



INTERNATIONAL CONFERENCE
MEĐUNARODNA KONFERENCIJA

MEETING POINT OF THE SCIENCE AND PRACTICE IN THE FIELDS OF
CORROSION, MATERIALS AND ENVIRONMENTAL PROTECTION

*STECIŠTE NAUKE I PRAKSE U OBLASTIMA KOROZIJE,
ZAŠTITE MATERIJALA I ŽIVOTNE SREDINE*

PROCEEDINGS

KNJIGA RADOVA

Under the auspices of the
MINISTRY OF EDUCATION, SCIENCE AND TECHNOLOGICAL
DEVELOPMENT OF THE REPUBLIC OF SERBIA

Pod pokroviteljstvom
MINISTARSTVO PROSVETE, NAUKE I TEHNOLOŠKOG RAZVOJA
REPUBLIKE SRBIJE

September 13-16, 2021 : : Tara Mountain, Serbia

CIP - Katalogizacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

620.193/.197(082)(0.034.2)

621.793/.795(082)(0.034.2)

667.6(082)(0.034.2)

502/504(082)(0.034.2)

66.017/.018(082)(0.034.2)

INTERNATIONAL Conference YUCORR (22 ; 2021 ; Tara)

Meeting point of the science and practice in the fields of corrosion, materials and environmental protection [Elektronski izvor] : proceedings = Stecište nauke i prakse u oblastima korozije, zaštite materijala i životne sredine : knjiga radova / XXII YuCorr International Conference = XXI YuCorr [Jugoslovenska korozija] Međunarodna konferencija, September 13-16, 2021, Tara Mountain, Serbia = [organized by] Serbian Society of Corrosion and Materials Protection ... [et al.] ; [organizatori Udruženje inženjera Srbije za koroziju i zaštitu materijala ... [et al.] ; [editors, urednici Miomir Pavlović, Miroslav Pavlović, Marijana Pantović Pavlović]. - Beograd : Serbian Society of Corrosion and Materials Protection UJSKOZAM : Udruženje inženjera Srbije za koroziju i zaštitu materijala UJSKOZAM, 2021 (Beograd : Serbian Society of Corrosion and Materials Protection UJSKOZAM : Udruženje inženjera Srbije za koroziju i zaštitu materijala UJSKOZAM). - 1 elektronski optički disk (CD-ROM) ; 12 cm

Sistemska zahteva: Nisu navedeni. - Nasl. sa naslovne strane dokumenta. - Tekst na engl. i srp. jeziku.

- Tiraž 200. - Bibliografija uz većinu radova. - Abstracts.

ISBN 978-86-82343-28-8

a) Премази, антикорозиони -- Зборници б) Превлаке, антикорозионе -- Зборници в)

Антикорозиона заштита -- Зборници г) Животна средина -- Заштита -- Зборници д) Наука о материјалима -- Зборници

COBISS.SR-ID 48091145

XXII YUCORR – International Conference | Međunarodna konferencija

PUBLISHED AND CD BURNED BY | IZDAVAČ I NAREZIVANJE CD

SERBIAN SOCIETY OF CORROSION AND MATERIALS PROTECTION (UISKOZAM)

UDRUŽENJE INŽENJERA SRBIJE ZA KORZIJU I ZAŠTITU MATERIJALA (UISKOZAM),

Kneza Miloša 7a/II, 11000 Beograd, Srbija, tel/fax: +381 11 3230 028, office@sitzam.org.rs; www.sitzam.org.rs

FOR PUBLISHER | ZA IZDAVAČA Prof. dr MIOMIR PAVLOVIĆ, predsednik UISKOZAM

SCIENTIFIC COMMITTEE | NAUČNI ODBOR: Prof. dr M. G. Pavlović, Serbia – President

Prof. dr Đ. Vaštag, Serbia; Dr M. M. Pavlović, Serbia; Prof. dr D. Vuksanović, Montenegro;

Prof. dr D. Čamovska, North Macedonia; Prof. dr M. Antonijević, Serbia; Prof. dr S. Stopić, Germany;

Prof. dr R. Zejnilović, Montenegro; Prof. dr L. Vrsalović, Croatia; Dr N. Nikolić, Serbia;

Dr I. Krastev, Bulgaria; Prof. dr B. Grgur, Serbia; Prof. dr M. Gvozdrenović, Serbia;

Prof. dr S. Hadži Jordanov, North Macedonia; Prof. dr R. Fuchs Godec, Slovenia;

Prof. dr J. Stevanović, Serbia; Dr V. Panić, Serbia; Dr M. Mihailović, Serbia;

Prof. dr V. Marić, Bosnia and Herzegovina; Prof. dr J. Jovičević, Serbia; Prof. dr D. Jevtić, Serbia;

Dr F. Kokalj, Slovenia; Prof. dr A. Kowal, Poland; Prof. dr Prof. dr M. Gligorić, Bosnia and Herzegovina;

Prof. dr M. Tomić, Bosnia and Herzegovina; Prof. Dr B. Arsenović, Bosnia and Herzegovina

ORGANIZING COMMITTEE | ORGANIZACIONI ODBOR: Dr Miroslav Pavlović – president

Dr Nebojša Nikolić – vice president; Dr Marija Mihailović – vice president

Prof. dr Miomir Pavlović; Aleksandar Putnik B.Sc.; Dr Vladimir Panić; Jelena Slepčević, B.Sc.;

Dr Vesna Cvetković; Prof. dr Milica Gvozdrenović; Zagorka Bešić, B.Sc.; Gordana Miljević, B.Sc.;

Miomirka Anđić, B.Sc.; Dr Marija Matić; Marijana Pantović Pavlović, M.Sc.; Dr Dragana Pavlović;

Dr Sanja Stevanović; Lela Mladenović – secretary

EDITORS | UREDNICI: Prof. dr Miomir Pavlović, Dr Miroslav Pavlović, Marijana Pantović Pavlović, M.Sc.

SCIENTIFIC AREA | OBLAST: CORROSION AND MATERIALS PROTECTION | KORROZIJA I ZAŠTITA MATERIJALA

PAGE LAYOUT | KOMPJUTERSKA OBRADA I SLOG: Dr Miroslav Pavlović

CIRCULATION | TIRAŽ: 200 copies | primeraka

PUBLICATION YEAR | GODINA IZDANJA: 2021

ISBN 978-86-82343-28-8

Comparison of bioactivity, cytotoxicity, antimicrobial and corrosive behavior of ceramic coatings with and without polymer on titanium

Upoređivanje bioaktivnosti, citotoksičnosti, antimikrobnih i korozivnih svojstava keramičkih prevlaka sa i bez polimera na titanu

Marijana R. Pantović Pavlović^{1,2}, Miroslav M. Pavlović^{1,2}, Jasmina S. Stevanović^{1,2}, Vladimir V. Panić^{1,2,3}, Nenad L. Ignjatović⁴

¹*Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, Belgrade, Serbia,*

²*Centre of Excellence in Environmental Chemistry and Engineering - ICTM, University of Belgrade, Belgrade, Serbia,*

