie wspomnianych produktów rozpoczęło erę „makro” w systemach kontrolowanego dozowania leków. Kontrola nad uwalnianym terapeutykiem była osiągnięta przez opracowanie rezerwuaru z lekiem otoczonym membraną. Do konstrukcji membrany wykorzystywano materiały porowate, odporne na degradację w środowisku implantacji oraz posiadające właściwości hydrofobowe. Dozowanie medykamentu zachodziło w oparciu o podstawowe prawo dyfuzji (I prawo Ficka), a jego

kinetykę charakteryzował przebieg liniowy, modelowo zaprezentowany na Rysunku 6.2.a. [264].



Rys. 6.2. Modelowe schematy kinetyk dozowania leków w poszczególnych erach rozwoju systemów: a) „makro”, b) „mikro” oraz c) „nano” (opracowanie własne).

Projektowanie biomateriałów, które reprezentuje model uwalniania o przebiegu liniowym, uwzględnia dobór niebiodegradowalnego materiału o odpowiedniej porowatości, odpowiadającego rozmiarom terapeutyków, który ma się z niego uwolnić. Kierując rozmiarami porów, można zaproponować odpowiedni postęp uwalniania, natomiast właściwości hydrofobowe są niezbędne do zapobiegania wypłukiwania leku z biomateriału [265].

6.1.2. Era „mikro”

Początkiem drugiej ery kontrolowanego uwalniania leków z biomateriałów była adaptacja biodegradowalnych polimerów bazujących na kwasach polihydroksylowych [266]. Prace nad syntezą polilaktydu (PLA) oraz poliglikolidu (PGA), a następnie otrzymanie z nich kopolimeru, doprowadziły do otrzymania poli(laktyd-co-glikolidu) (PLGA), który w proporcjach 10/90 mol/mol został opatentowany i wprowadzony na rynek w 1974 roku, w postaci resorbowalnych nici chirurgicznych pod nazwą Vicryl® [267]. Na przełomie lat 70-tych i 80-tych XX w. zdolność do biodegradacji PLGA zaczęła być wykorzystywana w projektowaniu leków. Do pierwszych prób kontrolowanego uwalniania leków z matrycy biodegradowalnej można zaliczyć otrzymywanie preparatów na bazie mikrocząstek PLGA z hormonem wzbudzającym lutropinę (LHRH, ang. *Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone*), odpowiadającym za cykl rozrodczy u ssaków [268]. Preparat ten uwalniał lek przez

miesiąc, nie został jednak wprowadzony na rynek. W przeciwieństwie do Decapeptylu® LP, który niecałą dekadę później, w 1986 roku, z sukcesem został opracowany przez tą samą grupę z Southern Research Institute. Mikrocząstki PLGA zostały wypełnione D-Trp-6 LHRH uwalniającym się przez sześć miesięcy i mającym działanie w leczeniu raka prostaty [269]. Po jego sukcesie pierwszy opisany preparat również został wprowadzony w 1989 roku na rynek pod nazwą Lupron® [261].

Model uwalniania leku z materiału charakterystycznego dla ery „mikro” został zaprezentowany na Rys. 6.2.b. Lek uwalnia się w ilości do osiągnięcia działania terapeutycznego, a następnie utrzymuje stężenie na tym samym poziomie przez długi czas. Jest to związane z degradacją polimeru, w którym znajduje się terapeutyk. Przy projektowaniu takiego materiału należy zwrócić uwagę na szybkość degradacji polimeru w środowisku wszczepu oraz jednolite zdyspergowanie terapeutyka w objętości całej matrycy.

Nie bez znaczenia są również zagrożenia i wyzwania, które towarzyszą temu podejściu do projektowania i uwalniania leków. Przykładowo N. Abu-Thabit, *et al.* [269] wskazuje na konieczność otrzymywania kapsułek o jednakowych rozmiarach, co jest niezbędne do zachowania jednolitego modelu degradacji i w rezultacie precyzyjnego dozowania czynnika aktywnego. Wspominany problem wciąż stanowi wyzwanie dla technologii, czego dowodem są liczne doniesienia opisujące metody otrzymywania materiałów o możliwie jak najmniejszym rozrzucie rozmiarów, np. mikrocząstek PLGA [270] lub nanocząstek lipidowych [271]. Drugie wyzwanie, które stoi przed materiałami tej ery, to wspomniana we wstępie do tego rozdziału antybiotykooporność, która jest promowana przez przebieg krzywej dozowania leku (Rys. 6.2.b.). Utrzymywanie się stężenia danego terapeutyka na stałym poziomie promuje bowiem wytworzenie oporności bakterii na działanie środka aktywnego.

6.1.3. Era „nano”

Rozpoczęcie ery „nano” było naturalną odpowiedzią na rozwój nanotechnologii, która została również zaimplementowana do systemów kontrolowanego uwalniania leków. A. Hoffman w pracy przeglądowej [261] wskazuje na trzy istotne obszary, które wpłynęły na rozpoczęcie nowej ery. Pierwszym z nich jest rozwój sprzężeń leków lub ich nośników z poli(tlenkiem etylenu) (PEG), który stabilizuje terapeutyki i wydłuża czas ich przydatności [272]. Drugim obszarem był rozwój terapii celowanych (ang. *active targeting*), które wykorzystują specyficzność i selektywność połączeń biologicznych ligandów (przeciwciał,

peptydów lub małych cząsteczek) z receptorami błony komórkowej [273]. Opisana właściwość jest wykorzystywana przy funkcjonalizacji powierzchni nośnika leku właściwym ligandem, który może przyłączyć się we właściwym miejscu i pozwolić na transport leku. Ostatnim impulsem było odkrycie efektu zwiększonej przepuszczalności i retencji naczyń guza (EPR, ang. *Enhanced Permeability and Retention Effect*) przez Hiroshi Maeda w 1986 roku [274]. Odkrycie to wskazało na powstawanie zdeformowanych i nieszczelnych naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu, które są zdolne do biernego transportu nanoobiektów do komórek nowotworowych, co w efekcie poprawia skuteczność leczenia terapeutycznego [275].

Typowy mechanizm uwalniania leku w czasie przebywania biomateriału w organizmie został schematycznie zaprezentowany na Rys. 6.2.c. Ideą kontroli transportu leku na tym etapie rozwoju jest dostosowanie jego dawki do potrzeb pacjenta tak, aby jego stężenie było w oknie terapeutycznym (Rys. 6.1.), ale nie utrzymywało się długo na jednolitym poziomie. Taki model pozwala na ograniczenie ryzyka związanego z wytworzeniem przez bakterie wspomnianej antybiotykooporności. Uwalnianie zatem ma działanie impulsowe, jednocześnie mając na względzie terapię celowaną. Lek trafia do specyficznych receptorów, które wymagają procesu leczenia. Gama materiałów, która jest wykorzystywana do projektowania leków ery „nano” jest bardzo szeroka, te muszą jednak spełniać wymagania w zakresie rozmiaru oraz posiadać zdolność do powierzchniowej modyfikacji przez ligand [276]. Do najpopularniejszych grup materiałów zaliczyć można wspomniane już polimery (PEG, PLGA) [277], liposomy [278] oraz nanocząstki nieorganiczne [279,280].

Zaprezentowane w powyższym rozdziale mechanizmy intencjonalnego modyfikowania materiałów w celu efektywnego dostarczania leków są jednym ze składowych elementów nowoczesnych biomateriałów, od których oczekuje się znacznej funkcjonalności. Prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej układy warstwowe bazują na mechanizmach charakterystycznych dla ery „mikro”, czyli uwalniania poprzez degradację materiału. Z kolei w zakresie intencjonalnego uwalniania stałej dawki czynnika bioaktywnego, będącego w zakresie okna terapeutycznego, aspirują do ery „nano”. Jednocześnie zakłada się, że struktury te można modyfikować w zakresie szybkości uwalniania niezbędnej dawki oraz czasu trwania terapii.

7. Cel naukowy oraz tezy pracy

Celem naukowym niniejszej rozprawy było **zapropowanie powierzchniowej funkcjonalizacji stopu z pamięcią kształtu NiTi do zastosowań w implantologii**, ze wskazaniem na chirurgię ortopedyczną. Mając na względzie aktualny stan wiedzy i doświadczenia własne w modyfikacji powierzchni implantów metalicznych, zaplanowano prace prowadzące do uzyskania funkcjonalnych struktur warstwowych na powierzchni nitinolu. Zapropowana metodyka badawcza dla wspomnianej modyfikacji powierzchni miała na celu (i) spełnienie warunków dla biogodności modyfikowanego stopu z tkanką kostną; (ii) wytworzenie struktur, o określonych parametrach chropowatości oraz zwilżalności, sprzyjających adhezji komórek i powodując ich prawidłowy wzrost; (iii) sprzyjać ograniczeniu wartości potencjału korozyjnego, tym samym stanowić barierę dyfuzyjną dla pierwiastków składowych stopu ograniczającą ich negatywny wpływ na organizm; (iv) wykazywać działanie antybakteryjne, o możliwie jak najbardziej precyzyjnym modelu uwalniania czynników bioaktywnych, dla ograniczenia infekcji w obrębie wszczepu.

Nawiązując do tematyki dysertacji w pracy eksperymentalnej sformułowano następujące tezy:

- i. Modyfikacja powierzchni stopu NiTi w środowisku kwasowym jest istotnym etapem obróbki, który pozwala na ograniczenie uwalniania z jego powierzchni wolnych pierwiastków składowych stopu, ze szczególnym uwzględnieniem niklu.
- ii. Modyfikacja chemiczna oraz etap wstępnej obróbki powierzchni stopu NiTi w warunkach plazmy sprzyja funkcjonalizacji powierzchni stopu przed procesem otrzymywania powłok na bazie biopolimerów.
- iii. Zapropowany etap otrzymywania powłok bionanokompozytowych wpływa korzystnie na odporność korozyjną stopu NiTi w warunkach symulowanego środowiska organizmu.
- iv. Zapropowane strategie otrzymania warstw bionanokompozytowych na bazie biopolimerów i nanocząstek złota, srebra i miedzi prowadzą do otrzymania układów nie wykazujących cytotoksyczności w kontakcie z linią komórkową osteoblastów (MG-63).

- v. Czynniki bioaktywne w postaci nanocząstek (Au, Ag, Cu), uwalnianych z powierzchni układów warstw, wykazują działanie antybakteryjne lub bakteriostatyczne w kontakcie z szczepami *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*.
- vi. Otrzymywanie pokryć o sekwencyjnej budowie warstwowej, na bazie chitozanu i warstwy nanocząstek metali, pozwala na kontrolowane uwalnianie nanostruktur z matrycy biopolimeru, tym samym sprzyja indywidualnemu dostosowaniu schematu uwalniania do potrzeb pacjenta.
- vii. Otrzymanie powłok na bazie chitozanu i nanocząstek metali szlachetnych na powierzchni stopu NiTi wykazuje potencjał aplikacyjny tej technologii w chirurgii ortopedycznej.

8. Metodyka badawcza

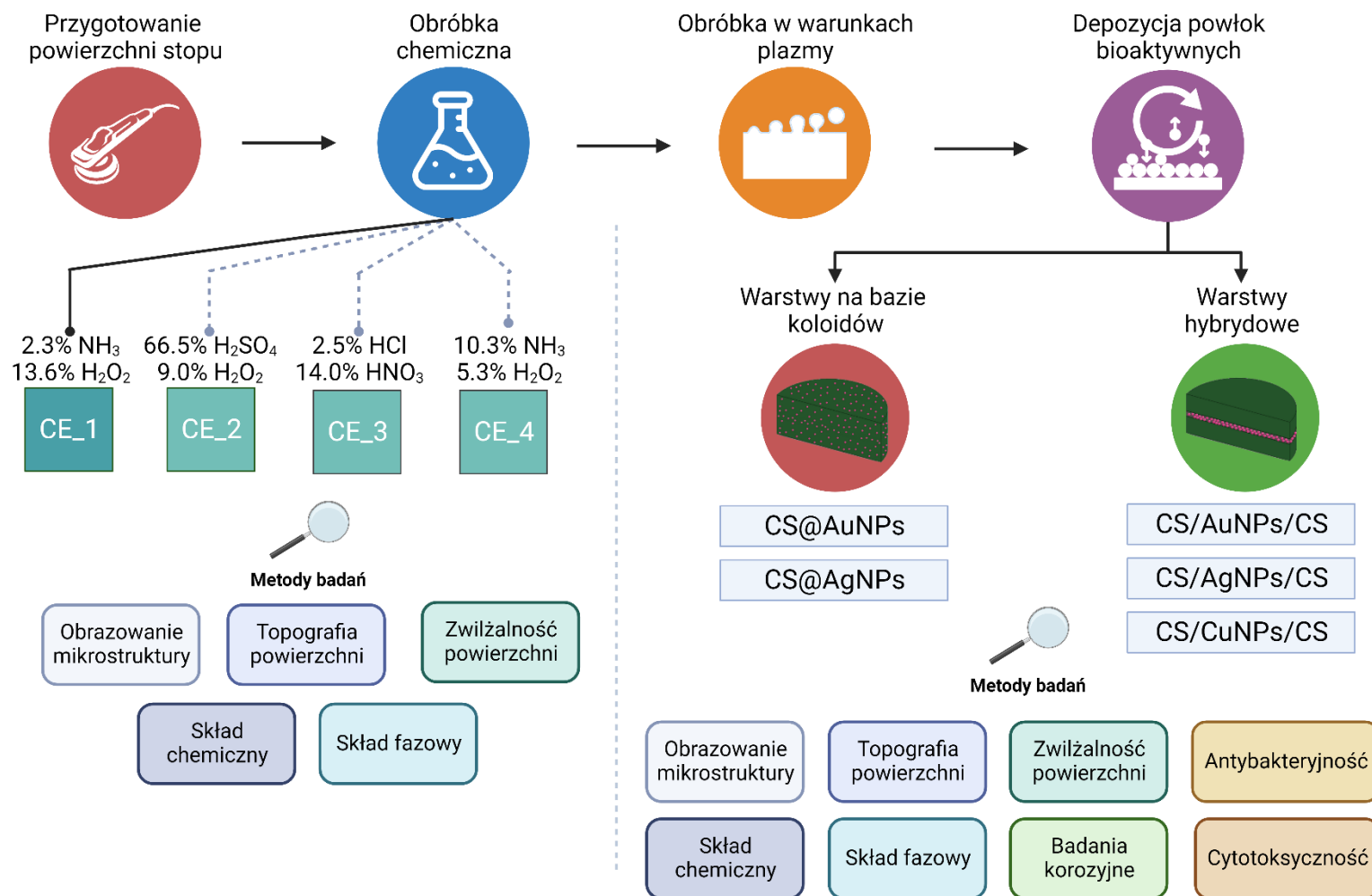
8.1. Opis prac eksperymentalnych

W niniejszej pracy zaproponowano kilkuetapowy proces modyfikacji powierzchni nitinolu, w tym obróbkę mechaniczną i chemiczną, aktywację plazmochemiczną oraz otrzymywanie w ostatnim etapie warstw na bazie chitozanu z dodatkiem nanocząstek złota, srebra i miedzi. Warto dodać, że dobór warunków trawienia chemicznego był przeprowadzony w taki sposób, aby w rezultacie ograniczyć ilość wolnego niklu na powierzchni modyfikowanego stopu ze względu na poprawę biogodności tego pierwiastka. Z kolei aktywacja powierzchni stopu w plazmie, z wykorzystaniem procesów chemicznego osadzania z fazy gazowej, miała na celu poprawę adhezji, otrzymywanych w kolejnym etapie, powłok.

Pokrycia zostały otrzymane z zastosowaniem dwóch różnych koncepcji syntezy bionanokompozytów. Pierwszą z nich było otrzymanie koloidów nanocząstek złota i srebra w środowisku chitozanu metodą redukcji chemicznej, a następnie wykorzystanie otrzymanego medium do depozycji warstw metodą immersyjną na powierzchni stopu. Druga koncepcja zakładała wykorzystanie metody hybrydowej, będącej połączeniem metod immersji oraz kondensacji z fazy gazowej w obecności gazu obojętnego. Nanokompozyty otrzymane zgodnie z założeniami drugiej koncepcji miały mieć budowę warstwową w charakterze kanapki (ang. Sandwich-Structured Composite), gdzie zewnętrzne warstwy zbudowane są z chitozanu, natomiast środkową warstwę stanowią nanocząstki złota, srebra lub miedzi. Przegląd aktualnej literatury w zakresie otrzymywania warstw nanokompozytowych, zaprezentowany w pierwszej części dysertacji, pozwolił na określenie wymagań stawianym powłokom funkcjonalnym w aplikacjach dla ortopedii, w szczególności w zakresie biogodności z tkanką kostną, wartości chropowatości powierzchni implantu wspomagającego jego osteointegrację, odporności na korozję w środowisku płynów ustrojowych organizmu oraz intencjonalne uwalnianie czynnika bioaktywnego, w tym działanie antybakteryjne. W kontekście oczekiwanych właściwości implantu zostały zestawione dwie, opisane wcześniej, koncepcje.

W niniejszej pracy przeanalizowano wybrane właściwości fizykochemiczne i użytkowe otrzymywanych serii eksperymentalnych, a uzyskane rezultaty przedyskutowano w odniesieniu do najnowszych doniesień z literatury przedmiotu. Schemat przeprowadzonych modyfikacji oraz metod ich badań został przedstawiony na Rys. 8.1.

Schemat metodyki badawczej



Rys. 8.1. Schemat ilustrujący kroki obejmujące modyfikację powierzchni stopu NiTi oraz metodykę badawczą otrzymanych modyfikacji.

8.1.1. Przygotowanie powierzchni stopu

Pręt NiTi o średnicy 12 mm został mechanicznie pocięty na próbki o wysokości 1 mm przy użyciu precyzyjnej przecinarki laboratoryjnej Accutom-2 (Struers). Deklarowany przez dostawcę (BIBUS METALS) średni skład chemiczny tego stopu (% wag.) wynosi 55.76 Ni, 44.127 Ti, 0.005 Co, 0.005 Cu, 0.005 Cr, 0.012 Fe, 0.005 Nb, 0.036 C, 0.001 H, 0.043 O oraz 0.001 N. Otrzymane dyski szlifowano i wypolerowano (do uzyskania powierzchni lustrzanej) z wykorzystaniem polerki mechanicznej i automatycznej (odpowiednio Struers LaboPol-25 i Struers TegraPol 21). Stosowano różne gradacje papierów polerskich SiC (#180, #320, #500, #800, #1000, #1200) oraz tarcze SiC MD-Allegro, z wykorzystaniem zawieszin diamentowych DiaPro Allegro 9 μm . Z kolei polerowanie prowadzono na tarczach pokrytych tkaninami polerskimi MD-Dac i MD-Nap, wykorzystując kolejno zawiesziny diamentowe DiaPro Dac 3 μm i DiaPro Nap B 1 μm (Struers). Przygotowane podłoża, celem zapobiegania utleniania się powierzchni, przechowywano w izopropanolu, a dodatkowo przed każdym procesem oczyszczano je w płuczce ultradźwiękowej przez 15 minut.

8.1.2. Obróbka chemiczna

Pierwszym zagadnieniem badawczym postawionym w pracy doktorskiej było eksperymentalne sprawdzenie wpływu modyfikacji wstępnej nitinolu, prowadzonej w różnych środowiskach kwasowych, na skład chemiczny i fazowy, topografię, energię powierzchniową oraz zwilżalność powierzchni stopu. W ramach prowadzonych eksperymentów wykonano serie modyfikacji bez wykorzystania kwasu fluorowego. Na podstawie przeglądu literaturowego, w tym prac [81,91–97,102,281–286] dokonano krytycznej analizy składu mieszanin stosowanych w procesach trawienia stopów na osnowie tytanu oraz stopu NiTi, i na tej podstawie wybrano cztery mieszaniny, które stanowiły przedmiot badań w niniejszej rozprawie. Przyjęto, że proces trawienia będzie realizowany w temperaturze 70°C, dla trzech różnych czasów kontaktu (15, 30 oraz 60 minut), oraz w środowiskach, których skład oraz stężenia przedstawiono w Tabeli 8.1.

Tabela 8.1. Stężenia składników wykorzystanych do trawienia powierzchni nitinolu, z podaniem nazw serii dla poszczególnych mieszanin

Nazwa serii	Rodzaj odczynnika				
	NH ₃	H ₂ O ₂	H ₂ SO ₄	HCl	HNO ₃
	Stężenie końcowe [% at.]				
CE_1	2.3	13.6	-	-	-
CE_2	-	9.0	66.5	-	-
CE_3	-	-	-	2.5	14.0
CE_4	10.3	5.3	-	-	-

8.1.3. Obróbka w warunkach plazmy

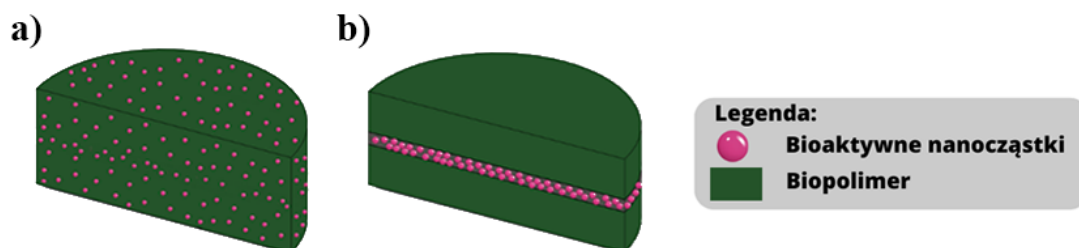
Trzecim etapem proponowanej technologii był proces aktywacji powierzchni nitinolu w plazmie, który realizowano w komorze RF CVD (Elettrovava S.p.A., Turyn, Włochy). Funkcjonalizacja powierzchni odbywała się w temperaturze pokojowej, po uprzednim odpompowaniu komory do próżni (aż do uzyskania wartości ciśnienia w komorze reaktora ok. $4 \cdot 10^{-6}$ Tr). Następnie proces prowadzono w mieszaninie amoniaku, tlenu i argonu, o zadanych przepływach kolejno 50 sccm, 45 sccm i 5 sccm, przy stałej wartości ciśnienia roboczego w komorze reakcyjnej 0.40 Tr. Czas trwania obróbki w plazmie ustalono na 60 minut, a gęstość plazmy wzbudzanej falami o częstotliwości RF (13,56 MHz) wynosiła 0.60 W/cm^2 . Warunki te zostały ustalone na podstawie wcześniejszych prac [145,287] naszego zespołu badawczego, które dotyczyły funkcjonalizacji powierzchni stopu Ti6Al7Nb. Po zakończonej obróbce w reaktorze RF, z uwagi na ograniczony czas utrzymania stanu aktywnej powierzchni stopu, podłoża były niezwłocznie poddawane kolejnemu etapowi funkcjonalizacji (otrzymaniu powłok bioaktywnych).

8.1.4. Depozycja powłok bioaktywnych

Metodyka otrzymania powłok bioaktywnych na bazie chitozanu oraz nanocząstek wybranych metali (AuNPs, AgNPs lub CuNPs) obejmowała zastosowanie dwóch różnych technik syntezy. Celem prac eksperymentalnych było bowiem między innymi porównanie właściwości fizykochemicznych, korozyjnych oraz biologicznych wspomnianych powłok, w zależności od wykorzystanej techniki ich depozycji.

Pierwsza z metod obejmowała otrzymanie koloidów nanocząstek złota oraz srebra w środowisku chitozanu metodą redukcji, a następnie depozycję koloidu na powierzchni, uprzednio modyfikowanego stopu, metodą immersji. W dalszej części pracy powłoki

otrzymane tą metodą nazwano jako warstwy na bazie koloidu, a schematyczny widok przekroju poprzecznego (przez warstwę, prostopadle do powierzchni podłoża) zilustrowano na Rys. 8.2.a.



Rys. 8.2. Schemat ilustrujący zaproponowane koncepcje otrzymywania warstw na bazie biopolimeru i nanocząstek metali szlachetnych.

Drugie zaproponowane podejście do otrzymania wspomnianych struktur miało charakter hybrydowy, i łączyło metodę immersyjną otrzymywania warstw chitozanu oraz metodę *Inert Gas Condensation (IGC)*, która pozwoliła na syntezę nanocząstek. Podejście to określano dalej w pracy hybrydowym, i polegało na depozycji warstwy chitozanu na powierzchni nitinolu, następnie naniesieniu warstwy nanocząstek wybranych metali techniką IGC, i ponowną depozycję warstwy chitozanu, w efekcie otrzymując nanokompozyt o budowie kanapkowej, którego schemat zaprezentowano na Rys. 8.2.b. Szczegółowy opis poszczególnych etapów modyfikacji, charakterystycznych dla prezentowanych podejść, zaprezentowane w kolejnych podrozdziałach (8.1.4.1 – 8.1.4.2).

8.1.4.1. Przygotowanie koloidów i synteza warstw na bazie koloidów

Do przygotowania koloidów na bazie chitozanu oraz nanocząstek złota lub srebra wykorzystano chitozan o średniej masie cząsteczkowej (M_w) 1278 ± 9 kDa (CSM Sigma-Aldrich). Jako reduktora użyto kwasu askorbinowego (Sigma-Aldrich), natomiast w roli prekursorów metali wykorzystano azotan(V) srebra (Sigma-Aldrich) i kwas tetrachlorozłotowy(III) (Sigma-Aldrich). Wszystkie reakcje prowadzono w środowisku 1% (w/v) roztworu chitozanu rozpuszczonego w 1% (v/v) kwasie octowym. Celem sprawdzenia jakości przeprowadzonych syntez koloidy były analizowane z wykorzystaniem spektrometru UV-VIS Shimadzu UV-1900 (Shimadzu Corp., Duisburg, Niemcy) oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tecnai TF 20 X-TWIN (FEI Company, Hillsboro, USA).

8.1.4.1.1. Koloid chitozanu z nanocząstkami złota

W celu przygotowania koloidu chitozanu z nanocząstkami złota (CS@AuNPs) na łaźni olejowej podgrzano (do temperatury 60°C) 50 ml 1% (w/v) roztworu chitozanu oraz osobno 20 ml 5 mM H₂AuCl₄. Po osiągnięciu zadanej temperatury dodano roztwór kwasu tetrachlorozłotowego do roztworu chitozanu i pozostawiono w temperaturze 60°C na mieszadle magnetycznym na 4h [228,229]. Syntezę prowadzono w warunkach ograniczających przepuszczanie promieniowania UV, podobną procedurę zastosowano podczas przechowywania koloidu do momentu syntezy pokryć.

8.1.4.1.2. Koloid chitozanu z nanocząstkami srebra

W celu przygotowania koloidu chitozanu z nanocząstkami srebra (CS@AgNPs) na łaźni olejowej podgrzano (do temperatury 95°C), 50 ml 1% (w/v) roztworu chitozanu z dodatkiem 10 ml 1mM kwasu askorbinowego. Po osiągnięciu zadanej temperatury dozowano zakraplaczem 20 ml 52mM azotanu(V) srebra i pozostawiono w temperaturze 95°C na mieszadle magnetycznym na 14h [229,288]. Podobnie jak w przypadku syntezy koloidu CS@AuNPs, mieszanina reakcyjna pozostawała w warunkach ograniczających dostęp promieniowania UV.

8.1.4.1.3. Otrzymanie warstw na bazie koloidów

Powłoki biopolimerowe otrzymano poprzez zanurzenie (immersję) podłoży NiTi, po wcześniejszej obróbce w plazmie, przez 60 minut w przygotowanych wcześniej koloidach: i) chitozanu z nanocząstkami srebra (AgNPs) wzbogaconym witaminą C oraz ii) chitozanu z nanocząsteczkami złota (AuNPs). Uzyskanie jednorodnych warstw wspomagano wytrząsarką kołyskową (IKA® - Werke GmbH, Staufen, Niemcy) o zadanym parametrze pracy 10 cykli/min. Po procesie depozycji zmodyfikowane powierzchnie stopu przemyto trzykrotnie, najpierw w 4% NaOH, a następnie w wodzie destylowanej. Tak przygotowane próbki pozostawiono do odparowania pozostałości rozpuszczalnika w warunkach pokojowych, po czym umieszczono je w warunkach próżni ze względu na niekorzystny wpływ tlenu oraz wilgoci znajdujący się w powietrzu. Podobnie jak w przypadku poprzednich serii eksperymentalnych, po procesie syntezy próbki zabezpieczono przed działaniem promieni UV poprzez użycie folii aluminiowej.

8.1.4.2. Otrzymywanie nanokompozytów warstwowych metodą hybrydową

Do przygotowania nanokompozytów warstwowych o charakterystycznej budowie kanapkowej wykorzystano dwie techniki. Pierwszą z nich stanowiła metoda immersyjna otrzymywania warstw chitozanu, do której wykorzystano CS o średniej masie cząsteczkowej (CSM, $M_w = 1278 \pm 9$ kDa, Sigma-Aldrich), przygotowany w formie 1% (w/v) roztworu chitozanu rozpuszczonego w 1% (v/v) kwasie octowym. Druga technika obejmowała depozycję nanocząstek techniką Inert Gas Condensation w aparaturze próżniowej Mantis (ACMiN, AGH). Nanocząstki złota, srebra i miedzi były otrzymywane na drodze procesów fizycznego osadzania z fazy gazowej, z wykorzystaniem targetów dostarczonych przez firmę Kurt J. Lesker Company (Wielka Brytania), o czystości Au 99.99%, Ag 99.99% oraz Cu 99.999%. Celem uzyskania struktur nanometrycznych o możliwie jak największej ilości i pożądanym rozmiarze wielkości cząstek, przeprowadzono kalibrację procesów prowadzących do syntezy nanocząstek, do czego wykorzystano kwadрупolowy spektrometr masowy, współpracujący ze wspomnianym systemem Mantis. W toku tych prac skupiono się na określeniu wartości nastaw dla kontroli trzech parametrów technologicznych, w tym wartości prądu zasilającego magnetron, udziału He w mieszaninie reakcyjnej oraz odległości działa od strefy kondensacji. Wyniki kalibracji przedstawiono w poniższych rozdziałach.

8.1.4.2.1. Otrzymywanie warstw chitozanu

Powłoki biopolimerowe otrzymano z wykorzystaniem analogicznej procedury jak w przypadku koloidów (p. Rozdział 8.4.1.3.). W tym celu wykorzystano również wytrząsarkę kołyskową (IKA® - Werke GmbH, Staufen, Niemcy), z nastawem 10 cykli/min, a warstwy uzyskano z użyciem 1% (w/v) roztworu chitozanu rozpuszczonego w 1% (v/v) kwasie octowym. Warstwy, zarówno dla pierwszej, jak i drugiej (zewnętrznej) depozycji neutralizowano w 4% NaOH i wodzie destylowanej, a następnie suszono w warunkach pokojowych. W celu określenia wymaganej grubości warstwy wykonano serię kalibracyjną, w której na ówczśnie przygotowane powierzchnie naniesiono warstwy chitozanu w różnym czasie prowadzenia procesu (15, 30, 60 i 90 minut). Grubość otrzymanych warstw oraz ich parametry chropowatości (R_a i R_q) określono na podstawie pomiarów profilu powierzchni (z użyciem profilometru igłowego), kolejno schodka uzyskanego poprzez usunięcie po procesie depozycji ówczśnie naklejonej taśmy kaptonowej na części podłoża oraz powierzchni warstw. Uzyskane wyniki serii kalibracyjnych zestawiono w Tabeli 8.2.

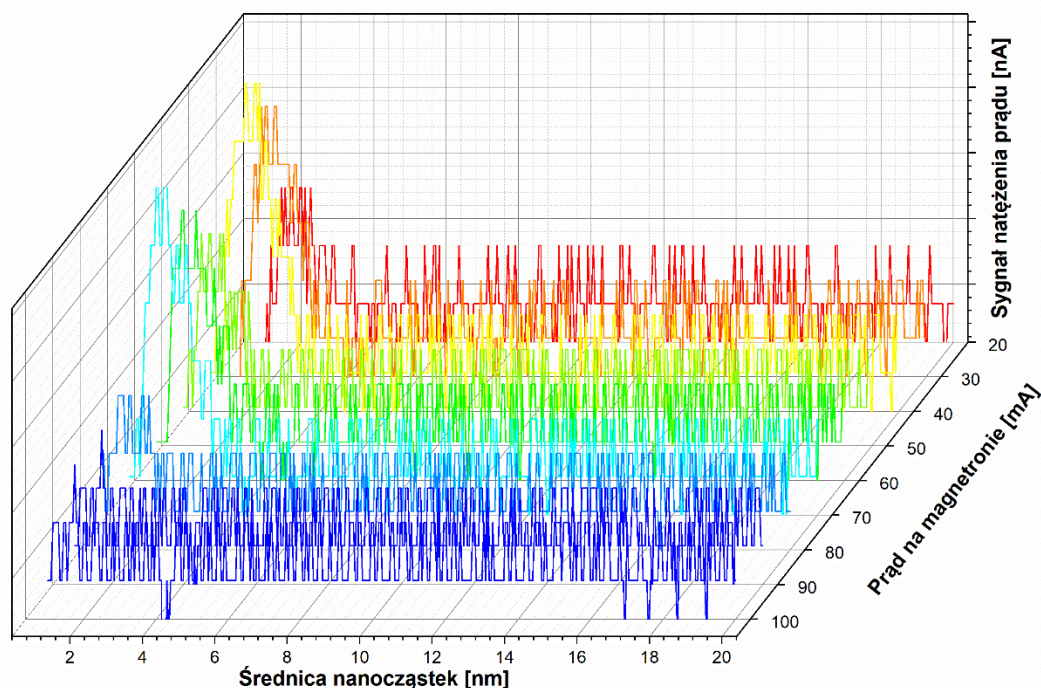
Tabela 8.2. Grubość warstw chitozanu oraz parametry chropowatości warstw otrzymanych w różnym czasie procesu depozycji

Czas depozycji [min]	Grubość warstwy [μm]	R _a [nm]	R _q [nm]
15	1.71±0.16	36.9±14.9	48.9±22.6
30	1.94±0.18	74.9±19.9	95.6±24.1
60	2.18±0.15	98.3±26.8	124.1±30.98
90	3.82±0.14	140.2±31.7	169.5±34.3

Zmiana grubości warstw w czasie depozycji 15-60 minut ma charakter liniowy, wraz z wydłużeniem czasu otrzymuje się proporcjonalnie grubsze pokrycia. Natomiast znaczny, nieproporcjonalny do czasu przyrost grubości warstwy chitozanu (do wartości ok. 3.8 μm) zaobserwowano dla 90-minutowego czasu syntezy. Jednakże taki mechanizm wzrostu warstwy jest tożsamy z opisywanym w literaturze wzrostem warstw chitozanowych metodami fizycznymi np. spin- i dip-coatingu [289], jak również metodami elektrochemicznymi [290]. Jednocześnie wraz ze wzrostem grubości warstw chitozanu zmieniają się, również rosnąco, ich parametry chropowatości (R_a i R_q), co również znajduje potwierdzenie m. in. w pracy Gassman, *et al.* [291], Autorzy otrzymując warstwy chitozanu metodą spin-coatingu obserwowali wzrost chropowatości odpowiadający wzrostowi grubości warstw. Jest to związane z przyrostem samoorganizującej się struktury chitozanu, który wraz z coraz to dłuższym czasem otrzymywania coraz gorzej odwzorowuje geometrię podłoża, w wyniku czego obserwuje się bardziej zróżnicowany profil powierzchni [292].

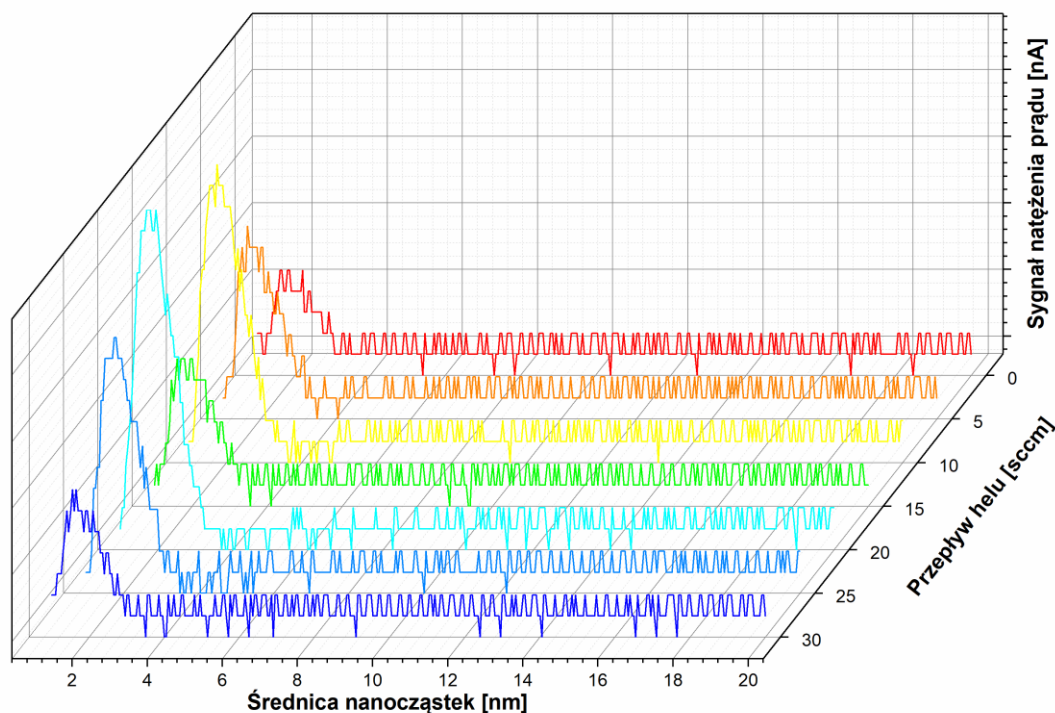
8.1.4.2.2. Otrzymywanie nanocząstek złota techniką IGC

Jak wcześniej wspomniano, kalibracja procesu tworzenia nanocząstek złota została przeprowadzona na podstawie wyników otrzymanych ze spektrometru masowego, umieszczonego *in situ*, za strefą agregacji w aparaturze Mantis, której budowa i działanie opisano w Rozdziale 4.2.2. (Rys. 4.2.). Pierwszym etapem tych prac był dobór odpowiednich wartości prądu zasilającego magnetron z targetem Au, parametr ten zmieniano w zakresie od 20 do 100 mA, z interwałem 10 mA. W tym przypadku procesy prowadzono przy stałej wartości przepływu argonu (100 sccm) jak i wartości ciśnienia w komorze reakcyjnej ($5 \cdot 10^{-4}$ Tr), położenie działa znajdowało się w podstawowym położeniu, określonym jako 0 mm. Wyniki kalibracji zaprezentowano na Rysunku 8.3.



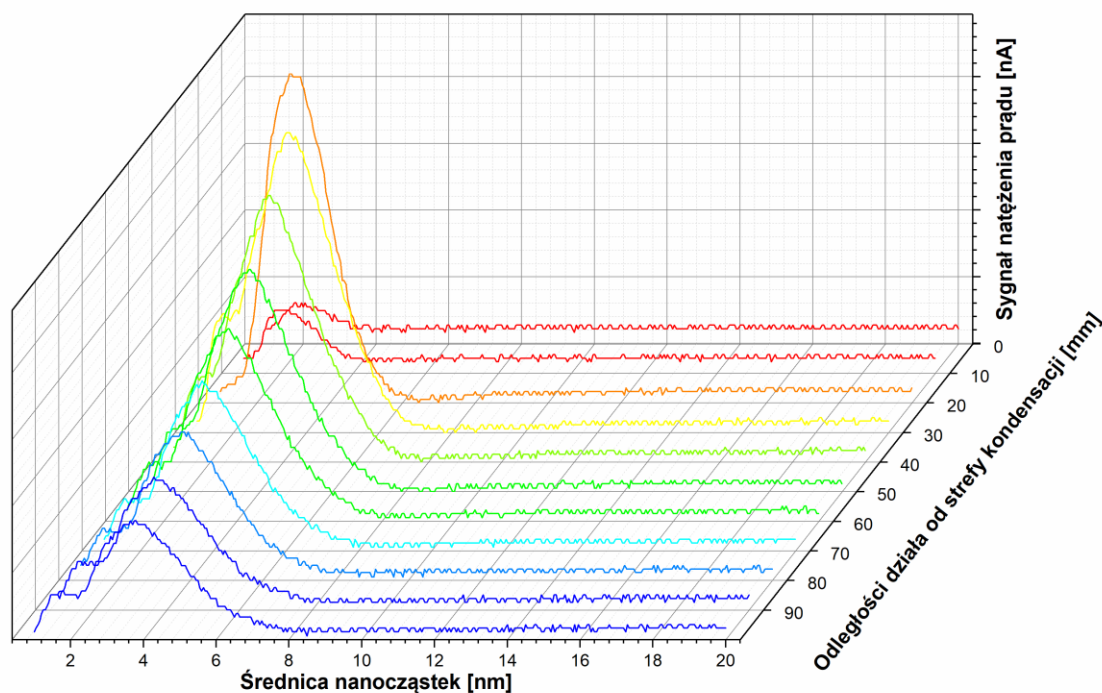
Rys. 8.3. Widma masowe rozkładu wielkości nanocząstek złota w zależności od zastosowanego natężenia prądu podawanego na magnetron.

Zarejestrowane widma cechują się znacznym podniesieniem tła analizowanego sygnału, jednak w przedziale od 1 do 4 nm można zaobserwować charakterystyczne piki, które świadczą o powstawaniu nanocząstek. Najbardziej intensywną linię widmową obserwuje się dla 40 mA (kolor żółty) oraz 70 mA (kolor jasno niebieski), podczas gdy dla większych wartości prądu (80, 100 mA) intensywność sygnałów zaczyna zanikać. W oparciu o zarejestrowaną podwyższoną wartość intensywności, przyjęto za korzystne ustalenie wartości prądu zasilającego magnetron na 70 mA, co jednocześnie stanowiło stałą wartość parametru dla kalibracji kolejnego parametru technologicznego - przepływu helu. Rezultaty tych pomiarów, dla zmiany wartości przepływu He w zakresie od 0 do 30 sccm, zilustrowano na Rys. 8.4.



Rys. 8.4. Widma masowe rozkładu wielkości nanocząstek złota w zależności od przepływu helu w komorze reakcyjnej.

Dodatek do komory reakcyjnej gazu nośnego o niższej masie atomowej (4,003 u) niż główny gaz procesowy (argon, 39,948 u) pozwala na poprawę warunków transportu atomów metali do strefy agregacji nanocząstek, co wpływa również na ilość wytwarzanych struktur o rozmiarach nanometrycznych, i jednocześnie sprzyja ograniczeniu nadmiernego rozrzutu ich wielkości [182]. Rejestrowane widma potwierdzają otrzymanie nanocząstek o średnicy od ok. 1 nm do 3 nm, a ich największy udział przypada na warunki prowadzonego procesu dla przepływu He 10 sccm oraz 25 sccm. Do kolejnych procesów kalibracji przyjęto wartość przepływu helu 10 sccm, dla którego wartość ciśnienia w komorze procesowej wynosiła $5.00 \cdot 10^{-4}$ Tr. Dla tak określonych parametrów procesu wykonano kolejne eksperymenty, zmieniając odległość działa magnetronowego od strefy kondensacji chłodzonej ciekłym argonem w zakresie od 0 mm (położenie podstawowe) do 100 mm, co zaprezentowano na Rys. 8.5.



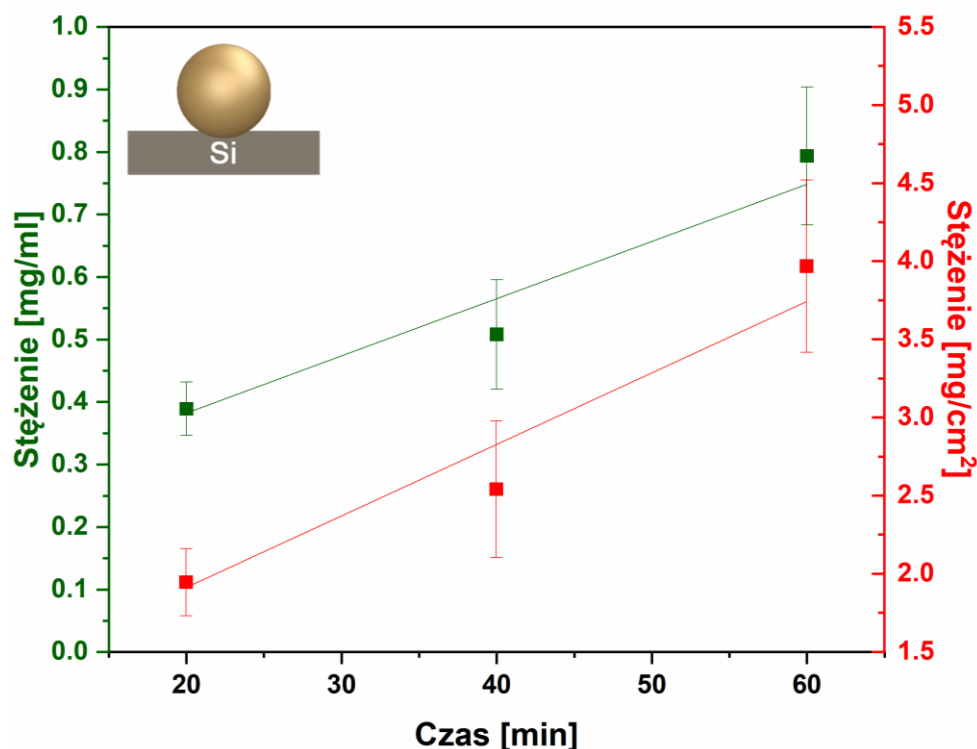
Rys. 8.5. Widma masowe rozkładu wielkości nanocząstek złota w zależności od odległości działa od strefy kondensacji.

Zmiana parametru wspomnianej odległości działa jest istotna z punktu widzenia mechanizmu transportu atomów do strefy ich kondensacji, które pod wpływem zmiany temperatury (ochłodzenia) agregują w nanocząstki. Wydłużenie drogi oraz czasu do momentu agregacji powoduje zwiększenie ich rozmiarów, co jest widoczne na prezentowanych widmach. Zakres średnicy nanocząstek zmienia się, wraz ze zwiększaniem się wspomnianej odległości przesuwa się w stronę większych rozmiarów, dla odległości 10 mm (linia czerwona), zakres ten to 1-4 nm, natomiast dla odległości 100 mm (linia ciemno-niebieska) obejmuje wartości od 2 do 7 nm. Na podstawie zebranych danych pomiarowych i ich analizy przyjęto do dalszych prac eksperymentalnych wartość odległości działa magnetronowego od strefy kondensacji równą 20 mm, co wynikało z zarejestrowanej dla tej wartości najbardziej intensywniej linii widmowej, która odpowiada za liczebność wytworzonych nanocząstek. Podsumowując tę część prac, w Tabeli 8.3. zebrano wartości poszczególnych parametrów technologicznych, które wykorzystano w kolejnych etapach syntezy nanocząstek Au.

Tabela 8.3. Zestawienie parametrów technologicznych dla procesu otrzymywania nanocząstek złota w procesie IGC, dane eksperymentalne uzyskane na drodze kalibracji systemu

Przepływ gazów [sccm]		Ciśnienie [Tr]	Parametry prądowe dla działa magnetronowego			Odległość działa od strefy agregacji [mm]
Ar	He	5.00·10 ⁻⁴	Natężenie [mA]	Napięcie [V]	Moc [W]	20
100	10		70	304.5±4.6	21.45±0.30	

Powyższe warunki otrzymywania nanocząstek złota techniką IGC pozwoliły na przeprowadzenie kolejnych procesów mających na celu określenie wartości stężenia otrzymywanych nanocząstek. Eksperymenty te prowadzono w czasie 20, 40 i 60 minut w celu ustalenia zależności uzyskanego stężenia od czasu depozycji nanocząstek. Nanocząstki otrzymane na podłożach krzemowych (10 x 10 mm), w ilości trzech powtórzeń dla każdego czasu otrzymywania, zostały następnie poddane procedurze trawienia, w celu przeprowadzenia nanocząstek do roztworu. Procedura trawienia obejmowała: zanurzenie podłoża z nanocząstkami w 2 ml 65% HNO₃ na okres trzech dni, następnie podgrzanie roztworu z podłożami do temperatury 60°C w łaźni wodnej i trawienie w tych warunkach przez 1 godzinę; finalnie usunięto podłoże krzemowe, a uzyskany roztwór rozcieńczono do objętości 5 ml. Na Rys. 8.6. przedstawiono średnie wartości stężeń, które określono na podstawie pomiarów z wykorzystaniem spektrometru masowego.

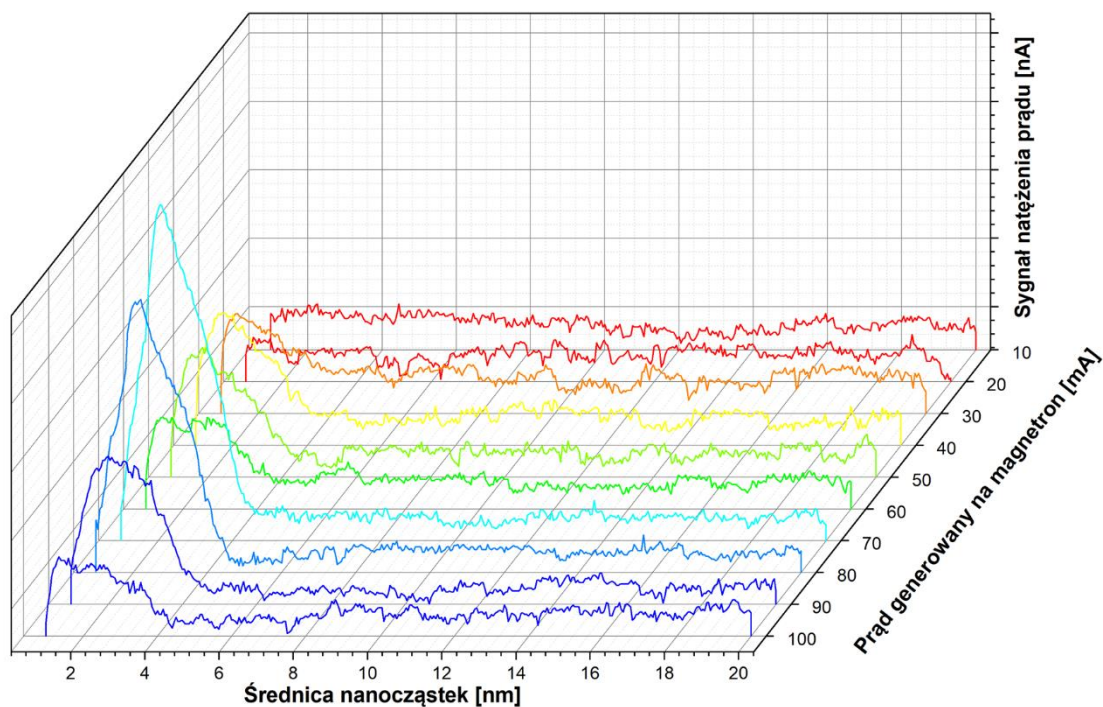


Rys. 8.6. Zależność stężenia nanocząstek złota otrzymanych w procesie IGC na podłożu krzemowych od czasu trwania syntezy.

Wzrost stężenia nanocząstek złota otrzymanych w procesie kondensacji w gazie obojętnym w funkcji czasu wykazuje zmiany o charakterze bliskim liniowemu, a współczynnik determinacji R^2 regresji liniowej wyniósł 0.94906. W dalszej części pracy stosowano godzinne procesy syntezy Ag NPs, o których stężenie w objętości roztworu wynosiło 0.79 ± 0.11 mg/ml. Badania stężenia tych struktur na powierzchni modyfikowanego podłoża wynosiło 3.97 ± 0.55 mg/cm².

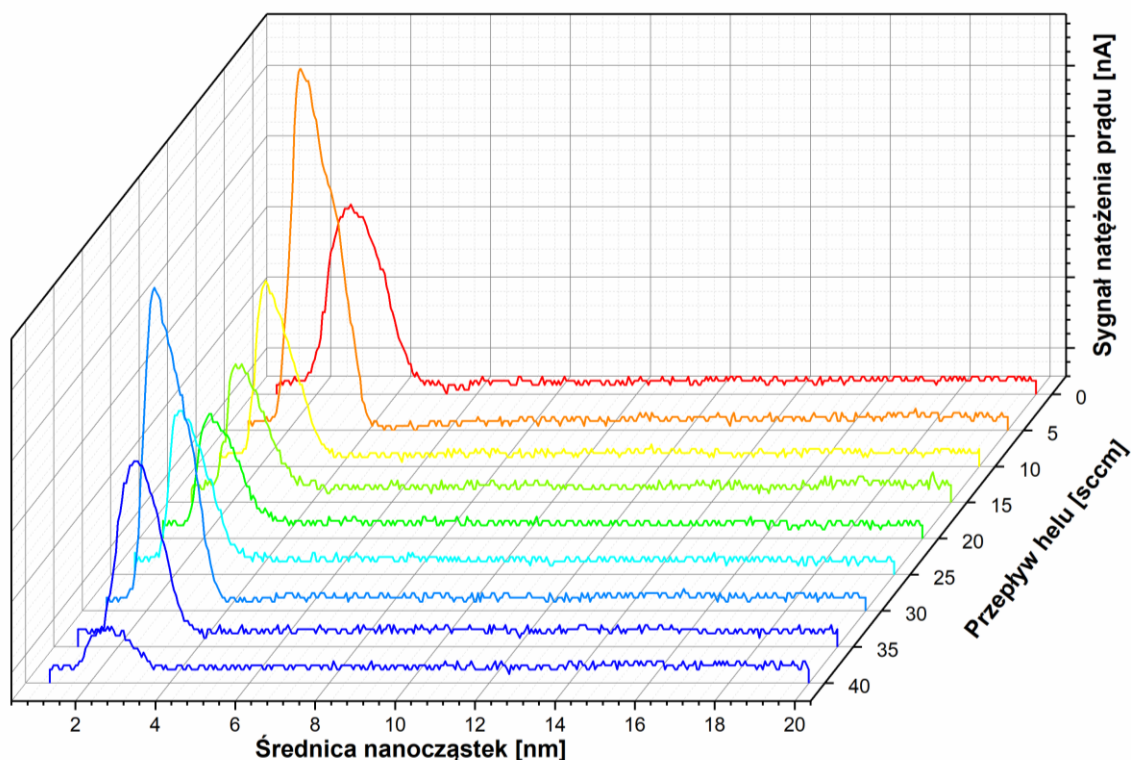
8.1.4.2.3. Otrzymywanie nanocząstek srebra techniką IGC

Dobór odpowiednich warunków otrzymywania nanocząstek srebra został przeprowadzony zgodnie z przyjętą metodyką jak w przypadku syntezy nanocząstek złota. W pierwszym etapie dobrano parametry prądowe z zakresu 20-100 mA, które zmieniano w interwale 10 mA. W tym przypadku również parametry te zostały wyznaczone dla przepływu Ar 100 sccm i wartości ciśnienia w komorze reakcyjnej $5.00 \cdot 10^{-4}$ Tr oraz odległości działa od strefy kondensacji 0 mm. Na Rys. 8.7. zilustrowano wpływ zmian wartości prądu zasilającego magnetron na rozkład wielkości otrzymywanych nanocząstek.



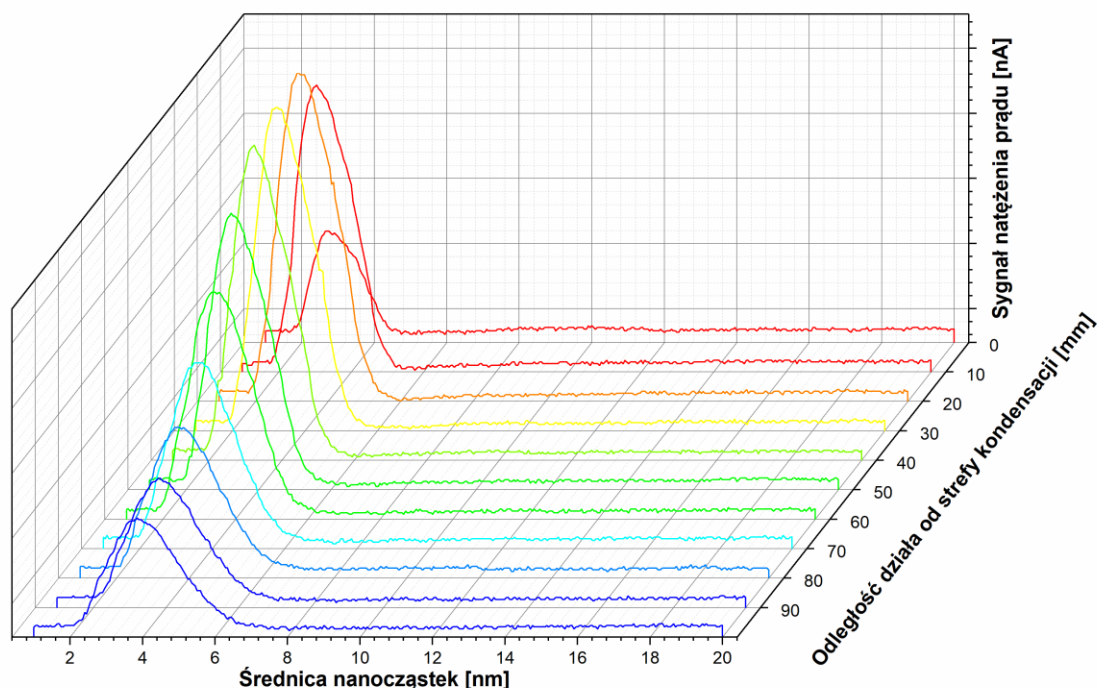
Rys. 8.7. Widma masowe rozkładu wielkości nanocząstek srebra w zależności od zastosowanego natężenia prądu podawanego na magnetron.

Wybrane widma masowe, dla wartości nastaw natężenia prądu z zakresu 40÷100 mA, potwierdzają tworzenie się nanocząstek o rozmiarach w zakresie od 1 nm do 4 nm. Najbardziej intensywna linia widmowa w tym zakresie rejestrowana jest dla 70 mA (kolor seledynowy), podczas gdy dla mniejszych i większych wartości natężenia prądu linie widmowe cechują się już niższą intensywnością. W następnej kolejności zwrócono uwagę na dodatku helu, którego przepływ analizowano w zakresie 0 – 40 sccm, a uzyskane wyniki zilustrowano na Rys. 8.8.



Rys. 8.8. Widma masowe rozkładu wielkości nanocząstek srebra w zależności od przepływu helu w komorze reakcyjnej.

Podobnie jak w przypadku nanocząstek Au, rozkład wielkości nanocząstek srebra wraz ze zwiększaniem wartości przepływu helu zmniejsza się. Mianowicie rejestruje się wielkości nanocząstek od ok. 1.6 nm do 4.6 nm (dla 0 sccm przepływu He) i ok. 1.6 – 3.6 nm (dla 40 sccm). Widma wskazują również na uprzywilejowane wartości przepływu helu, które wpływają na ilość w nanocząstek, największą ich ilość obserwuje się dla przepływu 5 sccm. Podobnie, jak w przypadku kalibracji procesu dla nanocząstek złota, ostatnim etapem było określenie odległości działła magnetronowego od strefy kondensacji, wyniki te zestawiono na Rys. 8.9.



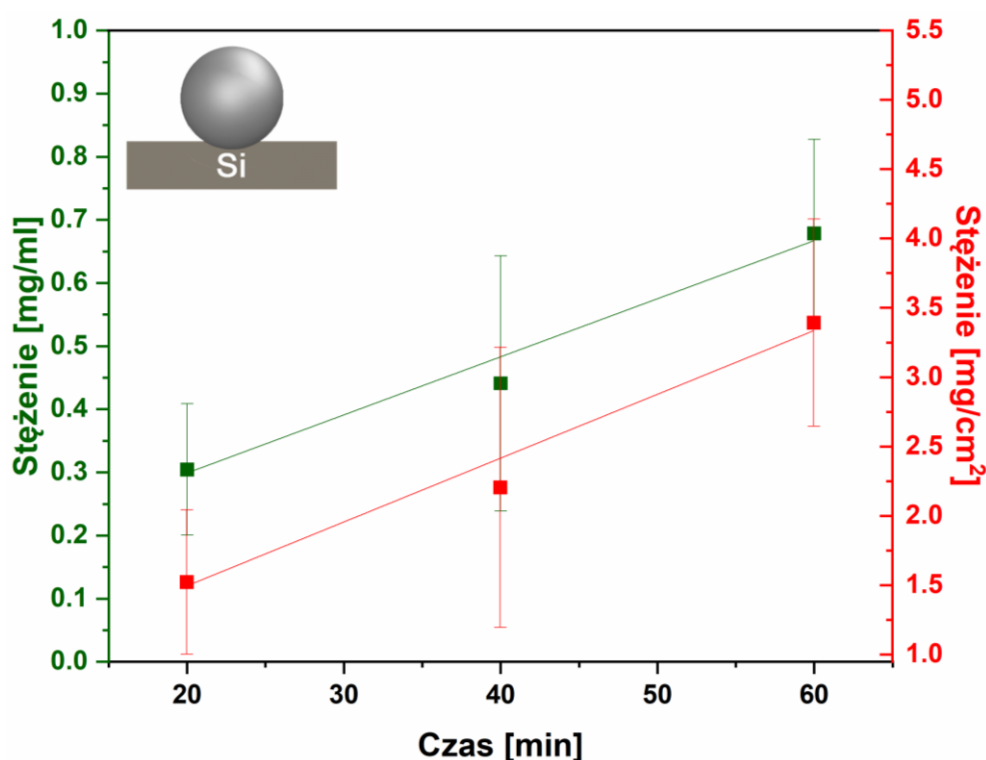
Rys. 8.9. Widma masowe rozkładu wielkości nanocząstek srebra w zależności od odległości działa od strefy kondensacji.

Wyraźny wzrost intensywności linii widmowej (reprezentującej ilość syntezowanych nanocząstek) widać już po odsunięciu działa na odległość 10 mm (linia czerwona), które to maksimum intensywności utrzymuje się dla położenia 30 mm (linia żółta), następnie intensywność linii widmowych w zakresie wielkości cząstek od 40 do 100 mm zmniejsza się, przy jednoczesnym zwiększeniu rozrzutu ich rozmiarów. Zmiana wartości średnicy otrzymywanych nanocząstek następuje w zakresie od 1.7 – 4.4 nm dla pozycji działa 0 mm do 1.9 – 6.5 nm dla maksymalnego wydłużenia wspomnianej odległości (100 mm). Na podstawie przeprowadzonych prac eksperymentalnych przyjęto za utrzymanie w kolejnych eksperymentach odległości działa od strefy agregacji na poziomie 30 mm, co wraz z wartościami innych nastaw dla procesu otrzymywania AgNPs zestawiono w Tabeli 8.4.

Tabela 8.4. Zestawienie parametrów technologicznych dla procesu otrzymywania nanocząstek srebra w procesie IGC, dane eksperymentalne uzyskane na drodze kalibracji systemu

Przepływ gazów [sccm]		Ciśnienie [Tr]	Parametry prądowe dla działa magnetronowego			Odległość działa od strefy agregacji [mm]
Ar	He		Natężenie [mA]	Napięcie [V]	Moc [W]	
100	5	$5.00 \cdot 10^{-4}$	70	283.9 ± 5.3	20.08 ± 0.37	30

Powyższe warunki otrzymywania nanocząstek srebra techniką IGC pozwoliły na przeprowadzenie kolejnych procesów kalibracyjnych mających na celu określenie stężenia otrzymywanych nanocząstek w trakcie procesu wytwarzania. Eksperymenty te prowadzono w czasie 20, 40 i 60 minut w celu ustalenia zależności uzyskanego stężenia od czasu depozycji nanocząstek. Nanocząstki otrzymane na podłożach krzemowych (10 x 10 mm), w ilości trzech powtórzeń dla każdego czasu otrzymywania, zostały następnie poddane procedurze trawienia, w celu przeprowadzenia nanocząstek do roztworu. Procedura trawienia obejmowała: zanurzenie podłoża z nanocząstkami w 2 ml 65% HNO_3 na okres trzech dni, następnie podgrzanie roztworu z podłożami do temperatury 60°C w łaźni wodnej i trawienie w tych warunkach przez 1 godzinę; finalnie usunięto podłoże krzemowe, a uzyskany roztwór rozcieńczono do objętości 5 ml. Na Rys. 8.10. przedstawiono średnie wartości stężeń, które określono z wykorzystaniem spektrometru masowego.



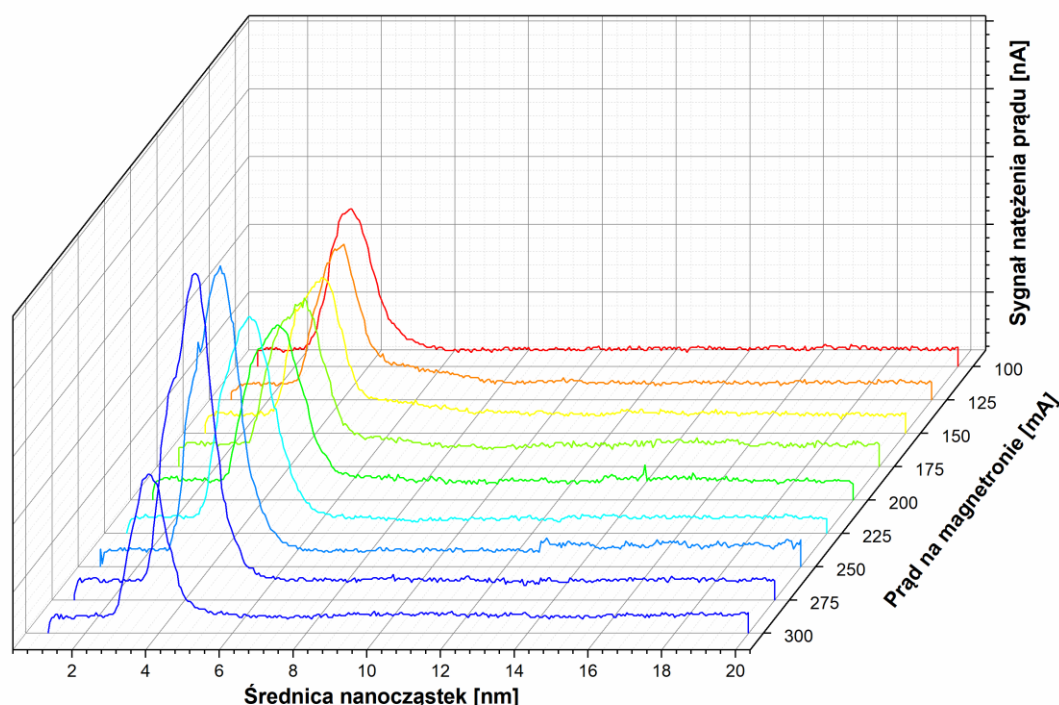
Rys. 8.10. Zależność stężenia nanocząstek srebra otrzymanych w procesie IGC na podłożu krzemowym od czasu trwania syntezy.

Obserwowany wzrost stężenia nanocząstek srebra w funkcji czasu ma charakter zbliżony do liniowego, charakteryzujący się współczynnikiem determinacji R^2 regresji liniowej o wartości 0.9877. Warto jednak zwrócić uwagę na wartości odchylenia standardowego

pomiarów stężenia, które mogą wynikać z umiejscowienia podłoża na stoliku podczas procesu. W celu uzyskania możliwie największej jednorodności pokrycia podłoża nanocząstkami stolik obraca się w trakcie procesu, jednakże zaobserwowano, że centralne umieszczenie próbki na stoliku prowadzi do uzyskania najwyższych stężeń nanocząstek. W dalszej części pracy aspekt ułożenia podłoża był szczegółowo przestrzegany w celu uzyskania jednorodnego pokrycia powierzchni nanocząstkami. Wykorzystane w dalszej części pracy godzinne procesy depozycji cechują się wartościami stężeń nanocząstek Au w roztworze ok. 0.68 ± 0.15 mg/ml, natomiast na powierzchni podłoża (po syntezie) ok. 3.39 ± 0.75 mg/cm².

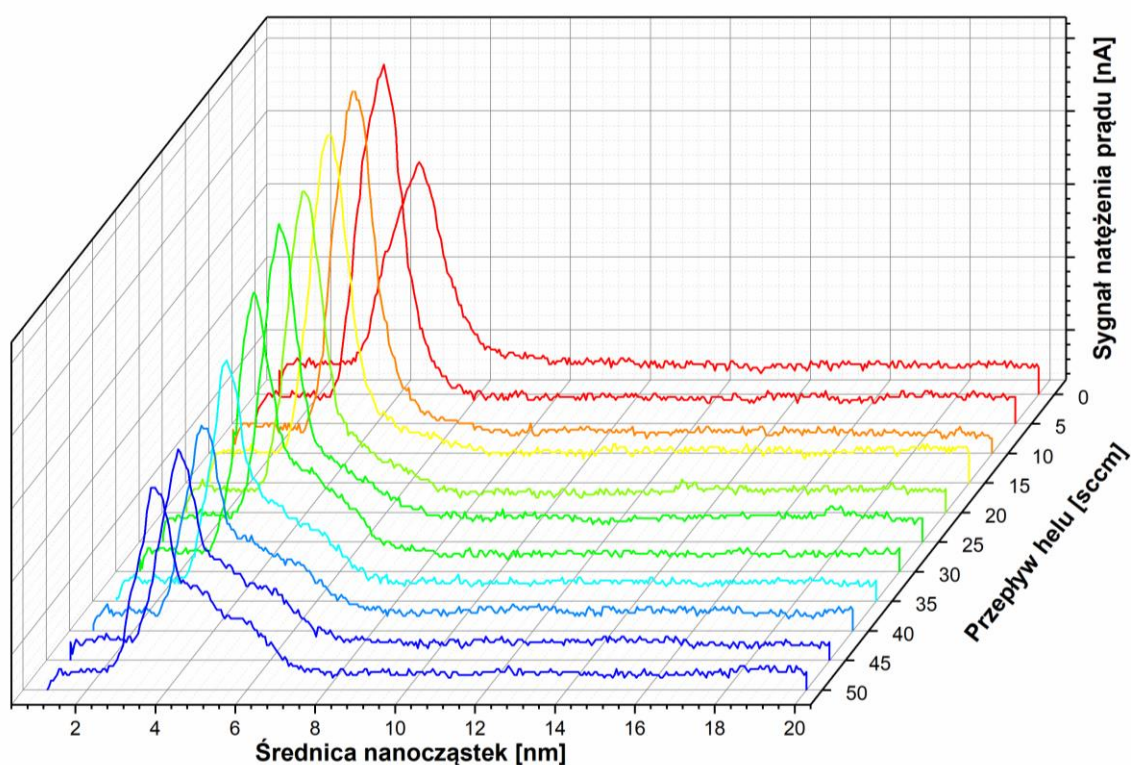
8.1.4.2.4. Otrzymywanie nanocząstek miedzi techniką IGC

W przypadku syntezy nanocząstek miedzi dobór warunków prądowych dla zasilania magnetronu z targetem Cu, z uwagi na brak depozycji struktur dla niższych wartości tego parametru, była optymalizowana w zakresie od 100 do 300 mA. Wartości pozostałych parametrów bazowych (w tym przepływu Ar i He) przyjęto na poziomie wartości jak w przypadku syntezy wcześniejszych nanocząstek. Rezultaty tych prac eksperymentalnych zestawiono na Rys. 8.11.



