



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA QUALITÀ, PROGRAMMAZIONE E SUPPORTO
STRATEGICO
SETTORE STRATEGIA PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI

Dottorato in Ingegneria dell'Innovazione Tecnologica
Dipartimento di Ingegneria
Chimica Fisica Applicata – SSD ING-IND/23

COATING SU SUBSTRATI METALLICI
PER APPLICAZIONI IN CAMPO ORTOPEDICO

IL DOTTORE

ING. CLAUDIO ZANCA

IL COORDINATORE

PROF. ING. SALVATORE GAGLIO

IL TUTOR

PROF.SSA ROSALINDA INGUANTA

CICLO XXXIV

2022

*Non abbiamo il tempo a disposizione: siamo a disposizione del tempo.
L'unica maniera per guadagnare tempo è crescere.
E l'unica maniera di crescere è nascere sempre nuovi.*

A. D'Avenia

Introduzione

I materiali metallici rappresentano la scelta migliore in campo ortopedico per la fabbricazione di protesi, placche ossee o impianti dentali, poiché le loro proprietà meccaniche sono molto simili a quelle delle ossa umane. Allo stesso tempo si contraddistinguono per una media resistenza alla corrosione e da una bassa osteointegrazione, caratteristiche che inficiano le loro prestazioni. Il corpo umano, infatti, è un ambiente aggressivo nei confronti dei metalli, per la presenza di cloruri, l'elevata concentrazione di ossigeno disciolto nel sangue e per altri fattori che saranno in seguito esplicitati. Inoltre, il rilascio di ioni metallici – quali ferro, cromo, nichel, vanadio e altri – può causare fenomeni infiammatori, con la conseguenza di un aumento della temperatura locale dei tessuti periprotetici che incrementa le cinetiche di dissoluzione elettrochimica.

I *coating* per substrati metallici per applicazioni in campo ortopedico sono al giorno d'oggi oggetto di studio da parte dei ricercatori: costituiscono un ambito di ricerca che si prefigge di contribuire al miglioramento della salute e dello stile di vita dei pazienti. Tra le loro funzioni, annoveriamo innanzitutto quella biomimetica: si tratta di una strategia volta a facilitare il riconoscimento del dispositivo impiantato nel corpo di un paziente da parte del tessuto osseo, il quale non lo riconosce ormai come estraneo. Ciò è possibile mediante l'utilizzo di biomateriali – quali idrossiapatite, *Bioglass*, biopolimeri – che presentano un'elevata biocompatibilità.

I *coating* talora svolgono anche altre funzioni: prevengono l'insorgenza di infezioni batteriche o fenomeni infiammatori (agiscono per tanto da *drug deliver*); promuovono l'adesione cellulare e oppongono un effetto barriera ai fenomeni corrosivi.

Il presente studio è il frutto di un progetto di ricerca svolto durante il periodo di dottorato e riguarda lo studio di *coating* per metalli per applicazioni in campo ortopedico attraverso un procedimento innovativo rispetto ai tradizionali metodi di deposizione. La scelta dell'argomento è conseguente a un interesse e a una curiosità crescenti nell'ambito dell'elettrochimica. Già durante il periodo degli studi magistrali questo ambito si era dimostrato gravido di interesse e ricco di spunti, al punto di stendere un primo lavoro di ricerca, confluito poi nell'elaborato conclusivo della stessa laurea magistrale, riguardante

film sottili per applicazioni fotovoltaiche a base di perovskiti organiche fabbricati per via elettrochimica¹. L'ulteriore frequentazione del laboratorio di Chimica Fisica Applicata del dipartimento di Ingegneria dell'Università degli Studi di Palermo diretto dalla prof.ssa Rosalinda Inguanta ha fatto sì che si intraprendesse un progetto di ricerca nel campo dei *coating*, sulla scia di una serie di precedenti lavori già realizzati nella stessa sede², e che quindi si innesta in un filone già ben rappresentato nel medesimo laboratorio.

Inoltre un interesse del tutto personale verso quell'ambito più specifico dell'elettrochimica che è la corrosione, non faceva altro che contribuire ad indirizzarsi verso questo settore e a porsi risolutamente al lavoro, con l'avallo della docente.

L'esperienza formativa accademica precedente, che aveva condotto all'ottenimento della laurea magistrale, non aveva previsto che il settore dell'ingegneria chimica di processo. Successivamente, la frequentazione del laboratorio suddetto, con la sua tradizione di studi elettrochimici – condotti da studiosi di chiara fama come Carmelo Sunseri e Salvatore Piazza e oggi affidato alla già ricordata direttrice di questo lavoro – ha reso necessario un approfondimento di tipo personale sul variegato universo dei biomateriali. Questa fase è quindi servita da momento di precomprensione dell'argomento, che poi è stato verificato dalla lunga fase sperimentale condotta nei tre anni previsti dal percorso di studi.

Tutto ciò è confluito nel presente lavoro, che risulta articolato in due sezioni. La prima, che consta di quattro capitoli, consegna al lettore gli strumenti necessari ed essenziali per l'iniziale comprensione dell'ambito della *Biomaterial Science* e si articola in una presentazione della disciplina con le sue definizioni e della sua parabola storica, in una sommaria descrizione del tessuto osseo e della fisiologia della rigenerazione ossea, in una descrizione dei principali metalli utilizzati in campo ortopedico e della loro degradazione

¹ C. Zanca, *Fabbricazione e caratterizzazione di thin film di perovskite* (tesi per la laurea magistrale in Ingegneria Chimica, 2018).

² Cfr. G. Blanda, V. Brucato, F. C. Pavia, S. Greco, S. Piazza, C. Sunseri, R. Inguanta (2016). *Galvanic deposition and characterization of brushite/hydroxyapatite coatings on 316L stainless steel* in *Materials Science and Engineering: C*, 64, 93-101. Cfr. G. Blanda, V. Brucato, F. C. Pavia, S. Greco, S. Piazza, C. Sunseri, R. Inguanta (2018). *In Vitro Corrosion and Biocompatibility of Brushite/Hydroxyapatite Coatings Obtained by Galvanic Deposition on 316LSS* in *Journal of The Electrochemical Society*, 165(2), G1. Cfr. Blanda, G., Brucato, V., Carfi, F., Conoscenti, G., La Carrubba, V., Piazza, S., ... & Inguanta, R. (2019). *Chitosan-coating deposition via galvanic coupling* in *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(4), 1715-1724.

all'interno del corpo umano, e infine in una rassegna dei principali materiali e metodi tradizionali di deposizione dei *coating*.

La seconda sezione, composta da sette capitoli, è strutturata in una serie di lavori, non necessariamente conseguenti l'uno all'altro, che hanno come denominatore comune il processo di deposizione galvanica, il vero momento di innovazione della ricerca qui presentata. Si tratta di un metodo elettrochimico nuovo che non richiede l'apporto di energia elettrica dall'esterno tramite un generatore di potenza. Inoltre, la realizzazione del processo, condotto su materiali non particolarmente costosi, non richiede una strumentazione sofisticata e la sua gestione è facilmente controllabile, poiché si basa sul rapporto tra le aree degli elettrodi.

Nei vari capitoli di questa sezione sono stati presi in considerazione tre tipi di substrato metallico: gli acciai AISI 316L, AISI 304L (entrambi a basso tenore di carbonio) e AISI 304. Quest'ultimo in particolare è caratterizzato da un basso costo ma anche da una minore resistenza alla corrosione. La fabbricazione di *coating* a base di idrossiapatite è stato il punto di partenza del progetto di ricerca, dal momento che è ampiamente utilizzata in campo biomedico per la produzione di *scaffold* e *coating*. Lo studio iniziale ha riguardato quindi i metodi di pretrattamento dell'acciaio AISI 316L per la deposizione galvanica di idrossiapatite e l'analisi dei vantaggi da un punto di vista della resistenza alla corrosione.

L'attenzione è stata rivolta non solo al metodo di fabbricazione: ci si è indirizzati sull'utilizzo dei materiali da affiancare all'idrossiapatite, giacché questa – come risulta ampiamente dalla letteratura – è idonea alla realizzazione di *coating* compositi. Ovviamente la scelta si è concentrata sull'utilizzo di materiali biocompatibili di natura sintetica (*Bioglass*, polivinilacetato, nanoparticelle di argento) ma anche di origine naturale, come chitosano e collagene. L'interazione sinergica tra questi biomateriali è stata investigata proprio al fine di far convergere le loro potenzialità e migliorare le prestazioni dei *coating* compositi in termini sia di biocompatibilità sia di resistenza alla corrosione.

Le caratterizzazioni chimico-fisiche, elettrochimiche e biologiche sono state strumento fondamentale di indagine per analizzare, comprendere e in alcuni casi migliorare le prestazioni dei *coating*. In base a quanto emergerà da questo lavoro, la deposizione galvanica è un processo riproducibile, scalabile e anche *low cost*, grazie al quale è possibile realizzare *coating* in ambito ortopedico.

La ricerca ha beneficiato di un significativo approfondimento grazie alla collaborazione con il laboratorio di *Tissue Engineering* diretto dai proff. Vincenzo La Carrubba e Valerio Brucato, presso il quale sono stati condotti test di citotossicità dal prof. Francesco Carfi Pavia e dalla collega Elisa Capuana e altre caratterizzazioni chimico-fisiche da parte del dott. Francesco Lopresti. Tutto ciò ha assicurato una proficua e al contempo necessaria interdisciplinarietà al nostro lavoro, come è richiesto dalla natura della *Biomaterial Science*.

Ma tutto ciò non sarebbe stato possibile senza un continuo confronto con il tutor prof.ssa Rosalinda Inguanta: la sua attenzione e il suo interesse sempre crescenti nei confronti della nostra modesta ricerca sono stati per noi un punto di riferimento imprescindibile e uno sprone ad approfondire sempre meglio un ambito senza dubbio stimolante e aperto a nuove sfide.

Sezione I – *Status Quæstionis*

Capitolo 1 – *Biomaterial Science*: cenni storici e caratteri generali

La *Biomaterial Science* è la disciplina che indaga le proprietà e il comportamento dei materiali da un punto di vista chimico fisico e biologico e ne studia l'interazione con l'ambiente circostante quando sono impiantati all'interno del corpo umano. Nata negli anni Sessanta del secolo scorso, può essere considerata una scienza abbastanza recente rispetto a tutte le altre. Più propriamente, questa disciplina abbraccia non solo le scienze di base come la chimica, la fisica e la biologia, ma anche la medicina e l'ingegneria. Il suo *basic concept* è quindi multidisciplinare. Infatti,

«Convergence is already emerging. For example, the tissue-engineering field combines advances in developmental biology with engineering and materials methods to replace or improve tissue, organs, and other biological functions. This is not a typical interdisciplinary situation where a cell type can be given over to an engineer or an engineer can guess what kind of scaffold will work in a biological system. Rather, there must be multidisciplinary collaboration from the start, with all participants having common reference points and language. This field simply would not exist without the convergence approach»³.

1.1 Cenni storici

Circa settanta anni fa il termine “biomateriale”, come lo intendiamo noi oggi, non era ancora entrato nel linguaggio quotidiano. Non vi erano dispositivi di questo genere, fatta eccezione per quelli di osteosintesi, protesi oculari (il cosiddetto “occhio di vetro”) e dentiere. Non erano ancora state varate legislazioni che regolamentassero o standardizzassero le procedure riguardo i biomateriali e le loro applicazioni e naturalmente non era previsto alcun tipo di corso accademico al riguardo. In altre parole, questa disciplina non godeva di particolare attenzione.

Come si approfondirà trattando della sua definizione, un biomateriale è una sostanza – di origine naturale o artificiale – che può essere introdotta all'interno dell'organismo per trattare, migliorare o sostituire un qualunque tessuto, organo o funzione del

³ Sharp, P. A., & Langer, R. (2011). *Promoting convergence in biomedical science* in *Science*, 333(6042), 527-527.

corpo umano. L'uso di biomateriali *ante litteram* era già stato largamente messo a punto in diversi campi, dal momento che fin dall'antichità venivano utilizzati materiali artificiali per riparare fratture o intervenire su tessuti e organi affetti da patologie⁴. Gli Egizi, ad esempio, installavano protesi lignee direttamente all'interno del corpo del paziente, utilizzando fili di lino per i punti di sutura. Verso il 630 a.C., per far fronte alla mancanza di denti, era uso comune tra l'aristocrazia etrusca utilizzare dispositivi ortodontici; infatti, i metallurghi dell'Italia centrale avevano sviluppato tecnologie per la produzione di ponti dentali in oro⁵. Anche Aulo Cornelio Celso (25 a.C. – 45 d.C.), medico romano che per primo ha descritto nel *De Medicina* i trattamenti per la cura dei disturbi e patologie dentali⁶, riporta la notizia dell'utilizzo di fili d'oro in campo ortodontico:

«[...] Dens autem scaber, qua parte niger, radendus inlinendusque rosæ flore contrito, cui gallæ quarta pars et altera murræ sit adiecta; continendumque ore crebro uinum meracum; atque in eo casu uelandum caput, ambulatione multa, frictione capitis, cibo non acri utendum. At si ex ictu uel alio casu aliquid labant dentes, auro cum is, qui bene hærent, uinciendi sunt»⁷.

De Medicina, 7, XII

Le prime testimonianze circa i materiali da utilizzare per le suture, invece, sono più tarde e provengono ancora una volta dall'area greco-romana. Galeno di Pergamo, medico vissuto durante il II secolo d.C., operò durante la sua vita nella scuola dei gladiatori acquisendo una vasta conoscenza nel campo della chirurgia e della cura delle ferite. Fu il primo a descrivere nei suoi trattati alcuni metodi di emostasi di vasi sanguiferi che

⁴ Per approfondimenti, cfr. H. F. Hildebrand (2013). *Biomaterials—a history of 7000 years in BioNanoMaterials*, 14(3-4), 119-133.

⁵ Cfr. M. J. Becker (2003). *Etruscan gold dental appliances in Molecular and Structural Archaeology: Cosmetic and Therapeutic Chemicals* (pp. 11-27). Springer, Dordrecht.

⁶ Cfr. S. Minozzi, G. Fornaciari S. Musco, P. Catalano (2007). *A gold dental prosthesis of Roman Imperial Age*. In *The American journal of medicine*, 120(5), e1-e2.

⁷ Aulus Cornelius Celsus, *De medicina*, VII,12; in <http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.02.0141%3Abook%3D7%3Achapter%3D12>.

Si riporta di seguito una traduzione nostra: «Ma un dente ruvido va raschiato nella parte che ha del nero e spalmato di petali di rosa schiacciati a cui è stata aggiunta una quarta parte di galle di bue e la stessa quantità di mirra; e ad intervalli frequenti si tenga in bocca il vino non diluito; e in questo caso la testa deve essere fasciata, e il paziente dovrebbe avere molto esercizio di deambulazione, massaggio della testa e cibo che non sia troppo amaro. Ma se i denti si allentano a causa di un colpo o di qualsiasi altro incidente, devono essere legati con filo d'oro a denti saldamente fissati».

prevedevano l'utilizzo di fili d'oro o di altri materiali⁸. Infatti, nel suo trattato nel suo trattato Θεραπευτικὴ μέθοδος (*De Methodo Medendi*) si legge:

«εἰ δ' ἐν τῷ γυμνοῦν φαίνοιτό | σοι μέγα τὸ ἀγγεῖον ἢ μεγάλως σφύζοι, ἀσφαλέστερον αὐτῷ βρόχον περιβάλλοντα πρότερον, οὕτως ἐκκόπτειν τὸ μεταξύ. γιγνέσθωσαν δ' οἱ τοιοῦτοι τῶν βρόχων ἐξ ὕλης δυσσήπτου· τοιαύτη δ' ἐστὶν ἐν Ρώμῃ μὲν ἢ τῶν Γαῖτανῶν ὀνομαζομένων, ἐκ μὲν τῆς τῶν Κελτῶν χώρας κομιζομένων, πιπρασκομένων δὲ μάλιστα κατὰ τὴν Ἱερὰν Ὀδόν, ἣτις ἐκ τοῦ τῆς Ρώμης ἱεροῦ κατάγει πρὸς τὰς ἀγοράς. τούτων μὲν οὖν ἐν Ρώμῃ ῥᾶστον εὐπορῆσαι· καὶ γὰρ εὐωνότατα πιπράσκειται. κατ' ἄλλην δὲ πόλιν ἰατρεῦντί σοι παρασκευάσθω τῶν νημάτων τι τῶν σηρικῶν ὀνομαζομένων»⁹.

De Methodo Medendi, XIII, 941-942

Un'altra testimonianza, stavolta di tipo archeologico, proviene da Chantambre (Essone, Francia): in una necropoli gallo-romana è stato rinvenuto un impianto dentale in ferro battuto ben visibile e osteointegrato all'interno di un cranio di un uomo all'incirca trentenne vissuto intorno al 200 d.C.¹⁰.

Questi pochi esempi bastano a dimostrare come l'uomo abbia avuto sempre la tendenza a migliorare la salute e la qualità della vita dei singoli individui con il ricorso a soluzioni, che comunque risultavano ancora primitive e rudimentali.

Nei secoli successivi non si registrano significativi progressi nel campo dei biomateriali. In ogni caso, esulano dalla nostra trattazione, non essendo questa la sede di una loro approfondita storia¹¹. Ci interessa invece pervenire al XX secolo, quando lo sviluppo di nuovi materiali (metallici, ceramici e soprattutto polimerici) fu essenzialmente volto a

⁸ Cfr. A. Hossain, S. Roy, P.S. Guin (2017). *The importance of advance biomaterials in modern technology: a review* in Asian Journal of Research in Chemistry, 10(4), 441-453. Cfr. T.M. Muffly, A. P. Tizzano, M. D. Walters (2011). *The history and evolution of sutures in pelvic surgery* in Journal of the royal society of medicine, 104(3), 107-112. Cfr. L. H. Toledo-Pereyra (1973). *Galen's contribution to surgery* in Journal of the history of medicine and allied sciences, 28(4), 357-375. Cfr. A. Goel (2015). *Surgical Sutures-A Review* in The Official Scientific Journal of Delhi Ophthalmological Society, 26(3), 159-162.

⁹ C. G. Kühn (1821). *Claudii Galeni opera omnia*, XIII, pp.941-942. Leipzig: Knobloch, 1833. Si riporta di seguito una traduzione nostra: «Se quando è scoperta la vena ti sembra grande o pulsa forte, è più sicuro per essa circondarla dapprima con un filo (laccio), in modo che si arresti il flusso nel mezzo (la gran parte del flusso, ndr). Tali tipi di fili siano fatti di materiale non facilmente deperibile. A Roma si chiama gallico, poiché proviene dalla terra dei Celti, ed è venduto soprattutto lungo la Via Sacra, che dal Campidoglio scende fino al Foro. Dunque Roma ne è facilmente provvista: infatti li si vendono a prezzi stracciati. Per te che sei medico in un'altra città, rifornisciti di fili di seta.»; Cfr. G. H. R. Horsley (Ed.). (2011). *Galen Method of Medicine* (Vol. 517). Harvard University Press. p.420.

¹⁰ Cfr. E. Crubzy, P. Murail, L. Girard, J. P. Bernadou (1998). *False teeth of the Roman world* in Nature, 391(6662), 29-29.

¹¹ Per uno sguardo d'insieme circa fonti storiche sull'uso dei biomateriali, si rimanda alla lettura di: E. Marin, F. Boschetto, G. Pezzotti (2020). *Biomaterials and biocompatibility: An historical overview* in Journal of Biomedical Materials Research Part A, 108(8), 1617-1633.

garantire maggiore aspettativa e qualità della vita allo sterminato numero di persone coinvolto, nel corso del “secolo breve”, in vari eventi bellici.

Durante il Novecento, infatti, è stata presa in considerazione la possibilità di impiegare biomateriali nel campo medico. Un esempio che annoveriamo è il caso di Harold Ridley (1906-2001), un ottico britannico che inventò le prime lenti intraoculari polimeriche per i pazienti affetti da cataratta. Subito dopo la seconda guerra mondiale, egli ebbe la possibilità di visitare parecchi militari dell’aeronautica britannica che vi avevano preso parte. Sebbene fossero passati diversi anni dagli avvenimenti, all’interno dei loro occhi erano presenti dei piccoli frammenti di plexiglas provenienti dai cupolini degli aerei militari, probabilmente finiti lì durante gli attacchi in volo¹². L’ottico britannico notò con grande stupore come questi frammenti non avessero avuto alcun tipo di reazione avversa sugli occhi degli aviatori e ne dedusse che l’occhio presumibilmente fosse un buon *host* per questo tipo di “biomateriale”. Fino ad allora, il paradigma medico-scientifico comune faceva leva sul concetto che il corpo umano non fosse idoneo ad ospitare oggetti estranei al suo interno, a maggior ragione all’interno dell’occhio. Ridley pertanto cominciò a maturare il concetto che oggi noi definiamo di *biocompatibilità*, aprendo così la strada per la realizzazione e la diffusione delle prime protesi intraoculari in polimetilmetacrilato.

Grazie allo sviluppo tecnologico, oggi interventi chirurgici del genere sono diventati una vera e propria *routine*. Eppure, quando nel 1951 all’*Oxford Congress* egli presentò il suo primo paziente, la notizia tuonò fortemente in tutto il mondo, suscitando non poche critiche da parte della comunità scientifica¹³:

- *Dr. Ridley, Why don't you... GO HOME! (Philadelphia).*
- *Would you have one of THESE THINGS put in your son's eye? (Oxford).*
- *As long as I remain in charge of this department no implant will ever be done (European Professor of Ophthalmology).*
- *This operation should never be done (Chicago).*
- *It offends the first principle of ophthalmic surgery and could cause malignant disease (USA).*

¹² Cfr. W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, M. J. Yaszemski (Eds.). (2020). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* in Academic Press.

¹³ R. H. Trivedi, D. J. Apple, S. K. Pandey, L. Werner, A. M. Izak, A. R. Vasavada, J. Ram (2003). *Sir Nicholas Harold Ridley. He changed the world, so that we might better see it* in *Indian journal of ophthalmology*, 51(3), 211-216.

Il suo pioneristico contributo¹⁴ influenzò non solo il campo dell'oftalmologia ma anche della medicina generale, favorendo la nascita di una disciplina che va sotto il nome di *ingegneria biomedica*¹⁵. Questa è una delle tante testimonianze di un ampio contesto storico nel quale figure come medici, biologi e ingegneri cominciarono sinergicamente ad interagire, progettare e commercializzare dispositivi biomedicali.

1.2 Biomateriale e biocompatibilità: un binomio inscindibile

Se finora abbiamo dato una definizione di *Biomaterial Science* e descritto ad ampie linee la sua parabola storica, non altrettanto semplice è definire il concetto di biomateriale, dato che nel tempo ha avuto una continua metamorfosi. È stato definito¹⁶:

- Sostanza *inerte*

*A biomaterial is a systematically, pharmacologically inert substance designed for implantation within or incorporation with a living system*¹⁷.

- Sostanza sia *inerte* che *attiva*

*A substance (other than a drug) or combination of substances, synthetic or natural in origin, which can be used for any period of time, as a whole or as a part of a system which treats, augments, or replaces any tissue, organ, or function of the body*¹⁸.

- Sostanza *non vitale*¹⁹

¹⁴ Sir Harold Ridley ebbe importanti riconoscimenti, seppur negli ultimi quindi anni della sua vita, per il lavoro svolto che si conclusero con il conferimento della carica di cavaliere nel febbraio del 2000 dalla Regina Elisabetta II.

¹⁵ Cfr. D. J. Apple, R. H. Trivedi (2002). *Sir Nicholas Harold Ridley, Kt, MD, FRCS, FRS: contributions in addition to the intraocular lens* in *Archives of Ophthalmology*, 120(9), 1198-1202.

¹⁶ Cfr. E. Marin (2020). *Biomaterials and biocompatibility: An historical...*

¹⁷ *The 6th Annual International Biomaterial Symposium, Clemson, South Carolina (US), 1974*

¹⁸ *National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on the Clinical Applications of Biomaterials, Bethesda, Maryland (US), 1984*

¹⁹ La “non vitalità” (in inglese *non-viability*) è intesa come un materiale che in linea di principio non dovrebbe essere composto da “tessuti viventi” quando è installato all’interno del corpo umano.

*A biomaterial is a non-viable material used in a medical device, intended to interact with biological systems*²⁰.

- Sostanza utile a migliorare la qualità della vita

*Any substance or combination of substances, other than drugs, synthetic or natural in origin, which can be used for any period of time, which augments or replaces partially or totally any tissue, organ or function of the body, in order to maintain or improve the quality of life of the individual*²¹.

Dunque, come è possibile constatare, il concetto di biomateriale si è evoluto nel tempo, non solo perché la conoscenza riguardo l'interazione biomateriale-corpo umano si è approfondita nel corso dei decenni, ma anche perché è maturata la necessità di dare una definizione man mano sempre più inclusiva e generale. Pertanto, una recente definizione di biomateriale – a nostro avviso la più esaustiva – recita così:

*A material designed to take a form that can direct, through interactions with living systems, the course of any therapeutic or diagnostic procedure*²².

È chiaro che un biomateriale racchiude in sé un senso più profondo di una semplice definizione formale. Infatti, se un materiale non risultasse *biocompatibile*, esulerebbe da qualsiasi definizione attribuibile al termine stesso di biomateriale. Per questo motivo, di pari passo con la precisazione della definizione di quest'ultimo, i ricercatori degli ultimi decenni hanno sempre più preso in considerazione e affiancato l'aspetto della biocompatibilità sottolineandone l'importanza, anzi il ruolo centrale sul quale far leva per determinare con maggior chiarezza il termine "biomateriale". Ovviamente, la biocompatibilità che un materiale possiede non è attribuibile ad un unico effetto o fenomeno fisico che si genera dal contatto con il corpo umano. Si riferisce piuttosto ad una serie di processi interdipendenti riguardanti materiali e tessuti in cui sono coinvolti diversi meccanismi. Per meglio dire, con il termine di biocompatibilità ci si riferisce propriamente alla capacità di un materiale di svolgere una funzione specifica, in modo tale che non possa causare effetti indesiderati non solo a livello locale ma anche a livello sistemico, e che allo stesso

²⁰ Prof. D.F. Williams, *European Society for Biomaterials*, Chester, UK, 1986. Professore della *Wake Forest Institute for Regenerative Medicine (WFIRM)*, un istituto di ricerca affiliato al *Wake Forest School of Medicine* sita in *Winston-Salem, Nord Carolina (USA)*.

²¹ *Biomaterial Consensus Conference*, Chester, UK, 1991

²² Cfr. L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreez, S. Ramakrishna, D. Williams (2019). *Key terminology in biomaterials and biocompatibility* in *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10, 45-50.

tempo possa garantire una risposta cellulare o tissutale più adeguata nel ricevente o nel beneficiario della terapia²³.

1.2.1 Classificazione dei biomateriali

Vi sono due principali classificazioni per i biomateriali. La prima riguarda la loro struttura chimica e di conseguenza essi si possono dividere in:

- **Metalli:** sono materiali caratterizzati da eccellenti proprietà meccaniche, buona duttilità e resistenza all'usura e dunque in grado di sopportare carichi e sforzi sia statici che a fatica. Da un punto di vista biomedico, svolgono molto spesso la funzione di supporto. Purtroppo hanno scarsa biodegradabilità e bassa resistenza alla corrosione.
- **Polimeri:** sono materiali dotati di una bassa resistenza meccanica e la maggior parte di essi si degrada durante la loro vita utile. Tuttavia vengono utilizzati per installazioni temporanee o per scaffold biodegradabili.
- **Ceramici:** sono utilizzati maggiormente in campo odontoiatrico e vi svolgono azioni di ricoprimento. In campo biomedico non sono utilizzati a fini di supporto perché hanno un comportamento fragile.
- **Compositi:** sono costituiti da due o più fasi con proprietà fisiche differenti. Hanno un basso rapporto densità/peso, un'elevata resistenza meccanica e resistenza alla corrosione, dato che le proprietà sono di gran lunga migliori rispetto a quelle delle singole fasi che lo costituiscono. Grazie a queste caratteristiche vengono utilizzati per la realizzazione delle protesi cardiache e ortopediche.

La seconda classificazione riguarda il grado di interazione tra i biomateriali e l'ambiente nel quale sono stati inseriti:

- **Bioinerti:** da un punto di vista chimico-fisico, sono materiali stabili che non presentano alcuna interazione con l'ambiente biologico, e dunque, consentono una

²³ D. F. Williams (2008). *On the mechanisms of biocompatibility in Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.

buona coesistenza tra impianto e organismo senza problemi di tossicità. È bene però ricordare che non vi è alcun materiale che sia completamente inerte, ma tutti presentano un minimo di interazione con l'ambiente circostante.

- **Bioattivi**: sono quei materiali che possiedono la capacità di avviare una risposta biologica dopo l'impianto nel corpo, come la stimolazione cellulare, la proliferazione e differenziazione delle cellule staminali per la rigenerazione di un tessuto danneggiato o di un organo intero²⁴.
- **Biorisorbibili**: si tratta di materiali in grado di essere completamente metabolizzati dall'organismo. Si dissolvono facilmente quando sono a contatto con i fluidi corporei e successivamente espulsi. Il loro impiego trova spazio nelle installazioni temporanee nel campo dell'ingegneria tissutale o in quelle per il rilascio controllato di farmaci.

²⁴ Cfr. J. Enderle (2012). *Introduction to biomedical engineering*, Academic press.

Capitolo 2 – Tessuto osseo e osteointegrazione: aspetti generali

I dispositivi impiegati nel campo dell'ortopedia e traumatologia sono realizzati con biomateriali che consentono di ripristinare la funzione articolare o anche di ricomporre una frattura. Affinché si verifichi un'ottima osteointegrazione tra impianto ortopedico e tessuto osseo, è essenziale che il biomateriale goda un'elevata biocompatibilità e risponda agli stimoli di carattere prettamente biologico. Le indagini che vengono eseguite su questi tipi di biomateriali ortopedici sono effettuate mediante test *in vitro*. Tuttavia per avere una conoscenza più profonda delle proprietà osteogenetiche e osteointegrative, non sono da escludere anche test *in vivo* per determinare il successo o il fallimento dell'impianto installato nel paziente. Dunque, per introdurre meglio l'argomento e aver contezza dell'ambito nel quale la nostra ricerca si muove, in questo capitolo si illustreranno in linee generali le caratteristiche del tessuto osseo e i meccanismi che stanno alla base dell'osteogenesi e osteointegrazione con un impianto ortopedico²⁵.

2.1 Il tessuto osseo

Il tessuto osseo è un connettivo specializzato nel sostegno del corpo di un essere vivente animale vertebrato. Grazie alla sua composizione istologica, conferisce alle strutture da esso formate, le ossa, di avere un ruolo fondamentale per il corpo di tutti gli esseri vertebrati. Le ossa, infatti:

- offrono i siti di ancoraggio per i muscoli, i tendini e i legamenti per la locomozione;
- proteggono organi molli come encefalo e midollo spinale;
- ospitano i tessuti emopoietici rappresentati dal midollo osseo rosso, che genera i vari tipi di cellule che costituiscono la parte corpuscolata del sangue;

²⁵ Cfr. I. C. Lavos-Valereto, S. Wolyneć, M. C. Z. Deboni, B. König Jr (2001). *In vitro and in vivo biocompatibility testing of Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating* in *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 58(6), 727-733. Cfr. K. Anselme (2000). *Osteoblast adhesion on biomaterials* in *Biomaterials*, 21(7), 667-681.