³*State University of Novi Pazar, Department of Chemical-Technological Sciences, Novi Pazar, Serbia,*

⁴*Institute of Technical Science of the Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia*

**m.pantovic@ihm.bg.ac.rs*

Abstract

Calcium phosphates (CP), amongst which amorphous calcium phosphate (ACP) and hydroxyapatite (HAp), along with Ti and TiO₂ layers, have found vast applications in preventive and regenerative medicine due to their excellent biocompatibility, nontoxic properties and ability to participate in the normal metabolism of organisms. In this paper cytotoxicity of amorphous calcium phosphate (ACP) and chitosan lactate (ChOL) multifunctional and hybrid composite coatings on MRC-5 human lung fibroblast cell line is presented. ACP/TiO₂ and ACP/TiO₂/ChOL are deposited by coatings new in situ anodization/anaphoretic deposition process at constant voltage of 60 V for 180 s at 25 °C. Cytotoxicity tests showed that there was no significant decrease in the survival of healthy MRC-5 cells in the Ti and ACP/TiO₂ composite samples, while there was an increase in the number of viable cells in the ACP/TiO₂/ChOL sample. There is improved cell proliferation, differentiation and cell viability in the later. Sample containing ACP/TiO₂/ChOL coating showed negative cytotoxicity in both DET and MTT tests. Greater recovery of MRC-5 human lung fibroblasts cells was observed compared to the control sample after 48 h of recovery. From these results, it can be concluded that not only the ACP/TiO₂/ChOL multifunctional composite coating is non-cytotoxic, but the presence of ChOL in the coating improves cell proliferation, differentiation and cell viability. Based on the obtained results, it can be concluded that both composite materials used in the studies are non-cytotoxic to the cell lines used, and that 5 wt.% of ChOL has a positive effect on the non-toxicity of the material. Based on presented results in this paper and previous published results of the physicochemical and bioactive properties of the ACP/TiO₂/ChOL composite material, it can be concluded that further development as well as potential preclinical studies would be largely justified.

Key words: cytotoxicity; dye exclusion test; colorimetric test with tetrazolium salts; amorphous calcium phosphate; chitosan oligolactate.

Izvod

Kalcijum fosfati (CP), među kojima su amorfni kalcijum fosfat (ACP) i hidroksiapatit (HAp), zajedno sa slojevima Ti i TiO₂, pronašli su ogromnu primenu u preventivnoj i regenerativnoj medicini zbog svoje odlične biokompatibilnosti, netoksičnih svojstava i sposobnosti da učestvuju u metaboličnim procesima organizama. U ovom radu je prikazana citotoksičnost multifunkcionalnih i

hibridnih kompozitnih prevlaka amorfnog kalcijum fosfata (ACP) i hitozan laktata (ChOL) na ćelijskoj liniji humanih fibroblasta pluća MRC-5. ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlake su taložene novim procesom *in situ* anodizacije/anaforetske depozicije pri konstantnom naponu od 60 V tokom 180 s na 25 ° C. Testovi citotoksičnosti pokazali su da nije bilo značajnog smanjenja preživljavanja zdravih ćelija MRC-5 u kompozitnim uzorcima Ti i ACP/TiO₂, dok je došlo do povećanja broja viabilnih ćelija u uzorku ACP/TiO₂/ChOL. Pokazano je poboljšanje ćelijske proliferacije, diferencijacije i viabilnosti ćelija. Uzorak koji sadrži ACP/TiO₂/ChOL prevlaku pokazao je negativnu citotoksičnost u DET i u MTT testovima. Zabeležen je veći oporavak humanih ćelija fibroblasta pluća MRC-5 u poređenju sa kontrolnim uzorkom posle 48 h oporavka. Iz ovih rezultata može se zaključiti da multifunkcionalna kompozitna prevlaka ACP/TiO₂/ChOL nije samo necitotoksična, već prisustvo ChOL-a u prevlaci poboljšava ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i viabilnost ćelija. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da oba kompozitna materijala koji su korišćeni u studijama nisu citotoksični za korišćene ćelijske linije, te da 5 tež.% ChOL-a ima pozitivan efekat na netoksičnost materijala. Na osnovu prikazanih rezultata u ovom radu i prethodnih objavljenih rezultata fizičko-hemijskih i bioaktivnih svojstava kompozitnog materijala ACP/TiO₂/ChOL, može se zaključiti da bi dalji razvoj, kao i potencijalne pretkliničke studije bili u velikoj meri opravdani.

Ključne reči: citotoksičnost; DET test; MTT test; amorfnu kalcijum fosfat; hitozan oligolaktat.

Uvod

Titan (Ti) kao i legure titana pripadaju biokompatibilnim materijalima. Svi se oni uspešno i široko koriste u medicini budući da ovi materijali imaju povoljnu kombinaciju svojstava kao što su: otpornost na koroziju, specifična čvrstoća, mehanička čvrstoća, biokompatibilnost i hemijska stabilnost [1–9]. Materijali na bazi titana smatraju se bio-inertnim implantabilnim materijalima jer duguju hemijsku i biološku inertnost. Titan i njegove legure spontano formiraju tanke pasivne oksidne filmove, koji se prvenstveno sastoje od TiO₂. Spontani pasivni sloj titanijum -oksida stabilan je u fiziološkom okruženju, pretežno je amorfan i debljine je 2–7 nm [10]. Pasivnost se ogleda u činjenici da se oksidni sloj ponaša kao zaštitna barijera od dalje površinske korozije [11,12]. Međutim, loša osteoprovodnost i osteoinduktivnost čine da titan i njegove legure nisu u potpunosti primenjiva zamena za koštano tkivo [13,14]. Neželjena reakcija tela nakon implantacije takođe može biti uzrokovana prisustvom titana u telu [15]. Iako autohtoni pasivni oksidni film potiskuje koroziju titana i legura titanijuma sa sposobnošću da promoviše biokompatibilnost, glavni nedostatak titanskih površina odnosi se na njihovo kontinuirano habanje, pasivizaciju i repasivizaciju pod mehaničkim naprezanjem u telesnim tečnostima [10]. Ova dva konkurentna procesa mogu dovesti do ugradnje različitih elemenata legure i okolnih rastvora u pasivni film [16,17]. Ovi efekti mogu odigrati ulogu u ortopedskim implantatima jer ponovna pasivizacija na mestu koštane implantacije može dovesti do adsorpcije jona kalcijuma i fosfata u pasivni film.

Uzimajući u obzir ova razmatranja, postoji zahtev za odgovarajućom površinskom modifikacijom titana i njegovih legura koja će dovesti do poboljšane biokompatibilnosti i osteointegracije, uz istovremeno smanjenje stvaranja bakterijskog filma na površini implantata [16,18–22]. Generalno, titanski implantati se tretiraju bioaktivnim materijalima, u većini slučajeva bioaktivnim keramičkim materijalima, kako bi se poboljšala biokompatibilnost implantata i osteointegracija [22–25].

Razvoj kompozitnih prevlaka koji kombinuju različite CP sa biopolimerima dobija sve veće interesovanje. CP prevlake na bazi hitozana predloženi su za inženjering koštanog tkiva [26–29] sa povećanom otpornošću na koroziju.