Rys. 8.11. Widma masowe rozkładu wielkości nanocząstek miedzi w zależności od zastosowanego natężenia prądu podawanego na magnetron.

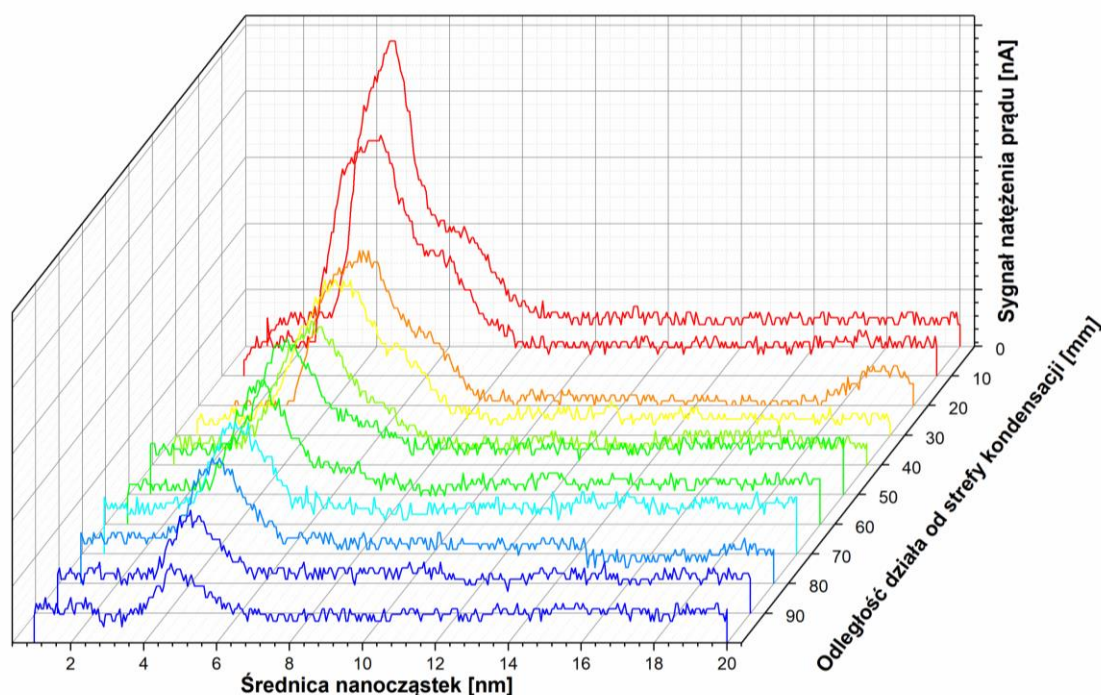
Zmiana wartości natężenia prądu w przypadku kalibracji systemu dla otrzymywania nanocząstek miedzi w pierwszym zakresie (od 100 mA - linia czerwona do 200 mA - linia ciemno zielona) nie wpłynęła znacząco na udział syntezowanych struktur, obserwowano jedynie nieznaczne zmiany rozrzutu ich rozmiarów w stronę większych wartości. Natomiast dla kolejnych zmian wartości tego parametru, w zakresie 225-275 mA, udział otrzymywanych struktur nanometrycznych zwiększa się, osiągając maksimum dla wartości 275 mA (linia ciemno-niebieska), jednocześnie wykazując mniejszy rozrzut wielkości nanocząstek. Mimo relatywnie ich dużej ilości dla wyższych wartości natężenia prądu (250-275 mA), do dalszych prac eksperymentalnych wybrano wartość 100 mA, co wynikało z nadmiernego zużycia targetu miedzi w warunkach wyższych wartości zmian tego parametru. Kolejnym etapem doboru nastaw poszczególnych parametrów technologicznych dla syntezy CuNPs było określenie wartości przepływu He. Zmianę tę obejmowały zakres od 0 do 50 sccm, a uzyskane rezultaty badań zobrazowano na Rys. 8.12.



Rys. 8.12. Widma masowe rozkładu wielkości nanocząstek miedzi w zależności od przepływu helu w komorze reakcyjnej.

Uzyskane wyniki wskazują, że zmiana wartości przepływu helu powoduje istotnie zmiany w ilości wytwarzanych struktur. W odróżnieniu do procesów otrzymywania nanocząstek złota

i srebra, nawet niewielki udział przepływu He (5 sccm) powoduje osiągnięcie maksymalnego udziału nanocząstek miedzi. Zwiększenie wartości przepływu wspomnianego gazu roboczego prowadzi do zmniejszenia udziału syntezowanych struktur oraz zwiększenia rozrzutu ich średnicy. Wobec zarejestrowanych widm, do dalszej procedury technologicznej otrzymywania CuNPs przyjęto wartość przepływu He 5 sccm. Z uwzględnieniem powyższych wartości parametrów technologicznych procesu IGC, zweryfikowany został również wpływ odległości magnetronu od strefy kondensacji nanocząstek, a zarejestrowane widma zestawiono na Rys. 8.13.



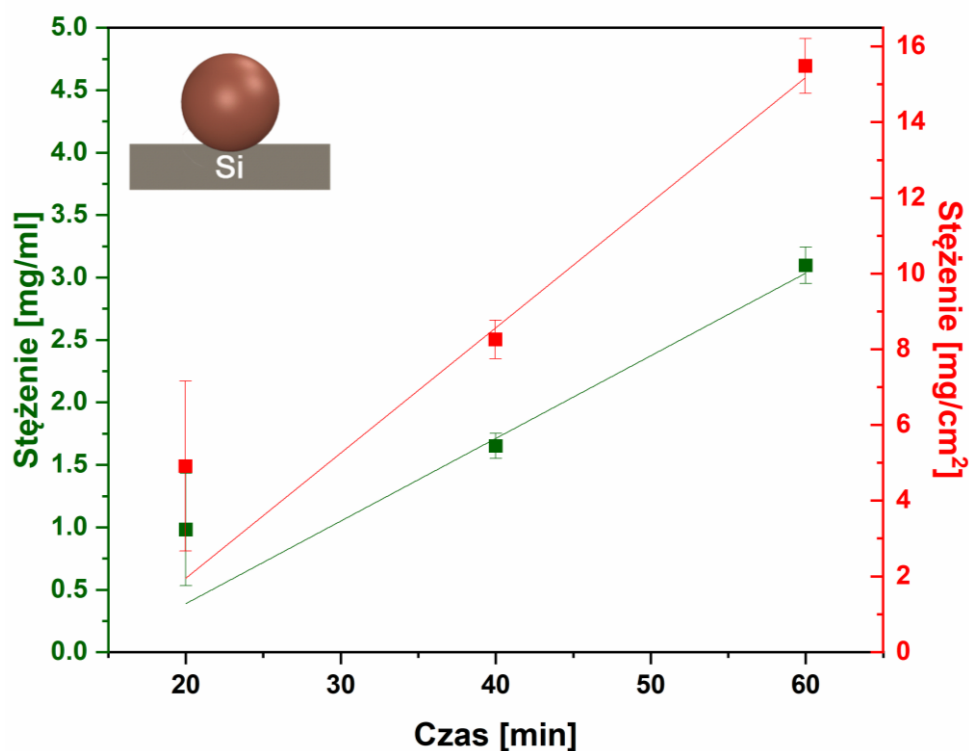
Rys. 8.13. Widma masowe rozkładu wielkości nanocząstek miedzi w zależności od odległości działa od strefy kondensacji.

W przypadku nanocząstek miedzi, największą ilość otrzymywanych struktur, obserwowano w przypadku odsunięcia działa na odległość 30 mm od odstrefy agregacji (linia żółta). Dalsze wydłużanie wspomnianej drogi prowadziło z jednej strony do zmniejszenia ilości otrzymywanych nanocząstek oraz zwiększenia ich charakterystycznego rozmiaru (średnicy). Uzyskane wyniki w ramach prowadzonych testów pozwoliły na określenie wartości parametrów technologicznych dla syntezy CuNPs (Tabela 8.5.), które następnie stosowano w kolejnych etapach prowadzonych prac eksperymentalnych.

Tabela 8.5. Zestawienie parametrów technologicznych dla procesu otrzymywania nanocząstek miedzi w procesie IGC, dane eksperymentalne uzyskane na drodze kalibracji systemu

Przepływ gazów [sccm]		Ciśnienie [Tr]	Parametry prądowe dla działa magnetronowego			Odległość działa od strefy agregacji [mm]
Ar	He		Natężenie [mA]	Napięcie [V]	Moc [W]	
100	5	$5.00 \cdot 10^{-4}$	100	316.4 ± 9.0	31.56 ± 0.87	30

W toku kolejnych prac przeprowadzono procesy kalibracyjne mające na celu określenie stężenia otrzymywanych nanocząstek w trakcie procesu depozycji na podłożach. W tym celu przeprowadzono depozycje w czasie 20, 40 i 60 minut. Nanocząstki otrzymano na podłożach krzemowych (10 x 10 mm), w ilości trzech powtórzeń dla każdego czasu otrzymywania, zostały następnie poddane procedurze trawienia, w celu przeprowadzenia nanocząstek do roztworu. Procedura trawienia obejmowała: zanurzenie podłoża z nanocząstkami w 2 ml 65% HNO₃ na okres trzech dni, następnie podgrzanie roztworu z podłożami do temperatury 60°C w łaźni wodnej i trawienie w tych warunkach przez 1 godzinę; finalnie usunięto podłoże krzemowe, a uzyskany roztwór rozcieńczono do objętości 5 ml. Na Rys. 8.14. przedstawiono uzyskane, średnie wartości stężeń.



Rys. 8.14. Zależność stężenia nanocząstek miedzi otrzymanych w procesie IGC na podłożu krzemowym od czasu trwania syntezy.

Wzrost stężenia nanocząstek miedzi otrzymanych w procesie kondensacji w gazie obojętnym w funkcji czasu odbiega nieco od przebiegu liniowego, na co wpływa wysoki błąd standardowy pomiaru stężenia nanocząstek otrzymywanych przez 20 minut. W tym wypadku współczynnik determinacji R^2 regresji liniowej wynosi 0.96871. Wykorzystane w dalszej części pracy godzinne procesy depozycji tych struktur charakteryzują się najwyższym stężeniem spośród nanocząstek otrzymanych tą techniką i wynoszą 3.10 ± 0.15 mg/ml (udział w roztworze), natomiast ich stężenie na powierzchni podłoża, na którym są nanoszone wynosiło ok. 15.49 ± 0.73 mg/cm².

Podsumowując ten etap prac można stwierdzić, że określenie warunków otrzymywania nanocząstek złota, srebra oraz miedzi z wykorzystaniem metody rozpylania magnetronowego wspieranego techniką kondensacji w gazie obojętnym było niezbędne do ustalenia i stosowania jednolitej procedury badawczej. Dzięki kalibracji procesów możliwe było bowiem otrzymywanie powtarzalnych rozmiarów nanocząstek (oraz ich ilości) w kolejnych pracach eksperymentalnych, co stanowi niezbędne działanie do realizacji zaplanowanych prac w zakresie uzyskania funkcjonalności wspomnianych pokryć, obejmujących ich aktywność antybakteryjną oraz celowane i kontrolowane uwalnianie.

8.2. Metody badań

Zastosowane metody badań obejmowały techniki, które pozwoliły na analizę wpływu zaproponowanych modyfikacji powierzchni stopu NiTi, w tym obróbki mechanicznej, chemicznej oraz otrzymanych warstw na bazie biopolimerów i nanocząstek metali. Dla potrzeb niniejszego zestawienia zostały one podzielone na dwie grupy. Pierwsza z nich obejmuje typowe metody z zakresu inżynierii powierzchni, w tym te pozwalające na określenie wartości wybranych parametrów użytkowych powłok (Rozdział 8.2.1). Z kolei w Rozdziale 8.2.2. szczegółowo opisano protokoły dla wybranych badań biologicznych, wykonywanych z wykorzystaniem linii komórkowych i szczepów bakterii.

8.2.1. Badania z zakresu inżynierii powierzchni materiałów

W Tabeli 8.6. zebrano, z podaniem między innymi celu i warunków pomiaru, wykorzystywane metody badań z zakresu typowych technik dla inżynierii powierzchni materiałów.

Tabela 8.6. Zestawienie wykorzystywanych metod badań z zakresu inżynierii powierzchni materiałów

Metoda badawcza	Cel pomiaru	Aparatura	Warunki pomiarów	Metody analizy i obróbki danych
Obrazowanie mikrostruktury				
Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	Obrazowanie mikrostruktury powierzchni modyfikowanego stopu w środowiskach chemicznych i powierzchni otrzymanych pokryw. Analiza składu chemicznego powierzchni.	NOVA NANO SEM 200, FEI (Hillsboro, OR, USA)	Detektor LVD	Zestawienie zdjęć w programie graficznym oraz wyników analizy EDS w programie Origin.
Mikroskopia metalograficzna	Obrazowanie mikrostruktury powierzchni modyfikowanego stopu w środowiskach chemicznych i otrzymanych warstw.	NIKON ECLIPSE LV150N	Obserwacje w jasnym polu (BF).	Zestawienie zdjęć w programie graficznym.
Mikroskopia sił atomowych (AFM)	Obrazowanie topografii powierzchni modyfikowanego stopu w środowiskach chemicznych oraz otrzymanych warstw, z określeniem wartości parametrów chropowatości (R_a i R_q).	Bruker Dimension ICON XR (Bruker, Santa Barbara, CA, USA)	Wykorzystano tryb tapping w powietrzu, a jako sondę wykorzystano krzemowy tip z igłą SiN o promieniu 8 nm. Sonda pracowała w warunkach pokojowych, sprężystość nominalna 0.4 N/m, częstotliwość 70 kHz.	Obróbka zdjęć w programie Gwyddion: uśrednienie tła i obróbka danych metodą wielomianową (interpolacja dwuliniowa). Odczyt wartości parametrów chropowatości. Zestawienie zdjęć w programie graficznym.

Metoda badawcza	Cel pomiaru	Aparatura	Warunki pomiarów	Metody analizy i obróbki danych
Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)	Obrazowanie mikrostruktury otrzymanych nanocząstek, koloidów z nanocząstkami oraz lameli struktur o budowie kanapkowej. Analiza składu chemicznego warstw i nanocząstek.	Tecnai TF 20 X-TWIN (FEI) oraz Thermo Fisher Scientific Titan Analítico	Źródło: FEG HV=200 kV Pomiary w jasnym (BF) i ciemnym (DF) polu, oraz w wysokiej rozdzielczości (HR).	Obróbka zdjęć w programie dedykowanym FEI TEM Imaging & Analysis. Zestawienia zdjęć w programie graficznym, pomiar dystrybucji (min. 100 pomiarów) oraz odległości międzypłaszczyznowych metodą szybkiej transformacji Fouriera nanocząstek w programie ImageJ.

Badania parametrów użytkowych

Zwilżalność powierzchni oraz energia powierzchniowa	Pomiar kąta zwilżania dla wody i diiodometanu oraz kalkulacja wartości swobodnej energii powierzchniowej dla powierzchni stopu modyfikowanego w środowiskach chemicznych oraz otrzymanych struktur.	Kruss DSA10Mk2 (KRÜSS GmbH, Hamburg, Germany)	Objętość kropli: 1 µl Ciecze pomiarowe: woda wysokiej czystości uzyskana z destylarki UHQ-PS (Elga) oraz diiodometan (Aldrich, Niemcy). Swobodną energię powierzchniową (SFE) obliczono w oparciu o model Owens'a-Wendt'a.	Zestawienie wyników w programie Origin.
Spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS)	Pomiar stężenia pierwiastków uwalnianych do medium (płyn Ringera) z powierzchni warstw na bazie chitozanu oraz po kontakcie z medium komórkowym.	ELAN 6100 (PerkinElmer Corp., Waltham, MS, USA) oraz NexION® 2000 (PerkinElmer Corp., Waltham, MS, USA.)	Roztwory zostały rozcieńczone stężonym HNO ₃ : 1) 1:1 (v/v) na 24 godziny przed analizą, 2) 1:32 (v/v) przed analizą.	Zestawienie wyników w programie Origin.

Metoda badawcza	Cel pomiaru	Aparatura	Warunki pomiarów	Metody analizy i obróbki danych
Badania składu chemicznego i fazowego				
Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS)	Badanie składu chemicznego powierzchni stopu modyfikowanego w środowiskach chemicznych oraz struktur na bazie chitozanu dla stanów: Ti 2p, Ni 2p _{3/2} , S 2p, N 1s, C 1s, O 1s, Ca 2p, Na 1s, Ag 3d, Au 4f i Cu 2p.	PHI 5000 VersaProbeII (ULVAC-PHI, Chigasaki, Japan)	Źródło: monochromatyczne Al Kα Spot: 100 μm Pole skanowania: 400 μm x 400 μm.	Dekonwolucja widm przeprowadzono z wykorzystaniem programu PHI MultiPak (v.9.9.0.1). Do odcięcia tła zastosowano metodą Shirley. Wynik zestawiono w programie Origin.
Fourierowska spektroskopia w podczerwieni (FTIR)	Badanie struktury wiązań cząsteczek obecnych w warstwach.	Bruker Vertex 70 FTIR oraz Bruker Tensor II	Zakres: 600÷4500 cm ⁻¹ , 80 skanów. Rozdzielczość: 4 nm ⁻¹ .	Zestawienie wyników w programie Origin.
Dyfraktometria rentgenowska (XRD)	Badanie składu fazowego warstw wierzchnich stopu modyfikowanego w środowiskach chemicznych oraz otrzymanych warstw.	Panalytical Empyrean z lampami Cu i Co	GIXRD Omega: 1° Zakres: 5÷100° Krok: 0.02° Czas kroku: 15 s	W przypadku wykorzystania XRD-Co przeliczono wyniki na Cu zgodnie z wzorem: 114.59156*asin(1.5418/1.7891*sin(0.00872664*X)), gdzie X to wartości 2θ Zestawienie wyników w programie Origin wraz z oznaczeniem faz pochodzącym z bazy Match!.
Spektroskopia absorbcyjna (UV-VIS)	Analiza zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonowego nanocząstek w koloidach CS@AuNPs i CS@AgNPs.	Shimadzu UV-1900	Zakres: 300÷800 cm ⁻¹ Rozdzielczość: 1 cm ⁻¹	Zestawienie wyników w programie Origin.

Metoda badawcza	Cel pomiaru	Aparatura	Warunki pomiarów	Metody analizy i obróbki danych
Badania korozyjne				
Woltamperometria liniowa (LSV)	Pomiar krzywych polaryzacyjnych dla otrzymanych struktur na bazie chitozanu.	Autolab PGSTAT128 N, (Metrohm) z elektrodami: referencyjną chlorosrebrową, zliczającą elektrodą platynową i badaną próbką - stanowiącą elektrodę pracującą.	Krzywe polaryzacyjne były wyznaczone dla zakresu potencjałów od 1.5 V do -1.0 V w odniesieniu do elektrody Ag/AgCl ze skokiem 0.001 V/s.	Zestawienie wyników w programie Origin.
Potencjał obwodu otwartego (OCP)	Pomiar potencjału otrzymanych struktur na bazie chitozanu.	Multimetr Kethley 2000 (Kethley, USA) wyposażony w referencyjną elektrodą chlorosrebrową i pracującą - badaną próbką.	Test prowadzony w roztworze Ringera (8.6g/L NaCl, 0.3g/L KCl, 0.243g/L CaCl ₂ , pH=7.15÷7.30), w temperaturze 37°C przez 24h, z interwałem pomiarowym 120s.	Zestawienie wyników w programie Origin.

8.2.2. Badania biologicznych

8.2.2.1. Badania cytotoksyczności

Badania biologiczne z wykorzystaniem linii komórkowych pozwalają na określenie ich odpowiedzi na działanie danego materiału, w szczególności jego powierzchni. Testy te pozwalają między innymi na ocenę cytotoksyczności, która informuje o przeżywalności komórek w badanym układzie po kontakcie z testowanym materiałem. Wspomniane testy zostały przeprowadzone na wszystkich seriach eksperymentalnych, zgodnie z odpowiednim protokołem badania [293].

Linia komórkowa ludzkich osteoblastów - MG-63 (ATCC® CRL-1427™) została namnożona w medium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Immuniq, Polska) z dodatkiem czerwieni fenolowej, wzbogaconym 10% serum płodowym z cieląt (FBS - Fetal Bovine Serum) oraz 1% dodatkiem streptomycyny/penicyliny (Gibco-BRL, Life Technologies, Niemcy) w standardowych warunkach hodowli (37°C, 5% CO₂). Niezmodyfikowane oraz zmodyfikowane powierzchniowo próbki stopu NiTi zostały wstępnie wysterylizowane w świetle UV przez 20 minut. Następnie umieszczono je w płytce 24-dółkowej i zalano zawiesiną komórkową o gęstości $50 \cdot 10^4$ komórek na 0.2 ml. Jako próbę kontrolną wykorzystano wspomniane komórki (linii MG-63), wysiane na czystej płytce. Wszystkie próbki były inkubowane przez 48 godzin, przy czym medium hodowlane było wymieniane co 24 godziny. Cytotoksyczność stopów (przed i po modyfikacji) określono przy użyciu testu Alamar Blue (Sigma-Aldrich), wg. ściśle przyjętego protokołu po upływie wspomnianych czasów inkubacji [294]. Próbki testowe zostały przemyte buforem fosforanowym (PBS) i inkubowano je z roztworem soli sodowej resazury (25 μM, PBS) przez 4 godziny w 37°C w warunkach ciemności. Odpowiedź fluorescencyjna, związana z prawidłowym metabolizmem komórek, została zmierzona w zakresie 605 nm (długość wzbudzenia 560 nm) za pomocą czytnika płytek (Infinite 200M PRO NanoQuant, Tecan, Szwajcaria). Wyniki testu cytotoksyczności zostały wyrażone jako odsetek żywych komórek dla badanych próbek stopów (S) w stosunku do liczby żywych komórek wysianych na czystej płytce hodowlanej (S₀). Obrazowanie morfologii komórek wykonano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Olympus IX51, Japonia) z filtrem wzbudzenia fali 470±20 nm. Zawiesina komórkowa została wybarwiona oranżem akrydynowym (komórki żywe) i jodkiem propidyny (komórki martwe). Analizie poddano pięć różnych mikroobszarów zawierających przynajmniej 100 komórek znajdujących się wokół testowanych mikroobszarów na powierzchni stopów.

Dodatkowo komórki poddano analizie za pomocą cytometru przepływowego (Guava easyCyte). W celu zróżnicowania typu śmierci komórkowej (nekroza, wczesna apoptoza i apoptoza) zastosowano Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (Invitrogen) do znakowania komórek apoptycznych i eBioscience™ 7-AAD Viability Staining Solution (ThermoFischer SCIENTIFIC) do detekcji komórek nekrotycznych. Po 24-godzinnej inkubacji linii MG-63 (gęstość zawiesiny $5 \cdot 10^5$ komórek/mL) na badanych próbkach, medium hodowlane zostało usunięte. Powierzchnie badanych próbek z komórkami zostały przemyte dwukrotnie buforem PBS (pH=7.4), po czym dodano do nich trypsynę trawiającą adhezyny, odpowiedzialne za przyleganie komórek do powierzchni i następnie odwirowano. Otrzymany osad komórkowy (pelet komórkowy) przemyto dwukrotnie 0.5 ml buforu PBS i rozcieńczono w buforze wiążącym (ang. *binding buffer*). Przed obrazowaniem komórki zostały wybarwione przy użyciu barwników, mianowicie Annexin V-FITC oraz 7-AAD i inkubowane w ciemności przez ok. 10 minut.

8.2.2.1. Badanie antybakteryjności

Aktywność antybakteryjna niemodyfikowanych i modyfikowanych stopów NiTi została przetestowana z wykorzystaniem Gram-ujemnych - bakterie *Escherichia coli*, szczep S17 (Pałeczka okrężnicy) oraz Gram-dodatnich - bakterie *Staphylococcus aureus GFP* ATCC 25923 (Gronkowiec złocisty), zgodnie z normą ASTM E-2180 [295]. Badania prowadzono w CIBA - Centro de Investigación Biomédica de Aragón (Saragossa, Hiszpania). Zgodnie z przyjętym protokołem 100 mL ciepłego (47 °C) TSA (Conda Pronadisa) zainokulowano 100 µL szczepu bakterii *S. aureus GFP* lub 1000 µL szczepu bakterii *E.coli* w fazie równowagi ($\sim 10^8$ CFU/mL) oraz 200 µL erytromycyny (*S. aureus GFP*) lub streptomycyny (*E. coli*). Przed rozpoczęciem badań próbki zostały poddane sterylizacji w świetle UV laminaru przez 20 minut (po każdej ze stron) i umieszczone w płytkach 12-dółkowych. Każdy dołek zawierający próbkę został wypełniony 1 mL zainokulowanego TSA, a następnie zamknięte płytki zostały zainkubowane w cieplarni (INCUBAT 2000207, JP SELECTA S.A., Barcelona, Hiszpania) w temperaturze 37°C na 24 godziny z dodatkiem 5 mL jałowej destylowanej wody (w celu utrzymania optymalnej wilgotności dla namnażania bakterii). Po upływie 24 godzin każdą próbkę przeniesiono do osobnej próbówki (typu Falcon) i dodano 10 mL TSB (Conda Pronadisa). Następnie całość poddano sonikacji (Ultrasons 3000514, JP SELECTA S.A., Barcelona, Hiszpania) przez minutę oraz wirowaniu (TX4 Digital Vortex Mixer, VELP Scientifica, Usmate, Włochy), również w czasie 1 minuty. W dalszej kolejności płytki 96-dółkowe uzupełniono 180 µL PBS i 20 µL supernatantu z próbek i zastosowano standardową procedurę mikrorozcieńczeń ($10^1 \div 10^6$), gdzie do każdego

kolejnego dołka dodawano 20 μ L zawartości poprzedniego dołka. Ostatnim etapem było naniesienie trzech kropli o objętości 25 μ L każda, na płytkę agarową z dodatkiem 0.2% erytromycyny (*S. aureus*) lub 0.1% streptomycyny (*E. coli*). Minimalne stężenie hamujące (MIC, ang. *Minimum Inhibitory Concentration*) definiowano jako stężenie niezbędne do zahamowania wzrostu bakterii do 3log10, natomiast minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC, ang. *Minimum Bactericidal Concentration*) definiowano jako stężenie niezbędne do całkowitego wyeliminowania bakterii [296].

Z uwagi na dużą zmienność związaną z pracą z żywymi komórkami i bakteriami protokoły badań biologicznych wymagają wykonania testów oraz ich powtórzenia w celu uzyskania wiarygodnych rezultatów. Wykonane testy biologiczne przeprowadzono w przynajmniej trzech powtórzeniach, a rezultaty przedstawiono jako średnią arytmetyczną z uzyskanych wyników wraz z odchyleniem standardowym populacji. Ponadto w przypadku badań z wykorzystaniem bakterii wartości istotne statystycznie oceniono za pomocą testu t-Studenta. Rezultaty tej analizy statystycznej przyporządkowano do zakresów poziomów istotności $p < 0,001$, $p < 0.01$ i $p < 0,05$.

9. Wyniki badań wraz z dyskusją

W ramach prowadzonych prac eksperymentalnych wykonano badania dotyczące każdego z proponowanych etapów modyfikacji powierzchni stopu NiTi. W niniejszej pracy wyniki oraz ich dyskusję, w tym wobec aktualnych doniesień literaturowych podzielono na dwie główne części, uwzględniające etapy proponowanej technologii. W pierwszej kolejności opisano zagadnienia związane z przygotowaniem powierzchni nitinolu w środowiskach kwasowych i ich wpływ na wybrane parametry fizykochemiczne i użytkowe stopu. W drugiej części skupiono się na zagadnieniach badawczych obejmujących porównanie warstw biopolimerowych z dodatkiem nanocząstek w zależności od przyjętej koncepcji ich otrzymywania (p. Rys. 8.2., Rozdział 8.1.4.).

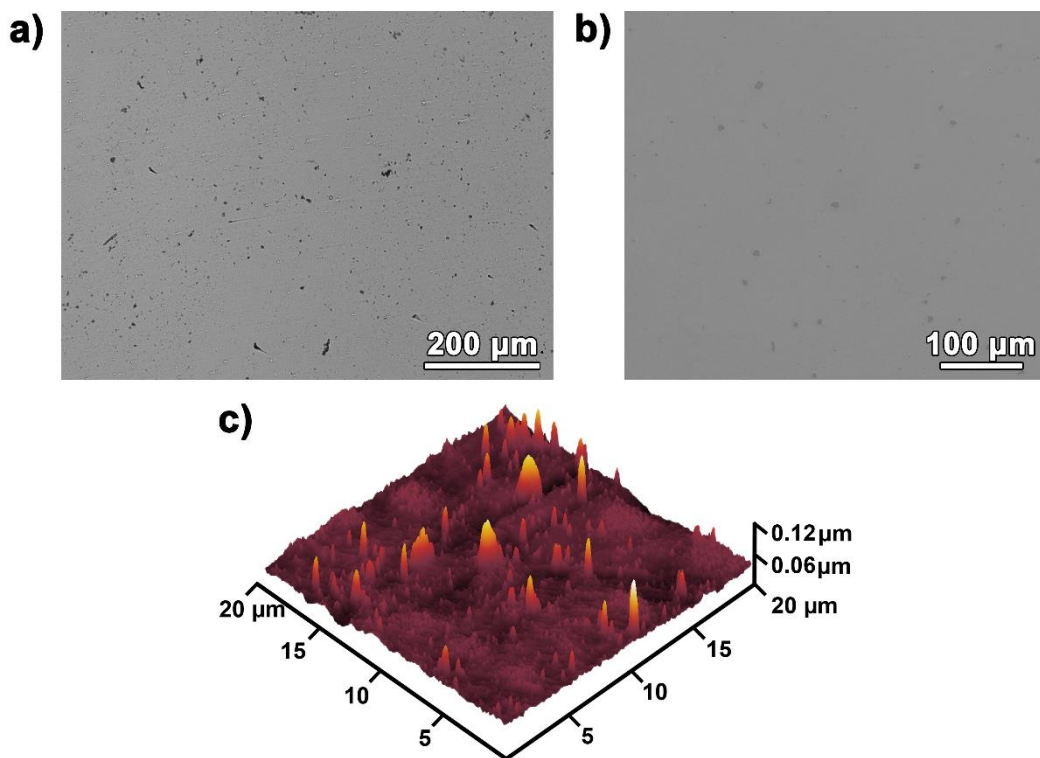
9.1. Obróbka powierzchni nitinolu metodą trawienia w środowisku kwasowym

Jak wcześniej wspomniano, w pierwszej części pracy zaprezentowano wyniki wstępnego przygotowania powierzchni nitinolu w środowisku kwasowym. Proces ten miał na celu ograniczenie stanów metalicznych pierwiastków składowych stopu, głównie ze względu na szczególną wrażliwość (alergie) części populacji na nikiel, a czasami nawet jego działanie toksyczne i kancerogenne. W procedurze eksperymentalnej zaplanowano modyfikację powierzchni stopu w czterech środowiskach kwasowych, o różnych składach i stężeniach, co opisano w Rozdziale 8.1.2. Otrzymane próbki zbadano pod kątem składu chemicznego (XPS) i fazowego (XRD) powierzchni, zmian mikrostruktury (mikroskop optyczny i SEM), topografii powierzchni (AFM) oraz zwilżalności i wartości swobodnej energii powierzchniowej. Szczegóły analiz i wykorzystaną aparaturę przedstawiono w Tabeli 8.2. w Rozdziale 8.2. W poniższym rozdziale badane serie próbek oznaczono za pomocą skróconych nazw: CE_X_Y, gdzie X stanowi oznaczenie mieszaniny użytych kwasów (Tabela 8.1., Rozdział 8.1.2.), natomiast Y czas kontaktu próbki ze środowiskiem, w których próbka była trawiona.

9.1.1. Morfologia powierzchni

Morfologię powierzchni chemicznie modyfikowanego podłoża NiTi zobrazowano z wykorzystaniem optycznego mikroskopu metalurgicznego oraz skaningowego mikroskopu elektronowego. Próbkę referencyjną stanowiła próbka wypolerowanego stopu (powierzchnia

lustrzana), zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 8.1.1., a otrzymane mikrofotografie przedstawiono na Rys. 9.1.

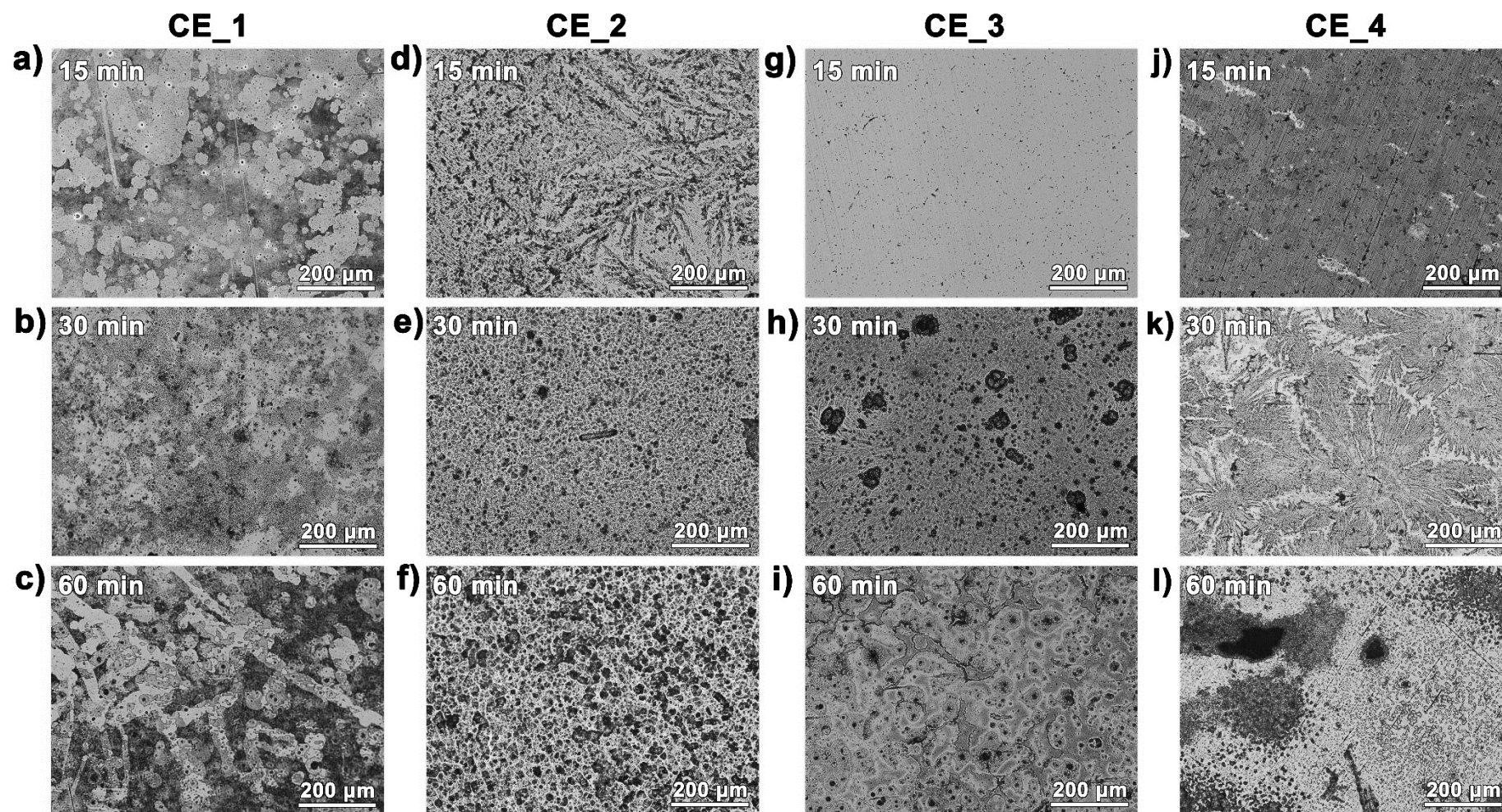


Rys. 9.1. Zestawienie obrazów z: a) mikroskopu metalurgicznego (powiększenie $\times 10$), b) skaningowego mikroskopu elektronowego (powiększenie $\times 1000$) oraz c) obraz AFM, dla niemodyfikowanej powierzchni nitinolu.

Powierzchnia niemodyfikowanego podłoża zawiera niezbyt liczne niedoskonałości po polerowaniu, w tym drobne rysy, punktowe wżery lub obszary z zanieczyszczeniami organicznymi, które widoczne są na Rys. 9.1.a. Z kolei mikrofotografia w wyższej rozdzielczości (zdjęcie SEM, Rys. 9.1.b) obejmuje widoczne ciemniejsze obszary, które stanowią wtrącenia fazy bogatszej w tytan (Ti_2Ni). Niewielkie ilości tej fazy są charakterystyczne dla powierzchni niemodyfikowanego nitinolu [297]. Występowanie wspomnianych wtrąceń/wytrąceń w stopie jest związane z efektami nierównowagowymi w chłodzącym się materiale stopowym, w którym segregacja może prowadzić do tworzenia się bogatszych w tytan skupisk fazy ciekłej, powodujących wytrącanie się Ti_2Ni [298]. Czynnikiem promującym większe wydzielanie tej fazy międzymetalicznej może być zwiększony udział zanieczyszczeń glinu (powyżej 7%) oraz zbyt wolne chłodzenie stopu. Nadmiar fazy Ti_2Ni ma znaczny wpływ na właściwości mechaniczne nitinolu, ponieważ faza ta odznacza się kruchością i w strukturze stopu stanowi miejsca inicjacji i propagacji pęknięć [299]. Ponadto na Rys. 9.1.c zaprezentowano obraz topografii powierzchni pochodzący

z mikroskopu sił atomowych. Na powierzchni niemodyfikowanego stopu obecne są nieliczne obszary o większej wysokości względem całości powierzchni, obecność tych wzniesień może być związana z niedoskonałościami po procesie polerowania lub występowaniem zanieczyszczeń na powierzchni stopu, co mogą potwierdzać podobne rezultaty topografii powierzchni polerowanego NiTi, które w pracy opisuje W. Haider [300]. Mikroskopia siła atomowych dostarczyła również informacji na temat wartości parametrów chropowatości, które dla niemodyfikowanego nitinolu wyniosły odpowiednio 4.40 ± 1.77 nm (R_a) oraz 7.22 ± 4.17 nm (R_q). Rezultaty te korespondują z wartościami napotykanymi po tego typu obróbce w literaturze. Przykładowo R. Rokicki, *et al.* [301] wskazują na wartość parametru R_a równą około 9.9 nm dla stopu NiTi po obróbce polerowania.

W przypadku modyfikacji w środowiskach kwasowych, w zależności od zastosowanej mieszaniny trawiącej, obserwowano w większości jakościowe zmiany w morfologii powierzchni stopu. Co ważne, istotny wpływ na obserwowaną powierzchnię miał również czas kontaktu z mieszaniną kwasów – Rys. 9.2.



Rys. 9.2. Zestawienie obrazów z mikroskopu metalograficznego (powiększenie x10) dla powierzchni nitinolu modyfikowanego w mieszaninach: a-c) CE_1 (NH₃/H₂O₂), d-f) CE_2 (H₂SO₄/H₂O₂), g-i) CE_3 (HCl/HNO₃) oraz j-l) CE_4 (NH₃/H₂O₂); w czasie 15, 30 oraz 60 minut.

Zmiany na powierzchni stopu, w kontakcie z mieszaniną CE_1 ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$), przedstawiono na Rys. 9.2. a-c. Na powierzchni nitinolu, wraz z postępującym czasem trawienia, zauważalne są coraz wyraźniejsze zmiany. Po 15 minutach widoczne są zagłębienia, o zbliżonej geometrii do tych obecnych w próbce niemodyfikowanej, jednak bardziej liczne. Dłuższy proces trawienia (30 minut) sprzyja powstawaniu niewielkich wżerów, nie tylko w obszarach z wspomnianymi defektami, ale także stanowiące ubytki materiału na większości powierzchni, widoczne są również jaśniejsze obszary, w których nie widać większych efektów procesu trawienia. Efekt ten wzmacnia się w trakcie godzinowego kontaktu powierzchni z mieszaniną kwasów (Rys. 9.2.c), który sprzyja tworzeniu się ubytków o większej średnicy, lokalizujących się dookoła wspomnianych wżerów.

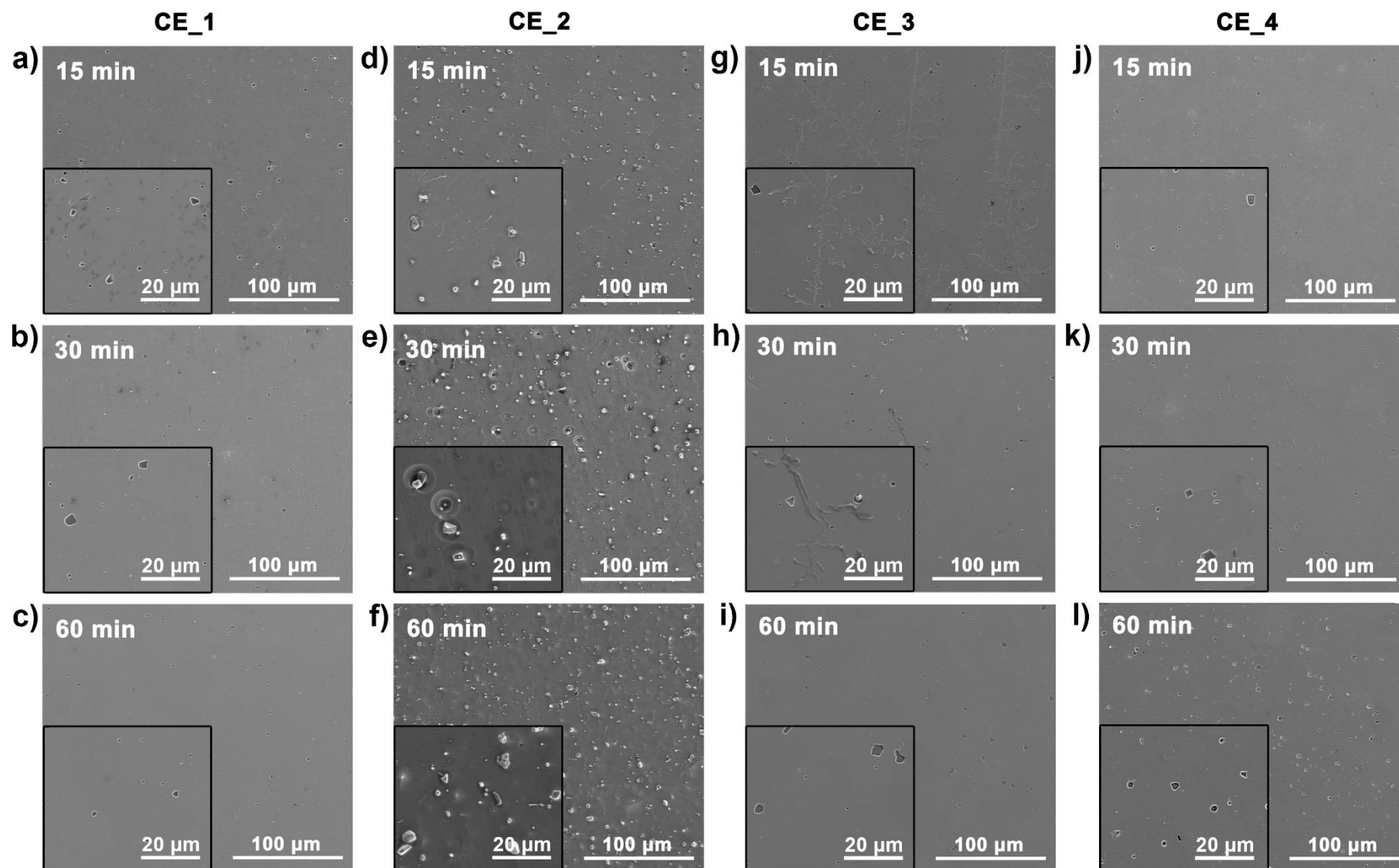
Najbardziej znaczące zmiany mikrostruktury powierzchni NiTi nastąpiły dla drugiego, najbardziej agresywnego środowiska CE_2 ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) - Rys. 9.2.d-f. Po zaledwie 15 minutach kontaktu (Rys. 9.2.d) obserwuje się zmiany na wytrwonionej, prawie całej powierzchni, o charakterystycznym dendrytycznym kształcie. Zwiększenie czasu kontaktu powierzchni stopu z tym środowiskiem do 30 minut (Rys. 9.2.e) sprzyja tworzeniu się głębszych małych wżerów, prowadzących do drobnej porowatej mikrostruktury (średnicy ok. 6-11 μm), która ewoluuje do uzyskania struktur o widocznie większej porowatości (średnica ok. 10-20 μm) po 60 minutach wytrawiania powierzchni (Rys. 9.2.f). Dłuższy czas wytrawiania nitinolu (30 i 60 minut) powoduje na powierzchni znaczne zmiany, które można porównać do zmian prezentowanych przez A. Pequegnat, *et al.* [94] dla wspomnianego stopu do zastosowań medycznych po 2 minutowym procesie trawienia w mieszaninie $7.5\text{HF}/20\text{HNO}_3/72.5\text{H}_2\text{O}$ przed procesem ablacji laserowej. Powierzchnia po trawieniu prezentowała znaczne ubytki mimo krótkiego czasu kontaktu z mieszaniną, natomiast zdecydowanie wpływ na to miały wysokie stężenia kwasów wykorzystanych do wspomnianego procesu.

Mieszanina CE_3 (HCl/HNO_3) nie wpływa w szczególnie istotnym stopniu na mikrostrukturę nitinolu po 15-minutowej ekspozycji (Rys. 9.2.g), jednak dłuższy kontakt (30 minut, Rys. 9.2.h) prowadzi do powstania małych (ok. 4÷6 μm) i dużych (ok. 45÷50 μm) wgłębień, które nie są typowe dla wcześniej opisanych zmian. Godzinny proces (Rys. 9.2.i) powoduje wytrawienie materiału w stopniu niwelującym duże wżery charakterystyczne dla półgodzinnego kontaktu podłoża ze wspomnianym środowiskiem. Podobne rezultaty, w zakresie wielkości ubytków (5 ÷ 9 μm), dla godzinowego trawienia odnotował przykładowo Z. Yang, *et al.* [302], modyfikując elektrochemicznie podłoża NiTi w 10% H_2SO_4 rozpuszczonego w środowisku metanolu. W przywołanej pracy przeprowadzono również

trawienie elektrochemiczne w 10% H_2SO_4 w środowisku wodnym, które z kolei nie wpłynęło znacząco na mikrostrukturę nitinolu. Zastosowanie również dwóch innych mieszanin (40% HNO_3 /10% HF oraz 9.3% H_3PO_4 /10% NH_4F) nie skutkowało obserwacją podobnych zmian jak wyżej opisane.

Dla ostatniej modyfikacji, z użyciem roztworu CE_4 (10.3% NH_3 /5.3% H_2O_2), obserwuje się nieznaczne zmiany mikrostruktury po 15 minutach ekspozycji (Rys. 9.2.j), o zbliżonej budowie do próbki na Rys.9.2.a, z użyciem mieszaniny CE_1 (2.3% NH_3 /13.6% H_2O_2). Dwukrotnie dłuższy czas obróbki (Rys. 9.2.k) powoduje zmiany na powierzchni w postaci struktur o kształcie i morfologii podobnej do tej obserwowanej dla 15-minutowej modyfikacji w środowisku z użyciem mieszaniny $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_2, Rys. 9.2.d), jednak o większych rozmiarach i na większej powierzchni. Wreszcie, godzinna ekspozycja na roztwór CE_4 występuje z pojedynczymi dużymi i wieloma mniejszymi wgłębieniami, jednak wyróżnić też można mikroobszary, które nie wykazują tendencji do erozji.

Podsumowując, struktura modyfikowanego nitinolu w środowiskach kwasowych ściśle zależy od składu i stężeń mieszanin oraz czasu obróbki. Analizując te zmiany można podzielić stosowane środowiska na dwie grupy. Pierwsza z nich obejmuje mieszaniny CE_2 (mieszanina $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) oraz CE_3 (mieszanina HCl/HNO_3), które znacznie wpływają na intensywność procesu trawienia, a powstałe wżery po kontakcie z roztworami są wyraźne i jak w przypadku CE_3 (mieszanina HCl i HNO_3) dużych rozmiarów. Druga grupa, do której zaliczyć można mieszaniny NH_3 i H_2O_2 (CE_1 i CE_4) charakteryzują się mniejszą aktywnością wobec powierzchni, chociaż mieszanina o wyższym stężeniu 10.3% at. NH_3 (CE_4) podczas dłuższego kontaktu (60 min.) również prowadzi do wytworzenia wżerów o dużych rozmiarach. W celu dodatkowej analizy powierzchni modyfikowanych podłoży NiTi przeprowadzono również obrazowanie mikrostruktury z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego, które to rezultaty zaprezentowano na Rys. 9.3.



Rys. 9.3. Obrazy SEM (powiększenie 1000 x oraz 5000 x - jako insert) powierzchni nitinolu modyfikowanego w mieszaninach a-c) CE_1 ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$), d-f) CE_2 ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$), g-i) CE_3 (HCl/HNO_3) oraz j-l) CE_4 ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$); w czasie 15, 30 oraz 60 minut.

Zaprezentowane na Rys. 9.3. a-c obrazy mikrostruktury, uzyskane po procesie trawienia nitinolu w środowisku CE_1, są zbieżne z rezultatami obserwacji powierzchni z wykorzystaniem mikroskopu optycznego. Drobne wżery zauważalne są dla każdego z czasów trawienia, wybrane mikroobszary charakteryzują się porównywalną ilością zagłębień o zbliżonych rozmiarach. Jak można zaobserwować na zdjęciach w większym powiększeniu (5000x) wżery o mniejszych rozmiarach mają regularne okrągłe kształty, natomiast większe ubytki w powierzchni charakteryzują się kształtami nieregularnymi. Defekty powierzchni o regularnych kształtach i niewielkiej średnicy oraz ich nieznaczna ilość obserwowane dla wszystkich czasów modyfikacji w mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (CE_1, Rys. 9.3.a-c) zostały również zauważone przez M. Etminanfar, *et al.* [95]. W przypadku wspomnianych badań powierzchnia nitinolu była modyfikowana w mieszaninie $\text{HF}/\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (obj. 1:5:4) i stanowiła etap przygotowania powierzchni przed otrzymywaniem warstw hydroksyapatytu na drodze procesów elektrochemicznych.

Z kolei na Rys. 9.3.d-f zobrazowano powierzchnię stopu po modyfikacji w mieszaninie $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (CE_2). Można wnioskować, że najkrótszy czas trawienia (15 minut, Rys. 9.3.d) sprzyja tworzeniu się wżerów o budowie zbieżnej z modyfikacją stopu w roztworze NH_3 i H_2O_2 (CE_1). Na powierzchni po wspomnianej obróbce można również zaobserwować wytrącenia w postaci drobnych kryształów, które najpewniej stanowią sole siarczanowe(VI), co szerzej opisano w Rozdziale 9.1.3. Zwiększenie ilości wspomnianych wytrąceń na powierzchni oraz nieznaczny wzrost średnicy regularnych wżerów obserwuje się również dla powierzchni z czasem trawienia 30 minut (Rys. 9.3.e). Co ważne, w tym przypadku ubytki się większe, i stanowią obszary zlokalizowane po procesie trawienia wkoło wytrąceń obecnych na powierzchni, co szczególnie można zaobserwować na mikrofotografii z powiększeniem 5000 razy (Rys. 9.3.e). Wydłużenie czasu wspomnianego procesu do 60 minut (Rys. 9.3.f) prowadzi do zmniejszenia się ilości ubytków na powierzchni, ale z wyraźnie większą ilością wytrąceń. Przywołana w omówieniu zdjęć uzyskanych z mikroskopu optycznego praca (A. Pequegnat, *et al.* [94]) prezentuje również zdjęcie w większym przybliżeniu (x600), na którym zostały zobrazowane wżery. Średnica prezentowanych ubytków jest większa względem uzyskanych na drodze trawienia w mieszaninie $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (CE_2). W przypadku modyfikacji przeprowadzonych w toku prac eksperymentalnych niniejszej dysertacji są to zagłębienia o średnicy ok. $7 \div 9 \mu\text{m}$, podczas gdy w przywołanej pracy (mieszanina $\text{HF}/\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ o udziałach obj. 7.5:20:72.5) kształty te są nieregularne, o średnicy ok. $12 \div 15 \mu\text{m}$. Na badanej powierzchni jednak nie obserwuje się wytrąceń, które w podobnej formie do prezentowanych na Rys. 9.3.d-f, zaobserwowała N. Lopes, *et al.* [303]. W tym przypadku powierzchnia nitinolu

była modyfikowana w procesie polerowania elektrolitycznego w środowisku 3.5M H₂SO₄ rozpuszczonego w metanolu w temperaturze 20°C, a wytrącenia określono (na podstawie EDS) jako TiC pochodzący z węglowego tygla służącego do przygotowania stopu, czego jednak już nie potwierdzono na drodze analizy budowy fazowej. Opisywanej interpretacji nie potwierdziły również analizy składu chemicznego i fazowego powierzchni dla badanych próbek, które zaprezentowano w kolejnych rozdziałach.

Dla kolejnej serii, analiza powierzchni podłoży trawionych w mieszaninie HCl i HNO₃ (CE_3, Rys. 9.3.g-i), wykazuje zbliżone zmiany do tych zarejestrowanych z wykorzystaniem mikroskopu metalograficznego. Podłoże trawione przez 15 minut (Rys. 9.3.g) charakteryzuje się stosunkowo niewielką ilością zagłębień o małej średnicy (ok. 2÷5 μm), a ponadto na powierzchni można zaobserwować formy krystaliczne o strukturze dendrytycznej, które najpewniej stanowią zanieczyszczenia po mieszaninie trawiącej. Wydłużenie czasu procesu trawienia do 30 minut (Rys. 9.3.h) prowadzi do zwiększenia średnicy wżerów, podobnie jak proces prowadzony przez 60 minut (Rys. 9.3.i), dla którego zakres wielkości ubytków wynosi od 2 μm do 8 μm. W badanych mikroobszarach (powiększeniach) na otrzymanych mikrofotografiach nie obserwuje się większych ubytków materiału z powierzchni, które niejednokrotnie rejestrowano z wykorzystaniem mikroskopu metalograficznego (Rys. 9.2.g-i).

Mikrostruktura podłoży modyfikowanych w mieszaninie NH₃/H₂O₂ (o wyższym udziale amoniaku, CE_4) jest zbliżona do rezultatów trawienia powierzchni nitinolu w mieszaninie CE_1, jednak o mniejszym udziale amoniaku. Zarówno 15-minutowy (Rys. 9.3.j), jak i 30-minutowy (Rys. 9.3.k) czas obróbki nie wpłynął znacząco na zmiany na powierzchni stopu. Dla tych czasów obserwuje się niemal identyczne obrazy SEM, z charakterystycznymi okrągłymi wżerami o średnicy od 0.8 μm do 2.0 μm, oraz nielicznymi ubytkami o większej średnicy (4-5 μm) i nieregularnym kształcie. W przypadku tych dwóch modyfikacji warto ponownie przywołać pracę M. Etminanfar, *et al.* [95] z uwagi na zbliżoną budowę powierzchni nitinolu po obróbce w mieszaninie 1 HF: 5 HNO₃: 4 H₂O. Przeprowadzone badania potwierdzają również, że wydłużenie czasu trawienia do 1h (Rys. 9.3.l) znacząco zwiększa ilość ubytków materiału, i ich rozmiary (w zakresie od 1.0 μm do 2.5 μm).

Jak opisano w Rozdziale 2, metody obróbki nitinolu stanowią jeden z etapów przygotowania powierzchni do dalszych procesów np. otrzymywania warstw. Z tego powodu zagadnienie modyfikacji ich powierzchni w środowisku chemicznym nie jest przeważnie szeroko opisywane w publikacjach naukowych, czy też w pracach opisujących technologie

modyfikacji. Jednakże otrzymane rezultaty obrazowania mikrostruktury można odnieść do modyfikacji nie tylko samego nitinolu, ale dodatkowo również innych stopów na osnowie Ti. Przykładem może być modyfikacja stopu Ti6Al4V, która przeprowadzona przez Y. Torres, *et al.* [304] obejmowała dwa poddane analizie podejścia trawienia po uprzednim wygrzewaniu stopu (750°C, 10 minut): 1) modyfikację w mieszaninie 9%HCl/24%H₂SO₄ przez 30 minut w temperaturze pokojowej oraz 2) opisaną w kroku pierwszym modyfikację, a następnie trawienie w 20%H₂O₂/0.3%HCl (80°C, 30 minut). Morfologia powierzchni stopu po trawieniu wyłącznie w mieszaninie 9%HCl/24%H₂SO₄ oraz mieszaninach 9%HCl/24%H₂SO₄ i 20%H₂O₂/0.3%HCl były odmienne, obróbki w sposób znaczny wpłynęły na ukształtowanie powierzchni zmieniając ich topografię na bardziej rozwiniętą, z widocznymi wytrąceniami faz, ale jednocześnie nie doprowadziły do powstania wżerów. Obserwowane różnice nie były bardzo znaczne, jednak modyfikacja w dwóch środowiskach charakteryzowała się większą chropowatością i pozostałością produktów trawienia na powierzchni. Opisaną morfologię można powiązać z rezultatem obserwowanym dla trawienia w mieszaninie H₂SO₄/H₂O₂ (CE_2), szczególnie dla najdłuższego czasu trawienia (60 minut, Rys. 9.3.f).

Wnikliwej analizie powierzchnię stopu Ti6Al4V po trawieniu w roztworze 95% H₂SO₄/30% H₂O₂ przez 30 minut w różnych temperaturach (25°C, 40°C i 60°C). poddali również C. Albeti, *et al.* [305]. Bardzo agresywne środowisko wykorzystane w modyfikacji spowodowało liczne ubytki w strukturze stopu, których nie zaobserwowano dla stosowanych środowisk obróbki w niniejszej pracy doktorskiej. Warto również wspomnieć, że temperatura prowadzonych procesów miała wpływ na skuteczniejsze trawienie konkretnych faz stopu, mianowicie prowadzenie procesu w 25°C wpływało głównie na fazę β , podczas gdy faza α nie wykazywała większych zmian w budowie. Proces prowadzony w 40°C powodował z kolei prawie równomierne trawienie faz α i β , podczas gdy temperatura trawienia 60°C prowadziła do dekompozycji powierzchni w stopniu uniemożliwiającym ich identyfikację.

Podobieństwo morfologii powierzchni nitinolu trawionego w mieszaninie 2.5% HCl/14% HNO₃ przez 60 minut (Rys. 9.2.i) można odnieść do morfologii powierzchni tytanu modyfikowanego w 30% HNO₃/3% HF przez 20 minut [306]. Opisane warunki trawienia tytanu prowadziły do powstawania wielu regularnych wżerów (średnica 1÷2 μ m), z charakterystycznymi sferami dookoła nich, widocznymi również na powierzchni modyfikacji CE_3_60 (Rys. 9.2.i). Fakt ten wynikał najprawdopodobniej z stosowania podczas obróbki mniej stężonego kwasu azotowego(V) i zbliżonych stężeń kwasów – HF i HCl, jak również

wydłużenia trawienia do 60 minut. W rezultacie spowodowało to powstanie wżerów o większej średnicy, od 5 do 7 μm .

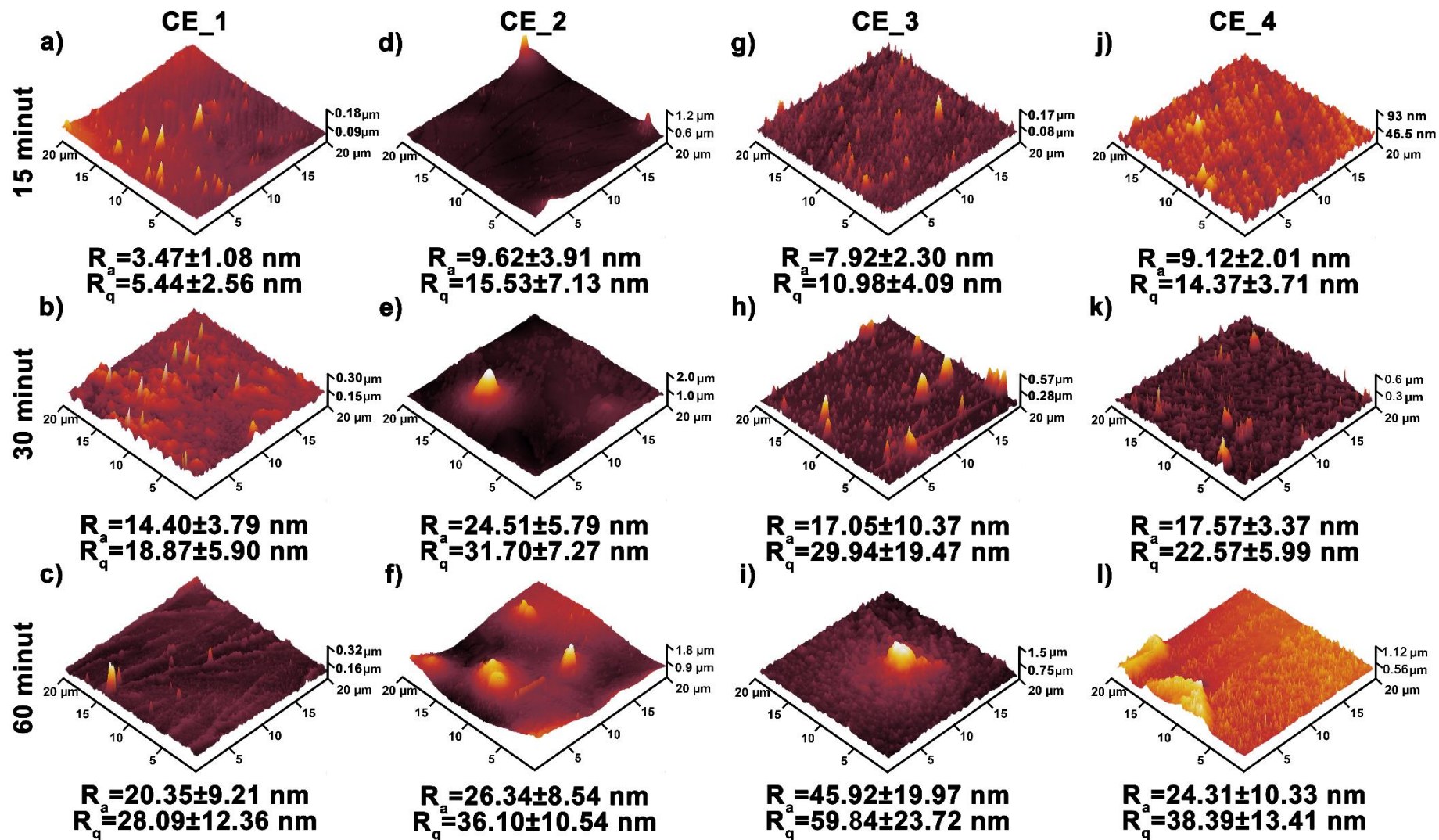
Warto również wspomnieć o kompleksowych badaniach powierzchni trawionego tytanu przeprowadzonych przez D. Nazarov, *et al.* [286] oraz K. Hung, *et al.* [307]. Pierwsza z prac obejmowała trawienie w środowiskach 1) $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ oraz 2) $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$ ³ przez 5 i 15 minut oraz 1, 2, 6 i 24 godziny. Druga praca przedstawiała rezultaty trawienia tytanu w pojedynczych roztworach: 1) w temperaturze pokojowej w 1% HF; w temperaturze wrzenia: 2) 96% H_2SO_4 i 3) 37% HCl oraz ich mieszaninach 4) 37% HCl/96% H_2SO_4 oraz podwójnemu trawieniu 5) najpierw przez 30 s w 1% HF, a następnie 37% HCl/96% H_2SO_4 w temperaturze wrzenia. Procesy trawienia według wszystkich wariantów były prowadzone przez 10 i 15 minut. Jednocześnie warto zauważyć, że rezultaty morfologii powierzchni tytanu trawionych w powyższych pracach nie są zbieżne z rezultatami uzyskanymi w niniejszej pracy.

Podsumowując, przeprowadzone obserwacje modyfikowanych podłoży NiTi wskazują na raczej niewielki wpływ składu chemicznego użytych mieszanin i czasu trawienia na różnice w budowie mikrostruktury powierzchni. Wyjątkiem jest powierzchnia nitinolu po obróbce w mieszaninie $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (udział odpowiednio 66.5%/9%, CE_2), na której widoczne są wytrącenia pochodzące najprawdopodobniej z produktów trawienia.

9.1.2. Topografia powierzchni

Jak wcześniej wspomniano, topografię powierzchni modyfikowanych podłoży analizowano z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych. Przedstawione poniżej obrazy AFM (Rys. 9.4) obejmują mikroobszary 20 x 20 μm , natomiast określenie wartości parametrów chropowatości powierzchni: R_a (średniego arytmetycznego odchylenia profilu od linii średniej) oraz R_q (średniego kwadratowego odchylenia profilu) przeprowadzono na podstawie pomiarów z pięciu mikroobszarów o rozmiarach 5 x 5 μm każdy, wartości zestawiono pod obrazem topografii każdej z modyfikacji.

³ brak stężeń i/lub stosunku objętościowego w opublikowanej pracy



Rys. 9.4. Zestawienie obrazów AFM z powierzchni nitinolu modyfikowanego w mieszaninach: a-c) CE_1 ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$), d-f) CE_2 ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$), g-i) CE_3 (HCl/HNO_3) oraz j-l) CE_4 ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$); przez 15, 30 oraz 60 minut; z podaniem wartości R_a i R_q dla poszczególnych serii eksperymentalnych.

Już na wstępie analiza topografii powierzchni modyfikowanych powierzchni NiTi i wybranych parametrów chropowatości modyfikowanych powierzchni pozwala stwierdzić, że zarówno rodzaj zastosowanej mieszaniny do trawienia oraz czas kontaktu z wybranym medium wpływają na budowę warstwy wierzchniej stopu. Na Rys. 9.4a-c zaprezentowano obraz AFM powierzchni nitinolu po kontakcie z mieszaniną CE_1 ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$). Piętnastominutowy kontakt ze środowiskiem kwasowym (Rys. 9.4.a) nie wpłynął znacząco na ukształtowanie powierzchni stopu, w badanych mikroobszarach można zaobserwować nieliczne stożkowe zmiany o wysokości nieprzekraczającej $0.18\ \mu\text{m}$, zlokalizowane raczej przypadkowo na badanej powierzchni. Taka topografia jest również obserwowana dla niemodyfikowanego nitinolu (patrz Rodz. 9.1.1., Rys. 9.1.c). Stosunkowo niska wartość parametrów chropowatości tej powierzchni ($R_q\ 5.44\ \text{nm}$) jest zbliżona do parametrów dla niemodyfikowanego nitinolu ($R_a\ 4.40\pm 1.77\ \text{nm}$), ale również do powierzchni NiTi modyfikowanego przez D. Batalu, *et al.* [97] w mieszaninach $\text{HF}/\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ o udziałach objętościowych 1:4:5 oraz 1:5:4 przez 2 minuty. Wartości parametru R_q tych modyfikacji wyniosły odpowiednio $6.68\ \text{nm}$ oraz $4.54\ \text{nm}$. Ponadto prowadzono również trawienie nitinolu w tych środowiskach w czasie jednej minuty, dla którego rezultaty parametru R_q wyniosły odpowiednio $1.96\ \text{nm}$ oraz $1.35\ \text{nm}$. Wydłużenie czasu trawienia do 30 minut nieco bardziej różnicuje powierzchnie, widoczne są miejsca z ubytkami materiału po obróbce chemicznej, co przekłada się również na czterokrotny wzrost wartości parametru R_a , do ok. $14.4\ \text{nm}$ (Rys. 9.4.b). Z kolei dla czasu obróbki 1h (Rys. 9.4.c) jeszcze silniej uwidaczniają się zmiany świadczące o zwiększeniu rozwinięcia powierzchni stopu, co można tłumaczyć roztwarzaniem materiału stopu w wybranych miejscach na jego powierzchni. Dla tej serii eksperymentalnej średnie wartości parametrów chropowatości wzrastają wraz z wydłużeniem czasu trawienia, a największa zmiana, około czterokrotny wzrostu wartości R_a i R_q , obejmuje warunki procesu obróbki z czasem po wydłużeniu trawienia z 15 do 30 minut.