- fungono da serbatoio di calcio e fosfati per l'omeostasi minerale.

Il tessuto osseo è dinamico e durante la vita va incontro alla rigenerazione e al ripristino mediante un processo di rimodellamento, essenziale per l'omeostasi del calcio e del fosforo nell'organismo²⁶.

2.1.1 Anatomia, morfologia e composizione delle ossa

L'osso è un nanocomposito eterogeneo e anisotropo le cui componenti principali sono organizzate gerarchicamente in diversi livelli strutturali, come mostrato in fig. 2.1. Nel corpo umano le ossa possono classificarsi in base alla forma e alla particolare funzione cui possono essere associate:

- **Lunghe:** (femore, tibia, perone, omero, radio ed ulna) si sviluppano in una dimensione, si trovano essenzialmente negli arti e fungono, come leve rigide, per la locomozione, e da deposito di minerali e midollo osseo in grado di produrre le cellule del sangue;
- **Corte:** (polso, calcagno e vertebre) si estendono ugualmente per due dimensioni e sono coinvolte in movimenti limitati, consentendo alle ossa delle caviglie e dei polsi di scorrere tra loro;
- **Piatte:** (scapole, sterno, ossa del cranio e del bacino) racchiudono e proteggono gli organi molli e forniscono ampie superfici per il fissaggio muscolare.

²⁶ Per una introduzione generale ed esaustiva ad un argomento di così vaste dimensioni, essendo l'osteologia umana e odontologia tematiche proprie delle discipline mediche, consultare: A. M. Christensen, N. V. Passalacqua, E. J. Bartelink (2019). *Forensic anthropology: current methods and practice*, Academic Press. cap. 2, pp. 33-76.

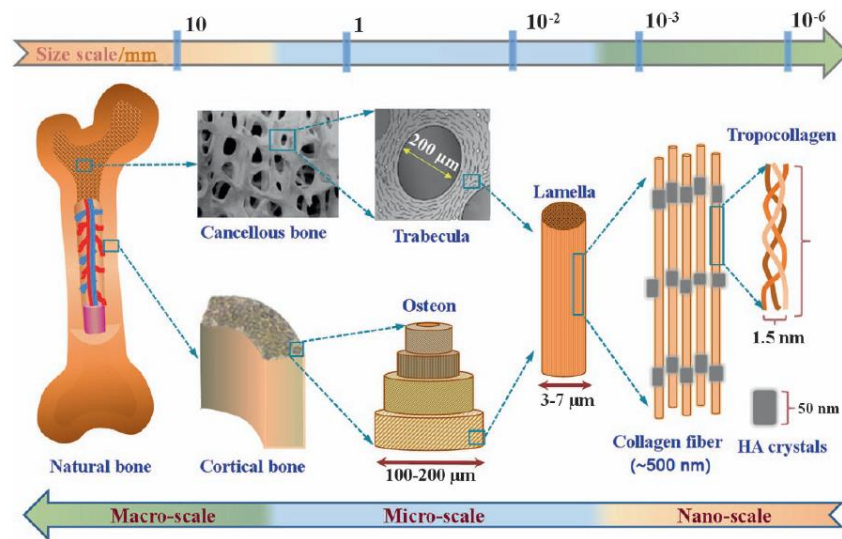


Fig. 2.1 Struttura gerarchica di un osso umano²⁷

Da un punto di vista strutturale, esistono due tipi di tessuti ossei (fig. 2.2):

- Compatto (o corticale)
- Trabecolare (o spugnoso)

Il tessuto osseo compatto (fig. 2.2) è denso, con una piccola area superficiale, e costituisce l'80% delle ossa del sistema scheletrico, in particolare la maggior parte della *diafisi* (parte delle ossa sita tra le due estremità chiamate *epifisi*) di ossa lunghe e le pareti di ossa corte e piatte. Queste si sviluppano attorno alla cavità midollare in cui è presente il midollo osseo. L'unità strutturale di base dell'osso compatto è l'osteone (o *sistema haversiano*) al centro del quale è presente il *canale di Havers*, che contiene i vasi sanguigni per la vascolarizzazione e una terminazione nervosa.

Le ossa trabecolari, invece, hanno una densità più bassa e sono formate da un reticolo interconnesso di trabecole, lamine sottili che si intrecciano a delimitare piccole cavità ripiene di midollo conferendo un'elevata porosità e alta resistenza alla compressione. L'osso spugnoso delimita il canale midollare, forma la regione centrale dell'epifisi delle ossa lunghe e costituisce gran parte delle ossa corte e la parte centrale delle ossa piatte (*diploe*). La parte più esterna dell'osso è ricoperto dal periostio, costituito da uno strato più esterno fibroso di collagene, che garantisce l'attaccamento e la continuità tra

²⁷ Tratta da: C. Gao, S. Peng, P. Feng, C. Shuai (2017). *Bone biomaterials and interactions with stem cells in Bone research*, 5(1), p.2

muscolo, tendini e ossa; lo strato più interno è costituito da cellule ossee che hanno un ruolo molto importante nella crescita, rimodellamento e rigenerazione delle ossa in seguito a fratture.

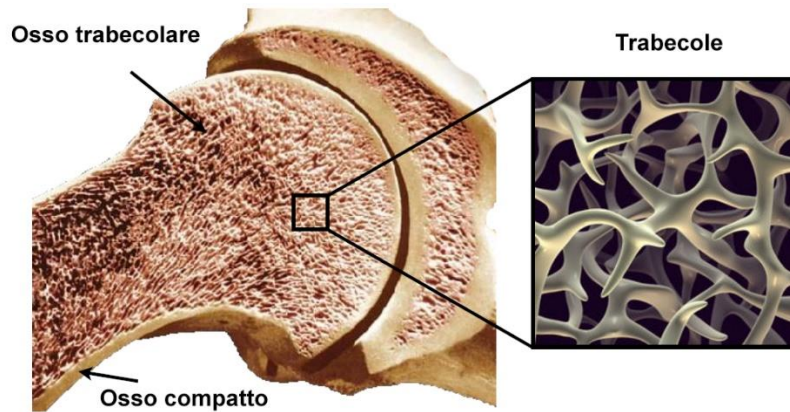


Fig. 2.2 Osso trabecolare e compatto²⁸

Il tessuto osseo è costituito dalla matrice extracellulare e dalle cellule ossee. Nella matrice extracellulare (o matrice ossea) è presente sia una componente organica (fibre proteiche) che inorganica (matrice amorfa). La prima, costituita al 90% da collagene di tipo I e altre proteine come osteocalcina, osteonectina e osteopontina, conferisce all'osso resistenza alla tensione e fornisce l'impalcatura che sostiene la matrice mineralizzata. La seconda è costituita invece da fosfati di calcio sotto forma di cristalli di idrossiapatite, ma anche da sodio, potassio, magnesio, fluoro, cloro, carbonati e tracce di elementi come silicio, stronzio, ferro, rame e zinco che conferiscono resistenza meccanica. Il fosfato di calcio è presente sotto forma di una varietà di apatite, simile all'idrossiapatite la cui formula bruta è $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$ ²⁹.

Le cellule che compongono il tessuto osseo sono di diversi tipi³⁰ (fig. 2.3) e distinguibili in:

²⁸ Tratta da: P. Cardiff (2012). *Development of the finite volume method for hip joint stress analysis*.

²⁹ Cfr. S. Adamo (1975), *Istologia di Monesi* – 7 ed. 2018 pp. 455-456-477 Cfr. Y. Liu, D. Luo, T. Wang, (2016). *Hierarchical structures of bone and bioinspired bone tissue engineering in Small*, 12(34), 4611-4632

³⁰ Cfr. B. Clarke (2008). *Normal bone anatomy and physiology in Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), S131-S139.

- **Osteoprogenitrici (o preosteoblasti):** si trovano nella lamina più interna del periostio, derivano da elementi (cellule) mesenchimali, caratterizzati da attività mitotica. Possono rimanere quiescenti oppure differenziarsi in osteoblasti.
- **Osteoblasti:** possiedono grande attività metabolica (vi si trovano infatti REG – reticolo endoplasmatico rugoso – e apparato di Golgi sviluppati), sono le principali cellule responsabili della formazione dell'osso, producono le principali proteine e glicoproteine e regolano la deposizione della matrice organica dell'osso e la mineralizzazione. Si localizzano in corrispondenza di periostio ed endostio durante tutto il periodo di morfogenesi dell'osso. Inoltre secernono importanti fattori di crescita che stimolano la formazione degli osteoblasti stessi come il fattore di crescita trasformante (*transforming growth factor beta* - TGF- β).
- **Osteociti:** nella maggior parte dei casi sono osteoblasti maturi che dopo aver elaborato la sostanza amorfa rimangono imprigionati nella matrice calcificata all'interno delle lacune ossee, trasformandosi appunto in osteociti. Le lacune ossee sono collegate tra loro attraverso canalicoli ramificati in cui i prolungamenti di osteociti vicini sono in contatto tramite regioni di aderenza delle membrane in cui si formano le giunzioni gap (*gap junctions*). In questo modo gli osteociti possono provvedere allo scambio metabolico tra loro, atteso che si trovano in una matrice estremamente mineralizzata. La funzione principale è quella di sostenere la struttura dell'osso e di contribuire al rimodellamento osseo, dato che hanno la capacità di fungere da sensori per lo sforzo meccanico (tramite un *ciglio primario o monociglio*, un organulo meccanorecettore) e segnalarlo così alle cellule perché il rimodellamento osseo avvenga.
- **Osteoclasti:** a differenza delle prime tre tipologie di cellule che fanno parte di diverse fasi dello stesso tipo cellulare mesenchimale, gli osteoclasti derivano dai preosteoclasti che si differenziano da cellule staminali del midollo osseo emopoietico. Essi appaiono accolti in fossette scavate sulla superficie della trabecola ossea, chiamate *lacune di Howship*, che si formano a seguito della loro stessa attività erosiva. Sono cellule polinucleate con dimensioni notevoli

che insieme agli osteoblasti provvedono all'omeostasi ossea³¹ e sono incaricate principalmente durante la fase di riassorbimento dell'osso di andare a formare l'unità multicellulare base (*Basic Multicellular Unit* – BMU).

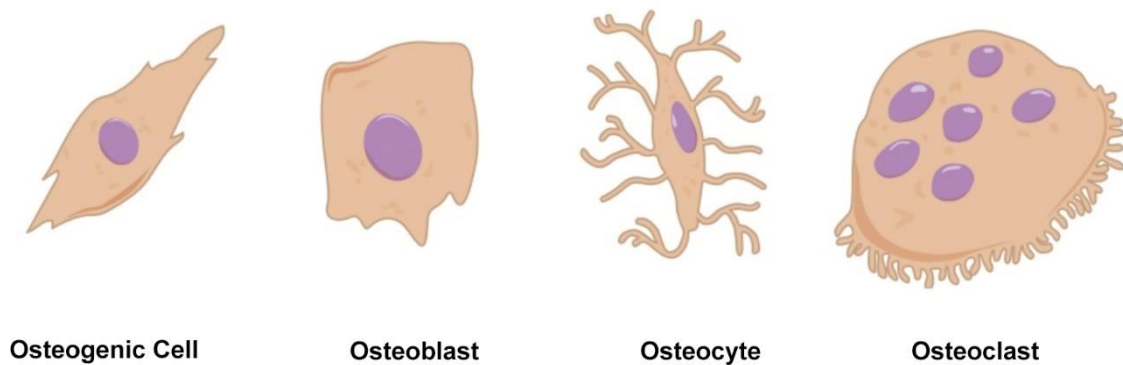


Fig. 2.3 Cellule ossee³²

2.2 Osteogenesi e rimodellamento osseo

I tessuti a funzione meccanica, (tessuto osseo, cartilagini e connettivo fibroso), si differenziano tra loro per il mesenchima, che è un connettivo embrionale. Quest'ultimo ha origine durante la prima differenziazione di un embrione nei diversi strati cellulari che daranno origine a strutture, tessuti e organi. Nel caso specifico del tessuto osseo, nelle sedi nelle quali è generato, cominciano ad addensarsi le cellule mesenchimali formando il cosiddetto blastema, che può seguire due tipi di sviluppi: ossificazione diretta e indiretta.

L'ossificazione diretta o intra-membranosa è tipica delle ossa piatte, come quelle del cranio, nei cui centri di ossificazione si differenziano gli osteoblasti, che aumentano di volume e producono le prime trabecole irregolari. Ben presto comincia il processo di mineralizzazione, durante il quale gli osteoblasti sono intrappolati nella matrice ossea non ancora calcificata, chiamata osteoide. Da lì in poi si differenziano in osteociti. Gli spazi tra le trabecole col tempo diminuiscono per apposizione di nuova matrice ossea e sono attraversati da vasi sanguigni formando gli osteoni primari.

³¹ Durante il periodo successivo alla menopausa in donne affette da osteoporosi, l'attività osteoclastica è più accentuata rispetto a quella osteoblastica e questo fa sì che l'osso risulti più esposto alle fratture.

³² Immagine tratta da: [http://www.pharmacy180.com/article/microscopic-anatomy-\(bone-cells\)-3487](http://www.pharmacy180.com/article/microscopic-anatomy-(bone-cells)-3487)

L'ossificazione indiretta o condrale, invece, si verifica nella maggior parte delle ossa dello scheletro (ossa alla base del cranio, colonna vertebrale, bacino e arti) e consiste nella sostituzione di tessuto cartilagineo con quello osseo che può avvenire o nella sua superficie (*ossificazione pericondrale*) o nel suo contesto (*ossificazione endocondrale*). Nell'ossificazione pericondrale l'osso si forma nella periferia dell'abbozzo cartilagineo: dalla periferia si dipartono vasi in profondità, al cui interno troviamo le cellule che si differenziano in condroblasti che degradano la matrice cartilaginea; nell'ossificazione endocondrale (dentro la cartilagine) l'osso si forma all'interno dell'abbozzo cartilagineo.

Durante la vita di un uomo, la struttura e l'architettura delle ossa subisce dei mutamenti dovuti al fatto che esse sono continuamente soggette a processi di dissoluzione e nuova deposizione di tessuto osseo. Inoltre, la forma di un osso, oltre ad essere determinata da un punto di vista genetico, può altresì essere modificata anche a seconda degli stimoli meccanici a cui va incontro. Questo processo viene definito come "rimodellamento" ed è stato schematizzato in fig. 2.4. Esso si realizza tramite cicli che prevedono il riassorbimento osseo per azione osteoclastica e la sua nuova deposizione per azione osteoblastica (processi accoppiati – riassorbimento/neoformazione). È stato studiato in particolare che la deposizione di nuovo tessuto osseo è più accentuata nelle zone più soggette a sforzi meccanici, in accordo alla legge di Wolff³³.

Il processo inizia attraverso il richiamo dei preosteoclasti al sito di rimodellamento in cui, attraverso fattori chemiotattici rilasciati dall'osso danneggiato, vengono attratti differenziandosi in osteoclasti maturi. Successivamente, comincia il processo erosivo da parte degli osteoclasti maturi che, grazie a podociti ricchi in actina, riescono ad aderire sulla matrice ossea. I podociti non svolgono solo la funzione di ancoraggio al sito di rimodellamento ma circoscrivono anche la zona da erodere. Infatti, grazie alla secrezione di acido cloridrico, acidificano localmente la componente minerale della matrice ossea, mentre la componente organica è degradata grazie all'azione di enzimi secreti dagli osteoclasti con azione collagenolitica come la catepsina K.

³³ Cfr. H. M. Frost (1994). *Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians* in *The Angle Orthodontist*, 64(3), 175-188.

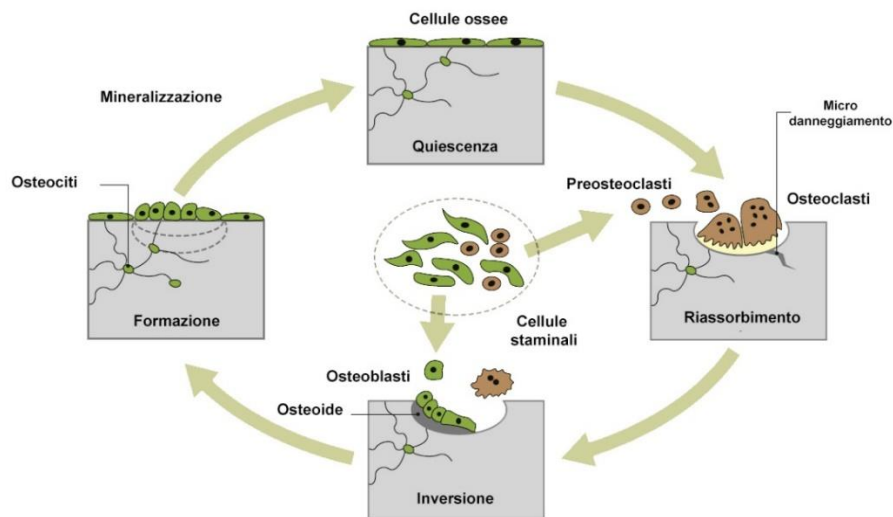


Fig. 2.4 Fasi del rimodellamento osseo³⁴

Durante la seconda fase del rimodellamento, che prevede la formazione del nuovo tessuto osseo, le cellule progenitrici vengono attratte nel sito eroso dagli osteoclasti, i quali, terminata la loro funzione, a loro volta vanno incontro ad apoptosi. In una prima fase, grazie all'azione di alcuni fattori di crescita depongono la matrice organica. In un secondo momento gli osteoblasti depongono sulla superficie ossea la matrice ossea non calcificata (*osteoide*).

La mineralizzazione dell'osteoide consiste in un processo nel quale vengono coinvolti gli ioni calcio e fosfato sequestrati dal plasma sanguigno e cristallizzati nella matrice ossea sotto forma di idrossiapatite, con il conseguente indurimento della matrice ossea. Alcuni tessuti diversi dalle ossa possiedono degli inibitori che evitano la precipitazione dei cristalli di idrossiapatite. Tuttavia, questo non accade nelle ossa, poiché gli osteoblasti hanno la capacità di bloccare l'azione di questi inibitori, favorendo così la formazione dell'idrossiapatite³⁵. Durante questo ultimo step, alcuni osteoblasti rimangono confinati all'interno della matrice ossea in lacune e successivamente si differenziano in osteociti all'interno di esse³⁶.

³⁴ Tratta da: Cfr. Ralston, S. H. (2013). *Bone structure and metabolism in Medicine*, 41(10), p.583

³⁵ L'ossificazione ectopica dei tessuti è la calcificazione anormale che può avvenire in tessuti diversi dal tessuto osseo, come l'arteriosclerosi; Cfr. K. S. Saladin, C. Porth (2010). *Anatomy & physiology: the unity of form and function (Vol. 5)*. New York, NY, USA: McGraw-Hill. p.230

³⁶ Cfr. L. J. Raggatt, N. C. Partridge (2010). *Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103-25108. Cfr. Ralston, S. H. (2013). *Bone structure...*

2.3 Osteointegrazione

Il processo di osteointegrazione di un dispositivo ortopedico può essere suddiviso in tre fasi (fig. 2.5). Durante la prima, la superficie dell’impianto entra a contatto con i fluidi corporei e con il sangue, facilitando così l’adsorbimento delle principali proteine, dei lipidi e delle glicoproteine, che favoriscono l’adesione cellulare sulla superficie dell’impianto. Nella seconda, che occupa i primi giorni dopo l’intervento, diventa dominante l’attività dei neutrofili e dei macrofagi, che provvedono il riassorbimento del tessuto osseo necrotizzato conseguente all’intervento chirurgico. Successivamente, dal quinto giorno in poi avvengono i processi di riassorbimento e formazione di un nuovo tessuto guidati dall’attività degli osteoclasti. Contemporaneamente, le cellule staminali mesenchimali cominciano il loro processo di differenziazione in osteoblasti e successivamente in osteociti. Dopo due settimane, la superficie dell’impianto è circondata da tessuti mineralizzati, osteoidi e matrice densa. L’ultima fase è caratterizzata dal progressivo completamento del processo di osteointegrazione che permette la connessione dell’impianto con il tessuto osseo³⁷.



Fig. 2.5 Procedura schematica di osteointegrazione³⁸

³⁷ Cfr. S. H. Hosseini, M. Kazemian, S. Ghorbanzadeh (2015). *A brief overview of cellular and molecular mechanisms of osseointegration*. *bone*, 12, 13.

³⁸ Tratta da: A. Zhou, H. Yu, J. Liu, J. Zheng, Y. Jia, B. Wu, L. Xiang (2020). *Role of hippo-YAP signaling in osseointegration by regulating osteogenesis, angiogenesis, and osteoimmunology* in *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 780.

Capitolo 3 – Biomateriali metallici e corrosione

L'impiego di impianti biomedicali in campo ortopedico è intimamente legato alla necessità di migliorare la qualità della vita di una popolazione mondiale che invecchia esponenzialmente nel tempo a causa dell'aumento della durata di vita media dell'uomo. In un recente rapporto pubblicato da *Facts&Factors*³⁹ nell'aprile 2021 si legge:

*«According to the research report, the global Orthopedic Implants Market was estimated at USD 50.6 Billion in 2019 and is expected to reach USD 73.5 Billion by 2026. The global Orthopedic Implants Market is expected to grow at a compound annual growth rate (CAGR) of 5.48% from 2020 to 2026».*⁴⁰

Prima di addentrarci nella trattazione, riteniamo utile una premessa, che possiamo riassumere con un'immagine che descrive in termini generali il corpo umano: una “macchina a fatica”. Basti pensare semplicemente come ogni movimento, sforzo o carico applicato sia ripetuto milioni di volte ogni anno. Per esempio, supponiamo che un uomo effettui almeno diecimila passi al giorno (che significano cinquemila per ogni gamba): i cicli di carico e scarico che ossa e articolazioni degli arti inferiori devono sostenere è estremamente elevato e raggiunge livelli di carico anche di centinaia di MPa⁴¹. Per questo motivo i metalli rappresentano i materiali migliori per la fabbricazione di dispositivi ortopedici, perché grazie alle loro proprietà chimico-fisiche e soprattutto meccaniche riescono ad assicurare una lunga vita dei dispositivi stessi.

Tuttavia, se da un lato l'utilizzo di materiali metallici altamente performanti garantisce una sempre più durevole vita utile del *device* impiantato all'interno del corpo, dall'altro i fenomeni corrosivi possono inficiare le prestazioni del dispositivo biomedicale causando l'abbassamento della sua vita utile. Essi infatti possono altresì portare a complicazioni patologiche e, nei casi più gravi, alla rottura dell'impianto.

³⁹ *Facts & Factors* è un'organizzazione leader per le ricerche di mercato che offre competenze del settore e servizi di consulenza scrupolosi ai clienti per lo sviluppo del loro business.

⁴⁰ <https://www.fnfresearch.com/news/global-orthopedic-implants-market>

⁴¹ Cfr. W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, M. J. Yaszemski (2020). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic Press.

In questo capitolo saranno illustrati i materiali metallici maggiormente utilizzati in campo ortopedico e i fenomeni corrosivi a cui sono soggetti all'interno del corpo umano.

3.1 I metalli in campo ortopedico

Grazie allo sviluppo tecnologico e alla continua ricerca su materiali con elevate prestazioni, l'impiego di quelli metallici in ortopedia è iniziato già nel secolo scorso. La maggior parte dei dispositivi ortopedici – come viti, perni, protesi o impianti dentali – richiedono la presenza di materiali metallici, gli unici a fornire proprietà meccaniche che nessun altro biomateriale possiede. Sono caratterizzati da elevati moduli elastici tali da essere utilizzati per strutture che possano sopportare elevati carichi senza un'apprezzabile deformazione. La loro duttilità fa sì che, una volta superato il punto di snervamento, possono subire una deformazione plastica piuttosto che essere soggetti ad un'improvvisa rottura. Ciò consente di sostituire o modificare un componente prima che il dispositivo possa perdere l'integrità. Inoltre, sono adatti a resistere a fatica in modo da sopportare stress ciclici di carico e scarico⁴². Per avere contezza delle proprietà meccaniche e capire come i materiali metallici possano essere dei validi rimedi, in tab. 3.1 sono riportati i parametri principali di alcune ossa umane.

Tab. 3.1 Proprietà meccaniche dei tessuti duri

Tipo di osso	Resistenza alla trazione (MPa)	Resistenza alla compressione (MPa)	Modulo Elastico (GPa)
Tibia	140	159	18.1
Femore	121	167	17.2
Omero	130	132	17.2
Vertebra Cervicale	3.1	10	0.23
Vertebra Lombare	3.7	5	0.16
Smalto	10	384	84.3
Dentina	39.9	297	11.0

⁴² Cfr. K. L. Ong, S. Lovald, J. Black (2014). *Orthopaedic biomaterials in research and practice*. CRC press. p.163

Benché presentino elevate resistenze meccaniche, le ossa non resistono molto bene alle forze di impatto e dunque sono soggette a traumi e a fratture. Grazie alla loro natura, i materiali metallici invece riescono a fornire le prestazioni necessarie per sopportare stress di carico notevoli. In tab. 3.2 è riportato un confronto tra le proprietà meccaniche delle leghe maggiormente utilizzate in campo ortopedico e a quelle dell'osso compatto che circonda la cavità midollare.

Tab. 3.2 Proprietà meccaniche dei materiali metallici per impianti ortopedici e osso compatto

Materiali	Modulo di Young (GPa)	Tensione di Rottura (MPa)
Leghe CoCrMo	240	900-1540
316L SS	200	540-1000
Leghe Ti	105-125	900
Leghe Mg	40-45	100-250
Leghe NiTi	30-50	1355
Osso Compatto	10-30	130-150

3.1.1 Acciai

L'acciaio è una lega ferrosa con un contenuto relativamente basso di carbonio e uno alto di cromo: il primo controlla la formazione dei carburi che sono necessari per aumentare la resistenza, mentre il secondo permette di creare uno strato molto compatto di ossidi di cromo (Cr_2O_3) durante il processo di passivazione.

Storicamente, gli acciai sono stati utilizzati per la prima volta in campo ortopedico nel 1926. Ne esistono di tre tipologie, a seconda della composizione a temperatura ambiente:

- **Acciaio Austenitico:** contiene una fase solida, $\gamma\text{-Fe}$, chiamata austenite, formata da ferro con un contenuto di carbonio inferiore al 2%. Contiene anche cromo e nichel e, a seconda della tipologia, possono essere presenti come alliganti il manganese o l'azoto.
- **Acciaio Ferritico:** contiene un basso contenuto di nichel e un alto contenuto di cromo (dall'11 al 30%) in cui; la fase austenitica si forma ad alte temperature ma si dissocia a basse temperature.

- **Acciaio Martensitico:** con contenuto di carbonio relativamente elevato (fino al 1.1% in peso), è sottoposto a processi di tempra che producono una trasformazione dell'austenite in una nuova fase, chiamata martensite, che conferisce ottime proprietà meccaniche alla lega⁴³.

La presenza di altri elementi all'interno della lega tende a migliorare le prestazioni. Infatti, l'aggiunta di azoto migliora la resistenza meccanica e la resistenza alla corrosione. Il nichel, oltre a dare tenacità, tende a migliorare le proprietà passivanti dell'acciaio. Il molibdeno, invece, migliora notevolmente la sua resistenza alla corrosione per pitting. La composizione chimica di ogni tipologia di acciaio è standardizzata dall'*ASTM International*⁴⁴.

Grazie alla loro tenacità, durabilità e resistenza alla corrosione, soltanto gli acciai austenitici della serie 300 (come 304, 304L⁴⁵, 316, 316L e 347) sono impiegati in campo ortopedico per la realizzazione di dispositivi di osteosintesi, come placche e viti, che non prevedono lunghi periodi di permanenza. In aggiunta, le proprietà non-magnetiche tipiche degli acciai austenitici permettono di non aver alcuna interazione con tecniche diagnostiche che utilizzano forti campi magnetici, come la risonanza magnetica. Tuttavia, il contenuto di carbonio deve essere tenuto basso (es. l'acciaio 316L) per evitare il fenomeno della sensibilizzazione. Questo si verifica quando gli acciai inossidabili austenitici sono mantenuti per un certo lasso di tempo a temperature comprese fra 400 e 800 °C. Le alte temperature portano alla segregazione dei carburi di cromo lungo i bordi di grano, creando quindi delle zone impoverite di cromo, rispetto al cuore del grano, che saranno più suscettibili alla corrosione⁴⁶.

3.1.2 Leghe di cobalto

Le leghe di cobalto sono impiegate nel campo biomedico per la realizzazione di impianti e dispositivi ortopedici, dentali e cardiovascolari, dal momento che godono di

⁴³ Cfr. K. L. Ong (2014). *Orthopaedic...* p.176

⁴⁴ *American Society for Testing and Materials International* è un'organizzazione di normalizzazione statunitense.

⁴⁵ La lettera L sta ad indicare "Low Carbon" ossia una percentuale di carbonio minore dello 0.03%.

⁴⁶ Cfr. W. R. Wagner (2020). *Biomaterials science: an ...* pp. 248-250

eccellenti proprietà meccaniche e tribologiche e di resistenza alla corrosione e all'usura. Le prime leghe impiegate risalgono agli anni Trenta dello scorso secolo e sono state commercializzate sotto il nome di "Vitallium": si trattava di una lega di CoCrMo e in un primo momento fu impiegata per la realizzazione di protesi dentali. In generale, questa tipologia di leghe presenta una buona resistenza alla corrosione poiché tende a creare un ossido protettivo (Cr_2O_3) che lo protegge dall'ambiente fisiologico del corpo umano⁴⁷.

La composizione delle leghe di cobalto, nelle quali è presente anche una quantità di altri elementi come cromo, tungsteno, molibdeno, azoto e carbonio, è anch'essa standardizzata dall'ASTM⁴⁸. In campo ortopedico, si annoverano la lega CoCrMo (ASTM F76) che viene solitamente lavorata col metodo di colata su stampo in ceramica; le leghe CoCrWNi (ASTM F90), CoNiCrMo (ASTM F562), CoNiCrMoWFe (ASTM F563) sono realizzate invece attraverso forgiatura e utensili. Da un punto di vista di lavorazione, sono meno duttili rispetto agli acciai e leghe di titanio, per cui non è semplice la realizzazione di aste intramidollari o spinali⁴⁹. Tuttavia, si realizzano protesi a forma fissa, come la ricostruzione dell'anca in modalità MoM e MoP⁵⁰.

3.1.3 Leghe di titanio

Rispetto agli acciai e alle leghe di cobalto, il titanio possiede una densità minore (4.5 gcm^{-3}) e un'eccellente resistenza alla corrosione, dovuta alla presenza di un ossido molto compatto (TiO_2) che tende ad essere ripristinato rapidamente non appena viene rimosso. Questa caratteristica lo rende inerte, ovvero senza alcuna possibilità di interazione con l'ambiente biologico circostante.