Ovo istraživanje izveštava o otpornosti na koroziju, bioaktivnosti i antibakterijskim svojstvima kompozitnih prevlaka ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL na titanu dobijenim novom *in situ* metodom anodizacije/anaforetske depozicije za potencijalnu za biomedicinsku primenu.

Eksperimentalni deo

Elektrohemijska impedansna spektroskopija (EIS) je tehnika koja je korišćena za ispitivanje korozione stabilnosti ACP i ACP/ChOL prevlaka na titanu, kao i za ispitivanje korozione stabilnosti čistog titana kao referentnog uzorka. Sva elektrohemijska ispitivanja su rađena u rastvoru SBF na temperaturi od 37 °C. Za izvođenje elektrohemijskih potenciodinamičkih i impedansnih spektroskopskih merenja korišćena je prilagođena elektrohemijska ćelija sa tri elektrode. Radna ćelija je imala mogućnost zadavanja i održavanja željene temperature radnog fluida. Radne elektrode su bile ispitivani uzorci (Ti pločica, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake na Ti), kontra elektroda je bila platinska mrežica, dok je referentna elektroda bila zasićena kalomelova elektroda (ZKE). Ispitivana površina uzoraka je iznosila 1 cm². Svi izmereni i pomenuti potencijali u elektrohemijskim merenjima su iskazani u odnosu na ZKE. Sva elektrohemijska merenja su urađena uporebom Reference 600™ potencioštata/galvanostata/ZRA (Gamry Instruments Inc., Warminster, PA, USA). Podaci o impedansi snimani su na potencijalu otvorenog kruga (OCP) u širokom frekvencijskom opsegu (100 kHz – 10 mHz) koristeći 10 mV efektivnu amplitudu sinusoidnog ulaznog napona. Impedansni spektri su analizirani i fitovani pomoću ZView® softvera [347,348].

Antibakterijska svojstva i antimikrobna aktivnost multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL ispitivana su na Gram-pozitivnan soj patogenih bakterija *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 i Gram-negativan soj *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ATCC 15692, na Mueller Hinton Broth (MHB) tečnoj hranljivoj podlozi metodom utrljavanja. Kolonije bakterijskih sojeva (*P. aeruginosa* PAO1 i *S. aureus*) su temperirane na 37 °C i ostavljene preko noći bez aeracije da bi se dobila prekonocna bakterijska kultura. Izmerena je optička gustina prekonocne kulture upotrebom monohromatske svetlosti talasne dužine 600 nm, a zatim je optička gustina podešena na 0,4 razblaživanjem sa MHB medijumom da bi se dobilo 10⁸ bakterija po ml. Ove prekonocne kulture su dalje razblaživane. Serijska razblaženja uzoraka su mešana sa rastopljenim Luria-Bertani (LB) agarom i sipana u petri šolje, odakle su dalje uzimani alikvoti na početku eksperimenta i uzastopno svakog sata tokom 7 sati inkubacije. Netretirane i nemodifikovane Ti pločice su korišćene kao kontrola (slepa proba). Za utvrđivanje krive rasta merenjem optičke gustine bakterija korišćen je spektrofotometar MRC UV-6300PC Double Beam, Izrael.

Ispitivanja su izvršena na ćelijskoj liniji humani fibroblasti pluća (MRC-5), koje rastu zalepljene za podlogu suda (Costar, 25cm³) u medijumu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) sa 4,5 g/l glukoze i 10 % FCS (fetal calf serum, Sigma). Medijum sadrži antibiotik-antimikotik rastvor (Sigma). Ćelijska linija je održavana pod standardnim uslovima: na temperaturi od 37 °C u atmosferi zasićenoj vlagom sa 5 % CO₂ (Heraeus). Presađivana je dva puta nedeljno a u eksperimentima je korišćena u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja. U eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa 0,1 % tripan plavim. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90 %.

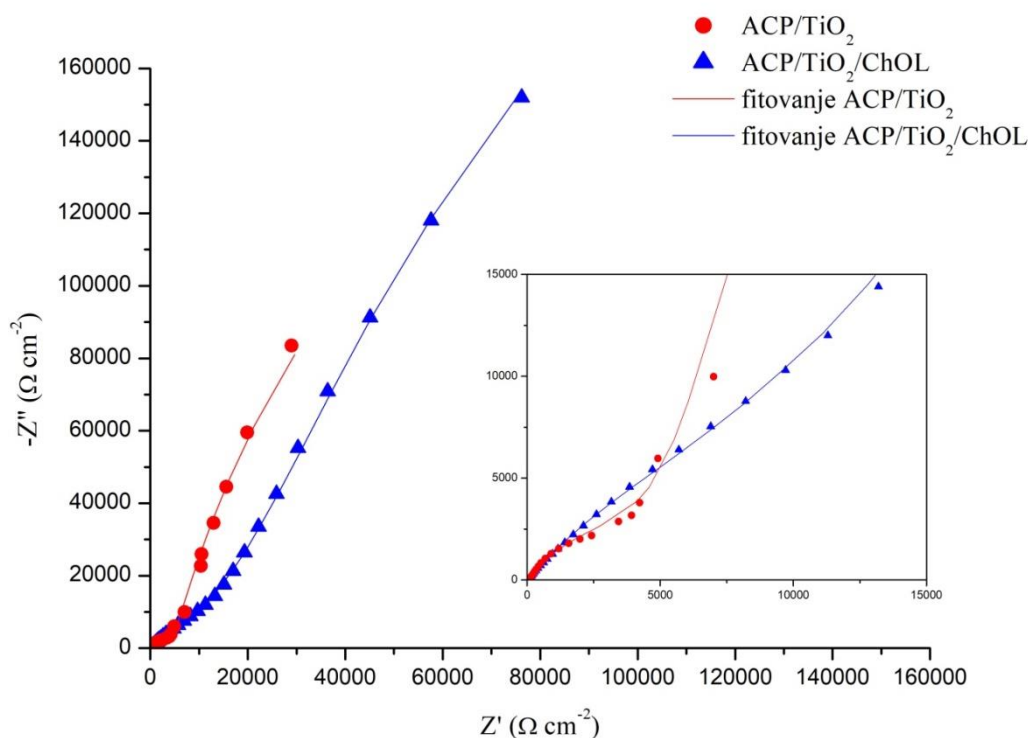
DET (Dye exclusion test) i kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT- test) su korišćeni za ispitivanje preživljavanja ćelija humanih fibroblasta pluća (MRC-5) [353]. MTT test je baziran na 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromidu (MTT) koji metabolišu samo žive ćelije i pri merenju aktivnosti sukcinil dehidrogenaze u mitohondrijama vijabilnih ćelija se može proceniti broj preživelih ćelija.