Zmiany topografii powierzchni stopu NiTi po obróbce w mieszaninie $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (CE_2) korelują ze zmianami morfologii zobrazowanej na zdjęciach SEM (Rys. 9.3.d-f). Powierzchnia stopu (Rys. 9.4.d-f) jest mniej zróżnicowana niż w przypadku innych serii eksperymentalnych, obejmuje bowiem mikroobszary o ewidentnie większych rozmiarach względem sąsiednich powierzchni, a ich kształt i rozmiary są zbieżne z morfologią przedstawioną na zdjęciach SEM dla tej serii próbek po procesie trawienia. Dodatkowo można zaobserwować, że topografię stopu trawionego przez 15 minut (Rys. 9.4.d) cechują charakterystyczne bruzdy, które wraz z wydłużeniem czasu poszerzają się (Rys. 9.4.e), ewoluując do głębszych zmian po 60 minutach ekspozycji (Rys. 9.4.f). Wartości parametrów chropowatości R_a i R_q , względem 15-minutowej

modyfikacji, zwiększają się około 2.5-krotnie po 30 minutach trawienia, a po obróbce 1h osiągają odpowiednio 26.34 nm oraz 36.10 nm.

Z kolei po modyfikacji powierzchni stopu serii CE_3 (w środowisku HCl/HNO₃), zgodnie z prezentowanymi wcześniej obrazami SEM dla czasu obróbki 15 minut (Rys. 9.2.g, Rys. 9.3.g) nie uwidaczniają się większe zmiany - Rys. 9.4.g. Na powierzchni dominuje regularna tekstura będąca efektem procesu obróbki (Rys. 9.1.c) z nielicznymi, drobnymi, stożkowymi krystalitami, których wysokość nie przekracza 170 nm. Półgodzinny proces trawienia sprzyja powstawaniu na powierzchni jeszcze wyższych tego typu form (do wysokości ok. 570 nm) oraz zmniejszaniu intensywności zróżnicowania powierzchni w porównaniu z krótszym czasem obróbki (15 minut), podobnych do tych dla serii CE_1_30 - Rys. 9.4.b. Godzinna obróbka tej serii prowadzi z kolei do powstania jeszcze drobniejszych zmian na całej powierzchni stopu, z wzniesieniami o wysokości do 1.5 µm, które były również rejestrowane dla innych mikroobszarów modyfikowanych powierzchni. Analizując zmiany wartości parametrów chropowatości tej serii (CE_3) dla dwóch pierwszych czasów trawienia, należy stwierdzić że są one zbliżone do zmian obserwowanych dla serii CE_2 (obróbka w mieszaninie H₂SO₄/H₂O₂), natomiast godzinne trawienie powoduje uzyskanie najwyższej wartości chropowatości (R_a ok. 45±19 nm) spośród wszystkich modyfikacji.

Z kolei powierzchnia podłoży modyfikowanych w mieszaninie NH₃/H₂O₂ (seria CE_4) jest zbliżona do rezultatów otrzymanych w wyniku trawienia w roztworach NH₃/H₂O₂ (seria CE_1) oraz HCl/HNO₃ (seria CE_3). Obróbka przez 15 (Rys. 9.4.j) oraz 30 minut (Rys. 9.4.k) prowadzi do wytworzenia się charakterystycznej struktury do tej obserwowanej również dla serii CE_3_15 i CE_3_30, z nielicznymi, drobnymi stożkowymi formami na powierzchni, których wysokość nie przekracza odpowiednio 93 nm i 600 nm. Topografia podłoża po godzinnym czasie trawienia (Rys. 9.4.l) charakteryzuje się obecnością fragmentów większych zmian, które najprawdopodobniej stanowią struktury okalające powstające wżery, widoczne również na obrazie SEM - Rys. 9.3.l. Parametry chropowatości dla tej serii, wraz z czasem trawienia, zwiększają swoją wartość do ok. 24.31 nm (R_a) dla 60 minutowego czasu obróbki. Zmiany te cechują się również wyższymi wartościami parametrów chropowatości niż dla serii stopu po obróbce w mieszaninie CE_1, czyli przy udziale tych samych składników mieszaniny (NH₃/H₂O₂) lecz różnych stężeniach, odpowiednio 2.3% NH₃/13.6% H₂O₂ i 10.3% NH₃/5.3% H₂O₂.

Wartości parametrów chropowatości po godzinnych modyfikacjach powierzchni w mieszaninach NH₃/H₂O₂ (seria CE_1, Rys. 9.3.c), H₂SO₄/H₂O₂ (seria CE_2, Rys. 9.3.f) oraz

NH₃/H₂O₂ (seria CE_4, Rys. 9.3.1) można porównać z efektami modyfikacji przeprowadzonej z wykorzystaniem 30% HNO₃ w środowisku metanolu (wykorzystanego do elektropolerowania), opisanej przez D. Armitage, *et al.* [308]. Procesy te były prowadzone stosunkowo krótko (przez 1 minutę), w rezultacie uzyskano powierzchnię cechującą się parametrem chropowatości R_a ok. 29 nm. Warto również wspomnieć dwie przywołane wcześniej prace obejmujące trawienie powierzchni nitinolu w 7.5HF/20HNO₃/72.5H₂O [94] oraz elektropolerowanie w środowisku 3.5M H₂SO₄ rozpuszczonego w metanolu [303]. W obydwu przypadkach parametry chropowatości znacznie przewyższały wartości uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej, pierwszy z opisanych procesów skutkowałam zmianami w topografii powierzchni dla wartości R_a 1.63 µm, a więc wykraczającym znacznie poza skalę nanometryczną. Natomiast polerowanie elektrochemiczne w środowisku kwasowym, opisane w drugiej z wymienionych prac, wraz z wydłużeniem czasu procesu pozwalało na obniżenie wartości parametru R_a od ok. 0.62 µm (podłoże niemodyfikowane) do ok. 0.16 µm.

Znacznie wyższe wartości parametrów chropowatości charakteryzują również trawiony biomedyczny stop Ti6Al4V. Cytowane w opisie mikrostruktury półgodzinne modyfikacje w mieszaninie: 1) 9%HCl/24%H₂SO₄ w temperaturze pokojowej oraz 2) 9%HCl/24%H₂SO₄ w temperaturze pokojowej, a następnie w 20%H₂O₂/0.3%HCl w temperaturze 80°C skutkowałam chropowatością powierzchni w skali mikrometrycznej [304]. Parametry R_a oraz R_q dla wspomnianych modyfikacji wyniosły odpowiednio 6.4 µm oraz 7.8 µm (dla pierwszej mieszaniny) i 10.0 µm oraz 13.1 µm dla kolejnego medium. Na tak wysokie wartości parametrów chropowatości miał wpływ udział i stężenia wykorzystanych mieszanin oraz relatywnie długi czas trawienia. Do wspomnianych już czynników wpływających na wzrost parametrów chropowatości powierzchni warto dodać także temperaturę trawienia, która była kluczowym czynnikiem wpływającym na topografię powierzchni stopu Ti6Al4V [305]. W pracy tej wykorzystano do modyfikacji powierzchni mieszaninę 95% H₂SO₄/30% H₂O₂ w warunkach temperatury 25, 40 i 60 °C, i stałej wartości czasu procesu: 30 minut. Wartość parametru R_q powierzchni trawionej w temperaturze bliskiej temperaturze pokojowej wyniosła 31.3 nm. Taka wartość parametru chropowatości R_q jest zbieżna z rezultatami osiągniętymi dla powierzchni nitinolu trawionymi przez 30 minut w roztworach H₂SO₄/H₂O₂ (CE_2, Rys. 9.4.e) oraz HCl/HNO₃ (CE_3, Rys. 9.4.h), jak również z godzinnym trawieniem w środowisku NH₃/H₂O₂ (CE_1, Rys. 9.4.c). Natomiast, wzrost temperatury do 40°C i 60°C spowodował już wzrost wartości R_q do odpowiednio 99.0 nm oraz 561.1 nm. Warto również wspomnieć o pracy, w której do trawienia powierzchni stopu Ti25Nb21Hf wykorzystano mieszaninę H₂SO₄/H₂O₂

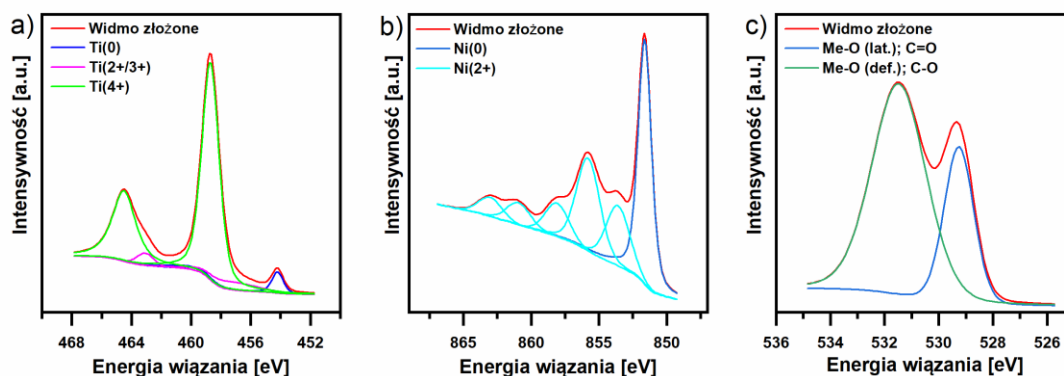
w proporcjach objętościowych 1:1, dla procesu prowadzonego w temperaturze pokojowej. Powierzchnia stopu (trawiona przez 30 minut) powodowała zmiany wartości parametrów chropowatości R_a i R_q , z odpowiednio 26.3 nm i 33.3 nm dla niemodyfikowanego stopu, do wartości 21.3 nm i 27.0 nm [309]. Uzyskane, wymienione wyżej parametry powierzchni dla trawionego stopu są bliskie wartościom osiągniętym przy trawieniu nitinolu w tym samym środowisku, ale innym udziale reagentów ($H_2SO_4:H_2O_2$), mianowicie 7:3, przez 30 i 60 minut (seria CE_2, Rys. 9.4. e-f) w nieznacznie wyższej temperaturze (70°C).

Podsumowując można stwierdzić, że analiza topografii powierzchni stopu modyfikowanego w wybranych mieszaninach (p. Tabela 8.1, rozdz. 8.1.2.) pozwoliła na określenie zmian w budowie warstwy wierzchniej wraz z oceną charakterystycznych wartości parametrów powierzchni (R_a oraz R_q) dla obserwowanych zmian. Najniższe wartości R_a obserwuje się w przypadku modyfikacji w mieszaninie CE_1_15, a największe po 60 minutowej obróbce w roztworze HCl/HNO₃ (seria CE_3_60), odpowiednio 3.47 nm oraz 45.92 nm. Warto dodać, że chropowatość modyfikowanej powierzchni w przypadku otrzymywania pokryw warstwowych jest istotnym parametrem w kontekście ich funkcjonalności, a w przypadku warstw na bazie biopolimerów oddziaływań determinujących ich adhezję do podłoża. Powierzchnie po modyfikacji powinny być wolne od większych ubytków, które zwykle znacznie pogarszają przyczepność otrzymywanych warstw. Dodatkowo uważa się, że umiarkowana wartość chropowatości (R_a od 10 nm do 6 µm) może poprawiać ogólne oddziaływanie na granicy faz (warstwa-podłoże) [310]. Z punktu widzenia aplikacji stopu NiTi warto zwrócić uwagę na rezultaty badań opisanych przez S. Jang, *et al.* [311], który opisuje wyraźne ograniczenie adhezji bakterii (*S. aureus* i *E. coli*) do powierzchni nitinolu cechującej się wartością chropowatości (R_a) w zakresie 20 - 30 nm. Zatem zmniejszenie wartości parametru R_a w skali nanometrycznej wydaje się być szczególnie istotne w przypadku przygotowania powierzchni nitinolu stosowanego bez dalszej modyfikacji. Jednakże również w przypadku otrzymywania warstw biodegradowalnych cecha ta może mieć istotny wpływ na utrzymanie właściwości bakteriostatycznych po dekompozycji warstwy, przy nawracających infekcjach w obrębie wszczepu.

9.1.3. Skład chemiczny

Jak wcześniej wspomniano, niemodyfikowane oraz modyfikowane powierzchnie nitinolu zostały poddane badaniom z wykorzystaniem rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów,

których celem było ilościowe określenie składu chemicznego oraz otoczenia chemicznego pierwiastków w warstwie wierzchniej. Na zestawionych w tym rozdziale wykresach przedstawiono widma XPS w zakresie energii odpowiadającej stanom 2p tytanu, 2p_{3/2} niklu oraz 1s tlenu, wraz z Tabelą prezentującą powierzchniową koncentrację atomów w badanych obszarach. Na Rys. 9.5 zilustrowano widmo dla niemodyfikowanej powierzchni nitinolu.



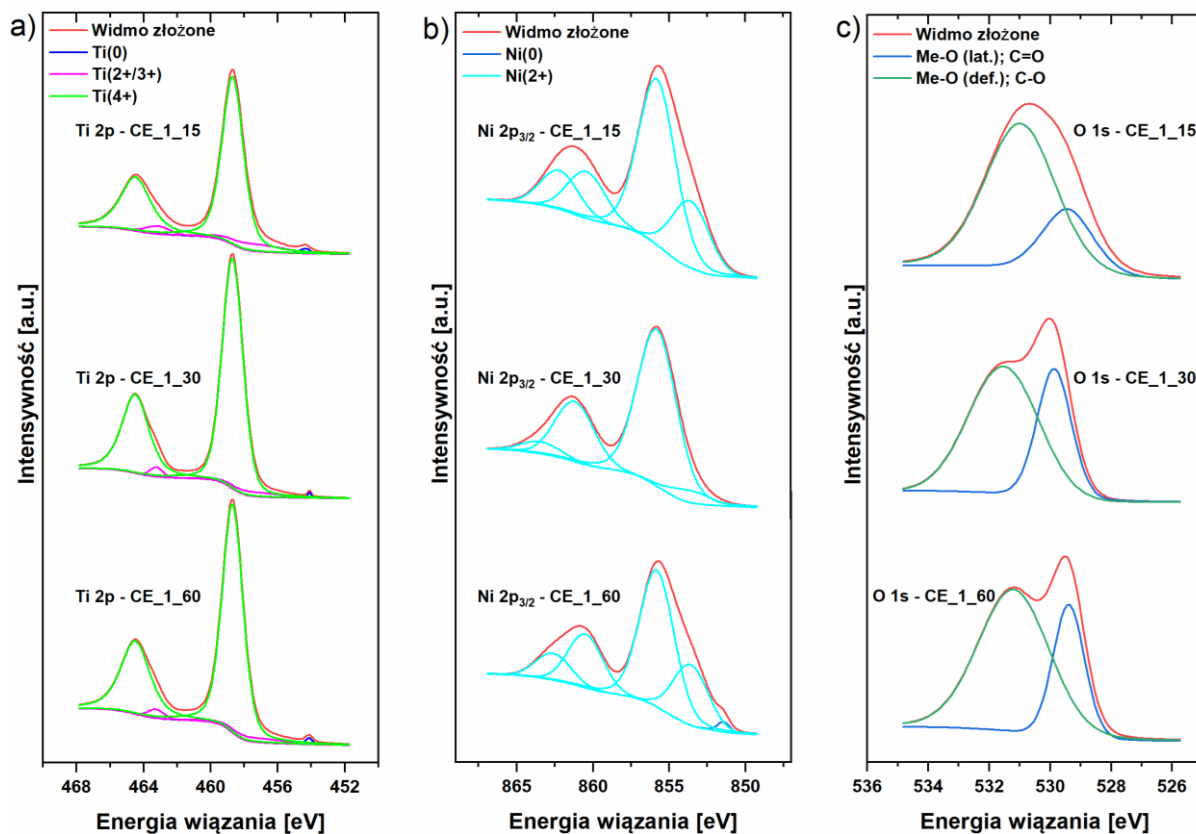
Rys. 9.5. Widma XPS fotoelektronów dla niemodyfikowanej powierzchni nitinolu: a) Ti 2p , b) Ni 2p_{3/2} oraz c) O 1s.

Zaprezentowane widmo (Rys. 9.5.a) wskazuje w pierwszej kolejności na obecność na powierzchni niemodyfikowanego stopu Ti⁴⁺ (linia zielona), który jest charakterystyczny dla dwutlenku tytanu oraz nieznacznych ilości tytanu metalicznego (linia niebieska) oraz tytanu na drugim lub trzecim stopniu utlenienia (linia różowa). Na podstawie widma (Rys. 9.5.b) w zakresie charakterystycznym dla stanów elektronowych niklu 2p_{3/2}, można stwierdzić obecność zarówno metalicznego niklu, jak i Ni²⁺. Z kolei analiza linii tlenu (O1s, Rys. 9.5.c) pokazuje obecność zarówno wiązań tlenu z metalem w sieci atomowej i/lub podwójnego wiązania z węglem (linia niebieska) oraz defektów/wakancji tlenowych [312], te ostatnie określane są również jako tlen zaadsorbowany [313]) i/lub pojedynczego wiązania tlenu z węglem (linia zielona). Na niemodyfikowanej powierzchni NiTi, poza stanami pierwiastków opisanych powyżej, stwierdzono struktury na bazie węgla, węgla i tlenu (C-C, C-O, O=C-O), grupy pochodzące od wiązań węgla i azotu lub azotu i wodoru (C-N, N-H) oraz stany siarczanowe (SO₃²⁻, SO₄²⁻), pochodzące najprawdopodobniej z zanieczyszczeń powierzchniowych stopu. Podsumowanie tych analiz stanowi Tabela 9.1, w której zestawiono udziały procentowe pierwiastków wchodzących w skład analizowanych powierzchni stopu niemodyfikowanego i po procesach trawienia chemicznego.

Tabela 9.1. Koncentracja pierwiastków (% at.) wchodzących w skład badanych powierzchni stopu NiTi

	C			N		O		S	Ti			Ni	
Energia wiązania [eV]	285.0	286.8	289.0	400.1	402.0	530.1	532.0	168.7	453.8	457.0	458.5	852.6	854-862
Stan chemiczny	C-C	C-O	O=C-O	C-N; N-H	N-O	Me-O; C=O	Me-O; C-O	SO ₃ ⁻² / SO ₄ ²⁻	Ti(0)	Ti(II/III)	Ti(IV)	Ni(0)	Ni(II)
CE_ref	35.0	6.9	8.1	2.6	0.0	10.2	25.4	0.8	0.4	0.5	5.2	0.7	1.0
CE_1_15	42.9	3.3	4.8	0.4	0.0	9.7	27.0	0.0	0.1	0.5	4.7	0.0	3.9
CE_1_30	41.0	5.8	5.0	0.8	0.4	12.4	23.4	0.0	0.0	0.3	6.4	0.0	3.5
CE_1_60	28.8	8.1	7.9	3.2	0.1	11.7	28.4	0.1	0.1	0.3	6.6	0.1	3.5
CE_2_15	44.0	2.9	2.1	0.9	2.4	6.2	29.9	6.1	0.0	0.2	4.6	0.1	0.6
CE_2_30	35.5	9.0	0.8	5.2	0.1	25.1	12.6	4.5	0.1	0.6	5.7	0.2	0.4
CE_2_60	46.5	6.1	4.6	1.9	0.8	5.4	26.0	3.3	0.1	0.4	4.4	0.0	0.5
CE_3_15	31.9	4.6	3.1	1.6	0.0	24.5	17.6	0.6	0.3	1.2	11.6	0.8	1.0
CE_3_30	33.1	4.1	2.8	1.2	1.3	19.7	23.3	2.0	0.0	0.5	10.1	0.2	1.5
CE_3_60	30.3	5.4	6.2	1.6	0.4	19.4	23.9	1.0	0.1	0.4	9.1	0.3	1.9
CE_4_15	34.9	5.1	4.6	2.1	0.3	19.9	18.8	0.9	0.3	0.9	10.0	0.7	1.2
CE_4_30	36.9	5.4	6.6	1.8	0.1	19.1	18.4	0.2	0.3	0.6	9.0	0.4	0.8
CE_4_60	38.9	4.4	6.0	1.7	0.1	18.8	17.4	0.2	0.3	0.8	9.2	0.6	1.4

Podobnie, na Rys. 9.6 zestawiono widma uzyskane z powierzchni stopu modyfikowanego w mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_1).

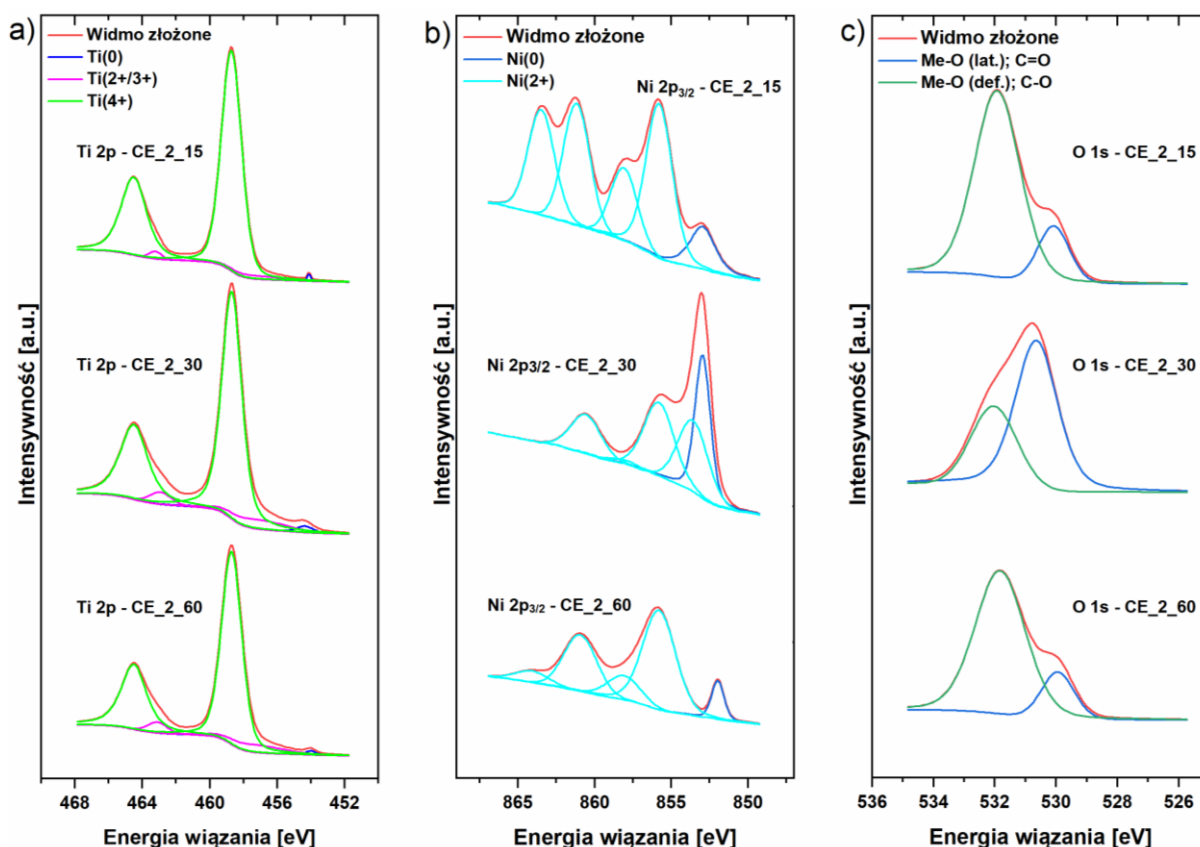


Rys. 9.6. Widma XPS fotoelektronów dla powierzchni nitinolu modyfikowanego w mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_1) przez 15, 30 i 60 minut w zakresach energii charakterystycznych dla: a) Ti 2p, b) Ni 2p_{3/2} oraz c) O 1s.

Podobnie jak w przypadku podłoża niemodyfikowanego dominującym stanem tytanu jest Ti^{4+} , analiza linii spektralnych wskazuje na porównywalnie wysoką intensywność wspomnianego stanu dla podłoży modyfikowanych przez 30 i 60 minut oraz nieco jego niższą koncentrację dla 15 minut trawienia w mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_1, Rys. 9.6.a). Potwierdzają to również wyniki ilościowe składu chemicznego, w którym udziały atomowe (Ti^{4+}) zmieniają się od 4.7% at. do 6.6% at. wraz z wydłużeniem czasu trawienia. Odnosząc te ilości do całkowitej koncentracji tytanu na powierzchni można stwierdzić, że stanowią one w przypadku 30 i 60 minut trawienia *ca.* 95%, a w przypadku 15 minut trawienia *ca.* 88% udziału tytanu. Ta ostatnia wartość jest bliska результатам analizy składu chemicznego uzyskaną przez Z. Yang, *et al.* [302] dla procesu elektrochemicznego trawienia nitinolu w 10% H_2SO_4 w postaci roztworu wodnego oraz rozpuszczonego w środowisku metanolu, dla których udziały

te wyniosły kolejno 87.4% oraz 85.8%. Warto również zwrócić na niską zawartość tytanu na zerowym stopniu utlenienia. Dla pierwszego ze wspomnianych roztworów, $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{aq.})}$, wartość ta wynosi 1.8%, co stanowi rezultat bliski udziałowi Ti^0 na powierzchni stopu modyfikowanego przez 15 minut w mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (udział 1.88%). Ponadto w analizowanej powierzchni, w podobnej ilości dla wszystkich modyfikacji tej serii, obecny jest również $\text{Ti}^{2+/3+}$, oraz tytan metaliczny (w ilości do 0.1% at.). W przypadku niklu (Rys. 9.6.b) występuje on niemal wyłącznie na drugim stopniu utlenienia, w ilości ok. 3.9% at. dla 15 minut i 3.5% at. dla 30 i 60 minut trawienia. Po procesie obróbki stopu z mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ w czasie 60 minut (seria CE_1_60) stwierdzono również nikiel metaliczny w ilości 0.1% at. Warto również wskazać na udział tytanu w stosunku do koncentracji niklu w analizowanych seriach stopu po przeprowadzonych modyfikacjach. Wraz z czasem procesu trawienia wartość wspomnianego ilorazu wzrasta i wynosi kolejno 1.36, 1.91 i 1.94, są to jednocześnie najniższe wartości spośród wszystkich serii modyfikowanych podłoży. Równie niskie wartości proporcji Ti/Ni zostały wyznaczone dla trawienia nitinolu w mieszaninie 40% HNO_3 /10% HF przez 3 minuty (1.68) i 6 minut (1.62) [302] oraz mieszaninie HF/ HNO_3 / H_2O w proporcjach 1:4:5 przez 4 minuty (2.00) [314]. Analizując linie spektralne dla O1s (Rys. 9.6.c) można stwierdzić, że te charakteryzują się podobną ilością wiązań Me-O (def.) i C-O, niezależnie od czasu kontaktu podłoża z mieszaniną $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, natomiast intensywności linii widmowej dla Me-O (lat.) i C=O wzrasta dwukrotnie dla dłuższych czasów obróbki względem procesu trawienia realizowanego w czasie 15 minut. Analiza ta jednoznacznie wskazuje na wpływ stosowanej mieszaniny $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_1) na utlenianie się metalicznych stanów tytanu i niklu do odpowiednio TiO_2 , nieznacznych ilości Ti_2O_3 i NiO , tym samym wiążąc na powierzchni potencjalnie niebezpieczne dla organizmu pierwiastki w formy mniej reaktywne, niż przedstawione i opisane w analizie XPS dla stopu niemodyfikowanego.

W przypadku stopu po obróbce w mieszaninie $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_2) rezultaty analiz zestawiono na rysunku Rys. 9.7.

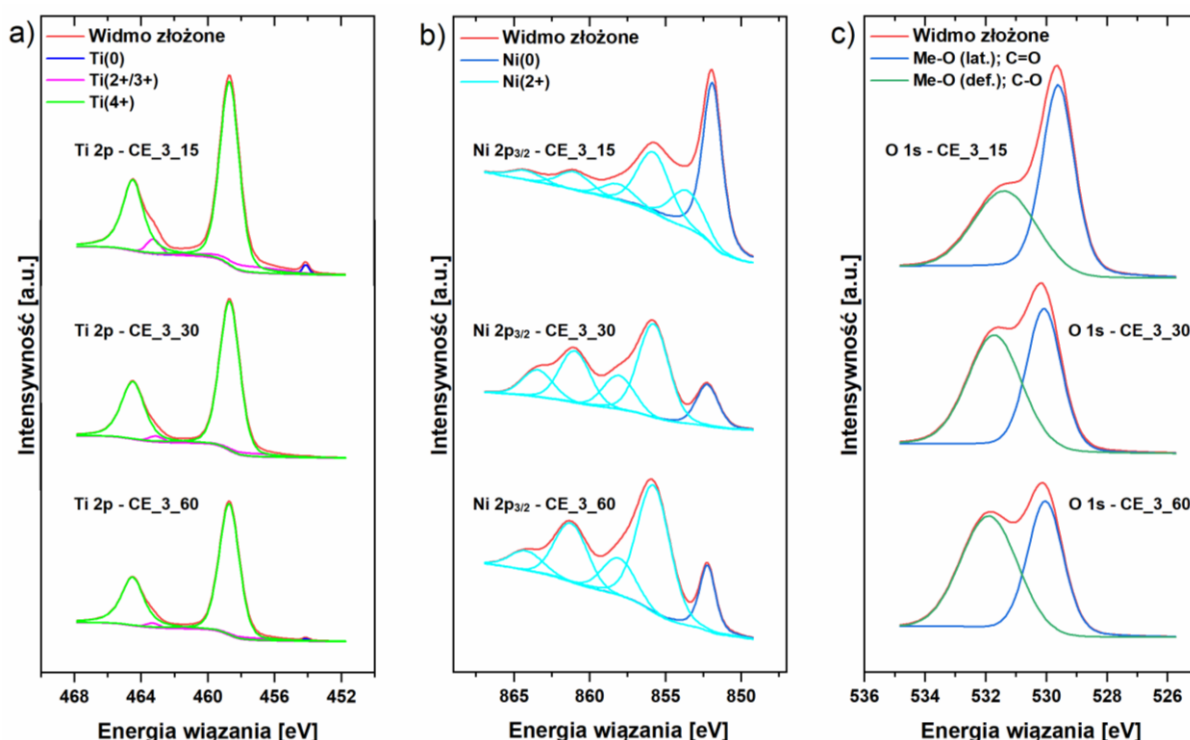


Rys. 9.7. Widma XPS fotoelektronów dla powierzchni nitinolu modyfikowanego w mieszaninie H_2SO_4/H_2O_2 (seria CE_2) przez 15, 30 i 60 minut w zakresach energii charakterystycznych dla: a) Ti 2p, b) Ni 2p_{3/2} oraz c) O 1s.

Linia spektralna Ti2p (Rys. 9.7.a) ma w tym przypadku podobny przebieg do tej prezentowanej na widmie po modyfikacji w mieszaninie CE_1 (2.3% $NH_3/13.6\% H_2O_2$), co potwierdza największy udział stanów Ti^{4+} , z bardzo niewielką ilością tego pierwiastka na innych stopniach utlenienia. Jednakże warto zwrócić uwagę na udział $Ti^{2+/3+}$, który wyniósł 4.16% na powierzchni nitinolu modyfikowanego przez 15 minut, podczas gdy udziały Ti^0 i Ti^{4+} wyniosły kolejno 0% i 95.84%. Rezultaty te świadczą o obecności tytanu tylko w postaci związanej chemicznie, co nie miało miejsca w przypadku modyfikacji przy użyciu 10% $H_2SO_{4(aq.)}$ o bardzo podobnym udziale $Ti^{2+/3+}$ (4.29%), oraz obecności na powierzchni metalicznego tytanu w ilości 9.87% [302]. Wspomniana, zastosowana w niniejszej pracy modyfikacja wpływa również na charakterystyczny przebieg linii spektralnej dla Ni 2p_{3/2}. Dekonwolucja widma w zakresie energii 850.5-866.5 eV dla tej serii stopu (Rys.9.7.b, CE_2) pozwoliła na wyodrębnienie stanów Ni^{2+} (0.4÷0.6% at.) oraz niklu metalicznego w ilości do 0.2% at. Sumaryczny udział niklu na powierzchni stopu modyfikowanego w mieszaninie CE_2 jest najniższy spośród wszystkich serii eksperymentalnych, a ponadto jego ilość zmniejsza się

wraz z wydłużeniem czasu trawienia (z 0.7% at. do 0.5% at.). Podobna tendencja zmian została zaobserwowana przez Lopes, *et al.* [303], po procesie modyfikacji powierzchni nitinolu na drodze elektropolerowania w $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{CH}_3\text{OH})$ w 20°C , w czasie od 30 do 240 s. Z otrzymanych rezultatów (Tabela 9.1.) wynika, że stosunek ilości tytanu do niklu w przeprowadzonych modyfikacjach tej serii eksperymentalnej (CE_2) jest najwyższy spośród wszystkich badanych serii. Zwłaszcza trawienie w czasie 30. i 60 minut wskazuje na znaczną przewagę udziału tytanu na powierzchni modyfikowanego nitinolu, stosunki udziału (% at. Ti/% at. Ni) wynoszą kolejno 10.7 oraz 9.8. Z kolei analiza linii O1s (Rys. 9.7.c) wskazuje na zmienne udziały tlenu w poszczególnych strukturach, dla obróbki w czasie 15- i 60-minut różnice obejmują jedynie intensywności pochodzące od stanów Me-O (def.), C-O, które wyraźnie dominują nad udziałem tlenu związanego w Me-O (lat.), C=O. W przypadku półgodzinnego procesu trawienia udziały te zmieniają się na korzyść wyższego udziału tych ostatnich wiązań. Warto również zwrócić uwagę na obecność znacznego udziału $\text{SO}_3^{2-}/\text{SO}_4^{2-}$ (do ok. 6.1% at.) dla wszystkich czasów modyfikacji stopu w tej mieszaninie, co może wskazywać na obecność zanieczyszczeń po procesie trawienia lub tworzenia się nieznacznych ilości siarczanu(VI) niklu na powierzchni stopu, co z kolei potwierdziła analiza XRD (rozdz. 9.1.4., Rys. 9.10.b). Podsumowując, modyfikacja powierzchni nitinolu w mieszaninie $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (CE_2), pozwala na ograniczenie ilości wolnych pierwiastków metalicznych na powierzchni próbki (Ni i Ti), ale również może prowadzić do tworzenia się NiSO_4 , który uważany jest za cytotoksyczny [315].

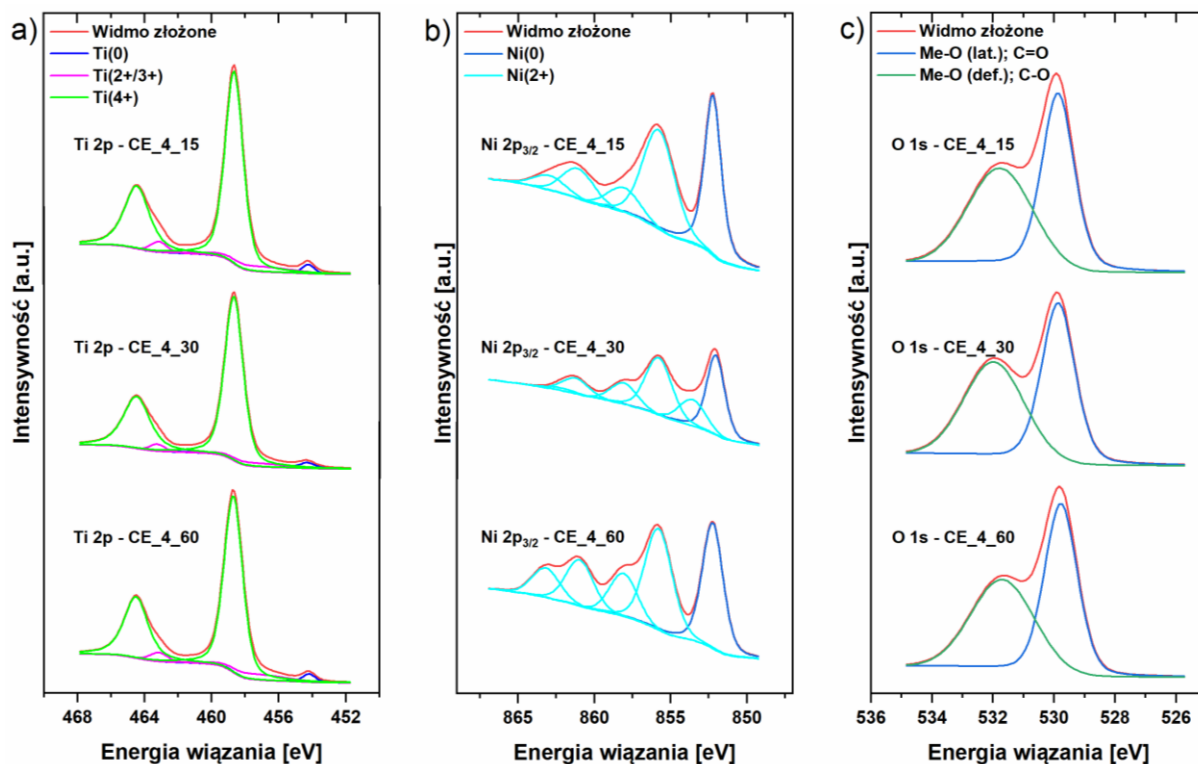
Analiza widm XPS z powierzchni stopu po obróbce w mieszaninie HCl/HNO_3 (seria CE_3, Rys. 9.8)



Rys. 9.8. Widma XPS fotoelektronów dla powierzchni nitinolu modyfikowanego w mieszaninie HCl/HNO₃ (seria CE_3) przez 15, 30 i 60 minut w zakresach energii charakterystycznych dla: a) Ti 2p, b) Ni 2p_{3/2} oraz c) O 1s.

Wpływ mieszaniny HCl/HNO₃ (seria CE_3) wskazuje na istotny wzrost udziału tytanu na czwartym stopniu utlenienia (w obszarze Ti2p, Rys. 9.8.a), względem powierzchni stopu niemodyfikowanego (Rys. 9.5.). Warto dodać, że udział Ti⁴⁺ maleje wraz ze zwiększającym się czasem kontaktu stopu po obróbce w mieszaninie HCl/HNO₃. Zmiany te są zbieżne z tymi obserwowanymi dla linii spektralnej pochodzącej od Me-O (lat.); C=O (Rys. 9.8.c), co wskazuje na zmniejszenie udziału TiO₂ na powierzchni stopu. Analogicznie do 15 minutowej modyfikacji w NH₃/H₂O₂ (seria CE_1) udział tytanu na czwartym stopniu utlenienia na powierzchni stopu modyfikowanego w HCl/HNO₃ (seria CE_3, 15 minut) wynosi także ca. 88%. Istotnym dla wspomnianej modyfikacji jest wzrost intensywności linii spektralnej pochodzącej od niklu metalicznego, której maksimum przypada dla czasu obróbki 15 minut (Rys. 9.8.b), w rezultacie można stwierdzić iż obróbka w tej mieszaninie nie sprzyja ograniczeniu wolnych form metali na powierzchni stopu. Stosunek udziału Ti/Ni w tej serii eksperymentalnej jest relatywnie wysoki, dla kolejnych czasów trawienia wynosi kolejno 7.3, 6.2, 4.4. Ostatni rezultat (dla czasu obróbki 60 min.) jest zbliżony z wartością Ti/Ni (4.45) określoną dla powierzchni modyfikowanego elektrochemicznie NiTi w mieszaninie 1M H₃PO₄/10% NH₄F w czasie dwudziestu minut przez Z. Yang, et al. [302].

Efekt obecności wolnego niklu na powierzchni nitinolu zaobserwowano również po kolejnej modyfikacji powierzchni NiTi, w środowisku $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (CE_4 - Rys. 9.9.).



Rys. 9.9. Widma XPS fotoelektronów dla powierzchni nitinolu modyfikowanego w mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_4) przez 15, 30 i 60 minut w zakresach energii charakterystycznych dla: a) Ti 2p, b) Ni 2p_{3/2} oraz c) O 1s.

Modyfikowane powierzchnie, niezależnie od czasu obróbki, cechuje znaczna obecność Ti^{4+} (w ilości od 9.0 do 10.0% at., Tabela 9.1.), obserwuje się również zwiększoną intensywność linii spektralnych tlenu (Rys. 9.9.c), co świadczy o procesie utleniania tytanu do tlenku tytanu(IV). W warstwie wierzchniej stopu, niezależnie od czasu obróbki, obecny jest również $\text{Ti}^{2+}/\text{Ti}^{3+}$ (do 0.9% at.) oraz Ti^0 w ilościach 0.3% at. Wyraźny problem aplikacyjny stopu NiTi po obróbce w tej mieszaninie stanowi metaliczny nikiel (Rys. 9.9.b), którego ilość (od 0.4% at. do 0.7% at.) jest porównywalna z wartością dla stopu niemodyfikowanego (do 0.7% at.). Warto również dodać, że skład mieszaniny stosowanej podczas obróbki powierzchni stopu dla serii CE_4 różni się od mieszaniny wykorzystywanej dla serii CE_1 stężeniami poszczególnych składników, co też wyraźnie wpływa na skład chemiczny modyfikowanej powierzchni.

Rozważając powyższe modyfikacje nitinolu można stwierdzić, że w wypadku zastosowania mieszanin CE_1 oraz CE_2 (odpowiednio 2.3% NH_3 /13.6% H_2O_2 oraz 66.5% H_2SO_4 /9% H_2O_2)

obserwuje się ograniczenie obecności dużego udziału niklu, w tym dla wybranych serii wolnego niklu, na powierzchni. Sumaryczny udział form niklu (Ni^0 oraz Ni^{2+}) nie przekroczył 4% at., a udział Ni^0 w wybranych warunkach trawienia był bliski 0. Takie rezultaty nie są częstym efektem procesów chemicznego trawienia nitinolu, większość doniesień literaturowych wskazuje na znacznie wyższe udziały niklu. Na przykład polerowanie elektrolityczne NiTi w 30% $\text{HNO}_3(\text{CH}_3\text{OH})$ (1 min., temp. -30°C) prowadzi do udziału 11.3% at. Ni^0 [308], natomiast S. Shabalovskaya, *et al.* [314] po modyfikacji nitinolu w mieszaninie $\text{HF}/\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (stosunek obj. 1:4:5) wykazał udział Ni na poziomie 9.0% at.. Jednakże, już nieco inny skład objętościowy mieszaniny $\text{HF}/\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (7.5:20:72.5), opisany przez A. Pequegant, *et al.* [94], podczas dwuminutowej modyfikacji nitinolu niemal całkowicie eliminuje zarówno Ni^0 , jak i Ti^0 z powierzchni stopu. Przywołane wyniki badań wskazują, że tlenkowa warstwa wierzchnia ma grubość ok. 50 nm, a w trakcie przeprowadzonego profilowania XPS wraz z zagłębianiem się w warstwę wzrastają udziały tytanu i niklu na zerowym stopniu utlenienia.

Z uwagi na niewielką ilość źródeł dotyczących trawienia stopu NiTi w niniejszym akapicie przeanalizowano literaturę w zakresie trawienia powierzchni tytanu oraz stopów biomedycznych na bazie Ti. Przykładem jest praca autorstwa D. Nazarov, *et al.* [286] przedstawiająca modyfikację tytanu w środowiskach 1) $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ oraz 2) $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$ ⁴ przez 5 i 15 minut oraz 1, 2, 6 i 24 godziny. Rezultaty analizy XPS wskazują na całkowite utlenienie tytanu rozpoczynając od 15 minutowego trawienia w $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$. Natomiast w przypadku drugiej mieszaniny ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$) tytan metaliczny nie był obecny na powierzchni tytanu modyfikowanego tylko w przypadku modyfikacji przez 5 minut oraz 24 godziny. W przypadku obydwu modyfikacji grubość warstwy TiO_2 na podłożach przed modyfikacją została określona na 6 nm i wzrastała z czasem do 45÷50 nm. Innym materiałem trawionym chemicznie był stop Ti6Al4V przeprowadzona przez Y. Torres, *et al.* [304], która obejmowała trawienie w: 1) 9% $\text{HCl}/24\%\text{H}_2\text{SO}_4$ (30 minut, RT) oraz 2) 9% $\text{HCl}/24\%\text{H}_2\text{SO}_4$ (30 minut, RT), a następnie w 20% $\text{H}_2\text{O}_2/0.3\%\text{HCl}$ (30 minut, 80°C). Obydwie modyfikacje prowadziły do wzrostu udziału glinu na powierzchni stopu, do kolejno 1) 7.1% wag. oraz 2) 7.7% wag. względem podłoża niemodyfikowanego (4.8% wag.), ale ograniczyły udział wanadu o odpowiednio 1) 0.1% wag. oraz 2) 0.5% wag. Nieznaczne ograniczenie udziału wanadu, przy znacznym wzroście udziału alergennego glinu nie jest efektem, który byłby

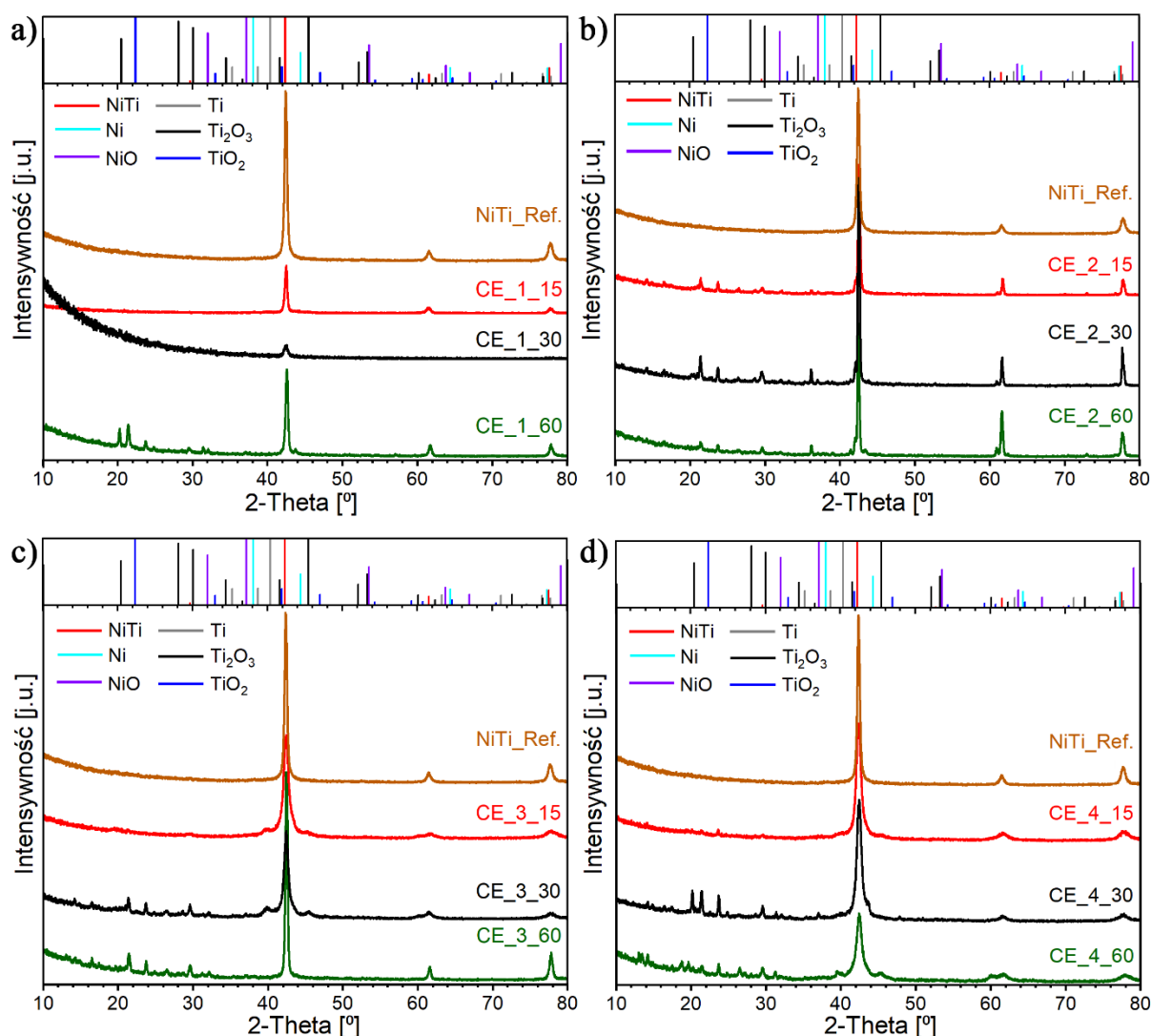
⁴ brak stężeń i/lub stosunku objętościowego w opublikowanej pracy

korzystny z punktu widzenia wymagań stawianych biomateriałom. Powierzchniowej modyfikacji w mieszaninie $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (stosunek objętościowy 1:1, 30 minut) przywołanej już w tym akapicie został również poddany stop $\text{Ti}_{25}\text{Nb}_{21}\text{Hf}$ [309]. Pod wpływem tej modyfikacji udział TiO_2 na powierzchni stopu wzrósł z 1.8% at. dla podłoża niemodyfikowanego do 6.5% at. Jednocześnie nieznacznie (o 0.1% at.) wzrosły udziały metalicznego niobu i hafnu, ale proporcja udziału wolnych form metalicznych do tlenków po trawieniu wyniosła 12:88 (w niemodyfikowanym $\text{Ti}_{25}\text{Nb}_{21}\text{Hf}$ było to 58:42).

Podsumowując ten etap modyfikacji powierzchni, w tym wpływ poszczególnych mieszanin stosowanych w obróbce chemicznej stopu, można stwierdzić, że najlepsze rezultaty w świetle wymagań stawianych modyfikacji chemicznej ograniczającej w głównej mierze wolne formy niklu oraz tytanu wykazała mieszanina użyta dla serii CE_1. Zastosowanie w tym przypadku 2.2% NH_3 i 13.6% H_2O_2 , i obróbka w czasie 30 minut, pozwala na całkowite ograniczenie Ti^0 (do 0 %at.) oraz Ni^0 (do 0 %at.) na powierzchni stopu.

9.1.4. Budowa fazowa powierzchni

Zmodyfikowane powierzchnie stopu NiTi po obróbce w mieszaninach (serie CE_1 – CE_4, p. Tabela 8.1., rozdz. 8.1.2.) w czasie 15, 30 i 60 minut poddano analizie fazowej z wykorzystaniem niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (GID-XRD). Dyfraktogramy te zestawiono na Rys. 9.10.a-d, każdy z nich obejmuje cztery widma w zależności od czasu trawienia, wraz z widmem dla próbki referencyjnej NiTi (stopu niemodyfikowanego).



Rys. 9.10. Widma XRD z powierzchni stopu NiTi modyfikowanego w mieszaninach a) CE_1, b) CE_2, c) CE_3 oraz d) CE_4; w czasie 15 min. (linia czerwona), 30 min. (linia czarna) oraz 60 min. (linia zielona) oraz stopu niemodyfikowanego (linia pomarańczowa). Dodatkowo zaznaczono refleksy charakterystyczne dla poszczególnych faz: NiTi, Ni, NiO, Ti, Ti_2O_3 , TiO_2 (dane z bazy programu Match!)

Analiza refleksów charakterystycznych dla serii referencyjnej stopu (NiTi_Ref., linia pomarańczowa) pozwala na określenie obecności fazy austenitu (B2) o płaszczyźnie krystalizacji (110), na co wskazuje najbardziej intensywny refleks dla wartości 42.5° , oraz piki w pozycji 61.6° oraz 77.8° [297,316].

Rysunek 9.10.a prezentuje dyfraktogram z powierzchni NiTi po procesie trawienia w mieszaninie NH_3/H_2O_2 (seria CE_1) w czasie przez 15, 30 i 60 minut. Zestawienie to pokazuje, że piętnastominutowa modyfikacja nie wpływa znacząco na jakość składu fazowego powierzchni, a jedynie na ilość poszczególnych faz, co jest związane z intensywnością poszczególnych refleksów. Podobną obserwację można poczynić dla podłoża serii CE_1_30,

dla którego rejestruje się tylko jeden mało intensywny refleks przypisywany do płaszczyzny (110) fazy austenitu (B2). Średnie rozmiary krystalitów dla próbek serii podłoża niemodyfikowanego, CE_1_15 i CE_1_30, wyznaczone na podstawie równania Scherrera, wynosiły odpowiednio 169, 191 i 149 nm. Wskazuje to na zmniejszenie się krystalitów NiTi (B2) po 30 minutach procesu trawienia. Z kolei obróbka w czasie 60 minut (CE_1_60), poza charakterystycznymi refleksami dla podłoża niemodyfikowanego, wskazuje również na obecność na powierzchni tlenków tytanu, w postaci tlenku tytanu(III) (20.3°) oraz tlenku tytanu(IV) (21.4°).

Z kolei modyfikacja powierzchni nitinolu w mieszaninie H_2SO_4/H_2O_2 (seria CE_2, Rys. 9.10.b), wskazuje na obecność na powierzchni modyfikowanych podłoży nie tylko wcześniej wspomnianej fazy (B2), charakterystycznej dla NiTi (42.5° , 61.6° , 77.8°), ale również licznych refleksów, zlokalizowanych w położeniu charakterystycznym dla tlenków tytanu i tlenku niklu. Refleksy zarejestrowane dla wartości kątów 2Θ wynoszących 21.4° , 42.0° , 60.8° można przypisać do tlenku tytanu(II) w postaci anatazu o płaszczyznach (101), (200) i (105) [317]. Natomiast na obecność Ti_2O_3 wskazuje refleks dla wartości kąta 29.5° , który stanowi o płaszczyźnie (104) [318]. Tlenek niklu(II) reprezentowany jest przez refleks w położeniu 37.1° , co przypisuje się orientacji fazy tlenku w płaszczyźnie (111) [319]. Dodatkowo w przypadku modyfikacji tej serii można wyróżnić nieznaczny sygnał dla wartości 73.5° , który w nawiązaniu do przeprowadzonej analizy XPS wskazuje na obecność na powierzchni $NiSO_4$ [320].

W przypadku powierzchni stopu po obróbce w mieszaninie HCl/HNO_3 (seria CE_3, Rys. 9.10.c) zarejestrowane widma cechują się między innymi obecnością refleksów charakterystycznych dla próbki referencyjnej stopu. Podobnie jak dla modyfikacji powierzchni z użyciem mieszaniny H_2SO_4/H_2O_2 (seria CE_2) dyfraktogram wskazuje na obecność pików charakterystycznych dla fazy TiO_2 oraz Ti_2O_3 oraz tlenku niklu. Dodatkowo przeprowadzona modyfikacja dla serii CE_3_15 i CE_3_30 wskazuje na obecność refleksów 21.4° i 42.0° , pochodzących od anatazu (TiO_2), które przypisuje się orientacji kolejno (101) i (200). Z kolei refleksy dla wartości 29.5° i 45.6° można przypisać fazie Ti_2O_3 zorientowanej w płaszczyznach kolejno (104) i (024) [317,318]. Ponadto, w pozycji 37.1° wyróżnia się refleks, który pochodzi od tlenku niklu(II), krystalizującego w kierunku zgodnym z płaszczyzną (111) [319]. Warto również zwrócić uwagę na dwa refleksy obecne tylko dla obróbki z czasem 15 i 30 minut. Pierwszy z nich (dla wartości 60.1°) pochodzi od metalicznego tytanu [321]. Natomiast drugi, szeroki refleks zlokalizowany w pozycji 77.9° , stanowi złożenie pochodzące od fazy NiTi krystalizującej w kierunku zgodnym z płaszczyzną (100) oraz niklu metalicznego

(kierunek krystalizacji zgodny z płaszczyzną (022)). Dodatkowo dla tej serii eksperymentalnej można wyróżnić refleks w położeniu 45° , który można interpretować jako obecność fazy niklu metalicznego, krystalizującą w kierunku zgodnym z płaszczyzną (111) [322].

Analizując widma XRD z powierzchni stopu modyfikowanego przez 15 i 30 minut w mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_4) można stwierdzić, że nie wykazują one większych różnic od tych zarejestrowanych po trawieniu stopu w mieszaninie HCl/HNO_3 (seria CE_3). Refleksy o najwyższej intensywności pochodzą od faz nitinolu (42.5° , 61.6° , 77.8°). Dodatkowo dla serii trawionej w czasie 15 minut (CE_4_15), w położeniu dla wartości kąta 77° , obserwuje się charakterystyczne poszerzenie sygnału (obserwowane również w przypadku serii CE_3_15 i CE_3_30), świadczące o obecności fazy Ni (022). Obecność fazy Ni (111) potwierdza również stosunkowo niewielki refleks w ok. 39.8° . Efekty te są również rejestrowane przy dłuższym czasie kontaktu stopu z stosowaną mieszaniną (dla czasów trawienia 30 i 60 minut, odpowiednio seria CE_4_30, CE_4_60), dla których obserwuje się opisywane wcześniej krystalizaty tlenku tytanu(II) (21.4° , 42.0°), tlenku tytanu(III) (19.8° , 29.5° , 45.6°) i tlenku niklu(II) (31.4° , 37.1°). Dodatkowo dla najdłuższego czasu trawienia dla tej serii eksperymentalnej (CE_4_60) dla wartości kąta 2θ wynoszącego 60.1° obserwuje się refleks pochodzący od metalicznego tytanu, o kierunku krystalizacji zgodnym z płaszczyzną (111) [319].

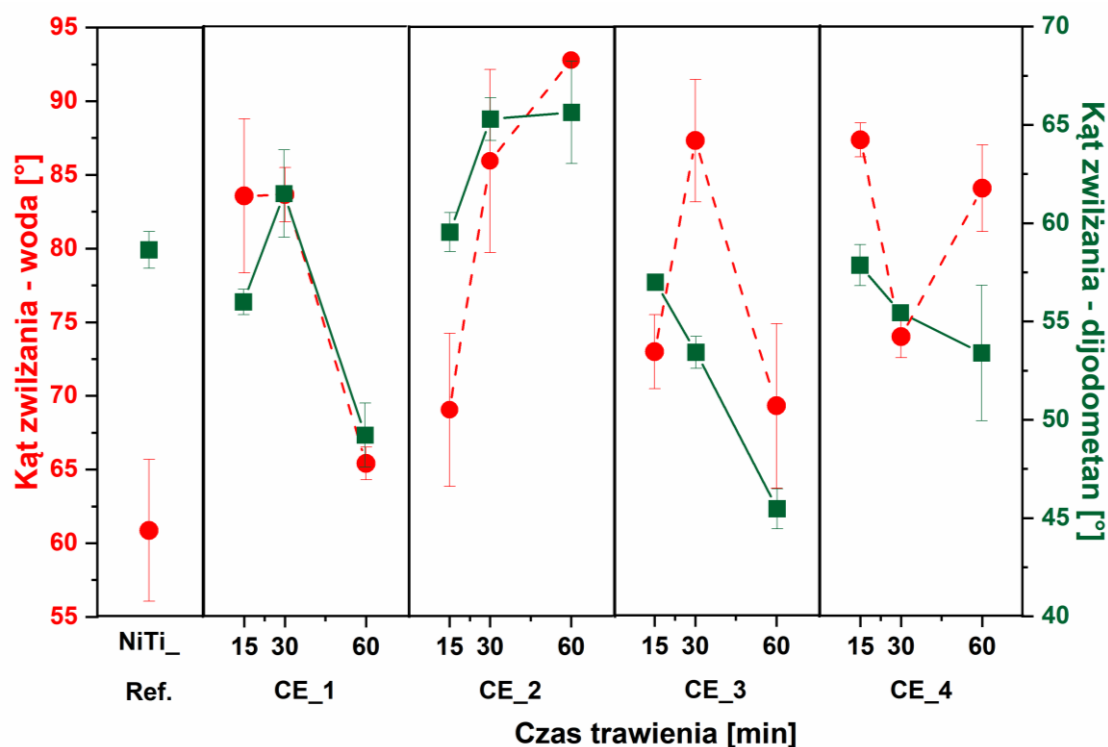
W literaturze jest stosunkowo niewiele prac weryfikujących skład fazowy modyfikowanych chemicznie podłoży NiTi. Jedną z nich jest praca N. Lopes, *et al.* [303] wskazująca na zmiany fazowe w modyfikowanym stopie (austenitycznym o właściwościach pseudoplastycznych oraz martenzytycznym z pamięcią kształtu) w 3.5M H_2SO_4 w środowisku metanolu. Uzyskane wyniki prezentują jednak analizę próbki w całej objętości. Pseudoplastyczny nitinol wskazuje na refleksy austenitu (B2) w płaszczyznach (110) i (200), obecne również we wszystkich modyfikacjach opisanych w niniejszej dysertacji. Niestety w tym przypadku trudno o analizę zmian budowy powierzchni po procesie trawienia, ponieważ w pracy nie zamieszczono dyfraktogramów niemodyfikowanych podłoży.

Podsumowując tę część pracy eksperymentalnej można stwierdzić, iż wybór rodzaju mieszaniny wykorzystywanej w modyfikacji nitinolu jest istotny z punktu widzenia budowy fazowej jego powierzchni. Z jednej strony trawienie powierzchni stopu wybranymi mieszaninami prowadzi do otrzymania odpowiednich faz krystalicznych, w tym tlenków tytanu oraz niklu, ale również i faz metalicznych pierwiastków, stanowiących składowe stopu. Uzyskane rezultaty analizy fazowej pozostają w korelacji z wynikami analizy XPS, opisanymi w Rozdziale 9.1.3. W kontekście wymagań stawianych biomateriałom, mianowicie eliminacji

z powierzchni nitinolu wolnych form metalicznych pierwiastków, proponowany etap modyfikacji chemicznej jest najbardziej zasadny przy zastosowaniu mieszanin CE_1 ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$) oraz CE_2 ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$), w czasie trawienia kolejno 30 i 60 minut. Jednak warto zaznaczyć, że modyfikacja NiTi w obecności kwasu siarkowego(VI) prowadzi również do powstania soli NiSO_4 , która może być cytotoksyczna [315].

9.1.5. Zwilżalność i energia powierzchniowa

Modyfikowana powierzchnia stopu NiTi, poza badaniami mikrostruktury, topografii oraz składu chemicznego i fazowego, była analizowana również pod kątem oceny zwilżalności oraz wartości energii powierzchniowej i jej składowych. Informacje te są bowiem istotne dla określenia budowy powierzchni, której parametry fizykochemiczne współdecydują bezpośrednio o cechach użytkowych stopu, wpływając w kolejnym etapie między innymi na stabilność otrzymywanych warstw, jak również zachowanie powierzchni wszczepu po biodegradacji pokryć na bazie biopolimerów [323]. Rezultaty tych pomiarów dla niemodyfikowanych i modyfikowanych powierzchni nitinolu, przy użyciu wody destylowanej i diiodometanu, zaprezentowano na Rys. 9.11.



Rys. 9.11. Wartości kąta zwilżania powierzchni nitinolu niemodyfikowanego i modyfikowanego w mieszaninach CE_1, CE_2, CE_3 oraz CE_4 przez 15, 30 oraz 60 minut w kontakcie z wodą destylowaną (kolor czerwony) oraz diiodometanem (kolor zielony).

W przypadku podłoża niemodyfikowanego stopu, wartości kąta zwilżania wyniosły średnio 60.9° dla wody oraz 58.6° dla diiodometanu, rezultaty te znajdują swoje potwierdzenie w literaturze [324–327] i będą stanowiły wartości odniesienia w analizie ich wartości dla pozostałych serii eksperymentalnych. Trawienie podłoży przez 15 minut w mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_1) spowodowało znaczne zwiększenie kąta zwilżania wody, do wartości ok. 83.5°. Z kolei dłuższy czas obróbki (30 minut) nie zmienia wartości kąta względem modyfikacji powierzchni stopu w czasie 15 minut, w odróżnieniu do obróbki prowadzonej przez 60 minut, która prowadzi do uzyskania powierzchni w kierunku zwiększonej hydrofilowości ($65.3 \pm 1.1^\circ$). Na obserwowane zmiany może mieć wpływ różny udział TiO_2 na powierzchni stopu, który charakteryzuje się kątem zwilżania ok. 85° [328]. Analiza wartości kąta zwilżania z wykorzystaniem diiodometanu nie ma typowego przebiegu, 15-minutowy proces trawienia doprowadził do zmian na powierzchni skutkujących nieznacznym zmniejszeniem jego wartości, podczas gdy stop po obróbce przez 30 minut wykazuje zwiększenie wartości tego parametru do ok. 61°, a proces 60-minutowy cechuje się zmniejszeniem badanej wartości poniżej tej obserwowanej dla próbki referencyjnej (NiTi_Ref.) oraz stopu serii CE_1_15.

W przypadku stopu NiTi modyfikowanego w mieszaninie $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_2) zmiany wartości kąta zwilżania zarówno dla wody jak i diiodometanu, wzrastają wraz z wydłużaniem czasu trawienia, co pozwala stwierdzić ich koherentny przebieg. Analizując dane dla wody, kąt ten wzrasta z ok. 69.0° (dla 15 minut trawienia), przez wartość ok. 85.9° (30 minut trawienia), aż do wartości $92.7 \pm 0.3^\circ$ dla czasu obróbki 60 minut, czyli wartości typowych dla powierzchni hydrofobowych. Zmiany te można powiązać z obecnością na powierzchni grup SO_4^{2-} , których udział maleje wraz z czasem trawienia lub udziału tlenku niklu, który ma charakter superhydrofobowy, charakteryzujący się kątem zwilżania o wartości 104° [329], jednakże w przypadku tego ostatniego tlenku jego udział na powierzchni po modyfikacji jest niewielki.

Modyfikacji powierzchni stopu NiTi w mieszaninie HCl/HNO_3 (seria CE_3) nie wykazuje określonej tendencji zmian wartości kąta zwilżania. W przypadku zastosowania wody jako cieczy pomiarowej obserwuje się zmianę wartości kąta do wartości $72.9 \pm 2.5^\circ$ i $87.2 \pm 4.2^\circ$, odpowiednio dla czasu trawienia 15 i 30 minut. Natomiast po procesie obróbki w czasie 60 minut wartość ta spada do ok. 69.2°. Obserwowany wzrost wartości może mieć związek z obecnością wolnego niklu na powierzchni, który wykazuje charakter superhydrofobowy [330], ale również z stosunkowo dużym wzrostem wartości parametrów chropowatości powierzchni (R_a 45.92 nm, p. Rys. 9.4) [331].

Trawienie nitinolu w mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (seria CE_4) podobnie jak poprzednia modyfikacja (seria CE_3) nie wykazuje jednoznacznej tendencji zmian. Wyższe wartości kąta zwilżania odnotowano dla 15 i 60 minut trawienia, odpowiednio $87.2 \pm 1.2^\circ$ i $84.0 \pm 2.9^\circ$, podczas gdy kontakt 30-minutowy wpłynął na uzyskanie niższej wartości kąta zwilżania (ca. 75°). Na taki charakter zwilżalności może mieć wpływ obecny metaliczny nikiel na powierzchni, bowiem zmiana jego udziału jest powiązana z uzyskanymi kątami zwilżania wody. Mianowicie wraz ze wzrastającym czasem trawienia występuje on na powierzchni w stężeniu kolejno 0.7% at., 0.4% at. i 0.6% at. (patrz Rozdział 9.1.3., Tabela.9.1). W przypadku użycia dijdometanu wartości kąta zwilżania maleją, ale w niewielkim zakresie zmian, od 53.4 do 57.9° .

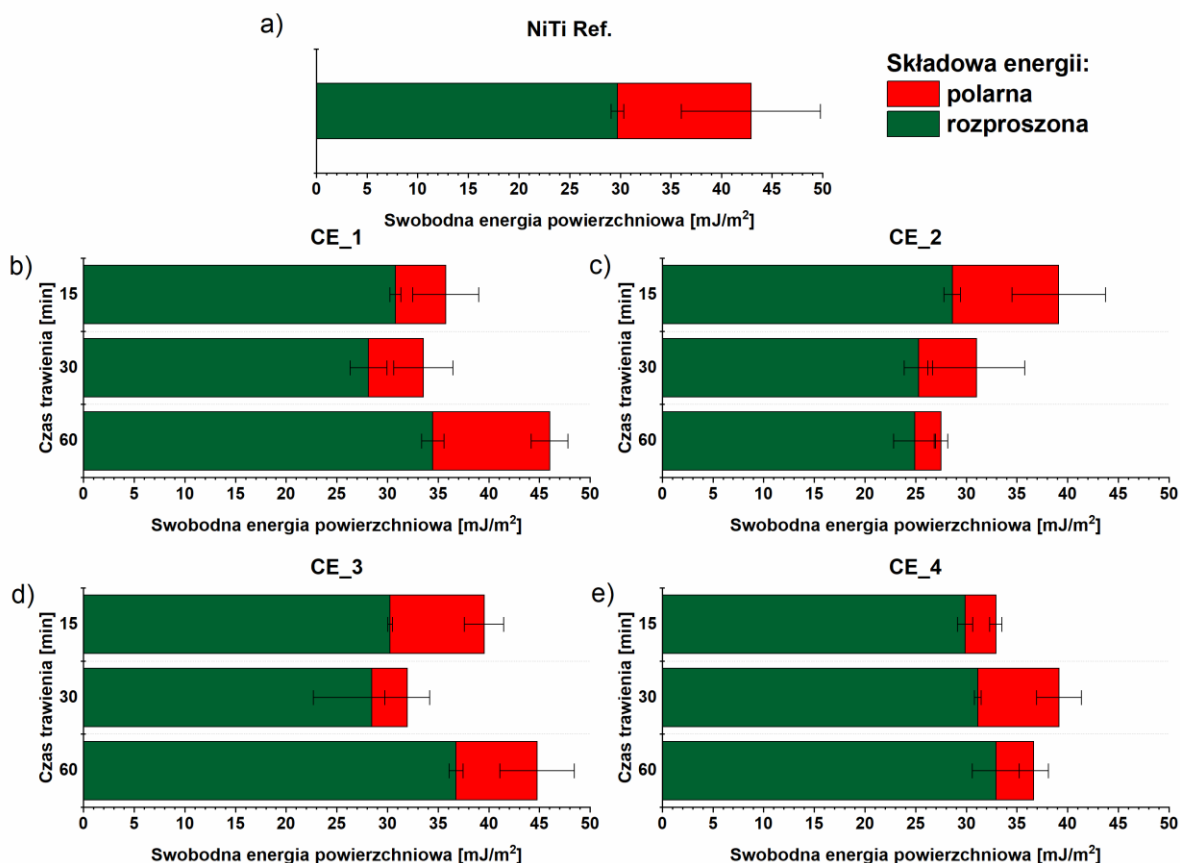
Uzyskane wyniki zwilżalności powierzchni modyfikowanego nitinolu nie korespondują w pełni z dostępnymi w literaturze, co najpewniej wynika z wpływu różnic w zakresie stosowanych procesów obróbki. Przykładowo zmniejszenie wartości kąta zwilżania powierzchni NiTi jest obserwowane przez T. Hu, *et al.* [332], którzy zastosowali w modyfikacji 10% H_2O_2 oraz 30% H_2O_2 w temperaturach 60°C i 100°C . W obydwu przypadkach trawienie trwało aż 24 godziny, a pomiar kąta zwilżania odbywał się po 1, 2, 5, 12 i 24 godzinach procesu obróbki. Niezależnie od stężenia H_2O_2 i temperatury procesu wartość kąta zwilżania zmniejszała się w czasie trawienia względem niemodyfikowanego nitinolu (65.5°). Zgodnie z przewidywaniami najmniej stężony nadtlenek wodoru (10% H_2O_2) i najniższa temperatura (60°C) doprowadziły do najmniejszej zmiany wartości kąta zwilżania, mianowicie o ok. 17° po 24-godzinnym trawieniu. Natomiast największą zmianę parametrów zwilżalności powierzchni wywołało trawienie w 30% H_2O_2 w 60°C przez 24 godziny, dla którego wartość kąta zwilżania wyniosła ca. 21°C . Powyższe rezultaty, mimo wykorzystania w niniejszej pracy doktorskiej mieszanin zawierających nadtlenek wodoru i podniesienia temperatury do 70°C , nie znajdują potwierdzenia w zmianach parametru kąta zwilżania nitinolu. Może to być związane, jak już wspomniano, z obecnością innych składowych mieszaniny trawiącej lub krótkim czasem procesu (do 60 minut). Również znacznie niższą wartość kąta zwilżania (42.5°) uzyskał D. Armitage, *et al.* [308] po elektropolerowaniu nitinolu w 30% HNO_3 w środowisku metanolu (z czasem obróbki 1 minuta, w temp. -30°C).