Il titanio puro esiste in natura in due forme allotropiche: α -Ti e β -Ti. La fase α presenta la forma esagonale compatta e si trasforma nella fase β con una struttura cubica

⁴⁷ Cfr. P. Balakrishnan, M. S. Sreekala, S. Thomas (2018). *Fundamental Biomaterials: Metals*. Woodhead Publishing. p.16

⁴⁸ Cfr. M. Niinomi, T. Narushima, M. Nakai (2015). *Advances in metallic Biomaterials: Tissues, materials and biological reactions* (Vol. 3). Springer. p.157

⁴⁹ Cfr. V. Hasirci, N. Hasirci (2018). *Fundamentals of biomaterials*. Verlag: Springer New York. p. 41

⁵⁰ Per le protesi d'anca solitamente l'accoppiamento consta di una componente femorale e di una acetabolare. Se ne distinguono due tipi: una MoM, ossia *Metal-on-Metal*, quando le due componenti sono entrambe di metallo. MoP, ossia *Metal-on-Polyethylene*, quando l'acetabolo è costituito da polietilene ad alto peso molecolare e la componente femorale è prodotta in metallo.

a corpo centrato sopra la temperatura di 883 °C⁵¹. Le leghe di titanio possono essere classificate a seconda della loro composizione:

- α -Ti, con una percentuale di β -Ti minore del 10%;
- β -Ti, con una percentuale di β -Ti maggiore del 25%;
- α -Ti + β -Ti, con una concentrazione di β -Ti compresa tra il 10% e il 25%.

La lega comunemente utilizzata in campo ortopedico (molto usata anche in campo aerospaziale) è la Ti6Al4V. Si tratta di una lega $\alpha+\beta$ nella quale l'aggiunta di alliganti all'interno della struttura stabilizza il materiale. Più specificatamente, l'aggiunta di alluminio tende a stabilizzare la fase α -Ti, mentre il vanadio stabilizza la fase β -Ti. Sfortunatamente l'alluminio e il vanadio presentano una certa tossicità per l'uomo, per cui sono state sviluppate delle leghe alternative (come la Ti6Al7Nb e la Ti5Al2.5Fe) con una struttura simile⁵². Tuttavia, queste leghe non godono di buone proprietà tribologiche tanto che non possono essere utilizzate per viti, perni o per impianti ortopedici di articolazioni scorrevoli⁵³.

3.2 Corrosione nel corpo umano

Come si è evidenziato nei precedenti paragrafi, l'utilizzo dei materiali metallici risulta essere la soluzione migliore per la realizzazione di impianti ortopedici, a motivo di proprietà meccaniche simili a quelle delle ossa umane. Tuttavia, i fenomeni corrosivi non possono essere trascurati, dato che sono una delle cause principali della riduzione della vita utile del *device* ortopedico. Infatti, il corpo umano è un ambiente aggressivo per i dispositivi biomedicali metallici e il paziente può essere esposto ad una serie di complicazioni che possono anche rendere necessaria, nel peggiore dei casi, la sostituzione dell'impianto.

I processi corrosivi che si verificano all'interno del corpo umano sono processi ad umido, poiché il metallo entra in contatto con un ambiente acquoso. L'acqua costituisce circa il 60% della massa corporea totale dell'uomo e si distribuisce tra lo spazio intra- ed

⁵¹ Cfr. L. C. Zhang, L. Y. Chen (2019). *A review on biomedical titanium alloys: recent progress and prospect*. *Advanced engineering materials*, 21(4), 1801215.

⁵² Cfr. K. L. Ong (2014). *Orthopaedic ...* pp.180-181

⁵³ Cfr. P. Balakrishnan (2018). *Fundamental ...* p.18

extracellulare: il primo contiene circa il 55% della totalità di acqua e costituisce i cosiddetti fluidi intracellulari; del secondo fanno parte i fluidi extracellulari come il plasma del sangue, i fluidi interstiziali che circondano le cellule, la linfa e i fluidi transcellulari⁵⁴. La distribuzione e la concentrazione ionica al loro interno sono autoregolate da un processo chiamato omeostasi, grazie al quale, in presenza di un cambiamento delle condizioni esterne, il sistema biologico si porta automaticamente alle condizioni normali, tale processo autoregolante si altera in presenza di disturbi o patologie⁵⁵. All'interno dei fluidi corporei sono presenti gli elettroliti, i quali hanno diverse funzioni che provvedono al corretto funzionamento dei processi biochimici e a garantire l'osmolarità. Nella maggior parte dei casi, però, questi possono anche influire sui processi che portano alla corrosione di un impianto metallico, come quella per *pitting* che avviene in presenza di cloruri.

Nelle condizioni di un soggetto non affetto da patologie, i fluidi corporei si trovano alla temperatura di circa 37 °C e con un pH intorno a 7.35. Tuttavia, quando viene impiantato un dispositivo, possono insorgere una serie di complicazioni. Ad esempio, è stato constatato che l'interruzione dell'apporto di sangue all'osso può provocare un abbassamento da 7.4 a 5.5 del pH fisiologico dei fluidi corporei a contatto con il dispositivo, condizione favorevole per l'innescarsi di un fenomeno corrosivo. Tra l'altro, le condizioni che si creano all'interno del corpo sono diverse rispetto a quelle presenti nell'ambiente, sia dal punto di vista chimico che dal punto di vista fisico. Infatti, l'ossigeno disciolto all'interno del corpo umano può accelerare la velocità di corrosione. La pressione parziale di O₂ nel sangue (100 mmHg per sangue arterioso e 40 mmHg per sangue venoso) si riduce rispetto all'O₂ presente in atmosfera (pari a 160 mmHg). Nel momento in cui una parte di film passivo si rompe o viene rimosso a causa dell'usura, data la bassa pressione parziale di ossigeno, la velocità di ripristino è decisamente minore rispetto a quando un metallo è esposto in atmosfera⁵⁶.

Il rilascio di ioni metallici dovuta alla corrosione e all'usura dei metalli nel corpo umano è un altro problema da prendere in considerazione. In realtà, non sempre può

⁵⁴ Cfr. F. E. Agrò, M. Vennari (2013). *Physiology of body fluid compartments and body fluid movements* In *Body Fluid Management* (pp. 1-25). Springer, Milano.

⁵⁵ Cfr. J. P. Sturmberg, C. Martin (2013). *Handbook of systems and complexity in health*. Springer Science & Business Media. p.159

⁵⁶ Cfr. M. Sumita, T. Hanawa, I. Ohnishi, T. Yoneyama (2003). *Failure processes in biometallic materials*. Cfr. N. S. Manam, W. S. W. Harun, D. N. A. Shri, S. A. C. Ghani, T. Kurniawan, M. H. Ismail, M. H. I. Ibrahim (2017). *Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review in Journal of Alloys and Compounds*, 701, 698-715.

essere un aspetto negativo, dato che alcuni metalli sono considerati essenziali per il metabolismo degli esseri umani (tab. 3.3). Infatti, se la concentrazione di questi scende sotto un certo valore limite di soglia, possono insorgere patologie anche gravi.

Tab. 3.3 Metalli essenziali per il corpo umano, prendendo come riferimento un uomo di 70kg ⁵⁷

Elemento	Quantità media
Ca	1000 g
K	140 g
Na	100 g
Mg	30 g
Fe	5 g
Zn	2 g
Cu	100 mg
Mn	6 mg
Mo	5 mg
Co	2 mg

Quando uno ione metallico viene rilasciato nel corpo umano (fig. 3.1), potenzialmente può interagire con qualsiasi molecola. Se riesce ad interagire rapidamente con un anione o un radicale idrossido, presenta una bassa tossicità: forma un ossido o un sale all'interno del corpo e presenta non solo una scarsa interazione con le biomolecole ma anche una migliore facilità di espulsione dal corpo umano. Invece, quando l'attività dello ione è molto bassa, ovvero quando riesce a sopravvivere per un tempo relativamente lungo senza aver alcun tipo di reattività, la probabilità di interagire stabilmente con le biomolecole è davvero elevata. Questo fenomeno provoca un accumulo di metalli pesanti all'interno del corpo umano⁵⁸ che può essere la causa di patologie anche gravi.

⁵⁷ Cfr. M. A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi (2019). *The essential metals for humans: a brief overview* in *Journal of inorganic biochemistry*, 195, 120-129.

⁵⁸ Cfr. T. Hanawa (2012). *Degradation of dental implants*. In *Degradation of Implant Materials* (pp. 57-78). Springer, New York, NY. p.73

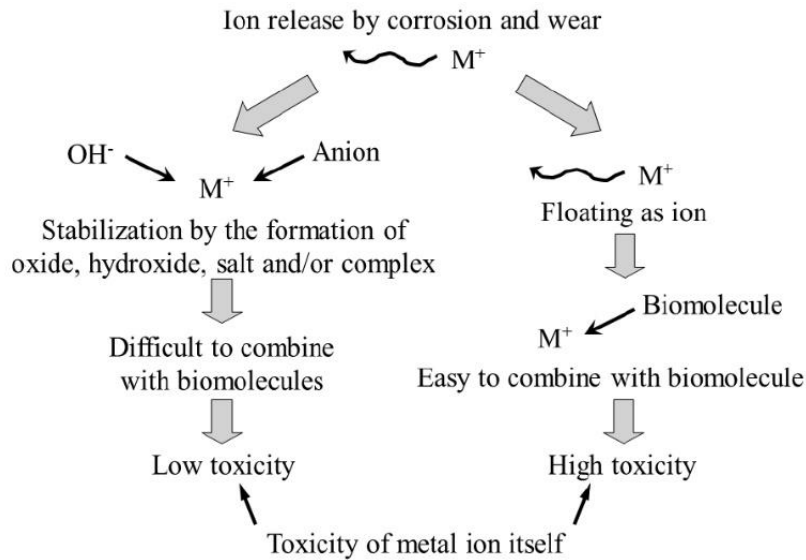
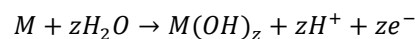
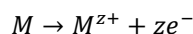


Fig. 3.1 Due possibili percorsi di uno ione metallico rilasciato all'interno dei fluidi corporei dovuta a corrosione o usura⁵⁹.

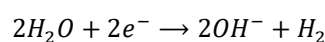
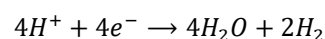
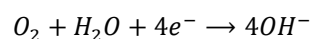
3.2.1 Tipi di corrosione

La corrosione è un processo elettrochimico che porta ad una lenta dissoluzione di un metallo ed è la somma di due reazioni elettrochimiche (fig. 3.2):

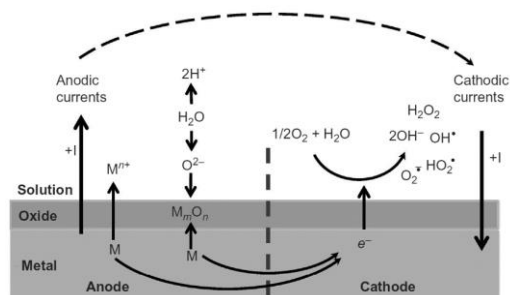
- processo anodico, in cui il metallo è portato dalla sua forma zerovalente alla sua forma ossidata o, in certe condizioni di pH e specie ioniche presenti in soluzione, alla formazione di ossidi o idrossidi del metallo:



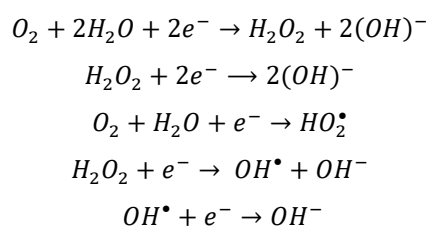
- processo catodico, le cui reazioni sono tipicamente la riduzione dell'ossigeno (poiché aumenta l'alcalinità della soluzione), la riduzione degli ioni H⁺ in ambienti acidi o riduzione delle molecole d'acqua in ambienti neutri:



⁵⁹ Tratta da: *ibid.* p.73


 Fig. 3.2 Rappresentazione di un sistema in corrosione nel corpo umano⁶⁰

Non si tratta però delle uniche semireazioni catodiche che potrebbero avvenire in un ambiente fisiologico umano. Infatti, nelle prime settimane del periodo post-operatorio che segue l'impianto di una protesi metallica, diverse reazioni, che avvengono nei tessuti periprotetici in seguito ad una risposta immunitaria, favoriscono l'insorgenza di microambienti favorevoli ad un attacco corrosivo. In particolare, le reazioni infiammatorie, oltre a generare dolori acuti e rigonfiamenti, danno luogo alla produzione di ROS (H_2O_2 o idrossidi radicali HO_2^* , OH^*) dovuta allo stress ossidativo cellulare⁶¹, e consumano gli elettroni provenienti dalla semireazione anodica di corrosione di un metallo attraverso le seguenti reazioni⁶²:



Oltre a queste semireazioni, un processo corrosivo contempla altri due processi (fig. 3.3): un trasporto elettronico che avviene all'interno del metallo dalla zona anodica

⁶⁰ J. L. Gilbert, G. W. Kubacki (2016). *Oxidative stress, inflammation, and the corrosion of metallic biomaterials: Corrosion causes biology and biology causes corrosion in Oxidative Stress and Biomaterials* p.62

⁶¹ I ROS (*Reactive Oxygen Species*) o radicali liberi sono prodotti durante l'attività metabolica ossidativa dei mitocondri come risposta a xenobiotici, citochine o batteri. Lo stress ossidativo cellulare si genera nel momento in cui vi è un eccesso di ROS poiché la cellula non è capace di avere una risposta antiossidante efficace.

⁶² Cfr. I. Antoniac (2012). *Biologically responsive biomaterials for tissue engineering (Vol.)*. Springer Science & Business Media. pp. 65-69

alla zona catodica dove gli elettroni sono consumati, e un trasporto ionico che va dalla regione anodica a quella catodica all'interno dell'elettrolita in modo da chiudere il circuito. Tutti questi processi avvengono alla stessa velocità e sono pari alla corrente di corrosione (I_{corr}). Infatti, la corrente dalla semireazione anodica (I_a) è uguale alla corrente della semireazione catodica (I_c). Allo stesso tempo, entrambe le semireazioni devono essere uguali sia alla corrente che circola all'interno del metallo (I_m) sia alla corrente ionica che si crea all'interno dell'elettrolita (I_{el})⁶³.

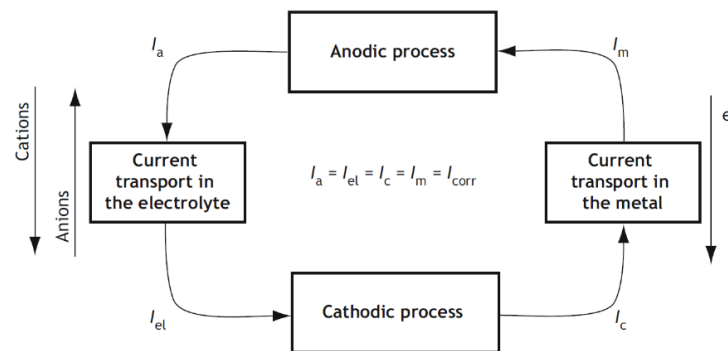


Fig. 3.3 Meccanismo elettrochimico di un processo in corrosione

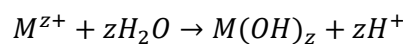
I meccanismi di corrosione degli impianti biomedicali *in vivo* possono essere di diversi tipi. Per quanto riguarda la corrosione generalizzata, forma che interessa tutta la superficie metallica quando è a contatto con un ambiente aggressivo, raramente avviene all'interno del corpo umano, poiché vengono utilizzati dei metalli che riescono a passivarsi e che possiedono una velocità di corrosione molto bassa, che non provoca alcun effetto collaterale al paziente (le perdite si attestano a circa $0.03 \mu\text{g cm}^{-2}$).

A differenza di quella generalizzata, è più frequente nel corpo umano la corrosione localizzata, perché causata non solo dall'aggressività dell'ambiente fisiologico umano ma anche da fattori di tipo meccanico. In particolare, possono avvenire diversi tipi di corrosione localizzata⁶⁴:

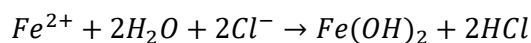
⁶³ Cfr. P. Pedferri, M. Ormellese (2018). *Corrosion science and engineering. Italy*: Springer. pp.18-19. Per approfondimenti consultare il cap.2 di P. Pedferri, M. Ormellese (2018). *Corrosion science and engineering* (p. 720). Italy: Springer

⁶⁴ Cfr. P. Pedferri, (2018) *Corrosion ...* pp. 575-578; Cfr. K. L. Ong (2014). *Orthopaedic ...* pp. 296-305; Cfr. N. Eliaz (2019). *Corrosion of metallic biomaterials: a review in Materials*, 12(3), 407.

- **Corrosione in fessura:** avviene in spazi stretti come fessure e interstizi, nei quali un elettrolita può insinuarsi per capillarità tra due parti metalliche, o tra una metallica e una isolante. Può avvenire, ad esempio, tra una testa di una vite e una placca da osteosintesi o all'interno di una cricca generata a fatica. Dato che la diffusione dell'ossigeno all'interno della fessura è limitata, si genera una condizione di areazione differenziale tra il microambiente all'interno dell'interstizio e la superficie esterna. In questo modo, il processo catodico avviene sulla superficie esterna mentre il processo anodico avviene all'interno della fessura, portando ad una dissoluzione dell'area intorno ad essa, che viene auto-accelerata dalla presenza di cloruri (fig. 3.4a).
- **Corrosione per pitting (o vaiolatura):** è un tipo di corrosione localizzata che crea delle cavità (*pit*) con diametri molto piccoli e con varie forme e dimensioni, che possono estendersi anche lungo l'intera sezione della zona interessata. È un tipo di corrosione estremamente difficile da diagnosticare, in quanto i *pit* interessano piccole aree, mentre la gran parte della superficie metallica esposta all'ambiente risulta inalterata. Interessa i materiali metallici a comportamento attivo-passivo ricoperti da film passivi che operano in ambienti con presenza di cloruri. In particolare, nei dispositivi di osteosintesi, questo tipo di corrosione è frequente nella testa di viti e nelle flange delle endoprotesi del femore prossimale e consta di due stadi: innesco e propagazione. Il primo è rappresentato dalla rottura locale del film protettivo dove inizia il *pit*; il secondo, invece, avviene una volta che il processo è stato innescato (fig. 3.4b). All'interno del *pit* avviene l'idrolisi degli ioni metallici che favoriscono l'acidificazione locale secondo la reazione:



Nel caso di acciai in presenza di cloruri la reazione diventa:



L'acidificazione all'interno del *pit* aumenta l'aggressività dell'ambiente in prossimità dell'apice ed inoltre richiama per elettroforesi gli ioni Cl^- presenti all'esterno. In questo modo l'apice del *pit* sarà sempre attivo, e quindi lavorerà come area anodica, mentre la zona esterna sarà sempre passiva e lavorerà come area catodica. Il processo così risulta auto-accelerante data l'enorme

differenza tra le aree catodiche e anodiche, dal cui rapporto dipende la velocità di corrosione per *pitting* (fig. 3.4b).

- **Corrosione galvanica:** questo tipo di corrosione avviene a causa del contatto tra due metalli caratterizzati da una differenza di potenziali standard di riduzione. Accade che il metallo più nobile funge da catodo ed è protetto, mentre quello meno nobile tende a corrodersi. La velocità di corrosione dipende dal rapporto dell'area catodica e anodica. È difficile che questo tipo di corrosione possa accadere in ortopedia, perché è impensabile fabbricare un dispositivo con due metalli differenti con il rischio di creare un contatto galvanico. Comunque sia, può verificarsi accidentalmente che fili di acciaio utilizzati in chirurgia per cerchiaggio possano entrare in contatto con impianti a base di leghe di titanio o cobalto (fig. 3.4c).
- **Corrosione per sfregamento (o *fretting*):** consiste nella rimozione fisica del metallo a causa dell'usura tra due superfici in moto relativo tra loro. Ciò porta ad un lento deterioramento delle superfici, con conseguente diminuzione dello strato di ossido protettivo del metallo, e aumenta la probabilità di un attacco corrosivo della superficie metallica (fig. 3.4d).
- **Corrosione sotto sforzo:** è un fenomeno corrosivo generato dalla combinazione di una sollecitazione a trazione in un ambiente chimicamente aggressivo. L'origine dello sforzo meccanico può nascere da forze esterne o stress termici. Questi possono contribuire all'insorgenza di una cricca depassivando localmente il metallo. In questo modo, la corrosione (a seconda della tipologia in fessura o per *pitting*) non fa altro che accelerare il processo di rottura del metallo, poiché l'avanzamento della cricca è dato da questo duplice effetto. Dal momento che le prestazioni meccaniche non saranno più garantite, la vita utile del dispositivo diminuisce notevolmente. Solitamente questa tipologia di corrosione si verifica in dispositivi che risultano meccanicamente sollecitati, come i fori delle viti per le piastre di fissaggio post-frattura (fig. 3.4e).
- **Corrosione a fatica:** è un fenomeno corrosivo generato dalla presenza di sforzi ciclici e variabili e interessa qualunque tipologia di materiale metallico che opera in ambiente anche poco aggressivi. Estremamente pericoloso, in

quanto può causare una rottura di schianto, è molto comune nelle protesi femorali, del ginocchio e della caviglia.

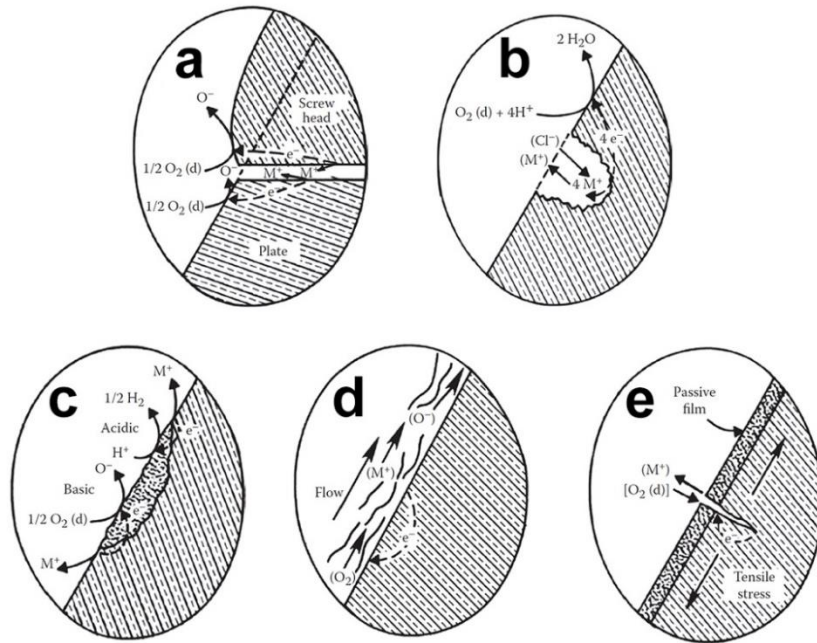


Fig. 3.4 Rappresentazione schematica di alcuni tipi di corrosione: a. Corrosione in fessura; b. Corrosione per vaiolatura; c. Corrosione galvanica; d. Corrosione per sfregamento; e. Corrosione sotto sforzo⁶⁵

⁶⁵ Tratta da: K. L. Ong (2014). *Orthopaedic ...* Cap. 12

Capitolo 4 – *Coating* per metalli: materiali e metodi di deposizione

Nel capitolo precedente è stato illustrato come i metalli siano utilizzati in campo ortopedico per la progettazione di protesi e impianti di osteosintesi. Nella parabola storica abbozzata nel cap. 1, si è visto come gli impianti ortopedici fossero utilizzati come dispositivi per risolvere problemi meccanico-funzionali che provavano a venire incontro, se non al pieno ristabilimento della salute dei pazienti, almeno al miglioramento della loro qualità di vita. Tuttavia, al contrario di quanto avviene oggi, il problema della biocompatibilità e dunque della risposta biologica dell'*host* per lungo tempo non è stato tenuto in considerazione. Il graduale e progressivo utilizzo dei biomateriali ha posto come sempre più urgente il problema: sebbene questi biomateriali riescano a fornire ottime prestazioni e ad emulare le proprietà meccaniche delle ossa, i fenomeni corrosivi e l'usura sono le cause principali del loro lento deterioramento, con il grave rischio di un'eventuale rottura dell'impianto ortopedico. Dunque, il principale obiettivo da parte degli esperti per far fronte a queste problematiche è stato lo sviluppo di strategie volte al miglioramento della biocompatibilità e della vita utile dell'impianto: tra queste figurano i *coating*, argomento di questo capitolo, i quali, realizzati con materiali biocompatibili e bioattivi, rappresentano una valida soluzione per migliorare l'osteointegrazione tra il tessuto osseo e l'impianto ortopedico.

4.1 *Coating*: non solo una strategia di osteointegrazione

Lo sviluppo dei *coating* rappresenta uno degli ambiti in cui si gioca il futuro nel settore dell'ortopedia, poiché essi offrono diverse soluzioni alle problematiche cui un impianto ortopedico va incontro. A differenza dei trattamenti superficiali di tipo fisico⁶⁶ che mirano ad aumentare la rugosità superficiale per garantire una buona adesione e differenziazione cellulare, la fabbricazione dei *coating* rientra fra i trattamenti superficiali di tipo chimico e mira a migliorare l'interazione con i tessuti periprotetici.

⁶⁶ Cfr. R. A. Gittens, R. Olivares-Navarrete, Z. Schwartz, B. D. Boyan (2014). *Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants* in *Acta biomaterialia*, 10(8), 3363-3371.

Abbiamo già descritto in par. 2.3 il meccanismo di osteointegrazione tra un impianto e tessuto osseo. Tuttavia, non sempre esso raggiunge perfettamente il suo scopo, poiché la superficie dell'impianto potrebbe non rispondere bene al processo osteointegrativo e avere alcune conseguenze, tra cui la formazione di tessuti fibrosi attorno all'impianto, una delle cause principali di allentamento della protesi⁶⁷.

Al fine di agevolare e migliorare l'osteointegrazione, un *coating* deve godere anche di una buona bioattività, cioè di quella particolare capacità di attivare una risposta biologica dei tessuti periprotetici. Affinché possa essere definito bioattivo, deve possedere proprietà di osteoinduzione e di osteoconduzione: la prima fa riferimento alla capacità di un materiale di indurre alla formazione di un nuovo tessuto osseo con l'adesione delle proteine (fattori di crescita) che portano alla differenziazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti; la seconda si riferisce non solo alla formazione di nuovo tessuto osseo ma anche ad una funzione angiogenetica, che permette l'aumento dell'integrazione tra osso e impianto. In fig. 4.1 è rappresentato schematicamente il meccanismo di osteoconduzione dovuto alla presenza di un *coating* a base di calcio fosfati.

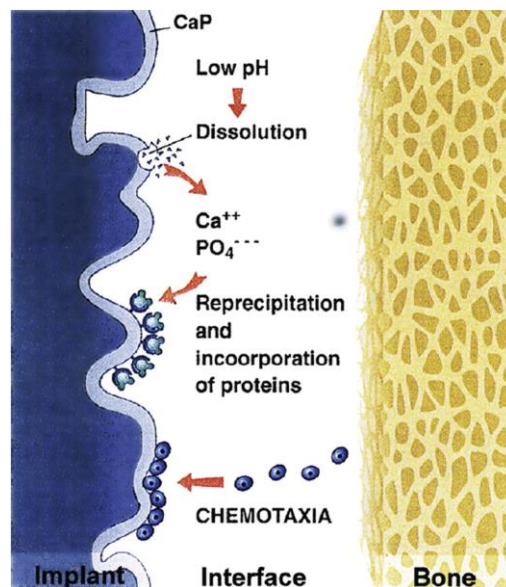


Fig. 4.1 Meccanismo di osteoconduzione tra impianto rivestito con un *coating* di calcio fosfati e l'osso umano

⁶⁷ Cfr. W. Jin, P. K. Chu (2019). *Orthopedic implants*. In *Encyclopedia of Biomedical Engineering* (pp. 425-439). Elsevier. Cfr. A. Hudecki, G. Kiryczyński, M. J. Łos (2019). *Biomaterials, definition, overview in Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine* (pp. 85-98). Academic Press.

Una diminuzione del pH locale tende a dissolvere parzialmente parte del *coating* con un conseguente rilascio di ioni calcio e fosfati in soluzione. Successivamente questi riprecipitano e sono incorporati all'interno della matrice di collagene e cristalli di idrossiapatite. L'aumento di ioni calcio e fosfato stimola la chemiotassia delle cellule ossee dall'interfaccia dell'osso verso l'impianto⁶⁸.

In linea di principio quindi l'obiettivo principale dei *coating* è quello di simulare il più possibile le caratteristiche dei tessuti periprotetici in modo tale che l'*host* non riconosca l'impianto come un elemento estraneo e che venga meno la possibilità di rigetto da parte del corpo ospitante. Tuttavia, questo non è l'unico scopo per il quale sono realizzati i rivestimenti e nel tempo si è cercato di conferire loro diverse proprietà, come mostrato in fig. 4.2. È stato osservato che nel periodo post-operatorio il paziente che ha subito un'installazione di un dispositivo ortopedico può essere esposto ad una maggiore vulnerabilità alle infiammazioni e infezioni batteriche, soprattutto quando non vi è una completa osteointegrazione tra la superficie dell'impianto e i tessuti periprotetici. In molti casi ciò può costituire una delle cause per le quali il paziente può essere sottoposto ad un'ulteriore operazione chirurgica per la rimozione della protesi e l'installazione di una nuova. Per questo motivo si è voluto studiare un *coating* ad azione antibatterica e antinfiammatoria che sfruttasse la capacità di *drug delivery* dei materiali polimerici o ceramici⁶⁹.

Un'altra proprietà non meno importante dei rivestimenti è la capacità di possedere un'azione protettiva nei confronti dei fenomeni corrosivi. Infatti, come già evidenziato in par. 3.2, non appena l'impianto è inserito all'interno del corpo, la superficie metallica è soggetta ai fenomeni corrosivi dovuti alla presenza di specie aggressive come gli ioni cloruri presenti nei fluidi corporei. La presenza di un *coating* ben adeso e compatto riesce ad agire come una barriera tra metallo e ambiente, moderando l'effetto della corrosione

⁶⁸ Cfr. R. A. Surmenev, M. A. Surmeneva, A. A. Ivanova (2014). *Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis—a review* in *Acta biomaterialia*, 10(2), 557-579.

⁶⁹ Cfr. C. Mas-Moruno, B. Su, M. J. Dalby (2019). *Multifunctional coatings and nanotopographies: toward cell instructive and antibacterial implants* in *Advanced healthcare materials*, 8(1), 1801103. Cfr. C. Pan, Z. Zhou, X. Yu (2018). *Coatings as the useful drug delivery system for the prevention of implant-related infections* in *Journal of orthopaedic surgery and research*, 13(1), 1-11. Cfr. O. Geuli, N. Metoki, T. Zada, M. Reches, N. Eliaz, D. Mandler (2017). *Synthesis, coating, and drug-release of hydroxyapatite nanoparticles loaded with antibiotics* in *Journal of Materials Chemistry B*, 5(38), 7819-7830

su diversi tipi di acciai, leghe di titanio e cobalto⁷⁰, e la protezione è essenzialmente tralata in un aumento del potenziale di corrosione.