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0,1 % tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u Petrijeve šolje (Center well, Falcon) na ispitivane uzorke ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka na titanu u koncentraciji 2×10⁵ ml⁻¹. U kontrolnim uzorcima nije bilo supstanci. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, sa 5 % CO₂ narednih 48 h. Po isteku inkubacije, nakon 48 h vrši se brojanje ćelija uz pomoć

invertnog mikroskopa u komoricama za brojanje. Rastvor MTT, pripremljen neposredno pre ispitivanja, dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 10 μl po otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3 h (u termostatu na 37 $^{\circ}\text{C}$, sa 5 % CO_2). Po isteku 3 h u svaki otvor je dodato po 100 μl 0.04 mol/l HCl u izopropanolu. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm.

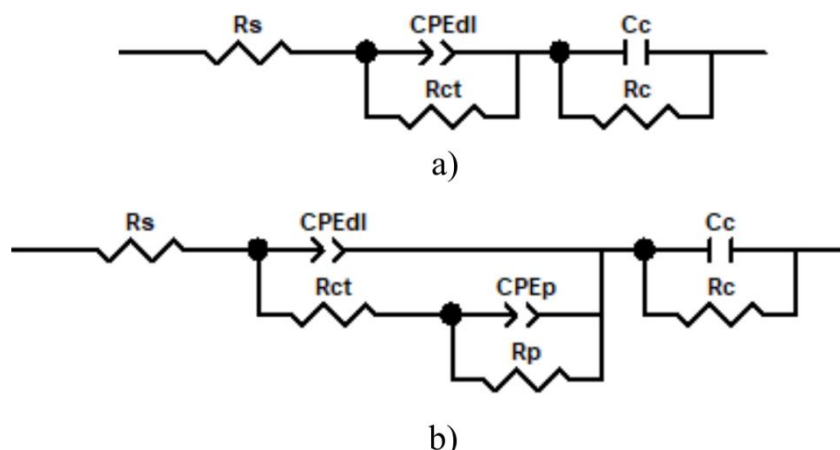
Rezultati i diskusija

Korišćena je PEIS metoda za procenu korozione stabilnosti i korozionog ponašanja ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL kompozita na titanu u rastvoru SBF. Rezultati su prikazani Najkvistovim dijagramom u kompleksnoj na Slici 1. PEIS je sniman na E_{OCP} za oba uzorka.



Slika 1. Najkvistovi dijagrami u kompleksnoj ravni ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka na titanu.

Kod oba uzorka kompozitnih materijala koji imaju multifunkcionalne prevlake javljaju se impedansne petlje velikih prečnika na visokim frekvencijama. Slika 2 prikazuje modele ekvivalentnih električnih kola (EEK) koji su korišćeni za fitovanje podataka sa Slike 1, a dobijeni su na osnovu podataka PEIS merenja. Impedansni spektri su fitovani pomoću EEK koja su bila sastavljena od sledećih elemenata R_s (CPEdlRct) (CPEcRc) za ACP/TiO₂ uzorak (Slika 2a), gde su R_s , R_c , CPEc, Rct i CPEdl otpor rastvora, otpor prevlake, kapacitivnost prevlake, otpor prenosa naelektrisanja koji je direktno povezan sa korozijom i kapacitivnost dvojnog sloja, redom. Za fitovanje PEIS podataka ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne prevlake na Ti korišćen je model R_s (CPEdl Rct (CPEpRp)) (CcRc) prikazan na Slici 2b, gde su Rp i CPEp, difuzioni otpor u porama i kapacitivnost pora, redom.



Slika 2. Ekvivalentna električna kola koja su korišćena za fitovanje PEIS podataka a) ACP/TiO₂ i b) ACP/TiO₂/ChOL višenamenskih kompozitnih obloga.

PEIS podaci su uspešno fitovani pomoću EEK prikazanim na Slici 2. Vrednosti χ^2 svih fitovanih podataka (prikazano punim linijama na Slici 1) su bile manje od 5×10^{-4} kroz 100 iteracija. Za ACP/TiO₂ kompozitnu prevlaku vremenska konstanta na visokim frekvencijama ($R_{ct}CPE_{dl}$) se odnosi na spoljni porozni sloj, dok vremenska konstanta na niskim frekvencijama (R_cCPE_c) odgovara korozionom ponašanju i stabilnosti unutrašnjeg barijernog sloja. Ove tvrdnje se takođe odnose i na ACP/TiO₂/ChOL prevlaku, ali se za ovaj uzorak može uočiti i difuzija SBF rastvora kroz pore, pri čemu je ponašanje prevlake (vremenska konstanta na niskim frekvencijama (R_cC_c)) kao pravog kondenzatora. Element sa konstantnim faznim uglom, CPE, se koristi u EEK umesto kondenzatora, C, kako bi se bolje objasnilo neidealno ponašanje kapacitivnih elementa (heterogenost površine, hrapavost površine, defekati na površini). Generalno, Jednačina 1 se koristi kao definicija CPE impedanse:

$$Z_{CPE} = [Y(j\omega)^n]^{-1} \quad (1)$$

gde je Y frekventno nezavisna realna konstanta CPE, ω je ugaona frekvencija ($\omega = 2\pi f$) u rad s⁻¹, f je frekvencija, n je vrednost CPE eksponenta između -1 (za idealni induktor) i 1 (za idealni kondenzator).

Dobijeni rezultati ispitivanih materijala iz merenja impedansne spektroskopije, a posle fitovanja i upotrebe EEK su prikazani u Tabeli 1.

Očigledna je strukturna sličnost impedansnih spektara oba biomaterijala. Ova sličnost je rezultat činjenice da elektrohemijski odziv biomaterijala zavisi od sličnosti njihovih zaštitnih slojeva na površini. Ipak, moguće je uočiti neke razlike.

Iz dobijenih PEIS rezultata kako za ACP/TiO₂, tako i za ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake, vidi se da ACP/TiO₂/ChOL ima uniformniji unutrašnji pasivni sloj (film), sa pravim kapacitivnim odzivom (n_{dl} je 0,90 za ACP/TiO₂, a ACP/TiO₂/ChOL ima pravo kapacitivno ponašanje). Čini se da je ovaj unutrašnji sloj mnogo definisaniji kod ACP/TiO₂/ChOL nego kod ACP/TiO₂ kompozitnih prevlaka. Dakle, ovaj unutrašnji sloj značajno doprinosi zaštitnoj sposobnosti prevlake u celini. Dvostepena pasivacija i zaštita se mogu videti kod obe prevlake, dok je kod ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake prisustvo širih pora evidentno iz heterogenog karaktera spoljnog sloja (prisustvo CPEp i Rp).

Tabela 1. Rezultati elektrohemijske impedansne spektroskopije za ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake na titanskim supstratima.