Trawienie powierzchni nitinolu, w opisanych powyżej pracach, prowadziło do uzyskania powierzchni o charakterze bardziej hydrofilowym. Zupełnie odmienny wpływ procesu trawienia podłoży Ti uzyskał C. Elias, *et al.* [333], na drodze modyfikacji implantu stomatologicznego w mieszaninie $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$, uzyskując kąt zwilżania o wartości 96.24° (wobec 85.20° dla powierzchni niemodyfikowanej. Podobny wpływ, choć w mniejszym

stopniu, zaobserwowali G. Strnad, *et al.* [334], którzy wykorzystali tę samą mieszaninę jednomolowych kwasów (stosunek obj. 1:1) do modyfikacji powierzchni stopu Ti6Al4V. Wartość kąta zwilżania rosła wraz ze wzrastającą temperaturą procesu (60°C, 80°C i 100°C), ale również zbliżała się do wartości (60.76°) dla niemodyfikowanego Ti6Al4V wraz z wydłużeniem czasu obróbki (realizowanym przez 1, 3, 6, 12 i 24 godzin). Przykładem może być sześciogodzinne trawienie w mieszaninie o temperaturze 60°C i 80°C, dla których otrzymane wartości wynosiły kolejno 61.46° i 67.89°.

Zestawione parametry kąta zwilżania mogą być wykorzystane w kontekście predykcji wpływu powierzchni implantów na kontakt z komórkami, ale jednocześnie nie mogą być jedynym czynnikiem brany pod uwagę, co podkreślają M. R. Alexander i P. Williams [335]. Zatem warto zwrócić uwagę na większą tendencję osteoblastów do przyłączania się do powierzchni o charakterze bliższym właściwościom hydrofobowym (zwykle w zakresie od 76÷95°) [336,337], podczas gdy bakterie reprezentują organizmy o właściwościach hydrofilowych, i w związku z tym stroniące od powierzchni hydrofobowych i superhydrofobowych [338]. W świetle tych doniesień zmiana kąta zwilżania wody dla niemodyfikowanego nitinolu w kierunku właściwości hydrofobowych, obserwowana dla każdej z modyfikacji, może być korzystna ale zarazem nie powinna być decydującym parametrem w kontekście osteointegracji i antybakteryjności wszczepu.

Na podstawie wyników wartości kąta zwilżania, zgodnie z modelem Owensa-Wendta, wyznaczono wartości energii powierzchniowej stopu niemodyfikowanego i po procesie trawienia podłoży. Wartości swobodnej energii powierzchniowej ($\gamma_{tot.}$), wraz z podziałem na składowe energii polarnej (γ_p) oraz rozproszonej (γ_d), zestawiono na Rys. 9.12.



Rys.9.12. Wartości energii powierzchniowej dla stopu NiTi a) niemodyfikowanego oraz modyfikowanego w mieszaninach b) CE_1, c) CE_2, d) CE_3 oraz e) CE_4 przez 15, 30 oraz 60 minut, z podziałem na składową polarną (kolor czerwony) i rozproszoną (kolor zielony)

Wartość całkowitej energii powierzchniowej niemodyfikowanego stopu NiTi (Rys. 9.12.a) wynosi ok. 42.93 mJ/m², z czego składowa energii rozproszonej osiąga wartość ok. 29.72 mJ/m², a energii polarnej ok. 13.21 mJ/m². Warto dodać, że są to rezultaty porównywalne do wartości prezentowanych w innych pracach, np. E. Taşkan, *et al.* [339] (γ_{tot} . 43 mJ/m²). Modyfikacja powierzchni nitinolu w środowisku NH₃/H₂O₂ (seria CE_1, Rys. 9.12.b) przez 15 i 30 minut prowadzi do obniżenia wartości γ_{tot} , co jest głównie spowodowane zmniejszeniem wartości składowej polarnej. Natomiast godzinny proces obróbki powoduje zwiększenie części rozproszonej energii, przy utrzymaniu składowej polarnej, co też jest charakterystyczne dla niemodyfikowanego stopu NiTi. Jednocześnie całkowita wartość swobodnej energii powierzchniowej podłoża modyfikowanego przez 1h charakteryzuje się jedną z wyższych wartości w całej serii prowadzonych modyfikacji, co jest związane z niską w stosunku do pozostałych modyfikacji wartością kąta zwilżania.

Z kolei w przypadku modyfikacji stopu w środowisku H₂SO₄/H₂O₂ (seria CE_2, Rys. 9.12.c) wartość swobodnej energii powierzchniowej sukcesywnie maleje wraz

z wydłużeniem czasu obróbki. Warto zwrócić uwagę na fakt, że obniżenie wartości γ_{tot} odbywa się głównie z powodu zmniejszającej się wartości składowej polarnej energii, która to na każdym etapie zmienia swoją wartość niemal dwukrotnie. W rezultacie powierzchnia po godzinnej modyfikacji charakteryzuje się najniższą wartością całkowitej energii powierzchniowej oraz składowej polarnej spośród wszystkich modyfikacji, odpowiednio $27.53 \pm 2.73 \text{ mJ/m}^2$ oraz $24.91 \pm 2.06 \text{ mJ/m}^2$.

W przypadku modyfikacji powierzchni w mieszaninie HCl/HNO₃ (seria CE_3, Rys. 9.12.d), wraz z wydłużeniem czasu trawienia do 30 minut, obserwuje się obniżanie wartości energii powierzchniowej. Podobnie jest to związane ze zmianą składowej polarnej energii, bez większych zmian drugiej składowej. Godzinna modyfikacja charakteryzuje się odmiennym trendem zmian, w którym przy niższej wartości γ_p , niż dla niemodyfikowanego stopu wartość γ_d wzrasta z $29.72 \pm 0.62 \text{ mJ/m}^2$ do $36.78 \pm 0.7 \text{ mJ/m}^2$, osiągając sumarycznie wartość wyższą od wartości całkowitej energii powierzchniowej dla niemodyfikowanego NiTi.

Wzrost wartości składowej dyspersyjnej energii powierzchniowej (γ_d) wraz z wydłużeniem czasu obróbki rośnie również po obróbce podłożu w mieszaninie NH₃/H₂O₂ (seria CE_4, Rys. 9.12.e). Podczas, gdy składowe polarne nie wykazują tych zmian, najwyższą wartość energii całkowitej cechuje się stop po modyfikacji w czasie 30 minut.

Jak wiadomo, swobodna energia powierzchniowa jest jednym z parametrów, który wpływa na adaptację i proliferację komórek na powierzchni stopu. Badania przeprowadzone przez V. M. Villapun Puzas, *et al.* [340] wskazują na wpływ niższych wartości energii powierzchniowej, ze szczególnym wskazaniem na niską wartość składowej polarnej, na wzmożoną proliferację i adhezję komórek w pierwszych godzinach kontaktu, przy jednoczesnym ograniczeniu wzrostu bakterii na powierzchni stopu Ti6Al4V. W kontekście doniesień literaturowych parametry energii powierzchniowej, charakteryzujące się największym potencjałem aplikacyjnym powierzchni, obserwuje się dla modyfikacji 60-minutowej w mieszaninie H₂SO₄/H₂O₂ (seria CE_2).

Z punktu widzenia intencjonalnego wykorzystania procesu trawienia powierzchni nitinolu w środowisku chemicznym rezultaty badań opisanych w Rozdziale 9.1. prowadzą do konkluzji prowadzenia obróbki chemicznej w roztworze NH₃/H₂O₂ (CE_1) przez 30 minut w temperaturze 70°C. Na dobór opisanych warunków trawienia wskazuje niska agresywność roztworu w kontakcie z powierzchnią NiTi, którą potwierdziły obserwacje powierzchni technikami mikroskopii optycznej oraz skaningowej mikroskopii elektronowej. Powierzchnia

po modyfikacji jest wolna od wżerów o znacznych rozmiarach i ubocznych produktów trawienia. Ponadto badania topografii wskazuje na nanometryczną chropowatość, R_a ok. 14.4 nm. Wspomniany parametr chropowatości wraz z wartością kąta zwilżania (dla wody) zbliżoną do wartości charakterystycznych dla powierzchni hydrofobowych (ok. 83.6) oraz stosunkowo niewielką wartością energii powierzchniowej (ok. 33.5 mJ/m²), wraz z niską wartością składowej dyspersyjnej energii (γ_d ok. 5.40 mJ/m²) może wskazywać na potencjalnie korzystny wpływ powierzchni na adhezję i proliferację komórek oraz ograniczenie wzrostu bakterii [310,311,335,336,338,340]. Ponadto, zaproponowane warunki procesu trawienia pozwoliły na wyeliminowanie wolnych form metalicznych Ti oraz Ni, co potwierdziła analiza składu chemicznego powierzchni (XPS) oraz składu fazowego (XRD).

W rezultacie przyjęto, że do dalszych prac eksperymentalnych, mając na uwadze skład fazowy i chemiczny powierzchni stopu po procesie trawienia, jak również inne badane właściwości powierzchni, będzie wykorzystywana mieszanina 2.3% NH₃/13.6% H₂O₂. Obróbkę chemiczną podłoży NiTi należy prowadzić przez 30 minut w temperaturze 70°C.

9.2. Warstwy bionanokompozytowe na bazie chitozanu i wybranych nanocząstek metali

W drugiej części pracy zaprezentowano rezultaty w zakresie otrzymywania warstw biopolimerowych z dodatkiem nanocząstek złota, srebra i miedzi oraz badań ich właściwości fizykochemicznych, korozyjnych i biologicznych. Założenia towarzyszące koncepcji wytwarzania wspomnianych warstw opierały się na spełnieniu wymagań stawianym biomateriałom dla zastosowania w ortopedii, mianowicie biokompatybilności pokryw oraz ich działaniu osteoindukcyjnemu wobec komórek tkanki kotnej (MG-63). Ponadto funkcjonalność otrzymanych warstw miała prowadzić do ich aktywności antybakteryjnej poprzez intencjonalny, kontrolowany system uwalniania nanocząstek metali oraz poprawę odporności korozyjnej w warunkach symulowanego środowiska organizmu.

Proponowane układy warstw obejmowały dwie koncepcje wytwarzania, pierwsza z nich była związana z otrzymaniem warstw metodą immersyjną, z uprzednio przygotowanego koloidu chitozanu z nanocząstkami wybranych metali (Au oraz Ag). Koncepcja ta wykorzystuje redukcję chemiczną do przygotowania koloidu chitozanu, w którym zdyspergowane są nanocząstki. Depozycja warstw zatem nie prowadzi do kontrolowanego lokowania nanocząstek (NPs) w matrycy biopolimeru. Rezultaty uzyskane z wykorzystaniem tego podejścia są w niniejszym rozdziale oznaczone jako CS@NPs, w którym pierwsza część oznacza zastosowany biopolimer, natomiast znak „@” sygnalizuje losowe ułożenie nanocząstek w matrycy biopolimeru, bez wyraźnej granicy pomiędzy strukturą biopolimeru, a występującymi w niej nanocząstkami.

Drugą z proponowanych koncepcji wykorzystaną w pracy jest technika hybrydowa, łącząca dwie metody, immersyjne otrzymywanie warstw biopolimeru oraz otrzymywanie nanocząstek metali (Au, Ag, Cu) techniką kondensacji w obecności gazu obojętnego (Inert Gas Condensation - IGC). W tym przypadku warstwy skrajne stanowiły struktury chitozanu, pomiędzy którymi znajdowała się warstwa nanocząstek wybranych metali. Precyzyjne umiejscowienie nanocząstek w powłoce, kontrola ich rozmiaru i ilości (grubość pokrycia) pozwalała na sformułowanie tezy odnośnie kontrolowanego ich uwalniania z otrzymanej nanokompozytowej powłoki o strukturze warstwowej. Nomenklatura jaką oznaczono ten rodzaj pokryw w pracy obejmuje warstwy biopolimeru CS, wraz z nanocząstkami (NPs), gdzie ukośnik (/) wskazuje na występowanie granicy między poszczególnymi warstwami, np. CS/NPs/CS.

Pokrycia otrzymane z wykorzystaniem powyższych technik na powierzchni nitinolu scharakteryzowano pod kątem składu chemicznego (EDS, FTIR) i fazowego (XRD), obrazowania mikrostruktury (SEM, TEM), topografii powierzchni (AFM) oraz zwilżalności i wartości energii powierzchniowej. Z kolei testy odporności na korozję zostały przeprowadzone z wykorzystaniem woltamperometrii liniowej (LSV), pomiaru potencjału obwodu otwartego (OCP) oraz elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS). Badania odpowiedzi biologicznej warstw w kontakcie z komórkami (MG-63) oraz bakteriami Gram+ *S. aureus* i Gram- *E. coli* zostały przeprowadzone zgodnie z protokołami badań biologicznych i zaprezentowane na wykresach ilustrujących odpowiednio przeżywalność komórek lub zahamowanie wzrostu bakterii. Ponadto ilość uwalnianych jonów pochodzących z nanocząstek o działaniu antybakteryjnym została zweryfikowana z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS).

9.2.1. Morfologia nanocząstek wybranych metali

Kształt nanocząstek, ich kształt, rozmiar oraz rozkład w matrycy (dystrybucja), są istotnymi czynnikami wpływającymi na ich właściwości. Generalnie, zgodnie z danymi literaturowymi, aktywność antybakteryjna wspomnianych nanomateriałów wzrasta wraz ze zmniejszeniem ich średnicy [341–343], czemu sprzyja też mniejszy rozrzut charakterystycznego rozmiaru. Prowadzone badania wskazują, że nanocząstki o kształtach zapewniających im możliwie jak największe rozwinięcie powierzchni są bardziej skuteczne w eradykacji bakterii [344,345]. Dodatkowo, specyficzne formy kształtu nanocząstek mogą mieć także wpływ na aktywność antybakteryjnością, przykładem mogą być te o strukturze nanogwiazdy, czyli nanocząstki sferyczne zakończone charakterystycznymi ostrymi igłami [346]. W poniższym rozdziale zaprezentowano wyniki badań w zakresie budowy morfologicznej nanocząstek otrzymywanych metodą redukcji chemicznej (AuNPs, AgNPs) oraz tych uzyskanych z wykorzystaniem techniki kondensacji w obecności gazu obojętnego (AuNPs, AgNPs, CuNPs). Nanomateriały te były następnie wykorzystywane w kolejnych etapach otrzymywania pokryć na powierzchni stopu NiTi.

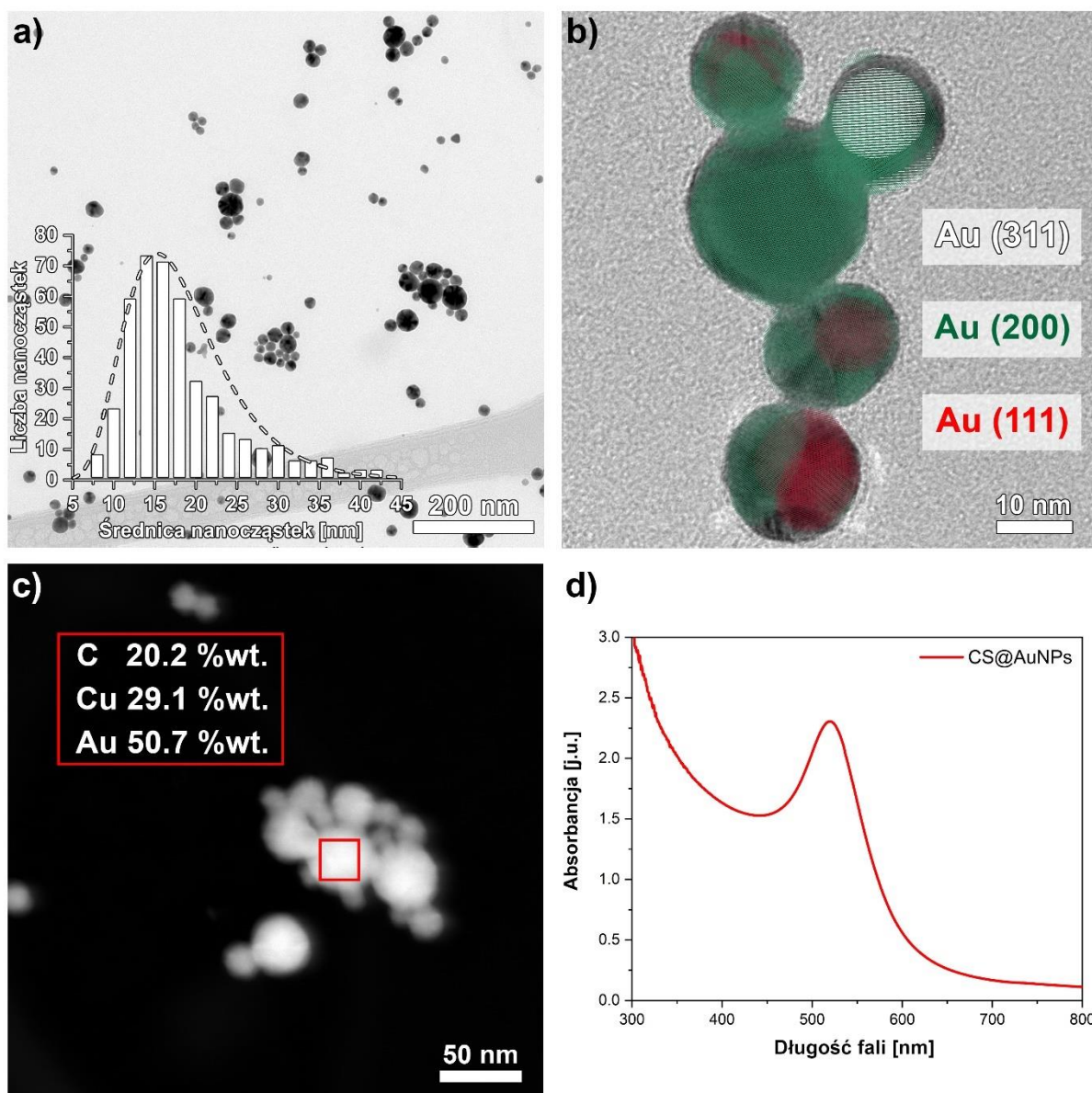
9.2.1.1. Nanocząstki złota

W tej części pracy w rozdziale 9.2.1.1.1. przedstawiono wyniki analizy morfologii nanocząstek złota stanowiących koloid z chitozanem (CS@AuNPs), uzyskanych metodą

redukcji chemicznej. Natomiast w rozdziale 9.2.1.1.2. zaprezentowano rezultaty dotyczące morfologii tych struktur otrzymanych w procesie IGC. Nanocząstki, w celu określenia rozkładu ich wielkości, zostały poddane obrazowaniu w trybie jasnego pola mikroskopii TEM, pozwalającej na pomiar odległości międzypłaszczyznowych, jak również w ciemnym polu pozwalającym na analizę chemiczną EDS. Dodatkowo dla koloidu przedstawiono widma UV-vis, a dla otrzymanych nanocząstek wyniki analizy ze spektrometru masowego.

9.2.1.1.1. Koloid CS@AuNPs

Wyniki analizy morfologii i składu chemicznego koloidu oraz wartości absorpcji w zakresie światła widzialnego z nanocząstkami złota, otrzymanego w procesie redukcji kwasu chlorozłotowego (HAuCl_4) w środowisku chitozanu (opis w Rozdziale 8.1.4.1.1.), zaprezentowano na Rys. 9.13.



Rys. 9.13. Analiza morfologii koloidu CS@AuNPs: a) obraz TEM w jasnym polu, wraz z załączonym rozkładem wielkości nanocząstek, b) obraz TEM w wysokiej rozdzielczości wraz z mapą odległości międzypłaszczyznowych, c) obraz TEM w ciemnym polu wraz z analizą chemiczną EDS oraz d) widmo UV-vis.

Nanocząstki otrzymane w osnowie chitozanu prezentują sferyczną morfologię budowy (Rys. 9.13.a), obrazowanie sugeruje ich tendencję do łączenia się w większe grupy, jednak nie stanowi to o ich typowej agregacji, widoczne są bowiem niewielkie przerwy między poszczególnymi nanocząstkami, co jest zapewne związane z obecnością cienkiej warstwy chitozanu w obrębie ich powierzchni. Rezultaty tych obserwacji znajdują potwierdzenie także w innych doniesieniach naukowych, przykładem jest praca G. Mendoza, *et al.* [347], w której nanocząstki złota również tworzyły zagregowaną strukturę, jeszcze większą od tej prezentowanej na Rys. 9.13.a. Jednak podobnie jak w przypadku prezentowanych wyników

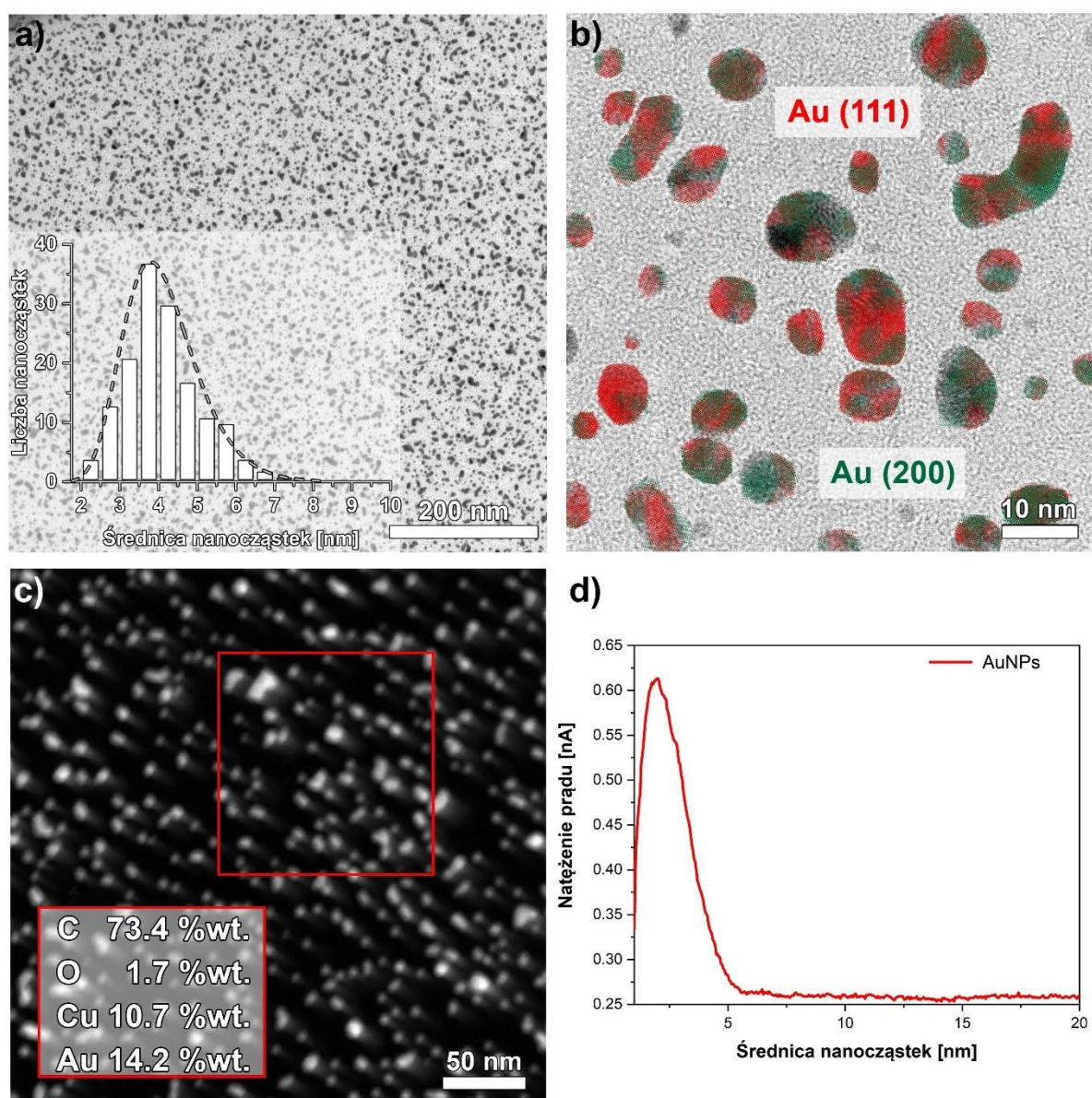
obserwowano także cienką otoczkę chitozanu, która oddzielała poszczególne nanocząstki złota. Na podstawie histogramu ilustrującego rozkład charakterystycznego rozmiaru nanocząstek złota można stwierdzić, że ich średnica zmienia się w zakresie od 7 do 45 nm, natomiast średni rozmiar nanocząstek wynosi średnio 18.5 ± 7.2 nm. Podobną wartość średniego rozmiaru nanocząstek złota (16 ± 5 nm) uzyskał K. Kleszcz, *et al.* [348], ale zakres średnic nanocząstek różnił się od uzyskanego w pracy doktorskiej i wynosił 14÷19 nm, na co mógł wpłynąć wykorzystany do syntezy chitozan. Na taką możliwość wskazuje również praca A. Regiel-Futry, *et al.* [349], prezentująca różnice w morfologii nanocząstek w zależności od stężenia prekursora złota i masy cząsteczkowej wykorzystanego chitozanu. Opisywane rezultaty wskazują na istotny wpływ masy cząsteczkowej chitozanu i bardzo nieznaczny wpływ stężenia prekursora na wartość średnicy nanocząstek.

Obrazowanie koloidu przy użyciu mikroskopu wysokiej rozdzielczości pozwoliło na określenie (metodami matematycznymi) odległości międzypłaszczyznowych krystalitów właściwych dla złota. Na Rys. 9.13.b zaprezentowano obrazy TEM nanocząstek wraz z zamarkowanymi na odpowiednie kolory obszarami, właściwymi dla odległości międzypłaszczyznowych, mianowicie $2.35\text{\AA}$ (kolor czerwony), $2.04\text{\AA}$ (kolor zielony), $1.23\text{\AA}$ (kolor biały), kolejno dla płaszczyzn (111), (200) oraz (311) [350]. Analiza pozwoliła na stwierdzenie, że otrzymane nanocząstki w obrębie koloidu mogą występować zarówno w formie struktur monokrystalicznych, jak również polikrystalicznych. Podobną budowę, mieszaninę nanocząstek mono- i polikrystalicznych AuNPs, otrzymanych w procesie ablacji laserowej, obserwował R. Torres-Mendieta, *et al.* [351]. Uzyskane wyniki wskazywały na występowanie charakterystycznych, dominujących płaszczyzn dla tych struktur, mianowicie (111) oraz (200), analogicznie do określonych na Rys. 9.13.b.

Przeprowadzona analiza EDS pozwoliła na określenie składu chemicznego nanocząstek, potwierdziła obecność złota, węgla będącego głównym składnikiem chitozanu jak i obecnego w formie cienkiej błonki węgla na powierzchni siateczki TEM i budujących ją atomów miedzi. Ponadto, zaraz po otrzymaniu koloidu, przeprowadzono pomiary absorpcji promieniowania UV-vis (Rys. 9.13.d), które wskazują na charakterystyczne dla nanocząstek złota wzbudzenie powierzchniowego rezonansu plazmonowego, dla wartości długości fali ok. 522 nm [352].

9.2.1.1.2. Nanocząstki złota wytworzone metodą IGC

W tym przypadku, podobnie jak dla nanocząstek otrzymanych metodą redukcji chemicznej, rezultaty obserwacji morfologii oraz składu chemicznego koloidu z nanocząstkami złota otrzymanymi w procesie IGC, zobrazowano z wykorzystaniem mikroskopii TEM – Rys. 9.14.a-c. Opis procesu kalibracji warunków wspomnianego procesu oraz otrzymywania nanocząstek przedstawiono w Rozdziale 8.1.4.1.2. Dodatkowo widmo masowe pomiaru rozkładu wielkości nanocząstek *in situ* ilustruje Rys. 9.14.d.



Rys. 9.14. Analiza morfologii nanocząstek złota otrzymanych metodą IGC: a) obraz TEM w jasnym polu, wraz z załączonym rozkładem wielkości nanocząstek, b) obraz TEM w wysokiej rozdzielczości wraz z mapą odległości międzyplaszczynowych, c) obraz TEM w ciemnym polu wraz z analizą chemiczną EDS oraz d) widmo masowe – *in situ*.

W tym przypadku otrzymane nanocząstki (Rys. 9.14.a) cechuje również w znacznej większości budowa sferyczna, wyróżnić jednak można niewielką ilość struktur o geometrii elipsoidy. Średnica AuNPs zmienia się w zakresie $2 \div 7$ nm, przy czym ich średni rozmiar wynosi 4.1 ± 1.0 nm. Przykładowo, nieznacznie wyższe wartości rozkładu wielkości nanocząstek złota, mianowicie $4 \div 10$ nm (dla średniej wartości 6.46 ± 0.02 nm), otrzymywanych również metodą IGC uzyskał A. Saj, *et al.* [353]. Jednakże warto wspomnieć, że ze względu na dużą ilość zmiennych parametrów technologicznych w procesie wytwarzania nanocząstek, ich rozmiary mogą być różne, między innymi w zależności od wykorzystanego gazu do procesu kondensacji [354] oraz wartości jego przepływu (ciśnienia w reaktorze) [355].

Obserwacje z wykorzystaniem mikroskopii TEM (Rys. 9.14.b) wykazały, że rozkład faz w obrębie utworzonych krystalitów obejmuje płaszczyznę (111) (kolor czerwony, $d=2.35\text{\AA}$) oraz płaszczyznę (200) (kolor zielony, $d=2.04\text{\AA}$). W przeciwieństwie do CS@AuNPs nie stwierdzono w tym przypadku obecności fazy krystalizującej w płaszczyźnie (311). Warto zwrócić uwagę na obecność obydwu płaszczyzn we wszystkich nanocząstkach zaprezentowanych na Rys. 9.14.b Polikrystaliczność nanomateriałów jest bowiem charakterystyczną cechą materiałów otrzymywanych z wykorzystaniem techniki kondensacji w obecności gazu obojętnego wykorzystującej rozpylanie magnetronowe, co potwierdzili w swoich pracach P. Grammatikopoulos [356] i X. Zhu [357]. Natomiast monokrystaliczne nanocząstki można osiągnąć wykorzystując tę technikę wzbudzając atomy otrzymywanego materiału np. poprzez odparowanie go w warunkach próżniowych jak prezentują A. Izadi i R. Anthony [358].

Obserwacja tych struktur w ciemnym polu wraz z analizą składu chemicznego (Rys. 9.14.c) wskazuje na obecność dużej ilości węgla (do ok. 73% wag.) i mniejszego udziału miedzi (do 10.7% wag.), stanowiącego użyty materiał do preparatyki TEM. Obecność tlenu (ok. 1.7% wag.) jest najprawdopodobniej związana z utlenieniem miedzianej siateczki. Warto w tym przypadku zwrócić uwagę na brak możliwości pomiaru składu chemicznego w obrębie pojedynczych struktur nanometrycznych, co było możliwe w przypadku koloidu (CS@AuNPs) ze względu na budowę analizowanych krystalitów tworzących swego rodzaju większe skupiska nanocząstek. W tym przypadku zastosowano analizę uśrednioną, co w rezultacie jest powodem wysokiego udziału pozostałych pierwiastków (przy niewielkiej ilości złota, 14.2% wag.). Dodatkowo na Rys. 9.14.d zamieszczono widmo masowe dla uzyskanych nanocząstek Au w reaktorze IGC. Wartość średnia charakterystycznego rozkładu wielkości nanocząstek (uzyskane w pomiarach *in situ*, $2 \div 5$ nm) jest zbieżna z wartościami

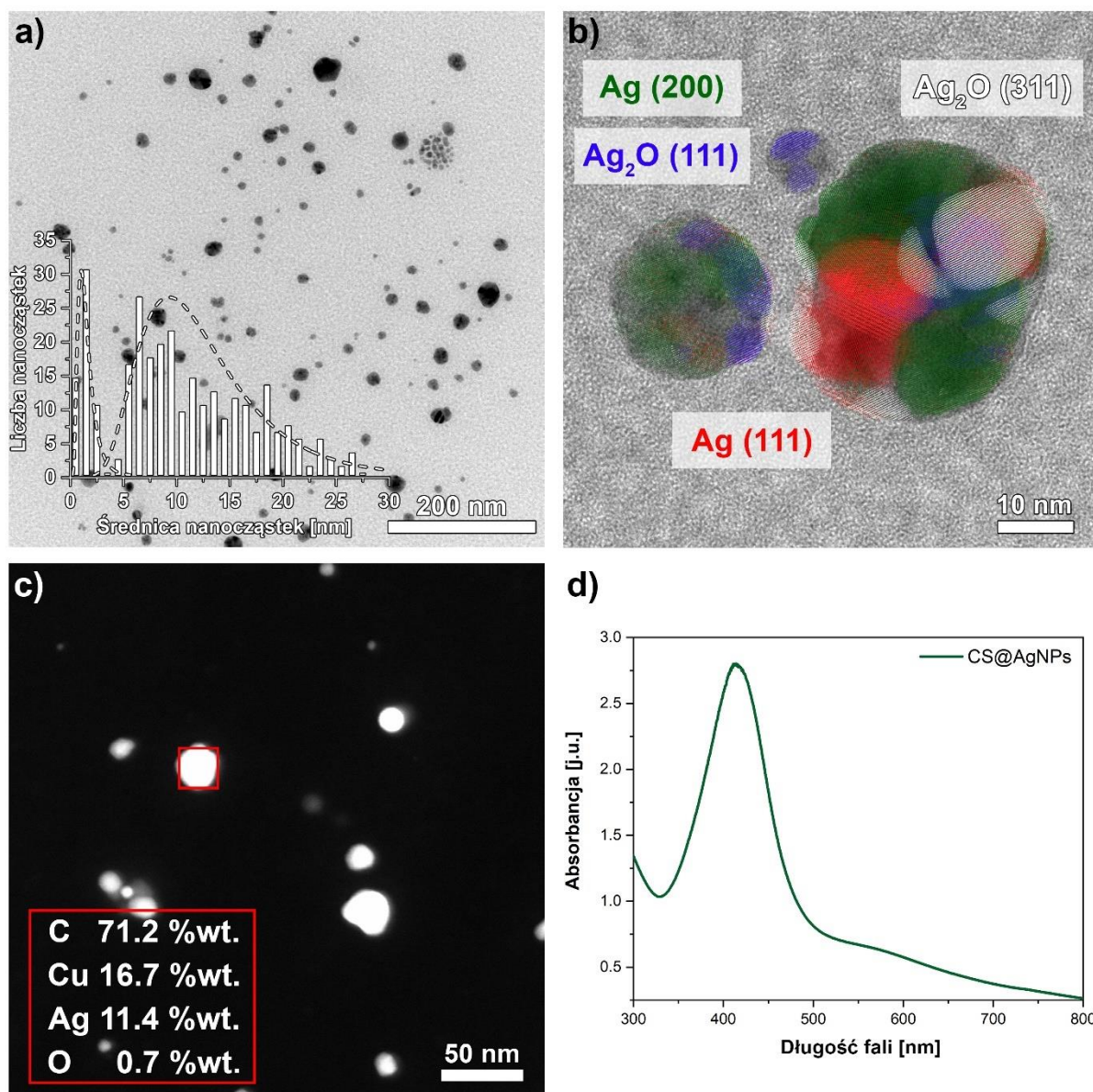
prezentowanymi na histogramie, będącymi rezultatem badań przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

9.2.1.2. Nanocząstki srebra

Dla wspomnianych nanomateriałów, morfologia, rozkład wielkości nanocząstek Ag oraz składzie chemicznym badanych struktur, otrzymanych na drodze redukcji (CS@AgNPs) oraz w procesie kondensacji w obecności gazu obojętnego zaprezentowano kolejno w rozdziałach 9.2.1.2.1. oraz 9.2.1.2.2. Otrzymane nanomateriały, podobnie jak nanocząstki złota opisane w rozdziale 9.2.1.1., poddano obrazowaniu w jasnym polu mikroskopu TEM, co pozwoliło na określenie rozkładu ich rozmiarów, w dalszej kolejności badań faz stanowiących wspomniane nanocząstki jak i analizie chemicznej. Badania powierzchniowego rezonansu plazmonicznego nanocząstek w postaci koloidu (CS@AgNPs) zmierzono z wykorzystaniem spektrometru UV-vis, natomiast do określenia rozkładu wielkości nanocząstek, co pozwoliło w trakcie procesu IGC kontrolować pomiary tych struktur (AgNPs), wykorzystano spektrometr masowy – pomiary *in situ*.

9.2.1.2.1. Koloid CS@AgNPs

Analogicznie do wyników przedstawionych w Rozdziale 9.2.1.1.1., koloid CS@AgNPs, powstały wyniku redukcji azotanu srebra kwasem askorbinowym w obecności chitozanu (Rozdział 8.1.4.1.2.), poddano analizie budowy morfologicznej, składu chemicznego oraz pomiarom absorbancji w świetle UV-vis, wyniki zaprezentowano na Rys. 9.15.



Rys. 9.15. Analiza morfologii koloidu CS@AgNPs: a) obraz TEM w jasnym polu, wraz z załączonym rozkładem wielkości nanocząstek, b) obraz TEM w wysokiej rozdzielczości wraz z mapą odległości międzyplaszczynowych, c) obraz TEM w ciemnym polu wraz z analizą chemiczną EDS oraz d) widmo UV-vis.

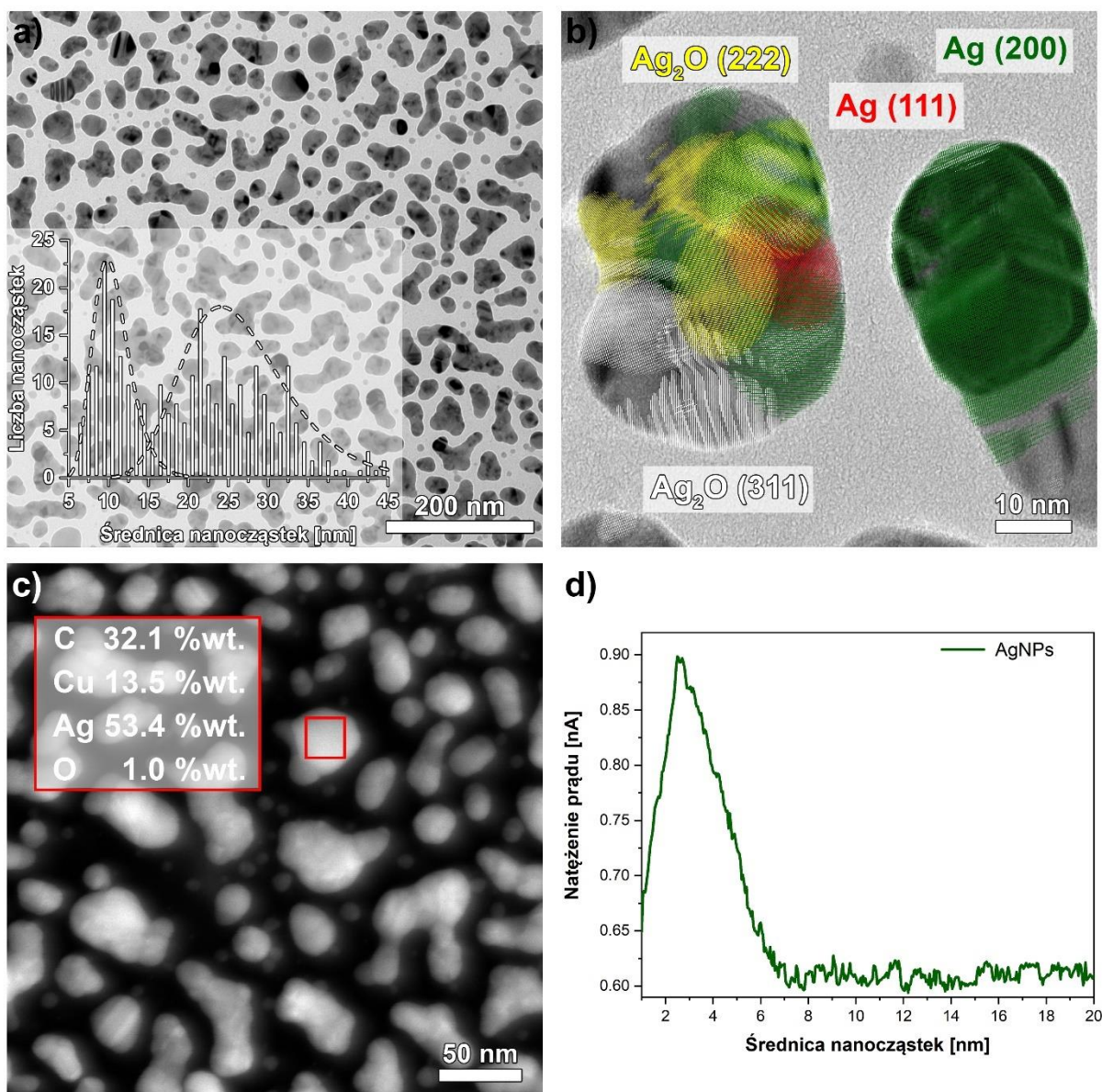
Nanocząstki srebra wytworzone wspomnianą metodą redukcji cechuje sferyczny kształt (Rys. 9.15.a) jednak, w przeciwieństwie do nanocząstek złota otrzymanych tą metodą (patrz Rodz. 9.2.1.1.1., Rys. 9.13.), nie wykazują one tendencji do tworzenia skupisk i aglomeratów. Średnice wspomnianych nanostruktur w CS@AgNPs mieszczą się w zakresie 5÷27 nm, a średnia wartość ich rozmiarów wynosi ok. 10.5 ± 6.8 nm. Analiza danych wskazuje na wyróżnienie w prezentowanym rozkładzie zakresu od 1 nm do 4 nm, dotyczy on jednak stosunkowo niewielkich agregatów zbudowanych z bardzo małych nanocząstek. Najprawdopodobniej jest to związane z faktem, iż część z nich osiąga po procesie nukleacji

mniejsze rozmiary (w zakresie ok. $1 \div 4$ nm), co może wynikać z krótszego czasu ich wzrostu, późniejszej fazy inicjacji tego procesu lub przerwane go procesu dojrzewania zarodków je tworzących. Na takie zachowanie może wskazywać mechanizm procesu wzrostu nanocząstek opisany (na przykładzie nanocząstek Pt) przez J. Quinson i K. Jensen [359]. Na powyższy mechanizm wskazuje również praca A. Regiel-Futyr, *et al.* [360], mianowicie w przypadku najwyższego stężenia prekursora srebra (ok. 10 mM) następuje formowanie nanocząstek o średnim rozmiarze 5.5 ± 1.1 nm, co widoczne jest na otrzymanych w publikacji fotografiach TEM. Pozostałe nanocząstki z zakresu $5 \div 27$ nm tworzą właściwe morfologicznie struktury charakterystyczne dla tych nanomateriałów. Wpływ na taki przebieg reakcji mogły mieć warunki prowadzonego procesu technologicznego, w tym wartość pH lub natlenienie wykorzystanych roztworów [361]. Wyniki analizy chemicznej (Rys. 9.15.c) wskazują, że poza obecnością oczekiwanego srebra, obecna jest też niewielka ilość tlenu. Nanocząstki srebra mają bowiem tendencję do tworzenia tlenków tego pierwiastka w kontakcie z powietrzem lub natlenionym roztworem [362], dlatego też w przypadku tych struktur (AgNPs) często zabezpiecza się ich powierzchnie, np. poprzez otrzymywanie powłok lipidowych, tworzących w rezultacie struktury typu *core-shell* [363].

Na obecność faz tlenkowych wskazuje również mapa obrazująca odległości międzypłaszczyznowe - Rys. 9.15.b, wyróżniono między innymi krystalizację tlenku srebra(I) krystalizującą w płaszczyźnie (111) (kolor niebieski, $d=2.75\text{\AA}$) oraz (311) (kolor biały, $d=1.44\text{\AA}$). Polikrystaliczne nanocząstki srebra zawierają jednak w znacznej przewadze krystalizację srebra metalicznego, na które wskazują odległości międzypłaszczyznowe $2.34\text{\AA}$ (kolor czerwony) oraz $2.04\text{\AA}$ (kolor zielony), krystalizujące w płaszczyznach odpowiednio (111) i (200) [364,365]. Nie bez znaczenia jest również ułożenie krystalitów widocznych na Rys. 9.15.b, które koresponduje z zaproponowanym przez V. Sundaresan, *et al.* [366] mechanizmem utleniania asymetrycznego nanocząstek srebra. Potwierdzeniem uzyskania AgNPs po syntezie w koloidzie jest również widmo UV-VIS (Rys. 9.15.d) z maksimum pasma w pozycji 424 nm, co jest charakterystyczne dla tych struktur [367].

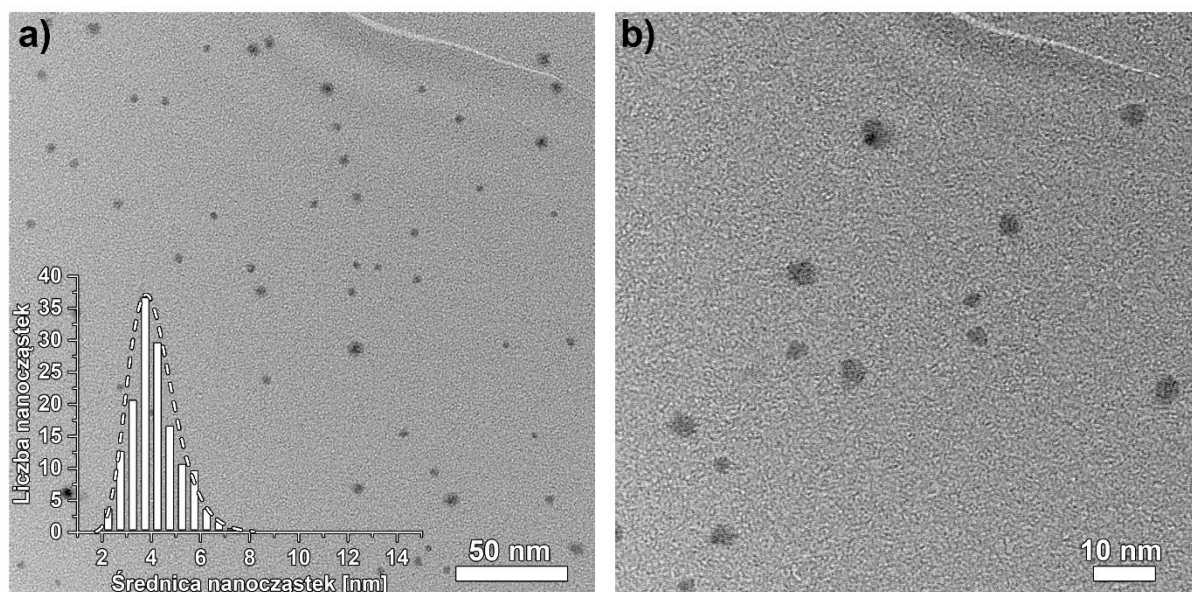
9.2.1.2.2. Nanocząstki srebra otrzymane metodą IGC

Otrzymane w procesie rozpylania magnetronowego i kondensacji w obecności gazu obojętnego nanocząstki srebra (Rozdział 8.1.4.2.3.) scharakteryzowano zgodnie z wcześniej przyjętą procedurą badawczą. Rezultaty tych analiz zaprezentowano na Rys. 9.16.



Rys. 9.16. Analiza morfologii nanocząstek srebra otrzymanych metodą IGC: a) obraz TEM w jasnym polu, wraz z załączonym rozkładem wielkości nanocząstek, b) obraz TEM w wysokiej rozdzielczości wraz z mapą odległości międzypłaszczyznowych, c) obraz TEM w ciemnym polu wraz z analizą chemiczną EDS oraz d) widmo masowe – in situ.

Uzyskane rezultaty wskazują, że dłuższe czasy procesu IGC (np. 60 minut) prowadzą do otrzymania nanocząstek o nieregularnych kształtach (Rys. 9.16.a), co najprawdopodobniej wynika z procesów wzrostu zarodków i ich koalescencji [368]. Dla porównania na Rys. 9.17 przedstawiono obraz TEM ilustrujący morfologię nanocząstek otrzymanych w takich samych warunkach prowadzonego procesu, ale ze czasem depozycji 20 minut.



Rys. 9.17. Analiza morfologii nanocząstek srebra otrzymanych w procesie 20-minutowym metodą IGC: a) obraz TEM w jasnym polu, wraz z załączonym rozkładem wielkości nanocząstek, b) obraz TEM w wysokiej rozdzielczości.

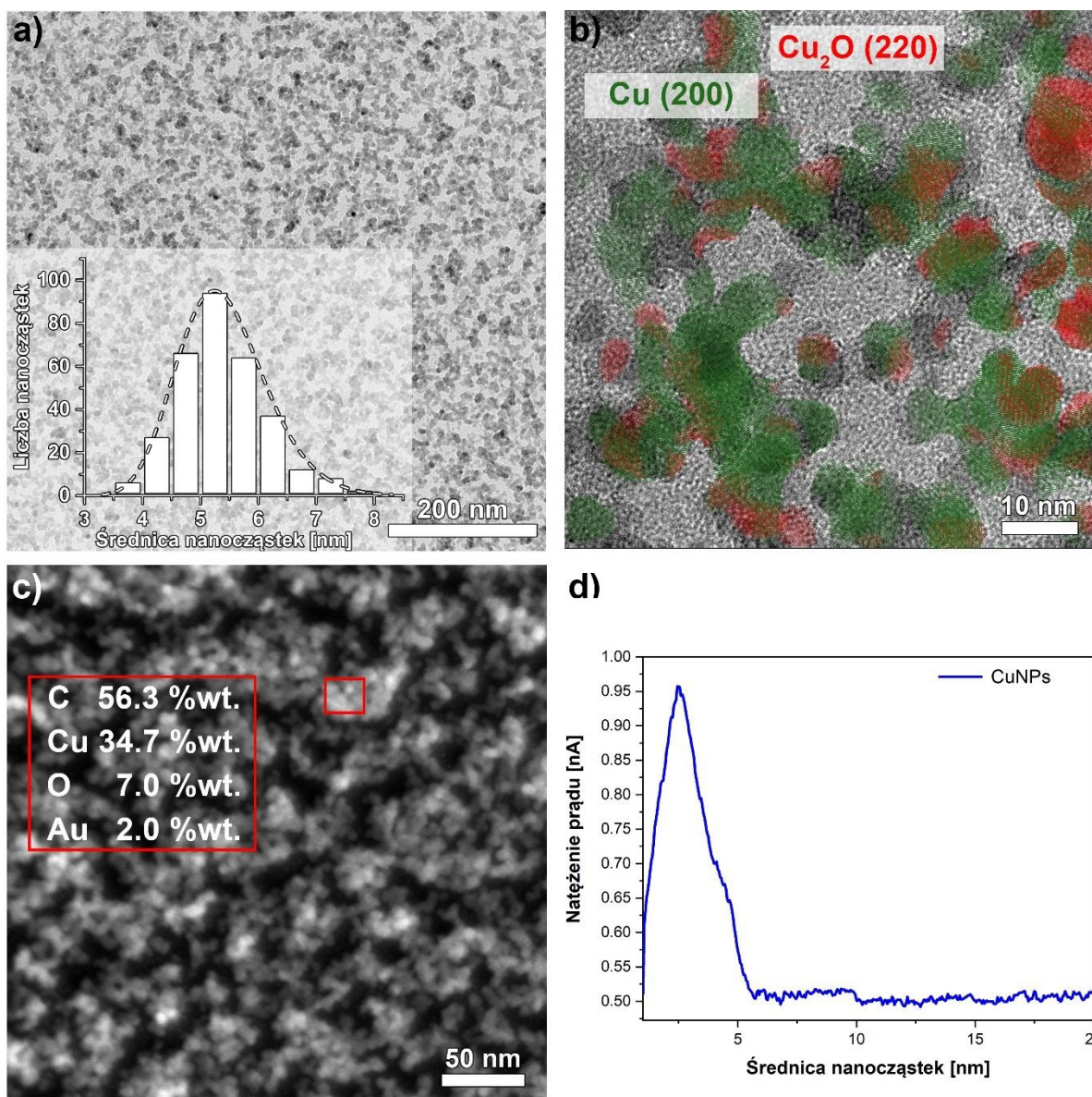
Kształt wspomnianych nanocząstek srebra (otrzymywanych przez 20 minut, Rys. 9.17.a-b) jest sferyczny, podobnie jak niektórych z nanocząstek zaprezentowanych na Rys. 9.16.a. W przypadku godzinnego procesu (Rys. 9.16.a) rozkład wielkości nanocząstek cechują dwa zakresy, pierwszy z nich obejmuje wartości od 5 do 15 nm, natomiast drugi (charakterystyczny dla struktur formujących większe struktury) od 15 do 45 nm. Średni rozmiar nanocząstek wynosi 20.5 ± 9.6 nm, dla porównania nanocząstki otrzymane w czasie 20 minut (Rys. 9.17.a) cechuje średnica 4.1 ± 1.0 nm i znacznie mniejszy rozrzut rozmiarów ($2 \div 7$ nm). Analiza danych literaturowych wskazuje, że w znacznej większości otrzymywane nanocząstki, przykładowo przez M. Cruz, *et al.* [369], U. Backman, *et al.* [370] i V. Popok, *et al.* [371], mają rozmiary (średnicę) w zakresie odpowiednio $2 \div 5$ nm, $3 \div 11$ nm i $4 \div 11$ nm, zatem o zbliżonych wartościach dla prowadzonego procesu 20-minutowego w tej pracy. Jednakże J. Kratochvíl, *et al.* [368] uzyskał AgNPs (również na drodze otrzymywania nanocząstek metodą IGC) zbliżone ilością oraz wykazujące tendencją do agregacji w warunkach ciśnienia w komorze agregacji wyższego o dwa rzędy ($50 \div 60$ Pa) względem warunków syntezy zastosowanych w tej pracy doktorskiej.

Analiza chemiczna otrzymanych struktur (Rys. 9.16.c) wyróżnia w ich składzie srebro (53.4% wag.) jak i tlen (1.0% wag.). Nanocząstki cechuje polikrystaliczna budowa (Rys. 9.16.b), obejmuje krystality srebra metalicznego oraz tlenku srebra(I). Fazy Ag_2O zidentyfikowano na podstawie odległości międzypłaszczyznowych $1.37\text{\AA}$ (kolor żółty) oraz

1.44Å (kolor biały), które są charakterystyczne dla płaszczyzn krystalizacji, odpowiednio (222) oraz (311). Natomiast srebro metaliczne, podobnie jak w przypadku CS@AgNPs, reprezentowane było przez płaszczyzny (111) (kolor czerwony, $d=2.34\text{\AA}$) i (200) (kolor zielony, $d=2.04\text{\AA}$) [364,365]. W przeciwieństwie do nanocząstek srebra otrzymanych metodą redukcji chemicznej (patrz Rozdz. 9.2.1.2.1., Rys. 9.15.b), których mechanizm utleniania miał charakter asymetryczny (V. Sundaresan, *et al.* [366]), nanocząstki syntezowane metodą kondensacji w obecności gazu obojętnego wykazują symetryczny mechanizm utleniania, na co wskazuje przewaga tlenków w strukturze nanocząstek oraz ich symetryczne rozłożenie. Na podstawie badań z wykorzystaniem spektrometru masowego (badania *in situ*) stwierdzono, że średnica otrzymywanych nanocząstek wynosiła od 1 do 7 nm, z maksimum w ok. 3 nm. Rezultaty te wskazują na niezaburzony proces otrzymywania nanocząstek w kontekście ich rozmiarów, które odpowiadają zakresowi średnic nanocząstek procesu prowadzonego przez 20 minut (Rys. 9.17), podczas gdy proces był prowadzony przez godzinę. Potwierdza to stabilność procesu otrzymywania, ale może wskazywać na agregację nanocząstek już w strefie depozycji (na podłożu) w przypadku godzinnej procesu otrzymywania. Dodatkowym czynnikiem mogącym wpływać na morfologię AgNPs otrzymywanych w godzinnej procesie są mechanizmy oksydacyjne następujące już poza systemem próżniowym.

9.2.1.3. Nanocząstki miedzi

W przypadku nanocząstek miedzi zostały one otrzymane jedynie metodą kondensacji w gazie obojętnym na drodze rozpylania magnetronowego z wykorzystaniem katody Cu. Analizę TEM CuNPs wykonano z wykorzystaniem złotej siateczki TEM, na którą to naniesiono nanocząstki miedzi, zgodnie z warunkami procesu otrzymywania nanocząstek opisanymi w Rozdziale 8.1.4.2.4. Na Rys. 9.18.a zilustrowano widmo masowe przedstawiające dystrybucję nanocząstek miedzi (pomiar w warunkach *in situ*).



Rys.9. 18. Analiza morfologii nanocząstek miedzi otrzymanych metodą IGC: a) obraz TEM w jasnym polu, wraz z załączonym rozkładem wielkości nanocząstek, b) obraz TEM w wysokiej rozdzielczości wraz z mapą odległości międzypłaszczyznowych, c) obraz TEM w ciemnym polu wraz z analizą chemiczną EDS oraz d) widmo masowe – in situ.

We wspomnianym procesie IGC otrzymano nanocząstki miedzi o względnie niewielkich rozmiarach, średnicy w zakresie 3÷7 nm, i średnią wartością 5.4 ± 0.8 nm (Rys. 9.18.a). Podobne parametry CuNPs, otrzymanych z wykorzystaniem analogicznej aparatury, uzyskała M. Gracia-Pinilla, *et al.* [372], mianowicie średnicy w zakresie od 2 do 10 nm, ze średnią średnicą 5.5 ± 0.7 nm. Nanocząstki cechował sferyczny kształt i tendencja do tworzenia niewielkich agregatów, co można również zaobserwować na Rys. 9.18.b. Obecność miedzi metalicznej potwierdzają badania odległości międzypłaszczyznowej $1.80 \text{ \AA}$ (kolor zielony), odpowiadającej płaszczyźnie krystalizacji (200) [373–375]. W znacznie mniejszej ilości

występuje faza tlenku miedzi(I), która odpowiada płaszczyźnie krystalizacji (220) (kolor zielony, $d=1.51\text{\AA}$) [376,377]. Analiza rozkładu wspomnianych faz ukazuje początek procesu utleniania nanocząstek metalicznych zgodnie z efektami Cabrera-Mott'a i Kirkendalla [378], ale dla potwierdzenia tej hipotezy koniecznym byłoby wykonanie dodatkowo bardziej szczegółowej analizy składu chemicznego, mianowicie w obrębie jednej odseparowanej nanocząstki. Badania analizowanego mikroobszaru (Rys. 9.18.c) wskazują m. in. na obecność 34.68% wag. miedzi oraz 7.07% wag. tlenu, co potwierdza występowanie wspomnianych faz. Analiza widma masowego (pomiar *in situ*) pozwoliła na określenie rozrzutu wielkości otrzymywanych nanocząstek Cu na powierzchni chitozanu, średnica ta wynosiła od 1 do 6 nm, z maksimum w okolicach wartości 3 nm. Warto dodać, że wynik ten jest nieco odmienny od rezultatów uzyskanych z wykorzystaniem analizy TEM ($3 \div 8$ nm) i może wynikać z dojrzewania nanocząstek już na podłożu lub utlenienia nanocząstek w kontakcie z powietrzem.

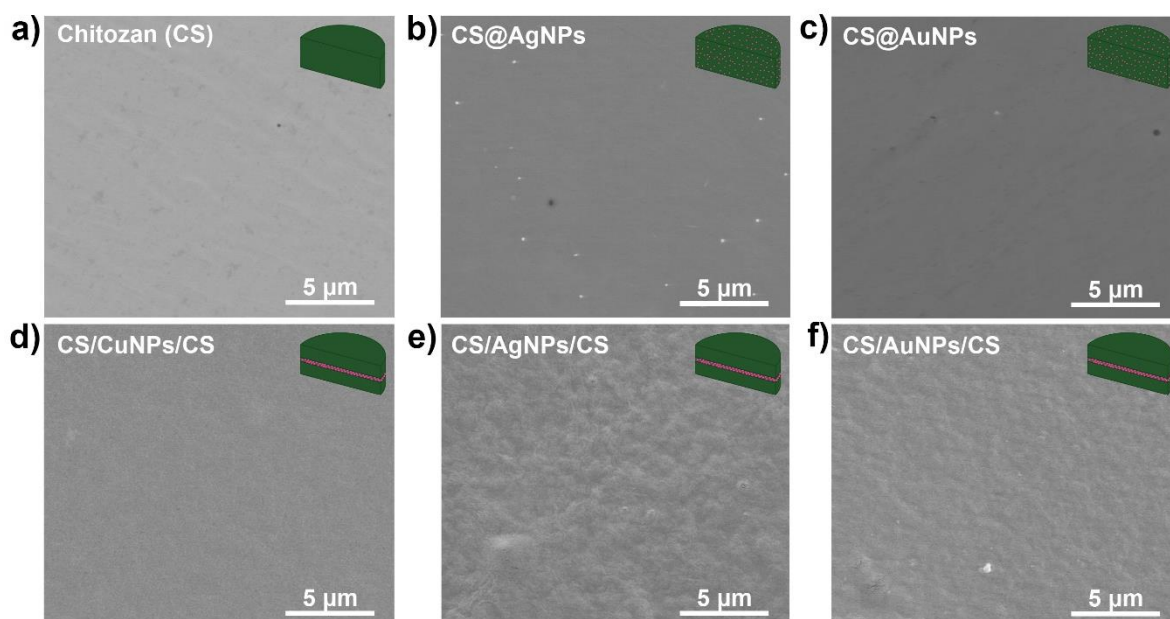
Zaprezentowane powyżej rezultaty syntezy nanocząstek złota, srebra oraz miedzi wskazują na skuteczność wykorzystania obydwu metod otrzymywania. Zarówno redukcja chemiczna prowadząca do uzyskania koloidów na bazie biopolimeru z nanocząstkami metalicznymi, jak również proces na drodze rozpylania magnetronowego z kondensacją w atmosferze gazu obojętnego w atmosferze próżni. Nanocząstki otrzymane pierwszą z metod mają wyraźnie większe średnice, mianowicie AuNPs - 18.5 ± 7.2 nm i AgNPs - 10.5 ± 6.8 , podczas, gdy rozpylane nanocząstki charakteryzują się średnicami: AuNPs - 4.1 ± 1.0 nm, AgNPs - 20.5 ± 9.6 nm oraz CuNPs - 5.4 ± 0.8 nm. Ponadto, nanocząstki otrzymane tymi dwoma metodami różnią się nieznacznie w zakresie występujących w nich faz krystalicznych metali i ich tlenków, warto również zwrócić uwagę na różne mechanizmy korozji nanocząstek srebra. Opisana w powyższych rozdziałach morfologia oraz skład fazowy niewątpliwie wpływają na aktywność biologiczną nanocząstek w układzie z chitozanem, dlatego w dalszych rozdziałach pracy przedstawiono charakterystykę fizykochemiczną i wybrane właściwości użytkowe warstw na bazie przedstawionych powyżej koloidów oraz nanocząstek metali.

9.2.2. Mikrostruktura otrzymanych warstw

Powłoki na bazie chitozanu są bardzo szeroko wykorzystywane ze względu na zdolność żelowania oraz możliwość tworzenia cienkich struktur warstwowych, również w układzie warstwa po warstwie (LBL, ang. *layer-by-layer*) z innymi polimerami. Otrzymywane powłoki można podzielić na dwa rodzaje, warstwy nanoszone na podłoża oraz folie mogące stanowić osobne materiały po delaminacji [379]. Pokrycia chitozanowe, niezależnie od ich rodzaju, mogą służyć np. jako rusztowania komórkowe, hydrożele lub systemy dostarczania leków, a w zależności od ich funkcji morfologia ich powierzchni powinna być dostosowana do przeznaczenia [380]. Przykładem może być praca G. Wang, *et al.* [381], w której określono wpływ chitozanu o różnej budowie na różnicowanie i proliferację komórek macierzystych tkanki nerwowej (NSC, ang. *Neural Stem Cell*). Wytworzone materiały na bazie chitozanu miały budowę folii, porowatego rusztowania oraz przewodu mikrotubulowego. Rezultaty badań wykazały, że najskuteczniej proliferację komórek wspierała folia chitozanowa (obserwowano dwukrotnie więcej komórek niż w przypadku pozostałych morfologii). Natomiast najskuteczniejsze różnicowanie neuronów zapewniał chitozan o budowie przewodu mikrotubulowego.

Zaprezentowane w pracy doktorskiej warstwy na bazie chitozanu przeznaczone są do pokrywania materiałów metalicznych, docelowo do zastosowań w implantach ortopedycznych. Wymagania stawiane morfologii powłok dla wspomnianych aplikacji bazują głównie na zapewnieniu biozgodności z tkanką kostną, a zatem ciągłości niecytotoksycznego pokrycia oraz warunków pozwalających na proliferację komórek, więc relatywnie homogenicznego obszaru bez znaczących nierówności lub struktur utrudniających przeżycie komórek np. ostrych struktur, które mogłyby uszkadzać błonę i ścianę komórkową [382]. Warstwy tego typu powinny również charakteryzować się odpornością na korozję w środowisku płynów ustrojowych organizmu, czemu bez wątpienia sprzyja zachowanie ciągłości warstwy [383].

W niniejszej pracy zmiany morfologii powierzchni nitinolu, po funkcjonalizacji powłokami na bazie chitozanu (CS) niemodyfikowanego oraz modyfikowanego nanocząstkami Au, Ag i Cu, określono na podstawie badań z wykorzystaniem mikroskopii SEM. Wyniki te zaprezentowano na Rys. 9.19.



Rys. 9.19. Obrazy SEM powierzchni stopu NiTi z powłokami na bazie chitozanu (CS): a) niemodyfikowanego; modyfikowanego koloidami: b) CS@AgNPs i c) CS@AuNPs oraz otrzymanych metodą hybrydową: d) CS/CuNPs/CS, e) CS/AgNPs/CS i f) CS/AuNPs/CS.

Testowane podłoża NiTi, niezależnie od zastosowanej modyfikacji, są równomiernie pokryte powłokami na bazie chitozanu. W badanych mikroobszarach nie stwierdzono miejsc delaminacji warstw jak i defektów budowy pokryć na powierzchni. Warstwy chitozanu (Rys. 9.19.a) oraz układy warstwowe (Rys. 9.19.d-f), których zewnętrzną warstwę stanowił chitozan, posiadają typową dla niego amorficzną budowę opisywaną w literaturze naukowej, w tym na powierzchni Ti [384], stopu Ti6Al7Nb [348] oraz NiTi [229,385]. Niemniej jednak na powierzchni otrzymanych warstw na bazie koloidów można zaobserwować bardziej zróżnicowane mikroobszary, wyraźniejsze dla CS@AgNPs (Rys.9.19.b) oraz nieliczne dla CS@AuNPs (Rys.9.19.c), stanowiące nanocząstki metali wykorzystywanych w danej modyfikacji. Obserwacje te w zakresie obecności nanocząstek srebra na powierzchni potwierdzają badania K. Yan, *et al.* [386]. Obrazują one multiwarstwową strukturę chitozanu z nanocząstkami srebra, uzyskaną elektrochemicznie metodą przyrostu warstw o strukturze analogicznej do układu słoje drzewa, której aktywność antybakteryjna zależy od ilości uwalnianych jonów srebra kontrolowanego przez odpowiednią wartość pH. Mechanizm uwalniania czynnika pod wpływem odpowiedniego pH jest istotnym narzędziem dostarczania terapeutycznego do obszaru organizmu o właściwym odczynie, w przypadku przywołanej pracy najszybsze uwalnianie miało miejsce dla wartości pH 1.2, które jest bliskie wartości odczynu w żołądku [387]. Przykładowo inna praca, autorstwa N. Nontipichet, *et al.* [388], prezentuje

morfologię warstw chitozanu z nanocząstkami złota aplikowaną na nanorurki węglowe wzbogacone błękitem pruskim do zastosowań w biosensoryce.