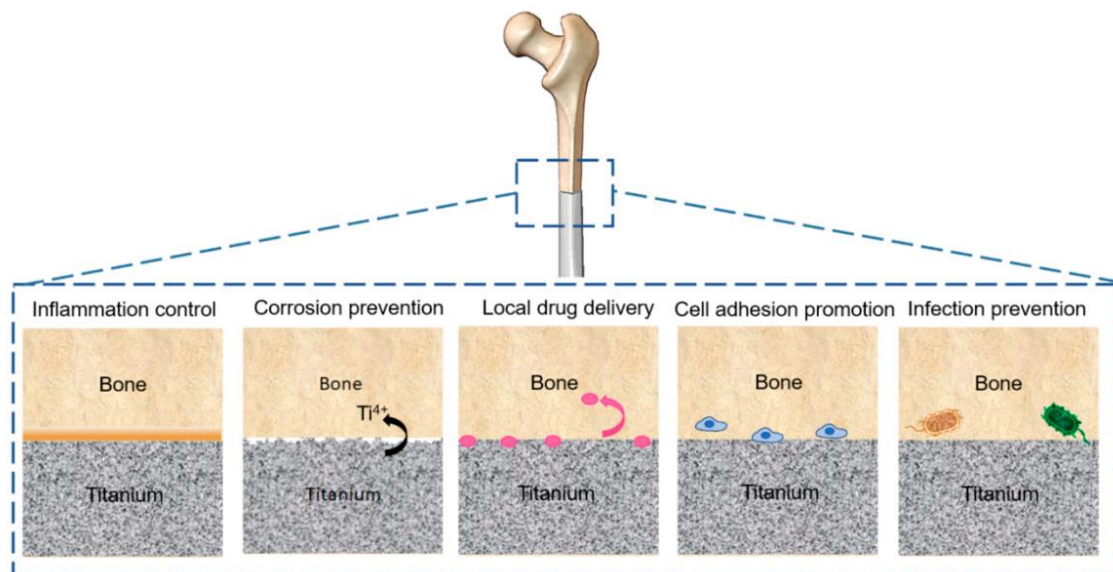


Fig. 4.2 Rappresentazione schematica delle differenti funzioni dei rivestimenti⁷¹

4.2 Materiali per *coating*

In questo lungo e articolato paragrafo si illustreranno alcuni dei materiali utilizzati per la realizzazione di rivestimenti per materiali metallici. Saranno dapprima descritti i materiali ceramici, i quali, grazie alle loro proprietà e inerzia chimica, risultano essere biocompatibili e assicurano l'osteointegrazione tra l'impianto e l'osso; successivamente i polimeri, un altro grande importante insieme di materiali che negli ultimi anni ha avuto un importante ruolo nel settore dei rivestimenti in campo ortopedico⁷².

⁷⁰ Cfr. M. Hussain, S. H. Askari Rizvi, N. Abbas, U. Sajjad, M. R. Shad, M. A. Badshah, A. I. Malik (2021). *Recent Developments in Coatings for Orthopedic Metallic Implants in Coatings*, 11(7), 791.

⁷¹ Tratta da: S. Cometa, M. A. Bonifacio, M. Mattioli-Belmonte, L. Sabbatini, E. De Giglio (2019). *Electrochemical strategies for titanium implant polymeric coatings: The why and how in Coatings*, 9(4), 268

⁷² Per ulteriori approfondimenti su questo argomento riguardante i materiali compositi che, seppur importante, esula dalla nostra trattazione, cfr. H. Y. Li, D. N. Huang, K. F. Ren, J. Ji (2020). *Inorganic-polymer composite coatings for biomedical devices in Smart Materials in Medicine*.

4.2.1 Materiali ceramici

I materiali ceramici fanno parte dell'uso quotidiano da tempi remotissimi e sono stati impiegati non solo nel settore delle telecomunicazioni, dell'energia e dell'ambiente ma anche nel campo della biomedicina. Sono materiali fragili ma caratterizzati da elevata durezza e resistenza alla corrosione. La loro inerzia chimica li rende tali da essere utilizzati per applicazioni biomediche. In particolare, nel campo dell'ortopedia, svolgono un ruolo fondamentale per la realizzazione di *scaffold*, riempimenti ossei e *coating* per protesi ortopediche⁷³.

- *Idrossiapatite*

L'idrossiapatite, la cui composizione chimica è $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, è uno dei più importanti materiali ceramici utilizzati in campo ortopedico dato che costituisce la parte mineralizzata delle ossa umane. Proprio per questo è molto utilizzata nel settore biomedico grazie alla sua elevata biocompatibilità, affinità con i biopolimeri e osteoconduttività che crea un forte legame tra l'interfaccia del fosfato di calcio e l'osso⁷⁴. Secondo alcuni studi, l'attività osteoblastica *in vitro* è migliore su *coating* in idrossiapatite realizzati attraverso la deposizione *sol-gel*, dal momento che si produce una morfologia più rugosa con un'elevata cristallinità⁷⁵. Queste proprietà rendono l'idrossiapatite un materiale versatile nel campo dell'ortopedia e dell'odontoiatria, poiché provvedono alla rigenerazione, sostituzione e ricostruzione del tessuto osseo senza alcun tipo di risposta tossica, infiammatoria o immunitaria. Sfortunatamente, le proprietà meccaniche molto blande la rendono un materiale fragile e non adatto a sopportare carichi. Questo limite tuttavia viene superato utilizzando l'idrossiapatite in altre modalità. Ad esempio, è impiegata nel settore dell'ingegneria tissutale per migliorare ed eliminare difetti delle ossa o dei denti come riempitivo osseo, e per sistemi di *drug delivery*. È anche impiegata sia come *coating*

⁷³ Cfr. J. Huang, S. Best (2014). *Ceramic biomaterials for tissue engineering* in *Tissue engineering using ceramics and polymers*, 3-34.

⁷⁴ Cfr. R. Z. LeGeros (2002). *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates* in *Clinical Orthopaedics and Related Research*[®], 395, 81-98.

⁷⁵ Cfr. H. W. Kim, H. E Kim, V. Salih, J. C. Knowles (2005). *Sol-gel-modified titanium with hydroxyapatite thin films and effect on osteoblast-like cell responses* in *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 74(3), 294-305

biomimetico per aumentare la biocompatibilità tra impianto e osso, sia come rivestimento protettivo per limitare i fenomeni corrosivi nel corpo umano⁷⁶.

- *Bioglass*

Si tratta di materiali bioattivi a base di silice. Sono stati sviluppati negli anni Settanta, quando Hench miscelò ad alta temperatura i precursori di diversi ossidi con il sistema di *melt quenching*⁷⁷. I *Bioglass* sono dei ceramici di grande interesse tecnologico poiché esibiscono diversi gradi di bioattività, la quale dipende fortemente dalla loro composizione. In particolare, il 45-52% in peso di SiO₂ assicura una buona adesione sia al tessuto osseo che ai tessuti molli; mentre, il 52-60% in peso di SiO₂ consente l'adesione solo all'osso. Per concentrazione in peso superiore al 60% di SiO₂ il *Bioglass* risulta bioinerte, con diminuzione drastica dell'osteointegrazione⁷⁸. Il *Bioglass*[®] 45S5 (avente una composizione in peso di 45% SiO₂, 24.5% CaO, 24.5% Na₂O, e 6% P₂O₅) è stato approvato dalla *Food and Drug Administration* nel 1985 e da allora è stato utilizzato in milioni di pazienti per riparare ossa e difetti dentali. La caratteristica che differenzia il *Bioglass* dagli altri ceramici è la facilità con la quale avvengono una serie di reazioni chimiche superficiali che generano uno strato di idrossiapatite e favoriscono una eccellente osteointegrazione. A differenza dell'idrossiapatite, che consente soltanto osteoconduzione di cellule ossee già differenziate, il *Bioglass* presenta una bioattività più marcata, perché è sia osteoconduttivo che osteoinduttivo, nella misura in cui induce le cellule primitive a

⁷⁶ Cfr. B. Ghiasi, Y. Sefidbakht, M. Rezaei (2019). Hydroxyapatite for biomedicine and drug delivery in *Nanomaterials for Advanced Biological Applications* (pp. 85-120). Springer, Cham. Cfr. W. S. W. Harun, R. I. M. Asri, J. Alias, F. H. Zulkifli, K. Kadirgama, S. A. C. Ghani, J. H. M. Shariffuddin (2018). *A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials* in *Ceramics International*, 44(2), 1250-1268. Cfr. A. A. El Hadad, E. Peón, F. R. García-Galván, V. Barranco, J. Parra, A. Jiménez-Morales, J. C. Galván (2017). *Biocompatibility and corrosion protection behaviour of hydroxyapatite sol-gel-derived coatings on Ti6Al4V alloy* in *Materials*, 10(2), 94. Cfr. R. I. M. Asri, W. S. W. Harun, M. A. Hassan, M. A., S. A. C. Ghani, Z. Buyong (2016). *A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol-gel and electrochemical depositions on biocompatible metals* in *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 57, 95-108.

⁷⁷ Il *melt quenching* è un processo che prevede la fusione di una miscela di diversi ossidi e carbonati in quantità stechiometrica. Questi sono portati a temperature superiori a 1300 °C e improvvisamente raffreddati per congelare la struttura atomica. Cfr. J. Haque, A. H. Munna, A. S. R. Ayon, Z. R. Shaitee, Z. R. A. Saha (2020). *A Comprehensive Overview of the Pertinence and Possibilities of Bioactive Glass in the Modern Biological World*. *Journal of Biomaterials*, 4(2), 23.

⁷⁸ Cfr. L. L. Hench, J. R. Jones (2015). *Bioactive glasses: frontiers and challenges* in *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 194.

differenziarsi per formare il tessuto osseo⁷⁹. Baino e Verné hanno fatto luce sulle potenzialità di questo materiale, che non è soltanto utilizzato nel campo dell'ortopedia come *scaffold* per rigenerazione ossea o *coating* per impianti ortopedici ma anche per lo sviluppo di *scaffold* per la rigenerazione di tessuti molli, impianti oculari, cicatrizzazione delle ferite e cateteri percutanei⁸⁰.

- *Zirconia (ZrO₂)*

È un ossido con una struttura policristallina bifasica che esiste in tre fasi – monoclinica, cubica e tetragonale – a seconda della temperatura e dell'ambiente. In base ad esse, cambia la tenacità e resistenza del materiale. Le sue proprietà intrinseche (basso coefficiente di attrito, inerzia chimica, elevata resistenza all'usura) la rendono ideale per applicazioni ortopediche. È abbastanza biocompatibile e difficilmente può causare delle reazioni allergiche. Studi recenti evidenziano la biocompatibilità e la resistenza alla corrosione attraverso la tecnica *Electron Beam Physical Vapour Deposition* (EBPVD), in cui lo strato di ossido depositato mostra una buona capacità passivante nei confronti del substrato metallico e prevenire i fenomeni corrosivi⁸¹. Per quanto riguarda l'adesione cellulare e la differenziazione, i risultati mostrano una migliore prestazione sui *coating* di zirconia rispetto all'acciaio nudo. Altri studi mostrano le proprietà anticorrosive aumentano grazie allo strato protettivo di ZrO₂⁸². Tuttavia, per aumentare le proprietà tribologiche e la resistenza alla corrosione, alcuni studi hanno utilizzato la *Yttria Stabilized Zirconia*

⁷⁹ Cfr. F. Baino, S. Hamzehlou, S. Kargozar (2018). *Bioactive glasses: where are we and where are we going?* in *Journal of functional biomaterials*, 9(1), 25. Cfr. E. Fiume, J. Barberi, E. Verné, F. Baino (2018). *Bioactive glasses: from parent 45S5 composition to scaffold-assisted tissue-healing therapies* in *Journal of functional biomaterials*, 9(1), 24.

⁸⁰ Cfr. F. Baino, E. Verné (2017). *Glass-based coatings on biomedical implants: A state-of-the-art review* in *Biomedical Glasses*, 3(1), 1-17. Cfr. N. O. Joy-anne, Y. Su, X. Lu, P. H. Kuo, J. Du, D. Zhu (2019). *Bioactive glass coatings on metallic implants for biomedical applications* in *Bioactive materials*, 4, 261-270.

⁸¹ Cfr. G. S. Kaliraj, V. Vishwakarma, K. Kirubakaran, T. Dharini, D. Ramachandran, B. Muthaiah (2018). *Corrosion and biocompatibility behaviour of zirconia coating by EBPVD for biomedical applications* in *Surface and Coatings Technology*, 334, 336-343

⁸² Cfr. F. Saberi, B. S. Boroujeny, A. Doostmohamdi, A. R. Baboukani, M. Asadikiya (2018). *Electrophoretic deposition kinetics and properties of ZrO₂ nano coatings* in *Materials Chemistry and Physics*, 213, 444-454.

(YSZ), un materiale costituito da ossido di zirconio che viene dopato con ossido di ittrio come stabilizzante⁸³.

- *Titania (TiO₂)*

Grazie alle sue proprietà meccaniche e optoelettroniche, l'ossido di titanio (*titanio*) è un materiale ampiamente utilizzato in diversi settori come nell'industria farmaceutica, nel campo delle vernici e dei pigmenti, della cosmesi e del fotovoltaico. Grazie alla sua buona permeabilità, recentemente è stato impiegato anche nel settore ortopedico per la realizzazione di *coating* che fungono da supporto per l'adesione e la differenziazione cellulare e ne sono state studiate le proprietà anticorrosive al variare delle diverse tecniche di deposizione⁸⁴. Inoltre, l'ossido di titanio si forma facilmente attraverso processi elettrochimici di *anodizing* effettuati sul titanio e le sue leghe. Il processo di *anodizing*, in particolare, porta alla formazione di nanostrutture tubolari che permettono non solo di proteggere il substrato dai fenomeni corrosivi ma anche di aumentare la forza di adesione di *coating* in idrossiapatite⁸⁵.

- *Ossido di zinco (ZnO)*

L'ossido di zinco è un materiale ceramico che offre una serie di vantaggi: è utilizzato in diversi settori della ricerca che vanno dagli pneumatici alle ceramiche, dai prodotti

⁸³ Cfr. M. Berni, N. Lopomo, G. Marchiori, A. Gambardella, M. Boi, M. Bianchi, ..., M. Marcacci (2016). *Tribological characterization of zirconia coatings deposited on Ti6Al4V components for orthopedic applications* in *Materials Science and Engineering: C*, 62, 643-655. Cfr. G. S. Kaliaraj, M. Bavanilathamuthiah, K. Kirubaharan, D. Ramachandran, T. Dharini, K. Viswanathan, V. Vishwakarma (2016). *Bio-inspired YSZ coated titanium by EB-PVD for biomedical applications* in *Surface and Coatings Technology*, 307, 227-235. Cfr. S. Mohandoss, S. Sureshkumar, V. Balasubramani, B. Venkatachalapathy, T. M. Sridhar (2017). *Bioinert nano yttria stabilized zirconia coatings on 316L SS for dental applications* in *J. Ceram. Process. Res.*, 18, 313-319.

⁸⁴ Cfr. S. Nagarajan, N. Rajendran (2009). *Surface characterisation and electrochemical behaviour of porous titanium dioxide coated 316L stainless steel for orthopaedic applications* in *Applied Surface Science*, 255(7), 3927-3932. Cfr. M. Velashjerdi, M. Soleymani, M. Z. Mehrizi (2020). *Preparation of crack-free TiO₂ coating by active screen plasma annealing method* in *Materials Today Communications*, 25, 101316. Cfr. M. A. Garcia-Lobato, A. I. Mtz-Enriquez, C. R. Garcia, M. Velazquez-Manzanares, F. Avalos-Belmontes, RR Ramos-Gonzalez, L. A. Garcia-Cerda (2019). *Corrosion resistance and in vitro bioactivity of dense and porous titania coatings deposited on 316L SS by spraying method* in *Applied Surface Science*, 484, 975-980.

⁸⁵ Cfr. M. İzmir, B. Ercan (2019). *Anodization of titanium alloys for orthopedic applications* in *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 13(1), 28-45. Cfr. S. F. Robertson, A. Bandyopadhyay, S. Bose (2019). *Titania nanotube interface to increase adhesion strength of hydroxyapatite sol-gel coatings on Ti-6Al-4V for orthopedic applications* in *Surface and Coatings Technology*, 372, 140-147.

farmaceutici all'agricoltura, dalle vernici ai prodotti chimici. Come biomateriale offre una serie di vantaggi, quali la buona biocompatibilità, l'alta resistenza alla corrosione, l'ottima attività antibatterica. Lo zinco è presente in tracce nel corpo umano e una concentrazione idonea di ioni zinco ha un effetto benefico sulla crescita cellulare. È stato anche dimostrato che una carenza di zinco inibisce la proliferazione dei condrociti e porta all'apoptosi cellulare dei preosteoblasti⁸⁶. Studi di Shen hanno evidenziato la biocompatibilità di rivestimenti a base di ossido di zinco su substrati in titanio. È stata notata adesione e differenziazione di osteoblasti e osteoclasti *in vitro*, indice di una buona biocompatibilità. In aggiunta, il *coating* svolge un'azione antibatterica su *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Studi circa le proprietà anticorrosive che i rivestimenti di ossido di zinco conferiscono a leghe di titanio sono stati condotti dalle *equipes* di Saidi e di Trino⁸⁷.

4.2.2 Materiali polimerici

Un'altra vasta gamma di materiali impiegati per la realizzazione di *coating* è rappresentata dai polimeri, e in particolare dai biopolimeri. La struttura chimica, il peso molecolare, la solubilità, lo *swelling*, il meccanismo di degradazione sono alcune delle

⁸⁶ Cfr. B. Guo, M. Yang, D. Liang, L. Yang, J. Cao, L. Zhang (2012). *Cell apoptosis induced by zinc deficiency in osteoblastic MC3T3-E1 cells via a mitochondrial-mediated pathway* in *Molecular and cellular biochemistry*, 361(1), 209-216. Cfr. G. R. Sauer, D. M. Smith, M. Cahalane, L. N. Wu, R. E. Wuthier (2003). *Intracellular zinc fluxes associated with apoptosis in growth plate chondrocytes* in *Journal of cellular biochemistry*, 88(5), 954-969.

⁸⁷ Cfr. X. Shen, Y. Hu, G. Xu, W. Chen, K. Xu, Q. Ran, ... K. Cai (2014). *Regulation of the biological functions of osteoblasts and bone formation by Zn-incorporated coating on microrough titanium* in *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(18), 16426-16440. Cfr. A. Kołodziejczak-Radzimska T. Jesionowski (2014). *Zinc oxide—from synthesis to application: a review* in *Materials*, 7(4), 2833-2881. Cfr. Z. Zhao, Y. Wan, M. Yu, H. Wang, Y. Cai, C. Liu, D. Zhang (2021). *Biocompatibility evaluation of micro textures coated with zinc oxide on Ti-6Al-4V treated by nanosecond laser* in *Surface and Coatings Technology*, 422, 127453. Cfr. X. Shen, Y. Hu, G. Xu, W. Chen, K. Xu, Q. Ran, ... K. Cai (2014). *Regulation of the biological functions of osteoblasts and bone formation by Zn-incorporated coating on microrough titanium* in *ACS applied materials & interfaces*, 6(18), 16426-16440. Cfr. R. Saidi, K. Raeissi, F. Ashrafizadeh, M. Khazrahi (2021). *The effect of zinc oxide coating morphology on corrosion performance of Ti-6Al-4V alloys* in *Journal of Alloys and Compounds*, 160771. Cfr. L. D. Trino, L. F. Dias, L. G. Albano, E. S. Bronze-Uhle, E. C. Rangel, C. F. Graeff, P. N. Lisboa-Filho (2018). *Zinc oxide surface functionalization and related effects on corrosion resistance of titanium implants* in *Ceramics International*, 44(4), 4000-4008.

proprietà intrinseche che possono incidere sulle loro *performance*⁸⁸. I biopolimeri si distinguono in naturali e sintetici.

- *Biopolimeri naturali*

Sono una classe di materiali che nell'ultimo decennio ha avuto grande rilievo nella ricerca. Possono essere di natura animale o vegetale e presentano diversi vantaggi, tra i quali buona biocompatibilità, non tossicità, facile riassorbimento e metabolizzazione da parte del corpo umano.

Senza dubbio, il **chitosano**, appartenente alla famiglia dei polisaccaridi, è il biopolimero naturale che grazie alla sua versatilità ha avuto maggior successo in diversi campi della ricerca. È il secondo per abbondanza dopo la cellulosa. Deriva dalla deacetilazione della chitina, un omopolimero della b-(1-4)-N-acetil-D-glucosamina, scoperta nei funghi da H. Braconnot nel 1811 ed estratta dall'esoscheletro dei crostacei. È un polimero policationico e la presenza dei gruppi amminici nella sua struttura fa sì che in condizioni di acidità sia solubile ($pK_a=6.3\sim 6.5$) in acqua. Sintetizzato da C. Rouget nel 1859, attraverso la deacetilazione della chitina⁸⁹, da una ventina d'anni ne sono state sviluppate diverse applicazioni nei campi dei biomateriali, delle tecnologie alimentari, dell'agricoltura, del trattamento delle acque reflue. Inoltre, il chitosano ha una elevata bioattività che lo rende molto adatto nell'ingegneria tissutale⁹⁰. Per quanto riguarda il campo ortopedico, grazie alla sua biocompatibilità il suo uso migliora l'adesione e la proliferazione cellulare. Inoltre, è utilizzato come *coating* per la limitazione degli effetti dei fenomeni corrosivi ma anche come *coating* a rilascio di farmaco⁹¹.

⁸⁸ Questo paragrafo riassume sinteticamente quanto espresso in: J. Song, B. Winkeljann, O. Lieleg (2020). *Biopolymer-Based Coatings: Promising Strategies to Improve the Biocompatibility and Functionality of Materials Used in Biomedical Engineering in Advanced Materials Interfaces*, 7(17), 2000850

⁸⁹ Si rimanda a P. R. Sivashankari, M. Prabaharan (2017). *Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan in Chitosan Based Biomaterials Volume 1* (pp. 117-133). Woodhead Publishing.

⁹⁰ Cfr. E. Avcu, F. E. Baştan, H. Z. Abdullah, M. A. U. Rehman, Y. Y. Avcu, A. R. Boccaccini (2019). *Electrophoretic deposition of chitosan-based composite coatings for biomedical applications: A review in Progress in Materials Science*, 103, 69-108.

⁹¹ Cfr. H. Ashassi-Sorkhabi, A. Kazempour (2020). *Chitosan, its derivatives and composites with superior potentials for the corrosion protection of steel alloys: A comprehensive review in Carbohydrate polymers*, 237, 116110. Cfr. M. Finšgar, A. P. Uzunalić, J. Stergar, L. Gradišnik, U. Maver (2016). *Novel chitosan/diclofenac coatings on medical grade stainless steel for hip replacement application in Scientific reports*, 6(1), 1-17. Cfr. M. Stevanovic, M. Došić, A. Jankovic, V. Kojic, M. Vukasinovic-Sekulic, J. Stojanovic, ... V. Miskovic-Stankovic (2018). *Gentamicin-loaded bioactive hydroxyapatite/chitosan composite coating electrodeposited on titanium in ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(12), 3994-4007.

Un altro polisaccaride utilizzato è l'**alginato**, che è costituito da una macromolecola polianionica ($pK_a=3.3\sim 3.6$). È composto da due unità ripetitive: b-D-acido manuronico, la cui presenza incide sulle proprietà reologiche, e a-L-acido guluronico, che determina le proprietà di *gelling*. Deriva dalle alghe brune e si ottiene tramite un processo di estrazione alcalina. Come il chitosano, anche l'alginato è un biopolimero versatile ed è stato utilizzato per la produzione di idrogeli, microsfele, schiume, spugne e fibre in diversi settori del campo biomedico. La sua capacità di gelificare dipende dalla presenza di cationi divalenti (come gli ioni Ca^{2+}) tra due monomeri di a-L-acido guluronico⁹². Cheng descrive il meccanismo di deposizione elettrochimica in cui la generazione di ioni calcio avviene alla superficie dell'anodo grazie alla presenza di particelle di $CaCO_3$ che si decompongono per via della reazione di sviluppo di ossigeno⁹³: gli ioni calcio rilasciati interagiscono con le macromolecole di alginato in modo da gelificare direttamente sull'elettrodo. Tuttavia, la realizzazione di *coating* è realizzata anche per via elettroforetica grazie alla capacità di gelificare in presenza di H^+ , con formazione di acido alginico⁹⁴.

Diventa sempre più comune l'introduzione di proteine nel campo dei biomateriali per la realizzazione di *coating*. Le proteine sono dei polipeptidi, polimeri costituiti da una catena di diversi aminoacidi. Questi sono connessi tra di loro tramite il legame peptidico, caratteristico di questa famiglia di biopolimeri. Vengono chiamate proteine quando il peso molecolare di una catena polipeptidica supera un certo valore di soglia (~10kDa). Sono utilizzate principalmente per aumentare la biocompatibilità dei metalli con l'ambiente fisiologico umano. Infatti, si è notato come l'adsorbimento di proteine (come albumina, collagene, fibronectina, lisina) aumenti la biocompatibilità, dal momento che le cellule non interagiscono con la superficie dell'impianto, bensì con *coating* proteico. Dunque, la presenza di proteine migliora l'adesione cellulare degli osteoblasti, la loro proliferazione e differenziazione, elementi fondamentali per la rigenerazione delle ossa⁹⁵. Una di queste proteine, ad esempio, è il **collagene**, che, come è stato già detto in par. 2.1,

⁹² Cfr. M.B. Łabowska, I. Michalak, J. Detyna (2019). *Methods of extraction, physicochemical properties of alginates and their applications in biomedical field—a review* in *Open Chemistry*, 17(1), 738-762.

⁹³ Cfr. Y. Cheng, X. Luo, J. Betz, G. F. Payne, W. E. Bentley, G. W. Rubloff (2011). *Mechanism of anodic electrodeposition of calcium alginate* in *Soft Matter*, 7(12), 5677-5684.

⁹⁴ Cfr. M. Warcaba, K. Kowalski, A. Kopia, T. Moskalewicz (2021). *Impact of Surface Topography, Chemistry and Properties on the Adhesion of Sodium Alginate Coatings Electroforetically Deposited on Titanium Biomaterials* in *Metallurgical and Materials Transactions A*, 1-14.

⁹⁵ Cfr. M. Talha, Y. Ma, P. Kumar, Y. Lin, A. Singh (2019). *Role of protein adsorption in the bio corrosion of metallic implants—A review* in *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 494-506.

rappresenta il 90% della componente organica del tessuto osseo. È stato utilizzato in diversi studi per la realizzazione di *coating* compositi con fosfati di calcio. Infatti, la presenza di ioni calcio migliora la deposizione del composito. Così facendo, si crea un collagene mineralizzato grazie alla presenza di gruppi $-COO^-$ del collagene in prossimità della superficie, che agiscono come siti di nucleazione durante il processo di elettrodeposizione catodica. L'**albumina** è una proteina che è presente in alte concentrazioni all'interno del plasma sanguigno e promuove non solo l'assorbimento cellulare ma anche la nucleazione di idrossiapatite. Höhn ha dimostrato che la presenza di **Bovine Serum Albumin** (BSA) aumenta inoltre la resistenza alla corrosione. In un altro caso studio, il BSA è inserito all'interno di un composito formato da una matrice di collagene e idrossiapatite, per via elettrochimica per migliorare l'adesione degli osteoblasti al variare del potenziale e del gradiente di pH⁹⁶.

- *Biopolimeri sintetici*

A differenza di quelli naturali, i biopolimeri sintetici presentano alcuni vantaggi e sono funzionalizzabili a seconda del loro scopo: si possono facilmente sintetizzare in diversi tipi di copolimeri, si possono ottenere con peso molecolare variabile, si ottengono infinità di strutture e hanno un costo minore. D'altro canto, non hanno un'ottima biocompatibilità e hanno un comportamento tendenzialmente idrofobico che non permette una buona adesione cellulare. Quest'ultima però può essere migliorata con funzionalizzazioni specifiche⁹⁷.

L'**acido polilattico** (PLA) è un poliestere alifatico derivabile anche dalle biomasse (canna da zucchero e amido di mais). È riconosciuto come *Generally Recognized As Safe* (GRAS) dalla *Food and Drug Administration*. È largamente utilizzato in campo

⁹⁶ Cfr. R. Sikkema, K. Baker, I. Zhitomirsky (2020). *Electrophoretic deposition of polymers and proteins for biomedical application* in *Advances in Colloid and Interface Science*, 102272. Cfr. C. C. Yang, C. Y. Huang, C. C. Lin, S. K. Yen (2010). *Electrolytic Deposition of Collagen/HA Composite on Post HA/TiO₂ Coated Ti6Al4V Implant Alloy* in *Journal of The Electrochemical Society*, 158(2), E13. Cfr. Y. Guo, Y. Su, R. Gu, Z. Zhang, G. Li, J. Lian, L. Ren (2020). *Enhanced corrosion resistance and biocompatibility of biodegradable magnesium alloy modified by calcium phosphate/collagen coating* in *Surface and Coatings Technology*, 401, 126318. Cfr. S. Höhn, A. Braem, B. Neirinck, S. Virtanen (2017). *Albumin coatings by alternating current electrophoretic deposition for improving corrosion resistance and bioactivity of titanium implants* in *Materials Science and Engineering: C*, 73, 798-807. Cfr. J. Zhuang, J. Lin, J. Li, H. Wang, K. Cheng, W. Weng (2016). *Electrochemical deposition of mineralized BSA/collagen coating* in *Materials Science and Engineering: C*, 66, 66-76.

⁹⁷ Cfr. M. Reddy, D. Ponnamma, R. Choudhary, K. K. Sadasivuni (2021). *A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds* in *Polymers*, 13(7), 1105.

biomedico grazie alle sue caratteristiche bioassorbibili e biodegradabili, dal momento che in ambiente fisiologico è metabolizzato da enzimi con la formazione di composti atossici. Inoltre, le sue buone proprietà meccaniche lo rendono adatto per la fabbricazione di dispositivi degradabili in campo ortopedico (ad es. viti, piastre), impianti dentali, impalcatura cellulare e suture. Questo biopolimero va incontro a una degradazione idrolitica attraverso un meccanismo di erosione: dapprima è convertito in acido lattico e successivamente in acqua e anidride carbonica. La sua velocità di degradazione è molto bassa (da 2 a 5 anni *in vivo*) e dipende essenzialmente dal grado di cristallinità. A causa del suo comportamento idrofobico e dell'assenza di gruppi funzionali, non promuove l'adesione cellulare e ciò potrebbe rappresentare un problema⁹⁸. Tuttavia, questi svantaggi possono essere superati utilizzando l'acido polilattico in materiale composito per aumentarne la biocompatibilità. Recenti studi condotti hanno dimostrato un miglioramento della vitalità cellulare su *scaffold* di chitosano e PLA⁹⁹. Grazie al comportamento idrofilico del chitosano e alla sua bioattività, questo composito migliora l'adesione cellulare degli osteoblasti rispetto allo *scaffold* di PLA puro. Altri studi mostrano che composti con PLA offrono una migliore biocompatibilità e resistenza alla corrosione¹⁰⁰.