Uzorak	ACP/TiO ₂	ACP/TiO ₂ /ChOL
R_s ($\Omega \text{ cm}^2$)	63.85	46.94
R_{ct} ($\Omega \text{ cm}^2$)	5223	16700
Y_{dl} ($\text{s}^n \Omega^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	3.48×10^{-5}	1.86×10^{-5}
n	0.71	0.67
C_{dl} (F cm^{-2})	1.73×10^{-5}	7.15×10^{-6}
R_p ($\Omega \text{ cm}^2$)	-	32691
Y_p ($\text{s}^n \Omega^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	-	2.73×10^{-5}
n	-	0.5
C_p (F cm^{-2})	-	2.44×10^{-5}
R_c ($\Omega \text{ cm}^2$)	9.02×10^5	1.22×10^6
Y_c ($\text{s}^n \Omega^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	1.03×10^{-4}	-
n	0.90	-
C_c (F cm^{-2})	1.62×10^{-4}	9.51×10^{-5}

Na samom početku procesa *in situ* anodizacije/anaforetskog taloženja primarno dolazi do formiranja sloja titan dioksida/ChOL, s obzirom da primenjeno EPD polje više utiče na ChOL usled veće polarnosti ChOL u poređenju sa ACP. Javlja se istovremena anodizacija Ti podloge i taloženje ChOL, a tek potom dolazi do taloženja ChOL/ACP. PEIS rezultati sugerišu da se u spoljnom sloju formiraju pore; ove pore su veće nego u uzorcima ACP/TiO₂, a dolazi i do difuzije SBF kroz pore. Stoga konačna ograničenja difuzije kroz pore određuju ukupnu otpornost na koroziju ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake. Jednom kada su se pojavile pore, prisustvo ChOL u tim porama je evidentno, a PEIS odziv prevlake oslikava njegovu kompaktniju i homogeniju strukturu.

Prema gore pomenutim razmatranjima, čini se da je homogeni pasivni zaštitni doprinos ACP/TiO₂/ChOL prevlake oslikan u onim EEK elementima koji se odnose na unutrašnju površinu prevlake. Komponente povezane sa spoljnom površinom, koja je u direktnom kontaktu sa rastvorom, su uglavnom definisane otpornošću u porama i procesima punjenja/praznjenja dvojnog sloja. Za pretpostaviti je da su procesi korozije lokalizovani u dnu pora (u pukotinama sloja). Ova konstatacija dobija smisao ako se pomnoži otpor prenosa naelektrisanja sa stvarnom raspoloživom površinom za koroziju. Drugim rečima, odnos R_{ct} ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka iznosi 0,32, što znači da je u uzorcima ACP/TiO₂/ChOL na raspolaganju samo 32% površine u odnosu na raspoloživu površinu ACP/TiO₂. Realna pretpostavka je da je raspoloživa površina na dnu brazde dvostruko veća od vidljive površine brazde, pa je površina brazda otprilike jedna trećina veličine cele površine prevlake.

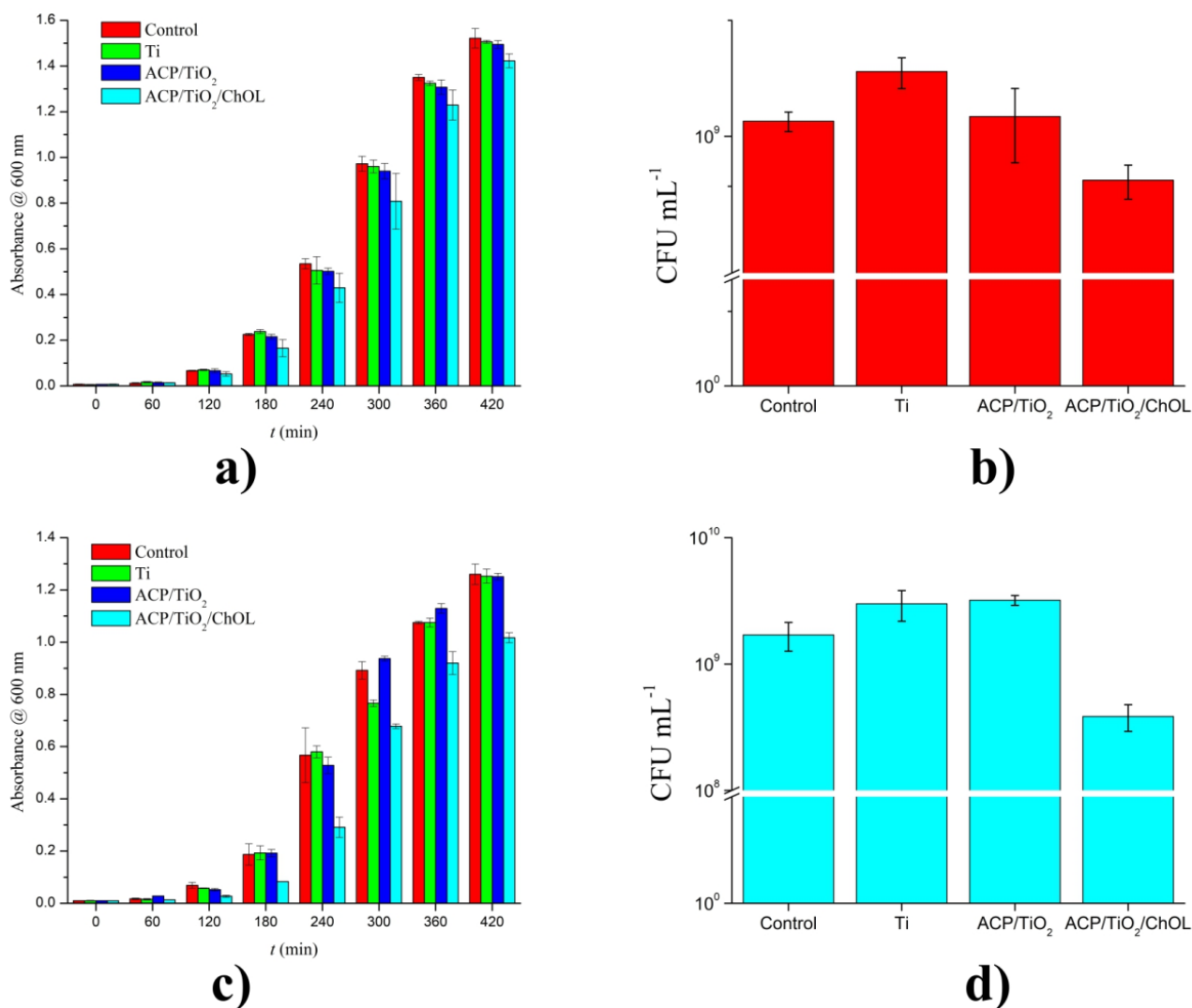
Kao što je već pomenuto, što je veći otpor prevlake, kao i njena kapacitivnost, to je uzorak otporniji na koroziju. Rezultati PEIS merenja se, prema tome, dobro slažu sa rezultatima dobijenim studijama potenciodinamičke polarizacije.