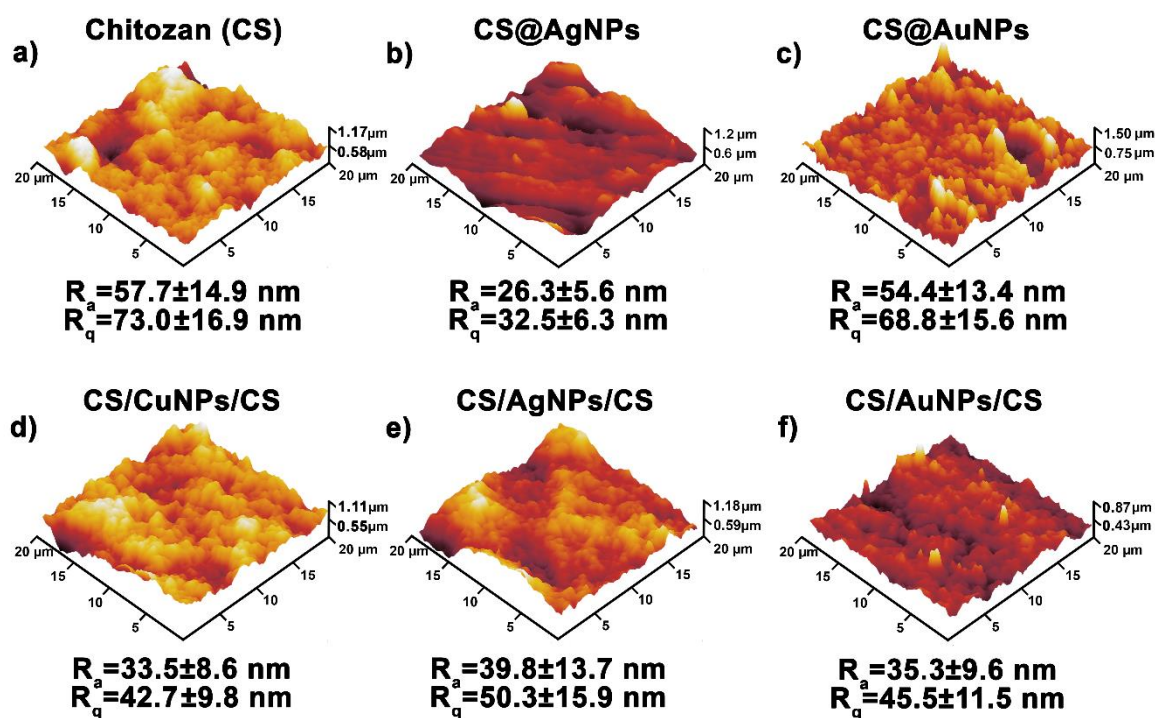
Podsumowując, morfologia uzyskanych warstw na bazie chitozanu i nanocząstek metali wskazuje na uzyskanie ciągłych struktur, nie wykazujących delaminacji względem podłoża stopowego. Zgodnie z przewidywaniem pokrycia, których zewnętrzną warstwą jest chitozan nie wykazywały znaczących różnic między sobą, natomiast w warstwach otrzymanych z koloidów widoczne są na powierzchni nanocząstki, co potwierdza ich losową dyspersję w całej objętości warstwy. Otrzymane struktury wskazują na spełnienie wymagań stawianych warstwom wykorzystywanym w bioinżynierii w zakresie morfologii powierzchni, co pozwala na ich dalszą charakterystykę w zakresie analizy topografii powierzchni, zaprezentowanej w kolejnym rozdziale.

9.2.3. Topografia i chropowatość otrzymanych warstw

Budowa powierzchni implantu, w tym parametry chropowatości i falistości powierzchni, odgrywają istotną rolę w adhezji i proliferacji komórek, co w konsekwencji prowadzi do adaptacji wszczepu w organizmie pacjenta. Przykładowe badania przeprowadzone przez O. Andrukhov, *et al.* [389] porównują pod tym względem (różnej chropowatości podłoża) proliferację oraz różnicowanie komórek MG-63, będących komórkami kostniako-mięsaka posiadającymi fenotyp osteoblastów, które są stosowanym modelem komórek kostnych w badaniach *in vitro*. Najwięcej namnożonych komórek MG-63 (po 2, 5 i 9 dniach inkubacji) obserwowano na powierzchni najmniej chropowatego podłoża tytanowego (R_a , $0.05 \pm 0.01 \mu\text{m}$; R_q , $0.06 \pm 0.01 \mu\text{m}$), natomiast różnicowanie komórek sprzyjające osteogenezie było najbardziej efektywne na podłożu o wartości $1.19 \pm 0.24 \mu\text{m}$ (R_a) i $1.46 \pm 0.31 \mu\text{m}$ (R_q). Warto jednak podkreślić, że chropowatość powierzchni nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na zachowanie komórek na powierzchni warstwy.

Dodatkowo chropowatość modyfikowanej powierzchni w przypadku otrzymywania pokryć warstwowych jest także istotnym parametrem w kontekście ograniczenia adhezji bakterii. Rezultaty badań opisanych przez S. Jang, *et al.* [311] wskazują na istotnie mniejszy przyrost biofilmu (na bazie bakterii *S. aureus* i *E. coli*) na powierzchni cechującej się wartością R_a w zakresie $20 \div 30 \text{ nm}$. Uzyskanie zatem chropowatości powierzchni implantu w skali nanometrycznej może być szczególnie istotne nie tylko z punktu widzenia adaptacji implantu, ale również bezpieczeństwa jego stosowania.

W niniejszej pracy doktorskiej topografię powierzchni otrzymanych struktur na bazie chitozanu, w tym z dodatkiem nanocząstek, określono z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych. Obrazy AFM zestawiono z dwóch obszarów, $20 \times 20 \mu\text{m}$ i $5 \times 5 \mu\text{m}$, dla tych ostatnich wyznaczono średnie wartości parametrów chropowatości powierzchni – mianowicie R_a oraz R_q (Rys. 9.20).



Rys. 9.20. Obrazy AFM powierzchni powłok na bazie chitozanu (CS): a) niemodyfikowanego oraz modyfikowanego b) koloidem CS@AgNPs, c) koloidem CS@AuNPs jak i otrzymanych metodą hybrydową w układzie d) CS/CuNPs/CS, e) CS/AgNPs/CS i f) CS/AuNPs/CS. Pod obrazami AFM podano średnie wartości parametrów R_a i R_q , na podstawie analizy z pięciu obszarów o rozmiarze $5 \times 5 \mu\text{m}$.

Badania chropowatości powierzchni próbek wskazują na pewne różnice w ich profilu, w zależności od rodzaju zastosowanej modyfikacji (otrzymanej powłoki). Warto jednak zaznaczyć, że zmiany te nie są znaczne, a wartości te zmieniają się w skali nanometrycznej. Najwyższą chropowatością charakteryzuje się warstwa CS (Rys. 9.20.a), R_a i R_q odpowiednio *ca.* 57.7 nm i *ca.* 73.0 nm. Wartość ta jest dość wysoka w porównaniu z chropowatością (R_a) warstw chitozanu otrzymanych na podłożu Ti6Al7Nb (*ca.* 18 nm) [390] oraz krzemie (*ca.* 1 nm) [391], ale w literaturze można znaleźć także wyższe wartości chropowatości warstw chitozanu, np. również na Ti6Al7Nb (*ca.* 87 nm) [348]. Różnice w tych wartościach wynikają niejednokrotnie z faktu stosowania różnych technik nanoszenia warstw oraz warunków

procesów technologicznych, które zostały zastosowane podczas suszenia warstw. Nie bez znaczenia jest również budowa i wartość charakterystycznych parametrów dla modyfikowanych podłoży, jeszcze przed procesami depozycji struktur.

Jedną z bardziej istotnych zmian chropowatości wyróżnia wpływ otrzymanych nanocząstek srebra (CS@AgNPs, Rys. 9.20.b) w strukturze chitozanu, co skutkuje ponad dwukrotnie niższą wartością R_a i R_q (odpowiednio 26.3 nm i 32.5 nm) względem wartości zarejestrowanych dla niemodyfikowanej struktury chitozanu (Rys. 9.20.a). Zmian tych nie obserwuje się przykładowo w pracy K. Kleszcz, *et al.* [348], w której poddano modyfikacji powierzchnię stopu Ti6Al7Nb z otrzymaniem chitozanu oraz na bazie koloidu CS z AgNPs. W obydwu seriach eksperymentalnych wartość parametru R_a była na zbliżonym poziomie i wyniosła *ca.* 80 nm. Różnice te mogą wynikać z innej wartości chropowatości podłoży, na których otrzymywane były warstwy. W innej pracy C. García-Cabezón, *et al.* [392] opisuje warstwy chitozanu z nanocząstkami srebra na powierzchni porowatego tytanu, otrzymane metodą elektrodpozycji, które cechują się parametrami chropowatości (R_a i R_q), odpowiednio na poziomie 11.12 nm i 13.42 nm. Wpływ na tak niską wartość chropowatości miała niewątpliwie metoda, która stymuluje wzrost wysoce uporządkowanych warstw.

W niniejszej pracy, w przypadku modyfikacji z otrzymaniem CS@AuNPs (Rys. 9.20.c) powierzchnia wykazuje porównywalne parametry jak warstwa CS. Niższe wartości R_a i R_q są obserwowane również dla modyfikacji stopu z otrzymaniem struktury o budowie wielowarstwowej, z zewnętrzną warstwą chitozanu (CS/AuNPs/CS, CS/AgNPs/CS, CS/CuNPs/CS). Dla serii stopów z otrzymaną warstwą pośrednią, którą stanowiły nanocząstki złota, srebra i miedzi (Rys. 9.20.d-f) następuje spadek wartości parametrów chropowatości względem powierzchni niemodyfikowanego chitozanu, mianowicie R_a o ok. 20 nm, a przypadku R_q o ok. 23÷30 nm. Na zaobserwowaną zmianę chropowatości może wpływać tzw. dziedziczenie (odwzorowanie) topografii po warstwie chitozanu z naniesionymi nanocząstkami, które mogły uzupełnić (wypełnić) obszary odbiegające od średniej wysokości warstwy chitozanu. Przykładem może być wpływ kwasu hialuronowego na powierzchnię chitozanu w procesie nakładania warstw metodą *layer-by-layer*, którą realizowano w różnych warunkach pH w pracy J. Hernández-Montelongo, *et al.* [393].

Reasumując, topografia powierzchni uzyskanych warstw nie wykazuje znacznych różnic między poszczególnymi seriami eksperymentalnymi, osiągając wartości parametry R_a z zakresu 26.3 ÷ 57.7 nm. Jednakże nawiązując do przywołanych we wstępie badań dotyczących wpływu chropowatości warstwy na proliferację i różnicowanie komórek w typie osteoblastów (MG-63)

[389], nanometryczne wartości charakterystycznych parametrów chropowatości badanych struktur pozwalają przypuszczać, że będą się one cechować dobrymi warunkami do proliferacji komórek na powierzchni wszczepów. Z drugiej strony, ze względu na zbyt niską wartość parametrów R_a i R_q , ograniczona może być osteogeneza, ponieważ zmierzone parametry R_a są średnio o ok. dwa rzędy wartości za niskie. Warto jednak zauważyć, że warstwy na bazie CS podlegają biodegradacji, co w rezultacie z czasem będzie wpływać na zmianę topografii powierzchni implantu, prawdopodobnie zwiększając ich chropowatość. Niewątpliwie wpływ degradacji otrzymanych pokryć na zmiany chropowatości jest zagadnieniem, które warto rozwinąć w dalszych pracach badawczych. Z drugiej strony chropowatość powierzchni modyfikowanej warstwą CS@AgNPs zawiera się w zakresie R_a od 20 do 30 nm, określonym jako wartość ograniczająca wzrost biofilmu bakterii *S. aureus* i *E. coli* [311]. Warto również zauważyć, że parametry R_a warstw uzyskanych metodą hybrydową (CS/AuNPs/CS, CS/AgNPs/CS, CS/CuNPs/CS) charakteryzują się wartościami zbliżonymi do wspomnianego zakresu (ca. $33 \div 39$ nm), co w połączeniu z innymi parametrami powierzchni (np. zwilżalnością, energią powierzchniową) może pozytywnie wpływać na ograniczenie wzrostu bakterii na tych powierzchniach.

9.2.4. Skład chemiczny struktur warstwowych

Jak już wcześniej wspomniano, skład chemiczny biomateriałów odgrywa ważną rolę w procesie adaptacji wszczepu w organizmie pacjenta. Z tego względu ważnym jest projektowanie biomateriałów w taki sposób, aby ograniczać potencjalne, niekorzystane działanie pierwiastków, które mogą stanowić zagrożenie dla pomyślnej adaptacji implantu oraz zdrowia. Jest to szczególnie istotne w przypadku materiałów metalicznych. Obecność niepożądanego, negatywnie działającego pierwiastka lub związku chemicznego może mieć kluczowe znaczenie w odrzuceniu implementowanego wszczepu [109]. Przy analizie należy zwrócić uwagę na obecność i udział metali, które mogą wpływać alergennie (np. Ni, Co, Cr) oraz prowadzić do schorzenia zwanego metalozą [394,395]. W związku z powyższym warstwy na bazie niemodyfikowanego i modyfikowanego nanocząstkami metali (Au, Ag, Cu) chitozanu poddano analizie EDS obejmującej większy zakres zbierania sygnału oraz komplementarnej do niej technice XPS operującej na znacznie mniejszej grubości wnikania. Z kolei dla oceny budowy atomowej otrzymanych struktur wykorzystano technikę spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni (FTIR-ATR), z zastosowaniem techniki odbiciowej. W Tabeli 9.2 zestawiono skład chemiczny warstw uzyskany podczas analizy EDS z badanych powierzchni.

Tabela 9.2. Skład chemiczny (at. %) powierzchni badanych serii próbek określony na podstawie analizy EDS

Rodzaj modyfikacji	Skład chemiczny [% at.]							
	Ti	Ni	O	C	Ag	Au	Cu	Na
CS	33.1±0.6	38.8±0.3	15.6±1.0	6.8±0.7	-	-	-	5.7±0.3
CS@AgNPs	36.3±0.5	42.1±0.1	7.7±1.3	6.5±1.1	0.3±0.1	-	-	7.2±1.6
CS@AuNPs	29.8±0.5	34.8±0.5	18.3±1.6	10.7±2.0	-	0.8±0.2	-	5.6±0.6
CS/CuNPs/CS	0.8±0.2	1.7±0.5	32.6±1.7	50.7±2.2	-	-	0.0	14.2±0.8
CS/AgNPs/CS	0.5±0.3	1.1±0.1	30.2±0.8	53.6±1.4	0.0	-	-	14.5±0.9
CS/AuNPs/CS	1.1±0.2	1.1±0.3	28.9±0.7	57.8±1.7	-	0.0	-	11.2±0.7

Badania te potwierdziły sygnały pochodzące głównie od węgla, tlenu, sodu oraz tytanu i niklu. Obecność dwóch ostatnich pierwiastków jest związana z sygnałem z podłoża, na którym otrzymano warstwy na bazie chitozanu. Jak można zauważyć udział tytanu i niklu jest zmienny w zależności od badanej serii eksperymentalnej. Podłoża z otrzymaniem warstw na bazie niemodyfikowanego chitozanu oraz te uzyskane na bazie koloidów charakteryzują się znacznie wyższym udziałem tych pierwiastków, średnio ok. 33%at. Ti oraz ok. 38%at. Ni, względem znacznie mniejszych koncentracji tych pierwiastków dla serii wytworzonych metodą hybrydową (CS/XNPs/CS), dla których średnio było to ok. 0.8%at. Ti i 1.3%at. Ni.

Obserwowane różnice wynikają zapewne z zastosowanych technik wytwarzania warstw, mianowicie w przypadku struktur nakładanych sekwencyjnie (warstwa po warstwie) ilość etapów przygotowania warstw była większa, a co za tym idzie grubość warstw była większa niż w przypadku procesu jednoetapowego.

Warstwy na bazie chitozanu charakteryzują się również obecnością węgla i tlenu, które to budują strukturę tego biopolimeru. Udział tych pierwiastków jest, podobnie jak w przypadku tytanu i niklu, różna w zależności od serii eksperymentalnej, a jej wartości są konsekwencją uwzględnienia udziałów metali stopowych. W przypadku warstw otrzymanych metodą hybrydową udział węgla i tlenu jest zbliżony dla wszystkich modyfikacji, wynosi kolejno ok. 53%at. i 30%at. Warto zauważyć, że udział węgla jest większy od tlenu, co z kolei jest odmienną tendencją do warstw niemodyfikowanego i modyfikowanego koloidami chitozanu. Wynikać to może z wieloetapowego otrzymywania warstw hybrydowych, a co za tym idzie ich większej grubości. Tym samym sygnał był zbierany głównie z warstwy, a nie ja w przypadku pojedynczych warstw chitozanu i koloidów z warstwy i nitinolowego podłoża.

Dodatkowo w przypadku serii eksperymentalnych CS@AgNPs i CS@AuNPs wykazano obecność kolejno srebra ($0.3 \pm 0.1\%$ at.) i złota ($0.8 \pm 0.2\%$ at.). Udział tych pierwiastków zależy od ich koncentracji w matrycy biopolimeru. Przykładowo w pracy G. Raghavendra, *et al.* [396] obserwuje się znacznie wyższe ilości AgNPs w matrycy chitozanu, dla stężeń prekursora 17.64 mM, 23.53 mM, 29.41 mM, 35.29 mM, stwierdzono odpowiednio wartości 5.47%at., 6.72%at., 7.64%at. i 8.29%at. tego pierwiastka. Zatem w porównaniu z niniejszą pracą doktorską, dla której stężenie prekursora wyniosło 52mM uzyskane wyniki analizy EDS są znacznie niższe. Może to sugerować, że rezultat ten jest wynikiem dystrybucji nanocząstek srebra w matrycy chitozanu lub uzyskaniem cieńszych warstw, niż w przypadku przywołanej publikacji.

W przypadku układów warstwowych otrzymanych metodą hybrydową (CS/AuNPs/CS, CS/AgNPs/CS, CS/CuNPs/CS), w przeciwieństwie do opisanych powyżej warstw, nie wykazano obecności nanocząstek metali w analizowanych powierzchniach z wykorzystaniem metody EDS. Wynika to z ograniczonej głębokości wnikania wiązki elektronowej w strukturę badanych powierzchni (zwykle do ok. 1 μ m). W tym przypadku zewnętrzną warstwę stanowił chitozan, w przeciwieństwie do serii CS@AuNPs i CS@AgNPs, w której powierzchnia zawierała również nanocząstki, co potwierdzono na obrazach SEM (patrz Rodz. 9.2.2., Rys. 9.19.b-c). Innym przyczynkiem mogła być zbyt niska koncentracja wspomnianych nanocząstek w analizowanym mikroobszarze. Badania składu chemicznego potwierdziło

również na drodze pomiarów z wykorzystaniem spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X, a rezultaty zestawiono w Tabeli 9.3.

Tabela 9.3. Skład chemiczny (at. %) powierzchni badanych serii próbek, określony na podstawie badań XPS

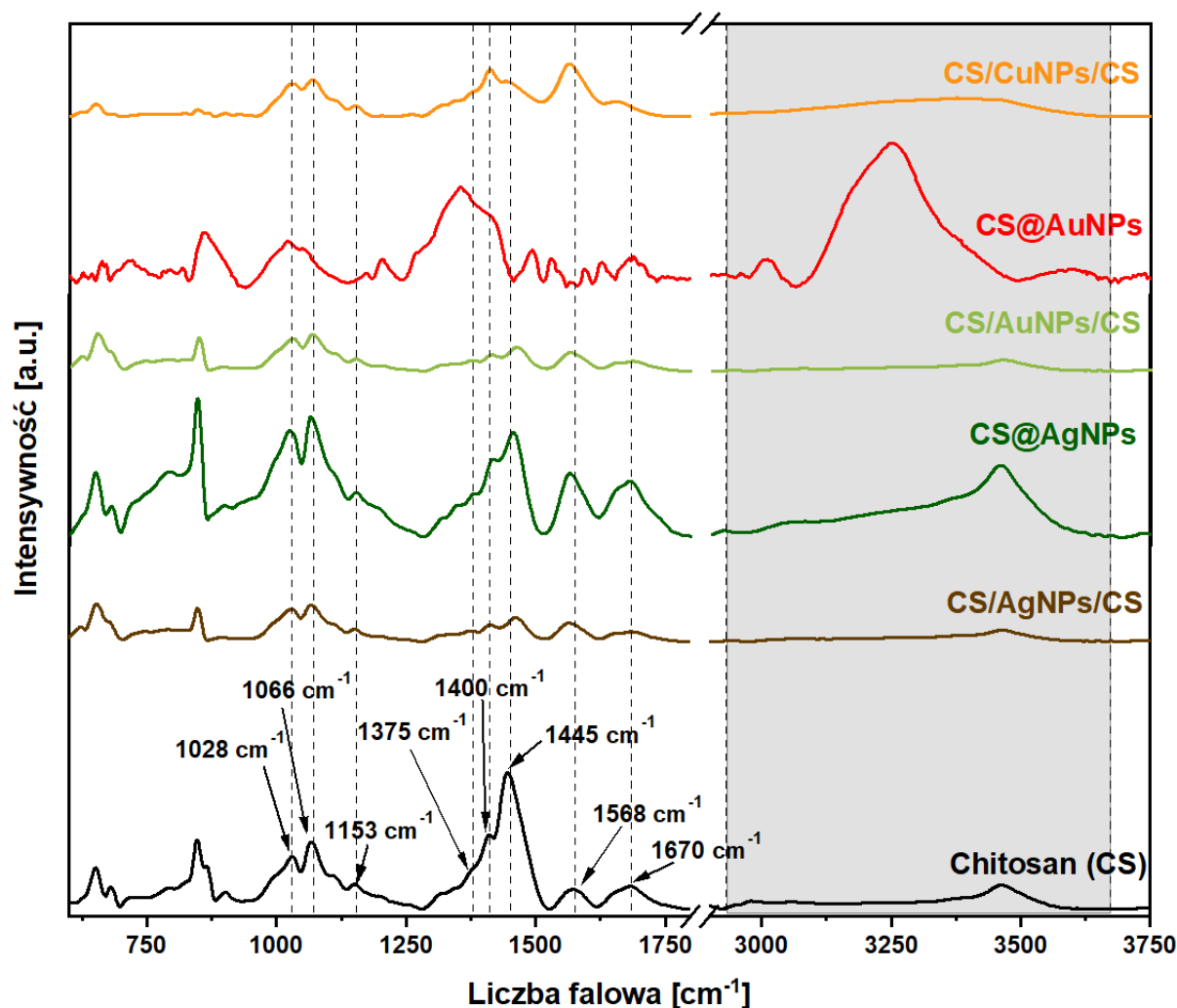
Rodzaj modyfikacji	Skład chemiczny [%at.]						
	C 1s	O 1s	N 1s	Cu 2p	Ag 3d	Au 4f	Na 1s
Chitozan (CS)	46.13	40.35	1.81	-	-	-	11.71
CS@AgNPs	45.66	43.38	2.37	-	0.41	-	8.18
CS@AuNPs	47.31	39.73	1.10	-	-	0.03	11.83
CS/CuNPs/CS	40.16	52.47	2.50	0.00	-	-	4.86
CS/AgNPs/CS	46.13	42.83	3.07	-	0.00	-	7.97
CS/AuNPs/CS	38.01	50.17	0.73	-	-	0.00	11.09

Przedstawione wyniki, w przeciwieństwie do wyników analizy EDS, są bardziej spójne w obrębie udziału głównych pierwiastków stanowiących składowe dla poszczególnych serii eksperymentalnych. Związane jest to z niewielką głębokością próbkowania (5÷6 nm), co jest charakterystyczne dla tej metody [397]. Struktura powłok w przeważającej większości składa się z węgla oraz tlenu, które są głównymi pierwiastkami budującymi strukturę chitozanu. Niemodyfikowana warstwa tego biopolimeru zbudowana jest z 46.13%at. węgla, 40.35%at. tlenu, jak również niewielkiego udziału azotu (1.81%at.), ale również sodu, który jest pozostałością z wodorotlenku sodu, którym neutralizowano powierzchnię otrzymanej warstwy.

Analiza budowy pokryw otrzymanych metodą hybrydową, w których zewnętrzną warstwę stanowi chitozan, jest zbliżona jak w przypadku modyfikacji z warstwą na bazie niemodyfikowanego CS, a obserwowane różnice mogą wynikać ze zmian w profilu powierzchni badanych struktur. Warto również zauważyć, że dla warstw otrzymanych z koloidu (CS@AgNPs i CS@AuNPs) metoda XPS potwierdza obecność srebra i złota w warstwie przypowierzchniowej o udziale odpowiednio 0.41%at. i 0.03%at, natomiast (podobnie jak z zastosowaniem metody EDS) nie stwierdzono obecności tych pierwiastków w strukturach hybrydowych. Dla powierzchni tych nie wykonano skanów wysokorozdzielczych, natomiast przykładowo analiza składu nanocząstek srebra otrzymanego w postaci koloidu (patrz Rozdz. 9.2.1.2.1., Rys. 9.15.) oraz rezultaty analizy dla analogicznych warstw na bazie chitozanu z dodatkiem srebra przeprowadzonych przez X. Du, *et al.* [398] oraz

W. Li, *et al.* [399] mogą wskazywać na obecność w uzyskanych strukturach srebra w postaci zarówno metalicznej, jak i na pierwszym stopniu utlenienia.

Uzupełnieniem tych analiz były badania struktury atomowej otrzymanych powłok z wykorzystaniem spektroskopii FTIR, które zaprezentowano na Rys. 9.21.



Rys. 9.21. Widma IR dla powłok niemodyfikowanego chitozanu (CS), chitozanu modyfikowanego koloidami CS@AgNPs i CS@AuNPs oraz struktur CS/CuNPs/CS, CS/AgNPs/CS i CS/AuNPs/CS otrzymanych metodą hybrydową.

Widma FTIR dla wszystkich badanych serii cechują się pasmami charakterystycznymi dla struktury chitozanu. Są to pasma występujące w pierwszej kolejności w regionie od 2920÷3670 cm⁻¹, zaznaczony na wykresie na kolor szary, odpowiadający nakładającym się drganiom rozciągającym grup aminowych (-N-H) i hydroksylowych (-O-H). Warto zauważyć, że niemodyfikowany chitozan oraz układy warstwowe z zewnętrzną tego typu strukturą charakteryzują się podobnym przebiegiem widma w tym zakresie, natomiast w warstwach

modyfikowanych koloidami pasma są przesunięte. Obecność tych pasm, dla różnych maksimów wartości liczb falowych, można tłumaczyć różnym stopniem uwodnienia struktur biopolimeru oraz pH, od których zależy proporcja, udział poszczególnych grup atomowych. W tym kontekście warto również wskazać na badania przeprowadzone przez C. Branca, *et al.* [400], który wskazuje na możliwość przesunięć wspomnianych pasm w związku z modyfikacją struktury chitozanu.

W dalszej kolejności wyróżnia się pasma absorpcji zlokalizowane przy 1670 cm^{-1} , które również mają charakter nakładających się drgań rozciągających podchodzących z wiązania $\text{C}=\text{O}$ (grupa N-acetylowa) i $\text{C}-\text{H}$ [401]. Wiązania z maksimum w 1568 cm^{-1} przypisuje się drganiom zginającym w grupach $\text{N}-\text{H}$ (amid II-rzędowy), ponadto III-rzędowy amid reprezentowany jest przez rozciągające wiązania $\text{C}-\text{N}$ znajdujące się w 1400 cm^{-1} [402]. Nie obserwuje się jednak amidu I-rzędowego przy ok. 1589 cm^{-1} i odpowiadającemu jemu drgań zginających w grupach $\text{N}-\text{H}$. Z kolei pasma znajdujące się w regionach 1445 cm^{-1} oraz 1375 cm^{-1} odpowiadają wiązaniom kolejno zginającemu $-\text{CH}_2$ i symetrycznym deformacjom grup $-\text{CH}_3$. Asymetrycznym rozciąganiom grup mostkowych $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ odpowiada pasmo z maksimum w 1153 cm^{-1} , natomiast rozciągające wiązania w grupach $\text{C}-\text{O}$ reprezentują regiony z maksimum w 1066 cm^{-1} oraz 1028 cm^{-1} [402]. Opisane powyżej zidentyfikowane pasma odpowiadają literaturowym analizom warstw chitozanu, różnice między kształtem poszczególnych pasm jak i intensywnością można powiązać z efektem wpływu stopnia hydratacji struktury chitozanu, co obserwowano również w pracy R. Mauricio-Sanchez, *et al.* [403].

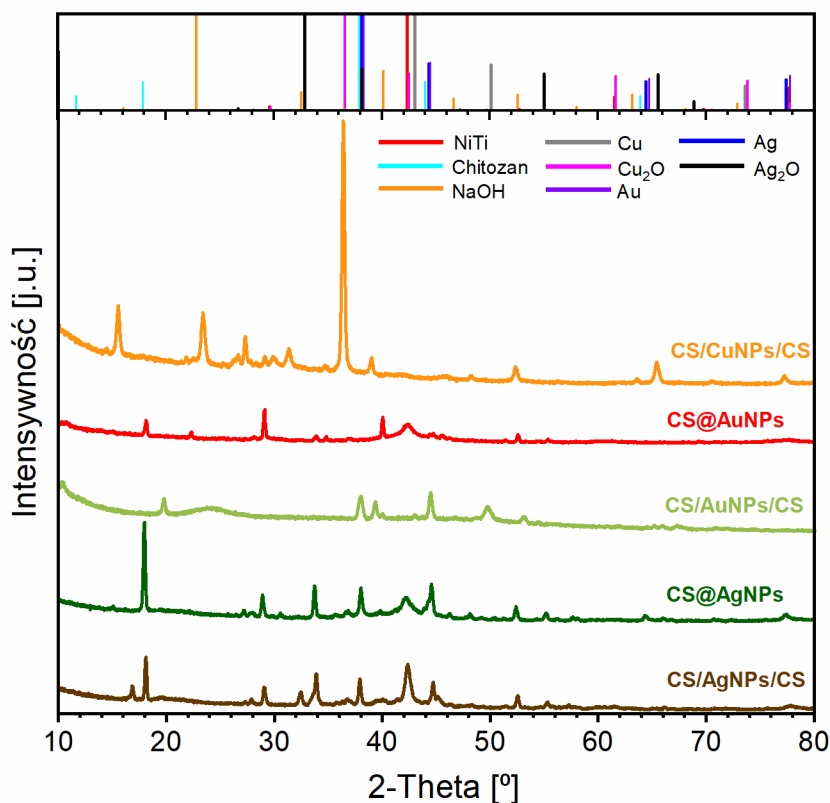
Analizując zestawione widma można stwierdzić, że na obecność nanocząstek metali w powłokach wskazują przesunięcia maksimów dwóch pasm zlokalizowanych w 1670 cm^{-1} oraz 1568 cm^{-1} . Jest to związane z oddziaływaniem elektrostatycznym polimeru z nanocząstkami, które w swojej pracy obserwowała M. Potara, *et al.* [404] dla warstw chitozanu z nanocząstkami srebra. Dodatkowo można zaobserwować wyższą intensywność pików związaną obecnością nanocząstek metali w warstwach otrzymanych z koloidów ($\text{CS}@\text{AuNPs}$, $\text{CS}@\text{AgNPs}$), w przeciwieństwie do większości pokryć przygotowanych metodą hybrydową ($\text{CS}/\text{AuNPs}/\text{CS}$, $\text{CS}/\text{AgNPs}/\text{CS}$). Wskazuje to na intensywniejsze oddziaływanie nanocząstek metali z chitozanem, w przypadku losowego ułożenia nanocząstek w matrycy biopolimeru, w przeciwieństwie do struktur z bardziej uporządkowanym ich umiejscowieniem. Odmienne zachowanie wykazuje warstwa $\text{CS}/\text{CuNPs}/\text{CS}$, dla której intensywności pasm są najwyższe, co obserwował również E. Prokhorov, *et al.* [405] dla podobnych warstw na bazie

chitozanu i CuNPs. Autor wskazuje, że podwyższone intensywności mogą być spowodowane potencjalną interakcją jonów miedzi ze strukturą chitozanu oraz tworzeniem kompleksów na bazie chitozanu i jonów miedzi.

W powyższym rozdziale zaprezentowano wyniki składu chemicznego i budowy strukturalnej otrzymanych pokryć, na podstawie których, w kontekście obecności chitozanu na powierzchni, można wnioskować o jednorodności chemicznej otrzymanych struktur. Obecność chitozanu potwierdzają również rezultaty analizy z wykorzystaniem spektroskopii IR, które wskazują na typowe wiązania dla tych struktur, w tym występowanie grup aminowych, grup $-CH_2$ i $-CH_3$, grup N-acetylowych i wiązań $C-O-C$. Dodatkowo warstwy otrzymane na bazie koloidów w analizie EDS oraz XPS wykazują obecność pierwiastków właściwych dla odpowiednich modyfikacji, co oznacza, że część nanocząstek metali znajduje się w warstwie wierzchniej otrzymanych pokryć, w przeciwieństwie do modyfikacji z nanocząstkami otrzymywanymi techniką hybrydową, które są umiejscowione między dwoma warstwami chitozanu. Na obecność dodatkowych atomów modyfikujących (nanocząstek metali) strukturę CS i ich wzajemne oddziaływanie elektrostatyczne wskazują również nieznaczne przesunięcia pasm charakterystycznych dla grup $-C=O$, $C-H$ i $N-H$.

9.2.5. Budowa fazowa warstw

Uzupełnieniem informacji o budowie warstwy wierzchniej na powierzchni modyfikowanego nitinolu były badania składu fazowego z wykorzystaniem techniki GID-XRD. Rezultaty pomiarów wraz z załączonymi wzorcami pozycji refleksów dla oczekiwanych w strukturze faz zamieszczono na Rys. 9.22.



Rys. 9.22. Widma XRD powierzchni powłok na bazie chitozanu modyfikowanego koloidem CS@AgNPs (linia ciemnozielona), koloidem CS@AuNPs (linia czerwona), jak i otrzymanych metodą hybrydową w układzie CS/CuNPs/CS (linia pomarańczowa), CS/AgNPs/CS (linia brązowa) i CS/AuNPs/CS (linia jasnozielona). Dodatkowo zaznaczono refleksy charakterystyczne dla poszczególnych faz: NiTi, Ni, NiO, Ti, Ti₂O₃, TiO₂ (dane z bazy programu Match!)

Skład fazowy badanych powłok charakteryzował się obecnością krystalitów chitozanu, mało intensywnych refleksów pochodzących od podłoża (NiTi), krystalitów wodorotlenku sodu pochodzących z etapu neutralizacji chitozanu oraz metali i ich tlenków właściwych dla charakteru modyfikacji. W pierwszej kolejności charakterystyczne refleksy chitozanu zostały zidentyfikowane w pozycjach 18.06°, 37.92° oraz 64.01°, odpowiadają one orientacji faz chitozanu w płaszczyznach kolejno (110), (200) i (220) [406,407]. Refleks pochodzący od nitinolu w pozycji 42.27° (110), charakteryzuje się niską intensywnością, wynika to z stosunkowo dobrego pokrycia powierzchni podłoża warstwami. Efektem neutralizacji warstw

chitozanowych jest obecność NaOH na powierzchni, co potwierdziła również analiza składu chemicznego. W postaci krystalicznej występuje on jako faza o orientacji w płaszczyznach (202), (400), (442) i (602), zidentyfikowanych na podstawie refleksów w pozycjach, odpowiednio 23.28° (w warstwach CS/AuNPs/CS i CS/CuNPs/CS), 32.50° (w warstwie CS/AgNPs/CS), 40.14° oraz 52.67° [408].

Każda z warstw zawiera ponadto fazy związane bezpośrednio z nanocząstkami, które znajdują się w strukturze właściwej modyfikacji. Warstwy CS@AuNPs (kolor czerwony) oraz CS/AuNPs/CS (kolor jasno zielony) charakteryzują się obecnością refleksu (o mniejszej intensywności w przypadku pierwszej, a wyraźniejszym w przypadku drugiej modyfikacji) w pozycji 44.38° identyfikowalnej jako złoto metaliczne (200), dodatkowo CS/AuNPs/CS cechuje refleks w 38.01° odpowiadający fazie zorientowanej w płaszczyźnie (111) [401]. Identycznymi płaszczyznami charakteryzuje się warstwa chitozanu z AuNPs uzyskana przez A. Youssef, *et al.* [409] z koloidu CS@AuNPs na drodze naniesienia koloidu i pozostawienia w suszarce laboratoryjnej do odparowania rozpuszczalnika.

Warstwy z dodatkiem nanocząstek srebra (CS@AgNPs – kolor ciemno zielony oraz CS/AgNPs/CS – kolor brązowy) charakteryzują się obecnością refleksów w podobnych pozycjach co warstwy wzbogacone złotem ze względu na bardzo niewielkie różnice w odległościach międzypłaszczyznowych między tymi dwoma metalami szlachetnymi. Zatem w pozycji 37.98° , 44.56° , 64.57° i 77.45° znajdują się refleksy odpowiadające płaszczyznom (111), (002), (022) i (113) [410–412]. Refleksy charakterystyczne dla trzech pierwszych wymienionych płaszczyzn znajdują również potwierdzenie w pracy A. Youssef, *et al.* [409], który scharakteryzował również warstwę chitozanu z nanocząstkami srebra. Natomiast wszystkie płaszczyzny zidentyfikowane dla wytworzonych warstw były obecne w kompozycie chitozan-AgNPs stabilizowanym sodem, otrzymanym na drodze syntezy filmów poprzez odparowanie rozpuszczalnika [413]. Dodatkowo struktura fazowa warstw z dodatkiem srebra wykazuje obecność tlenku srebra (I), który został zidentyfikowany na podstawie pozycji 33.65° , 54.99° oraz 66.04° wskazujących płaszczyzny, kolejno, (111), (202) oraz (131) [414,415]. Ostatnia z modyfikacji, CS/CuNPs/CS (kolor pomarańczowy), obecnością refleksów w pozycjach 29.19° i 36.26° wskazuje na udział fazy Cu_2O o orientacji płaszczyzn (110) i (111) [416,417]. Brak obecności krystalitów miedzi metalicznej można z dużą dozą prawdopodobieństwa uzasadnić bardzo szybkim procesem utleniania nanocząstek miedzi w powietrzu, co w połączeniu z niewielką ich średnicą może uzasadniać obecność wyłącznie tlenku miedzi(I). Obecność tego zjawiska również zaobserwował w strukturach CS@CuNPs

M. Usman, *et al.* [416], który poza niewielkim udziałem miedzi metalicznej, wskazał również na tlenki miedzi na pierwszym i drugim stopniu utlenienia.

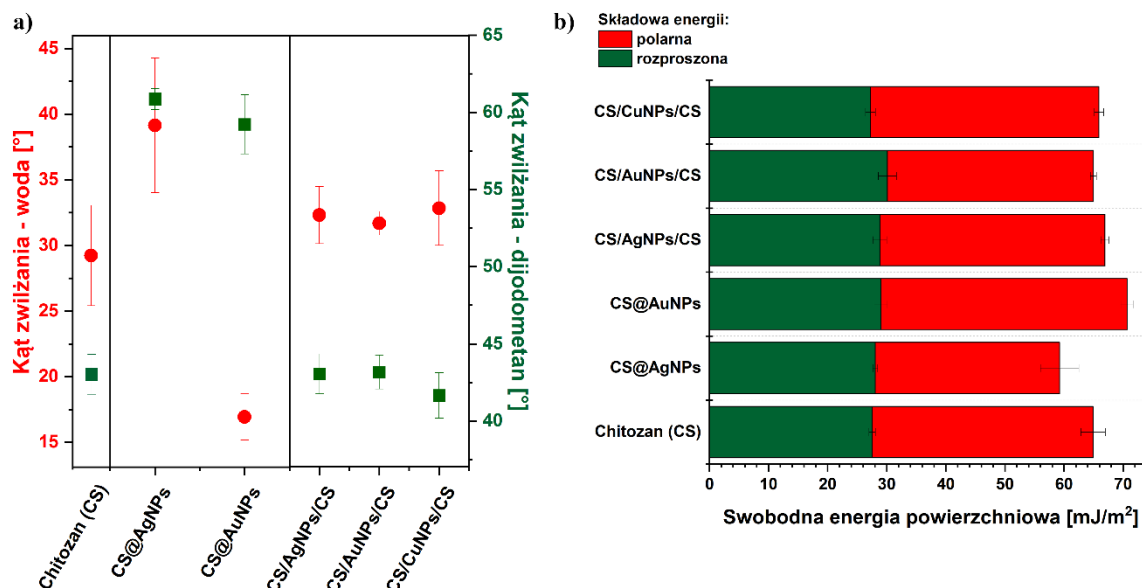
Badania składu fazowego warstw na bazie chitozanu dostarczyły wyników komplementarnych do rezultatów składu chemicznego zaprezentowanych w Rozdziale 9.2.4. Przeprowadzona analiza dyfraktogramu potwierdza obecność faz krystalicznych pochodzących od chitozanu oraz pozostałości wodorotlenku sodu na powierzchni warstw. Jednak bardziej istotne są rezultaty pomiarów zaobserwowane dla faz odpowiadającym metalom i ich tlenkom, które występują w biokompozycie w postaci nanocząstek. Każda z modyfikowanych warstw charakteryzuje się obecnością krystalitów metalu właściwego dla wprowadzonych nanocząstek, jak również w przypadku srebra oraz miedzi obecne są refleksy identyfikowane jako tlenki odpowiednio Ag_2O i Cu_2O . Rezultaty te potwierdzają utlenianie się nanocząstek, które było również widoczne podczas analizy koloidu na bazie chitozanu z dodatkiem srebra (Rozdz. 9.2.1.2.1.) oraz nanocząstek srebra i miedzi otrzymanych metodą kondensacji w obecności gazu obojętnego (kolejno, Rozdz. 9.2.1.2.2. i Rozdz. 9.2.1.3.)

9.2.6. Zwilżalność powierzchni i energia powierzchniowa warstw

Jak już wcześniej wspomniano, powierzchnie biomateriałów, które wchodzą w bezpośredni kontakt z tkankami organizmu muszą spełniać szczególne właściwości pozwalające na eliminację zagrożeń związanych z trombogennością, stanami zapalnymi oraz infekcjami. Do właściwości powierzchni ograniczających powyższe czynniki zalicza się szereg właściwości, w tym opisaną w Rozdz. 9.2.3. chropowatość powierzchni, porowatość, kształt porów i ich rozkład, skład chemiczny oraz omawianą w tym rozdziale zwilżalność i energię powierzchniową [418]. Mając na uwadze powyższy, złożony układ zależności cech powierzchni, nie można jednoznacznie stwierdzić jakie parametry kąta zwilżania będą optymalne dla adaptacji i proliferacji komórek. Przykładowo, F. Abushahba, *et al.* [419] analizując wpływ kąta zwilżania podłoża cynkowego modyfikowanego bioszklę o nazwie handlowej Bioglass® klasy 45S5 na proliferację komórek wskazuje na trend wzrostu ich ilości na powierzchniach bardziej hydrofilowych (10.5° ÷ 14.7°). Natomiast V. Babuska, *et al.* [420] modyfikując tytan uzyskał najbardziej efektywną proliferację komórek dla wartości kąta zwilżania 70° . Różnica ta może wynikać między innymi z wysokiego stopnia skomplikowania żywych organizmów i szeregu właściwości fizykochemicznych powierzchni, które mogą wpływać na adaptację komórek. Właściwości materiału, kontaktującego się z komórkami, muszą stanowić wypadkową, która będzie odpowiadała optymalnym warunkom dla przeżycia komórek właściwych dla lokalizacji implantu. Warto również zwrócić uwagę na doniesienia

w zakresie antybakteryjności powierzchni hydrofobowych i superhydrofobowych [338], jednakże w kontekście oddziaływania powierzchni z komórkami i bakteriami nie jest jedynym i decydującym.

Zwilżalność biomateriałów polimerowych odgrywa ponadto szczególną rolę w rozwijaniu ich funkcjonalności o kolejne właściwości, w tym dozowanie leków i biostymulację [421]. Kąt zwilżania wpływa na szybkość uwalniania czynników bioaktywnych z powierzchni biomateriału, w przypadku gdy terapeutyk ma charakter hydrofobowy hydrofilowa powierzchnia biomateriału zwykle spowalnia jego wydzielanie i analogicznie jeżeli czynnik bioaktywny będzie hydrofilowy do hydrofobowa powierzchnia biomateriału prowadzi do wolniejszego jego uwalniania. Natomiast jeżeli układ został zaprojektowany do szybkiego uwalniania terapeutyku to charakterystyki terapeutyku i powierzchni w zakresie zwilżalności powierzchni powinny być zgodne [422]. Zatem intencjonalna modyfikacja zwilżalności powierzchni może, jako jeden z czynników, umożliwić projektowanie systemu dostarczania leków. Mając na uwadze powyższe zależności dokonano pomiarów kąta zwilżania dla cieczy polarnej i niepolarniej dla otrzymanych układów warstw, a ich rezultaty zaprezentowano na Rys. 9.23.a.



Rys. 9.23. a) Wartości kąta zwilżania powierzchni warstw chitozanu (CS), chitozanu modyfikowanego koloidami CS@AgNPs i CS@AuNPs oraz warstw otrzymanych metodą hybrydową CS/CuNPs/CS, CS/AgNPs/CS i CS/AuNPs/CS w kontakcie z wodą destylowaną (kolor czerwony) oraz diiodometanem (kolor zielony) oraz b) energia powierzchniowa z podziałem na energię polarną (kolor czerwony), rozproszoną (kolor zielony) powłok niemodyfikowanego chitozanu (CS), chitozanu modyfikowanego koloidami CS@AgNPs i CS@AuNPs oraz warstw otrzymanych metodą hybrydową CS/CuNPs/CS, CS/AgNPs/CS i CS/AuNPs/CS.

Obserwacje poczynione w obszarze zwilżalności powierzchni pozwalają na określenie wszystkich modyfikacji powierzchni warstwami na bazie chitozanu materiałami hydrofilowymi (kąt zwilżania $< 90^\circ$). Warstwa CS charakteryzuje się kątem zwilżania $29.2 \pm 3.8^\circ$ (dla wody) oraz $43.0 \pm 1.3^\circ$ (dla diiodometanu), rezultaty w bardzo podobnym zakresie zaobserwowano dla warstw otrzymanych metodą hybrydową, w których zewnętrzną warstwę stanowił chitozan (CS/AuNPs/CS, CS/AgNPs/CS, CS/CuNPs/CS). Uzyskane wyniki korespondują z prezentowanymi przez K. Terpiłowski, *et al.* [423], choć wybrane wskazują również na wartości kąta zwilżania dla chitozanu ok. 80° [424], co może być podyktowane wykorzystaniem chitozanu o innej masie cząsteczkowej, innej porowatości, innego pochodzenia lub innym stopniem deacetylacji (udziałem wolnych grup aminowych w strukturze) biopolimeru. Szczegółowe badania wskazujące na istotny wpływ deacetylacji na zwilżalność powierzchni chitozanu (z wykorzystaniem wody jako cieczy pomiarowej) przeprowadził L. Foster, *et al.* [425]. Z pracy wynika, że deacetylacja na poziomie od 72% do 77% nie wpływa znacząco na kąt zwilżania stabilizując go na poziomie *ca.* 65° , natomiast jej wzrost do 85% powoduje wzrost wartości kąta zwilżania do *ca.* 105° .

W przeciwieństwie do opisanych wcześniej modyfikacji, zmianę kąta zwilżania zaobserwować można dla warstw otrzymanych z wykorzystaniem koloidów CS@AuNPs i CS@AgNPs. W pierwszym przypadku wartość kąta zwilżania (dla wody) maleje do $16.8 \pm 1.8^\circ$, względem chitozanu niemodyfikowanego (CS), natomiast obecność AgNPs w strukturze zwiększa wspomnianą wartość do $39.2 \pm 5.2^\circ$. Opisywane, zmienne wartości zwilżalności w przypadku nanocząstek złota wynikają między innymi z rodzaju i rozmiarów nanocząstek [426], przykładowo dla struktur chitozanu z AuNPs (o średniej średnicy ok. 10 nm) obserwuje się zwilżalność na poziomie *ca.* 60° . Natomiast w przypadku modyfikowania struktury z wykorzystaniem nanocząstek srebra (średnica ok. 15.3 nm) powierzchnia wykazuje przeważnie właściwości hydrofilowe (ok. 30°). W tym ostatnim przypadku, jak donosi J. Yin, *et al.* [427], wzmacnia się również działanie antybakteryjne powierzchni w kontakcie ze szczepem *E. coli*.

W przypadku swobodnej energii powierzchniowej, jej wartość zależy od kątów zwilżania dla cieczy polarnej i niepolarniej, zatem oczekuje się wpływu kąta zwilżania na adaptację namnażanie komórek. Badania wskazują jednak, że korelacja nie jest bardzo silna, przykładowo S. Kennedy, *et al.* [428] wskazuje na znacznie efektywniejsze namnażanie się komórek MC3T3-E1 (osteoblasty pochodzenia mysiego) dla powierzchni o najniższej wartości energii powierzchniowej (*ca.* 13 mN/m) i kąta zwilżania 90° . Natomiast V. Pešková,

et al. [429] zaobserwowała najlepszą proliferację komórek fibroblastów dla diametralnie wyższej wartości energii powierzchniowej (ca. 50 mN/m) i kąta zwilżania z podobnego zakresu (70-100°), jak w pracy S. Kennedy, *et al.* [428]. Dane te wskazują na równie nieoczywisty wpływ wartości energii powierzchniowej na zachowanie komórek jak w przypadku parametru kąta zwilżania. W pracy na podstawie uzyskanych danych (wartości kąta zwilżania dla dwóch cieczy pomiarowych) obliczono w oparciu o metodę Owensa-Wendta wartości energii powierzchniowej, z podziałem na składową polarną i dyspersyjną. Wartości te dla otrzymanych struktur na bazie chitozanu zestawiono na Rys. 9.23.b.

Wyniki obliczeń wartości całkowitej swobodnej energii powierzchniowej nie różnią się znacznie w obrębie badanych serii eksperymentalnych. Rezultaty te dla struktur chitozanu oraz serii układu warstw (CS/AuNPs/CS, CS/AgNPs/CS, CS/CuNPs/CS) były bardzo zbliżone, a wartość γ_c wyniosła ca. 65 mJ/m². Nieco niższą wartością (54.29 mJ/m²) charakteryzują się warstwy chitozanu otrzymane przez A. Mouhoub, *et al.* [430], natomiast obserwowane różnice, podobnie jak w przypadku kąta zwilżania, zależały od stopnia deacetylacji chitozanu. Taką zależność przywołuje w swojej pracy S. Bhardwaj, *et al.* [431], otrzymując wyniki ok. 65 mJ/m² dla niedeacetylowanego chitozanu, oraz wartości 22.1 mJ/m², 21.3 mJ/m² i 20.8 mJ/m² dla kolejno 77%, 84%, 94% deacetylacji. Składowa rozproszona (γ_d) dla wszystkich badanych serii oscylowała ok. 30 mJ/m², natomiast składowa polarna (γ_p) wykazywała zmienny charakter w zakresie ok. 30÷40 mJ/m², co właśnie stanowiło o odmiennych wartościach całkowitej energii powierzchniowej w przypadku warstw otrzymanych z koloidów CS@AuNPs i CS@AgNPs. Najwyższa wartość γ_p , a zarazem γ_c charakteryzowała warstwę CS@AuNPs, kolejno 41.65 mJ/m² i 70.67 mJ/m². Podobne wartości energii powierzchniowej warstw na bazie chitozanu z nanocząstkami złota uzyskał K. Kleszcz, *et al.* [348], mianowicie γ_c ok. 70 mJ/m² oraz γ_p ok. 45 mJ/m². W niniejszej rozprawie doktorskiej najniższą wartością całkowitej swobodnej energii powierzchniowej (59.27 mJ/m²) charakteryzowała się warstwa na bazie chitozanu i AgNPs (CS@AgNPs), co w dużej mierze wynikało z najniższej wartości składowej polarnej (31.20 mJ/m²). Zbliżone wartości całkowitej energii powierzchniowej (ca. 55 mJ/m²) do serii CS@AgNPs wykazywały również warstwy na bazie chitozanu i nanocząstek srebra otrzymane przez G. Raghavendra, *et al.* [396]. Warstwy wykazywały trend zmniejszenia wartości całkowitej i składowej polarnej energii powierzchniowej wraz ze zwiększeniem stężenia prekursora srebra, a co za tym idzie ilości AgNPs w warstwie. Warto również zauważyć, że wartość składowej niepolarniej energii powierzchniowej miała stałą wartość niezależnie od stężenia prekursora srebra.

Podsumowując wyniki uzyskane w tym rozdziale można stwierdzić, że wszystkie otrzymane warstwy wykazują hydrofilowy charakter powierzchni ($<90^\circ$), jednocześnie bez większych zmian w zakresie wartości swobodnej energii powierzchniowej. Zgodnie z przewidywaniami warstwy hybrydowe, z zewnętrzną warstwą niemodyfikowanego CS mają parametry bardzo zbliżone do warstwy chitozanu. Z kolei obecność nanocząstek na powierzchni struktur otrzymanych z koloidów wpływa na nieznaczne zmiany wartości kąta zwilżania i energii powierzchniowej, ze szczególnym uwzględnieniem jej składowej polarnej. Mając na uwadze chropowatość otrzymanych warstw w zakresie nanometrycznym oraz hydrofilowy charakter powierzchni modyfikowanych można zakładać, że procesy te mają potencjał w zakresie tworzenia dobrych warunków dla rozwoju komórek na powierzchni stopu NiTi.

9.2.7. Badania korozyjne

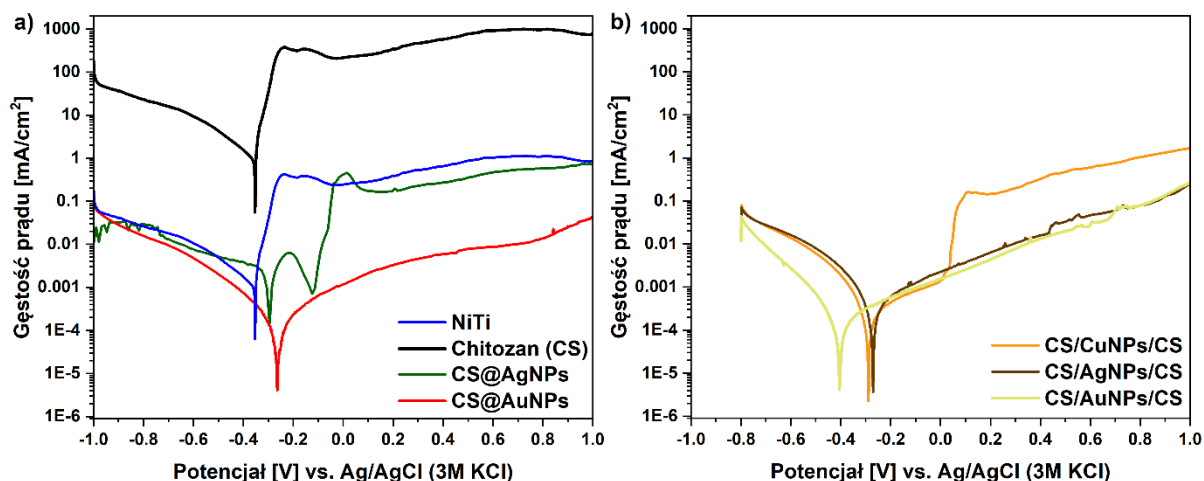
Jak już wcześniej wspomniano, korozja jest jednym z głównych procesów powodujących problemy podczas stosowania metali i ich stopów jako implantów w organizmie. Procesy korozyjne są efektem reakcji elektrochemicznych zachodzących na powierzchni implantu w środowisku płynów ustrojowych, czyli w warunkach, które U. Kamachimudali, *et al.* [432] porównuje do środowiska wody morskiej (napowietrzony NaCl). Metale pochodzące ze stopów w stanie wolnym utleniają się do kationów tych metali, a rozpuszczony tlen jest redukowany do anionów hydroksylowych. Podczas procesu korozji całkowite szybkości reakcji utleniania i redukcji muszą być równe, a ogólną szybkość reakcji reguluje najwolniejszy etap tych dwóch procesów [433]. Implantacyjne materiały metaliczne muszą zatem być chronione przed tym zjawiskiem poprzez obecność pasywnej warstwy ochronnej na powierzchni. Powłoka ta ma za z jednej strony za zadanie hamować procesy korozyjne ale i również ograniczać wydzielanie produktów korozji do organizmu [434].

Nitinol, jak przedstawiono w rozdziale 1.1.1. charakteryzuje się stosunkowo skomplikowanym procesem utleniania powierzchni, co powoduje wysoką podatność stopu na korozję i potencjalne niebezpieczeństwo związane z uwalnianiem jonów niklu do organizmu. W pierwszej części badawczej rozprawy (Rozdział 9.1.) jako korzystną wskazano modyfikację powierzchni stopu NiTi, pozwalającą na ograniczenie problemu uwalniania wolnych metali z powierzchni, z wykorzystaniem półgodzinnego trawienia w mieszaninie $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (CE_1, 70°C). Dotychczasowe badania wskazują, że dodatkowe pokrycie powierzchni stopu warstwami powinno wpłynąć pozytywnie na dodatkową poprawę odporności na korozję

w warunkach środowiska organizmu. Z tego powodu w przyjętej metodyce zaproponowano badania korozyjne obejmujące techniki woltamperometrii liniowej (LSV, ang. *Linear Sweep Voltammetry*) oraz pomiaru potencjału obwodu otwartego (OCP, ang. *Open Circuit Potential*), które przeprowadzono w warunkach symulowanego środowiska organizmu, mianowicie w płynie Ringera (8.6 g/L NaCl, 0.3 g/L KCl, 0.243 g/L CaCl₂, 7.15 pH), w temperaturze 37°C. Rezultaty powyższych badań pozwolą na określenie potencjału ochrony korozyjnej warstw otrzymanych na powierzchni stopu NiTi.

9.2.7.1. Woltamperometria liniowa

Metoda ta jest jedną z powszechnych technik badania biomateriałów pod kątem odporności na korozję. W teście tym reakcja anodowa próbki jest przyspieszana przez przyłożenie anodowego napięcia, a mierzona jest odpowiedź prądowa. Zwykle przeprowadza się potencjodynamiczny test polaryzacji (woltamperometria liniowa, LSV), w którym potencjał próbki jest zmieniany ze stałą prędkością. Na podstawie różnych uzyskanych parametrów, takich jak wielkość gęstości prądu i potencjał wżerów, można ocenić zachowanie korozyjne metali. Rezultaty uzyskane tą metodą (w tym gęstość prądu korozyjnego - $I_{kor.}$) można wyznaczyć metodą ekstrapolacji krzywych Tafela, w której określa się parametry krzywych polaryzacji anodowej i katodowej oraz punkt ich przecięcia będący wartością potencjału korozyjnego ($E_{kor.}$) [435]. Odporność korozyjna materiału lub badanego układu jest wypadkową powyższych parametrów, których wartości, im wyższe dla potencjału korozyjnego i im niższe dla gęstości prądu korozyjnego, tym lepszą ochronę korozyjną zapewniają [436]. Na Rys. 9.24. przedstawiono krzywe polaryzacji dla warstw na bazie chitozanu, otrzymanych na powierzchni stopu NiTi, a w Tabeli 9.4 zestawiono parametry korozyjne wyznaczone metodą ekstrapolacji krzywych Tafela.



Rys. 9.24. Przebieg krzywych polaryzacyjnych dla: a) powłok niemodyfikowanego nitinolu oraz podłoża modyfikowanego powłokami chitozanu (CS), chitozanu modyfikowanego koloidami CS@AgNPs i CS@AuNPs oraz b) warstw otrzymanych metodą hybrydową CS/CuNPs/CS, CS/AgNPs/CS i CS/AuNPs/CS.

Tabela 9.4. Zestawienie parametrów korozyjnych z przeprowadzonych testów uzyskanych na podstawie analizy uzyskanych krzywych polaryzacyjnych. $E_{kor.}$ – potencjał korozyjny, $I_{kor.}$ – gęstość prądu korozyjnego, β_a – nachylenie części anodowej, β_c – nachylenie części katodowej.

Rodzaj modyfikacji	$E_{kor.}$ [V]	β_a [V]	β_c [V]	$I_{kor.}$ [mA/cm ²]
NiTi	-0.03	0.12	20.27	$4.77 \cdot 10^{-3}$
Chitosan (CS)	-0.03	18.18	1.80	4.31
CS@AgNPs	-0.29	1.56	6.98	$2.77 \cdot 10^{-3}$
CS@AuNPs	-0.26	2.89	1.66	$6.39 \cdot 10^{-4}$
CS/CuNPs/CS	-0.29	5.81	2.44	$4.10 \cdot 10^{-4}$
CS/AgNPs/CS	-0.27	5.49	2.31	$6.23 \cdot 10^{-4}$
CS/AuNPs/CS	-0.41	6.12	2.17	$2.08 \cdot 10^{-4}$

Analiza powyższych krzywych, w tym w połączeniu z wartościami zamieszczonymi w Tabeli 9.4., pozwala na określenie odporności korozyjnej modyfikowanych powierzchni. Dla badanych właściwości parametrem wpływającym na korzystniejszą odporność korozyjną powierzchni jest jak najniższa wartość gęstości prądu w całym, zmiennym zakresie potencjałów. W przypadku nitinolu modyfikowanego powłoką chitozanu (CS, kolor czarny) obserwuje się bardzo dużą wartość gęstości prądu w części katodowej i anodowej, skutkującą gęstością prądu korozyjnego ($4.31 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) na najwyższym poziomie spośród wszystkich modyfikacji. Rezultat ten wskazuje, że powłoka CS nie poprawia, a wręcz pogarsza odporność korozyjną niemodyfikowanego stopu NiTi (kolor niebieski) w środowisku roztworu Ringera. W tym przypadku prawdopodobnie mechanizm korozyjny obejmuje powierzchniowy rozkład wiązań β -1,4-glikozydowych (depolimeryzację) oraz wiązań N-acetylowych (deacetylację),

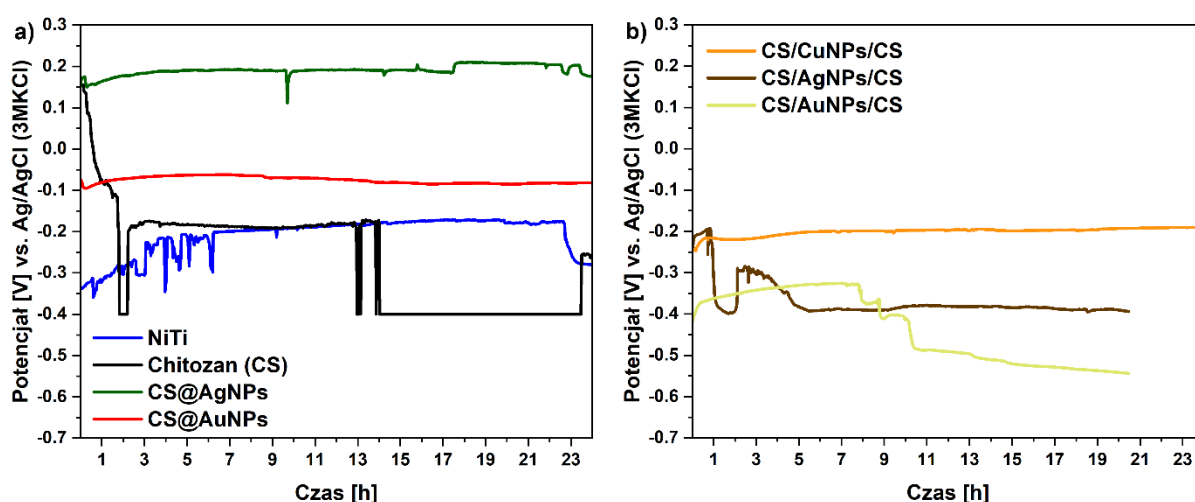
które to procesy nasilają się w środowiskach korozyjnych. W efekcie obserwuje się spadek masy cząsteczkowej biopolimeru i wzrost stopnia deacetylacji. W tym samym czasie następuje również degradacja grup funkcyjnych chitozanu, w tym karbonylowych (-CO), aminowych (-NH₂) i hydroksylowych (-OH) [437]. Podobny efekt zaobserwował Szoke, et al. [438], który badał powłoki chitozanowe wytworzone metodą dip-coatingu na podłożach cynkowych. Dodatek nanocząstek metali szlachetnych do powłoki CS, dla wszystkich stosowanych modyfikacji, powoduje znaczny spadek gęstości prądu (minimum stukrotnie), zwłaszcza w części anodowej. Najmniej skuteczna pod względem ochrony korozyjnej jest warstwa CS@AgNPs, której wartość $I_{kor.}$ wynosi $2.77 \cdot 10^{-3} \text{ mA/cm}^2$, na co wskazują również badania przeprowadzone przez H. Fetouh, et al. [439], który uzyskał wyniki tylko nieznacznie poprawiające właściwości korozyjne warstwy modyfikowanej AgNPs względem warstwy chitozanu. Natomiast, wartość prądu korozyjnego w przypadku czterech modyfikacji, mianowicie z otrzymaniem warstwy koloidu CS@AuNPs oraz warstw hybrydowych (CS/CuNPs/CS, CS/AgNPs/CS, CS/AuNPs/CS) były o rząd niższe (do $2.08 \cdot 10^{-4} \text{ } \mu\text{A/cm}^2$) niż wartość prądu korozyjnego dla nitinolu niemodyfikowanego ($4.77 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{A/cm}^2$). Poprawę właściwości korozyjnych ($I_{kor.}$ $0.01 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$) dla warstw chitozanu modyfikowanych AuNPs uzyskał R. Ahmed, et al. [440] w warunkach pięciogodzinnej immersji w roztworze Hanks'a.

Przedstawione wyniki wskazują zatem na korzystny wpływ otrzymanych nanocząstek w badanych układach warstwowych na odporność korozyjną powierzchni stopu NiTi w roztworze Ringera. Związane jest to z lokowaniem się naometrycznych cząstek metali w strukturze chitozanu, które w rezultacie zmniejszają porowatość struktury biopolimeru. W konsekwencji depozycja nanocząstek utrudnia przejście agresywnego roztworu przez strukturę powłoki do powierzchni stopu NiTi. Dodatkowo w przypadku otrzymanych pokryć techniką hybrydową (CS/AuNPs/CS, CS/AgNPs/CS, CS/CuNPs/CS), homogeniczna warstwa nanocząstek metali stanowi dodatkową barierę zabezpieczającą podłoże.

9.2.7.2. Potencjał obwodu otwartego

Uzupełnieniem testów odpowiedzi korozyjnej dla układów podłoże metaliczne – warstwa ochronna jest pomiar potencjału obwodu otwartego (OCP), który odpowiada potencjałowi korozji ($E_{kor.}$). Przyjmuje się, że wartość potencjału reprezentuje stan ustalony, ale nie równowagę elektrochemiczną. Potencjał korozyjny ($E_{kor.}$) to potencjał korodującej powierzchni (badanej modyfikacji) w elektrolicie w stosunku do elektrody odniesienia [433]. Przeprowadzenie pomiarów

w funkcji czasu pozwala na określenie potencjału korozyjnego w obwodzie otwartym niezależnie od możliwych występujących zakłóceń spowodowanych efektami zachodzącymi w warstwach ochronnych, jak również określenie ich trwałości w warunkach korozyjnych [436]. W niniejszej pracy komplementarną analizę pomiarów LSV w postaci pomiaru potencjału obwodu otwartego przeprowadzano przez 24h w roztworze Ringera, co pozwoliło na wykrycie zmian potencjału w czasie (względem elektrody Ag/AgCl). Wartość potencjału świadczy o parametrach korozyjnych zabezpieczających powierzchnię stopu przed korozją, im wyższa jego wartość tym skuteczniej ogranicza negatywne skutki korozji. Jednakże ostateczna ocena odporności na korozję wynika z analizy wyników z obydwu stosowanych metod badań, LVS oraz OCP. Wyniki pomiaru potencjału w zależności od czasu zostały przedstawione w formie graficznej na Rys. 9.25.



Rys. 9.25. Wykres potencjału obwodu otwartego przeprowadzanego przez 24h dla a) powłok niemodyfikowanego nitinolu oraz podłoża modyfikowanego powłokami chitozanu (CS), chitozanu modyfikowanego koloidami CS@AgNPs i CS@AuNPs oraz b) warstw otrzymanych metodą hybrydową CS/CuNPs/CS, CS/AgNPs/CS i CS/AuNPs/CS.

Początkowa wartość potencjałów obwodu otwartego warstw w większości jest podobna do wartości potencjału charakterystycznego dla minimalnej wartości gęstości prądu uzyskanego metodą LSV (Rys. 9.24.). Wyjątek stanowi warstwa chitozanu (CS, Rys. 9.25.a.) oraz warstwa CS@AgNPs. W pierwszym przypadku potencjał po początkowych wysokich wartościach w drugiej godzinie pomiaru przyjmuje wartość odpowiadającą rezultatom woltamperometrii liniowej. Dla drugiej warstwy potencjał jest znacznie różny od wyznaczonego techniką LSV (o ok 0.44 V). Różnica ta może być spowodowana niejednoznacznym przebiegiem krzywej polaryzacyjnej uzyskanej dla warstwy chitozanu modyfikowanego AgNPs.