Un altro biopolimero di natura sintetica è il **polivinilacetato (PVAc)**, biodegradabile e biocompatibile, che non sviluppa alcun effetto tossico o cancerogeno per l'uomo. Si sintetizza a partire dall'acetato di vinile, che è l'estere vinilico dell'acido acetico. Grazie alla sua biocompatibilità, è impiegato come materiale per la realizzazione di dispositivi biomedicali, come pure per incrementare l'adesione cellulare osteoblastica. Diversi

⁹⁸ Cfr. L. W. McKeen (2014). *Plastics used in medical devices in Handbook of polymer applications in medicine and medical devices* (pp. 21-53). William Andrew Publishing. Cfr. S. Farah, D. G. Anderson, R. Langer (2016). *Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—A comprehensive review in Advanced drug delivery reviews*, 107, 367-392. Cfr. H. Zhu, J. Ji, R. Lin, C. Gao, L. Feng, J. Shen (2002). *Surface engineering of poly (d, l-lactic acid) by entrapment of chitosan-based derivatives for the promotion of chondrogenesis in Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 62(4), 532-539. Cfr. L. S. Nair, C. T. Laurencin (2007). *Biodegradable polymers as biomaterials in Progress in polymer science*, 32(8-9), 762-798.

⁹⁹ Cfr. S. Zeng, J. Ye, Z. Cui, J. Si, Q. Wang, X. Wang, ...W. Chen (2017). *Surface biofunctionalization of three-dimensional porous poly (lactic acid) scaffold using chitosan/OGP coating for bone tissue engineering in Materials Science and Engineering: C*, 77, 92-101.

¹⁰⁰ Cfr. L. Zhang, J. Pei, H. Wang, Y. Shi, J. Niu, F. Yuan ... G. Yuan (2017). *Facile preparation of poly (lactic acid)/brushite bilayer coating on biodegradable magnesium alloys with multiple functionalities for orthopedic application in ACS applied materials & interfaces*, 9(11), 9437-9448. Cfr. A. Abdal-hay, N. A. Barakat, J. K. Lim (2013). *Influence of electrospinning and dip-coating techniques on the degradation and cytocompatibility of Mg-based alloy in Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 420, 37-45.

studi sono stati condotti nel campo dei rivestimenti dei materiali metallici utilizzando il PVAc come biomateriale in composito per migliorare le *performance*, e hanno dimostrato un miglioramento sia nell'adesione del *coating* al substrato metallico grazie alla presenza del polimero sia della bioattività grazie alla morfologia del rivestimento. Inoltre, studi riguardo sulla resistenza alla corrosione hanno mostrato ottimi risultati riferibili alla forte interazione chimica che si viene a creare tra substrato e rivestimento composito di idrossiapatite e PVAc. Da un punto di vista di biocompatibilità, questo rivestimento offre una risposta migliore rispetto al substrato privo di rivestimento¹⁰¹.

4.3 Metodi di deposizione

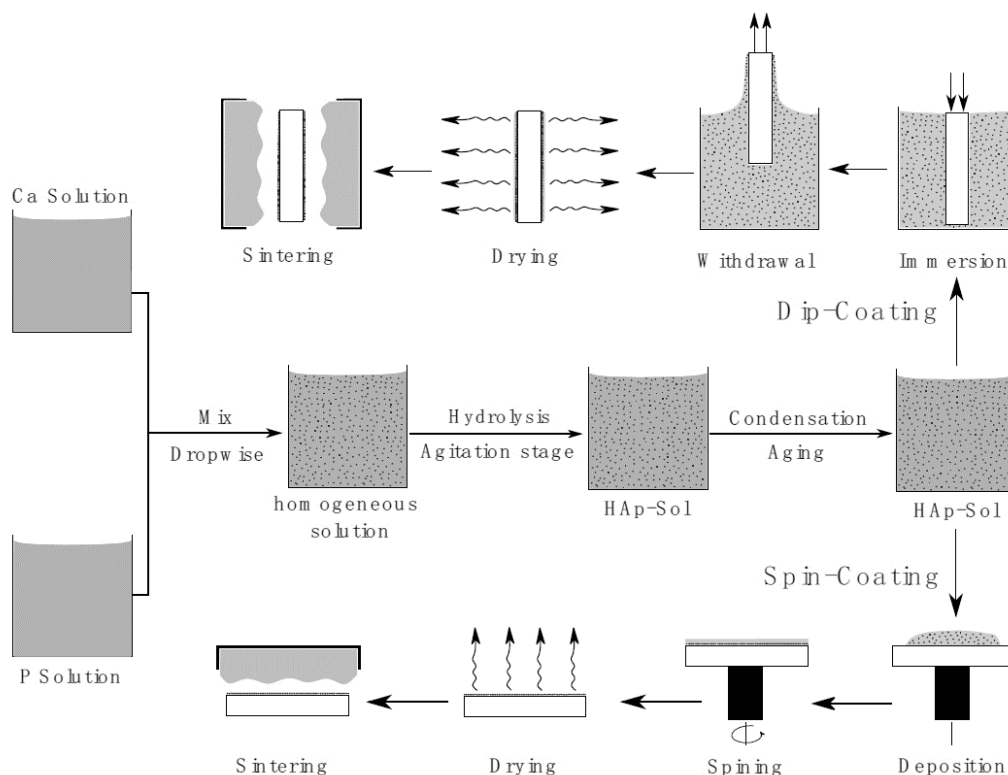
Dopo aver illustrato i materiali maggiormente utilizzati nel campo dei rivestimenti dei biomateriali ortopedici, è necessario trattare i metodi di deposizione dei *coating* maggiormente utilizzati in questo settore. Non solo ne saranno descritte le procedure, ma saranno anche evidenziati per ognuna punti di forza e di debolezza¹⁰².

¹⁰¹ Cfr. H. Hu, C. Lin, P. P. Y. Lui, Y. Leng (2003). *Electrochemical deposition of hydroxyapatite with vinyl acetate on titanium implants* in *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 65(1), 24-29. Cfr. H. B. Hu, C. J. Lin, R. Hu, Y. Leng (2002). *A study on hybrid bioceramic coatings of HA/poly (vinyl acetate) co-deposited electrochemically on Ti-6Al-4V alloy surface* in *Materials Science and Engineering: C*, 20(1-2), 209-214. Cfr. A. Abdal-Hay, A. S. Hamdy, K. A. Khalil, J. H. Lim (2015). *A novel simple one-step air jet spinning approach for deposition of poly (vinyl acetate)/hydroxyapatite composite nanofibers on Ti implants* in *Materials Science and Engineering: C*, 49, 681-690.

¹⁰² Questo paragrafo riassume sinteticamente quanto espresso in: Cfr. A. Dehghanhadikolaei, B. Fotovvati (2019). *Coating techniques for functional enhancement of metal implants for bone replacement: a review* in *Materials*, 12(11), 1795.; Cfr. B. Fotovvati, N. Namdari, A. Dehghanhadikolaei (2019). *On coating techniques for surface protection: A review* in *Journal of Manufacturing and Materials Processing*, 3(1), 28; Cfr. B. Moore, E. Asadi, G. Lewis (2016). *Deposition methods for microstructured and nanostructured coatings on metallic bone implants: a review* in *Advances in Materials Science and Engineering*, 2017.; Cfr. P. Bhattacharya, S. Neogi (2017). *Techniques for deposition of coatings with enhanced adhesion to bio-implants* in *Adhes. Pharm. Biomed. Dent. Fields; John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA*, 235-255.

4.3.1. Sol-gel

Il metodo di deposizione *Sol-Gel*, tecnica abbastanza semplice e versatile, è tra i più diffusi per realizzare *coating* con materiali ceramici e permette di ricoprire substrati porosi anche con geometrie abbastanza complesse. Questo metodo prevede la preparazione di una soluzione colloidale (chiamata *Sol*) al cui interno sono presenti i precursori del *coating*. A titolo esemplificativo verrà descritta di seguito la realizzazione di *coating* a base di fosfati di calcio. Per l'appunto si utilizzano precursori per il calcio e il fosforo disciolti in soluzione di acqua ed etanolo, in cui avvengono reazioni di idrolisi e condensazione¹⁰³. Successivamente la soluzione viene riscaldata in modo tale da far evaporare parte del solvente ed ottenere la giusta viscosità. A questo punto, la soluzione da liquida assume una consistenza gelatinosa (chiamata *Gel*). Il gel viene usato nel processo di rivestimento che avviene per *dip coating* o per *spin coating* (fig. 4.3).


 Fig. 4.3 Rappresentazione schematica della tecnica sol-gel e del dip coating¹⁰⁴

¹⁰³ Cfr. A. Jaafar, C. Hecker, P. Árki, Y. Joseph (2020). *Sol-gel derived hydroxyapatite coatings for titanium implants: A review in Bioengineering*, 7(4), 127, p.5

¹⁰⁴ Tratta da: *ibid.*, p.6

Nel *dip coating*, metodo utilizzato soprattutto quando si hanno geometrie particolari, il substrato metallico viene immerso nella soluzione *Gel*, con cui entra a contatto in modo omogeneo in tutta la superficie; viene quindi estratto dalla soluzione con una velocità pressoché costante per garantire uniformità dello strato gel sul substrato ed infine è sottoposto ad un processo di essiccazione durante il quale avviene l'evaporazione del solvente. Nello *spin coating*, utilizzato invece principalmente per superfici piane, il Gel è posto sulla superficie del substrato che viene posto in rotazione e la distribuzione uniforme è garantita dalla forza centrifuga che agisce sul fluido. Ovviamente le *performance* e la qualità del *coating* dipendono dai parametri operativi di deposizione come la velocità di estrazione, il numero e il tempo delle immersioni per il *dip coating*, la velocità di rotazione, viscosità del gel per lo *spin coating*¹⁰⁵. Per migliorare la resistenza meccanica dei *coating* è previsto sempre un processo di *annealing* per far avvenire la sinterizzazione e migliorare l'adesione sul substrato¹⁰⁶.

Questa tecnica di fabbricazione risulta molto semplice e non particolarmente costosa (la spesa maggiore è riferibile ai reagenti). Studi condotti attestano che i rivestimenti tramite deposizione *Sol-Gel* conferiscono una migliore resistenza alla corrosione e quindi riducono il rilascio di ioni metallici da parte del *device*¹⁰⁷. Tuttavia, il metodo presenta alcuni svantaggi: processo lento non industrialmente sostenibile, scarsa resistenza meccanica e all'usura, disomogeneità del *coating* dovuta a un controllo non ottimale dei parametri del processo e presenza di cricche dovute al processo di sinterizzazione. Quest'ultimo inconveniente è superabile, conducendo uno step finale a bassa temperatura piuttosto che utilizzare il processo di *annealing*. In questo modo è possibile incorporare nel *coating* anche materiali termolabili come polimeri, farmaci e biomolecole, i quali conferiscono non solo proprietà migliori dal punto di vista meccanico ed evitano la formazione di

¹⁰⁵ Cfr. *ibid.*, p.5

¹⁰⁶ Cfr. D. M. Liu, Q. Yang, T. Troczynski (2002). *Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates* in *Biomaterials*, 23(3), 691-698.

¹⁰⁷ Cfr. D. Wang, G. P. Bierwagen (2009). *Sol-gel coatings on metals for corrosion protection* in *Progress in organic coatings*, 64(4), 327-338. Cfr. J. Y. Han, Z. T. Yu, L. Zhou (2008). *Hydroxyapatite/titania composite bioactivity coating processed by the sol-gel method* in *Biomedical Materials*, 3(4), 044109. Cfr. S. M. Hussein, M. T. Mohammed (2019). *Pure and bilayer sol-gel nanolayers derived on a novel Ti surface for load bearing applications* in *Materials Today: Proceedings*, 18, 2217-2224. Cfr. U. Anjaneyulu, U. Vijayalakshmi (2017). *Preparation and characterization of novel sol-gel derived hydroxyapatite/Fe₃O₄ composites coatings on Ti-6Al-4V for biomedical applications* in *Materials Letters*, 189, 118-121.

cricche sulla superficie del deposito, ma assicurano anche un aumento delle prestazioni in termini di biocompatibilità.

4.3.2 *Electrochemical deposition*

Nel campo dei *coating*, l'elettrochimica ha avuto da sempre una tradizione ben attestata, dato che una delle prime applicazioni riguarda la deposizione di rivestimenti protettivi a base di metalli, polimeri o ossidi. Ancora oggi rappresenta un punto di riferimento per la realizzazione di biomateriali grazie alla sua versatilità, facilità di esecuzione, basso costo e prestazioni dei rivestimenti. Si tratta di processi controllabili e a basse temperature, a differenza delle altre tecniche, e quindi ideali per la deposizione di materiali termolabili come biopolimeri o molecole organiche. Inoltre, i metodi elettrochimici di deposizione si prestano per la realizzazione di *coating* a rilascio di farmaco¹⁰⁸. In linea di principio, la deposizione prevede l'utilizzo di una corrente elettrica e avviene in una cella elettrochimica in cui è applicata una differenza di potenziale tra due elettrodi immersi in una soluzione elettrolitica. La deposizione avviene su un elettrodo di lavoro che, a seconda del tipo di materiale, può funzionare da anodo, sede in cui sono presenti le reazioni di ossidazione, o da catodo, sede in cui avvengono i processi di riduzione. L'altro elettrodo funge da contro-elettrodo e, insieme al *reference* se presente, serve a chiudere il circuito.

Distinguiamo due tipi di deposizione elettrochimica: l'elettrodeposizione e la deposizione elettroforetica (fig. 4.4). L'elettrodeposizione consiste in reazioni di ossidoriduzione che avvengono sulla superficie dell'elettrodo sulla quale i precursori si depositano sottoforma di metallo (*electroplating*) o sottoforma di ossidi o idrossidi (per anodizzazione o elettrogenazione di basi)¹⁰⁹.

¹⁰⁸ Cfr. O. Geuli, N. Metoki, T. Zada, M. Reches, N. Eliaz, D. Mandler (2017). *Synthesis, coating, and drug-release of hydroxyapatite nanoparticles loaded with antibiotics* in *Journal of Materials Chemistry B*, 5(38), 7819-7830. Cfr. K. D. Patel, A. El-Fiqi, H. Y. Lee, R. K. Singh, D. A. Kim, H. H. Lee, H. W. Kim (2012). *Chitosan–nanobioactive glass electrophoretic coatings with bone regenerative and drug delivering potential* in *Journal of Materials Chemistry*, 22(47), 24945-24956. Cfr. M. Stevanovic, M. Došić, A. Jankovic, V. Kojic, M. Vukasinovic-Sekulic, J. Stojanovic, ... V. Miskovic-Stankovic (2018). *Gentamicin-loaded bioactive hydroxyapatite/chitosan composite coating electrodeposited on titanium* in *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(12), 3994-4007.

¹⁰⁹ Nel caso dell'*electroplating*, gli ioni metallici si depositano per mezzo di reazioni di riduzione al catodo secondo la reazione generica: $M^{z+} + ze^- \rightarrow M$. Nel caso di ossidi e idrossidi, dato che sono caratterizzati

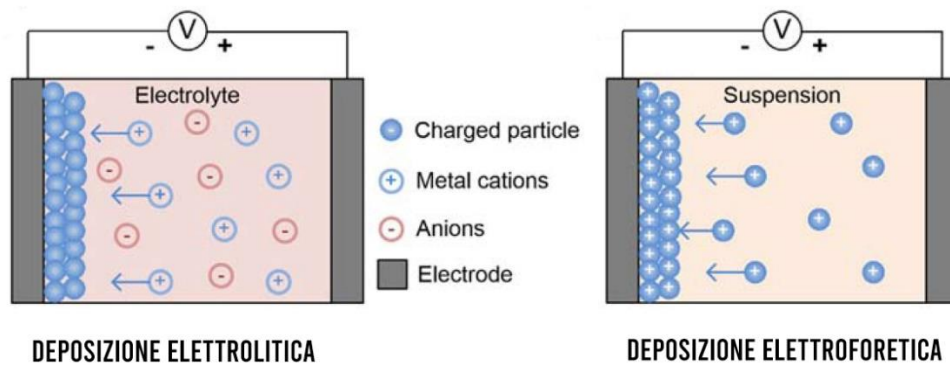


Fig. 4.4 Rappresentazione schematica della deposizione elettrolitica e della deposizione elettroforetica¹¹⁰

La deposizione elettroforetica consta essenzialmente di due processi: la migrazione (ovvero l'elettroforesi), in cui le specie cariche in soluzione risentono dell'azione del campo elettrico che si genera tra i due elettrodi e sono attratte dall'elettrodo con carica opposta allo ione, e la deposizione. A differenza di quella elettrolitica, la deposizione elettroforetica può riguardare non solo specie non cariche in soluzione, come polveri o colloidi di ceramici che saranno successivamente portati a processi di sinterizzazione, ma anche biopolimeri e compositi¹¹¹. La cinetica di deposizione è stata studiata da Sakar¹¹² sulla base del modello proposto da Hamaker. La resa di deposizione è espressa dalla formula (4.1):

$$w = \int_{t_1}^{t_2} f \cdot \mu \cdot S \cdot E \cdot C_s \cdot dt \quad (4.1)$$

da una bassa solubilità, le reazioni all'anodo portano alla precipitazione sulla superficie secondo le reazioni: $M^{z+}_{(aq)} \rightarrow M^{z+}_{(aq)} + e^-$; $M^{z+}_{(aq)} + (z+1)OH^-_{(aq)} \rightarrow M(OH)_{z+1}(s)$. Per la deposizione di fosfati di calcio come idrossiapatite, si invece instaurano diverse reazioni di equilibrio dovuta all'elettrogenazione di base, ossia formazione di ioni ossidrilici sulla superficie dell'elettrodo data dalle reazioni di riduzione delle molecole di acqua o nitrati. Un altro caso da annoverare è la crescita dell'ossido di titanio su titanio o le sue leghe attraverso un processo di *anodizing* (4.2.1).

¹¹⁰ Tratta da: A. Karatutlu, A. Barhoum, A. Sapelkin (2018). *Liquid-phase synthesis of nanoparticles and nanostructured materials in Emerging applications of nanoparticles and architecture nanostructures* (pp. 1-28). Elsevier.

¹¹¹ Cfr. R. Sikkema, K. Baker, I. Zhitomirsky (2020). *Electrophoretic deposition of polymers and proteins for biomedical applications. Advances in Colloid and Interface Science*, 102272. Cfr. S. Heise, L. R. Rivera, A. R. Boccaccini (2019). *Bioactive glass containing coatings by electrophoretic deposition: development and applications in Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses* (pp. 3-33). Woodhead Publishing. Cfr. F. Pishbin, A. Simchi, M. P. Ryan, A. R. Boccaccini (2011). *Electrophoretic deposition of chitosan/45S5 Bioglass® composite coatings for orthopaedic applications in Surface and Coatings Technology*, 205(23-24), 5260-5268.

¹¹² Cfr. P. Sarkar, P. S. Nicholson (1996). *Electrophoretic deposition (EPD): mechanisms, kinetics, and application to ceramics. Journal of the American Ceramic Society*, 79(8), 1987-2002.

in cui w rappresenta la resa, f un fattore di efficienza che tiene conto del fatto che non tutte le particelle arrivano all'elettrodo, E l'intensità del campo elettrico, μ la mobilità elettroforetica, A la superficie dell'elettrodo e C la concentrazione delle particelle sospese¹¹³. Studi effettuati *in vitro* e *in vivo* hanno mostrato risultati interessanti in termini di miglioramento della resistenza alla corrosione e biocompatibilità, grazie alla capacità di questo metodo di rivestire i substrati in maniera omogenea¹¹⁴.

4.3.3 *High Velocity Suspension Flame-Spray*

La tecnica consiste nella deposizione di un rivestimento tramite un sistema, schematizzato in fig. 4.5, costituito da una camera nella quale avviene la combustione di una miscela di combustibili alimentata di continuo al fine di produrre una corrente di gas di combustione ad alta pressione. Una corrente liquida, contenente il materiale polverizzato in sospensione con il quale si rivestirà il substrato, è unita alla corrente gassosa all'interno di un *nozzle* e crea uno spray ad alta velocità. Le particelle, che a causa delle alte temperature (circa 2500 °C) risulteranno semisolide, andranno a rivestire il substrato creando così il *coating*. È superfluo affermare che con questa tecnica i materiali d'elezione sono i ceramici che riescono a resistere alle alte temperature¹¹⁵. In aggiunta, le elevate

¹¹³ Cfr. L. Besra, M. Liu (2007). *A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD) in Progress in materials science*, 52(1), 1-61.

¹¹⁴ Cfr. L. Sorkhi, M. Farrokhi-Rad, T. Shahrabi (2019). *Electrophoretic deposition of hydroxyapatite–chitosan–titania on stainless steel 316 L in Surfaces*, 2(3), 458-467. Cfr. K. Khlifi, H. Dhiflaoui, A. Ben Rhouma, J. Faure, H. Benhayoune, A. Ben Cheikh Laarbi (2021). *Nanomechanical Behavior, Adhesion and Corrosion Resistance of Hydroxyapatite Coatings for Orthopedic Implant Applications in Coatings*, 11(4), 477. Cfr. Q. Chen, L. Cordero-Arias, J. A. Roether, S. Cabanas-Polo, S. Virtanen, A. R. Boccaccini (2013). *Alginate/Bioglass® composite coatings on stainless steel deposited by direct current and alternating current electrophoretic deposition in Surface and Coatings Technology*, 233, 49-56. Cfr. M. Assadian, H. Jafari, S. M. Ghaffari Shahri, M. H. Idris, B. Gholampour (2014). *Corrosion resistance of EPD nano-hydroxyapatite coated 316L stainless steel in Surface engineering*, 30(11), 806-813. Cfr. P. C. Rath, L. Besra, B. P. Singh, S. Bhattacharjee (2012). *Titania/hydroxyapatite bi-layer coating on Ti metal by electrophoretic deposition: Characterization and corrosion studies in Ceramics International*, 38(4), 3209-3216. Cfr. Y. Y. Shi, M. Li, Q. Liu, Z. J. Jia, X. C. Xu, Y. Cheng, Y., Y. F. Zheng (2016). *Electrophoretic deposition of graphene oxide reinforced chitosan–hydroxyapatite nanocomposite coatings on Ti substrate in Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(3), 48.

¹¹⁵ Cfr. H. L. Yao, H. T. Wang, X. B. Bai, G. C. Ji, Q. Y. Chen (2018). *Improvement in mechanical properties of nano-structured HA/TiO₂ multilayer coatings deposited by high velocity suspension flame spraying (HVSFS) in Surface and Coatings Technology*, 342, 94-104. Cfr. J. Kiilakoski, J. Puranen, E. Heinonen, H. Koivuluoto, P. Vuoristo (2019). *Characterization of powder-precursor HVOF-sprayed Al₂O₃-YSZ/ZrO₂ coatings in Journal of Thermal Spray Technology*, 28(1), 98-107. Cfr. G. Bolelli, V. Cannillo, R. Gadow, A. Killinger, L. Lusvardi, T. Manfredini, P. Müller (2015). *Properties of Al₂O₃ coatings*

temperature fanno sì che si possa omettere uno step di *annealing*, necessario invece nella tecnica *Sol-Gel* (4.3.1). Tra i vantaggi si annoverano la possibilità di realizzare *coating* abbastanza adesi sul substrato, la possibilità di creare rivestimenti compositi, il controllo della porosità del *coating* in tempo reale. Sebbene nella fase iniziale ci sia un miglioramento della resistenza alla corrosione¹¹⁶, tuttavia il deposito ha ridotte proprietà meccaniche e tende a disgregarsi nel tempo. Questo processo porta all'esposizione della superficie del substrato ai fluidi corporei, con il conseguente risultato dell'insorgere di fenomeni corrosivi. La disgregazione del *coating* può avvenire anche nella fase di raffreddamento post-deposizione, durante la quale rimangono all'interno del deposito stati tensionali residui che possono portare alla formazione di cricche¹¹⁷.

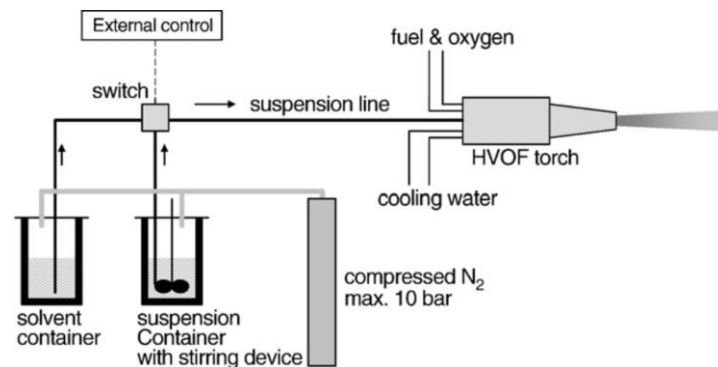


Fig. 4.5 Rappresentazione del processo High Velocity Suspension Flame-Spray¹¹⁸

by *High Velocity Suspension Flame Spraying (HVSFS): Effects of injection systems and torch design in Surface and Coatings Technology*, 270, 175-189.

¹¹⁶ Cfr. J. Henao, O. Sotelo-Mazon, A. L. Giraldo-Betancur, J. Hincapie-Bedoya, D. G. Espinosa-Arbelaez, C. Poblano-Salas, L. Martinez-Gomez (2020). *Study of HVOF-sprayed hydroxyapatite/titania graded coatings under in-vitro conditions in Journal of Materials Research and Technology*, 9(6), 14002-14016. Cfr. H. L. Yao, X. Z. Hu, H. T. Wang, Q. Y. Chen, X. B. Bai, M. X. Zhang, G. C. Ji (2019). *Microstructure and corrosion behavior of thermal-sprayed hydroxyapatite/magnesium composite coating on the surface of AZ91D magnesium alloy in Journal of Thermal Spray Technology*, 28(3), 495-503.

¹¹⁷ Cfr. S. Nourouzi, M. J. Azizpour, H. R. Salimijazi (2014). *Parametric study of residual stresses in HVOF thermally sprayed WC-12Co coatings in Materials and Manufacturing Processes*, 29(9), 1117-1125.

¹¹⁸ Tratta da: R. Gadow, A. Killinger, J. Rauch (2008). *New results in high velocity suspension flame spraying (HVSFS) in Surface and Coatings Technology*, 202(18), 4329-4336.

4.3.4 Plasma Spraying

La tecnica del *Plasma Spraying* è ben attestata in letteratura ed è una tra le più diffuse per la deposizione di ceramici. Il *concept* è abbastanza simile alla tecnica dell'*High Velocity Suspension Flame-Spray*. In questo caso però, al posto di utilizzare una miscela di gas combustibili per la realizzazione di una corrente di gas di combustione ad alta temperatura e alta pressione, il plasma è generato in una torcia all'interno della quale una corrente gassosa (solitamente argon o elio) attraversa due elettrodi (fig. 4.6). Tra questi si instaura un intenso campo elettrico tale da ionizzare il gas e così permettere che la corrente gassosa raggiunga ad alte temperature. Il materiale da depositare, anche in questo caso qui pulverulento, è quindi inserito all'interno della corrente ad altissima temperatura che genera goccioline di materiale liquefatto. Non appena queste colpiscono il substrato, mantenuto a temperature basse, passano allo stato solido formando così il *coating*.

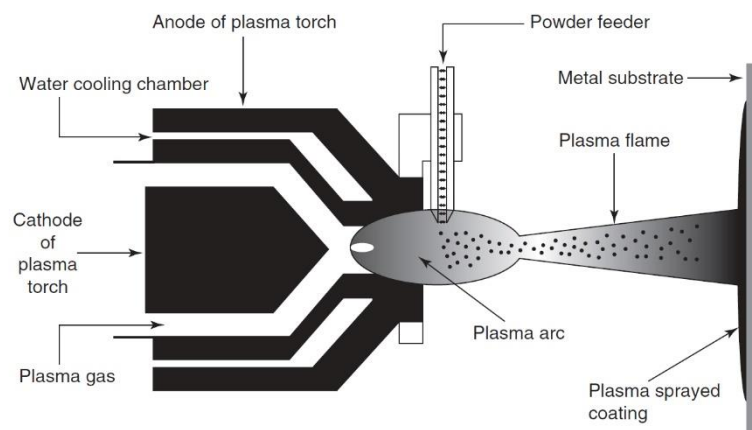


Fig. 4.6 Schema rappresentativo della tecnica *Plasma Spraying*¹¹⁹

A livello industriale è un processo implementabile, data la velocità di deposizione e il basso costo. Sono stati condotti diversi studi sulla biocompatibilità e resistenza alla corrosione che hanno dimostrato come la porosità del film e l'adesione sul substrato

¹¹⁹ Tratta da: U. Gunpath, H. Le (2017). *Composite coatings for implants and tissue engineering scaffolds in Biomedical Composites*. Woodhead Publishing. p.135

conferiscano un miglioramento delle prestazioni¹²⁰. Tuttavia, ci sono delle criticità tuttora oggetto di studio, come la possibile degradazione del materiale ceramico per le elevatissime temperature, tensioni residue dovute a gradienti di temperatura e presenza di alcuni difetti dovuti a particelle non liquefatte che possono creare dei punti di innesco di cricche e irregolarità, similmente a quanto avviene nella deposizione *High Velocity Suspension Flame-Spray*¹²¹.

4.3.5 *Micro Arc Oxidation (MAO)*

Consiste in un processo che si basa sull'ossidazione anodica. Nella fattispecie, avviene la sinterizzazione ad alta temperatura dovuta alla scarica di un arco tra elettrodo di lavoro e contro elettrodo, tra i quali è applicato un'elevata differenza di potenziale tra 150 e 400 V (fig. 4.7). L'ossigeno disciolto in soluzione gioca un ruolo fondamentale, poiché provvede alla formazione degli ossidi sulla superficie del substrato nel momento in cui avviene la scarica dell'arco. A differenza delle altre tecniche già presentate, i rivestimenti realizzati attraverso la MAO hanno la peculiarità di essere molto porosi. Una struttura porosa è vantaggiosa quando si tratta di osteointegrazione, perché aumenta l'affinità tra impianto e tessuto osseo¹²². I parametri di processo che incidono sulle

¹²⁰ Cfr. M. Mittal, S. K. Nath, S. Prakash (2011). *Characterization of plasma sprayed hydroxyapatite coatings on AISI 316L SS and titanium substrate and their corrosion behavior in simulated body fluid in Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering*, 10(11), 1041-1049. Cfr. R. Kumari, J. D. Majumdar (2017). *Studies on corrosion resistance and bio-activity of plasma spray deposited hydroxyapatite (HA) based TiO₂ and ZrO₂ dispersed composite coatings on titanium alloy (Ti-6Al-4V) and the same after post spray heat treatment in Applied Surface Science*, 420, 935-943. Cfr. J. Singh, S. S. Chatha, H. Singh (2021). *Characterization and corrosion behavior of plasma sprayed calcium silicate reinforced hydroxyapatite composite coatings for medical implant applications in Ceramics International*, 47(1), 782-792.

¹²¹ Cfr. U. Gunpath, H. Le (2017). *Composite coatings for implants and tissue engineering scaffolds in Biomedical Composites*. Woodhead Publishing. pp.136-137 Cfr. J. Chang, Y. L. Zhou (2018). *Surface modification of bioactive glasses in Bioactive Glasses* (pp. 119-143). Woodhead Publishing. Cfr. X. Liu, M. Morra, A. Carpi, B. Li (2008). *Bioactive calcium silicate ceramics and coatings in Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(8), 526-529. Cfr. Y. S. Huang, T. McGowan, R. Lee, S. Ivanovski (2017). *7.23 dental implants: Biomaterial properties influencing osseointegration*. Cfr. H. Singh, P. K. Rana, J. Singh, S. Singh, C. Prakash, G. Królczyk (2020). *Plasma Spray Deposition of HA-TiO₂ Composite Coating on Ti-6Al-4V Alloy for Orthopedic Applications in Advances in Materials Processing* (pp. 13-20). Springer, Singapore.