Osnovna hipoteza ovog rada je bila da se dodavanjem ChOL ACP prevlaci dobija kompozitna prevlaka sa povećanom stabilnošću na koroziju i poboljšanim antimikrobnim svojstvima. Da bi se ispitala antimikrobna svojstva, ispitivana je efikasnost anti-biofilma dve bioaktivne multifunkcionalne kompozitne prevlake (ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL) procenom broja živih ćelija (*viable cell count* - VCC) i merenjima gustine bakterijskih kultura. VCC merenja su izvedena na kraju eksperimenta, tj. nakon što je prošlo 420 minuta. Uzimajući u obzir strukturne razlike bakterijskog ćelijskog zida, ispitivane su *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivna bakterija) i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Gram-negativna bakterija) bakterijske kulture nakon 420 minuta. Slike 3a i 3c ilustruju antibakterijsku aktivnost uzoraka čistog titana, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih uzoraka na sojeve *S. aureus* i *P. aeruginosa*, dok Slike 3b i 3d prikazuju rezultate merenja VCC posle 420 minuta za sojeve *S. aureus* i *P. aeruginosa*.

Antibakterijska aktivnost je procenjena odmah nakon inokulacije, što je praćeno alikvotiranjem nakon 60, 120, 180, 240, 300, 360 i 420 minuta inkubacije. Iz rezultata antimikrobne aktivnosti prikazanih na Slici 5.33, može se primetiti da je broj ćelija bio relativno zadržan čak i do 180 minuta nakon inkubacije za sve uzorke kada se upoređi sa početnim brojem ćelija u suspenziji. Ovaj efekat je nešto izraženiji za uzorke testirane na *P. aeruginosa* (Slika 3c). Posle 180 minuta dolazi do eksponencijalnog rasta bakterijskog filma. Uzorci ACP/TiO₂, kao i uzorci čistog cp-Ti pokazali su sličnu anti-biofilmsku aktivnost kao kontrolna grupa za oba soja bakterija. Međutim, kompozitni uzorci koji sadrže hitozan oligosaharid laktat (ACP/TiO₂/ChOL) pokazali su poboljšanu antimikrobnu aktivnost.

Nakon 420 minuta inkubacije ACP/TiO₂/ChOL uzoraka sa *P. aeruginosa* PAO1 i *S. aureus* (Slika 3a i 3c), primećen je pad broja ćelija čak 4 puta za *P. aeruginosa* i 3 puta za *S. aureus* u odnosu na kontrolni uzorak. Vreme generacije (vreme za koje se stvori nova generacija bakterijskog soja) takođe je povećano za oko 15 minuta za *P. aeruginosa* i 9 minuta za *S. aureus*. Rezultati VCC merenja nakon 420 minuta dodatno potvrđuju nadmoć i smanjenje broja bakterija oba soja kod ACP/TiO₂/ChOL kompozitnih uzoraka u poređenju sa ACP/TiO₂ uzorcima i čistog cp-Ti. Primetno je smanjenje broja ćelija *S. aureus* i *P. aeruginosa*, što definitivno pokazuje da se antibakterijski potencijal ChOL javlja čak i sa tako niskom koncentracijom od 5 mas.%.

Hitozan oligosaharid laktat u svojoj strukturi poseduje primarne amino grupe. Pokazalo se da broj ovih amino grupa igra glavnu ulogu u antibakterijskoj aktivnosti. Opštepoznati mehanizam objašnjava da ChOL ima sposobnost da menja osobine propustljivosti mikrobne ćelijske membrane i dalje sprečava ulazak materijala. Ovo smanjenje propustljivosti uzrokuje curenje ćelijskih sastojaka što kao konačan rezultat ima smrt bakterijske ćelije. Autori sugerišu da je mesto delovanja ChOL najverovatnije bakterijski omotač, a ubijanje organizma moglo bi biti uzrokovano poremećajem membrane. Dodatni predloženi mehanizam za antibakterijsku aktivnost ChOL može biti blokada transkripcije RNK adsorpcijom prodrlog molekula ChOL u bakterijsku DNK.



Slika 3. Rezultati antimikrobnih svojstava dobijeni merenjima optičke gustine za: a) *Staphylococcus aureus* i c) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Broj ćelija nakon 420 minuta za: b) *Staphylococcus aureus* i d) *Pseudomonas aeruginosa*.

Generalno, pozitivno naelektrisana priroda molekula ChOL olakšava njihovo vezivanje za bakterijski ćelijski zid i dodatno rezultira inhibicijom rasta bakterijskih ćelija. Ova pojava se javlja usled činjenice da pozitivno naelektrisana amino grupa na položaju C-2 monomera glukozamina deluje u interakciji sa negativno naelektrisanom grupom karboksilne kiseline makromolekula površine bakterijskih ćelija i formira polielektrolitne komplekse. Ovi kompleksi funkcionišu kao nepropusni sloj oko ćelije i potiskuju metaboličku aktivnost bakterija blokirajući prodiranje hranljivih sastojaka kroz ćelijski zid.

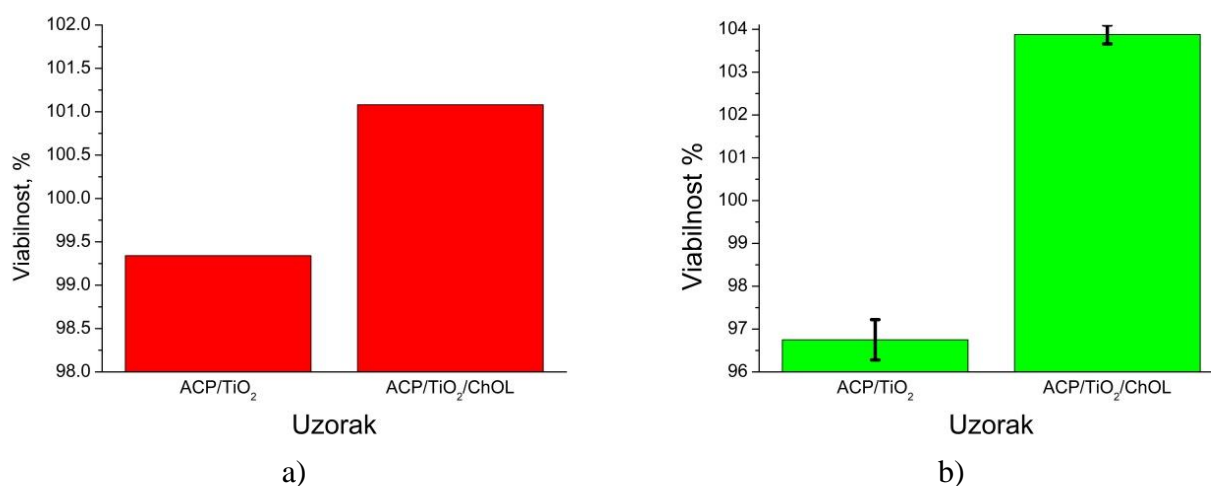
Takođe je otkriveno da rastvorljivi ChOL, koji se koristio u eksperimentima, pokazuje baktericidno delovanje i na gram-pozitivne i na gram-negativne bakterije.

Testovi citotoksičnosti smatraju se primarnim *in vitro* testovima za istraživanje biokompatibilnosti materijala koji se koriste u medicinske svrhe. Pružaju informacije o citotoksičnosti materijala i citotoksičnosti eventualnih otpuštanja jona ili molekula iz materijala na ćelijskoj kulturi. Oni su standardizovani i rezultati se lako mogu uporediti sa potrebnim nivoima sigurnosti. Prema ISO 7405 standardu, oba preporučuju se test direktnog kontakta i kontakt ćelija sa eluatima. Sa testovima direktnog kontakta, *in vivo* uslovi se bolje imitiraju, ali uključuju određeni rizik od mehaničkog oštećenja ćelija i takođe povećavaju rizik od bakterijske kontaminacije ćelijske kulture.