Niemodyfikowany stop NiTi (Rys. 9.25.a., kolor niebieski) wykazuje przebieg zmian potencjału w czasie wskazujący na tworzenie się warstwy pasywacyjnej na jego powierzchni po ok. 7 godzinach immersji, na co wskazuje wzrastający potencjał a później jego stabilizacja w kolejnych godzinach pomiaru. Nagłe obniżenie wartości potencjału jest widoczne dopiero ok. 22 godziny pomiaru, co wskazuje na degradację wytworzonej warstwy pasywacyjnej. Podobne rezultaty wzrostu potencjału w zakresie od $-0.35 \div -0.20$ V zaobserwował dla niemodyfikowanego nitinolu Y. Liu, *et al.* [441]. Potencjał warstwy niemodyfikowanego chitozanu (Rys. 9.25.a., kolor czarny), jak już wcześniej wspomniano, stabilizuje się po 2 godzinach pomiaru na poziomie -0.2 V i jest praktycznie niezmienny do ok. 13 godziny pomiaru, w której jego wartość znacznie spada do -0.4 V. Związane jest to zapewne z mechanizmami degradacji warstwy chitozanu opisanymi w poprzednim rozdziale (patrz rozdz. 9.2.7.1.). Takie zachowanie warstw chitozanu naniesionego na stal potwierdza również praca O. Fayomi, *et al.* [442], wskazująca na zmniejszenie wartości potencjału od ok. -0.5 V do ok. -0.7 V. Warto odnotować, że wartości potencjału są poniżej tych charakterystycznych dla nitinolu, zatem ponownie otrzymane rezultaty wskazują na negatywny wpływ niemodyfikowanej warstwy chitozanu na odporność korozyjną badanego układu.

Również niestabilny przebieg wartości potencjału korozyjnego w czasie można zaobserwować dla warstw hybrydowych CS/AuNPs/CS oraz CS/AgNPs/CS. W przypadku pierwszej z nich wartość potencjału utrzymywała się w okolicach -0.35 V do ósmej godziny pomiaru, kiedy to w ciągu dwóch kolejnych godzin wartość tego parametru spadała i osiągnęła minimum w ok. -0.5 V, utrzymując się na tym poziomie do końca pomiaru. Natomiast warstwa z nanocząstkami srebra (początkowo przez ok. godzinę) wykazywała E_{kor} ok. -0.2 V, która to wartość w kolejnej godzinie pomiaru zmalała do -0.4 V i pozostała na tym poziomie do końca pomiaru, poza czasem testu od 3 do 5 godziny kiedy wartość potencjału wzrosła do -0.3 V. Trudno wskazać przyczynę takiego zachowania warstw nakładanych sekwencyjnie, zwłaszcza w porównaniu do stabilnej warstwy CS/CuNPs/CS, jednakże można przytoczyć opisane wcześniej procesy degradacyjne warstwy chitozanu, która była warstwą zewnętrzną otrzymywanych pokryć.

Do powłok o stabilnym przebiegu potencjału w czasie należy zaliczyć warstwy chitozanu modyfikowane koloidami, w tym CS@AgNPs (Rys. 9.25.a., kolor zielony) i CS@AuNPs (Rys. 9.25.a., kolor czerwony) oraz warstwę hybrydową CS/CuNPs/CS (Rys. 9.25.b., kolor pomarańczowy). Wartości potencjału, którymi charakteryzują się te warstwy wynoszą kolejno 0.2 V, -0.1 V i -0.2 V, co wskazuje na potencjalnie najlepszą ochronę korozyjną warstwy

CS@AgNPs, kolejno warstwy CS@AuNPs i warstwy hybrydowej modyfikowanej CuNPs. Niezmiennosc potencjału podczas testów świadczy o stabilności tych warstw w czasie w warunkach symulujące procesy elektrochemiczne w symulowanym środowisku organizmu. W przypadku warstw chitozanu modyfikowanych nanocząstkami złota oraz miedzi doniesienia literaturowe potwierdzają obserwowane rezultaty, m.in. R. Farghali, *et al.* [443] wskazuje na poprawę właściwości korozyjnych tytanu pokrytego warstwą chitozanu z nanocząstkami złota (zmiana potencjału o ok. 0.2 V). Również wyższy o 0.2 V potencjał korozyjny wykazują warstwy na bazie CS i nanocząstek miedzi pokrywające stal medyczną 316L, które otrzymał E. Tabesh, *et al.* [444]. Natomiast, rezultaty uzyskiwane dla warstw chitozanu z dodatkiem AgNPs uzyskują tylko nieznaczną poprawę właściwości korozyjnych w zakresie wzrostu potencjału o ok. 0.04 V, jak w przypadku pokrycia stali St37 przeprowadzonego przez M. Solomon, *et al.* [445].

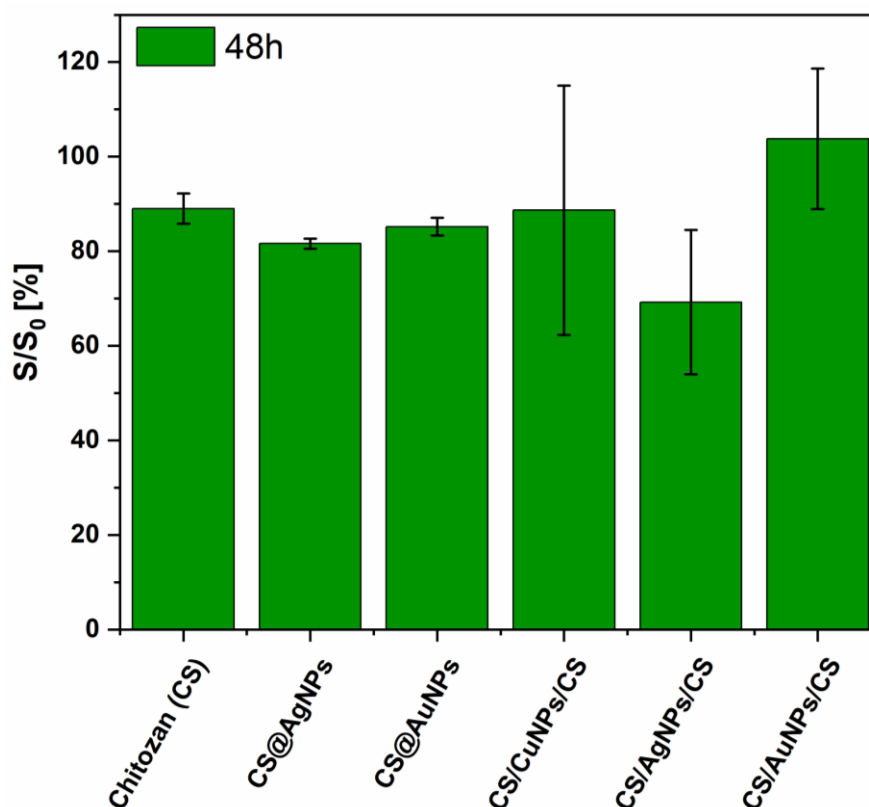
Rezultaty badań otrzymane w toku analizy odporności korozyjnej otrzymanych warstw na bazie chitozanu wskazują na bardzo dobre parametry korozyjne oraz stabilność warstw CS@AuNPs oraz CS/CuNPs/CS, które charakteryzowały się niską gęstością prądu korozyjnego ($2.77 \cdot 10^{-3} \div 2.08 \cdot 10^{-4} \text{ mA/cm}^2$) i jednolitymi wartościami potencjału korozyjnego w badaniu potencjału obwodu otwartego (ok. $-0.2 \div 0.15 \text{ V}$). Dobrą stabilnością w symulowanych warunkach organizmu charakteryzuje się warstwa CS@AgNPs, natomiast gęstość prądu korozyjnego jest o rząd wielkości wyższa od wymienionych wyżej warstw. Odminnym trendem charakteryzują się warstwy CS/AuNPs/CS i CS/AgNPs/CS, których wartość $I_{\text{kor.}}$ jest bardzo niska (ok. 10^{-4} mA/cm^2), natomiast warstwy te nie utrzymują jednolitej wartości potencjału w czasie. Z kolei najgorszymi parametrami korozyjnymi charakteryzuje się warstwa niemodyfikowanego chitozanu, która jak wspomniano zamiast ograniczać korozję nitinolu może ją przyspieszać.

9.2.8. Badania biologiczne *in vitro*

Wszelkie nowe materiały np. w postaci warstw lub powłok przeznaczone do zastosowań medycznych wymagają oceny ich bezpieczeństwa biologicznego. Badanie biogodności materiałów przeprowadzane jest poprzez aplikację komórek na powierzchnię materiału i ocenę ich przeżywalności oraz zachowania, w tym proliferacji. Szczególną uwagę należy skierować na materiały zawierające nanocząstki metali ze względu na ich niekonwencjonalne

właściwości wynikające z charakterystycznego rozmiaru i relacji objętości tych struktur do rozwinięcia powierzchni. Nanocząsteczki srebra są dobrze znane ze swojego szeroko udokumentowanego działania przeciwdrobnoustrojowego. Niemniej jednak ich skutki uboczne w stosunku do komórek organizmu znacznie ograniczają ich zastosowania terapeutyczne. Sugeruje się, że indukują one stres oksydacyjny i odpowiedź zapalną, co skutkuje cytotoksycznością i genotoksycznością [446–448]. Z drugiej strony, obecne szerokie zainteresowanie biomateriałami zawierającymi AuNPs wynika z ich unikalnych, wyjątkowych właściwości oraz faktu, że ogólnie określa się je jako stabilne chemicznie, biokompatybilne i nietoksyczne [449]. Z kolei nanocząstki miedzi charakteryzują się podobnymi właściwościami jak złoto, z potencjałem modyfikacji nanocząstek odpowiednimi ligandami, tańsze jest również ich wytwarzanie w porównaniu do nanocząstek złota i srebra [450].

Mając na względzie te wymagania określono żywotność komórek osteoblastów (linia MG-63) dla testowanych układów warstw na bazie chitozanu w warunkach *in vitro* po 48 godzinach kontaktu. Przeżywalność komórek oznaczono ilościowo za pomocą testu Alamar Blue, a uzyskane rezultaty zaprezentowano na Rys. 9.26.

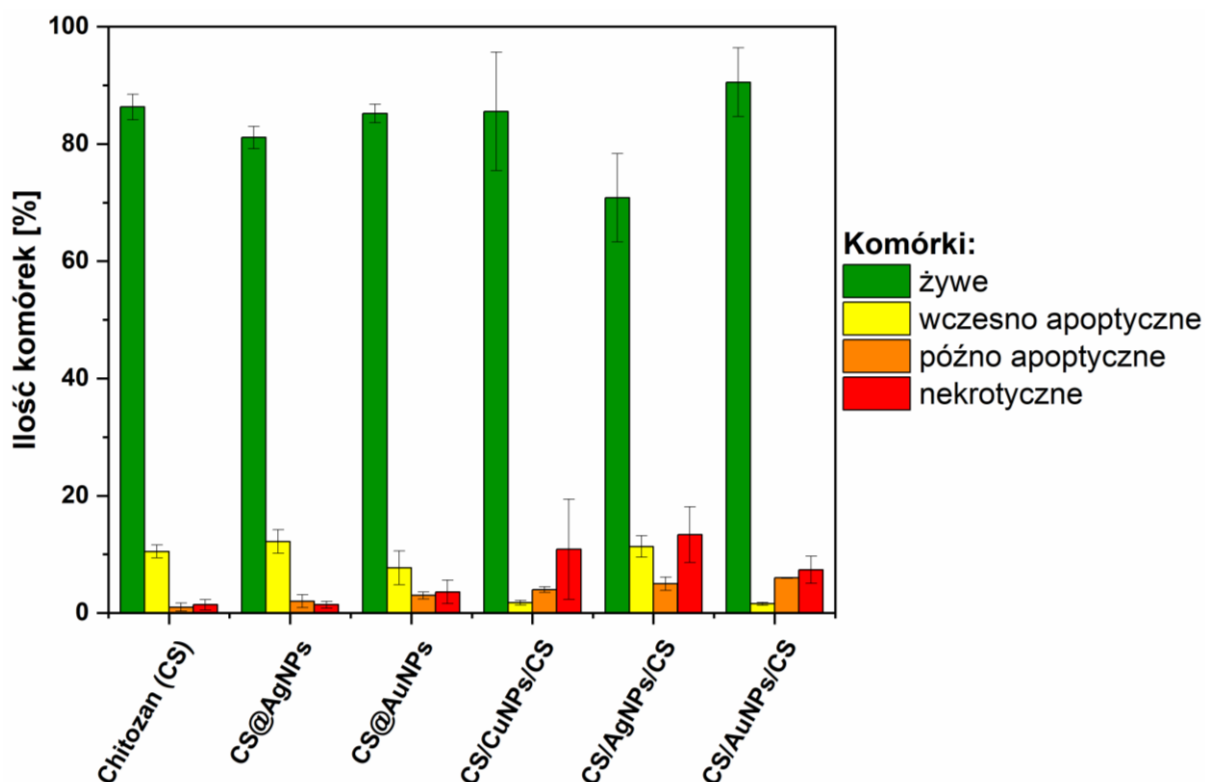


Rys. 9.26. Wykres przeżywalności komórek MG-63 w teście cytotoksyczności w kontakcie z powłokami chitozanu (CS), chitozanu modyfikowanego koloidami CS@AgNPs i CS@AuNPs oraz warstw otrzymanych metodą hybrydową CS/CuNPs/CS, CS/AgNPs/CS i CS/AuNPs/CS.

Zaprezentowane wyniki testu cytotoksyczności wskazują na przeżywalność komórek MG-63 na poziomie przekraczającym 80%, który wyznacza próg konieczny do uznania materiału za biozgodny. Jednym wyjątkiem spośród badanych struktur, niespełniającym tego wymagania jest warstwa CS/AgNPs/CS, na powierzchni której udział żywych komórek wyniósł $69.24 \pm 15.23\%$. Taki rezultat jest zapewne związany ze aktywnością nanocząstek srebra, które jak wcześniej wspomniano, poza działaniem antybakteryjnym mogą działać również cytotoksycznie. Znajduje to potwierdzenie m. in. w pracy B. Kulandaivelu, i K. Gothandam [451], w której komórki MCF-7 (komórki hormonozależnego nowotworu piersi) charakteryzowały się niższą przeżywalnością wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek srebra ($5 \div 40$ nm), dla $25 \mu\text{g/ml}$ było to ok. 60% przeżywalności, natomiast dla $100 \mu\text{g/ml}$ ok. 30%. Co istotne druga z przeprowadzonych modyfikacji z udziałem nanocząstek srebra (CS@AgNPs) również była na granicy 80% przeżywalności. Korzystniejsze rezultaty zostały zaobserwowane dla warstwy chitozanu, która wykazuje 90% przeżywalność komórek MG-63, na co wykazują wcześniejsze prace eksperymentalne zespołu K. Kyzioł, *et al.* [287] i P. Jabłoński, *et al.* [390]. Brak cytotoksyczności (S/S_0 ca. 90%) obserwowany był również dla układu CS/CuNPs/CS, rezultat ten potwierdza praca M. Sharifiaghdam, *et al.* [452] prezentująca wpływ stężenia CuNPs na żywotność komórek NIH-3T3 (fibroblasty), których 90% przeżywalność odnotowano dla $0.5 \mu\text{g/ml}$ i $1 \mu\text{g/ml}$ po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Najlepszą odpowiedzią biologiczną charakteryzują się warstwy z udziałem nanocząstek złota CS@AuNPs i CS/AuNPs/CS. Pierwsza z nich umożliwiła przeżycie ca. 90% komórek, natomiast warstwa wytworzona metodą hybrydową spowodowała przyrost komórek wyższy (tj. około 110%) niż w próbce odniesienia. Przykładowo N. Amanlou, *et al.* [453] wykazuje, że tak korzystne warunki dla wzrostu i proliferacji komórek (Huh7 – komórki nowotworu wątrobowokomórkowego i MCF7 – komórki estrogenozależnego nowotworu piersi) występują w żelach z nanocząstkami złota o stężeniu nieprzekraczającym $1 \mu\text{g/ml}$.

Warto jednak zauważyć wysoką wartość odchylenia standardowego w serii rezultatów dla warstw otrzymanych metodą hybrydową, która mogła być spowodowana nienajlepszą początkową kondycją komórek. Z tego też względu badania uzupełniono wykorzystując technikę cytometrii przepływowej, która jest testem pozwalającym na precyzyjne określenie wpływu materiału na żywotność komórek. Metoda pozwala na określenie nie tylko żywotności komórek, ale również mechanizmu ich śmierci. Możliwe jest rozróżnienie komórek apoptycznych, z podziałem na wczesną i późną apoptozę, oraz komórek nekrotycznych. Pierwszy mechanizm śmierci jest naturalnym końcem życia komórki, zwanym również

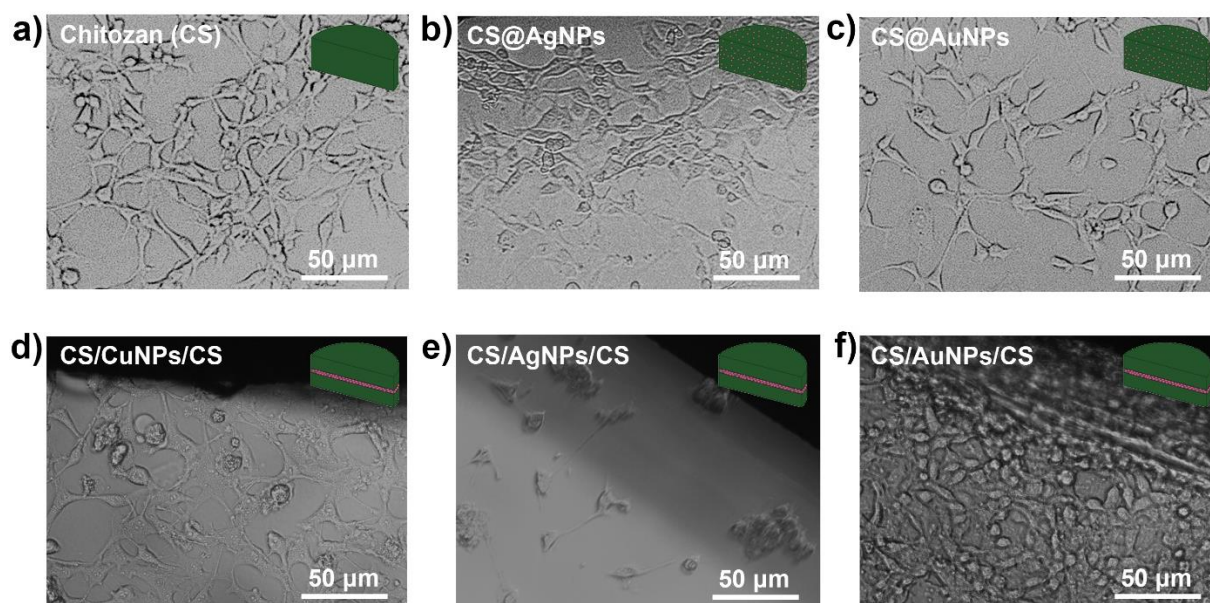
zaprogramowaną śmiercią komórki, a określenie czasu ich śmierci pozwala na rozróżnienie, czy śmierć nastąpiła w okresie inkubacji przed ekspozycją na materiał badany (wczesna faza apoptozy) lub już w trakcie badania (późna faza apoptozy). Natomiast mechanizm komórek nekrotycznych oznacza śmierć komórki w odpowiedzi na stres lub kontakt z powierzchnią badanego materiału. Rezultaty tych analiz zaprezentowano na Rys. 9.27.



Rys. 9.27. Wykres przeżywalności komórek MG-63, z podziałem na komórki żywe, wczesno i późno apoptyczne i nekrotyczne, w teście cytometrii przepływowej w kontakcie z powłokami chitozanu (CS), chitozanu modyfikowanego koloidami CS@AgNPs i CS@AuNPs oraz warstw otrzymanych metodą hybrydową CS/CuNPs/CS, CS/AgNPs/CS i CS/AuNPs/CS.

Rezultaty badań z wykorzystaniem cytometrii przepływowej potwierdzają rezultaty testu cytotoksyczności w zakresie udziału komórek żywych po kontakcie z warstwami na bazie chitozanu. Dla niemodyfikowanego chitozanu, chitozanu modyfikowanego koloidami (CS@AuNPs, CS@AgNPs) oraz CS/AgNPs/CS udział komórek wczesno apoptycznych utrzymywał się na poziomie ok. 10%, co oznacza, że taki procent komórek został zidentyfikowany jako komórki we wczesnym stadium zaprogramowanej śmierci. Poza tym warstwa CS i warstwy modyfikowane koloidem z nanocząstkami wykazują bardzo niewielkie udziały komórek późno apoptycznych oraz nekrotycznych. Natomiast seria warstw

hybrydowych charakteryzuje się dość wysokim udziałem komórek nekrotycznych, od ok. 10% dla CS/AgNPs/CS do ok. 6% dla CS/AuNPs/CS, których śmierć została spowodowana najprawdopodobniej kontaktem z testowanym materiałem. W tej serii również wyższy jest również udział komórek późno apoptycznych, wynoszący ok. 4% (np. dla CS/AgNPs/CS). Wskazuje to na mniejszą biogodność badanych modyfikacji z linią MG-63 i większy udział komórek, których śmierć była spowodowana kontaktem z materiałem. Obserwacje mikroskopowe komórek po ich okresie inkubacji pozwalają również określić ich morfologię oraz stopień pokrycia powierzchni. Komórki żywe, które dobrze reagują na powierzchnię zwiększają swoją objętość rozplaszczając się na powierzchni, natomiast komórki, które nie zaadaptowały się dobrze do powierzchni zmniejszają z nią swój kontakt, w rezultacie przyjmując postać kuli. Rezultaty obrazowania komórek z wykorzystaniem mikroskopu optycznego przedstawiono na Rys. 9.28.



Rys. 9.28. Morfologia komórek MG-63 po wykonanym teście cytotoxyczności powłok: a) chitozanu (CS), chitozanu modyfikowanego koloidami b) CS@AgNPs i c) CS@AuNPs oraz warstw otrzymanych metodą hybrydową d) CS/CuNPs/CS, e) CS/AgNPs/CS i f) CS/AuNPs/CS.

Zgodnie z uzyskanymi rezultatami testów cytotoxyczności i cytometrii przepływowej, komórki na powierzchni warstw niemodyfikowanego (Rys. 9.28.a.) oraz modyfikowanego koloidami chitozanu (Rys. 9.28.b-c.) adaptują się prawidłowo i rozplaszczają się, a stopień pokrycia badanych powierzchni jest relatywnie wysoki. Natomiast serie eksperymentalne badanych układów powłok, otrzymywanych metodą hybrydową, różnią się morfologią

i stopniem pokrycia w zależności od zastosowanych nanocząstek metali. Najgorzej adaptują się komórki na powierzchni warstwy CS/AgNPs/CS (Rys. 9.28.e.), dla której widoczne są nieliczne komórki, które nie przyrastają tylko formują się w kształt zbliżone do postaci sferycznej. Warstwa modyfikowana nanocząstkami miedzi (Rys. 9.28.d.) wykazuje posobny charakter pokrycia i morfologii komórek MG-63 jak warstwy modyfikowane koloidami. W przypadku z kolei struktur na bazie chitozanu i AuNPs (Rys. 9.28.f.) obserwuje się bardzo korzystne warunki do rozwoju komórek, które pokrywają niemal całą powierzchnię biomateriału i dobrze się adaptują, z rezultacie zwiększając swój udział.

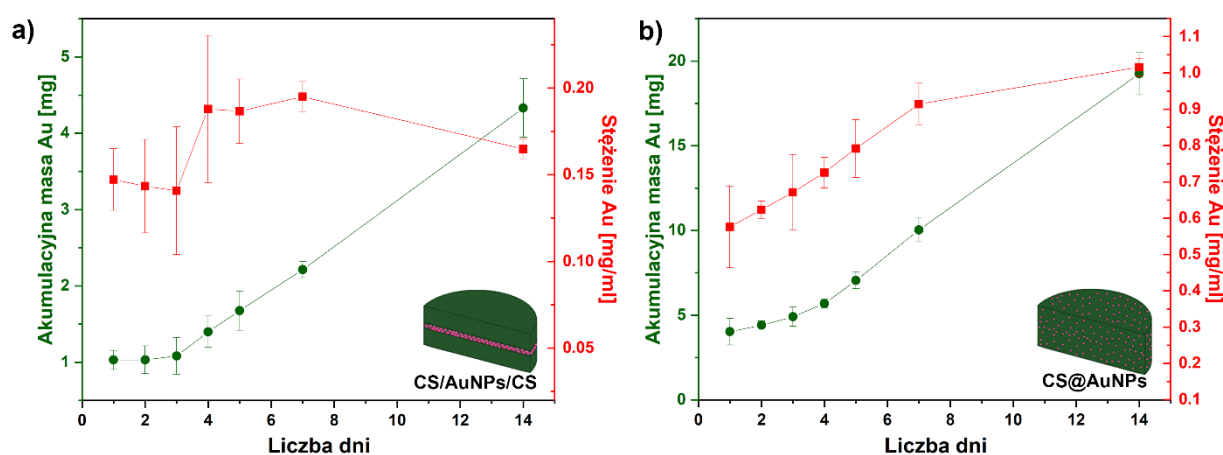
Jak już nadmieniono, nowe materiały przeznaczone do zastosowań medycznych wymagają oceny biogodności. Powyższe rezultaty testu cytotoksyczności, cytometrii przepływowej i obrazowania morfologii komórek jednoznacznie wskazują, że wszystkie otrzymane układy warstwowe mają charakter biogodny z linią komórkową MG-63. Jedynym pokryciem, który nie spełnia wymogu biogodności jest seria CS/AgNPs/CS, w której prawdopodobnie adaptację komórek utrudnia udział nanocząstek srebra o bardzo małych rozmiarach. Natomiast pozostałe warstwy wykazują warunki korzystne dla rozwoju komórek, mimo obecności nanocząstek również o niewielkich rozmiarach. Może to być spowodowane uwięzieniem w stałej matrycy polimerowej chitozanu nanocząstek miedzi i złota, jak i otrzymanych w koloidzie AgNPs o większych rozmiarach. Uwięzienie to i stopniowe uwalnianie nanocząstek mogą uniemożliwiać komórkom eukariotycznym dostęp nanocząstek metali.

9.2.9. Schemat uwalniania nanocząstek

Z definicji systemy dostarczania terapeutyków (leków) mają za zadanie umożliwić dostarczanie określonych substancji do określonych narządów, tkanek i w rezultacie komórek, w celu ich uwolnienia i absorpcji leku. Opracowywanie skutecznych systemów w tym zakresie jest zatem ważne dla uzyskania odpowiedniej aktywności farmakologicznej medykamentów oraz przewyciężenie obecnie istniejących ograniczeń w tym względzie, do których można zaliczyć m. in. ograniczoną rozpuszczalność, agregację leku, niską biodostępność, słabą biodystrybucję, brak selektywności lub zmniejszenie skutków ubocznych środków terapeutycznych. Ponadto ważnym jest aby dostarczanie leków miało ciągły charakter w okresie terapii, a ich stężenie było utrzymywane w tzw. oknie terapeutycznym, właściwym dla zastosowanego celu (patrz Rozdz. 6, Rys. 6.1.). Utrzymanie bowiem stężenia leku między

wartością stężenia cytotoksycznego do komórek, a minimalnym stężeniem hamującym rozwój bakterii jest istotne nie tylko ze względu na działanie terapeutyczne, ale również ze względu na niebezpieczeństwo wykształcenia antybiotykooporność bakterii na zastosowany lek. W tym rozdziale zbadano i porównano tempo uwalniania się bioaktywnych nanocząstek metali z matrycy chitozanu w dwóch układach konstrukcji warstw bionanokompozytowych, otrzymanej z koloidu z losowym zdyspergowaniem nanocząstek oraz otrzymanej metodą hybrydową z uporządkowaną strukturą biopolimer/nanocząstki/biopolimer. Badania uwalniania prowadzono w roztworze symulującym warunki środowiska organizmu ludzkiego – roztworze Ringera.

Na Rys. 9.29 przedstawiono wpływ budowy warstw nanokompozytowych na uwalnianie nanocząstek złota z matrycy chitozanu.

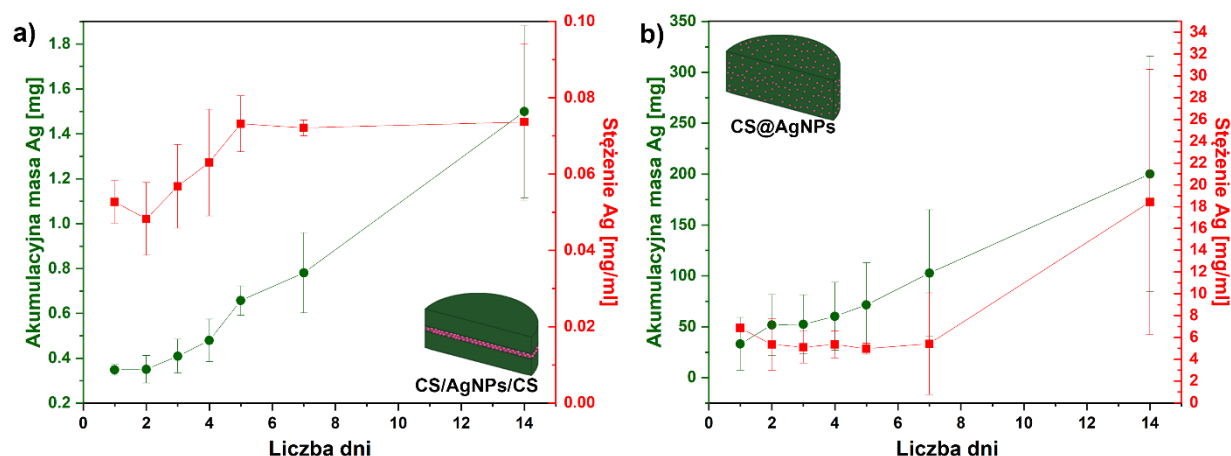


Rys. 9.29. Masa akumulacyjna (kolor zielony) oraz stężenie (kolor czerwony) nanocząstek złota uwalnianych z warstwy bionanokompozytowej otrzymanej: a) metodą hybrydową CS/AuNPs/CS, b) metodą depozycji z koloidu CS@AuNPs.

Uwalnianie złota ze struktury warstwy otrzymanej metodą hybrydową, podczas której warstwy otrzymywano sekwencyjnie (Rys. 9.29.a), miało charakter bliski liniowemu w pierwszych trzech dniach immersji warstwy w roztworze Ringera, a masa uwolnionych form złota wynosiła ok. 1 mg. Natomiast od 4 dnia immersji nastąpił znaczny przyrost masy uwalnianego Au (zmiana liniowa) aż do 14-tego dnia testu, w którym wyniosła 4.3 mg, co jednocześnie stanowi 96% uwolnionych nanocząstek złota z warstwy. Stężenie uwolnionego z warstwy złota w zależności od dnia zawierało się w zakresie od 141 $\mu\text{g/ml}$ do 195 $\mu\text{g/ml}$, co stanowi niewielką zmianę stężeń w zależności od dnia kontaktu. Podobny charakter uwalniania w zakresie przebiegu uwalniania miała warstwa otrzymana metodą depozycji

z koloidu (Rys. 9.29.b). Analogicznie do warstwy CS/AuNPs/CS przez pierwsze trzy dni ilość uwolnionych AuNPs była w zakresie ok. 4÷5 mg, warto jednak zauważyć, że jest to wartość blisko 5-krotnie wyższa od pokryć otrzymanych metodą hybrydową. Kolejne dni immersji warstwy w roztworze prowadziły do gwałtownego uwalniania złota, aż do wartości 19.25 mg odnotowanych po 14 dniach kontaktu. Stężenia złota w poszczególnych dniach inkubacji wzrastały średnio o 50 µg, osiągając w 14-tym dniu wartość 1.01 mg/ml. Literaturowe dane dotyczące uwalniania nanocząstek AuNPs z matrycy CS są ograniczone. Przykładowo w pracy R. Seyedebrahimi, *et al.* [454] przeprowadzono test uwalniania osiągając w pierwszym dniu emisję 20% całkowitej masy nanocząstek złota, co odpowiada obydwu układom (CS@AuNPs oraz CS/AuNPs/CS). Natomiast szóstego dnia z warstwy uwolnione zostało 50% masy złota, co stanowi nieco wyższą wartość w stosunku do obydwu badanych warstw z nanocząstkami złota. Natomiast znacznie wyższy postęp uwalniania leku sprzężonego z AuNPs odnotował E. Nivethaa, *et al.* [455], w której złoto uwalniało się w 30% pierwszego dnia, natomiast jego całkowita ilość (500 mg) została uwolniona po 72 godzinach.

Analogicznej analizie uwalniania czynnika bioaktywnego z matrycy chitozanu poddano warstwy wytworzone z udziałem nanocząstek srebra, rezultaty te zaprezentowano na Rys. 9.30.

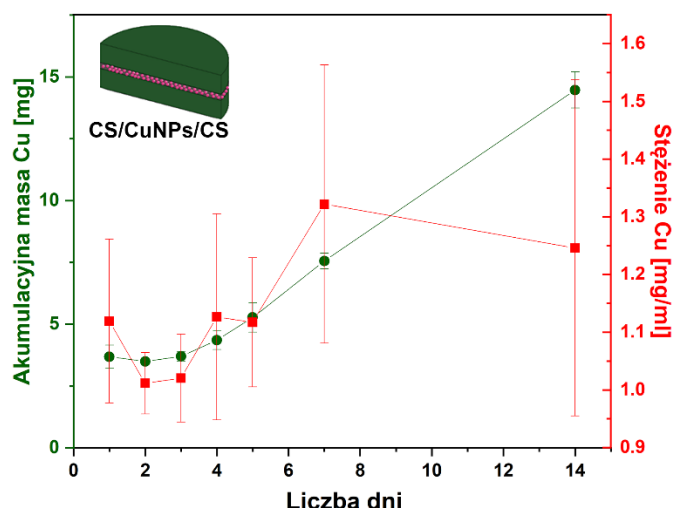


Rys. 9.30. Masa akumulacyjna (kolor zielony) oraz stężenie (kolor czerwony) nanocząstek srebra uwalnianych z warstwy bionanokompozytowej otrzymanej: a) metodą hybrydową CS/AgNPs/CS, b) metodą depozycji z koloidu CS@AgNPs.

Na Rys. 9.30.a. linią koloru zielonego przedstawiono akumulacyjny przyrost masy uwolnionych form srebra (Ag^0 oraz Ag^+). W pierwszych dwóch dniach ich ilość była na podobnym poziomie ok. 0.35 mg, w trakcie kolejnych dni masa uwolnionego srebra wzrastała

niemal liniowo, zwiększając się o średnio 0.18 mg/dzień, aż do wartości 1.50 mg. Ilość nanocząstek na powierzchnię określona w kalibracji (Rodz. 8.1.4.2.3., Rys. 8.9.), przypadająca na godzinny proces otrzymywania, wyniosła ok. 3.9 mg. Pozwala to stwierdzić, że skuteczność uwalniania nanocząstek srebra z matrycy CS wyniosła zaledwie 40%. Niska efektywność uwalniania może mieć związek z tendencją do agregacji nanocząstek srebra (patrz Rodz. 9.2.1.2.2.), co może powodować wzrost rozmiarów nanostruktur i utrudniać dyfuzję nanocząstek w matrycy chitozanu. Zakres stężeń form srebra uwalnianych z warstwy CS/AgNPs/CS wynosił od 48 µg/ml do 73 µg/ml, co stanowi o unormowanym sposobie dozowania srebra, bez znacząco odbiegających stężeń w trakcie dwutygodniowego uwalniania nanocząstek. Istotną sprawą jest również wartość odchylenia standardowego danych pomiarowych w przeprowadzonych testach uwalniania, które zwłaszcza dla określenia stężenia może wydawać się wysokie (np. dla 14 dniowego uwalniania odchylenie standardowe prowadzonych pomiarów wynosi 20 µg/ml). Rezultat taki jest zapewne związany ze wspomnianym wcześniej agregowaniem nanocząstek, charakterystycznym dla AgNPs, a co za tym idzie mniej równomiernym ich uwalnianiem. Drugi z badanych układów (CS@AgNPs, Rys. 9.30.b.) również wskazuje na stopniowy przyrost uwalnianego z warstwy srebra. Już po pierwszym dniu masa uwolnionych form srebra wyniosła 33.19 mg, co stanowi wartość ponad 20-krotnie wyższą niż w przypadku 14-dniowego uwalniania srebra z warstwy CS/AgNPs/CS. W kolejnych dniach następowała stabilizacja na poziomie 50÷60 mg, a następnie wzrost do ok. 103 mg po 7-iu dniach i 200 mg po 14-tu dniach imersji. Zmiana stężenia Ag w pierwszym tygodniu zanurzenia w roztworze Ringera miało przebieg na poziomie *ca.* 6 mg/ml, jednak warto zwrócić uwagę na wysokie wartości odchylenia standardowego tych prób (ok. ±5 mg/ml). Wskazuje to na niejednorodność uwalniania nanocząstek spowodowaną zapewne losowym rozmieszczeniem ich w matrycy biopolimeru. Natomiast uwalnianie po 14-tu dniach charakteryzuje się bardzo wysoką wartością oraz znacznym odchyleniem standardowym, mianowicie 18.43±12.16 mg/ml. Może to również wskazywać na niejednorodny rozkład nanocząstek, ale również na brak kontroli nad ich stężeniem w trakcie depozycji z koloidu, w związku z tendencją do sedimentacji cząstek.

Ostatnia analiza dotyczyła uwalniania form miedzi z warstwy o budowie sekwencyjnej, opartej jak wcześniej prezentowane przykłady na dwóch warstwach chitozanu, pomiędzy którymi umiejscowiona była warstwa nanocząstek miedzi. Rezultaty tych badań zaprezentowano na Rys. 9.31.

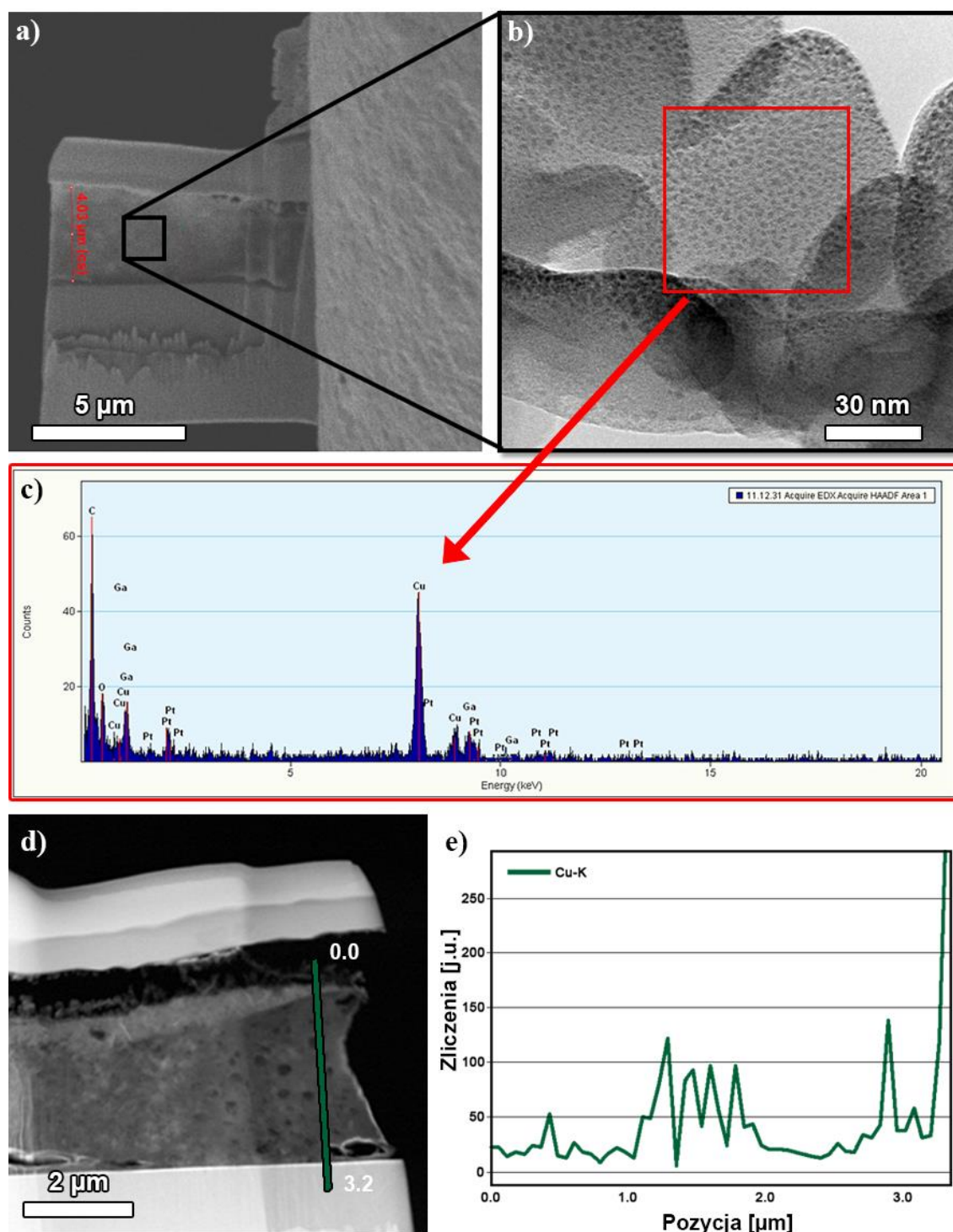


Rys. 9.31. Masa akumulacyjna (kolor zielony) oraz stężenie (kolor czerwony) nanocząstek miedzi uwalnianych z warstwy bionanokompozytowej otrzymanej metodą hybrydową CS/CuNPs/CS.

Proces otrzymywania CuNPs był najbardziej efektywny na co wskazuje kalibracja przedstawiona w Rodz. 8.1.4.2.4. (Rys. 8.13.) i pozwolił na uzyskanie aż 17.5 mg nanocząstek na badanej powierzchni. W trakcie pierwszych trzech dni zanurzenia w roztworze Ringera stężenie ustabilizowało się na poziomie ok. 3.5 mg form miedzi uwolnionych pierwszego dnia. Proces ten w trakcie kolejnych dni miał charakter prawie liniowy, z proporcjonalnym przyrostem masy o 1 mg na każdy jeden dzień inkubacji. Efektywność uwalniania nanocząstek miedzi z warstwy CS/CuNPs/CS po 14 dniach wyniosła ok. 83%. Z kolei stężenie uwolnionej do roztworu miedzi w trakcie kolejnych dni immersji mieściło się w zakresie od 1.01 mg/ml do 1.32 mg/ml. Warto jednak zwrócić uwagę na znaczne wartości odchylenia standardowego tych prób, które można powiązać z rezultatem opisanym dla nanocząstek srebra. Mianowicie CuNPs również charakteryzują się tendencją do agregacji (patrz Rodz. 9.2.1.3.1.), co może przekładać się na utrudnioną dyfuzję nanocząstek o większych rozmiarach w matrycy CS. Nieliczną z prac poświęconą uwalnianiu CuNPs z matrycy chitozanowej jest publikacja R. Wuana, *et al.* [456], w której nanocząstki miedzi sprzężone z herbicydem uwalniane są w tempie ok. 2.8 ppm, 6.8 ppm i 8.5 ppm w środowiskach o odczynie pH odpowiednio 8.0, 5.5 i 7.0. Badania te wskazują jednocześnie na możliwości dodatkowego sterowania uwalnianiem czynników bioaktywnych w środowiskach o odpowiednio dobranym odczynie.

Ostatnia z opisanych powyżej warstw została poddana również badaniu morfologii i składu z wykorzystaniem mikroskopii transmisyjnej. Warto zaznaczyć, że mimo licznych prób tylko warstwa CS/CuNPs/CS przetrwała trudny proces przygotowania cienkiej folii (lameli) z, jak się okazało, skomplikowanego układu łączącego trwałe materiały metaliczne oraz

biodegradowalny polimer. Rezultaty obrazowania oraz analizy chemicznej, ze szczególnym uwzględnieniem lokalizacji nanocząstek w strukturze chitozanu, dla warstwy CS/CuNPs/CS przedstawiono na Rys. 9.32.



Rys. 9.32. Rezultaty analizy cienkiej folii wykonanej z warstwy CS/CuNPs/CS: a) obrazowania cienkiej folii po przygotowaniu, b) obrazowaniu obszaru z widocznymi nanocząstkami miedzi, c) widmo analizy EDS, d) obrazowanie cienkiej folii z zaznaczoną ścieżką analizy liniowej i e) liniowe widmo zmian udziału miedzi.

Cienka folia wycięta z warstwy CS/CuNPs/CS w celu obserwacji jej morfologii z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu transmisyjnego została zobrazowana na Rys. 9.32.a. Z wykorzystaniem tej metody określono grubość warstwy, która wyniosła 4.03 μm , co dobrze odpowiada kalibracji grubości chitozanu przedstawionej w Tabeli 8.2. (Rozdz. 8.1.4.2.1.). Wysokorozdzielcze zdjęcie obrazujące nanocząstki w strukturze chitozanu w środkowej części warstwy zostało przedstawione na Rys. 9.32.b. Obraz wskazuje na obecność nanocząstek miedzi, co potwierdza widmo analizy jakościowej składu chemicznego obszaru zaznaczonego czerwonym kwadratem (Rys. 9.32.c). Nanocząstki obecne są przeważnie w środkowej części warstwy, czyli w miejscu, gdzie zostały pierwotnie otrzymane – pomiędzy dwoma warstwami chitozanu. Natomiast analiza liniowa składu chemicznego (Rys. 9.32.e.) wzdłuż ścieżki oznaczonej na zielono (Rys. 9.32.d.) wskazuje na dyfuzję nanocząstek w strukturze chitozanu na długości ok. 1 μm . Przeprowadzona analiza miała miejsce ok. miesiąca po przygotowaniu warstw, wskazuje to na migrację nanocząstek w warunkach temperatury pokojowej. Najbardziej istotnym wnioskiem płynącym z przeprowadzonej analizy jest obecność samorzutnych procesów dyfuzyjnych w przygotowanych układach warstwowych, zauważalne w relatywnie krótkim czasie. Zjawisko to powinno zatem zostać wzięte pod uwagę przy projektowaniu technologii otrzymywania warstw. Jest to szczególnie istotne w zastosowaniach biomedycznych i może skutkować odmiennym (niż wstępnie założony) profilem dostarczania czynnika bioaktywnego w miejsce narażone na potencjalne infekcje, co powinno być wzięte pod uwagę przy preparatyce tego rodzaju biomateriałów wykorzystywanych w praktyce medycznej.

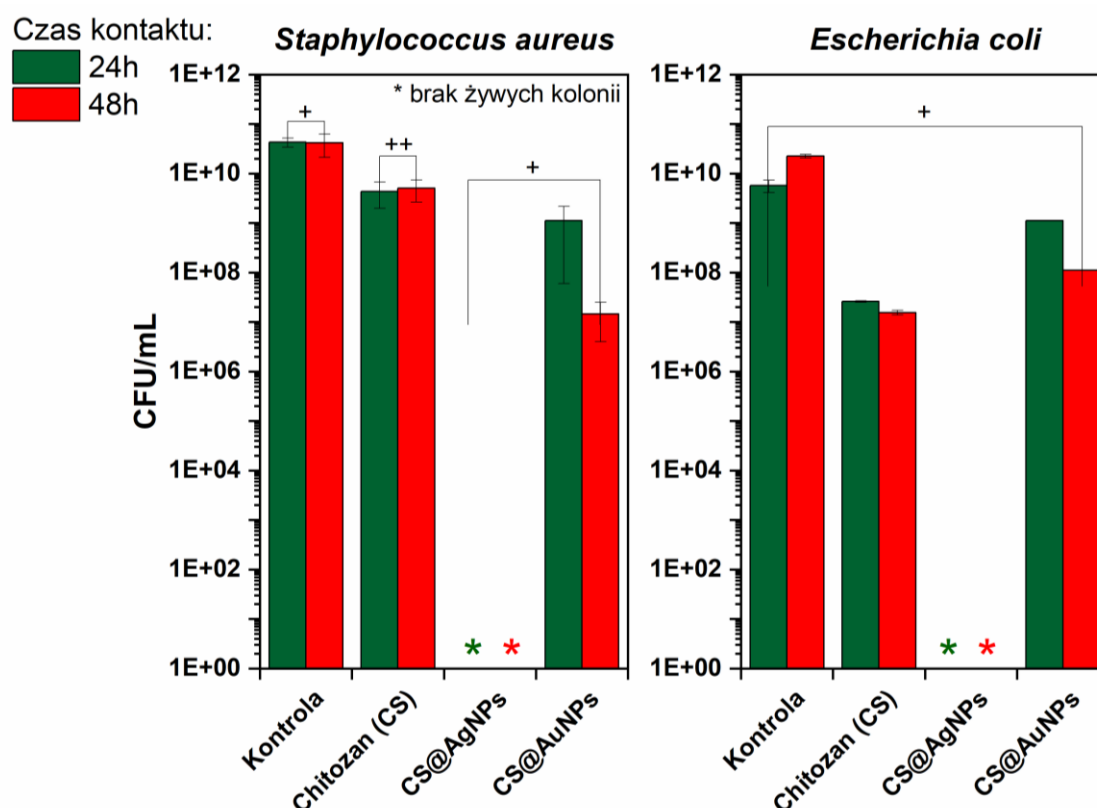
Podsumowując tę część prac badawczych można stwierdzić, że warstwy przygotowane z koloidów chitozanu i nanocząstek, czyli CS@AuNPs oraz CS@AgNPs charakteryzują się odpowiednio 5-krotnie i ponad 200-krotnie większą zawartością nanocząstek w swojej strukturze w porównaniu z warstwami hybrydowymi (CS/AuNPs/CS i CS/AgNPs/CS). Uwalnianie nanocząstek i ich jonów do roztworu Ringera przebiegało w głównej mierze w sposób liniowy zależny od czasu immersji, co jednak warto zauważyć to stałe stężenie uwolnionych form w pierwszych trzech dniach w przypadku warstw hybrydowych (CS/AuNPs/CS, CS/AgNPs/CS, CS/CuNPs/CS), co jest związane z obecnością zewnętrznej warstwy chitozanu. Struktura warstw hybrydowych ma również wpływ na znacznie mniejsze odchylenia standardowe uzyskanych rezultatów w porównaniu z warstwami otrzymanymi z koloidów, co przekłada się na precyzję systemu dozowania czynników bioaktywnych.

Istotnym jest również fakt samorzutności dyfuzji nanocząstek w matrycy chitozanu, co należy wziąć pod uwagę przy projektowaniu tego typu układów dozowania leków.

9.2.10. Badania antybakteryjności

W niniejszej pracy testy antybakteryjności były wykorzystywane do określenia zachowania namnożonych do fazy stacjonarnej bakterii (CFU $10^7 \div 10^9$) w kontakcie z badanym, potencjalnie antybakteryjnym, materiałem. Warto zaznaczyć, że badania te są modelem *in vitro* prowadzonym w warunkach oddziaływania wyizolowanego szczepu bakterii na testowany materiał. Jednakże z reguły uzyskane rezultaty z akceptowalną dokładnością są w stanie wskazywać na aktywność antybakteryjną w rzeczywistych, bardziej skomplikowanych układach [457]. Do dwóch istotnych rezultatów badań antybakteryjności zalicza się określenie minimalnego stężenia (danej substancji, np. antybiotyku) hamującego (MIC) i minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC). Pierwsze z nich (MIC) określa wartość stężenia niezbędnego do zahamowania wzrostu bakterii, natomiast MBC określa stężenie niezbędne do eliminacji 99.9% bakterii [458].

Wskazany w poprzednim rozdziale sposób działania czynników bioaktywnych w postaci nanocząstek metali (złota, srebra oraz miedzi) pozwala stwierdzić, że odgrywają one kluczową rolę w aktywności antybakteryjnej wspomnianych powłok. Tak jak przedstawiono na Rys. 6.1. (Rozdz. 6) uzyskanie aktywności terapeutycznej jest możliwe przy utrzymaniu stężenia danego medium między wartością stężenia cytotoksycznego dla komórek, a minimalnym stężeniem hamującym (MIC) rozwój bakterii [459]. Rezultaty tych badań, w szczególności dotyczą wpływu warstwy chitozanu oraz warstw otrzymanych metodą depozycji koloidu na powierzchni nitinolu na aktywność bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* oraz Gram-ujemnych *Escherichia coli*, co zaprezentowano na Rys. 9.33.



Rys. 9.33. Aktywność antybakteryjna powłok na bazie chitozanu niemodyfikowanego (CS) oraz modyfikowanego koloidami CS@AgNPs i CS@AuNPs w kontakcie z bakteriami *S. aureus* i *E. coli* po 24 i 48 godzinach. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią i odchylenie standardowe oraz poziomami istotności oznaczonymi: ⁺ $p < 0.001$, ⁺⁺ $p < 0.01$.

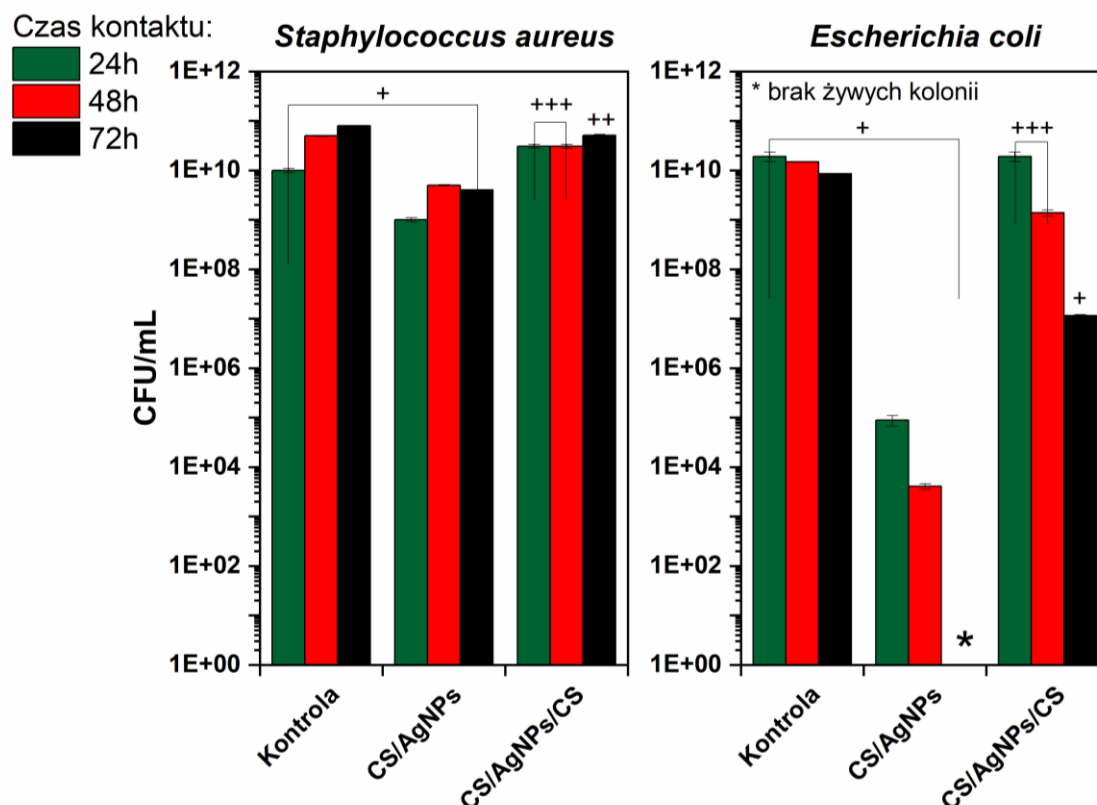
Rezultaty testu antybakteryjności przeprowadzonego na warstwach niemodyfikowanego chitozanu (CS) nie przyniosły znacznych różnic w porównaniu z próbą kontrolną, zarówno w kontakcie z *S. aureus* jak i *E. coli*. Podobne efekty braku efektu antybakteryjnego warstw CS zaobserwowano w pracy [390], w której kontakt bakterii *S. aureus* oraz *E. coli* z warstwą chitozanu na stopie Ti6Al7Nb skutkowało wzrostem kolonii do wartości kolejno $7.5 \log_{10}$ CFU/ml i $7.2 \log_{10}$ CFU/ml po 24 godzinach kontaktu. Również brak znaczącej aktywności antybakteryjnej powłok xxx wobec szczepu *E. coli* (redukcja wzrostu o ok. $0.5 \log_{10}$ CFU/ml względem próby kontrolnej) zaobserwował T. Kamal, *et al.* [460].

Kolejne testy wskazują także na brak istotnego wpływu na rozwój bakterii Gram⁺ i Gram⁻ dla struktur CS@AuNPs, w tym przypadku widoczna jest jednak redukcja ilości kolonii bakterii o ok. $1 \log_{10}$ CFU/ml (*S. aureus*) i $2 \log_{10}$ CFU/ml (*E. coli*), zwłaszcza w drugim dniu inkubacji. Niemniej jednak rezultaty te nadal wskazują na utrzymywanie się fazy stacjonarnej liczności bakterii. Obserwowany brak działania antybakteryjnego struktur CS@AuNPs jest interesujący w kontekście rezultatów opisanych w pracy A. Regiel-Futyr, *et al.* [349], gdzie obserwowano całkowitą eliminację szczepów *S. aureus* (Gram⁺) i *P. aeruginosa* (Gram⁻) [349]. Należy

jednak nadmienić, że testy te zostały wykonane na cienkich warstwach otrzymanych z koloidu, którego protokół otrzymywania był identyczny z tym wykorzystanym w niniejszej pracy doktorskiej (patrz Rozdz. 8.1.4.1.2.). Wpływ na takie zachowanie mogła mieć znacznie mniejsza powierzchnia warstwy koloidu, która na podłożu NiTi wynosiła 1.13 cm^2 , podczas gdy filmy otrzymane do badania antybakteryjności w pracy A. Regiel-Futyrza charakteryzowały się powierzchnią 9 cm^2 [349]. Ograniczenie wzrostu liczności bakterii *S. aureus* i *E. coli* o ok. 10% w kontakcie z analogicznymi warstwami na bazie chitozanu z AuNPs obserwowali również K. Wang, *et al.* [426].

Ostatnią z analizowanych w tej serii pokryw jest warstwa CS@AgNPs, która charakteryzowała się najwyższą ilością nanocząstek, które dyfundowały do roztworu (ok. 200 mg po 14-tu dniach imersji) spośród wszystkich serii eksperymentalnych (patrz Rozdz. 9.2.9.). Jak można zaobserwować na Rys. 9.33 aktywność antybakteryjna wspomnianych struktur pozwoliła na eliminację bakterii obydwu szczepów już po 24 godzinach inkubacji. Efektywne i niemal natychmiastowe działanie biobójcze warstwa zawdzięcza szybkiemu i efektywnemu uwalnianiu srebra z powierzchni (ok. 30 mg uwolnionych w pierwszym dniu). Kwestią dalszych badań nad tego typu układami powinno być określenie wpływu na organizm kolejnych dawek (ilości) srebra uwalnianego w trakcie dalszych 14 dni kontaktu. Rezultaty skutecznego działania antybakteryjnego warstw otrzymywanych z koloidów po syntezie metodą redukcji chemicznej są powszechne w literaturze naukowej i zostały zestawione w postaci Tabeli podsumowującej ten rozdział. Warto jednak przytoczyć kompleksowe badania N. Vokhidova i S. Rashidova [413], które obejmowały testy antybakteryjne przeprowadzone na aż trzynastu szczepach bakterii, z czego tylko szczep *Bacillus subtilis* był odporny na działanie wspomnianych warstw CS z nanocząstkami srebra.

Kolejne badania pod kątem aktywności antybakteryjnej obejmowały układy warstw otrzymywanych metodą hybrydową, mianowicie chitozan i AgNPs. W obrębie tej serii eksperymentalnej zbadano struktury o budowie sekwencyjnej - CS/AgNPs/CS oraz te złożone z warstwy chitozanu oraz nanocząstek srebra (CS/AgNPs). Prace eksperymentalne zaplanowano tak aby było możliwe określenie aktywności biobójczej warstwy zewnętrznej (AgNPs). Analogicznie jak w przypadku poprzedniej serii testy przeprowadzono z wykorzystaniem szczepów *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*, jednak ze względu na niewielkie uwalniane stężenia nanocząstek wyniki wzbogacono o rezultaty po 72 godzinach kontaktu. Rezultaty aktywności antybakteryjnej badanych struktur przedstawiono na Rys. 9.34.

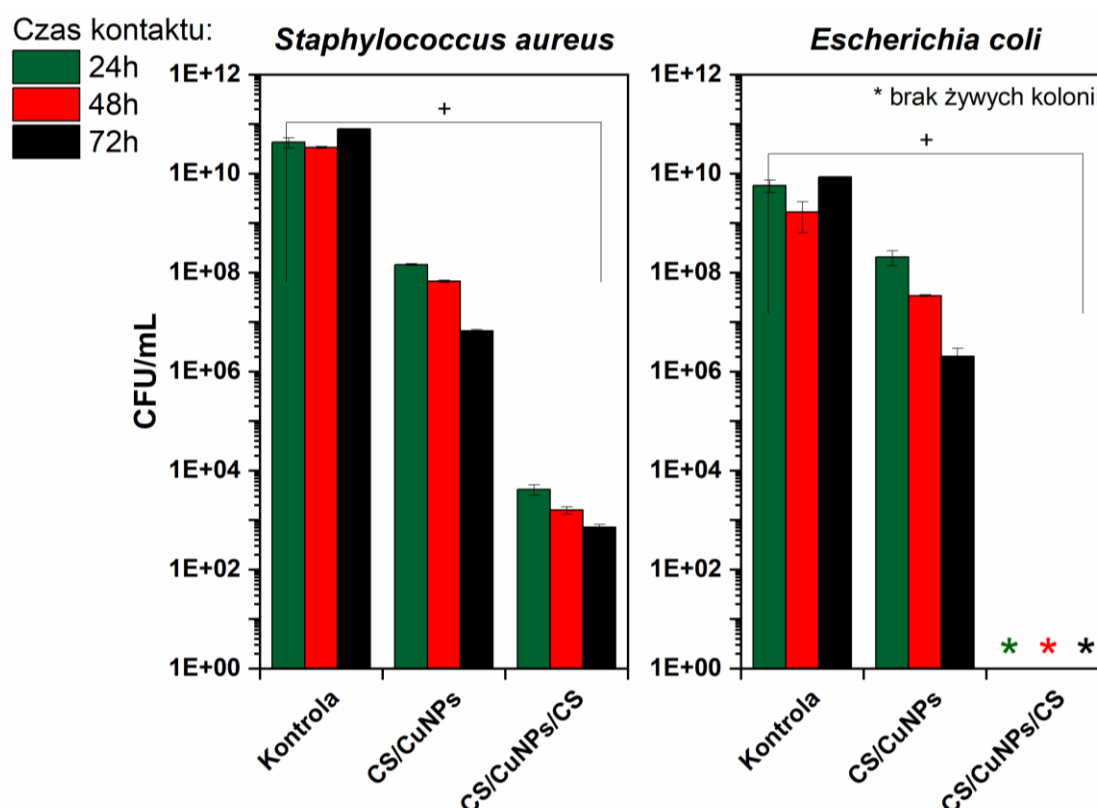


Rys. 9.34. Aktywność antybakteryjna powłok otrzymanych metodą hybrydową w układzie CS/AgNPs/CS w kontakcie z bakteriami *S. aureus* i *E. coli* po 24, 48 i 72 godzinach. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią i odchylenie standardowe oraz poziomami istotności oznaczonymi: ⁺ $p < 0.001$, ⁺⁺ $p < 0.01$, ⁺⁺⁺ $p < 0.05$.

Niezależnie rodzaju modyfikacji w postaci układów warstwowych (CS/AgNPs, CS/AgNPs/CS) nie obserwowano aktywności antybakteryjnej wspomnianych powłok w kontakcie ze szczepem gronkowca złocistego (*S. aureus*). Wartości ilości kolonii bakterii na mililitr były niemal identyczne z próbą kontrolną i charakteryzowały fazę stacjonarną bakterii. Na takie zachowanie mogła wpłynąć relatywnie niewielka całkowita ilość nanocząstek srebra, ok. 1.5 mg oraz niskie ich stężenie dzienne, ok. 50 µg/ml (patrz Rys. 9.30.a., Rozdz. 9.2.9.). Kontakt warstw z bakteriami szczepu *E. coli* wskazuje na odmienne działanie wspomnianego układu warstw, którego zewnętrzną warstwę stanowiły nanocząstki srebra. W tym przypadku obserwuje się sukcesywne ograniczenie ilości żywych kolonii bakterii, po pierwszej dobie wzrost ich liczności został zahamowany do 5log₁₀ CFU/ml, po kolejnych 24 godzinach do 3.5log₁₀ CFU/ml, aby po 72 godzinach kontaktu stwierdzić całkowitą ich eliminację. W tym przypadku trudno określić ilość uwolnionego srebra z powierzchni, ponieważ badania uwalniania nie objęły zakresem układów dwuwarstwowych. W przypadku warstwy CS/AgNPs/CS można stwierdzić, że sprzyja ona zmniejszeniu ilości kolonii bakterii *E. coli*.

W ujęciu dziennym stężenie kolonii zmniejsza się o $1\log_{10}$ CFU/ml, w trzecim dniu wartość ta maleje o $2\log_{10}$ CFU/ml. Rezultat osiągnięty dla 72 godzin inkubacji ($7\log_{10}$ CFU/ml) nie oznacza znacznej redukcji bakterii, natomiast w kontekście obserwowanego, wzmożonego uwalniania srebra po 3 dniu inkubacji może stanowić o potencjale tych układów we wczesnych etapach implantacji wszczepów. Niemniej jednak uzyskane wyniki dla tego typu układów w dłuższym czasie kontaktu ze środowiskiem bakterii wskazują, że jest to tematyka którą warto zgłębić na drodze kolejnych prac badawczych.

Ostatnią z badanych serii były warstwy otrzymywane metodą hybrydową w układzie chitozan - nanocząstki miedzi. Analogicznie do poprzedniej serii zbadano wpływ warstw o budowie sekwencyjnej CS/CuNPs/CS oraz CS/CuNPs. Testy te przeprowadzono w analogicznych warunkach z wykorzystaniem szczepów *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli* i czasem kontaktu warstw z bakteriami (24, 48, 72 godziny), a ich rezultaty zobrazowano na Rys. 9.35.



Rys. 9.35. Aktywność antybakteryjna powłok otrzymanych metodą hybrydową w układzie CS/CuNPs/CS w kontakcie z bakteriami *S. aureus* i *E. coli* po 24, 48 i 72 godzinach. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią i odchylenie standardowe oraz poziomami istotności oznaczonymi: $^+ p < 0.001$.

Warstwy hybrydowe na bazie chitozanu i nanocząstek miedzi stanowiły układy, które charakteryzowały się najwyższą masą uwolnionych nanocząstek spośród warstw wytworzonych metodą hybrydową. W ciągu 2-tygodniowego testu z powierzchni CS/CuNPs/CS zostało uwolnionych łącznie ok. 15 mg miedzi. Pierwszą z analizowanych serii był układ CS/CuNPs, dla którego w porównaniu do próby kontrolnej, obserwowano obniżenie stężenia kolonii obydwu szczepów bakterii. Zmiany te następowały wraz z każdym kolejnym dniem inkubacji o ok. jeden rząd wielkości, jednak po trzech dniach inkubacji stężenia pozostawały nadal na wysokim poziomie, charakterystycznym dla fazy stacjonarnej rozwoju bakterii, podobnie jak miało to miejsce w przypadku modyfikacji stopu NiTi z otrzymaniem CS/AgNPs/CS i kontakcie powierzchni ze szczepem *E. coli*. Niemniej jednak modyfikacja CS/CuNPs/CS charakteryzuje się znaczną aktywnością antybakteryjną wobec szczepu *S. aureus*, ograniczając wzrost stężenia kolonii do k. $3.5 \log_{10}$ CFU/ml po 24 godzinach inkubacji, $3.1 \log_{10}$ CFU/ml po 48h, ostatecznie osiągając wartość $2.8 \log_{10}$ CFU/ml, co stanowi o osiągnięciu progu minimalnego stężenia hamującego na poziomie 3.7mg/ml. Wpływ wspomnianych struktur na Gram- szczep *E. coli* miał jeszcze skuteczniejszy przebieg ponieważ już po pierwszej dobie obserwowano eliminację wszystkich bakterii, a zatem osiągnięto cel minimalnego stężenia bakteriobójczego, przy stężeniu 3.6 mg/ml medium. Odnosząc się do danych literaturowych, wartości te są znacznie wyższe od tych opublikowanych przez Y. Li, *et al.* [462] dla warstw na bazie koloidu chitozanu z CuNPs, które wyniosły odpowiednio $1.17 \mu\text{g/ml}$ (MIC) i $2.34 \mu\text{g/ml}$ (MBC) dla *S. aureus* oraz $0.59 \mu\text{g/ml}$ (MIC) i $1.17 \mu\text{g/ml}$ (MIC) dla *E. coli*. Na taki efekt, jak również na ograniczoną aktywność antybakteryjną warstw CS/CuNPs, dla których warstwę wierzchnią stanowiły nanocząstki miedzi, mogło wpłynąć utlenianie wspomnianych nanostruktur, które obserwuje się na Rys. 9.18. (patrz Rozdz. 9.2.1.3.). Dla nanocząstek CuO wartości parametrów MIC są wyższe, o czym świadczą m. in. badania prowadzone przez A. Shehabeldine, *et al.* [463], który określił te wartości dla *E. coli* na poziomie $3.12 \mu\text{g/mL}$, natomiast dla *S. aureus* ok. $12.5 \mu\text{g/mL}$. Niezależnie jednak od wartości stężeń warto zauważyć, że warstwa CS/CuNPs/CS skutecznie hamuje rozwój bakterii gronkowca złocistego oraz eliminuje bakterię pałeczki okrężnicy.

W celach poglądowych na temat antybakteryjnego działania tego typu układów warstwowych w Tabeli 9.6. zestawiono aktualne doniesienia literaturowe obejmujące warstwy na bazie CS z dodatkiem nanocząstek złota, srebra oraz miedzi.