¹²² Cfr. Z. Zhang, J. Sun, H. Hu, Q. Wang, X. Liu (2011). *Osteoblast-like cell adhesion on porous silicon-incorporated TiO₂ coating prepared by micro-arc oxidation in Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 97(2), 224-234. Cfr. W. Jing, M. Zhang, L. Jin, J. Zhao, Q. Gao, M. Ren, Q. Fan (2015). *Assessment of osteoinduction using a porous hydroxyapatite coating prepared by micro-arc oxidation on a new titanium alloy in International Journal of Surgery*, 24, 51-56.

prestazioni sono diversi: la tensione applicata, il tempo, la temperatura, il tipo di elettrolita o la natura della corrente (alternata o continua). Tuttavia, questa tecnica può essere applicata solo su metalli valvola come alluminio, magnesio, titanio, sui quali è possibile accrescere uno strato di ossido protettivo molto resistente ad elevate tensioni senza problemi di transpassività. Ciò comporta una limitazione sulla scelta del substrato. Comunque, sebbene il processo riesca a realizzare dei rivestimenti che migliorano le proprietà di resistenza alla corrosione, la presenza di un *coating* poroso potrebbe essere controproducente da un punto di vista corrosivo, poiché i fluidi corporei possono entrare al suo interno e innescare un processo di degradazione elettrochimica. Per far fronte a questo problema, da uno studio di Wang è emerso un metodo *self-sealing* con fosfati di calcio per creare una barriera tra substrato di magnesio e ambiente aggressivo. Lo dimostrano i risultati dei test elettrochimici *in vitro* nei quali vi è un rallentamento della velocità di corrosione¹²³.

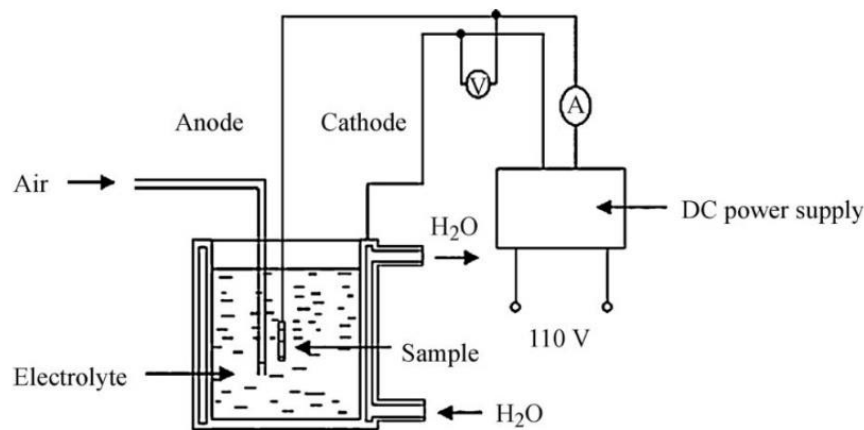


Fig. 4.7 Schema di processo di deposizione Micro Arc Oxydation¹²⁴

¹²³ Cfr. Y. Hu, Z. Wang, J. Ai, S. Bu, H. Liu (2021). *Preparation of coating on the titanium surface by micro-arc oxidation to improve corrosion resistance* in *Coatings*, 11(2), 230. Cfr. H. H. Yang, X. S. Wang, Y. M. Wang, Y. L. Wang, Z. H. Zhang (2017). *Microarc oxidation coating combined with surface pore-sealing treatment enhances corrosion fatigue performance of 7075-T7351 Al alloy in different media* in *Materials*, 10(6), 609. Cfr. Y. Song, K. Dong, D. Shan, E. H. Han (2013). *Investigation of a novel self-sealing pore micro-arc oxidation film on AM60 magnesium alloy* in *Journal of Magnesium and Alloys*, 1(1), 82-87. Cfr. W. Wang, P. Wan, C. Liu, L. Tan, W. Li, K. Yang (2015). *Degradation and biological properties of Ca-P contained micro-arc oxidation self-sealing coating on pure magnesium for bone fixation* in *Regenerative biomaterials*, 2(2), 107-118.

¹²⁴ Tratta da: S. R. Paital, N. B. Dahotre (2009). *Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies* in *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 66(1-3), p.47

4.3.6 Physical Vapor Deposition

Questa tecnica di deposizione consiste nella realizzazione di rivestimenti protettivi ed è utilizzata non solo nel campo biomedico ma anche in larga scala nell'industria dei semiconduttori. Consiste in processo che avviene all'interno di una camera dentro la quale è realizzato un alto vuoto. Nella fase iniziale viene effettuato un cambio di fase – da solido o liquido a vapore – del materiale col quale si vuol realizzare il rivestimento. Una volta che è stato portato alla fase vapore, avviene una condensazione direttamente sul substrato metallico, che viene mantenuto a bassa temperatura. Per vaporizzare il materiale possono essere utilizzate la *thermal evaporation* e lo *sputtering* (fig. 4.8).

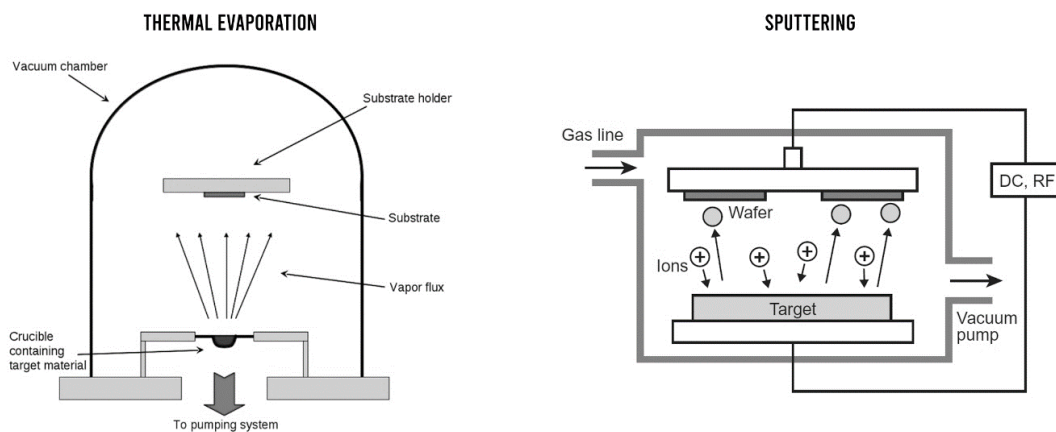


Fig. 4.8 Rappresentazione schematica delle tecniche *thermal evaporation* e *sputtering*¹²⁵

La *thermal evaporation*, impiegata per materiali bassofondenti, prevede il riscaldamento ad alte temperature di materiali attraverso l'utilizzo di resistenze all'interno di un crogiolo in tungsteno. L'alto vuoto realizzato nella camera di deposizione (valori minori di 0.004 Pa) facilita il passaggio di stato. Lo *sputtering* invece è una tecnica opposta all'evaporazione termica: la deposizione avviene dentro una camera in cui è realizzato il vuoto e consiste nell'uso di un plasma, generato da un elevato campo elettrico, un gas molto reattivo che interagisce con un target costituito dal materiale che si vuol depositare;

¹²⁵ Tratta da: J. X. Zhang, K. Hoshino (2019). *Fundamentals of nano/microfabrication and scale effect in Molecular Sensors and Nanodevices*; Zhang, JXJ, Hoshino, K., Eds, 43-111.; Cfr. R. Martín-Palma, A. Lakhtakia (2013). *Vapor-deposition techniques in Engineered Biomimicry* (pp. 383-398). Elsevier Inc.

quest'ultimo, eroso dal plasma, libera gli atomi che andranno a depositarsi sul substrato¹²⁶.

Tramite questa tecnica di deposizione si è in grado di rivestire i substrati con depositi molto sottili che aderiscono perfettamente e migliorano la resistenza all'usura e alla corrosione¹²⁷; da un punto di vista biologico è stato anche constatato che rivestimenti realizzati tramite questo metodo non inibiscono la proliferazione cellulare¹²⁸. Tuttavia, la forza di legame non è molto forte tra impianto e deposito e ciò è dovuto al *mismatch* del coefficiente di espansione termica. I ricercatori, per questo motivo, si sono indirizzati verso la realizzazione di *coating* in nitrato di titanio su leghe di titanio in modo tale da ridurre il *mismatch* tra i reticoli cristallini per ridurre l'insorgenza di stress meccanici¹²⁹.

¹²⁶ Cfr. T. I. Awan, A. Bashir, A. Tehseen (2020). *Chemistry of Nanomaterials: Fundamentals and Applications*. Elsevier. Cap.3, pp.51-87; Cfr. T. Xue, S. Attarilar, S. Liu, J. Liu, X. Song, L. Li ... Y. Tang, Y. (2020). *Surface modification techniques of titanium and its alloys to functionally optimize their biomedical properties: thematic review in Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1261.

¹²⁷ Cfr. D. A. Hamdi, Z. T. Jiang, K. No, M. M. Rahman, P. C. Lee, L. N. T. Truc, B. Z. Dlugogorski (2019). *Biocompatibility study of multi-layered hydroxyapatite coatings synthesized on Ti-6Al-4V alloys by RF magnetron sputtering for prosthetic-orthopaedic implant applications in Applied Surface Science*, 463, 292-299. Cfr. L. Chen, X. Yan, L. Tan, B. Zheng, F. K. Muhammed, K. Yang, Y. Liu (2019). *In vitro and in vivo characterization of novel calcium phosphate and magnesium (CaP-Mg) bilayer coated titanium for implantation in Surface and Coatings Technology*, 374, 784-796.

¹²⁸ Cfr. R. R. Behera, A. Das, A. Hasan, D. Pamu, L. M. Pandey, M. R. Sankar (2020). *Effect of TiO₂ addition on adhesion and biological behavior of BCP-TiO₂ composite films deposited by magnetron sputtering in Materials Science and Engineering: C*, 114, 111033.

¹²⁹ Cfr. W. Y. Wu, M. Y. Chan, Y. H. Hsu, G. Z. Chen, S. C. Liao, C. H. Lee, P. W. Lui (2019). *Bioapplication of TiN thin films deposited using high power impulse magnetron sputtering in Surface and Coatings Technology*, 362, 167-175. Cfr. I. Caha, A. C. Alves, L. J. Affonço, P. N. Lisboa-Filho, J. H. D. da Silva, L. A. Rocha ... F. Toptan (2019). *Corrosion and tribocorrosion behaviour of titanium nitride thin films grown on titanium under different deposition times in Surface and Coatings Technology*, 374, 878-888.

Sezione II – Progetto di ricerca

Capitolo 5 – Metodo di deposizione galvanica: aspetti generali

Dopo aver illustrato nei capitoli precedenti lo *status quæstionis* sui materiali metallici e sui loro rivestimenti impiegati in campo ortopedico, con particolare attenzione anche ai metodi di deposizione dei rivestimenti, in questa sezione focalizzeremo il tema centrale del lavoro di ricerca, che riguarda la realizzazione di *coating* con un metodo innovativo e differente dalle tradizionali tecniche di deposizione.

Dedichiamo questo quinto capitolo del lavoro ad alcuni aspetti introduttivi e preliminari, utili – anzi necessari – alla comprensione di quanto verrà rappresentato in seguito, ossia elementi, processi e caratteristiche comuni a tutte le fattispecie che saranno analizzate singolarmente in ognuno dei capitoli successivi. Ci riferiamo in particolare al metodo di deposizione galvanica – fulcro del nostro lavoro di ricerca –, che comporta come step preliminare la preparazione dei substrati, e alle diverse caratterizzazioni che permetteranno di desumere tutte le informazioni sulle caratteristiche chimico-fisiche dei campioni e sulle *performance* di resistenza alla corrosione. In ultimo, si descrive la metodologia dei test di citotossicità *in vitro* che nei singoli capitoli successivi serviranno a valutare la biocompatibilità dei *coating* sperimentati.

5.1 Il metodo di deposizione galvanica

La corrosione è un problema che molto spesso viene sottovalutato e che a lungo andare può portare a seri problemi per la salute del paziente. Come è stato già esposto in par. 3.2, l'utilizzo dei rivestimenti è una delle soluzioni impiegate per aumentare la biocompatibilità del dispositivo. Inoltre, se a questo aspetto viene associato un miglioramento delle prestazioni in termini di resistenza alla corrosione e usura, l'interesse verso la ricerca di nuove tecnologie aumenta notevolmente.

È vero comunque che un fenomeno corrosivo non sempre può essere considerato come qualcosa di negativo. Infatti, in campo corrosionistico, uno dei sistemi di protezione da corrosione è basato proprio sull'utilizzo di anodi galvanici, detti anche *sacrificali*, impiegati ad esempio per la protezione delle carene delle navi o per strutture metalliche

interrate o sommerse¹³⁰. In particolare, la protezione catodica per anodi sacrificali avviene in seguito all'accoppiamento della struttura da proteggere con un materiale metallico meno nobile. In questo modo, il metallo da proteggere è posto in una condizione termodinamica tale da ridurre la velocità di corrosione fino a renderlo, in alcuni specifici casi, addirittura immune alla corrosione¹³¹.

Sullo stesso principio, si basa il metodo di deposizione galvanica, in cui avviene una reazione elettrochimica spontanea che sfrutta l'accoppiamento galvanico tra un metallo nobile, sul quale avverrà la reazione catodica di deposizione del *coating*, e un secondo metallo caratterizzato da una diversa nobiltà pratica. In altri termini, i metalli devono possedere un diverso potenziale di equilibrio standard.

In fig. 5.1 sono riportate le curve di polarizzazione nel diagramma di Evans di due metalli e si nota come il metallo A sia caratterizzato da una nobiltà pratica maggiore rispetto al metallo B. Nel momento in cui sono posti a contatto, si crea una macrocoppia nella quale circola una corrente di elettroni dal metallo meno nobile a quello più nobile. Il punto di funzionamento del sistema si porta al potenziale di accoppiamento dato dall'intersezione della caratteristica catodica del metallo A e anodica del metallo B.

Da un punto di vista termodinamico, il processo di deposizione galvanica si basa su un processo spontaneo¹³² nel quale il sistema lavora al punto del potenziale di accoppiamento (E_{cpl}). Questo è maggiore del potenziale di equilibrio del metallo B (E_{eq}^B), che dunque tende spontaneamente ad ossidarsi. Il metallo A, invece, si trova in una condizione termodinamicamente favorevole, dato che il potenziale di accoppiamento è minore del suo potenziale di equilibrio, e sarà dunque sede delle reazioni catodiche¹³³.

¹³⁰ Cfr. P. R. Roberge, (2019). *Handbook of corrosion engineering*. McGraw-Hill Education. Cap.14. Cfr. R. W. Revie (Ed.). (2011). *Uhlig's corrosion handbook (Vol. 51)*. John Wiley & Sons. p.1002

¹³¹ Per interessanti approfondimenti storici e tecnologici sull'argomento Cfr. L. Lazzari, P. Pedferri, P., M. Ormellese (2006). *Protezione catodica*, polipress. Cap. 14 pp. 409-417.

¹³² In generale, la spontaneità di una reazione chimica è data dalla variazione dell'energia libera di Gibbs. In particolare, si verifica quando il valore di tale variazione assume segno negativo. Per le reazioni elettrochimiche è possibile esprimere la variazione di energia libera di Gibbs secondo la relazione: $\Delta G = -nF\mathcal{E}$ in cui n è il numero di elettroni scambiati, F rappresenta la costante di Faraday e \mathcal{E} la forza elettromotrice.

¹³³ Il lavoro motore che dà contezza circa la tendenza del metallo all'ossidazione è dato dalla differenza tra il potenziale a cui si trova e il potenziale di equilibrio secondo la relazione $\Delta E = E - E_{eq}$. Nel caso appena esposto di accoppiamento galvanico, la misura della tendenza del metallo all'ossidazione secondo la reazione $B \rightarrow B^{z+} + ze^-$ è dato dal lavoro motore espresso da $\Delta E = E_{cpl} - E_{eq}^B > 0$. Per cui, più è alto il valore di ΔE maggiore è la tendenza del metallo ad ossidarsi e funzionerà da anodo sacrificale. Al contrario se $\Delta E = E_{cpl} - E_{eq}^A < 0$, il metallo si trova in una situazione di immunità termodinamica e si funzionerà come catodo.

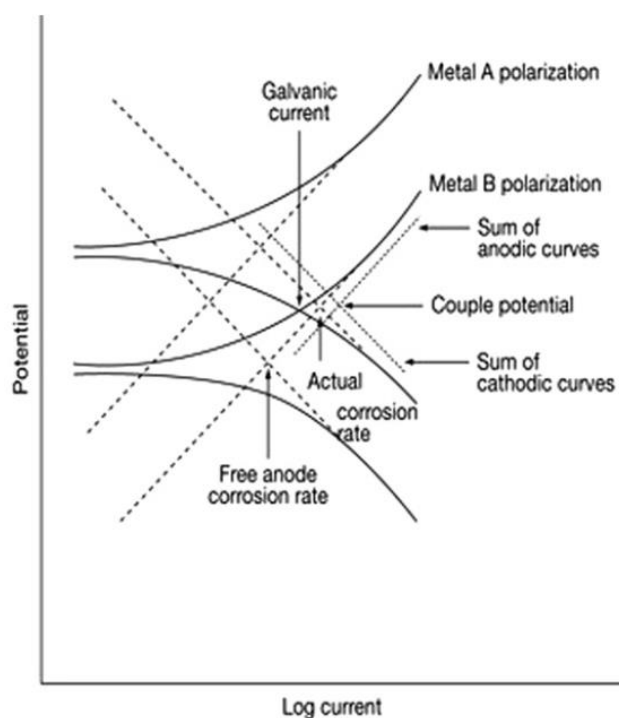


Fig. 5.1 Diagramma di Evans di un accoppiamento galvanico tra due metalli A e B caratterizzati da un diverso potenziale di corrosione¹³⁴

Da un punto di vista cinetico, le correnti scambiate durante il processo di deposizione galvanica sono molto modeste, poiché la corrente di elettroni è rilasciata da un processo corrosivo. Tuttavia, il processo può essere controllato dalla velocità di dissoluzione dell'anodo sacrificale, velocità di corrosione che è regolata dal rapporto tra l'area superficiale del catodo e dell'anodo secondo la relazione (5.1):

$$v_{corr} = v_{corr,0} \left(1 + \frac{S_c}{S_a}\right) \quad (5.1)$$

in cui $v_{corr,0}$ è la velocità di corrosione dell'anodo sacrificale in assenza di un accoppiamento con un metallo più nobile¹³⁵. In un processo di deposizione galvanica si sfruttano gli elettroni prodotti dalla dissoluzione dell'anodo per le reazioni catodiche di deposizione dei *coating*. Chiaramente, individuati i parametri di *optimum* per la deposizione dei

¹³⁴ Cfr. T. J. Richardson (2009). *Shreir's corrosion*. Elsevier. p. 834

¹³⁵ Cfr. P. Pedferri (2015). *Corrosione e protezione dei materiali metallici vol.2*, polipress, cap. 20, pp. 15-27

coating, il processo di *scale up* può essere effettuato mantenendo costante il rapporto tra le aree di lavoro¹³⁶.

Poiché la deposizione galvanica è classificabile come un processo elettrochimico ad umido, si distinguono un anodo e un catodo che sono in contatto elettrico tramite un conduttore di prima specie. Come detto prima, gli elettroni rilasciati dalla reazione di corrosione dell'anodo sacrificale migrano verso il catodo, l'elettrodo di lavoro, nel quale avvengono le reazioni di riduzione. I *layout* di deposizione possono essere scelti a seconda delle esigenze:

- a cella unica, in cui gli elettrodi cortocircuitati sono inseriti nella stessa soluzione elettrolitica dove sono presenti i precursori per realizzare il *coating* (fig. 5.2a);
- a celle separate, in cui il catodo e l'anodo sacrificale sono cortocircuitati e immersi separatamente nelle loro rispettive soluzioni e collegati per mezzo di un ponte salino che permette la chiusura del circuito elettrochimico (fig. 5.2b).

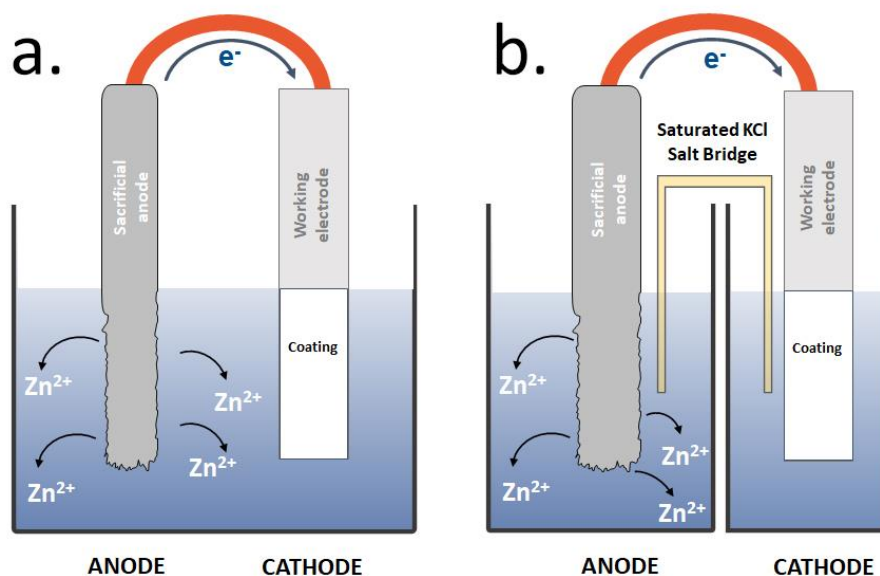


Fig. 5.2 a) *Layout* di cella unita b) *Layout* di celle separate

Da un punto di vista tecnologico, la deposizione galvanica risulta un'alternativa ai tradizionali metodi di elettrodeposizione, è un metodo consolidato e molto versatile

¹³⁶ Per approfondimenti legati agli aspetti termodinamici e cinetici delle reazioni elettrochimiche: Cfr. P. Pedefferi (2015). *Corrosione e protezione dei materiali metallici vol.1*, polipress, cap.4 pp.43-60 e cap.6, pp. 75-101; Cfr. J. O. M. Bockris, A. K. Reddy, M. Gamboa-Aldeco (2000). *Electrodeics. Modern Electrochemistry 2A: Fundamentals of Electrodeics*, cap.7 pp.1035-1400.

che può essere utilizzato per ottenere materiali diversi anche in forma nanostrutturata, non richiede l'apporto di energia elettrica dall'esterno tramite un generatore di potenza ma sfrutta il potenziale di accoppiamento (differenza tra il potenziale di equilibrio del processo catodico e del processo anodico), che risulta così la chiave di volta dell'intero processo¹³⁷.

5.2 Preparazione del substrato e anodi sacrificali

Il progetto di ricerca si concentra sull'utilizzo di acciai inossidabili come substrati per la deposizione galvanica di *coating*. Nella fattispecie, sono stati utilizzati acciai commerciali AISI 316L, AISI 304 e AISI 304L le cui composizioni chimiche sono state riportate in tab. 5.1.

Tab. 5.1 Composizione chimica degli acciai utilizzati

	Element (%wt)								
	C	Cr	Ni	Mn	Si	P	S	Mo	Fe
AISI 304	0.025	18.18	8.03	1.66	0.31	0.031	0.001	-	At Bal.
AISI 304 L	0.022	18.13	8.052	1.208	0.355	0.0165	0.0109	-	At Bal.
AISI 316 L	0.022	16.61	10.02	1.244	0.321	0.029	0.001	2.010	At Bal.

Ogni barretta, delle dimensioni 15 x 70 x 3 mm, è stata sottoposta al trattamento di pulizia meccanica con l'utilizzo di carte abrasive con grana crescente (#150, #320, #800, #1200). In seguito, le operazioni di sgrassaggio sono state eseguite in un bagno di ultrasuoni per 10 minuti in acetone e 10 minuti in acqua. Lo stesso trattamento superficiale è stato condotto per gli anodi sacrificali, zinco, alluminio e lega alluminio/magnesio, in modo da studiare i depositi in funzione del diverso accoppiamento. Successivamente

¹³⁷ Cfr. M. Battaglia, S. Piazza, C. Sunseri, R. Inguanta (2013). *Amorphous silicon nanotubes via galvanic displacement deposition* in *Electrochemistry communications*, 34, 134-137. Cfr. R. Inguanta, G. Ferrara, S. Piazza, C. Sunseri (2012). *A new route to grow oxide nanostructures based on metal displacement deposition. Lanthanides oxy/hydroxides growth* in *Electrochimica acta*, 76, 77-87. Cfr. B. Patella, R. Inguanta, S. Piazza, C. Sunseri (2017). *A nanostructured sensor of hydrogen peroxide* in *Sensors and Actuators B: Chemical*, 245, 44-54. Cfr. C. Cocchiara, R. Inguanta, S. Piazza, C. Sunseri (2016). *Nanostructured anode material for li-ion battery obtained by galvanic process* in *Chemical Engineering Transactions*, 47, 73-78. Cfr. R. Inguanta, S. Piazza, C. Sunseri (2009). *Synthesis of self-standing Pd nanowires via galvanic displacement deposition* in *Electrochemistry communications*, 11(7), 1385-1388. Cfr. R. Inguanta, S. Piazza, C. Sunseri. (2008). *Novel procedure for the template synthesis of metal nanostructures* in *Electrochemistry Communications*, 10(4), 506-509.

si è passati all'isolamento delle superfici con un materiale isolante in modo tale che la superficie esposta dell'acciaio sia pari a 1.14 cm² mentre l'area esposta per gli anodi di circa 27 cm².

5.3 Preparazione SBF

La soluzione è stata preparata con acqua Milli-Q (18 MΩ cm). In particolare, 700 mL di acqua bidistillata sono stati riscaldati fino alla temperatura di 37±1 °C e sono stati aggiunti i sali presentati in tab. 5.2. Ciascun sale è stato aggiunto rispettando l'ordine prescritto e dopo l'avvenuta dissoluzione del precedente. L'HEPES (*2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanesulfonic acid*) è stato preparato a parte con una soluzione di acqua Milli-Q a 37° C e successivamente aggiunto alla soluzione. Infine il pH della soluzione è stato portato a 7.4 con l'aggiunta di 0.8 mL di NaOH 1M.

Tab. 5.2 Composizione della soluzione di fluido corporeo simulato (SBF)

Componente	Concentrazione [gL⁻¹]
NaCl	5.403
NaHCO₃	0.74
Na₂CO₃	2.046
KCl	0.225
K₂PO₄ · 3H₂O	0.230
MgCl₂ · 6H₂O	0.311
HEPES	11.928
CaCl₂	0.293
Na₂SO₄	0.072
NaOH 1 M	0.8 mL

5.4 Caratterizzazioni

La metodologia di indagine per valutare le proprietà e le prestazioni che possiedono i depositi fabbricati si articola su tre livelli paralleli: chimico fisico, elettrochimico e biologico.

5.4.1 Caratterizzazioni chimico-fisiche

La morfologia dei rivestimenti è stata esaminata con un microscopio FEG-ESEM (QUANTA 200) dotato di una sonda per spettroscopia a dispersione di energia (EDS) per valutarne la composizione chimica.

Le strutture cristallografiche dei rivestimenti sono state studiate mediante diffrazione di raggi X utilizzando uno strumento RIGAKU (modello: D-MAX 25600 HK). I diffrattogrammi sono stati ottenuti nell'intervallo 2θ da 10° a 60° mediante radiazione $K\alpha$ di Cu ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) con le seguenti condizioni di installazione: tensione di 40 kV, corrente di 100 mA, velocità di scansione di 4° min^{-1} e *sampling* di 0.01° .

Gli spettri Raman sono stati ottenuti con uno spettrometro Renishaw (inVia Raman Microscope). L'eccitazione è stata fornita da un laser 532 nm di Nd:YAG calibrato dal picco Raman del Si policristallino (520 cm^{-1}).

Le analisi FT-IR/ATR sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR/NIR Spectrum 400. Gli spettri sono stati raccolti nell'intervallo $4000\text{--}500 \text{ cm}^{-1}$.

È stata anche eseguita la spettrometria di emissione ottica al plasma accoppiata induttivamente (ICP-OES, PerkinElmer Optima 2100 DV) per valutare la concentrazione di ioni metallici rilasciati dopo 21 giorni di *aging* in SBF (*Simulated Body Fluid*) a una temperatura di $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. È stata determinata una linea di calibrazione per ogni ione metallico per rilevare Fe, Ni, Cr, Mo, Ca e P con soluzioni di calibrazione standard.

5.4.2 Caratterizzazioni elettrochimiche

Le prove di corrosione sono state condotte immergendo i campioni in una soluzione di SBF per un periodo di 21 giorni ad una temperatura di 37 °C. In particolare, ogni caratterizzazione comprendeva monitoraggio dell'OCP, polarizzazione lineare e spettroscopia d'impedenza. In dettaglio, ogni campione è stato immerso in SBF (soluzione di *aging*), periodicamente estratto e trasferito rapidamente in una soluzione di SBF fresca per condurre prove elettrochimiche. Al termine di questi esperimenti, ogni campione è stato nuovamente trasferito nella soluzione di *aging* fino alle successive prove elettrochimiche. Per tutte le caratterizzazioni elettrochimiche è stata utilizzata una cella convenzionale a tre elettrodi con un filo di platino come controelettrodo e un 3.0 M Ag/AgCl come elettrodo di riferimento.

Il monitoraggio dell'OCP è stato eseguito per mezz'ora per stabilizzare l'interfaccia. Eventuali *spike* di potenziale sono sintomo di processi faradici sulla superficie dell'elettrodo. Successivamente sono state realizzate le misure di polarizzazione con una velocità di scansione di 0.166 mVs⁻¹ in un intervallo di potenziale di 150 mV rispetto al valore OCP. I valori del potenziale di corrosione e della densità di corrente di corrosione sono stati ricavati attraverso l'estrapolazione delle rette di Tafel.

La spettroscopia d'impedenza è stata eseguita con uno *sweep* di frequenze da 100 kHz a 0.1Hz con una perturbazione del segnale in corrente alternata di 10 mV. In un secondo momento sono stati modellati i diagrammi di Bode e Nyquist con un circuito equivalente attraverso il *software* ZSimpWin.