Vijabilnost biomaterijala koji su ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji u cilju moguće primene u biomedicini je eksperimentalno određena kao što je opisano u Eksperimentalnom delu. Uzorci koji su ispitivani na citotoksičnost upotrebom MRC-5 ćelijske linije (fibroblasti pluća) su ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake na titanskom supstratu grade 2 titana dobijene pri naponu od 60V tokom vremena taloženja od 3 minuta na način opisan u Eksperimentalnom delu.

Na Slici 4 su prikazani su rezultati DET i MTT testova vijabilnosti ćelija za ispitivane uzorke. Rezultati su prikazani kao frakcija preživelih ćelija, a ova frakcija se prikazuje i izražava kao procenat od kontrolne vrednosti, odnosno kontrolnog uzorka.

Upoređujući dobijene rezultate DET testa (Slika 4a) sa rezultatima MTT testa (Slika 4b) može se primetiti da su rezultati konzistentni i da nisu u međusobnoj koliziji. Oba testa su pokazala da ne dolazi do značajnog umanjavanja preživljavanja zdravih MRC-5 ćelija kod ACP/TiO₂ kompozitnog uzorka. Prema klasifikaciji, može se uočiti da je ovaj uzorak necitotoksičan za MRC-5 liniju humanih fibroblasta pluća. Vijabilnost za ACP/TiO₂ kompozitni uzorak iznosi $96,75 \pm 0,47$ % kod MTT testa, odnosno $99,34$ % kod DET testa.



Slika 4. a) Rezultati DET testa vijabilnosti izraženi kao procenat od kontrolne vrednosti za ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL uzorke i b) Rezultati MTT testa vijabilnosti nakon 48h + 48h oporavka izraženi kao procenat od kontrolne vrednosti za cp-Ti, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL uzorke

Kod uzorka koji sadrži ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnu kompozitnu prevlaku na titanskom supstratu procentualno dolazi do povećanja broja viabilnih ćelija. Procenat preživljavanja zdravih MRC-5 ćelija na kompozitu koji sadrži hitozan oligosaharid laktat u odnosu na kontrolne uzorke iznosi $101,08$ % kod DET testa, odnosno $103,88 \pm 0,22$ % kod MTT testa. Primećuje se veći oporavak MRC-5 ćelija humanih fibroblasta pluća u odnosu na kontrolni uzorak posle 48h od ubiranja. Iz ovih rezultata se može izvući zaključak da ne samo da ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalna kompozitna prevlaka nije citotoksična, već prisustvo ChOL u prevlaci poboljšava ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i vijabilnost ćelija. Svi eksperimenti citotoksičnosti su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta izvedena u kvadruplikatu, tako da je vijabilnost predstavljena kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su oba kompozitna materijala korišćena u istraživanjima necitotoksični za korišćene ćelijske linije, kao i da 5 mas.% ChOL pozitivno utiče na netoksičnost materijala.

Zaključci

- E_{OCP} merenja ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka na titanskim supstratima su pokazala da su potencijali obe analizirane prevlake plemenitiji od potencijala čistog cp-Ti. Ovaj rezultat ukazuje na bolju površinsku pasivaciju titanskog supstrata. ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalna kompozitna prevlaka je pokazala najnižu vrednost j_{corr} , koja je oko tri puta niža od vrednosti gustine struje korozije za čisti Ti. ACP/TiO₂ kompozitna prevlaka takođe ima vrednost j_{corr} koja je niža od vrednosti čistog titana. Bolja koroziona stabilnost oba uzoraka podrazumeva da je na koroziono ponašanje i trajnost uzoraka u SBF medijumu uticalo stvaranje kako nehomogenih, tako i homogenih oksidnih, zatim keramičkih i na kraju kompozitnih multifunkcionalnih slojeva. Dodavanje ChOL u ACP uz istovremeno formiranje titan dioksida pomaže u formiranju dobro vezanih, ujednačenih, stabilnih prevlaka na Ti površini sa velikom otpornošću na koroziju. Plemenitije vrednosti E_{corr} i niže vrednosti j_{corr} ukazuju na sposobnost ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL kompozita da ostvare visoku otpornost na koroziju u *in vitro* uslovima. ACP/TiO₂/ChOL ima homogeniji unutrašnji pasivni sloj/film, sa dobrom adhezijom na Ti podlogu.
- Utvrđeno je smanjenje broja ćelija četiri puta za *P. aeruginosa* i tri puta za *S. aureus* za prevlaku ACP/TiO₂/ChOL u odnosu na ACP/TiO₂.
- Testovi citotoksičnosti su pokazali da ne dolazi do značajnog umanjavanja preživljavanje zdravih MRC-5 ćelija kod ACP/TiO₂ kompozitnog uzorka, dok procentualno dolazi do povećanja broja viabilnih ćelija kod uzorka koji sadrži ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnu kompozitnu prevlaku na titanskom supstratu, što pokazuje da dolazi do poboljšane ćelijske proliferacije, diferencijacije i viabilnosti ćelija.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansijski potpomognut od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovori br. 451-03-9/2021-14/200026 i br. 451-03-9/2021-14/200175).

Literatura

1. Barjaktarević, D. R.; Djokić, V. R.; Bajat, J. B.; Dimić, I. D.; Cvijović-Alagić, I. L.; Rakin, M. P. The Influence of the Surface Nanostructured Modification on the Corrosion Resistance of the Ultrafine-Grained Ti–13Nb–13Zr Alloy in Artificial Saliva. *Theor. Appl. Fract. Mech.* **2019**, *103*, 102307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tafmec.2019.102307>.
2. Duraccio, D.; Mussano, F.; Faga, M. G. Biomaterials for Dental Implants: Current and Future Trends. *J. Mater. Sci.* **2015**, *50* (14), 4779–4812. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9056-3>.
3. Liu, X.; Chu, P. K.; Ding, C. Surface Modification of Titanium, Titanium Alloys, and Related Materials for Biomedical Applications. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2004**, *47* (3–4), 49–121. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mser.2004.11.001>.
4. Pantović Pavlović, M. R.; Eraković, S. G.; Pavlović, M. M.; Stevanović, J. S.; Panić, V. V.; Ignjatović, N. L. Anaphoretical/Oxidative Approach to the in-Situ Synthesis of Adherent Hydroxyapatite/Titanium Oxide Composite Coatings on Titanium. *Surf. Coatings Technol.* **2019**, *358*, 688–694. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.12.003>.
5. Ahmadi, S.; Sadrezaad, S. K. A Novel Method for Production of Foamy Core@compact Shell Ti6Al4V Bone-like Composite. *J. Alloys Compd.* **2016**, *656*, 416–422. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.09.248>.
6. Long, M.; Rack, H. J. Titanium Alloys in Total Joint Replacement—a Materials Science Perspective. *Biomaterials* **1998**, *19* (18), 1621–1639. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00146-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00146-4).