Tabela 9.6. Zestawienie wybranych rezultatów prac opisujących wytwarzanie warstw na bazie chitozanu z nanocząstkami złota, srebra i miedzi, dane obejmują rozmiary nanocząstek i aktywnością antybakteryjną badanych warstw

Warstwa	Rozmiary nanocząstek (średnica)	Szczep bakterii	Aktywność antybakteryjna ⁵	Literatura
Warstwy CS z dodatkiem nanocząstek złota				
Warstwy CS@AuNPs	7 ÷ 45 nm (18.5 ± 7.2 nm)	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	brak brak	Praca doktorska [327]
Folie CS - AuNPs	10 ÷ 15 nm (-)	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	12 ÷ 15 mm 7 ÷ 12 mm	[409]
Folie CS - AuNPs	- (16 ± 4 nm)	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	100% 100%	[349]
Folie CS - AuNPs	Bd.	<i>S. aureus</i>	100%	[443]
Folie CS - AuNPs	- (34.6 ± 0.5 nm)	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	99.94% 96.26%	[464]
Folie CS - AuNPs	- (15.51±2.71nm)	<i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i> <i>S. enterica</i> <i>E. coli</i>	23.12 ± 0.52 mm 16.71 ± 1.04 mm 19.93 ± 1.23 mm 12.52 ± 0.52 mm	[465]
Warstwy CS z dodatkiem nanocząstek srebra				
CS@AgNPs	5 ÷ 27 nm (10.5 ± 6.8 nm)	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	100% 100%	Praca doktorska [327]
CS/Ag	5 ÷ 45 nm (20.5 ± 9.6 nm)	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Brak 100%	Praca doktorska
CS/AgNPs/CS	5 ÷ 45 nm (20.5 ± 9.6 nm)	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Brak 30%	Praca doktorska

⁵ Podana wartość w Tabeli odnosi się do wartości gęstości optycznej OD [-], ograniczenia wzrostu bakterii [%], pomiaru strefy zahamowania wzrostu [mm] lub wartości stężenia MBC lub MIC [µg/ml].

Folie CS - AgNPs	10 ÷ 25 nm (-)	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	9 ÷ 18 mm 11 ÷ 15 mm	[409]
Folie CS - AgNPs	10 ÷ 30 nm (-)	<i>E. coli</i>	100%	[466]
Folie CS - AgNPs	- (ca. 20 nm)	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	32 ÷ 43 mm 36 ÷ 49 mm	[467]
Folie CS - AgNPs	Bd.	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	120 µg/mL, 120 µg/mL	[461]
Folie CS - AgNPs stabilizowanym sodem	- (10.30 nm)	<i>Staph.aureus</i>	15.0±0.2 mm	[413]
		<i>St.epidermidis</i>	5.0±0.1 mm	
		<i>St.saprofticus</i>	15.0±0.2 mm	
		<i>Str. Pyogens</i>	5.0±0.1 mm	
		<i>Ent.faecalis</i>	5.0±0.1 mm	
		<i>Esch. Coli</i>	15.0±0.2 mm	
		<i>Esch. Coli</i>	10.0±0.1 mm	
		<i>Prot. Vulgaris</i>	5.0±0.1 mm	
		<i>Klebsiella</i>	20.0±0.4 mm	
		<i>Ps. Aerogenosa</i>	5.0±0.1 mm	
Folie CS - AgNPs nanocząstki otrzymane metodą biosyntezy z udziałem ekstraktu z herbaty	12 ÷ 38 nm (-)	<i>Actinomycetae</i>	20.0±0.4 mm	[468]
		<i>Bac.subtilis</i>	0 mm	
Filmy CS - AgNPs	2÷15 nm (-)	<i>E. coli</i>	5 ÷ 9 mm	[469]
		<i>S. aureus</i>	3 ÷ 5 mm	
		<i>B. Subtilis</i>	3 ÷ 15 mm	
		<i>S. aureus</i>	3 ÷ 12 mm	
Warstwy CS - AgNPs na tytanie	5÷35 nm (14.15 ± 5.44 nm)	<i>E. coli</i>	6 ÷ 19 mm	[399]
		<i>P. areuginosa</i>	9 ÷ 17 mm	
		<i>P. gingivalis</i>	OD ₄₅₀ 0.05	
Filmy CS - AgNPs	>50 nm (-)	<i>S. aureus</i>	1.04 ÷ 1.23 mm	[396]
		<i>E. coli</i>	1.89 ÷ 2.57 mm	

Warstwy CS z dodatkiem nanocząstek miedzi				
CS/CuNPs	3 ÷ 7 nm (5.4±0.8 nm)	<i>S. aureus</i>	20%	Praca doktorska
		<i>E. coli</i>	40%	
CS/CuNPs/CS	3 ÷ 7 nm (5.4±0.8 nm)	<i>S. aureus</i>	70%	Praca doktorska
		<i>E. coli</i>	100%	
Membrany na bazie cienkich filmów chitozanu z CuNPs	10÷50 nm (-)	<i>E. coli</i>	99%	[470]
Warstwy kompozytowe chitozan - CuNPs	Bd.	<i>S. aureus</i>	2.34 mg/mL	[462]
		<i>B. subtilis</i>	0.29 mg/mL	
		<i>E. coli</i>	1.17 mg/mL	
		<i>P. aeruginosa</i>	1.17 mg/mL	
Warstwy CS - CuNPs	6÷33 nm (11 ± 6 nm)	<i>S. aureus</i>	100%	[444]
		<i>E. coli</i>	ok. 30%	
Filmy CS - CuNPs	- (ca. 8.11 nm)	<i>S. aureus</i>	6 ÷ 19 mm	[471]
		<i>E. coli</i>	3.5 ÷ 8 mm	

Jak już wcześniej wspomniano, rezultaty uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wskazują na brak działania antybakteryjnego w przypadku modyfikacji powierzchni stopu z otrzymaniem warstw CS@AuNPs, podczas gdy rezultaty prezentowane w przedstawionej literaturze wskazują na działanie antybakteryjne pozwalające na całkowitą redukcję bakterii zarówno Gram(+), jak i Gram(-). Bardzo podobne rozmiary nanocząstek w pracy np. A. Regiel-Futyr, *et al.* [349], ale również dużo większy zakres rozmiarów tych struktur w innych pracach wskazują, że w tym przypadku wielkość nanocząstek nie wpływała znacząco na aktywność antybakteryjną. Co jednak istotne w kontekście właściwości antybakteryjnych AuNPs ich wspierająca rola w aktywności antybakteryjnej, a nie bezpośrednie działanie biobójcze. Związane jest to z procesami bakteriobójczymi opisanymi w rozdziale 5.2, które muszą być aktywowane przez wpływ innej substancji antybakteryjnej, jaką w przypadku otrzymanych warstw miał być chitozan.

W prezentowanym zestawieniu najszerzej reprezentowaną grupą struktur biokompozytowych były folie na bazie chitozanu i nanocząstek srebra. Uzyskane rezultaty w niniejszej pracy doktorskiej stanowiły o skuteczności bakteriobójczej warstw CS@AgNPs w kontakcie z obydwoma rodzajami bakterii oraz działaniu antybakteryjnym warstwy CS/AgNPs i ograniczeniu wzrostu kolonii *E. coli* w przypadku warstw CS/AgNPs/CS. Zestawione w Tabeli przykłady doniesień potwierdzają aktywność antybakteryjną warstw z dodatkiem AgNPs, która w większości przypadków jest wyższa wraz z zmniejszającym się rozmiarem nanocząstek, czego nie wykazują uzyskane wyniki zwłaszcza w kontakcie z gronkowcem złocistym.

Na podstawie przeprowadzonych testów można również stwierdzić, że również rozmiar nanocząstek miedzi nie wpłynął znacząco na ich aktywność antybakteryjną choć warstwy CS/CuNPs/CS charakteryzują się bardzo dobrym efektem antybakteryjnym w kontakcie z *E. coli* oraz znaczącym ograniczeniem ilości kolonii *S. aureus*. Aktywność ta w znacznie mniejszym stopniu, ale również dotyczy struktur CS/CuNPs. Niewielka ilość publikacji obejmująca badanie aktywności antybakteryjnej warstw CS-CuNPs wskazywać może na stosunkowo niewielkie zainteresowanie tym tematem, jednakże uzyskane w tej pracy doktorskiej wyniki świadczą o skuteczności CuNPs jako czynnika antybakteryjnego.

10. Podsumowanie i wnioski

Rozprawa doktorska dotyczy funkcjonalizacji powierzchni stopu NiTi do zastosowań w implantologii i obejmuje dwa główne zagadnienia, mianowicie (i) modyfikację powierzchni nitinolu w różnych środowiskach chemicznych oraz (ii) procesy otrzymywania warstw na bazie chitozanu z dodatkiem nanocząstek wybranych metali. W tym ostatnim przypadku syntezę prowadzono z wykorzystaniem redukcji chemicznej lub kondensacji w reaktorze z działem magnetronowym w obecności gazu obojętnego. Podejścia te implikowały różnice w rozkładzie nanocząstek w matrycy chitozanu, co również stanowiło zagadnienia badawcze podjęte niniejszej rozprawie.

W odniesieniu do pierwszej części przeprowadzonych prac eksperymentalnych w zakresie modyfikacji powierzchni wspomnianego stopu w środowiskach chemicznych z wykorzystaniem 2.3% NH_3 /13.6% H_2O_2 (seria CE_1), 66.5% H_2SO_4 /9.0% H_2O_2 (seria CE_2), 2.5% HCl /14.0% HNO_3 (seria CE_3) oraz 10.3% NH_3 /5.3% H_2O_2 (seria CE_4) w czasie 15, 30 i 60 minut trawienia można stwierdzić, że:

- I. zarówno skład mieszanin jak i czas trawienia wpływa znacząco na skład chemiczny powierzchni modyfikowanego stopu NiTi, a dobór odpowiedniego środowiska jest niezwykle istotny w kontekście procesu utleniania wolnych metali do postaci tlenkowej, które to w rezultacie stanowią barierę ochronną stopu. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że środowiskiem chemicznym sprzyjającym całkowitej oksydacji wolnego tytanu i niklu jest mieszanina 2.3% NH_3 /13.6% H_2O_2 (seria CE_1), przy czasie trawienia 30 minut i temperaturze 70 °C, co jednocześnie jest potwierdzeniem **tezy (i) z rozdziału 7**;
- II. modyfikacja powierzchni stopu NiTi w roztworze 2.3% NH_3 /13.6% H_2O_2 przez 30 minut i w temperaturze 70°C, prowadzi do uzyskania chropowatości stopu na poziomie 14.4 nm (R_a) i zwilżalności powierzchni (84°), co jest korzystnie dla proliferacji komórek i ograniczenia namnażania się bakterii;
- III. obróbka chemiczna powierzchni oraz proces aktywacji plazmochemicznej pozwoliły na zapewnienie właściwych warunków do otrzymania jednorodnych, chemicznie ciągłych warstw na bazie chitozanu, co jest potwierdzeniem **tezy (ii) z rozdziału 7**;

W toku realizacji kolejnych zagadnień badawczych scharakteryzowano i poddano analizie warstwy na bazie niemodyfikowanego CS oraz te na bazie koloidów i otrzymane na drodze

redukcji chemicznej (CS@AuNPs i CS@AgNPs), jak również warstwy o budowie sekwencyjnej wytworzone metodą hybrydową (na bazie chitozanu i nanocząstek złota - CS/AuNPs/CS, srebra - CS/AgNPs/CS oraz miedzi - CS/CuNPs/CS). Na podstawie uzyskanych rezultatów można stwierdzić, że:

- IV. otrzymane warstwy biopolimeru modyfikowanego nanocząstkami pozwoliły na uzyskanie wyższych wartości gęstości prądu przebicia warstwy ochronnej stopu NiTi (do ok. $2.08 \cdot 10^{-4} \text{ mA/cm}^2$). Z kolei stabilność wartości potencjału w funkcji czasu dla pokryć CS@AuNPs oraz CS/CuNPs/CS wskazuje na skuteczną ochronę korozyjną stopu, co stanowi potwierdzenie **tezy (iii) z rozdziału 7**;
- V. prowadzone modyfikacje powierzchni stopu (z wyjątkiem struktur CS/AgNPs/CS) charakteryzują się biogodnością z linią komórkową MG-63, ponadto modyfikacja z otrzymaniem CS/AuNPs/CS wskazuje na potencjalne działanie osteoindukcyjne, stymulujące wzrost komórek na powierzchni, co jest potwierdzeniem **tezy (iv) z rozdziału 7**;
- VI. w przypadku warstw CS/CuNPs/CS i CS@AgNPs można stwierdzić, że charakteryzują się one działaniem antybakteryjnym w kontakcie z bakteriami *E. coli* i *S. aureus*, natomiast struktury typu CS/CuNPs i CS/AgNPs/CS wykazują działanie bakteriostatyczne, co jest potwierdzeniem **tezy (v) z rozdziału 7**;
- VII. sekwencyjna budowa pokryć (na bazie chitozanu i warstw nanocząstek metali) pozwala na kontrolowane uwalnianie nanocząstek, o niewielkim i stałym w okresie 14 dni stężeniu, z matrycy biopolimerowej, co jest potwierdzeniem **tezy (vi) z rozdziału 7**;
- VIII. wybrane warstwy na bazie chitozanu modyfikowanego nanocząstkami (w szczególności CS/AuNPs/CS i CS/CuNPs/CS) charakteryzują się zgodnością komórkową, zabezpieczają powierzchnię stopu NiTi przed korozją, wykazują działanie antybakteryjne oraz cechuje je stopniowy model uwalniania niewielkiej, ale skutecznej ilości nanocząstek. Zatem procesy jednostkowe prowadzące do ich otrzymywania mogą stanowić składowe technologie wytwarzania tego typu pokryć powierzchni stopu NiTi, co jest potwierdzeniem **tezy (vii) z rozdziału 7**;

- IX. możliwość kształtowania w procesie hybrydowego otrzymywania warstw sekwencyjnych m. in. grubości warstw CS oraz ilości otrzymywanych nanocząstek pozwala na otrzymywanie układów dostosowanych do indywidualnych potrzeb pacjentów.

Podsumowując można stwierdzić, że zaplanowane i analizowane w niniejszej rozprawie doktorskiej procesy prowadzące do modyfikacji powierzchni nitinolu w środowiskach chemicznych, w określonych warunkach prowadzą do ograniczenia obecności wolnych form metali na powierzchni, zapewniając przyjazne środowisko do rozwoju komórek oraz korzystne warunki do otrzymywania stabilnych i trwałych powłok w kolejnych etapach procesu obróbki. Z kolei warstwy na bazie chitozanu z dodatkiem nanocząstek metali charakteryzują się biogodnością, antybakteryjnością, z charakterystycznym kontrolowanym uwalnianiem czynnika bioaktywnego oraz szeregiem innych parametrów, które są niezbędne do oceny materiału jako bezpiecznego, biogodnego i funkcjonalnego produktu implantacyjnego.

Szczególnie obiecującą modyfikację stanowi warstwa CS/CuNPs/CS, która charakteryzuje się antybakteryjnością, biogodnością czy też profilem uwalniania nanocząstek pozwalającym na 14-dniową terapię z wykorzystaniem tej modyfikacji. Natomiast w kontekście innych potencjalnych zastosowań warstwa CS/AuNPs/CS charakteryzuje się przyrostem komórek na powierzchni wyższym niż wartość dla próby kontrolnej, co może stanowić korzystne środowisko dla rusztowań komórkowych.

Rezultaty przedstawione w niniejszej pracy wskazują również na szeroki zakres możliwości dalszego rozwijania systemów warstwowych bazujących na testowanych strukturach. Możliwe ścieżki rozwoju tego typu pokryć mogą obejmować systemy o większej ilości nakładanych cieńszych warstw chitozanu i nanocząstek w celu zwiększenia dawki terapeutycznej, wykorzystania innych polimerów o innym czasie degradacji i współczynniku dyfuzji (np. fibroiny, alginianu), jak również wykorzystanie nanocząstek bimetalicznych, które mogą prowadzić do wyższej aktywności antybakteryjnej przy zastosowaniu mniejszych stężeń. Niewątpliwie są to zagadnienia, których kontynuacja może przynieść nowe i skuteczne rozwiązania dla rozwoju inżynierii biomateriałów.

11. Literatura

- [1] X. Zhang, D. Williams, Definitions of Biomaterials for the Twenty-First Century, 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818291-8.00011-0>.
- [2] J. Wilson, Metallic biomaterials: State of the art and new challenges, in: *Fundam. Biomater. Met.*, Elsevier Ltd, 2018: pp. 1–33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102205-4.00001-5>.
- [3] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreez, S. Ramakrishna, D. Williams, Key terminology in biomaterials and biocompatibility, *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 10 (2019) 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.02.004>.
- [4] W. Jin, P.K. Chu, Orthopedic implants, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.10999-7>.
- [5] H. Chouirfa, H. Bouloussa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications, *Acta Biomater.* 83 (2019) 37–54. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.036>.
- [6] X. Yang, Y. Chen, F. Meng, P. Road, W. Area, T.N. Town, J. District, Participating in health care for total hip replacement patients: an integrative review, *TMR Integr. Med.* 5:e21017 (2021) 1–5. <https://doi.org/10.12032/TMRIM202105017>.
- [7] M. Prakasam, J. Locs, K. Salma-Ancane, D. Loca, A. Largeteau, L. Berzina-Cimdina, Biodegradable materials and metallic implants-A review, *J. Funct. Biomater.* 8 (2017) 1–15. <https://doi.org/10.3390/jfb8040044>.
- [8] L. Rony, R. Lancigu, L. Hubert, Intraosseous metal implants in orthopedics : Les implants métalliques en Chirurgie Osseuse : revue de la, *Morphologie.* 102 (2018) 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2018.09.003>.
- [9] P.K. Zysset, X. Edward Guo, C. Edward Hoffer, K.E. Moore, S.A. Goldstein, J. Nagels, M. Stokdijk, P.M. Rozing, N. Razfar, J.M. Reeves, D.G. Langohr, R. Willing, G.S. Athwal, J.A. Johnson, R.M. Meneghini, N.J. Hallab, R. a Berger, J.J. Jacobs, W.G. Paprosky, A.G. Rosenberg, S.R. Small, S.E. Hensley, P.L. Cook, R.A. Stevens, R.D. Rogge, J.B. Meding, M.E. Berend, Stem diameter and rotational stability in revision total hip arthroplasty: a biomechanical analysis., *J. Shoulder Elb. Surg.* 32 (2016) 1005–1012. <https://doi.org/10.1067/mse.2003.22>.
- [10] M. Niinomi, T. Hattori, Effect of Young ' s modulus in metallic implants on atrophy and bone remodeling, in: *Interface Oral Heal. Sci.* 2009, 2009: pp. 90–99. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-99644-6>.
- [11] L. Zhang, L. Chen, A Review on Biomedical Titanium Alloys : Recent Progress and Prospect, *Adv. Eng. Mater.* 1801215 (2019) 1–29. <https://doi.org/10.1002/adem.201801215>.
- [12] K. Miura, N. Yamada, S. Hanada, T. Jung, E. Itoi, The bone tissue compatibility of a new Ti – Nb – Sn alloy with a low Young ' s modulus, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2320–2326. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.008>.
- [13] M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, A.K. Gogia, Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review, *Prog. Mater. Sci.* 54 (2009) 397–425. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2008.06.004>.
- [14] M.A. Gepreel, M. Niinomi, Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 20 (2013) 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.11.014>.
- [15] H. Akbar, S. Sharif, D. Kim, M. Hasbullah, Machinability of Cobalt-based and Cobalt Chromium Molybdenum Alloys - A Review, *Procedia Manuf.* 11 (2017) 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2017.07.150>.
- [16] G.C. Maria Cristina Tanzi, Silvia Farè, Biomaterials and Applications, in: *Found. Biomater. Eng.*, 2019: pp. 199–287. <https://doi.org/10.1201/9781003049203-9>.
- [17] H. Hermawan, D. Ramdan, J.R.P. Djuansjah, Metals for Biomedical Applications, in: *Biomed. Eng. From Theory to Appl.*, 2010.
- [18] E. Kaya, İ. Kaya, A review on machining of NiTi shape memory alloys: the process and post process perspective, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 100 (2019) 2045–2087. <https://doi.org/10.1007/s00170-018-2818-8>.

- [19] H. Matsumoto, S. Watanabe, S. Hanada, Beta TiNbSn alloys with low Young's modulus and high strength, *Mater. Trans.* 46 (2005) 1070–1078. <https://doi.org/10.2320/matertrans.46.1070>.
- [20] N. Soro, E.G. Brodie, A. Abdal-hay, A.Q. Alali, D. Kent, M.S. Dargusch, Additive manufacturing of biomimetic Titanium-Tantalum lattices for biomedical implant applications, *Mater. Des.* 218 (2022) 110688. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.110688>.
- [21] P. Castany, D.M. Gordin, S.I. Drob, C. Vasilescu, V. Mitran, A. Cimpean, T. Gloriant, Deformation Mechanisms and Biocompatibility of the Superelastic Ti–23Nb–0.7Ta–2Zr–0.5N Alloy, *Shape Mem. Superelasticity*. 2 (2016) 18–28. <https://doi.org/10.1007/s40830-016-0057-0>.
- [22] R. Ion, D.M. Gordin, V. Mitran, P. Osiceanu, S. Dinescu, T. Gloriant, A. Cimpean, In vitro bio-functional performances of the novel superelastic beta-type Ti-23Nb-0.7Ta-2Zr-0.5N alloy, *Mater. Sci. Eng. C*. 35 (2014) 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.11.018>.
- [23] S. Liu, Y.Z. Guo, Z.L. Pan, X.Z. Liao, E.J. Lavernia, Y.T. Zhu, Q.M. Wei, Y. Zhao, Microstructural softening induced adiabatic shear banding in Ti-23Nb-0.7Ta-2Zr-O gum metal, *J. Mater. Sci. Technol.* 54 (2020) 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.03.042>.
- [24] P. Malloy, S.J. Nho, *Hip Arthroscopy and Hip Joint Preservation Surgery*, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7321-3>.
- [25] L. Cristofolini, Critical Examination of Stress Shielding Evaluation of Hip Prostheses, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 45 (2017) 395–447.
- [26] H. Bodén, P. Adolphson, M. Öberg, Unstable versus stable uncemented femoral stems : a radiological study of periprosthetic bone changes in two types of uncemented stems with different concepts of fixation, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 124 (2004) 382–392. <https://doi.org/10.1007/s00402-004-0666-5>.
- [27] R. Madanat, D.K. Hussey, G.S. Donahue, H.G. Potter, R. Wallace, C.R. Bragdon, O.K. Muratoglu, H. Malchau, The Symmetry of Adverse Local Tissue Reactions in Patients with Bilateral Simultaneous and Sequential ASR Hip Replacement, *J. Arthroplasty*. 30 (2015) 1794–1798. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2015.04.036>.
- [28] R.P. Kolli, A. Devaraj, A review of metastable beta titanium alloys, *Metals (Basel)*. 8 (2018) 1–41. <https://doi.org/10.3390/met8070506>.
- [29] S.S. Sidhu, H. Singh, M.A.H. Gepreel, A review on alloy design, biological response, and strengthening of β -titanium alloys as biomaterials, *Mater. Sci. Eng. C*. 121 (2021) 111661. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111661>.
- [30] Ö. Çakmak, M. Kaya, Effect of sintering procedure on microstructure and mechanical properties of biomedical TiNbSn alloy produced via powder metallurgy, *Appl. Phys. A*. 127 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00339-021-04678-4>.
- [31] K. Ronoh, F. Mwema, S. Dabees, D. Sobola, Advances in sustainable grinding of different types of the titanium biomaterials for medical applications: A review, *Biomed. Eng. Adv.* 4 (2022) 100047. <https://doi.org/10.1016/j.bea.2022.100047>.
- [32] Y. Wang, J. Venezuela, M. Dargusch, Biodegradable shape memory alloys: Progress and prospects, *Biomaterials*. 279 (2021) 121215. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121215>.
- [33] D. Safranski, K. Dupont, K. Gall, Pseudoelastic NiTiNOL in Orthopaedic Applications, *Shape Mem. Superelasticity*. 6 (2020) 332–341. <https://doi.org/10.1007/s40830-020-00294-y>.
- [34] B. Li, Y. Shen, Q. An, Structural origin of reversible martensitic transformation and reversible twinning in NiTi shape memory alloy, *Acta Mater.* 199 (2020) 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2020.08.039>.
- [35] P. Šittner, L. Heller, P. Sedlák, Y. Chen, O. Tyc, O. Molnářová, L. Kadeřávek, H. Seiner, B2 $\Rightarrow$ B19' $\Rightarrow$ B2T Martensitic Transformation as a Mechanism of Plastic Deformation of NiTi, *Shape Mem. Superelasticity*. 5 (2019) 383–396. <https://doi.org/10.1007/s40830-019-00250-5>.
- [36] G. Shimoga, T.H. Kim, S.Y. Kim, An intermetallic niti-based shape memory coil spring for actuator technologies, *Metals (Basel)*. 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/met11081212>.
- [37] C.H. Fu, M.P. Sealy, Y.B. Guo, X.T. Wei, Austenite-martensite phase transformation of biomedical Nitinol by ball burnishing, *J. Mater. Process. Technol.* 214 (2014) 3122–3130.

- <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2014.07.019>.
- [38] M.G. Ahlström, J.P. Thyssen, M. Wennervaldt, T. Menné, J.D. Johansen, Nickel allergy and allergic contact dermatitis: A clinical review of immunology, epidemiology, exposure, and treatment, *Contact Dermatitis*. 81 (2019) 227–241. <https://doi.org/10.1111/cod.13327>.
 - [39] A. Hinojos, D. Hong, H. Sriram, L. Feng, C. Yang, J.P. Wharry, X. Gao, K. Hattar, N. Li, J.E. Schaffer, Y. Wang, M.J. Mills, P.M. Anderson, Taming the Pseudoelastic Response of Nitinol Using Ion Implantation, *Scr. Mater.* 226 (2023) 115261. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2022.115261>.
 - [40] E. Farber, J.N. Zhu, A. Popovich, V. Popovich, A review of NiTi shape memory alloy as a smart material produced by additive manufacturing, *Mater. Today Proc.* 30 (2019) 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.563>.
 - [41] J.W. Mwangi, L.T. Nguyen, V.D. Bui, T. Berger, H. Zeidler, A. Schubert, Nitinol manufacturing and micromachining: A review of processes and their suitability in processing medical-grade nitinol, *J. Manuf. Process.* 38 (2019) 355–369. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2019.01.003>.
 - [42] M. Pawlikowski, K. Skalski, J. Bańcerowski, A. Makuch, K. Jankowski, Stress–strain characteristic of human trabecular bone based on depth sensing indentation measurements, *Biocybern. Biomed. Eng.* 37 (2017) 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.bbe.2017.01.002>.
 - [43] S.S. Kirana, E.I. Auerkari, Genotoxicity of NiTi orthodontic wires induced by the release of metal ions, *AIP Conf. Proc.* 2344 (2021). <https://doi.org/10.1063/5.0047255>.
 - [44] G. Baigonakova, E. Marchenko, T. Chekalkin, J. Kang, S. Weiss, A. Obrosof, Influence of Silver Addition on Structure, Martensite Transformations and Mechanical Properties of TiNi – Ag Alloy Wires for Biomedical Application, *Materials (Basel)*. 13 (2020).
 - [45] Y.F. Zheng, B.B. Zhang, B.L. Wang, Y.B. Wang, L. Li, Q.B. Yang, L.S. Cui, Introduction of antibacterial function into biomedical TiNi shape memory alloy by the addition of element Ag, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2758–2767. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.010>.
 - [46] E.S. Marchenko, G.A. Baigonakova, V.E. Gyunter, The Effect of Silver Doping on the Structure and Shape Memory Effect in Biocompatible TiNi Alloys, *Tech. Phys. Lett.* 44 (2018) 749–752. <https://doi.org/10.1134/S1063785018080254>.
 - [47] E. Thangavel, V. Shankar, K. Dharmalingam, M. Marimuthu, M. Veerapandian, M. Kumar, S. Kim, B. Kim, S. Ramasundaram, D. Kim, RF magnetron sputtering mediated NiTi / Ag coating on Ti-alloy substrate with enhanced biocompatibility and durability, *Mater. Sci. Eng. C*. 99 (2019) 304–314. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.099>.
 - [48] W.M. Haynes, D.R. Lide, T.J. Bruno, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 97th Editi, CRC Press, 2016.
 - [49] G.H.T. Álvares da Silva, J. Otubo, Designing NiTiAg Shape Memory Alloys by Vacuum Arc Remelting: First Practical Insights on Melting and Casting, *Shape Mem. Superelasticity*. 4 (2018) 402–410. <https://doi.org/10.1007/s40830-018-0190-z>.
 - [50] G.S. Priyanga, S. Santosh, M.N. Matur, Structural and mechanical properties of NiTiAg shape memory alloys: ab-initio study, *Model. Simul. Mater. Sci. Eng.* 31 (2023) 065004. <https://doi.org/10.1088/1361-651x/acde94>.
 - [51] C. Zamponi, M. Wuttig, E. Quandt, Ni-Ti-Ag shape memory thin films, *Scr. Mater.* 56 (2007) 1075–1077. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2007.02.021>.
 - [52] M.K. Ibrahim, S.N. Saud, E. Hamzah, E.M. Nazim, Role of Ag addition on microstructure, mechanical properties, corrosion behavior and biocompatibility of porous Ti-30 at % Ta shape memory alloys, *J. Cent. South Univ.* 27 (2020) 3175–3187.
 - [53] F. Dagdelen, E. Balci, I.N. Qader, E. Ozen, M. Kok, M.S. Kanca, S.S. Abdullah, S.S. Mohammed, Influence of the Nb Content on the Microstructure and Phase Transformation Properties of NiTiNb Shape Memory Alloys, *JOM*. 72 (2020) 1664–1672. <https://doi.org/10.1007/s11837-020-04026-6>.
 - [54] S. Sampath, T.A. Nguyen, NiTi-based ternary shape-memory alloys, in: *NICKEL-TITANIUM SMART HYBRID Mater. From Micro- to Nano-Structured Alloy. Emerg. Appl.*, Elsevier B.V, 2022: pp. 123–138.

- [55] T. Sabu, A. Behera, T.A. Nguyen, NICKEL-TITANIUM SMART HYBRID MATERIALS From Micro- to Nano-Structured Alloys for Emerging Applications, Elsevier B.V, 2022.
- [56] Yildirim Aydogdu, O. Abboosh, P. Soyer, G. Kiliç, A. Savur, F. Dagdelen, A. Aydogdu, Y. Tunalı, Investigation of Thermal and Antimicrobial Properties of NiTiX (X = Ta, Ag, and Nb) Shape Memory Alloys, *Phys. Met. Metallogr.* 123 (2022) 1326–1334. <https://doi.org/10.1134/S0031918X21100306>.
- [57] S.S. Mohammed, E. Balci, H.A. Qadir, I.N. Qader, S. Saydam, F. Dagdelen, The exploring microstructural, caloric, and corrosion behavior of NiTiNb shape-memory alloys, *J. Therm. Anal. Calorim.* 147 (2022) 11705–11713. <https://doi.org/10.1007/s10973-022-11440-2>.
- [58] F.F. Cardoso, P.L. Ferrandini, E.S.N. Lopes, A. Cremasco, R. Caram, Ti – Mo alloys employed as biomaterials : Effects of composition and aging heat treatment on microstructure and mechanical behavior, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 32 (2014) 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.11.021>.
- [59] P.E.L. Moraes, R.J. Contieri, E.S.N. Lopes, A. Robin, R. Caram, Effects of Sn addition on the microstructure , mechanical properties and corrosion behavior of Ti – Nb – Sn alloys, *Mater. Charact.* 96 (2014) 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2014.08.014>.
- [60] H.Y. Kim, Y. Ikehara, J.I. Kim, H. Hosoda, S. Miyazaki, Martensitic transformation , shape memory effect and superelasticity of Ti – Nb binary alloys, *Acta Mater.* 54 (2006) 2419–2429. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2006.01.019>.
- [61] E.S.N. Lopes, A. Cremasco, C.R.M. Afonso, R. Caram, Effects of double aging heat treatment on the microstructure , Vickers hardness and elastic modulus of Ti – Nb alloys, *Mater. Charact.* 62 (2011) 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2011.04.015>.
- [62] M.K. Ibrahim, E. Hamzah, S.N. Saud, E.M. Nazim, A. Bahador, Parameter optimization of microwave sintering porous Ti – 23 % Nb shape memory alloys for biomedical applications, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 28 (2018) 700–710. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(18\)64702-8](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(18)64702-8).
- [63] S. Acharya, S. Bahl, S.S. Dabas, S. Hassan, V. Gopal, A.G. Panicker, G. Manivasagam, S. Suwas, K. Chatterjee, Role of aging induced α precipitation on the mechanical and tribocorrosive performance of a β Ti-Nb-Ta-O orthopedic alloy, *Mater. Sci. Eng. C.* 103 (2019) 109755. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109755>.
- [64] B. Sun, X.L. Meng, Z.Y. Gao, W. Cai, Martensite structure and mechanical property of Ti-Nb-Ag shape memory alloys for biomedical applications, *Vacuum.* 156 (2018) 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2018.07.029>.
- [65] L.A. Alberta, J. Vishnu, A. Hariharan, S. Pilz, A. Gebert, M. Calin, Novel low modulus beta-type Ti-Nb alloys by gallium and copper minor additions for antibacterial implant applications, *J. Mater. Res. Technol.* 20 (2022) 3306–3322. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.08.111>.
- [66] H.Y. Kim, S. Miyazaki, Several Issues in the Development of Ti–Nb-Based Shape Memory Alloys, *Shape Mem. Superelasticity.* 2 (2016) 380–390. <https://doi.org/10.1007/s40830-016-0087-7>.
- [67] B. Sun, X. Meng, Z. Gao, W. Cai, Crystallography Study on the Internal Twinning of Ti – Nb-Based Shape Memory Alloys, *Cryst. Res. Technol.* 1800067 (2018) 1–5. <https://doi.org/10.1002/crat.201800067>.
- [68] M. Fischer, P. Laheurte, P. Acquier, D. Joguet, L. Peltier, T. Petithory, K. Anselme, P. Mille, Synthesis and characterization of Ti-27.5Nb alloy made by CLAD® additive manufacturing process for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 75 (2017) 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.060>.
- [69] R.E. McMahon, J. Ma, S. V. Verkhoturov, D. Munoz-Pinto, I. Karaman, F. Rubitschek, H.J. Maier, M.S. Hahn, A comparative study of the cytotoxicity and corrosion resistance of nickel-titanium and titanium-niobium shape memory alloys, *Acta Biomater.* 8 (2012) 2863–2870. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.034>.
- [70] S.N. Saud, S. Raheleh Hosseini, H.R. Bakhsheshi-Rad, F. Yaghoubidoust, N. Iqbal, E. Hamzah, C.H.R. Ooi, Corrosion and bioactivity performance of graphene oxide coating on Ti-Nb shape memory alloys in simulated body fluid, *Mater. Sci. Eng. C.* 68 (2016) 687–694.

- <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.048>.
- [71] Y. Oshida, Materials Classification, in: Biosci. Bioeng. Titan. Mater., 2013: pp. 9–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62625-7.00002-9>.
 - [72] A. Yolun, S. Murat, Fabrication , characterization , and in vivo biocompatibility evaluation of titanium-niobium implants, J. Eng. Med. (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1177/0954411920960854>.
 - [73] S. Li, W. Lee, J. Yeom, J.G. Kim, J.S. Oh, T. Lee, Y. Liu, T. Nam, Towards bone-like elastic modulus in TiNbSn alloys with large recovery strain for biomedical applications, J. Alloys Compd. 925 (2022) 166724. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2022.166724>.
 - [74] K. Miura, N. Yamada, S. Hanada, T. Jung, E. Itoi, Acta Biomaterialia The bone tissue compatibility of a new Ti – Nb – Sn alloy with a low Young ' s modulus, Acta Biomater. 7 (2011) 2320–2326. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.008>.
 - [75] M.K. Ibrahim, E. Hamzah, S.N. Saud, Microstructure , Phase Transformation , Mechanical Behavior , Bio-corrosion and Antibacterial Properties, J. Mater. Eng. Perform. 28 (2019) 382–393. <https://doi.org/10.1007/s11665-018-3776-x>.
 - [76] A.H. Hussein, M.A.H. Gepreel, M.K. Gouda, A.M. Hefnawy, S.H. Kandil, Biocompatibility of new Ti-Nb-Ta base alloys, Mater. Sci. Eng. C. 61 (2016) 574–578. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.071>.
 - [77] A.G. Kolmakov, E.O. Nasakina, M. Sevostyanov, S. V. Konushkin, K. V. Sergiyenko, M.L. Kheifetz, Dynamics of Nonlinear Processes of Corrosion of Non-Nikel Titanium Shape Dynamics of Nonlinear Processes of Corrosion of Non-Nikel Titanium Shape Memory Alloy, Nonlinear Phenom. Complex Syst. 22 (2019) 354–361. <https://doi.org/10.33581/1561-4085-2019-22-4-354-361>.
 - [78] G. Manivasagam, D. Dhinasekaran, A. Rajamanickam, Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention - A Review, Recent Patents Corros. Sci. 2 (2010) 40–54. <http://benthamscience.com/open/openaccess.php?rptcs/articles/V002/40RPTCS.htm>.
 - [79] G. Ring, J. O'Mullane, A. O'Riordan, A. Furey, Trace metal determination as it relates to metallosis of orthopaedic implants: Evolution and current status, Clin. Biochem. 49 (2016) 617–635. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.01.001>.
 - [80] J.L. Gilbert, S.A. Mali, Medical Implant Corrosion : Electrochemistry at Metallic Biomaterial Surfaces, in: Degrad. Implant Mater., 2012: pp. 1–28. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3942-4>.
 - [81] T. Hryniewicz, R. Rokicki, Modification of Nitinol Biomaterial for Medical Applications, World Sci. News. 96 (2018) 35–58.
 - [82] S. Nagaraja, A.R. Pelton, Corrosion resistance of a Nitinol ocular microstent: Implications on biocompatibility, J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater. 108 (2020) 2681–2690. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34599>.
 - [83] S. Nagaraja, S.J.L. Sullivan, P.R. Stafford, A.D. Lucas, E. Malkin, Impact of nitinol stent surface processing on in-vivo nickel release and biological response, Acta Biomater. 72 (2018) 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.036>.
 - [84] S.J.L. Sullivan, D. Madamba, S. Sivan, K. Miyashiro, M.L. Dreher, C. Trépanier, S. Nagaraja, The effects of surface processing on in-vivo corrosion of Nitinol stents in a porcine model, Acta Biomater. 62 (2017) 385–396. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.029>.
 - [85] G.S. Firstov, R.G. Vitchev, H. Kumar, B. Blanpain, J. Van Humbeeck, Surface oxidation of NiTi shape memory alloy, Biomaterials. 23 (2002) 4863–4871. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00244-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00244-2).
 - [86] S.S. Zumdahl, D.J. DeCoste, Chemical Principles, 8th Editio, Cengage Learning, 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-103386-9.50017-4>.
 - [87] N. Norouzi, Z. Nouri, The effect of two-stage acid treatment on surface behavior and improvement of bioactivity of nitinol alloy, Biointerface Res. Appl. Chem. 11 (2021) 10690–10702. <https://doi.org/10.33263/BRIAC113.1069010702>.
 - [88] R. Zahran, J.I. Rosales Leal, M.A. Rodríguez Valverde, M.A. Cabrerizo Vílchez, Effect of

- hydrofluoric acid etching time on titanium topography, chemistry, wettability, and cell adhesion, *PLoS One*. 11 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165296>.
- [89] P. Kazimierczak, A. Przekora, Osteoconductive and osteoinductive surface modifications of biomaterials for bone regeneration: A concise review, *Coatings*. 10 (2020) 1–25. <https://doi.org/10.3390/coatings10100971>.
- [90] Q. Wang, P. Zhou, S. Liu, S. Attarilar, R.L.W. Ma, Y. Zhong, L. Wang, Multi-scale surface treatments of titanium implants for rapid osseointegration: A review, *Nanomaterials*. 10 (2020) 1–27. <https://doi.org/10.3390/nano10061244>.
- [91] E. Ramos-Moore, A. Rosenkranz, L.F. Matamala, A. Videla, A. Durán, J. Ramos-Grez, Effect of surface etching and electrodeposition of copper on nitinol, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 258 (2017). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/258/1/012009>.
- [92] R. Chakraborty, M.S. Raza, S. Datta, P. Saha, Synthesis and characterization of nickel free titanium–hydroxyapatite composite coating over Nitinol surface through in-situ laser cladding and alloying, *Surf. Coatings Technol.* 358 (2019) 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.11.036>.
- [93] R. Chakraborty, S. Datta, M.S. Raza, P. Saha, A comparative study of surface characterization and corrosion performance properties of laser surface modified biomedical grade nitinol, *Appl. Surf. Sci.* 469 (2019) 753–763. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.11.045>.
- [94] A. Pequegnat, A. Michael, J. Wang, K. Lian, Y. Zhou, M.I. Khan, Surface characterizations of laser modified biomedical grade NiTi shape memory alloys, *Mater. Sci. Eng. C*. 50 (2015) 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.085>.
- [95] M.R. Etminanfar, J. Khalil-Allafi, S.O.R. Sheykholeslami, The Effect of Hydroxyapatite Coatings on the Passivation Behavior of Oxidized and Unoxidized Superelastic Nitinol Alloys, *J. Mater. Eng. Perform.* 27 (2018) 501–509. <https://doi.org/10.1007/s11665-018-3200-6>.
- [96] Z. Azar, J. Khalil-Allafi, M.R. Etminanfar, Electro-crystallization of hydroxyapatite coatings on Nitinol rotating disk electrode, *Mater. Res. Express*. 6 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab00b8>.
- [97] D. Batalu, F. Nastase, M. Militaru, M. Gherghiceanu, P. Badica, NiTi coated with oxide and polymer films in the in vivo healing processes, *Integr. Med. Res.* 8 (2018) 914–922. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2018.06.015>.
- [98] Shubhava, A. Jayarama, G.K. Kannarpady, S. Kale, S. Prabhu, R. Pinto, Chemical etching of glasses in hydrofluoric Acid: A brief review, *Mater. Today Proc.* 55 (2022) 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.110>.
- [99] H. Park, J.H. Cho, J.H. Jung, P.P. Duy, A.H. Tuan Le, J. Yi, A Review of Wet Chemical Etching of Glasses in Hydrofluoric Acid based Solution for Thin Film Silicon Solar Cell Application, *Curr. Photovolt. Res.* 5 (2017) 75–82.
- [100] R.B. Rebak, J.R. Dillman, P. Crook, C.V.V. Shawber, Corrosion behavior of nickel alloys in wet hydrofluoric acid, *Mater. Corros.* 52 (2001) 289–297. [https://doi.org/10.1002/1521-4176\(200104\)52:4<289::aid-maco289>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-4176(200104)52:4<289::aid-maco289>3.0.co;2-0).
- [101] J. Lee, Y.C. Shin, Effects of Composition and Post Heat Treatment on Shape Memory Characteristics and Mechanical Properties for Laser Direct Deposited Nitinol, *Lasers Manuf. Mater. Process.* 6 (2019) 41–58. <https://doi.org/10.1007/s40516-019-0079-5>.
- [102] S.A. Shabalovskaya, J. Anderegg, Surface Conditions of Nitinol Wires , Tubing , and As-Cast Alloys . The Effect of Chemical Etching , Aging in Boiling Water , and Heat Treatment, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 65 (2003) 193–203.
- [103] E. Marchenko, G. Baigonakova, K. Dubovikov, O. Kokorev, Y. Yasenchuk, A. Vorozhtsov, In Vitro Bio-Testing Comparative Analysis of NiTi Porous Alloys Modified by Heat Treatment, *Metals (Basel)*. 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/met12061006>.
- [104] I. Bae, B.H. Kim, D.G. Kim, I.B. Sohn, S.W. Yang, Salt heat treatment and passivation to improve the corrosion resistance of nitinol (Ni-ti), *Materials (Basel)*. 14 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.3390/ma14247789>.
- [105] N. Ohtsu, S. Suginishi, M. Hirano, Antibacterial effect of nickel-titanium alloy owing to nickel ion

- release, *Appl. Surf. Sci.* 405 (2017) 215–219. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.02.037>.
- [106] W.S. Chan, K. Gulati, O.A. Peters, Advancing Nitinol: From heat treatment to surface functionalization for nickel–titanium (NiTi) instruments in endodontics, *Bioact. Mater.* 22 (2023) 91–111. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.09.008>.
- [107] M. Montazerian, F. Hosseinzadeh, C. Migneco, M.V.L. Fook, F. Baino, Bioceramic coatings on metallic implants: An overview, *Ceram. Int.* 48 (2022) 8987–9005. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.02.055>.
- [108] B. Priyadarshini, M. Rama, U. Vijayalakshmi, Bioactive coating as a surface modification technique for biocompatible metallic implants: a review, *J. Asian Ceram. Soc.* 7 (2019) 397–406. <https://doi.org/10.1080/21870764.2019.1669861>.
- [109] S. Kargozar, S. Ramakrishna, M. Mozafari, Chemistry of biomaterials: future prospects, *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 10 (2019) 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.07.003>.
- [110] S. Widiarto, S.D. Yuwono, A. Rochliadi, I.M. Arcana, Preparation and Characterization of Cellulose and Nanocellulose from Agro-industrial Waste - Cassava Peel, *J. Phys. Conf. Ser.* 176 (2017). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/755/1/011001>.
- [111] J. Landauer, P. Foerst, Triboelectric separation of a starch-protein mixture – Impact of electric field strength and flow rate, *Adv. Powder Technol.* 29 (2018) 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2017.10.018>.
- [112] S. (Gabriel) Kou, L.M. Peters, M.R. Mucalo, Chitosan: A review of sources and preparation methods, *Int. J. Biol. Macromol.* 169 (2021) 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>.
- [113] A. George, M.R. Sanjay, R. Srisuk, J. Parameswaranpillai, S. Siengchin, A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites, *Int. J. Biol. Macromol.* 154 (2020) 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120>.
- [114] A. Kashirina, Y. Yao, Y. Liu, J. Leng, Biopolymers as bone substitutes: A review, *Biomater. Sci.* 7 (2019) 3961–3983. <https://doi.org/10.1039/c9bm00664h>.
- [115] V. Zargar, M. Asghari, A. Dashti, A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications, *ChemBioEng Rev.* 2 (2015) 204–226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>.
- [116] W. Xiang, H. Cao, H. Tao, L. Jin, Y. Luo, F. Tao, T. Jiang, Applications of chitosan-based biomaterials: From preparation to spinal cord injury neuroprosthetic treatment, *Int. J. Biol. Macromol.* 230 (2023) 123447. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123447>.
- [117] W. Wang, C. Xue, X. Mao, Chitosan: Structural modification, biological activity and application, *Int. J. Biol. Macromol.* 164 (2020) 4532–4546. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042>.
- [118] L. Ren, J. Xu, Y. Zhang, J. Zhou, D. Chen, Z. Chang, Preparation and characterization of porous chitosan microspheres and adsorption performance for hexavalent chromium, *Int. J. Biol. Macromol.* 135 (2019) 898–906. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.007>.
- [119] S. Kim, Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities, *Int. J. Polym. Sci.* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/1708172>.
- [120] M. Azmana, S. Mahmood, A.R. Hilles, A. Rahman, M.A. Bin Arifin, S. Ahmed, A review on chitosan and chitosan-based bionanocomposites: Promising material for combatting global issues and its applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 185 (2021) 832–848. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.023>.
- [121] F. Shahidi, J.K.V. Arachchi, Y.-J. Jeon, Food applications of chitin and chitosans, *Trends Food Sci. Technol.* 10 (1999) 37–51.
- [122] D. Chuan, T. Jin, R. Fan, L. Zhou, G. Guo, Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.03.007>.
- [123] R.T. De Silva, M.M.M.G.P.G. Mantilaka, S.P. Ratnayake, G.A.J. Amaratunga, K.M.N. de Silva, Nano-MgO reinforced chitosan nanocomposites for high performance packaging applications with improved mechanical, thermal and barrier properties, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 739–747. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.038>.

- [124] P. Jabłoński, A. Kyzioł, D. Pawcenis, B. Pucelik, M. Hebda, M. Migdalska, H. Krawiec, M. Arruebo, K. Kyzioł, Electrostatic self-assembly approach in the deposition of bio-functional chitosan-based layers enriched with caffeic acid on Ti-6Al-7Nb alloys by alternate immersion, *Biomater. Adv.* 136 (2022) 212791. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212791>.
- [125] M.B. Kannan, *Surface Modification of Magnesium and its Alloys for Biomedical Applications*, Elsevier, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-078-1.00013-X>.
- [126] F.M. Chen, X. Liu, Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering, *Prog. Polym. Sci.* 53 (2016) 86–168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>.
- [127] Y. Kim, Z. Zharkinbekov, K. Raziyeva, L. Tabyldiyeva, K. Berikova, D. Zhumagul, K. Temirkhanova, A. Saparov, Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Regeneration, *Pharmaceutics*. 15 (2023) 807. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030807>.
- [128] A. Madni, R. Kousar, N. Naeem, F. Wahid, Recent advancements in applications of chitosan-based biomaterials for skin tissue engineering, *J. Bioresour. Bioprod.* 6 (2021) 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.01.002>.
- [129] U. Garg, S. Chauhan, U. Nagaich, N. Jain, Current Advances in Chitosan Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting, *Adv Pharm Bull.* 9 (2019) 195–204. <https://doi.org/10.15171/jcvtr.2015.24>.
- [130] W. Wang, Q. Meng, Q. Li, J. Liu, M. Zhou, Z. Jin, K. Zhao, Chitosan derivatives and their application in biomedicine, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21020487>.
- [131] W. Sun, D.A. Gregory, M.A. Tomeh, X. Zhao, Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms22031499>.
- [132] T.P. Nguyen, Q.V. Nguyen, V. Nguyen, T. Le, Q. Van Le, Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical, *Polimers*. 11 (2019) 1–25.
- [133] Y. Wang, L. Qi, Y. Wu, Effect of ultrathin Fe dusting layer on electrical transport properties of few-layer MoS₂ field-effect transistors, 041510 (2017). <https://doi.org/10.1116/1.4986195>.
- [134] C. Hu, D. Ashok, D.R. Nisbet, V. Gautam, Bioinspired surface modification of orthopedic implants for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 219 (2019) 119366. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119366>.
- [135] J.Y. Kim, B.E. Yang, J.H. Ahn, S.O. Park, H.W. Shim, Comparable efficacy of silk fibroin with the collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects, *J. Adv. Prosthodont.* 6 (2014) 539–546. <https://doi.org/10.4047/jap.2014.6.6.539>.
- [136] S. Mohammadzadehmoghadam, Y. Dong, Fabrication and characterization of electrospun silk fibroin/gelatin scaffolds crosslinked with glutaraldehyde vapor, *Front. Mater.* 6 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00091>.
- [137] C. Zhang, X. Wang, A. Liu, C. Pan, H. Ding, W. Ye, Reduced graphene oxide/titanium dioxide hybrid nanofiller-reinforced electrospun silk fibroin scaffolds for tissue engineering, *Mater. Lett.* 291 (2021) 129563. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.129563>.
- [138] S.P. Miguel, D. Simões, A.F. Moreira, R.S. Sequeira, I.J. Correia, Production and characterization of electrospun silk fibroin based asymmetric membranes for wound dressing applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 121 (2019) 524–535. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.041>.
- [139] R.S. Riseh, Y.A. Skorik, V.K. Thakur, M.M. Pour, E. Tamanadar, S.S. Noghabi, Encapsulation of plant biocontrol bacteria with alginate as a main polymer material, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222011165>.
- [140] J. Sun, H. Tan, Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications, *Materials (Basel)*. 6 (2013) 1285–1309. <https://doi.org/10.3390/ma6041285>.
- [141] H. Zhang, J. Cheng, Q. Ao, Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine, *Mar. Drugs*. 19 (2021) 1–24. <https://doi.org/10.3390/md19050264>.
- [142] X. Shen, P. Huang, F. Li, X. Wang, T. Yuan, R. Sun, Compressive alginate sponge derived from seaweed biomass resources for methylene blue removal from wastewater, *Polymers (Basel)*. 11 (2019) 4–8. <https://doi.org/10.3390/polym11060961>.
- [143] E. Ruvinov, S. Cohen, Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction: Progress, translational strategies, and clinical outlook. From ocean algae to patient bedside., *Adv. Drug*

- Deliv. Rev. 96 (2016) 54–76. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.021>.
- [144] M. Ueno, T. Oda, Biological activities of alginate, *Adv. Food Nutr. Res.* 72 (2014) 95–112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800269-8.00006-3>.
- [145] P. Jabłoński, A. Kyzioł, D. Pawcenis, B. Pucelik, M. Hebda, M. Migdalska, H. Krawiec, M. Arruebo, K. Kyzioł, Electrostatic self-assembly approach in the deposition of bio-functional chitosan-based layers enriched with caffeic acid on Ti-6Al-7Nb alloys by alternate immersion, *Biomater. Adv.* 136 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212791>.
- [146] M. Zhang, X. Zhao, Alginate hydrogel dressings for advanced wound management, *Int. J. Biol. Macromol.* 162 (2020) 1414–1428. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.311>.
- [147] M. Farokhi, F. Jonidi Shariatzadeh, A. Solouk, H. Mirzadeh, Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 69 (2020) 230–247. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1562924>.
- [148] S. Mallakpour, E. Azadi, C.M. Hussain, State-of-the-art of 3D printing technology of alginate-based hydrogels—An emerging technique for industrial applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 293 (2021) 102436. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102436>.
- [149] A. V. Nikam, B.L.V. Prasad, A.A. Kulkarni, Wet chemical synthesis of metal oxide nanoparticles: A review, *CrystEngComm.* 20 (2018) 5091–5107. <https://doi.org/10.1039/C8CE00487K>.
- [150] S. RAI, A. RAI, Review: Nanotechnology- The secret of fifth industrial revolution and the future of next generation, *Nusant. Biosci.* 7 (2015) 61–66. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n070201>.
- [151] T. Athar, Smart precursors for smart nanoparticles, Second Edi, Elsevier Inc., 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28990-0.00017-8>.
- [152] V. Vinothkumar, M. Abinaya, S.-M. Chen, V. Sethupathi, V. Muthuraj, Ultrasound assisted synthesis of silver titanate for the differential pulse voltammetric determination of antibiotic drug metronidazole, *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures.* 134 (2021) 114865. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2021.114865>.
- [153] X. Jia, Y. Yao, G. Yu, L. Qu, T. Li, Z. Li, C. Xu, Synthesis of gold-silver nanoalloys under microwave-assisted irradiation by deposition of silver on gold nanoclusters/triple helix glucan and antifungal activity, *Carbohydr. Polym.* 238 (2020) 116169. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116169>.
- [154] I.F. Cruz, C. Freire, J.P. Araújo, C. Pereira, A.M. Pereira, Multifunctional Ferrite Nanoparticles: From Current Trends Toward the Future, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813904-2.00003-6>.
- [155] H. Al-Madhagi, V. Yazbik, W. Abdelwahed, L. Alchab, Magnetite Nanoparticle Co-precipitation Synthesis, Characterization, and Applications: Mini Review, *Bionanoscience.* (2023). <https://doi.org/10.1007/s12668-023-01113-1>.
- [156] S.A. Ansari, M. Oves, R. Satar, A. Khan, S.I. Ahmad, M.A. Jafri, S.K. Zaidi, M.H. Alqahtani, Antibacterial activity of iron oxide nanoparticles synthesized by co-precipitation technology against *Bacillus cereus* and *Klebsiella pneumoniae*, *Polish J. Chem. Technol.* 19 (2017) 110–115. <https://doi.org/10.1515/pjct-2017-0076>.
- [157] M.A. Rahman, R. Radhakrishnan, R. Gopalakrishnan, Structural, optical, magnetic and antibacterial properties of Nd doped NiO nanoparticles prepared by co-precipitation method, *J. Alloys Compd.* 742 (2018) 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.01.298>.
- [158] B. Pejjai, M. Reddivari, T.R.R. Kotte, Phase controllable synthesis of CuS nanoparticles by chemical co-precipitation method: Effect of copper precursors on the properties of CuS, *Mater. Chem. Phys.* 239 (2020) 122030. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122030>.
- [159] S.C. Veerla, D.R. Kim, J. Kim, H. Sohn, S.Y. Yang, Controlled nanoparticle synthesis of Ag/Fe co-doped hydroxyapatite system for cancer cell treatment, *Mater. Sci. Eng. C.* 98 (2019) 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.148>.
- [160] C. Daruich De Souza, B. Ribeiro Nogueira, M.E.C.M. Rostelato, Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction, *J. Alloys Compd.* 798 (2019) 714–740. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153>.

- [161] Q. Zhang, K. Kusada, H. Kitagawa, Phase Control of Noble Monometallic and Alloy Nanomaterials by Chemical Reduction Methods, *Chempluschem*. 86 (2021) 504–519. <https://doi.org/10.1002/cplu.202000782>.
- [162] R.A. Bapat, T. V. Chaubal, C.P. Joshi, P.R. Bapat, H. Choudhury, M. Pandey, B. Gorain, P. Kesharwani, An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry, *Mater. Sci. Eng. C*. 91 (2018) 881–898. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.069>.
- [163] R.A. Bapat, T. V. Chaubal, S. Dharmadhikari, A.M. Abdulla, P. Bapat, A. Alexander, S.K. Dubey, P. Kesharwani, Recent advances of gold nanoparticles as biomaterial in dentistry, *Int. J. Pharm.* 586 (2020) 119596. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119596>.
- [164] A. Khan, A. Rashid, R. Younas, R. Chong, A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles, *Int. Nano Lett.* 6 (2016) 21–26. <https://doi.org/10.1007/s40089-015-0163-6>.
- [165] N. Berahim, W.J. Basirun, B.F. Leo, M.R. Johan, Synthesis of Bimetallic Gold-Silver (Au-Ag) Nanoparticles for the Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol to 4-Aminophenol, *Catalysts*. 8 (2018). <https://doi.org/10.3390/catal8100412>.
- [166] S.M. Padre, S. Kiruthika, S. Mundinamani, Ravikirana, S. Surabhi, J.R. Jeong, K.M. Eshwarappa, M.S. Murari, V. Shetty, M. Ballal, G. S. C, Mono- and Bimetallic Nanoparticles for Catalytic Degradation of Hazardous Organic Dyes and Antibacterial Applications, *ACS Omega*. 7 (2022) 35023–35034. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03784>.
- [167] A. Król, P. Pomastowski, K. Rafińska, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski, Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.033>.
- [168] Y. He, S. Ingudam, S. Reed, A. Gehring, T.P. Strobaugh, P. Irwin, Study on the mechanism of antibacterial action of magnesium oxide nanoparticles against foodborne pathogens, *J. Nanobiotechnology*. 14 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0202-0>.
- [169] B. Safieh, M. Safari, E. Shaabani, M. Shirzad, R. Faridi-Majidi, Selenium nanoparticles: synthesis, characterization and study of their cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity, *Mater. Res. Express*. 6 (2019).
- [170] Z. Cai, B. Liu, X. Zou, H. Cheng, Chemical Vapor Deposition Growth and Applications of Two-Dimensional Materials and Their Heterostructures, *Chem. Rev.* 118 (2018) 6091–6133. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00536>.
- [171] J. Li, J. Liang, X. Yang, X. Li, B. Zhao, B. Li, X. Duan, Controllable Preparation of 2D Vertical van der Waals Heterostructures and Superlattices for Functional Applications, *Small*. 2107059 (2022) 1–30. <https://doi.org/10.1002/sml.202107059>.
- [172] X. Hou, K.L. Choy, Processing and applications of aerosol-assisted chemical vapor deposition, *Chem. Vap. Depos.* 12 (2006) 583–596. <https://doi.org/10.1002/cvde.200600033>.
- [173] M.J. Powell, D.B. Potter, R.L. Wilson, J.A. Darr, I.P. Parkin, C.J. Carmalt, Scaling aerosol assisted chemical vapour deposition: Exploring the relationship between growth rate and film properties, *Mater. Des.* 129 (2017) 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.05.017>.
- [174] P. Marchand, I.A. Hassan, I.P. Parkin, C.J. Carmalt, Aerosol-assisted delivery of precursors for chemical vapour deposition: Expanding the scope of CVD for materials fabrication, *Dalt. Trans.* 42 (2013) 9406–9422. <https://doi.org/10.1039/c3dt50607j>.
- [175] E. Ozkan, C.C. Crick, A. Taylor, E. Allan, I.P. Parkin, Copper-based water repellent and antibacterial coatings by aerosol assisted chemical vapour deposition, *Chem. Sci.* 7 (2016) 5126–5131. <https://doi.org/10.1039/c6sc01150k>.
- [176] M. Taylor, R.C. Pullar, I.P. Parkin, C. Piccirillo, Nanostructured titanium dioxide coatings prepared by Aerosol Assisted Chemical Vapour Deposition (AACVD), *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 400 (2020) 112727. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112727>.
- [177] M. Claros, M. Setka, Y.P. Jimenez, S. Vallejos, AACVD synthesis and characterization of iron and copper oxides modified zno structured films, *Nanomaterials*. 10 (2020) 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano10030471>.
- [178] C. Lo Porto, F. Palumbo, G. Palazzo, P. Favia, Direct plasma synthesis of nano-capsules loaded

- with antibiotics, *Polym. Chem.* 8 (2017) 1746–1749. <https://doi.org/10.1039/c7py00103g>.
- [179] C. Lo Porto, F. Palumbo, A. Treglia, G. Camporeale, P. Favia, Aerosol assisted atmospheric pressure PE-CVD of drug containing nano- capsules, *Jpn. J. Appl. Phys.* 59 (2020).
- [180] A. Simchi, R. Ahmadi, S.M.S. Reihani, A. Mahdavi, Kinetics and mechanisms of nanoparticle formation and growth in vapor phase condensation process, *Mater. Des.* 28 (2007) 850–856. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2005.10.017>.
- [181] A.V. Rane, K. Kanny, V.K. Abitha, S. Thomas, S. Thomas, *Methods for Synthesis of Nanoparticles and Fabrication of Nanocomposites*, Elsevier Ltd., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101975-7.00005-1>.
- [182] D. Świąch, G. Palumbo, N. Piergies, K. Kollbek, M. Marzec, A. Szkudlarek, C. Paluszkiwicz, Surface modification of Cu nanoparticles coated commercial titanium in the presence of tryptophan: Comprehensive electrochemical and spectroscopic investigations, *Appl. Surf. Sci.* 608 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.155138>.
- [183] M. Mery, N. Orellana, C.A. Acevedo, S. Oyarzún, F. Araneda, G. Herrera, D. Aliaga, W. Creixell, T.P. Corrales, C.P. Romero, Fabrication of silver nanoparticles using a gas phase nanocluster device and preliminary biological uses, *Materials (Basel)*. 11 (2018). <https://doi.org/10.3390/ma11122574>.
- [184] K.M. Lee, S.T. Park, D.J. Lee, Nanogold synthesis by inert gas condensation for immuno-chemistry probes, *J. Alloys Compd.* 390 (2005) 297–300. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2004.08.047>.
- [185] H. Lamsaf, L.F. Ballesteros, M.A. Cerqueira, J.A. Teixeira, L.M. Pastrana, L. Rebouta, S. Carvalho, S. Calderon, Zn and Zn-Fe Nanostructures with Multifunctional Properties as Components for Food Packaging Materials, *Nanomaterials*. 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/nano12122104>.
- [186] H. Lamsaf, V. Lenzi, L. Marques, L. Rebouta, S. Carvalho, L.F. Ballesteros, M.A. Cerqueira, J.A. Teixeira, L. Pastrana, S. Calderon V, Zn-Fe Flower-like nanoparticles growth by gas condensation, *Mater. Lett.* 297 (2021) 129916. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.129916>.
- [187] J. Vernieres, S. Steinhauer, J. Zhao, P. Grammatikopoulos, R. Ferrando, K. Nordlund, F. Djurabekova, M. Sowwan, Site-Specific Wetting of Iron Nanocubes by Gold Atoms in Gas-Phase Synthesis, *Adv. Sci.* 6 (2019). <https://doi.org/10.1002/advs.201900447>.
- [188] E. Pérez-Tijerina, M. Gracia Pinilla, S. Mejía-Rosales, U. Ortiz-Méndez, A. Torres, M. José-Yacamán, Highly size-controlled synthesis of Au/Pd nanoparticles by inert-gas condensation, *Faraday Discuss.* 138 (2008) 353–362. <https://doi.org/10.1039/b705913m>.
- [189] A. Hemben, I. Chianella, G.J.T. Leighton, Surface engineered iron oxide nanoparticles generated by inert gas condensation for biomedical applications, *Bioengineering*. 8 (2021). <https://doi.org/10.3390/bioengineering8030038>.
- [190] N.I. Hulkoti, T.C. Taranath, Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 121 (2014) 474–483. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.027>.
- [191] M. Hasan, I. Ullah, H. Zulfiqar, K. Naeem, A. Iqbal, H. Gul, M. Ashfaq, N. Mahmood, Biological entities as chemical reactors for synthesis of nanomaterials: Progress, challenges and future perspective, *Mater. Today Chem.* 8 (2018) 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.02.003>.
- [192] R.S. Varma, Greener approach to nanomaterials and their sustainable applications, *Curr. Opin. Chem. Eng.* 1 (2012) 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2011.12.002>.
- [193] I. Hussain, N.B. Singh, A. Singh, H. Singh, S.C. Singh, Green synthesis of nanoparticles and its potential application, *Biotechnol. Lett.* 38 (2016) 545–560. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2026-7>.
- [194] P. Vijaya Kumar, S. Mary Jelastin Kala, K.S. Prakash, Green synthesis of gold nanoparticles using Croton Caudatus Geisel leaf extract and their biological studies, *Mater. Lett.* 236 (2019) 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.10.025>.
- [195] R. Ranjana, N. Parushuram, K.S. Harisha, S. Asha, Y. Sangappa, Silk fibroin a bio-template for synthesis of different shaped gold nanoparticles: Characterization and ammonia detection application, *Mater. Today Proc.* 27 (2020) 434–439.