5.4.3 Citotossicità

I campioni sono stati tagliati in rettangoli di 30 x 15 x 3 mm, risciacquati con acqua Milli-Q, immersi in etanolo per 24 ore e quindi sterilizzati in autoclave a 121 °C ad alta pressione. Per la sterilizzazione dei *coating* in cui sono presenti biomateriali polimerici – più sensibili alle alte temperature – è stata eseguita un'immersione in etanolo per 24 ore in una cappa biologica con esposizione ai raggi UV. Ciascun campione è stato quindi incubato con *Modified Eagle Medium di Dulbecco* (DMEM, Sigma Aldrich) a 37 °C per 24 ore con un rapporto volume/superficie di 5 mLcm⁻². Successivamente, i

terreni trattati sono stati raccolti in una Falcon da 50 mL e utilizzati per il test di citotossicità. Le cellule pre-osteoblastiche MC3T3-E1 acquistate da Sigma-Aldrich (ECACC) sono state coltivate in DMEM integrate con *Fetal Bovine Serum* al 10%, glutammina all'1% e antibiotico all'1% a 37 °C e in un'atmosfera di CO₂ al 5%. Le cellule sono state distribuite nei pozzetti di una piastra di coltura da ventiquattro pozzetti (10 mm di diametro) e incubate con DMEM normale a 37 °C e 5% di CO₂. Dopo 24 ore, il mezzo è stato sostituito con quello trattato. Per confronto, il DMEM normale è stato utilizzato come controllo positivo per valutare l'effetto dei rivestimenti sul substrato, mentre il DMEM trattato con acciaio non rivestito è stato utilizzato come controllo negativo. I test di citotossicità sono stati condotti dopo 0, 2, 5 e 7 giorni di coltura. La vitalità cellulare è stata valutata con CCK-8 (*Cell Counting Kit-8*, Sigma-Aldrich), utilizzando il sale altamente solubile in acqua WST-8 che, in presenza di cellule viventi, produce un colorante formazano solubile in acqua, dal colore giallo rilevabile a 450 nm. Ogni esperimento riportato in questo lavoro è stato ripetuto almeno tre volte¹³⁸.

¹³⁸ Cfr. ISO,10993-5, Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity, 2009

Capitolo 6 – Studio dei pretrattamenti su acciaio AISI 316L per *coating* a base di fosfati di calcio

6.1 Pretrattamenti

Come è stato illustrato nei capitoli precedenti, il rivestimento della superficie metallica con un *coating* risulta una soluzione utile a migliorare le *performance* del dispositivo biomedico contro la corrosione, poiché agisce da barriera fisica tra l'impianto e l'ambiente fisiologico umano. Inoltre, l'adesione del *coating* può essere condizionata dalle interazioni chimiche e fisiche tra il rivestimento e substrato, il quale presenta una morfologia diversa in forza di un particolare pretrattamento¹³⁹. Prima di applicare un rivestimento, la superficie deve essere resa idonea, dato che possono essere presenti dei contaminanti o ossidi che possono inficiare le prestazioni. Esistono diversi metodi di pretrattamento, meccanici o tramite attacchi chimici. Nel lavoro esposto in questo capitolo, ne sono stati selezionati tre diversi tipi in aggiunta a quello meccanico già descritto in cap. 5: l'*electroetching*, l'*anodizing* e il *phosphating*. Di essi saranno descritte le principali peculiarità.

6.1.1 *Electroetching*

È una tecnica elettrochimica nella quale avviene un processo di rimozione selettiva e controllata di un materiale metallico senza particolari deformazioni plastiche o sollecitazioni. In questo modo si evitano trasformazioni di fase o danni dovuti al riscaldamento causato da un aggressivo pretrattamento abrasivo.

Normalmente il pretrattamento prevede l'utilizzo di un generatore di potenza DC/AC nel quale l'elettrodo di lavoro, immerso in un bagno elettrolitico, funziona da anodo, mentre un controlettrodo funge da catodo: in questo modo la superficie

¹³⁹ Cfr. P. Zarras, J. D. Stenger-Smith (2015). *Smart inorganic and organic pretreatment coatings for the inhibition of corrosion on metals/alloys* in *Intelligent coatings for corrosion control*, 59-91. Cfr. F. Xia, L. Jiang (2008). *Bio-inspired, smart, multiscale interfacial materials* in *Advanced materials*, 20(15), 2842-2858.

dell'elettrodo di lavoro sarà portata in dissoluzione, dato che il potenziale applicato è maggiore del potenziale di equilibrio, e sul catodo avverrà la reazione di sviluppo di idrogeno¹⁴⁰. Anche la composizione chimica e la densità di corrente influiscono sulla velocità di dissoluzione e dipendono dai diversi metalli utilizzati. Anche la temperatura della soluzione elettrolitica influisce anche sul processo, nella misura in cui la viscosità dipende da questo parametro. Tuttavia, le condizioni fluidodinamiche possono essere variate introducendo un sistema di agitazione in soluzione¹⁴¹.

A differenza di un *etching* di tipo chimico, l'*electroetching* è un processo che può essere gestito regolando il potenziale applicato tra gli elettrodi: in questo modo si possono realizzare delle superfici caratterizzate da una microrugosità controllata. Una superficie texturizzata può migliorare l'adesione del rivestimento al substrato, diversamente dall'*electropolishing*, che consiste nella levigatura anodica per ottenere una superficie luminosa, lucente e priva di difetti¹⁴². Jang ha dimostrato che l'*electroetching* della superficie dell'acciaio 316L diminuisce l'adesione dei batteri senza l'utilizzo di *coating* antibiotici e incrementa la resistenza alla corrosione e la citocompatibilità¹⁴³. Inoltre, una superficie microrugosa può migliorare l'osteointegrazione e l'ancoraggio tra osso e impianto e migliorare la formazione di fosfati di calcio¹⁴⁴.

In un interessante studio di J. Jakubowicz e G. Adameks, l'*etching* elettrochimico è utilizzato come pretrattamento per una successiva deposizione elettrochimica di fosfati di calcio su leghe di titanio (fig. 6.1). Due studiosi propongono un meccanismo di crescita dei cristalli di fosfati di calcio sulla superficie microrugosa durante l'elettrodeposizione. Sebbene siano presenti dei pori o dei *pit* sulla superficie, la crescita dei fosfati di calcio

¹⁴⁰ Cfr. P. V. Shchigolev (1970). *Electrolytic And Chemical Polishing Of Metals* Cfr. D. Landolt (1987). *Fundamental aspects of electropolishing* in *Electrochimica Acta*, 32(1), 1-11.

¹⁴¹ Cfr. M. Haidopoulos, S. Turgeon, C. Sarra-Bournet, G. Laroche, D. Mantovani (2006). *Development of an optimized electrochemical process for subsequent coating of 316 stainless steel for stent applications* in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(7), 647-657.

¹⁴² Cfr. T. Hayakawa, M. Kawashita, G. H. Takaoaka (2008). *Coating of hydroxyapatite films on titanium substrates by electrodeposition under pulse current* in *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 116(1349), 68-73. Cfr. L. Cardenas, J. MacLeod, J. Lipton-Duffin, D. G. Seifu, F. Popescu, M. Siaj, F. Rosei (2014). *Reduced graphene oxide growth on 316L stainless steel for medical applications* in *Nanoscale*, 6(15), 8664-8670.

¹⁴³ Cfr. Y. Jang, W. T. Choi, C. T. Johnson, A. J. García, P. M. Singh, V. Breedveld, J. A. Champion, (2018). *Inhibition of bacterial adhesion on nanotextured stainless steel 316L by electrochemical etching* in *ACS biomaterials science & engineering*, 4(1), 90-97.

¹⁴⁴ Cfr. N. N. C. Isa, Y. Mohd, N. Yury (2012, December). *Electrodeposition of hydroxyapatite (HAp) coatings on etched titanium mesh substrate*. in *2012 IEEE Colloquium on Humanities, Science and Engineering (CHUSER)* (pp. 771-775). IEEE.

al loro interno avviene durante una deposizione elettrochimica, dal momento che la parte più profonda del poro è una superficie elettroattiva. Man mano che aumenta il tempo di deposizione, il poro comincia a cominciare a riempirsi e si forma un deposito discontinuo fino al completo riempimento del difetto¹⁴⁵.

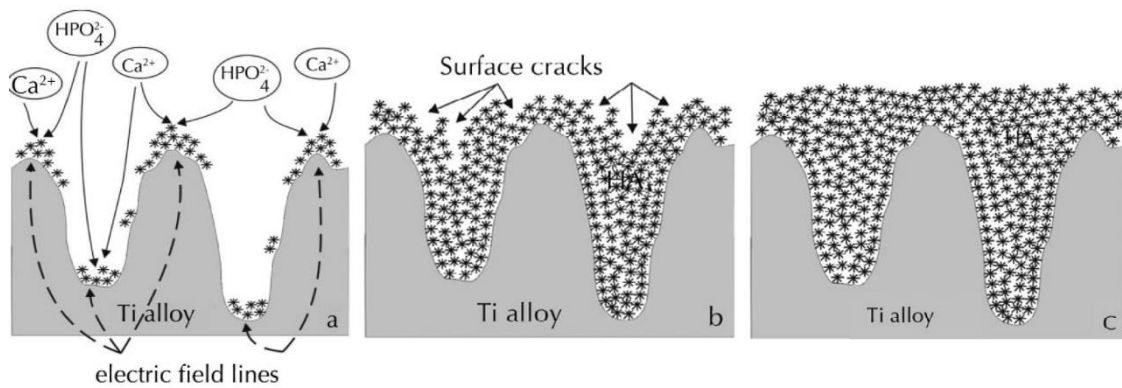


Fig. 6.1 Processo di crescita dei fosfati di calcio¹⁴⁶

6.1.2 Anodizing

Il processo di *anodizing* è uno dei più investigati in letteratura nel campo dei trattamenti superficiali. Inizialmente adoperato nel settore aerospaziale, poiché le leghe di alluminio da un lato offrono una buona resistenza in relazione al peso, dall'altro hanno una limitata resistenza alla corrosione, è un processo elettrochimico nel quale è prevista la crescita di un sottile film di ossido sulla superficie del metallo. I parametri operativi come temperatura, potenziale applicato, tempo di anodizzazione sono variabili che influenzano la realizzazione dei film passivi di ossido.

Attraverso questa procedura è possibile far accrescere uno strato di ossido (Al_2O_3) che aumenta le prestazioni in termini di resistenza alla corrosione¹⁴⁷. Successivamente la tecnica dell'*anodizing* è stata estesa anche ad altri metalli, come il titanio e le sue leghe,

¹⁴⁵ Cfr. J. Jakubowicz, G. Adameks (2013). *Porous Nanostructure Ti Alloys for Hard Tissue Implant Applications*. in *Nanomaterials* (pp. 97-136). Apple Academic Press.

¹⁴⁶ Cfr. *ibid*

¹⁴⁷ Cfr. M. Paz Martínez-Viademonte, S. T. Abrahami, T. Hack, M. Burchardt, H. Terryn (2020). *A review on anodizing of aerospace aluminum alloys for corrosion protection in Coatings*, 10(11), 1106.

su cui è possibile far accrescere un film di TiO₂ molto compatto (par. 4.2.1), che aumenta non solo la biocompatibilità ma anche la resistenza alla corrosione¹⁴⁸.

Anche sugli acciai è possibile far accrescere film di ossidi tramite il processo di *anodizing*. A differenza dell'alluminio o del titanio, sui quali è possibile realizzare film passivi in ambienti acquosi neutri, con gli acciai ciò è possibile se immersi in soluzioni caustiche¹⁴⁹. Esistono anche trattamenti termici per la realizzazione di ossidi protettivi per gli acciai, come il *blackening*, che prevede un'immersione in una soluzione alcalina molto calda fino a 350 °C e in seguito un'esposizione ad un'atmosfera di vapore (con temperature tra 300~600 °C) per convertire l'ossido in magnetite (Fe₃O₄) dal tipico colore nero. Tuttavia, sebbene la magnetite sia termodinamicamente stabile a temperatura ambiente, questi ossidi sono caratterizzati da una cinetica di formazione lenta sotto i 100 °C e da una scarsa adesione con il substrato¹⁵⁰. Inoltre la magnetite ha anche una piccola conducibilità elettronica che la rende poco adatta come rivestimento protettivo contro i fenomeni corrosivi. Per questo motivo il processo di *anodizing* è preferibile ai processi termici.

Nello studio condotto da Asoh, il processo di *anodizing* è stato eseguito su un acciaio AISI 304 in una soluzione elettrolitica contenente acido solforico e acqua ossigenata ed è stato utilizzato come pretrattamento per la deposizione di idrossiapatite per dispositivi biomedicali¹⁵¹. Altrove si è messa in evidenza la resistenza alla corrosione di acciai AISI 304 sui quali è stato accresciuto un film di ossido variando il tempo e l'agitazione della soluzione elettrolitica¹⁵².

¹⁴⁸ Nel caso specifico del titanio, l'*anodizing* prende il nome di *coloring* poiché l'ossido di titanio possiede un indice di rifrazione tale che quando è esposto alla luce produce effetti di interferenza. Il colore dipende dallo spessore dell'ossido accresciuto che a sua volta corrisponde ad un preciso potenziale applicato. Questo nel campo ortodontico risulta molto utile per un facile riconoscimento. Cfr. C. Wadhvani, M. Brindis, M. T. Kattadiyil, R. O'Brien, K. H. Chung (2018). *Colorizing titanium-6aluminum-4vanadium alloy using electrochemical anodization: Developing a color chart in The Journal of prosthetic dentistry*, 119(1), 26-28. Cfr. S. Minagar, C. C. Berndt, J. Wang, E. Ivanova, C. Wen (2012). *A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces in Acta biomaterialia*, 8(8), 2875-2888.

¹⁴⁹ Cfr. T. D. Burleigh, T. C. Dotson, K. T. Dotson, S. J. Gabay, T. B. Sloan, S. G. Ferrell (2007). *Anodizing steel in KOH and NaOH solutions in Journal of The Electrochemical Society*, 154(10), C579.

¹⁵⁰ Cfr. B. Bhushan (2013). *Principles and applications of tribology*. John Wiley & Sons. p.884

¹⁵¹ Cfr. H. Asoh, M. Nakatani, S. Ono (2016). *Fabrication of thick nanoporous oxide films on stainless steel via DC anodization and subsequent biofunctionalization in Surface and coatings technology*, 307, 441-451.

¹⁵² Cfr. L. P. Domínguez-Jaimes, M. Á Arenas Vara, E. I. Cedillo-González, J. J. Ruiz Valdés, J. J. De Damborenea, A. Conde Del Campo, ... J. M. Hernández-López (2019). *Corrosion Resistance of Anodic Layers Grown on 304L Stainless Steel at Different Anodizing Times and Stirring Speeds in Coatings*, 9(11), 706.

6.1.3 *Phosphating*

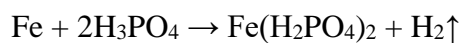
È un processo di pretrattamento superficiale che consiste in una serie di reazioni chimiche od elettrochimiche che comportano la formazione di strati protettivi, chiamati anche strati di conversione. Si tratta di una tecnica economica che offre però blanda resistenza all'usura e ai fenomeni corrosivi e che rappresenta una soluzione economica per migliorare l'adesione dei successivi trattamenti protettivi di rivestimento come le pitture.

Una prima testimonianza del *phosphating* è rintracciabile in un brevetto britannico di W.A. Ross in cui materiali metallici a base di ferro rovente erano immersi in una soluzione di acido fosforico per prevenire l'insorgenza di attacchi corrosivi. Successivamente la ricerca ha tentato di migliorare la qualità del pretrattamento, per adattarlo ai rivestimenti con base organica.

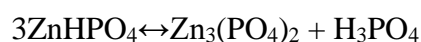
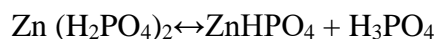
Diversi elementi (ferro, zinco, manganese) si prestano per la formazione di fosfati, che possono essere: primari $M(H_2PO_4)_2$, solubili in acqua; secondari $MHPO_4$, poco solubili; terziari del tipo $M_3(PO_4)_2$ completamente insolubili anche in soluzione di acido fosforico¹⁵³.

Solitamente la fosfatazione avviene in una soluzione costituita da fosfati metallici solubili, acido fosforico e altri elementi che accelerano la reazione.

Per quanto riguarda la fosfatazione dell'acciaio con composti di zinco, il ferro presente tende a disciogliersi nei siti microanodici, dato che in soluzione è presente acido fosforico, e nei siti microcatodici si ha lo sviluppo di idrogeno a causa un incremento del pH all'interfaccia elettrodo/elettrolita, secondo la reazione:



Tale reazione è responsabile dell'equilibrio tra i fosfati primari e terziari sulla superficie dell'acciaio. Nel caso particolare della fosfatazione con zinco, le reazioni che governano l'equilibrio tra i fosfati primari solubili e il fosfato terziario insolubile sulla superficie sono:



¹⁵³ Cfr. Pedferri (2015) *Corrosione e protezione ...* vol 1, p. 233

Per un'efficace deposizione di fosfato nei siti microcatodici, deve essere presente una certa quantità di acido fosforico libero per reprimere l'idrolisi e mantenere stabile il bagno. Un eccesso di acido fosforico potrebbe causare non solo un ritardo nella formazione del rivestimento di fosfati di zinco ma potrebbe comportare anche un'eccessiva dissoluzione del metallo. La temperatura e il tempo di immersione sono i principali parametri efficaci nei rivestimenti di conversione del fosfato di zinco¹⁵⁴. Uno studio condotto dall'equipe di Arthanareeswari dimostra che il processo di *phosphating* avviene grazie all'accoppiamento galvanico, con cui si riescono a realizzare dei rivestimenti di fosfato di zinco uniformi e poco porosi. In particolare il rivestimento di fosfati è influenzato da alcuni parametri come il tipo di materiale catodico, il rapporto tra le aree catodica/anodica e il tempo di immersione¹⁵⁵.

6.2 Procedure sperimentali

I tre diversi pretrattamenti descritti sopra sono stati applicati su substrati di acciaio AISI 316L in barre (15 x 70 x 2 mm). Successivamente, il substrato pretrattato è stato usato come *working* in una cella galvanica per la deposizione di *coating* a base di idrossiapatite. Dapprima si è proceduto alla pulitura meccanica della superficie elettrodica. In particolare, il substrato è stato sottoposto ad un trattamento meccanico con carte abrasive, con grana crescente (#150, #320, #800, #1200). Quindi è stata eseguita un'operazione di sgrassaggio in ultrasuoni per 10 minuti prima in acetone puro e dopo in acqua distillata. Infine, attraverso un materiale isolante, è stata delimitata un'area di circa 10 cm².

¹⁵⁴ Cfr. S. Jegannathan, T. S. Narayanan, K. Ravichandran, S. Rajeswari (2006). *Formation of zinc phosphate coating by anodic electrochemical treatment in Surface and Coatings Technology*, 200(20-21), 6014-6021. Cfr. C. Kavitha, T. S. Narayanan, K. Ravichandran, I. S. Park, M. H. Lee (2014). *Deposition of zinc-zinc phosphate composite coatings on steel by cathodic electrochemical treatment in Journal of Coatings Technology and Research*, 11(3), 431-442. Cfr. T. S. N. Sankara Narayanan (2005). *Surface pretreatment by phosphate conversion coatings-A review in Reviews in Advanced Materials Science*, 9, 130-177.

¹⁵⁵ Cfr. M. Arthanareeswari, T. S. N. Narayanan, P. Kamaraj, M. Tamilselvi (2010). *Influence of galvanic coupling on the formation of zinc phosphate coating*

6.2.1 Pretrattamenti: *electroetching*, *anodizing*, *phosphating*

L'*electroetching* è stato realizzato in una soluzione elettrolitica costituita da 240 mL H₂O, 420 mL H₃PO₄ (85% peso) e 340 mL H₂SO₄ (95% vol). La cella elettrolitica è stata immersa in un bagno di sale e ghiaccio e la soluzione posta in agitazione, non solo per evitare l'accumulo di prodotti dovuti alla dissoluzione dell'elettrodo di lavoro sulla superficie, ma anche per garantire una temperatura uniforme inferiore a -5 °C. Tra i due elettrodi è stata applicata una tensione di 2 V e l'elettrodo di lavoro è stato posto ad una distanza di 15 mm dal contro elettrodo. L'*electroetching* è stato effettuato per un tempo di dieci minuti. Al termine del processo il campione è stato pulito in acqua distillata.

Per quanto riguarda il processo di *anodizing*, è stato effettuato in una soluzione di NaOH al 50% in peso. L'elettrodo di lavoro e il contro elettrodo sono entrambi di acciaio AISI 316L con la stessa area esposta (~10 cm²). La soluzione è stata mantenuta alla temperatura di 70 °C per 10 minuti. Tra gli elettrodi, posti alla distanza di 2 cm, è stata applicata una tensione di 2 V. Alla fine dell'anodizzazione l'elettrodo di lavoro è stato pulito con acqua distillata.

Sebbene in letteratura il *phosphating* sia solitamente condotto ad alte temperature, si è scelto di condurre questo processo a temperatura ambiente utilizzando un accoppiamento galvanico tra l'acciaio e lo zinco a cella unica, con un rapporto tra area anodica e catodica di 2.5:1 per 10 minuti. La soluzione di *phosphating* utilizzata ha la seguente composizione: 50 mL di acqua distillata, 800 µL H₃PO₄ (85% wt), 0.1 g ZnO, 0.55 NaNO₃, 600 µL NaOH (10 M). Anche al termine del processo, il campione è stato pulito con acqua distillata.

6.2.2 Deposizione galvanica

Dopo il pretrattamento, l'acciaio è stato usato come *working* per la deposizione galvanica. In primo luogo, è stato condotto l'isolamento di un'area pari a 1.13 cm² con Parafilm[®], in modo tale da avere un'area esposta alla soluzione elettrolitica ben definita. È stato scelto un accoppiamento galvanico con un anodo sacrificale di zinco, mantenendo un rapporto tra area anodica e area catodica di 27:1. La soluzione di deposizione è

costituita da: 0.061M Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0.036M NH₄H₂PO₄, 0.1M NaNO₃. La concentrazione dei precursori è tale da garantire il rapporto molare tra Ca/P di 1.67, pari alla composizione stechiometrica dell'idrossiapatite¹⁵⁶. La deposizione è stata condotta per tre giorni a temperatura ambiente.

Subito dopo il cortocircuito degli elettrodi e l'immersione in soluzione, avviene una serie di reazioni in entrambi gli elettrodi¹⁵⁷. In particolare, all'anodo avviene la corrosione dello zinco secondo la reazione (6.1):



Gli elettroni generati dalla reazione anodica fluiscono verso l'elettrodo di lavoro, che funge da catodo in cui avvengono le reazioni di riduzione. Nel caso in questione, si tratta di reazioni di elettrogenazione di base che producono ioni ossidrili sulla superficie dell'elettrodo e riguardano gli ioni nitrati, le molecole d'acqua e l'ossigeno disciolto in soluzione secondo le reazioni (6.2) (6.3) (6.4):



La formazione del *coating* di idrossiapatite avviene in seguito ad una serie di reazioni di equilibrio di dissociazione dei fosfati presenti in soluzione, che sono causate dall'aumento del pH all'interfaccia dell'elettrodo grazie alle reazioni di elettrogenazione di base. Infatti, l'aumento della concentrazione degli ioni ossidrili all'interfaccia sposta localmente l'equilibrio di dissociazione di H₂PO₄⁻ verso HPO₄²⁻ (6.5):



¹⁵⁶ Cfr. G. Blanda, V. Brucato, F. C. Pavia, S. Greco, S. Piazza, C. Sunseri, R. Inguanta (2016). *Galvanic deposition and characterization of brushite/hydroxyapatite coatings on 316L stainless steel* in *Materials Science and Engineering: C*, 64, 93-101. Cfr. G. Blanda, V. Brucato, F. C. Pavia, S. Greco, S. Piazza, C. Sunseri, R. Inguanta (2018). *In Vitro Corrosion and Biocompatibility of Brushite/Hydroxyapatite Coatings Obtained by Galvanic Deposition on 316LSS* in *Journal of The Electrochemical Society*, 165(2), G1.

¹⁵⁷ Adesso non ci si soffermerà sulla teoria che sta alla base del processo di deposizione già descritto ampiamente in §5.1 ma entreranno più sulle reazioni che governano la deposizione galvanica di fosfati di calcio.

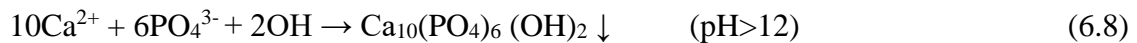
La produzione di ioni idrogenofosfato porta alla formazione di un composto fosfato di calcio che prende il nome di brushite, secondo la reazione (6.6):



La brushite è un composto elettricamente isolante e pertanto, se si deposita un *coating* compatto e uniforme, la superficie elettrodica non è più esposta alla soluzione elettrolitica, e di conseguenza le reazioni di elettrogenazione di base si arresterebbero. Tuttavia, nel nostro caso si forma uno strato non uniforme e poroso di brushite, che di conseguenza non ostacola le reazioni di elettrogenazione. Dunque, lo ione idrogenofosfato continua a dissociarsi formando lo ione ortofosfato secondo l'equilibrio (6.7):



Nel momento in cui il pH raggiunge valori al di sopra di 12, avviene la precipitazione dell'idrossiapatite secondo la reazione (6.8):



6.3 Risultati

La morfologia dei campioni ottenuti è stata osservata al microscopio elettronico. In fig. 6.2 sono riportate le immagini SEM relative ai substrati al variare del tipo di pretrattamento, mentre in fig. 6.3 sono riportate le morfologie dei rivestimenti ottenuti al termine della deposizione al variare del tipo di pretrattamento eseguito.

Come è possibile notare, il substrato metallico è completamente ricoperto da un deposito uniforme. Per ingrandimenti maggiori riportati negli *inset*, la morfologia dei *coating* è differente a parità di condizioni operative di deposizione. Questa differenza dei cristalli può essere attribuita al diverso tipo di rugosità che presenta il substrato al variare del tipo di pretrattamento. Tale comportamento è del tutto identico a quello ottenuto da Fujishiro, che ha osservato una diversa morfologia di *coating* di idrossiapatite al variare della rugosità superficiale¹⁵⁸.

¹⁵⁸ Cfr. Y. Fujishiro, A. Sugimori, A. Okuwaki, T. Sato (2001). *Coating of hydroxyapatite on various substrates via hydrothermal reactions of Ca (edta) 2-and phosphate* in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(4), 333-337.

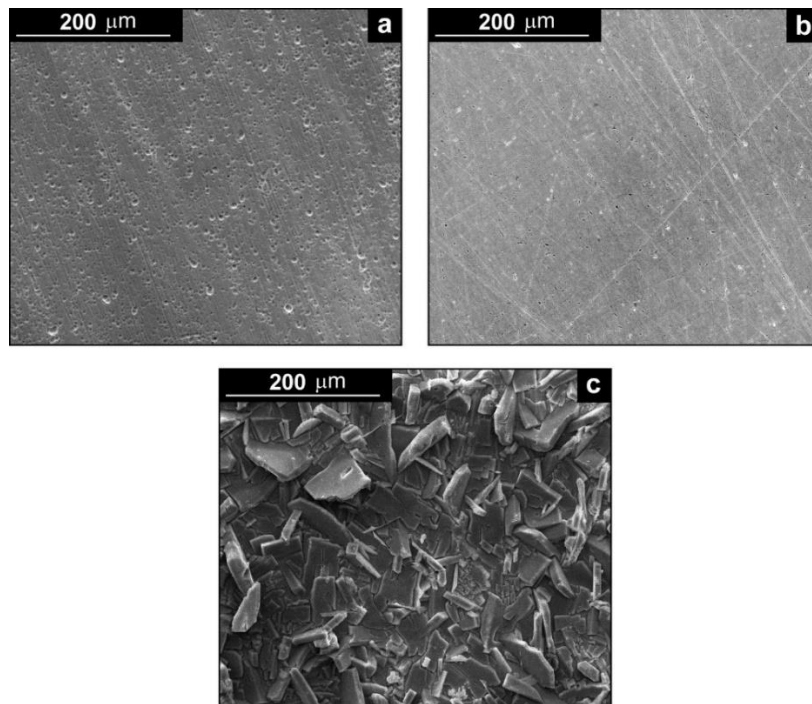


Fig. 6.2 Morfologia del substrato al variare dei pretrattamenti:

a) *electroetching*; b) *anodizing*, c) *phosphating*

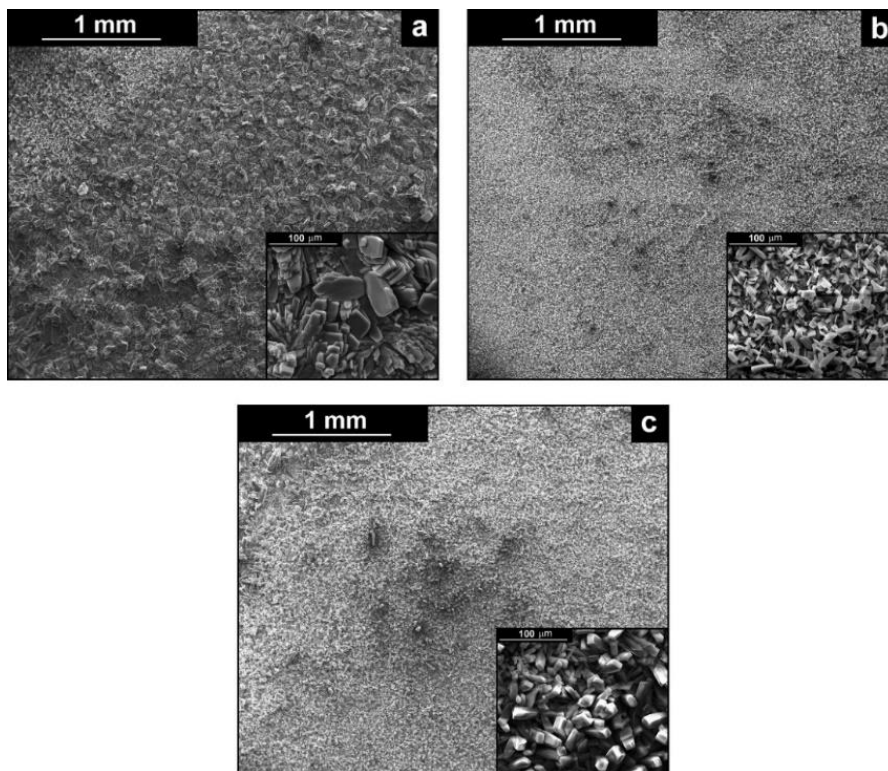


Fig. 6.3 Morfologia dei *coating* al variare dei pretrattamenti:

a) *electroetching*; b) *anodizing*, c) *phosphating*

Dopo la deposizione galvanica, ha avuto luogo un'investigazione chimico-fisica dei *coating*, che è iniziata con un'analisi XRD per determinare le possibili fasi cristalline che formano il deposito. In fig. 6.4 sono riportati i diversi diffrattogrammi dei *coating* con diverso pretrattamento del substrato.

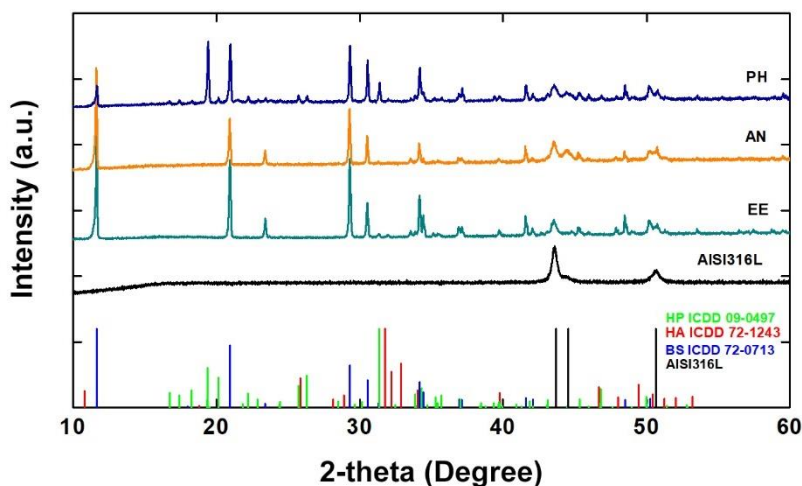


Fig. 6.4 Diffrattogrammi dei campioni variando il tipo di pretrattamento.