7. Dezfuli, S. N.; Sadrnezhaad, S. K.; Shokrgozar, M. A.; Bonakdar, S. Fabrication of Biocompatible Titanium Scaffolds Using Space Holder Technique. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23* (10), 2483–2488. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4706-3>.
8. Geetha, M.; Singh, A. K.; Asokamani, R.; Gogia, A. K. Ti Based Biomaterials, the Ultimate Choice for Orthopaedic Implants – A Review. *Prog. Mater. Sci.* **2009**, *54* (3), 397–425. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2008.06.004>.
9. Ahmadi, S.; Mohammadi, I.; Sadrnezhaad, S. K. Hydroxyapatite Based and Anodic Titania Nanotube Biocomposite Coatings: Fabrication, Characterization and Electrochemical Behavior. *Surf. Coatings Technol.* **2016**, *287*, 67–75. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.12.062>.
10. Benea, L.; Danaila, E.; Ponthiaux, P. Effect of Titania Anodic Formation and Hydroxyapatite Electrodeposition on Electrochemical Behaviour of Ti–6Al–4V Alloy under Fretting Conditions for Biomedical Applications. *Corros. Sci.* **2015**, *91*, 262–271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.corsci.2014.11.026>.
11. Chiang, C.-Y.; Chiou, S.-H.; Yang, W.-E.; Hsu, M.-L.; Yung, M.-C.; Tsai, M.-L.; Chen, L.-K.; Huang, H.-H. Formation of TiO₂ Nano-Network on Titanium Surface Increases the Human Cell Growth. *Dent. Mater.* **2009**, *25* (8), 1022–1029. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.03.001>.
12. Pantovic-Pavlovic, M.; Pavlovic, M.; Erakovic, S.; Barudzija, T.; Stevanovic, J.; Ignjatovic, N.; Panic, V. Relationship between the Properties of an Interlayer Formed by in Situ Ti Anodization and Anaphoretically Deposited Hydroxyapatite. *J. Serbian Chem. Soc.* **2019**, *84* (11), 1305–1318. <https://doi.org/10.2298/jsc190730105p>.
13. Han, C.; Wang, Q.; Song, B.; Li, W.; Wei, Q.; Wen, S.; Liu, J.; Shi, Y. Microstructure and Property Evolutions of Titanium/Nano-Hydroxyapatite Composites in-Situ Prepared by Selective Laser Melting. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *71*, 85–94. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.02.021>.
14. Hamada, K.; Kon, M.; Hanawa, T.; Yokoyama, K.; Miyamoto, Y.; Asaoka, K. Hydrothermal Modification of Titanium Surface in Calcium Solutions. *Biomaterials* **2002**, *23* (10), 2265–2272. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00361-1](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00361-1).
15. Osman, R.; Swain, M. A Critical Review of Dental Implant Materials with an Emphasis on Titanium versus Zirconia. *Materials (Basel)*. **2015**, *8* (3), 932.
16. Jäger, M.; Jennissen, H. P.; Dittrich, F.; Fischer, A.; Köhling, H. L. Antimicrobial and Osseointegration Properties of Nanostructured Titanium Orthopaedic Implants. *Materials* . 2017. <https://doi.org/10.3390/ma10111302>.
17. Kulkarni, M.; Mazare, A.; Schmuki, P.; Iglič, A. Biomaterial Surface Modification of Titanium and Titanium Alloys for Medical Applications. *Nanomedicine* **2014**, *111*, 111.
18. Gilabert-Chirivella, E.; Pérez-Feito, R.; Ribeiro, C.; Ribeiro, S.; Correia, D. M.; González-Martín, M. L.; Manero, J. M.; Lanceros-Méndez, S.; Ferrer, G. G.; Gómez-Ribelles, J. L. Chitosan Patterning on Titanium Implants. *Prog. Org. Coatings* **2017**, *111*, 23–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.04.027>.
19. Ferraris, S.; Spriano, S. Antibacterial Titanium Surfaces for Medical Implants. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *61*, 965–978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.062>.
20. Simchi, A.; Tamjid, E.; Pishbin, F.; Boccaccini, A. R. Recent Progress in Inorganic and Composite Coatings with Bactericidal Capability for Orthopaedic Applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2011**, *7* (1), 22–39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.10.005>.
21. Chen, M.; Li, H.; Wang, X.; Qin, G.; Zhang, E. Improvement in Antibacterial Properties and Cytocompatibility of Titanium by Fluorine and Oxygen Dual Plasma-Based Surface Modification. *Appl. Surf. Sci.* **2019**, *463*, 261–274. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.08.194>.
22. Kang, K.; Zakiyuddin, A.; Lee, K. Electrochemical Properties of HA Coated Titanium Dioxide Nanotubes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16* (2), 1708–1710. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11988>.
23. Yilmaz, B.; Evis, Z.; Tezcaner, A.; Banerjee, S. Surface Characterization and Biocompatibility of Selenium-Doped Hydroxyapatite Coating on Titanium Alloy. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2016**, *13* (6), 1059–1068. <https://doi.org/10.1111/ijac.12577>.

24. Pantović Pavlović, M. R.; Pavlović, M. M.; Eraković, S.; Stevanović, J. S.; Panić, V. V.; Ignjatović, N. Simultaneous Anodization/Anaphoretic Electrodeposition Synthesis of Nano Calcium Phosphate/Titanium Oxide Composite Coatings Assisted with Chitosan Oligosaccharide Lactate. *Mater. Lett.* **2020**, *261*, 127121. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127121>.
25. Moore, B.; Asadi, E.; Lewis, G. Deposition Methods for Microstructured and Nanostructured Coatings on Metallic Bone Implants: A Review. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2017**, *2017*, 9. <https://doi.org/10.1155/2017/5812907>.
26. Pang, X.; Casagrande, T.; Zhitomirsky, I. Electrophoretic Deposition of Hydroxyapatite-CaSiO₃-Chitosan Composite Coatings. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *330* (2), 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.10.070>.
27. Sun, F.; Pang, X.; Zhitomirsky, I. Electrophoretic Deposition of Composite Hydroxyapatite-Chitosan-Heparin Coatings. *J. Mater. Process. Technol.* **2009**, *209* (3), 1597–1606. <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2008.04.007>.
28. Pawlik, A.; Rehman, M. A. U.; Nawaz, Q.; Bastan, F. E.; Sulka, G. D.; Boccaccini, A. R. Fabrication and Characterization of Electrophoretically Deposited Chitosan-Hydroxyapatite Composite Coatings on Anodic Titanium Dioxide Layers. *Electrochim. Acta* **2019**, *307*, 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.03.195>.
29. Govindharajulu, J. P.; Chen, X.; Li, Y.; Rodriguez-cabello, J. C. Chitosan-Recombinamer Layer-by-Layer Coatings for Multifunctional Implants. *Int. J. Molecular Sci.* **2017**, *18* (2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms18020369>.