- <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.259>.
- [196] D. Garibo, H.A. Borbón-Nuñez, J.N.D. de León, E. García Mendoza, I. Estrada, Y. Toledano-Magaña, H. Tiznado, M. Ovalle-Marroquin, A.G. Soto-Ramos, A. Blanco, J.A. Rodríguez, O.A. Romo, L.A. Chávez-Almazán, A. Susarrey-Arce, Green synthesis of silver nanoparticles using *Lysiloma acapulcensis* exhibit high-antimicrobial activity, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69606-7>.
 - [197] M.A. Huq, Green synthesis of silver nanoparticles using *pseudoduganella eburnea* MAHUQ-39 and their antimicrobial mechanisms investigation against drug resistant human pathogens, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21041510>.
 - [198] M.W. Amer, A.M. Awwad, Green synthesis of copper nanoparticles by Citrus limon fruits extract, characterization and antibacterial activity, *Int. Sci. Organ.* 7 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4017993>.
 - [199] V. Cittrarasu, D. Kaliannan, K. Dharman, V. Maluventhen, M. Easwaran, W.C. Liu, B. Balasubramanian, M. Arumugam, Green synthesis of selenium nanoparticles mediated from *Ceropegia bulbosa* Roxb extract and its cytotoxicity, antimicrobial, mosquitocidal and photocatalytic activities, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80327-9>.
 - [200] G. Karunakaran, M. Jagathambal, G.S. Kumar, E. Kolesnikov, Hylotelephium telephium Flower Extract-Mediated Biosynthesis of CuO and ZnO Nanoparticles with Promising Antioxidant and Antibacterial Properties for Healthcare Applications, *Adv. Charact. Powder Mater.* 72 (2020) 1264–1272. <https://doi.org/10.1007/s11837-020-04007-9>.
 - [201] Y.A. Selim, M.A. Azb, I. Ragab, M. H. M. Abd El-Azim, Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Deverra tortuosa* and their Cytotoxic Activities, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60541-1>.
 - [202] B.K. Thakur, A. Kumar, D. Kumar, Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and evaluation of their antibacterial activity, *South African J. Bot.* 124 (2019) 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.024>.
 - [203] Z. Sabouri, A. Rangrazi, M.S. Amiri, M. Khatami, M. Darroudi, Green synthesis of nickel oxide nanoparticles using *Salvia hispanica* L. (chia) seeds extract and studies of their photocatalytic activity and cytotoxicity effects, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 44 (2021) 2407–2415. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02613-8>.
 - [204] S. Qasim, A. Zafar, M.S. Saif, Z. Ali, M. Nazar, M. Waqas, A.U. Haq, T. Tariq, S.G. Hassan, F. Iqbal, X.G. Shu, M. Hasan, Green synthesis of iron oxide nanorods using *Withania coagulans* extract improved photocatalytic degradation and antimicrobial activity, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 204 (2020) 111784. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111784>.
 - [205] S.A. Khan, S. Shahid, S. Hanif, H.S. Almoallim, S.A. Alharbi, H. Sellami, Green Synthesis of Chromium Oxide Nanoparticles for Antibacterial, Antioxidant Anticancer, and Biocompatibility Activities, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22020502>.
 - [206] D.W. Grainger, H.C. Van Der Mei, P.C. Jutte, J.J.A.M. Van Den Dungen, M.J. Schultz, B.F.A.M. Van Der Laan, S.A.J. Zaat, H.J. Busscher, Biomaterials Critical factors in the translation of improved antimicrobial strategies for medical implants and devices, *Biomaterials.* 34 (2013) 9237–9243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.043>.
 - [207] O. Gherasim, A. Ficai, E. Andronescu, Biomedical Applications of Silver Nanoparticles : An Up-to-Date Overview, *Nanomaterials* 8 (2018) 1–25. <https://doi.org/10.3390/nano8090681>.
 - [208] T. Bruna, F. Maldonado-Bravo, P. Jara, N. Caro, Silver nanoparticles and their antibacterial applications, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>.
 - [209] Z. Tavaf, M. Tabatabaei, A. Khala, F. Panahi, Evaluation of antibacterial , antioxi fi lm and antioxidant activities of synthesized silver nanoparticles (AgNPs) and casein peptide fragments against *Streptococcus mutans*, *Eur. J. Integr. Med.* 12 (2017) 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2017.05.011>.
 - [210] J. Roszak, B. Janasik, E. Tomaszewska, C.D.Q. Jr, W. Wa, A study on the in vitro percutaneous

- absorption of silver nanoparticles in combination with aluminum chloride , methyl paraben or di-n-butyl phthalate, *Toxicol. Lett.* 272 (2017) 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.03.006>.
- [211] S. Kumar, A. Shukla, P. Pratim, A. Mitra, D. Halder, Biodegradable hybrid nanocomposites of chitosan / gelatin and silver nanoparticles for active food packaging applications, *Food Packag. Shelf Life.* 16 (2018) 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.008>.
- [212] B. Pannerselvam, M. Kumar, D. Jothinathan, M. Rajenderan, V. Singh, S. Kumaran, An in vitro study on the burn wound healing activity of cotton fabrics incorporated with phytosynthesized silver nanoparticles in male Wistar albino rats, *Eur. J. Pharm. Sci.* 100 (2017) 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.01.015>.
- [213] L. Xu, Y.Y. Wang, J. Huang, C.Y. Chen, Z.X. Wang, H. Xie, Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety, *Theranostics.* 10 (2020) 8996–9031. <https://doi.org/10.7150/thno.45413>.
- [214] Y. Qing, L. Cheng, R. Li, G. Liu, Y. Zhang, X. Tang, J. Wang, H. Liu, Y. Qin, Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies, *Int. J. Nanomedicine.* 13 (2018) 3311–3327. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165125>.
- [215] T. Chatterjee, B.K. Chatterjee, D. Majumdar, P. Chakrabarti, Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850 (2015) 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.022>.
- [216] C. You, C. Han, X. Wang, Y. Zheng, Q. Li, X. Hu, H. Sun, The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity, *Mol. Biol. Rep.* 39 (2012) 9193–9201. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1792-8>.
- [217] Y.G. Yuan, Q.L. Peng, S. Gurunathan, Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017). <https://doi.org/10.3390/ijms18030569>.
- [218] M.A. Quinteros, V. Cano Aristizábal, P.R. Dalmasso, M.G. Paraje, P.L. Páez, Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity, *Toxicol. Vitro.* 36 (2016) 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.08.007>.
- [219] K.S. Siddiqi, A. Husen, R.A.K. Rao, A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties, *J. Nanobiotechnology.* 16 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>.
- [220] C. Liao, Y. Li, S.C. Tjong, Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>.
- [221] L. Dykman, N. Khlebtsov, Gold nanoparticles in biomedical applications : recent advances and perspectives to biological and medical, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2256–2282. <https://doi.org/10.1039/c1cs15166e>.
- [222] H. Chugh, D. Sood, I. Chandra, V. Tomar, G. Dhawan, R. Chandra, Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) 1210–1220. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1449118>.
- [223] B. Fazio, C. D'Andrea, A. Foti, E. Messina, A. Irrera, M.G. Donato, V. Villari, N. Micali, O.M. Maragò, P.G. Gucciardi, SERS detection of Biomolecules at Physiological pH via aggregation of Gold Nanorods mediated by Optical Forces and Plasmonic Heating, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep26952>.
- [224] K. Sztandera, M. Gorzkiewicz, B. Klajnert-Maculewicz, Gold nanoparticles in cancer treatment, *Mol. Pharm.* 16 (2019) 1–23. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00810>.
- [225] Y. Liu, C. Cao, Y. Yu, Y. Si, Thermal ablation in cancer (Review), *Oncol. Lett.* 12 (2016) 2293–2295. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4997>.
- [226] C.B. Collins, R.S. McCoy, B.J. Ackerson, G.J. Collinsc, C.J. Ackerson, Radiofrequency heating

- pathways for gold nanoparticles, *Nanoscale*. 6 (2014) 8459–8472. <https://doi.org/10.1039/c4nr00464g>.
- [227] C. Tao, Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles : research progress , challenges and prospects, *Lett. Appl. Microbiol.* 67 (2018) 537–543. <https://doi.org/10.1111/lam.13082>.
- [228] A. Regiel-Futyra, M. Kus-Liškiewicz, V. Sebastian, S. Irusta, M. Arruebo, G. Stochel, A. Kyzioł, Development of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient antibacterial materials, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 1087–1099. <https://doi.org/10.1021/am508094e>.
- [229] P. Jabłoński, M. Hebda, P. Pytlak, A. Kyzioł, H. Krawiec, Z. Grzesik, K. Kyzioł, Impact of chitosan/noble metals-based coatings on the plasmochemically activated surface of NiTi alloy, *Mater. Chem. Phys.* 248 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.122931>.
- [230] S.J. Amina, B. Guo, A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle, *Int. J. Nanomedicine*. 15 (2020) 9823–9857.
- [231] N. Wang, X. Cheng, N. Li, H. Wang, H. Chen, Nanocarriers and Their Loading Strategies, *Adv. Healthc. Mater.* 1801002 (2018) 1–26. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801002>.
- [232] M. Yang, J. Li, P. Gu, X. Fan, The application of nanoparticles in cancer immunotherapy : Targeting tumor microenvironment, *Bioact. Mater.* 6 (2021) 1973–1987. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.12.010>.
- [233] P. Khandelwal, D.K. Singh, P. Poddar, Advances in the Experimental and Theoretical Understandings of Antibiotic Conjugated Gold Nanoparticles for Antibacterial Applications, *ChemistrySelect*. 4 (2019) 6719–6738. <https://doi.org/10.1002/slct.201900083>.
- [234] S.K. Murthy, Nanoparticles in modern medicine : State of the art and future challenges, *Int. J. Nanomedicine*. 2 (2007) 129–141.
- [235] M. Salavati-niasari, F. Davar, N. Mir, Synthesis and characterization of metallic copper nanoparticles via thermal decomposition, *Polyhedron*. 27 (2008) 3514–3518. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2008.08.020>.
- [236] V.P. Zharov, J. Kim, D.T. Curiel, M. Everts, Self-assembling nanoclusters in living systems : application for integrated photothermal nanodiagnostics and nanotherapy, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 1 (2005) 326–345. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.10.006>.
- [237] K. Giannousi, K. Lafazanis, J. Arvanitidis, A. Pantazaki, C. Dendrinou-samara, Hydrothermal synthesis of copper based nanoparticles : Antimicrobial screening and interaction with DNA, *J. Inorg. Biochem.* 133 (2014) 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.12.009>.
- [238] A.P. Ingle, N. Duran, M. Rai, Bioactivity , mechanism of action , and cytotoxicity of copper-based nanoparticles : A review, *Appl Microbiol Biotechnol.* 98 (2014) 1001–1009. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5422-8>.
- [239] M.I. Din, F. Arshad, Z. Hussain, M. Mukhtar, Green Adeptness in the Synthesis and Stabilization of Copper Nanoparticles : Catalytic , Antibacterial , Cytotoxicity , and Antioxidant Activities, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017). <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2399-8>.
- [240] G.R. Tortella, J.C. Pieretti, O. Rubilar, M.C. Diez, A.B. Seabra, J.C. Pieretti, O. Rubilar, Silver , copper and copper oxide nanoparticles in the fight against human viruses : progress and perspectives, *Crit. Rev. Biotechnol.* 0 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1939260>.
- [241] L. Chen, J. Liang, An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents, *Mater. Sci. Eng. C*. 112 (2020) 110924. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110924>.
- [242] P. Nisar, N. Ali, L. Rahman, M. Ali, Z. Khan, M. Ali, Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles : an insight into the mechanism of action, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 24 (2019) 929–941. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01717-7>.
- [243] S. Shende, A.P. Ingle, A. Gade, M. Rai, Á. Copper, Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn . (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31 (2015) 865–873. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1840-3>.
- [244] N.T.K. Thanh, L.A.W. Green, Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications,

- Nano Today. 5 (2010) 213–230. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.05.003>.
- [245] Y. Liu, H. Miyoshi, M. Nakamura, Nanomedicine for drug delivery and imaging : A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles, *Int. J. Cancer*. 120 (2007) 2527–2537. <https://doi.org/10.1002/ijc.22709>.
- [246] C.J. Murray, K.S. Ikuta, F. Sharara, L. Swetschinski, G. Robles Aguilar, A. Gray, C. Han, C. Bisignano, P. Rao, E. Wool, S.C. Johnson, A.J. Browne, M.G. Chipeta, F. Fell, S. Hackett, G. Haines-Woodhouse, B.H. Kashef Hamadani, E.A.P. Kumaran, B. McManigal, R. Agarwal, S. Akech, S. Albertson, J. Amuasi, J. Andrews, A. Aravkin, E. Ashley, F. Bailey, S. Baker, B. Basnyat, A. Bekker, R. Bender, A. Bethou, J. Bielicki, S. Boonkasidecha, J. Bukosia, C. Carvalho, C. Castañeda-Orjuela, V. Chansamouth, S. Chaurasia, S. Chiurchiù, F. Chowdhury, A.J. Cook, B. Cooper, T.R. Cressey, E. Criollo-Mora, M. Cunningham, S. Darboe, N.P.J. Day, M. De Luca, K. Dokova, A. Dramowski, S.J. Dunachie, T. Eckmanns, D. Eibach, A. Emami, N. Feasey, N. Fisher-Pearson, K. Forrest, D. Garrett, P. Gastmeier, A.Z. Giref, R.C. Greer, V. Gupta, S. Haller, A. Haselbeck, S.I. Hay, M. Holm, S. Hopkins, K.C. Iregbu, J. Jacobs, D. Jarovsky, F. Javanmardi, M. Khorana, N. Kissoon, E. Kobeissi, T. Kostyanov, F. Krapp, R. Krumkamp, A. Kumar, H.H. Kyu, C. Lim, D. Limmathurotsakul, M.J. Loftus, M. Lunn, J. Ma, N. Mturi, T. Munera-Huertas, P. Musicha, M.M. Mussi-Pinhata, T. Nakamura, R. Nanavati, S. Nangia, P. Newton, C. Ngoun, A. Novotney, D. Nwakanma, C.W. Obiero, A. Olivas-Martinez, P. Oliaro, E. Ooko, E. Ortiz-Brizuela, A.Y. Peleg, C. Perrone, N. Plakkal, A. Ponce-de-Leon, M. Raad, T. Ramdin, A. Riddell, T. Roberts, J.V. Robotham, A. Roca, K.E. Rudd, N. Russell, J. Schnall, J.A.G. Scott, M. Shivamallappa, J. Sifuentes-Osornio, N. Steenkeste, A.J. Stewardson, T. Stoeva, N. Tasak, A. Thaiprakong, G. Thwaites, C. Turner, P. Turner, H.R. van Doorn, S. Velaphi, A. Vongpradith, H. Vu, T. Walsh, S. Waner, T. Wangrangsimaikul, T. Wozniak, P. Zheng, B. Sartorius, A.D. Lopez, A. Stergachis, C. Moore, C. Dolecek, M. Naghavi, Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *Lancet*. 399 (2022) 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- [247] WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control, Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2022.
- [248] A. Frei, A.D. Verderosa, A.G. Elliott, J. Zuegg, M.A.T. Blaskovich, Metals to combat antimicrobial resistance, *Nat. Rev. Chem*. 7 (2023) 202–224. <https://doi.org/10.1038/s41570-023-00463-4>.
- [249] M. Ye, Y. Zhao, Y. Wang, M. Zhao, N. Yodsanit, R. Xie, D. Andes, S. Gong, A Dual-Responsive Antibiotic-Loaded Nanoparticle Specifically Binds Pathogens and Overcomes Antimicrobial-Resistant Infections, *Adv. Mater*. 33 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.1002/adma.202006772>.
- [250] F. Altimira, C. Yáñez, G. Bravo, M. González, L.A. Rojas, M. Seeger, Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile, *BMC Microbiol*. 12 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-193>.
- [251] S. González Henao, T. Ghneim-Herrera, Heavy Metals in Soils and the Remediation Potential of Bacteria Associated With the Plant Microbiome, *Front. Environ. Sci*. 9 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.604216>.
- [252] L. Aljerf, A Gateway to Metal Resistance: Bacterial Response to Heavy Metal Toxicity in the Biological Environment, *Ann. Adv. Chem*. (2018) 032–044. <https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001012>.
- [253] A. Hasan, M. Morshed, A. Memic, S. Hassan, T.J. Webster, H.E.S. Marei, Nanoparticles in tissue engineering: Applications, challenges and prospects, *Int. J. Nanomedicine*. 13 (2018) 5637–5655. <https://doi.org/10.2147/IJN.S153758>.
- [254] L. Kumar, V. Ragunathan, M. Chugh, N. Bharadvaja, Nanomaterials for remediation of contaminants : a review, *Environ. Chem. Lett*. 19 (2021) 3139–3163. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01212-z>.
- [255] I. Corsi, I. Venditti, F. Trotta, C. Punta, Environmental safety of nanotechnologies: The eco-design of manufactured nanomaterials for environmental remediation, *Sci. Total Environ*. 864 (2023) 161181. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161181>.
- [256] Y. Zhu, X. Liu, Y. Hu, R. Wang, M. Chen, J. Wu, Y. Wang, S. Kang, Y. Sun, M. Zhu, Behavior,

- remediation effect and toxicity of nanomaterials in water environments, *Environ. Res.* 174 (2019) 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.014>.
- [257] H. Wigger, R. Kägi, M. Wiesner, B. Nowack, Exposure and Possible Risks of Engineered Nanomaterials in the Environment—Current Knowledge and Directions for the Future, *Rev. Geophys.* 58 (2020) 1–25. <https://doi.org/10.1029/2020RG000710>.
- [258] A. Malakar, S.R. Kanel, C. Ray, D.D. Snow, M.N. Nadagouda, Nanomaterials in the environment, human exposure pathway, and health effects: A review, *Sci. Total Environ.* 759 (2021) 143470. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143470>.
- [259] C.N. Cheaburu-Yilmaz, H.Y. Karasulu, O. Yilmaz, Nanoscaled dispersed systems used in drug-delivery applications, Elsevier Inc., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813932-5.00013-3>.
- [260] A. Al Ragib, R. Chakma, K. Dewan, T. Islam, T. Kormoker, A.M. Idris, Current advanced drug delivery systems: Challenges and potentialities, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 76 (2022) 103727. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103727>.
- [261] A.S. Hoffman, The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems, *J. Control. Release.* 132 (2008) 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.08.012>.
- [262] C.J.F. Bertens, M. Gijs, F.J.H.M. van den Biggelaar, R.M.M.A. Nuijts, Topical drug delivery devices: A review, *Exp. Eye Res.* 168 (2018) 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.01.010>.
- [263] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O.C. Farokhzad, Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release, *Chem. Rev.* 116 (2016) 2602–2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>.
- [264] Y. Fu, W.J. Kao, Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 429–444. <https://doi.org/10.1517/17425241003602259>.
- [265] J. Siepmann, F. Siepmann, Modeling of diffusion controlled drug delivery, *J. Control. Release.* 161 (2012) 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.006>.
- [266] K. Ginjupalli, G.V. Shavi, R.K. Averineni, M. Bhat, N. Udupa, P. Nagaraja Upadhya, Poly(α -hydroxy acid) based polymers: A review on material and degradation aspects, *Polym. Degrad. Stab.* 144 (2017) 520–535. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.08.024>.
- [267] X. Deng, M. Qasim, A. Ali, Engineering and polymeric composition of drug-eluting suture: A review, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 109 (2021) 2065–2081. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37194>.
- [268] I.J.S. Kent, T.R. Tice, 4675189 Microencapsulation of water soluble active polypeptides, *Biotechnol. Adv.* 5 (1987) 374. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(87\)90648-3](https://doi.org/10.1016/0734-9750(87)90648-3).
- [269] N.Y. Abu-Thabit, A.S.H. Makhlof, Historical development of drug delivery systems: From conventional macroscale to controlled, targeted, and responsive nanoscale systems, Elsevier Ltd., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101997-9.00001-1>.
- [270] Y. Su, B. Zhang, R. Sun, W. Liu, Q. Zhu, X. Zhang, R. Wang, C. Chen, PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application, *Drug Deliv.* 28 (2021) 1397–1418. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1938756>.
- [271] J. Aparicio-Blanco, V. Sebastián, M. Rodríguez-Amaro, H.C. García-Díaz, A.I. Torres-Suárez, Size-tailored design of highly monodisperse lipid nanocapsules for drug delivery, *J. Biomed. Nanotechnol.* 16 (2019) 1149–1161. <https://doi.org/10.1166/jbn.2019.2765>.
- [272] D. Yadav, H.K. Dewangan, PEGylation: an important approach for novel drug delivery system, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 32 (2021) 266–280. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1825304>.
- [273] J. Yoo, C. Park, G. Yi, D. Lee, H. Koo, Active targeting strategies using biological ligands for nanoparticle drug delivery systems, *Cancers (Basel)*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11050640>.
- [274] J. Wu, The enhanced permeability and retention (Epr) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application, *J. Pers. Med.* 11 (2021).

- <https://doi.org/10.3390/jpm11080771>.
- [275] K. Błaszczak-Świątkiewicz, P. Olszewska, E. Mikiciuk-Olasik, Zastosowanie nanocząsteczek w leczeniu i diagnostyce nowotworów, *Nowotwory*. 63 (2013) 320–330. <https://doi.org/10.5603/NJO.2013.0020>.
 - [276] A. Ahmad, F. Khan, R.K. Mishra, R. Khan, Precision Cancer Nanotherapy: Evolving Role of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Active Targeting, *J. Med. Chem.* 62 (2019) 10475–10496. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00511>.
 - [277] F. Salahpour Anarjan, Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands, Nano-Structures and Nano-Objects. 19 (2019) 100370. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100370>.
 - [278] M. Alavi, M. Hamidi, Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles, *Drug Metab. Pers. Ther.* 34 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2018-0032>.
 - [279] H. Montaseri, C.A. Kruger, H. Abrahamse, Inorganic nanoparticles applied for active targeted photodynamic therapy of breast cancer, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1–33. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030296>.
 - [280] Z.R. Goddard, M.J. Marín, D.A. Russell, M. Searcey, Active targeting of gold nanoparticles as cancer therapeutics, *Chem. Soc. Rev.* 49 (2020) 8774–8789. <https://doi.org/10.1039/d0cs01121e>.
 - [281] D. V. Nazarov, E.G. Zemtsova, R.Z. Valiev, V.M. Smirnov, Specific features of etching of ultrafine- and coarse-grained titanium in base and acid solutions of hydrogen peroxide, *Russ. J. Appl. Chem.* 89 (2016) 334–336. <https://doi.org/10.1134/S1070427216020269>.
 - [282] S.A. Shabalovskaya, J.W. Anderegg, Surface spectroscopic characterization of TiNi nearly equiatomic shape memory alloys for implants Surface spectroscopic characterization of TiNi nearly equiatomic shape memory alloys for implants, *J. Vac. Sci. Technol. A*. 2624 (2013). <https://doi.org/10.1116/1.579461>.
 - [283] S. Shabalovskaya, J. Anderegg, J. Van Humbeeck, Critical overview of Nitinol surfaces and their modifications for medical applications, *Acta Biomater.* 4 (2008) 447–467. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.01.013>.
 - [284] H. Zhao, J. Van Humbeeck, I. De Scheerder, Surface conditioning of nickel-titanium alloy stents for improving biocompatibility, *Surf. Eng.* 17 (2001) 451–458. <https://doi.org/10.1179/026708401322911356>.
 - [285] S. Dadbakhsh, M. Speirs, J. Van Humbeeck, J.P. Kruth, Laser additive manufacturing of bulk and porous shape-memory NiTi alloys: From processes to potential biomedical applications, *MRS Bull.* 41 (2016) 765–774. <https://doi.org/10.1557/mrs.2016.209>.
 - [286] D. V. Nazarov, E.G. Zemtsova, A.Y. Solokhin, R.Z. Valiev, V.M. Smirnov, Modification of the Surface Topography and Composition of Ultrafine and Coarse Grained Titanium by Chemical Etching, *Nanomaterials*. 7 (2017) 1–15. <https://doi.org/10.3390/nano7010015>.
 - [287] K. Kyzioł, J. Rajczyk, K. Wolski, A. Kyzioł, B. Handke, Ł. Kaczmarek, Z. Grzesik, Dual-purpose surface functionalization of Ti-6Al-7Nb involving oxygen plasma treatment and Si-DLC or chitosan-based coatings, *Mater. Sci. Eng. C*. 121 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111848>.
 - [288] A. Regiel, S. Irusta, A. Kyzioł, M. Arruebo, J. Santamaria, Preparation and characterization of chitosan–silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Nanotechnology*. 24 (2013) 015101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/1/015101>.
 - [289] S. Zhang, K.E. Gonsalves, Influence of the Chitosan Surface Profile on the Nucleation and Growth of Calcium Carbonate Films, *Langmuir*. 14 (1998) 6761–6766.
 - [290] K. Nawrotek, J. Grams, R. Sobczyk, M. Kubicka, J. Piotr, Effect of chitosan structure and deposition time on structural and mechanical properties of chitosan-hydroxyapatite tubular-shaped electrodeposits for biomedical applications, *Polym. Test. J.* 123 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2023.108061>.
 - [291] K.I. Gassman, S.G. Hill, N.D. Smith, M.S. Kennedy, T.R. Tzeng, S. Beladi Behbahani, S.M. Helms, L. O'Neill, J.D. DesJardins, The effect of surface roughness and chitosan deposition volume on

- microbial growth in biofilm involving titanium surfaces for orthopaedic applications, *Materialia*. 24 (2022) 101481. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2022.101481>.
- [292] N.G. Chander, J. Venkatraman, Mechanical properties and surface roughness of chitosan reinforced heat polymerized denture base resin, *J. Prosthodont. Res.* 66 (2022) 101–108. https://doi.org/10.2186/jpr.JPR_D_20_00257.
- [293] S. Stokłosowa, *Hodowla komórek i tkanek*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2011.
- [294] E. Vega-Avila, M.K. Pugsley, An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells, *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 54 (2011) 10–14.
- [295] ASTM International, ASTM E2180-18, Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) In Polymeric or Hydrophobic Materials, 2018.
- [296] E. Gamez, G. Mendoza, S. Salido, M. Arruebo, S. Irusta, Antimicrobial Electrospun Polycaprolactone-Based Wound Dressings : An In Vitro Study About the Importance of the Direct Contact to Elicit Bactericidal Activity, *Adv. Wound Care.* 00 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1089/wound.2018.0893>.
- [297] S. Tomić, R. Rudolf, M. Brunčko, I. Anžel, V. Savić, M. Čolić, Response of monocyte-derived dendritic cells to rapidly solidified nickel-titanium ribbons with shape memory properties, *Eur. Cells Mater.* 23 (2012) 58–80. <https://doi.org/10.22203/eCM.v023a05>.
- [298] A. Shojaei Zoeram, A.A. Akbari mousavi, F. Mohsenifar, Effect of welding speed on mechanical and fracture behavior of nitinol laser-joints, *Weld. World.* 60 (2016) 11–19. <https://doi.org/10.1007/s40194-015-0281-9>.
- [299] H. Chen, L.J. Zheng, F.X. Zhang, H. Zhang, Thermal stability and hardening behavior in superelastic Ni-rich Nitinol alloys with Al addition, *Mater. Sci. Eng. A.* 708 (2017) 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2017.10.016>.
- [300] W. Haider, Enhanced Biocompatibility of NiTi (Nitinol) Via Surface Treatment and Alloying, Florida International University, 2010. <https://doi.org/10.25148/etd.FI10041612>.
- [301] R. Rokicki, T. Hryniewicz, Nitinol surface finishing by magnetoelectropolishing, *Int. J. Surf. Eng. Coatings.* 86 (2008) 280–285. <https://doi.org/10.1179/174591908X345040>.
- [302] Z. Yang, X. Wei, P. Cao, W. Gao, Surface modification of nitinol by chemical and electrochemical etching, *Mod. Phys. Lett. B.* 27 (2013) 1–7. <https://doi.org/10.1142/S0217984913410121>.
- [303] N.I. De Azevedo Lopes, L.Á. De Oliveira Silva, L. De Arruda Santos, V.T.L. Bueno, Surface characterization of NiTi superelastic and shape memory alloys after electrolytic polishing, *Mater. Res.* 20 (2017) 580–587. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2016-0933>.
- [304] Y. Torres, P. Sarria, F.J. Gotor, E. Gutiérrez, E. Peon, A.M. Beltrán, J.E. González, Surface modification of Ti-6Al-4V alloys manufactured by selective laser melting: Microstructural and tribo-mechanical characterization, *Surf. Coatings Technol.* 348 (2018) 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.05.015>.
- [305] C.J. Alberti, E. Saito, F.E. De Freitas, D.A.P. Reis, J.P.B. MacHado, A.G. Dos Reis, Effect of etching temperature on surface properties of Ti6Al4V alloy for use in biomedical applications, *Mater. Res.* 22 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2018-0782>.
- [306] R.Z. Valiev, E. V. Parfenov, L. V. Parfenova, Developing nanostructured metals for manufacturing of medical implants with improved design and biofunctionality, *Mater. Trans.* 60 (2019) 1356–1366. <https://doi.org/10.2320/matertrans.MF201943>.
- [307] K.Y. Hung, Y.C. Lin, H.P. Feng, The effects of acid etching on the nanomorphological surface characteristics and activation energy of titanium medical materials, *Materials (Basel)*. 10 (2017). <https://doi.org/10.3390/ma10101164>.
- [308] D.A. Armitage, T.L. Parker, D.M. Grant, Biocompatibility and hemocompatibility of surface-modified NiTi alloys, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 66 (2003) 129–137. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10549>.
- [309] V. Paredes, E. Salvagni, E. Rodríguez-Castellón, J.M. Manero, Comparative Study of Surface Chemical Composition and Oxide Layer Modification upon Oxygen Plasma Cleaning and Piranha Etching on a Novel Low Elastic Modulus Ti25Nb21Hf Alloy, *Metall. Mater. Trans. A Phys. Metall.*

- Mater. Sci. 48 (2017) 3770–3776. <https://doi.org/10.1007/s11661-017-4144-4>.
- [310] B. Liang, A. Nagarajan, H. Ahmadian, S. Soghrati, Analyzing effects of surface roughness, voids, and particle–matrix interfacial bonding on the failure response of a heterogeneous adhesive, *Comput. Methods Appl. Mech. Eng.* 346 (2019) 410–439. <https://doi.org/10.1016/j.cma.2018.12.010>.
 - [311] S.R. Jang, I.W. Suh, L. Heng, Nanoscale Polishing Technique of Biomedical Grade NiTi Wire by Advanced MAF Process: Relationship between Surface Roughness and Bacterial Adhesion, *J. Funct. Biomater.* 14 (2023). <https://doi.org/10.3390/jfb14040177>.
 - [312] B. Zhao, X. Wen, M. Jiang, J. Wu, F. Lan, J. Wang, D. den Engelsen, G. Li, D. Gao, The application of Al₂TiO₅ at the TiO₂/perovskite interface to decrease carrier losses in solar cells, *J. Mater. Chem. A* 5 (2017) 3691–3698. <https://doi.org/10.1039/c6ta10468a>.
 - [313] L. Wang, T. Xia, L. Sun, Q. Li, H. Zhao, Effect of calcium doping on the electrocatalytic activity of the Bi_{1-x}CaxFeO_{3-δ} oxygen electrode for solid oxide fuel cells, *RSC Adv.* 13 (2023) 2339–2344. <https://doi.org/10.1039/d2ra06750a>.
 - [314] S.A. Shabalovskaya, J. Anderegg, F. Laab, P.A. Thiel, G. Rondelli, Surface Conditions of Nitinol Wires, Tubing, and As-Cast Alloys. The Effect of Chemical Etching, Aging in Boiling Water, and Heat Treatment Keywords: 600-grit polished Nitinol and wire/tubing surface conditions; surface treatment; chemical etching; aging, (2003) 193–203.
 - [315] S. Deville, B. Baré, J. Piella, K. Tirez, P. Hoet, M.P. Monopoli, K.A. Dawson, V.F. Puentes, I. Nelissen, Interaction of gold nanoparticles and nickel(II) sulfate affects dendritic cell maturation, *Nanotoxicology*. 10 (2016) 1395–1403. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1221476>.
 - [316] A. Bhardwaj, A.K. Gupta, S.K. Padisala, K. Poluri, Characterization of mechanical and microstructural properties of constrained groove pressed nitinol shape memory alloy for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C* 102 (2019) 730–742. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.070>.
 - [317] A.R.G. Korpi, S. Rezaee, C. Luna, Țălu, A. Arman, A. Ahmadpourian, Influence of the oxygen partial pressure on the growth and optical properties of RF-sputtered anatase TiO₂ thin films, *Results Phys.* 7 (2017) 3349–3352. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.08.018>.
 - [318] A.A. Valeeva, S.Z. Nazarova, A.A. Rempel, Nanosize effect on phase transformations of titanium oxide Ti₂O₃, *J. Alloys Compd.* 817 (2020) 153215. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.153215>.
 - [319] M. Terlemezoglu, O. Surucu, M. Isik, N.M. Gasanly, M. Parlak, Temperature-dependent optical characteristics of sputtered NiO thin films, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 128 (2022) 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00339-021-05197-y>.
 - [320] S. Pintowantoro, F.P. Waluyo, Y. Setiyorini, V.A. Setyowati, A. Kawigraha, F. Abdul, Study of the Effect of Time Variations on the Leaching Process of Ferronickel Products from Mini Blast Furnace to Yield Elements of Fe, Ni, and Co for NiSO₄·6H₂O Synthesis, *J. Phys. Conf. Ser.* 2117 (2021). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2117/1/012024>.
 - [321] S. Amouzad, M. Khosravi, N. Monadi, B. Haghighi, S.I. Allakhverdiev, M.M. Najafpour, Photo-electrochemistry of metallic titanium / mixed phase titanium oxide, *Int. J. Hydrogen Energy*. 46 (2021) 19433–19445. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.03.106>.
 - [322] M. Angelo, J.S. Marcuzzo, S. Pinheiro, B. Hakuo, K. Lopes, A. Paula, S. De Oliveira, J.T. Matsushima, M.R. Baldan, Study of reflection process for nickel coated activated carbon fiber felt applied with electromagnetic interference shielding, *Integr. Med. Res.* 8 (2019) 4040–4047. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.07.014>.
 - [323] S.A. Shabalovskaya, D. Siegmund, E. Heurich, M. Rettenmayr, Evaluation of wettability and surface energy of native Nitinol surfaces in relation to hemocompatibility, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.018>.
 - [324] M.A. Surovtseva, O. V. Poveschenko, O.S. Kuzmin, I.I. Kim, A.S. Kozhukhov, N.A. Bondarenko, E. V. Chepeleva, A.N. Kolodin, A.P. Lykov, D. V. Shcheglov, V.F. Pichugin, I. Yu. Zhuravleva, Titanium oxide– and oxynitride–coated nitinol: Effects of surface structure and composition on

- interactions with endothelial cells, *Appl. Surf. Sci.* 578 (2022) 152059. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.152059>.
- [325] Y. V. Zhuikova, V.A. Zhuikov, A.A. Zubareva, S.A. Akhmedova, I.K. Sviridova, N.S. Sergeeva, V.P. Varlamov, Physicochemical and biological characteristics of chitosan/k-carrageenan thin layer-by-layer films for surface modification of nitinol, *Micron*. 138 (2020) 102922. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2020.102922>.
- [326] K. Gegenschatz-Schmid, S. Buzzi, J. Grossmann, B. Roschitzki, R. Urbanet, R. Heuberger, D. Glück, A. Zucker, M. Ehrbar, Reduced thrombogenicity of surface-treated Nitinol implants steered by altered protein adsorption, *Acta Biomater.* 137 (2022) 331–345. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.10.022>.
- [327] P. Jabłoński, M. Hebda, P. Pytlak, A. Kyzioł, H. Krawiec, Z. Grzesik, K. Kyzioł, Impact of chitosan/noble metals-based coatings on the plasmochemically activated surface of NiTi alloy, *Mater. Chem. Phys.* 248 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.122931>.
- [328] J. Estrada-martínez, J. Reyes-gasga, R. García-garcía, N. Vargas-becerril, M.G. Zapata-torres, N.V. Gallardo-rivas, A.M. Mendoza-martínez, U. Paramo-garcía, Surface & Coatings Technology Wettability modification of the AISI 304 and 316 stainless steel and glass surfaces by titanium oxide and titanium nitride coating, *Surf. Coat. Technol.* 330 (2017) 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.09.059>.
- [329] R.M. Kore, R.S. Mane, M. Naushad, M.R. Khan, B.J. Lokhande, Nanomorphology-dependent pseudocapacitive properties of NiO electrodes engineered through controlled potentiodynamic electrodeposition process, *RCS Adv.* 6 (2016) 24478–24483. <https://doi.org/10.1039/C5RA26041H>.
- [330] T. Xiang, S. Ding, C. Li, S. Zheng, W. Hu, J. Wang, P. Liu, Effect of current density on wettability and corrosion resistance of superhydrophobic nickel coating deposited on low carbon steel, *Mater. Des.* 114 (2017) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.10.047>.
- [331] D. Quéré, Wetting and roughness, *Annu. Rev. Mater. Res.* 38 (2008) 71–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.38.060407.132434>.
- [332] T. Hu, C. Chu, L. Yin, Y. Pu, Y. Dong, C. Guo, X. Sheng, J.-C. Chung, P.-K. Chu, In vitro biocompatibility of titanium-nickel alloy with titanium oxide film by H₂O₂ oxidation, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*. 17 (2007) 553–557.
- [333] A.S. Guilherme, G.E.P. Henriques, R.A. Zavanelli, M.F. Mesquita, Surface roughness and fatigue performance of commercially pure titanium and Ti-6Al-4V alloy after different polishing protocols, *J. Prosthet. Dent.* 93 (2005) 378–385.
- [334] G. Strnad, N. Chirila, C. Petrovan, O. Russu, Contact Angle Measurement on Medical Implant Titanium Based Biomaterials, *Procedia Technol.* 22 (2016) 946–953. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.01.094>.
- [335] M.R. Alexander, P. Williams, Water contact angle is not a good predictor of biological responses to materials, *Biointerphases*. 12 (2017) 02C201. <https://doi.org/10.1116/1.4989843>.
- [336] M.M. Gentleman, E. Gentleman, The role of surface free energy in osteoblast-biomaterial interactions, *Int. Mater. Rev.* 59 (2014) 417–429. <https://doi.org/10.1179/1743280414Y.0000000038>.
- [337] M. Padial-Molina, P. Galindo-Moreno, J.E. Fernández-Barbero, F.O. Valle, A.B. Jódar-Reyes, J.L. Ortega-Vinuesa, P.J. Ramón-Torregrosa, Acta Biomaterialia Role of wettability and nanoroughness on interactions between osteoblast and modified silicon surfaces, *Acta Biomater.* 7 (2011) 771–778. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.024>.
- [338] E.Y. Nakanishi, J.H. Palacios, S. Godbout, S. Fournel, Interaction between biofilm formation, surface material and cleanability considering different materials used in pig facilities—an overview, *Sustain.* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/su13115836>.
- [339] E. Taşkan, S. Bulak, B. Taşkan, M. Şaşmaz, S. El Abed, A. El Abed, Nitinol as a suitable anode material for electricity generation in microbial fuel cells, *Bioelectrochemistry*. 128 (2019) 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.03.008>.
- [340] V.M. Villapun Puzas, L.N. Carter, C. Schröder, P.E. Colavita, D.A. Hoey, M.A. Webber, O. Addison,

- D.E.T. Shepherd, M.M. Attallah, L.M. Grover, S.C. Cox, Surface Free Energy Dominates the Biological Interactions of Postprocessed Additively Manufactured Ti-6Al-4V, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 8 (2022) 4311–4326. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00298>.
- [341] Y. Dong, H. Zhu, Y. Shen, W. Zhang, L. Zhang, Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio Natriegens*, *PLoS One*. 14 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222322>.
- [342] A. de Campos, A.C. Corrêa, P.I. Cunha Claro, E. de Moraes Teixeira, J.M. Marconcini, Processing, characterization and application of micro and nanocellulose based environmentally friendly polymer composites, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05399-4_1.
- [343] A. Salleh, R. Naomi, N.D. Utami, A.W. Mohammad, E. Mahmoudi, N. Mustafa, M.B. Fauzi, The potential of silver nanoparticles for antiviral and antibacterial applications: A mechanism of action, *Nanomaterials*. 10 (2020) 1–20. <https://doi.org/10.3390/nano10081566>.
- [344] C. Kinnear, T.L. Moore, L. Rodriguez-Lorenzo, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine, *Chem. Rev.* 117 (2017) 11476–11521. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00194>.
- [345] W. Wang, K. Gaus, R.D. Tilley, J.J. Gooding, The impact of nanoparticle shape on cellular internalisation and transport: What do the different analysis methods tell us?, *Mater. Horizons*. 6 (2019) 1538–1547. <https://doi.org/10.1039/c9mh00664h>.
- [346] P. Grisoli, L. De Vita, C. Milanese, A. Taglietti, Y.D. Fernandez, M. Bouzin, L. D’alfonso, L. Sironi, S. Rossi, B. Vigani, P. Sperandeo, A. Polissi, P. Pallavicini, Pva films with mixed silver nanoparticles and gold nanostars for intrinsic and photothermal antibacterial action, *Nanomaterials*. 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/nano11061387>.
- [347] G. Mendoza, A. Regiel-Futyra, V. Andreu, V. Sebastián, A. Kyzioł, G. Stochel, M. Arruebo, Bactericidal Effect of Gold-Chitosan Nanocomposites in Coculture Models of Pathogenic Bacteria and Human Macrophages, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 17693–17701. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b15123>.
- [348] K. Kleszcz, M. Hebda, A. Kyzioł, H. Krawiec, K. Kyzioł, Towards prevention of biofilm formation: Ti6Al7Nb modified with nanocomposite layers of chitosan and Ag/Au nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 557 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149795>.
- [349] A. Regiel-Futyra, M. Kus-Liśkiewicz, V. Sebastian, S. Irusta, M. Arruebo, G. Stochel, A. Kyzioł, Development of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient antibacterial materials, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 1087–1099. <https://doi.org/10.1021/am508094e>.
- [350] S. Zhu, Y. Shen, Y. Yu, X. Bai, Synthesis of antibacterial gold nanoparticles with different particle sizes using chlorogenic acid, *R. Soc. Open Sci.* 7 (2020). <https://doi.org/10.1098/rsos.191141>.
- [351] R. Torres-Mendieta, D. Ventura-Espinosa, S. Sabater, J. Lancis, G. Mínguez-Vega, J.A. Mata, In situ decoration of graphene sheets with gold nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids, *Sci. Rep.* 6 (2016) 30478. <https://doi.org/10.1038/srep30478>.
- [352] V. Amendola, R. Pilot, M. Frascioni, O.M. Maragò, M.A. Iati, Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review, *J. Phys. Condens. Matter*. 29 (2017). <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.
- [353] A. Saj, S. Alketbi, S.M. Ansari, D.H. Anjum, B. Mohammad, H.M. Aldosari, Production of Size-Controlled Gold Nanoclusters for Vapor–Liquid–Solid Method, *Nanomaterials*. 12 (2022) 763. <https://doi.org/10.3390/nano12050763>.
- [354] J. Zhao, A. Mayoral, L. Martínez, M.P. Johansson, F. Djurabekova, Y. Huttel, Core-Satellite Gold Nanoparticle Complexes Grown by Inert Gas-Phase Condensation, *J. Phys. Chem. C*. 124 (2020) 24441–24450. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07346>.
- [355] N.M. Figueiredo, R. Serra, N.K. Manninen, A. Cavaleiro, Production of Au clusters by plasma gas condensation and their incorporation in oxide matrixes by sputtering, *Appl. Surf. Sci.* 440 (2018) 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.01.011>.
- [356] P. Grammatikopoulos, S. Steinhauer, J. Vernieres, V. Singh, M. Sowwan, Nanoparticle design by gas-phase synthesis, *Adv. Phys. X*. 1 (2016) 81–100.

- <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1142829>.
- [357] X. Zhu, G.H. Brink, S. De Graaf, B.J. Kooi, G. Palasantzas, Gas-Phase Synthesis of Tunable-Size Germanium Nanocrystals by Inert Gas Condensation, *Chem. Mater.* 32 (2020) 1627–1635. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b05076>.
 - [358] A. Izadi, R.J. Anthony, A plasma-based gas-phase method for synthesis of gold nanoparticles, *Plasma Process. Polym.* 16 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1002/ppap.201800212>.
 - [359] J. Quinson, K.M.Ø. Jensen, From platinum atoms in molecules to colloidal nanoparticles : A review on reduction , nucleation and growth mechanisms, *Adv. Colloid Interface Sci.* 286 (2021) 102300. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102300>.
 - [360] A. Regiel-Futyra, M. Kus-Liśkiewicz, V. Sebastian, S. Irusta, M. Arruebo, A. Kyzioł, G. Stochel, Development of noncytotoxic silver-chitosan nanocomposites for efficient control of biofilm forming microbes, *RSC Adv.* 7 (2017) 52398–52413. <https://doi.org/10.1039/c7ra08359a>.
 - [361] W. Zhang, B. Xiao, T. Fang, Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity, *Chemosphere.* 191 (2018) 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.016>.
 - [362] N. Durán, M. Durán, M.B. de Jesus, A.B. Seabra, W.J. Fávaro, G. Nakazato, Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12 (2016) 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>.
 - [363] B. Cunningham, A.E. Engstrom, B.J. Harper, S.L. Harper, M.R. Mackiewicz, Silver nanoparticles stable to oxidation and silver ion release show size-dependent toxicity in vivo, *Nanomaterials.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/nano11061516>.
 - [364] L. D’Lima, M. Phadke, V.D. Ashok, Biogenic silver and silver oxide hybrid nanoparticles: A potential antimicrobial against multi drug-resistant: *Pseudomonas aeruginosa*, *New J. Chem.* 44 (2020) 4935–4941. <https://doi.org/10.1039/c9nj04216d>.
 - [365] M.K. Hossain, A.W. Mukhaimer, M. Al-Jabari, Fabrication and characterizations of arbitrary-shaped silver nanoparticles for surface-enhanced fluorescence microscopy, *J. Nanoparticle Res.* 23 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11051-021-05201-9>.
 - [366] V. Sundaresan, J.W. Monaghan, K.A. Willets, Visualizing the Effect of Partial Oxide Formation on Single Silver Nanoparticle Electrodissolution, *J. Phys. Chem. C.* 122 (2018) 3138–3145. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11824>.
 - [367] A.B. Albeladi, S.A. AL-Thabaiti, Z. Khan, Effect of CTAB on the surface resonance plasmon intensity of silver nanoparticles: Stability and oxidative dissolution, *J. Mol. Liq.* 302 (2020) 112565. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112565>.
 - [368] J. Kratochvíl, A. Kuzminova, O. Kylián, H. Biederman, Comparison of magnetron sputtering and gas aggregation nanoparticle source used for fabrication of silver nanoparticle films, *Surf. Coatings Technol.* 275 (2015) 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.05.003>.
 - [369] M.C. Cruz, G. Ruano, M. Wolf, D. Hecker, E. Castro Vidaurre, R. Schmittgens, V.B. Rajal, Plasma deposition of silver nanoparticles on ultrafiltration membranes: Antibacterial and anti-biofouling properties, *Chem. Eng. Res. Des.* 94 (2015) 524–537. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.09.014>.
 - [370] U. Backman, J.K. Jokiniemi, A. Auvinen, K.E.J. Lehtinen, The effect of boundary conditions on gas-phase synthesised silver nanoparticles, *J. Nanoparticle Res.* 4 (2002) 325–335. <https://doi.org/10.1023/A:1021148001483>.
 - [371] V.N. Popok, L. Gurevich, Charge states of size-selected silver nanoparticles produced by magnetron sputtering, *J. Nanoparticle Res.* 21 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4615-1>.
 - [372] M. Gracia-Pinilla, E. Martinez, G.S. Vidaurri, E. Perez-Tijerina, Deposition of Size-Selected Cu Nanoparticles by Inert Gas Condensation, *Nanoscale Res Lett.* 5 (2010) 180–188. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9462-z>.
 - [373] N. Eisenreich, O. Schulz, A. Koleczko, S. Knapp, Comparison of Kinetics, Oxide Crystal Growth and Diffusivities of Nano- and Micrometer-Sized Copper Particles on Oxidation in Air, *Thermochim. Acta.* 654 (2017) 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2017.05.012>.

- [374] M.D. Susman, A. Vaskevich, I. Rubinstein, A General Kinetic-Optical Model for Solid-State Reactions Involving the Nano Kirkendall Effect. the Case of Copper Nanoparticle Oxidation, *J. Phys. Chem. C*. 120 (2016) 16140–16152. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b00137>.
- [375] M.D. Susman, Y. Feldman, T.A. Bendikov, A. Vaskevich, I. Rubinstein, Real-time plasmon spectroscopy study of the solid-state oxidation and Kirkendall void formation in copper nanoparticles, *Nanoscale*. 9 (2017) 12573–12589. <https://doi.org/10.1039/c7nr04256f>.
- [376] M. Raffi, S. Mehrwan, T.M. Bhatti, J.I. Akhter, A. Hameed, W. Yawar, M.M. Ul Hasan, Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*, *Ann. Microbiol.* 60 (2010) 75–80. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0015-6>.
- [377] G.H. Ten Brink, G. Krishnan, B.J. Kooi, G. Palasantzas, Copper nanoparticle formation in a reducing gas environment, *J. Appl. Phys.* 116 (2014) 1–6. <https://doi.org/10.1063/1.4895483>.
- [378] V.P. Zhdanov, Kinetic model of oxidation of metal nanoparticles: Cabrera-Mott and Kirkendall effects, *Surf. Sci.* 684 (2019) 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2018.12.006>.
- [379] B. Hu, Y. Guo, H. Li, X. Liu, Y. Fu, F. Ding, Recent advances in chitosan-based layer-by-layer biomaterials and their biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 271 (2021) 118427. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118427>.
- [380] R. Jayakumar, M. Prabakaran, R.A.A. Muzzarelli, *Chitosan for Biomaterials II*, Springer, 2011.
- [381] G. Wang, Q. Ao, K. Gong, A. Wang, L. Zheng, Y. Gong, X. Zhang, The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells, *Acta Biomater.* 6 (2010) 3630–3639. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.039>.
- [382] L.S. Rhoads, W.T. Silkworth, M.L. Roppolo, M.S. Whittingham, Cytotoxicity of nanostructured vanadium oxide on human cells in vitro, *Toxicol. Vitro*. 24 (2010) 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.08.010>.
- [383] A. Dehghanghadikolaie, B. Fotovvati, Coating techniques for functional enhancement of metal implants for bone replacement: A review, *Materials (Basel)*. 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ma12111795>.
- [384] F. Ordikhani, A. Simchi, Long-term antibiotic delivery by chitosan-based composite coatings with bone regenerative potential, *Appl. Surf. Sci.* 317 (2014) 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.07.197>.
- [385] M.R. Moradi, E. Salahinejad, E. Sharifi, L. Tayebi, Controlled drug delivery from chitosan-coated heparin-loaded nanopores anodically grown on nitinol shape-memory alloy, *Carbohydr. Polym.* 314 (2023) 120961. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120961>.
- [386] K. Yan, F. Xu, W. Wei, C. Yang, D. Wang, X. Shi, Electrochemical synthesis of chitosan / silver nanoparticles multilayer hydrogel coating with pH-dependent controlled release capability and antibacterial property, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 202 (2021) 111711. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111711>.
- [387] E. Proksch, pH in nature, humans and skin, *J. Dermatol.* 45 (2018) 1044–1052. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14489>.
- [388] N. Nontipichet, S. Khumngern, J. Choosang, An enzymatic histamine biosensor based on a screen-printed carbon electrode modified with a chitosan – gold nanoparticles composite cryogel on Prussian blue-coated multi-walled carbon nanotubes, *Food Chem.* 364 (2021).
- [389] O. Andrukhov, R. Huber, B. Shi, S. Berner, X. Rausch-Fan, A. Moritz, N.D. Spencer, A. Schedle, Proliferation, behavior, and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness, *Dent. Mater.* 32 (2016) 1374–1384. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.08.217>.
- [390] P. Jabłoński, A. Kyzioł, D. Pawcenis, B. Pucelik, M. Hebda, M. Migdalska, H. Krawiec, M. Arruebo, K. Kyzioł, Electrostatic self-assembly approach in the deposition of bio-functional chitosan-based layers enriched with caffeic acid on Ti-6Al-7Nb alloys by alternate immersion, *Biomater. Adv.* 136 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212791>.
- [391] W.H. Nosal, D.W. Thompson, L. Yan, S. Sarkar, A. Subramanian, J.A. Woollam, UV – vis – infrared optical and AFM study of spin-cast chitosan films, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 43 (2005) 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.08.022>.

- [392] C. García-Cabezón, V. Godinho, C. Salvo-Comino, Y. Torres, F. Martín-Pedrosa, Improved corrosion behavior and biocompatibility of porous titanium samples coated with bioactive chitosan-based nanocomposites, *Materials* (Basel). 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/ma14216322>.
- [393] J. Hernández-Montelongo, V.F. Nascimento, D. Murillo, T.B. Taketa, P. Sahoo, A.A. De Souza, M.M. Beppu, M.A. Cotta, Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: An antibacterial surface for *Xylella fastidiosa*, *Carbohydr. Polym.* 136 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.076>.
- [394] Y. Takaoka, Y. Akiba, M. Nagasawa, A. Ito, Y. Masui, N. Akiba, K. Eguchi, H. Miyazawa, K. Tabeta, K. Uoshima, The relationship between dental metal allergy, periodontitis, and palmoplantar pustulosis: An observational study, *J. Prosthodont. Res.* 66 (2022) 438–444. https://doi.org/10.2186/jpr.JPR_D_20_00307.
- [395] C.C. Ude, C.J. Esdaille, K.S. Ogueri, H.M. Kan, S.J. Laurencin, L.S. Nair, C.T. Laurencin, The Mechanism of Metallosis After Total Hip Arthroplasty, *Regen. Eng. Transl. Med.* 7 (2021) 247–261. <https://doi.org/10.1007/s40883-021-00222-1>.
- [396] G.M. Raghavendra, J. Jung, J. Seo, Microwave assisted antibacterial chitosan – silver nanocomposite films, *Int. J. Biol. Macromol.* 84 (2016) 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.026>.
- [397] R.E. Galindo, R. Gago, D. Duday, Towards nanometric resolution in multilayer depth profiling : a comparative study of RBS , SIMS , XPS and GDOES, *Anal Bioanal Chem.* 396 (2010) 2725–2740. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3339-y>.
- [398] X. Du, H. Jiang, X. Guo, L. Chen, T. Kang, Synthesis of ferrocene / chitosan-AgNPs films and application in plasmonic color-switching and antimicrobial materials, *React. Funct. Polym.* 169 (2021) 105061. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105061>.
- [399] W. Li, Y. Yang, H. Zhang, Z. Xu, L. Zhao, J. Wang, Y. Qiu, B. Liu, Improvements on biological and antimicrobial properties of titanium modified by AgNPs-loaded chitosan-heparin polyelectrolyte multilayers, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2019). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6250-x>.
- [400] C. Branca, G. D'Angelo, C. Crupi, K. Khouzami, S. Rifici, G. Ruello, U. Wanderlingh, Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films, *Polymer (Guildf).* 99 (2016) 614–622. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.07.086>.
- [401] W.H. Eisa, T. Abdelnaby, S. Mostafa, M.Y. Elzayat, In situ preparation of chitosan/gold nanocomposite: Structural and catalytic properties, *Adv. Polym. Technol.* 37 (2018) 2095–2101. <https://doi.org/10.1002/adv.21867>.
- [402] M.F. Queiroz, K.R.T. Melo, D.A. Sabry, G.L. Sassaki, H.A.O. Rocha, Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 141–158. <https://doi.org/10.3390/md13010141>.
- [403] R.A. Mauricio-Sánchez, R. Salazar, J.G. Luna-Bárcenas, A. Mendoza-Galván, FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning, *Vib. Spectrosc.* 94 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.10.005>.
- [404] M. Potara, E. Jakab, A. Damert, O. Popescu, V. Canpean, S. Astilean, Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*, *Nanotechnology.* 22 (2011). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/13/135101>.
- [405] E. Prokhorov, B.L. España-Sánchez, G. Luna-Bárcenas, F. Padilla-Vaca, M.E. Cruz-Soto, M.O. Vázquez-Lepe, Y. Kovalenko, E.A. Elizalde-Peña, Chitosan/copper nanocomposites: Correlation between electrical and antibacterial properties, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 180 (2019) 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.047>.
- [406] Z.M. Mizwari, A.A. Oladipo, E. Yilmaz, Chitosan/metal oxide nanocomposites: synthesis, characterization, and antibacterial activity, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 70 (2021) 383–391. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1725753>.
- [407] R.S.C.M.D.Q. Antonino, B.R.P.L. Fook, V.A.D.O. Lima, R.Í.D.F. Rached, E.P.N. Lima, R.J.D.S. Lima,

- C.A.P. Covas, M.V.L. Fook, Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone), *Mar. Drugs*. 15 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.3390/md15050141>.
- [408] K. Mardenborough, M. Florentino, R. Haxhari, Y.-C. Lin, M. Rafailovich, G. Halada, H.J. Jung, T. Kim, Influence of NaOH concentration on the decolorization of crystal violet dyed cotton fabric, *Environ. Eng. Res.* 28 (2022) 210643–0. <https://doi.org/10.4491/eer.2021.643>.
- [409] A.M. Youssef, M.S. Abdel-aziz, S.M. El-sayed, Chitosan nanocomposite films based on Ag-NP and Au-NP biosynthesis by *Bacillus Subtilis* as packaging materials, *Int. J. Biol. Macromol.* 69 (2014) 185–191.
- [410] A.M. Youssef, M.S. Abdel-aziz, S.M. El-sayed, Chitosan nanocomposite films based on Ag-NP and Au-NP biosynthesis by *Bacillus Subtilis* as packaging materials, 69 (2014) 185–191.
- [411] P. Senthilkumar, G. Yaswant, S. Kavitha, E. Chandramohan, G. Kowsalya, R. Vijay, B. Sudhagar, D.S.R.S. Kumar, Preparation and characterization of hybrid chitosan-silver nanoparticles (Chi-Ag NPs); A potential antibacterial agent, *Int. J. Biol. Macromol.* 141 (2019) 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.234>.
- [412] S. Hajji, R.B.S. Ben Salem, M. Hamdi, K. Jellouli, W. Ayadi, M. Nasri, S. Boufi, Nanocomposite films based on chitosan–poly(vinyl alcohol) and silver nanoparticles with high antibacterial and antioxidant activities, *Process Saf. Environ. Prot.* 111 (2017) 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.06.018>.
- [413] N.R. Vokhidova, S.S. Rashidova, The influence of synthesis conditions on the film morphology of chitosan-stabilized silver nanoparticles, *Polym. Bull.* 79 (2022) 3419–3436. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03669-y>.
- [414] Z. Hu, J. Zhang, W.L. Chan, Y.S. Szeto, Suspension of silver oxide nanoparticles in chitosan solution and its antibacterial activity in cotton fabrics, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 920 (2006) 33–38. <https://doi.org/10.1557/proc-0920-s02-03>.
- [415] B. Rahmanifar, S. Moradi Dehaghi, Removal of organochlorine pesticides by chitosan loaded with silver oxide nanoparticles from water, *Clean Technol. Environ. Policy.* 16 (2014) 1781–1786. <https://doi.org/10.1007/s10098-013-0692-5>.
- [416] M.S. Usman, N.A. Ibrahim, K. Shameli, N. Zainuddin, W.M.Z.W. Yunus, Copper nanoparticles mediated by chitosan: Synthesis and characterization via chemical methods, *Molecules*. 17 (2012) 14928–14936. <https://doi.org/10.3390/molecules171214928>.
- [417] E.A. Mohamed, Green synthesis of copper & copper oxide nanoparticles using the extract of seedless dates, *Heliyon*. 6 (2020) e03123. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03123>.
- [418] F.S.L. Bobbert, A.A. Zadpoor, Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone, *J. Mater. Chem. B*. 5 (2017) 6175–6192. <https://doi.org/10.1039/c7tb00741h>.
- [419] F. Abushahba, F. Abushahba, J. Tuukkanen, A. Set, I. Miinalainen, L. Hupa, N. To, Effect of bioactive glass air - abrasion on the wettability and osteoblast proliferation on sandblasted and acid - etched titanium surfaces, *Eur. J. Oral Sci.* (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1111/eos.12683>.
- [420] V. Babuska, J. Palan, J.K. Dobra, V. Kulda, M. Duchek, J. Cerny, D. Hrusak, Proliferation of Osteoblasts on Laser-Modified Nanostructured Titanium Surfaces, *Materials (Basel)*. 11 (2018). <https://doi.org/10.3390/ma11101827>.
- [421] G. Agrawal, Y.S. Negi, S. Pradhan, M. Dash, S.K. Samal, Wettability and contact angle of polymeric biomaterials, Elsevier Ltd., 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100737-2.00003-0>.
- [422] T. Chantadee, S. Senarat, C. Chinpaisal, J. Mahadlek, Measurement of Surface Tension/Contact Angle of Saturated Fatty Solution for Developing In Situ Forming Drug Delivery Systems, *Key Eng. Mater.* 914 (2022) 69–74. <https://doi.org/doi.org/10.4028/p-40ah26>.
- [423] K. Terpiłowski, A.E. Wiącek, M. Jurak, Influence of nitrogen plasma treatment on the wettability of polyetheretherketone and deposited chitosan layers, *Adv. Polym. Technol.* 37 (2018) 1557–1569. <https://doi.org/10.1002/adv.21813>.

- [424] A. Acevedo-Fani, L. Salvia-Trujillo, R. Soliva-Fortuny, O. Martín-Belloso, Layer-by-Layer Assembly of Food-Grade Alginate/Chitosan Nanolaminates: Formation and Physicochemical Characterization, *Food Biophys.* 12 (2017) 299–308. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9486-3>.
- [425] L.J.R. Foster, S. Ho, J. Hook, M. Basuki, H. Marçal, Chitosan as a biomaterial: Influence of degree of deacetylation on its physicochemical, material and biological properties, *PLoS One.* 10 (2015) 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135153>.
- [426] K. Wang, Z. Qi, S. Pan, S. Zheng, H. Wang, Y.X. Chang, H. Li, P. Xue, X. Yang, C. Fu, Preparation, characterization and evaluation of a new film based on chitosan, arginine and gold nanoparticle derivatives for wound-healing efficacy, *RSC Adv.* 10 (2020) 20886–20899. <https://doi.org/10.1039/d0ra03704d>.
- [427] J. Yin, Y. Yang, Z. Hu, B. Deng, Attachment of silver nanoparticles (AgNPs) onto thin-film composite (TFC) membranes through covalent bonding to reduce membrane biofouling, *J. Memb. Sci.* 441 (2013) 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.03.060>.
- [428] S.B. Kennedy, N.R. Washburn, C. George, S. Jr, E.J. Amis, Combinatorial screen of the effect of surface energy on fibronectin-mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation, *Biomaterials.* 27 (2006) 3817–3824. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.044>.
- [429] V. Peššková, D. Kubies, H. Hulejova, L. Himmlova, The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation, *J Mater Sci Mater Med.* 18 (2007) 465–473. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-2006-0>.
- [430] A. Mouhoub, S. Er, R. Amine, G. Zainab, E. Alaoui, T. Saad, I. Koraichi, The effect of essential oils mixture on chitosan - based film surface energy and antiadhesion activity against foodborne bacteria, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 39 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03520-8>.
- [431] S. Bhardwaj, N. Kant, B. Yuvraj, S. Negi, Effect of degree of deacetylation of chitosan on its performance as surface application chemical for paper-based packaging, *Cellulose.* 27 (2020) 5337–5352. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03134-5>.
- [432] U. Kamachimudali, T.M. Sridhar, R.A.J. Baldev, Corrosion of bio implants, *Sadhana - Acad. Proc. Eng. Sci.* 28 (2003) 601–637. <https://doi.org/10.1007/BF02706450>.
- [433] N. Eliaz, Corrosion of metallic biomaterials: A review, *Materials (Basel).* 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ma12030407>.
- [434] H.Y. Chen, P.Y. Wang, Special Issue: Biointerface coatings for biomaterials and biomedical applications, *Coatings.* 11 (2021) 9–13. <https://doi.org/10.3390/coatings11040423>.
- [435] S. Hiromoto, Corrosion of metallic biomaterials, 2nd ed., Elsevier Ltd., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102666-3.00004-3>.
- [436] N. Eliaz, E. Gileadi, Physical electrochemistry: fundamentals, techniques and applications, 2019. <https://doi.org/10.5860/choice.49-0279>.
- [437] F. Heidari, M. Razavi, M.E. Bahrololoom, M. Tahriri, M. Rasoulboroujeni, H. Koturi, L. Tayebi, Preparation of natural chitosan from shrimp shell with different deacetylation degree, *Mater. Res. Innov.* 22 (2018) 177–181. <https://doi.org/10.1080/14328917.2016.1271591>.
- [438] Á.F. Szőke, G.S. Szabó, Z. Hórvölgyi, E. Albert, L. Gaina, L.M. Muresan, Eco-friendly indigo carmine-loaded chitosan coatings for improved anti-corrosion protection of zinc substrates, *Carbohydr. Polym.* 215 (2019) 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.077>.
- [439] H.A. Fetouh, A. Hefnawy, A.M. Attia, E. Ali, Facile and low-cost green synthesis of eco-friendly chitosan-silver nanocomposite as novel and promising corrosion inhibitor for mild steel in chilled water circuits, *J. Mol. Liq.* 319 (2020) 114355. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114355>.
- [440] R.A. Ahmed, S.A. Fadel-Allah, N. El-Bagoury, S.M.F.G. El-Rab, Improvement of corrosion resistance and antibacterial effect of NiTi orthopedic materials by chitosan and gold nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 292 (2014) 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.11.150>.
- [441] Y. Liu, Z. Ren, L. Bai, M. Zong, A. Gao, R. Hang, H. Jia, B. Tang, P.K. Chu, Relationship between Ni

- release and cytocompatibility of Ni-Ti-O nanotubes prepared on biomedical NiTi alloy, *Corros. Sci.* 123 (2017) 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2017.05.006>.
- [442] O.S.I. Fayomi, I.G. Akande, O.O. Oluwole, D. Daramola, Effect of water-soluble chitosan on the electrochemical corrosion behaviour of mild steel, *Chem. Data Collect.* 17–18 (2018) 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2018.10.006>.
- [443] R.A. Farghali, A.M. Fekry, R.A. Ahmed, H.K.A. Elhakim, Corrosion resistance of Ti modified by chitosan–gold nanoparticles for orthopedic implantation, *GEF Bull. Biosci.* 1 (2015) 1–6.
- [444] E. Tabesh, H.R. Salimijazi, M. Kharaziha, M. Mahmoudi, M. Hejazi, Development of an in-situ chitosan-copper nanoparticle coating by electrophoretic deposition, Elsevier B.V, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.02.040>.
- [445] M.M. Solomon, H. Gerengi, T. Kaya, S.A. Umoren, Enhanced corrosion inhibition effect of chitosan for St37 in 15% H₂SO₄ environment by silver nanoparticles, *Int. J. Biol. Macromol.* 104 (2017) 638–649. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.072>.
- [446] H.-J. Yen, S. Hsu, C.-L. Tsai, Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes, *Small.* 5 (2009) 1553–1561. <https://doi.org/10.1002/sml.200900126>.
- [447] Al Omar Suliman, D. Ali, S. Alarifi, A.H. Harrath, L. Mansour, S.H. Alwasel, Evaluation of Cytotoxic, Oxidative stress, Proinflammatory and Genotoxic Effect of Silver Nanoparticles in Human Lung Epithelial Cells, *Environmemntal Toxicol.* 30 (2013) 149–160. <https://doi.org/10.1002/tox>.
- [448] P. V. AshaRani, G.L.K. Mun, M.P. Hande, S. Valiyaveetil, Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells, *ACS Nano.* 3 (2009) 279–290. <https://doi.org/10.1021/nn800596w>.
- [449] N. Elahi, M. Kamali, M.H. Baghersad, Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review, *Talanta.* 184 (2018) 537–556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>.
- [450] M.F. Al-Hakkani, Biogenic copper nanoparticles and their applications: A review, *SN Appl. Sci.* 2 (2020) 1–20. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2279-1>.
- [451] K. Balaji, K.M. Gothandam, Cytotoxic effect on cancerous cell lines by biologically synthesized silver nanoparticles, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 59 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150529>.
- [452] M. Sharifiaghdam, E. Shaabani, F. Asghari, R. Faridi-Majidi, Chitosan coated metallic nanoparticles with stability, antioxidant, and antibacterial properties: Potential for wound healing application, *J. Appl. Polym. Sci.* 139 (2022) 1–16. <https://doi.org/10.1002/app.51766>.
- [453] N. Amanlou, M. Parsa, K. Rostamizadeh, S. Sadighian, F. Moghaddam, Enhanced cytotoxic activity of curcumin on cancer cell lines by incorporating into gold/chitosan nanogels, *Mater. Chem. Phys.* 226 (2019) 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.12.089>.
- [454] R. Seyedebrahimi, S. Razavi, J. Varshosaz, Controlled Delivery of Brain Derived Neurotrophic Factor and Gold-Nanoparticles from Chitosan/TPP Nanoparticles for Tissue Engineering Applications, *J. Clust. Sci.* 31 (2020) 99–108. <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01621-9>.
- [455] E.A.K. Nivethaa, S. Dhanavel, V. Narayanan, C.A. Vasu, A. Stephen, An in vitro cytotoxicity study of 5-fluorouracil encapsulated chitosan/gold nanocomposites towards MCF-7 cells, *RSC Adv.* 5 (2015) 1024–1032. <https://doi.org/10.1039/c4ra11615a>.
- [456] R.A. Wuana, L.A. Nnamonu, R. Sha’Ato, H.U. Itodo, Characterization of Formulated Copper Chitosan Nanoparticles for the Controlled Release Studies of Dicamba Dimethylamine Herbicide, *ChemSearch J.* 10 (2019) 74–87. <http://www.ajol.info/index.php/csj>.
- [457] A. Jaggesar, P.K.D.V. Yarlagadda, Modelling the growth of hydrothermally synthesised bactericidal nanostructures, as a function of processing conditions, *Mater. Sci. Eng. C.* 108 (2020) 110434. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110434>.
- [458] B. Kowalska-Krochmal, R. Dudek-Wicher, The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance, *Pathogens.* 10 (2021) 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>.
- [459] M. Mozafari, *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery*, Elsevier, 2020.

- [460] T. Kamal, Y. Anwar, S.B. Khan, M.T.S. Chani, A.M. Asiri, Dye adsorption and bactericidal properties of TiO₂/chitosan coating layer, *Carbohydr. Polym.* 148 (2016) 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.042>.
- [461] X. Dai, S. Li, S. Li, K. Ke, J. Pang, C. Wu, Z. Yan, High antibacterial activity of chitosan films with covalent organic frameworks immobilized silver nanoparticles, *Int. J. Biol. Macromol.* 202 (2022) 407–417. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.174>.
- [462] Y. Li, B. Li, Y. Wu, Y. Zhao, L. Sun, Preparation of carboxymethyl chitosan/copper composites and their antibacterial properties, *Mater. Res. Bull.* 48 (2013) 3411–3419. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.05.010>.
- [463] A.M. Shehabeldine, B.H. Amin, F.A. Hagra, A.A. Ramadan, M.R. Kamel, M.A. Ahmed, K.H. Atia, S.S. Salem, Potential Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Copper Oxide Nanoparticles: Time-Kill Kinetic Essay and Ultrastructure of Pathogenic Bacterial Cells, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 195 (2023) 467–485. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04120-2>.
- [464] I.O. Silva, R. Ladchumananandasivam, H.O. Nascimento, K.O.S. Silva, F.R. Oliveira, P. Souto, H.P. Felgueiras, A. Zille, Multifunctional Chitosan / Gold Nanoparticles Coatings for Biomedical Textiles, *Nanomaterials*. 9 (2019).
- [465] K. Saravanakumar, A. Vijaya, A. Mariadoss, A. Sathiyaseelan, M. Wang, Synthesis and characterization of nano-chitosan capped gold nanoparticles with multifunctional bioactive properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 165 (2020) 747–757. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.177>.
- [466] C.H. Chen, Y.C. Lin, C.F. Mao, W.T. Liao, Green synthesis, size control, and antibacterial activity of silver nanoparticles on chitosan films, *Res. Chem. Intermed.* 45 (2019) 4463–4472. <https://doi.org/10.1007/s11164-019-03842-z>.
- [467] A. Shah, M.A. Yameen, N. Fatima, G. Murtaza, Chemical synthesis of chitosan/silver nanocomposites films loaded with moxifloxacin: Their characterization and potential antibacterial activity, *Int. J. Pharm.* 561 (2019) 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.029>.
- [468] W. Zhang, W. Jiang, Antioxidant and antibacterial chitosan film with tea polyphenols-mediated green synthesis silver nanoparticle via a novel one-pot method, *Int. J. Biol. Macromol.* 155 (2020) 1252–1261. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.093>.
- [469] D. Kadam, B. Momin, S. Palamthodi, S.S. Lele, Physicochemical and functional properties of chitosan-based nano-composite films incorporated with biogenic silver nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 211 (2019) 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.005>.
- [470] A. Zhang, Y. Zhang, G. Pan, J. Xu, H. Yan, Y. Liu, In situ formation of copper nanoparticles in carboxylated chitosan layer : Preparation and characterization of surface modified TFC membrane with protein fouling resistance and long-lasting antibacterial properties, *Sep. Purif. Technol.* 176 (2017) 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.12.006>.
- [471] T. Fahmy, A. Sarhan, Investigation of optical properties and antibacterial activity of chitosan copper nanoparticle composites, *Mater. Technol.* 37 (2022) 2400–2413. <https://doi.org/10.1080/10667857.2022.2038497>.