Si nota la presenza di diversi picchi di diffrazione che appartengono principalmente alla fase brushite ($2\theta=11.75^\circ$, 20.94° o 29.29°), risultato facilmente prevedibile, dato che la brushite rappresenta il precursore dell'idrossiapatite. Tuttavia, pur se con intensità minore rispetto alla brushite predominante, si sono rivelati anche i picchi caratteristici dell'idrossiapatite ($2\theta=31.74^\circ$, 32.18° , 32.87°). Gli altri picchi provengono dal substrato AISI 316L e sono meno intensi rispetto all'acciaio non rivestito, poiché la presenza del *coating* scherma i segnali di diffrazione del substrato. Dunque, si può attestare che il *coating* è costituito principalmente da entrambe le fasi, delle quali la brushite è quella più dominante. Per il deposito ottenuto su substrati con il pretrattamento di *phosphating*, sono stati identificati anche i picchi caratteristici dell'hopeite, la cui formula chimica è $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4(H_2O)$ ¹⁵⁹.

¹⁵⁹ Per l'identificazione dei picchi di diffrazione si è utilizzato come riferimento: ICDD Cards: Brushite (72-0713), Hydroxyapatite (72-1243), Hopeite (09-0497). *International Centre for Diffraction Data, Power Diffraction File*, 2007. Pennsylvania USA. In aggiunta sono stati inseriti i picchi del substrato.

Un'importante informazione desumibile dall'analisi dei diffrattogrammi è la dimensione media dei grani cristallini, calcolabile con l'equazione di Scherrer¹⁶⁰. I valori ottenuti, prendendo come riferimento il picco principale di diffrazione della brushite intorno a $2\theta=11^\circ$, sono riportati in tab. 6.1. A parità di condizioni di deposizione galvanica, si può constatare una dimensione più piccola dei grani in seguito al *phosphating* rispetto agli altri due pretrattamenti. Ciò si spiega grazie alla presenza del deposito di hopeite caratterizzato da una spiccata microrugosità; quest'ultima, infatti, accelera il processo di nucleazione rispetto all'accrescimento dei cristalli e crea delle condizioni favorevoli sul substrato per la precipitazione dei fosfati di calcio¹⁶¹. Studi in letteratura dimostrano che l'hopeite ha una bassa solubilità in ambiente alcalino, che si traduce in una lenta dissoluzione dei cristalli¹⁶². Questo processo stimola dunque la nucleazione di cristalli di idrossiapatite in presenza di ioni Ca^{2+} e HPO_4^{2-} . Per quanto riguarda l'*electroetching* e l'*anodizing*, è stata riscontrata una più grande dimensione dei grani. La dimensione maggiore è indice di una cristallinità più elevata del rivestimento. Tuttavia, un aumento della cristallinità comporta un tasso di dissoluzione più veloce in SBF¹⁶³.

Tab. 6.1 Dimensione media dei grani calcolata usando l'equazione di Scherrer. La deviazione standard è del 1.1%

	Picco	Dimensione (nm)
<i>Electroetching</i>	11.659	80
<i>Anodizing</i>	11.64	71
<i>Phosphating</i>	11.679	44

¹⁶⁰ L'equazione di Scherrer è utilizzata in cristallografia per valutare la dimensione dei grani cristallini ed è pari a $\tau = \frac{K\lambda}{\beta_\tau \cos \theta}$ dove τ è la dimensione dei grani; λ è la lunghezza d'onda dell'onda incidente (in questo caso è pari a 0.154 nm); β_τ è l'ampiezza a metà altezza del picco più intenso (FWHM) e θ l'angolo di diffrazione. Cfr. R. L. Snyder, R. Jenkins (2012). *Introduction to X-ray powder diffractometry*. Wiley-Interscience. p.90.

¹⁶¹ Cfr. C. Aparicio, J. M. Manero, F. Conde, M. Pegueroles, J. A. Planell, M. Vallet-Regi, F. J. Gil (2007). *Acceleration of apatite nucleation on microrough bioactive titanium for bone-replacing implants* in *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 82(3), 521-529. Cfr. X. X. Wang, S. Hayakawa, K. Tsuru, A. Osaka (2001). *A comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H₂O₂-, and NaOH-treated titanium surfaces* in *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 54(2), 172-178. Cfr. S. Ban, J. Hasegawa (2002). *Morphological regulation and crystal growth of hydrothermal-electrochemically deposited apatite* in *Biomaterials*, 23(14), 2965-2972.

¹⁶² Cfr. X. Zhang, G. Y. Xiao, B. Liu, C. C. Jiang, N. B. Li, Y. P. Lu (2016). *The formation of hydroxyapatite layer onto hopeite coating on stainless steel substrate* in *Corrosion Science*, 111, 216-229

¹⁶³ Cfr. M. P. Da Silva, J. H. C. Lima, G. A. Soares, C. N. Elias, M. C. De Andrade, S. M. Best, I. R. Gibson, I. R. (2001). *Transformation of monetite to hydroxyapatite in bioactive coatings on titanium* in *Surface and Coatings Technology*, 137(2-3), 270-276.

Lo stesso risultato è stato confermato dall'analisi di spettroscopia RAMAN, che ha rivelato i caratteristici modi vibrazionali dell'idrossiapatite e della brushite¹⁶⁴, mentre non è stato notato alcun segnale di hopeite nei campioni con il pretrattamento della fosfatazione (fig. 6.5). La brushite è caratterizzata da un elevato *splitting* e gli *shift* delle bande possono essere attribuiti al gruppo fosfato protonato. Per 985 cm^{-1} e 878 cm^{-1} si possono osservare i picchi relativi allo *stretching* (ν_1) del legame P-O del gruppo PO_4 . A 1081 cm^{-1} e 1059 cm^{-1} vi sono segnali che riguardano lo *stretching* (ν_3) del legame P-O del gruppo PO_4 . I modi vibrazionali a 379 cm^{-1} e 415 cm^{-1} fanno riferimento al *bending* O-P-O (ν_2) del gruppo HPO_4^{2-} . Inoltre, a 1121 cm^{-1} è stato osservato un picco meno intenso, attribuibile allo *stretching* (ν_3) del legame P-O del gruppo HPO_4^{2-} . Si rilevano inoltre i picchi relativi al *bending* (ν_4) e *stretching* (ν_4) dei legami P-O e O-P-O del gruppo PO_4 a 593 cm^{-1} e il *bending* (ν_4) a 530 cm^{-1} del gruppo idrogenofosfato.

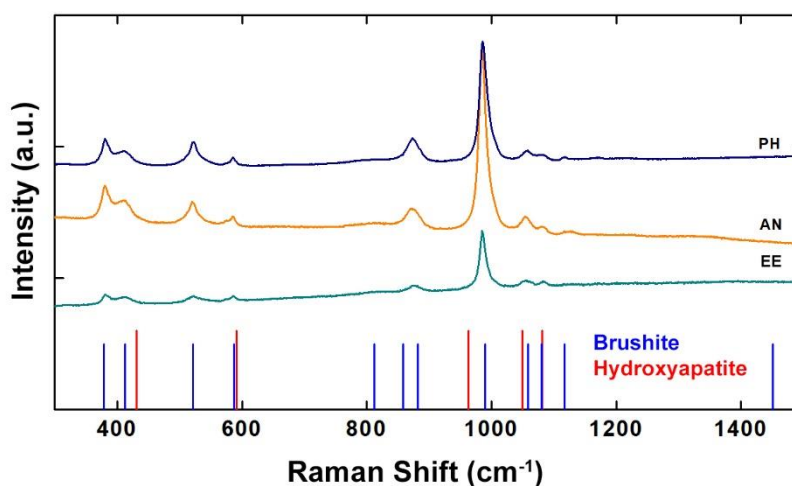


Fig. 6.5 Spettri RAMAN dei campioni variando il tipo di pretrattamento

Le stesse caratterizzazioni sono state eseguite sui campioni dopo un *aging* in SBF di 21 giorni, durante i quali si instaura un equilibrio di dissoluzione/riprecipitazione tra

¹⁶⁴ Per l'identificazione dei modi vibrazionali è stato utilizzato come riferimento: Ruff Database. *R.T. Downs, M. Hall-Wallace in The American Mineralogist Crystal Structure Database*. Cfr. G. Penel, N. Leroy, P. Van Landuyt, B. Flautre, P. Hardouin, J. Lemaitre, G. Leroy (1999). *Raman microspectrometry studies of brushite cement: in vivo evolution in a sheep model in Bone*, 25(2), 81S-84S. S. Koutsopoulos, (2002). *Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods in Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 62(4), 600-612. Cfr. G. R. Sauer, W. B. Zunic, J. R. Durig, R. E. Wuthier (1994). *Fourier transform Raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates in Calcified tissue international*, 54(5), 414-420.

idrossiapatite e brushite. Per quanto riguarda la caratterizzazione XRD mostrata in fig. 6.6, è interessante notare che sono presenti solo i picchi di diffrazione appartenenti all'idrossiapatite, mentre risultano assenti quelli della fase brushite, segno della sua totale conversione in idrossiapatite. Interessante notare come siano completamente scomparsi i picchi che appartenevano all'hopeite, sintomo di una completa dissoluzione/conversione di questa fase in SBF. Lo stesso si può desumere dalla spettroscopia RAMAN, i cui risultati sono riportati in fig. 6.7. Anche in questo caso i modi vibrazionali della brushite si annullano del tutto, mentre spicca un picco principale a 960 cm^{-1} che appartiene al primo modo vibrazionale di *stretching* simmetrico (ν_1) dello ione fosfato tipico dell'idrossiapatite, che è caratteristico ed unico e differente rispetto agli altri composti fosfati di calcio. Altri segnali sono presenti a 433 cm^{-1} dovuto al doppio *bending* (ν_2) degenerato del legame O-P-O del gruppo PO_4 e a 594 cm^{-1} dovuto al triplo *bending* (ν_4) degenerato del legame O-P-O del gruppo PO_4 ¹⁶⁵.

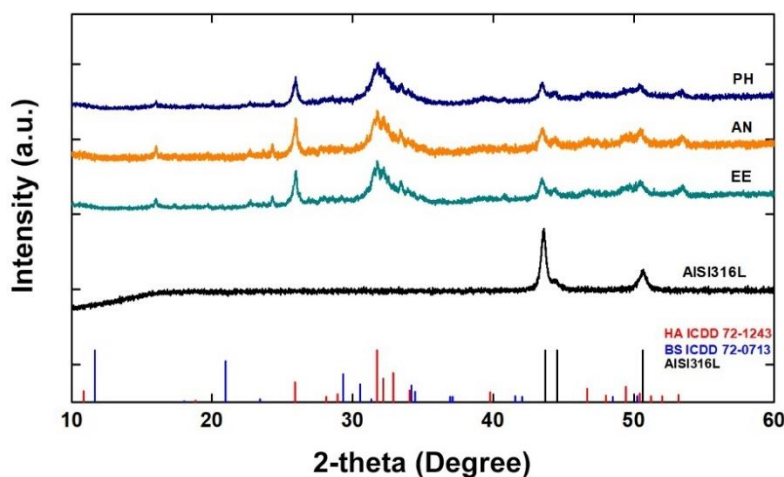
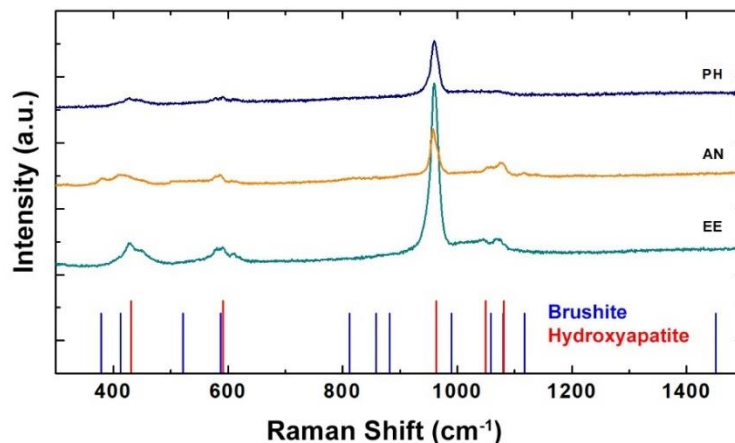
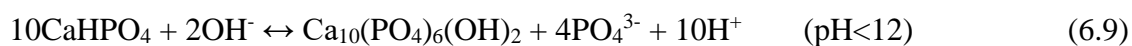


Fig. 6.6 Diffrattogrammi dei campioni eseguiti al termine dell'*aging* in SBF

¹⁶⁵ Cfr. G. Penel, G. Leroy, C. Rey, E. Bres (1998). *MicroRaman spectral study of the PO_4 and CO vibrational modes in synthetic and biological apatites* in *Calcified tissue international*, 63(6), 475-481. Cfr. S. Baradaran, E. Moghaddam, W. J. Basirun, M. Mehrali, M. Sookhajian, M. Hamdi, ... Y. Alias (2014). *Mechanical properties and biomedical applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced graphene oxide composite* in *Carbon*, 69, 32-45. Cfr. S. Koutsopoulos, S. (2002). *Synthesis and characterization...*


 Fig. 6.7 Spettri RAMAN eseguiti al termine dell'*aging* in SBF

Questi risultati concordano con quanto ha evidenziato Nur¹⁶⁶, secondo cui in SBF si instaura un equilibrio reversibile tra la fase brushite ed idrossiapatite secondo la reazione (6.9):



Un'ulteriore conferma proviene da un'analisi elementare condotta tramite EDS, con cui è stato possibile calcolare i rapporti di Ca/P e Ca/Fe¹⁶⁷. Dai valori medi calcolati e riportati in tab. 6.2 si evince che, subito dopo la deposizione, nei *coating* è presente in modo predominante la brushite in accordo alle precedenti caratterizzazioni, mentre dopo 21 giorni di *aging* il rapporto aumenta, dato che la fase brushite è convertita in idrossiapatite. È stato anche studiato il rapporto Ca/Fe, che può essere usato come indice qualitativo dello spessore dei *coating*: da esso questo rapporto si evince che lo spessore dei *coating* per i substrati trattati con l'*electroetching* e *phosphating* è maggiore rispetto a quello ottenuto usando substrati trattati con l'*anodizing*. Dopo l'*aging* invece gli spessori maggiori riguardano i campioni ottenuti sui substrati pretrattati con *electroetching* e *anodizing*.

¹⁶⁶ Cfr. A. Nur, H. Setyawan, A. Widjaja, I. W. Lenggoro (2014). *Electrochemical processes for the formation of hydroxyapatite powders in Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 9(3), 168.

¹⁶⁷ Con questa analisi permette di avere una stima della composizione chimica del deposito. Infatti, il rapporto Ca/P vale 1 per la brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 1.66 per idrossiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Invece un'informazione qualitativa sullo spessore dei depositi proviene dal rapporto tra Ca/Fe: più alto è il valore di questo rapporto, maggiore sarà lo spessore.

	Pre Aging			Post Aging		
	EE	AN	PH	EE	AN	PH
Ca/P	1.09	1	1.1	1.9	1.82	1.77
Ca/Fe	No Fe	5.55	No Fe	No Fe	No Fe	10.08

In fig. 6.8 sono messe a confronto le morfologie dei rivestimenti dopo l'*aging* in SBF. Vi si può notare che a livello macroscopico non vi sono cambiamenti sostanziali nella morfologia dei depositi. A livello microscopico invece si evidenzia una modifica superficiale caratterizzata da una microrugosità dovuta ai processi di dissoluzione e formazione di una nuova matrice cristallina, come del resto conferma il lavoro di Da Rocha¹⁶⁸. Tuttavia, i campioni risultano uniformemente rivestiti. Sono presenti alcune crepe sulla superficie per il campione pretrattato tramite *phosphating* e la loro presenza può essere attribuita ad una variazione di volume dovuta all'essiccamento del deposito una volta che il campione è stato posto in aria fuori dalla soluzione di *aging*.

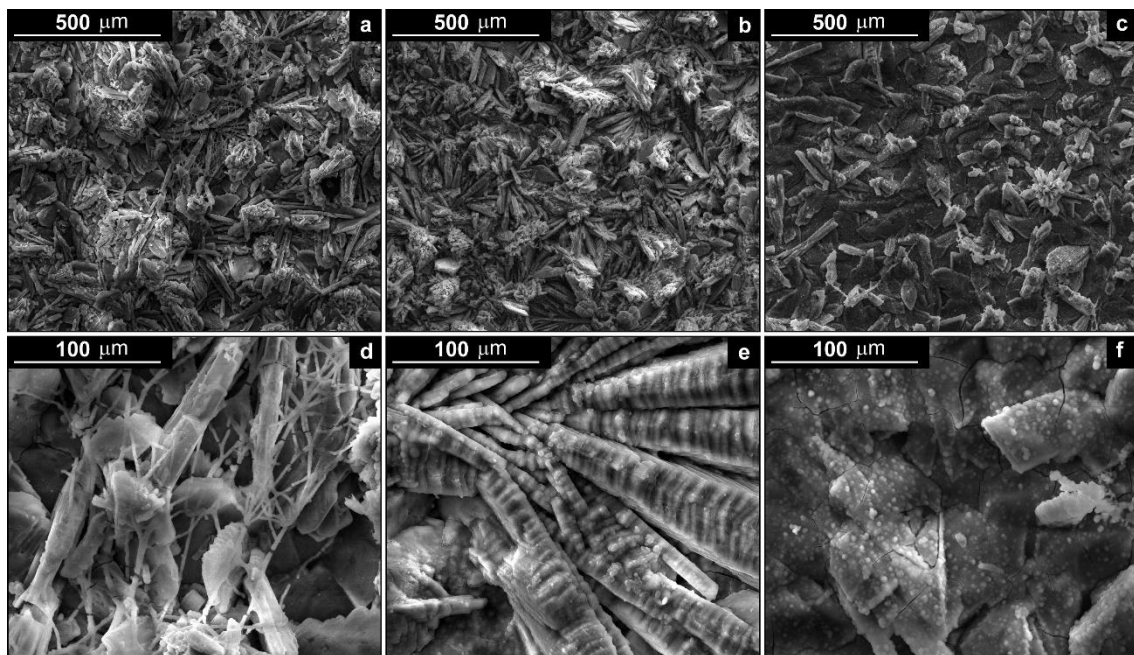


Fig. 6.8 Morfologia post-*aging*: a-d) *electroetching*; b-e) *anodizing*; c-f) *phosphating*

In concomitanza alle caratterizzazioni chimico-fisiche, sono stati eseguiti test elettrochimici per valutare le prestazioni durante l'*aging* in SBF.

¹⁶⁸ Cfr. D. N. Da Rocha, M. H. P. Da Silva, J. B. De Campos, R. L. S. B. Marçal, D. Q. Mijares, P. G. Coelho, L. R. Cruz (2018). *Kinetics of conversion of brushite coatings to hydroxyapatite in alkaline solution* in *Journal of materials research and technology*, 7(4), 479-486.

Il monitoraggio dell'OCP sui campioni presi in esame è riportato in fig. 6.9 e in esso non si notano *spike* di potenziale durante i primi trenta minuti di immersione in SBF. Non si osserva una variazione importante dovuta alla continua evoluzione del rivestimento, che è parzialmente solubilizzato e ridepositato quando è in contatto con SBF. È interessante sottolineare come durante le tre settimane di *aging*, il valore dell'OCP, che è intimamente legato al potenziale di corrosione, si sposta verso potenziali più nobili rispetto all'acciaio privo di rivestimento. Pertanto, è possibile affermare che la presenza del *coating*, indipendentemente dal tipo di pretrattamento eseguito, conferisce una resistenza alla corrosione.

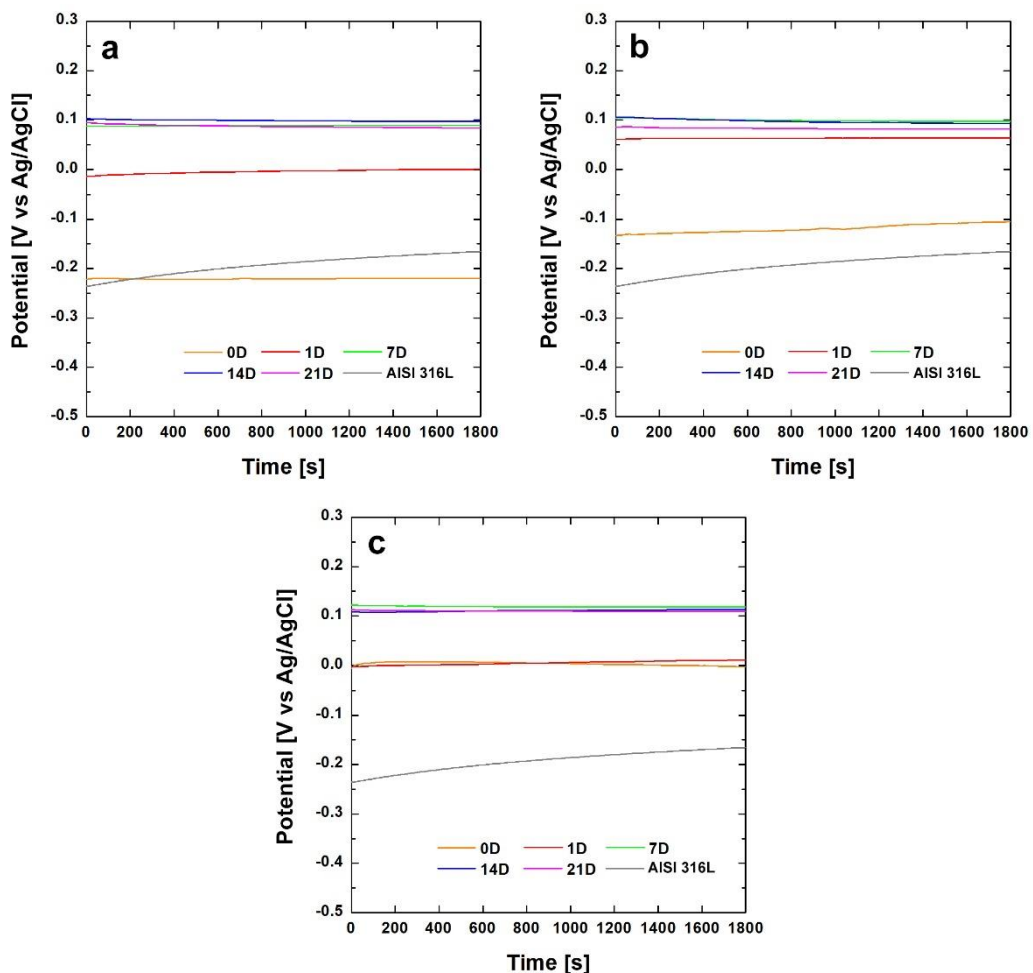


Fig. 6.9 Monitoraggio dell'OCP: a) *electroetching* b) *anodizing* c) *phosphating*

In fig. 6.10 sono riportate le curve di polarizzazione dei campioni rivestiti messi a confronto con l'acciaio AISI 316L nudo¹⁶⁹.

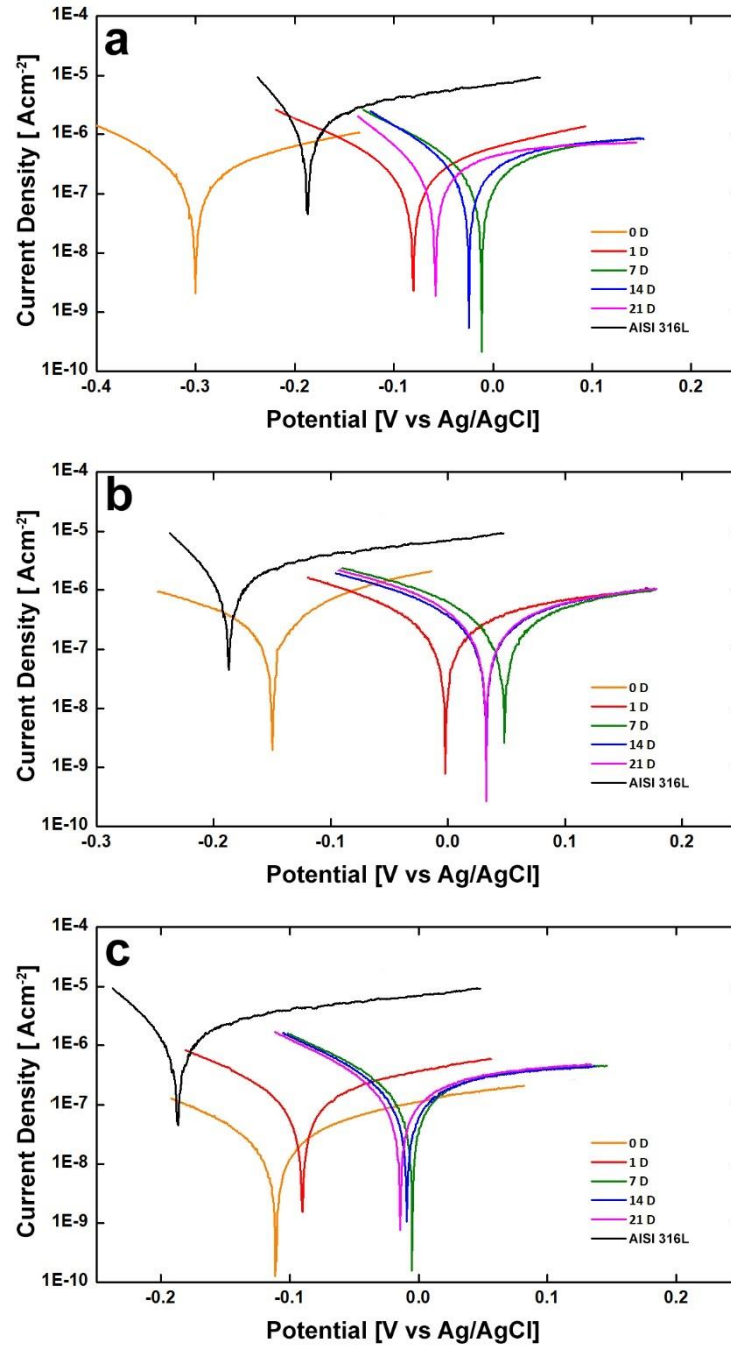


Fig. 6.10 Curve di polarizzazione a) *Electroetching* b) *Anodizing* c) *Phosphating*

¹⁶⁹ Cfr. S. Paul, C. Mandal (2013). *Biocompatibly coated 304 stainless steel as superior corrosion-resistant implant material to 316L steel in Journal of materials engineering and performance*, 22(10), 3147-3154.

I campioni rivestiti per ogni pretrattamento considerato sono caratterizzati da un potenziale di corrosione più nobile rispetto a quello dell'acciaio nudo, segno che la corrosione è un processo termodinamicamente meno vantaggioso. In particolare, il valore del potenziale aumenta di circa 180 mV rispetto all'acciaio nudo al termine del ventunesimo giorno. Per quanto riguarda il valore della densità di corrente di corrosione, i campioni rivestiti, a prescindere dal pretrattamento, sono caratterizzati da valori più bassi rispetto all'acciaio nudo di un ordine di grandezza.

Confrontando i pretrattamenti, l'*anodizing* è quello che offre un aumento del potenziale di corrosione, quindi una maggiore nobiltà all'elettrodo; l'*electroetching* invece è il meno prestante dato che ha correnti di corrosione più alte; il *phosphating* è caratterizzato da correnti di corrosione più basse anche se i valori del potenziale di corrosione sono inferiori all'*anodizing*¹⁷⁰. La cristallinità dei rivestimenti realizzati gioca un ruolo fondamentale in termini di *performance* di resistenza alla corrosione. Infatti, una cristallinità più bassa è strettamente legata ad una migliore azione protettiva, poiché la velocità di dissoluzione è più bassa in SBF. Difatti, il *coating* realizzato dopo il pretrattamento del *phosphating* ha una cristallinità più bassa. Invece, il pretrattamento di *electroetching* è caratterizzato da una cristallinità più alta e dunque da una velocità di dissoluzione maggiore. Ciò è in linea con i valori riportati in tab. 6.3, in cui i valori del potenziale di corrosione (E_{corr}) e della densità di corrente di corrosione (i_{corr}) sono stati ricavati tramite estrapolazione delle curve di Tafel. Dai risultati emerge che nel caso dell'*electroetching* si ha il valore di E_{corr} più basso e la i_{corr} più alta.

Tab. 6.3 Parametri di corrosione valutati a diversi tempi di giorni di *aging* per i campioni ottenuti a diversi pretrattamenti: potenziale di corrosione (E_{corr}) e densità di corrente di corrosione (i_{corr})

	Time					AISI 316L
	0	1	7	14	21	
<i>Electroetching</i>						
E_{corr} [V]	-0.3	-0.078	-0.009	-0.028	-0.06	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	4.91E-07	4.18E-07	2.42E-07	2.20E-07	5.43E-07	2.52E-06
<i>Anodizing</i>						
E_{corr} [V]	-0.158	-0.001	0.049	0.027	0.034	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	4.12E-07	3.79E-07	4.93E-07	4.25E-07	2.88E-07	2.52E-06
<i>Phosphating</i>						
E_{corr} [V]	-0.112	-0.094	0.006	0.010	-0.013	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	2.65E-08	3.20E-07	3.49E-07	3.17E-07	1.54E-07	2.52E-06

¹⁷⁰ Le fluttuazioni in termini di E_{corr} e i_{corr} sono dovute al continuo equilibrio tra dissoluzione e riprecipitazione che tende a modificare la superficie del coating. Cfr. D. T. M. Thanh, P. T. Nam, N. T. Phuong, N. Van Anh, T. Hoang, T. Dai Lam (2013). *Controlling the electrodeposition, morphology and structure of hydroxyapatite coating on 316L stainless steel in Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 2037-2045.

La spettroscopia d'impedenza è stata effettuata sui campioni pretrattati e rivestiti per ottenere ulteriori informazioni sulle prestazioni dei *coating* a seconda del tipo di pretrattamento eseguito. Le misure sono state rappresentate nelle figg. 6.11, 6.12 e 6.13 e fanno riferimento alle prove eseguite a diversi giorni di *aging*. Il miglior *fitting* è stato ottenuto prendendo in riferimento il circuito equivalente proposto da Kathavate che simula il comportamento di rivestimenti disomogenei modellato da Jüttner per descrivere i rivestimenti con la presenza di difetti¹⁷¹.

¹⁷¹ Cfr. V. S. Kathavate, D. N. Pawar, N. S. Bagal, P. P. Deshpande (2020). *Role of nano ZnO particles in the electrodeposition and growth mechanism of phosphate coatings for enhancing the anti-corrosive performance of low carbon steel in 3.5% NaCl aqueous solution* in *Journal of Alloys and Compounds*, 823, 153812. Cfr. K. Jüttner (1990). *Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) of corrosion processes on inhomogeneous surfaces* in *Electrochimica Acta*, 35(10), 1501-1508.

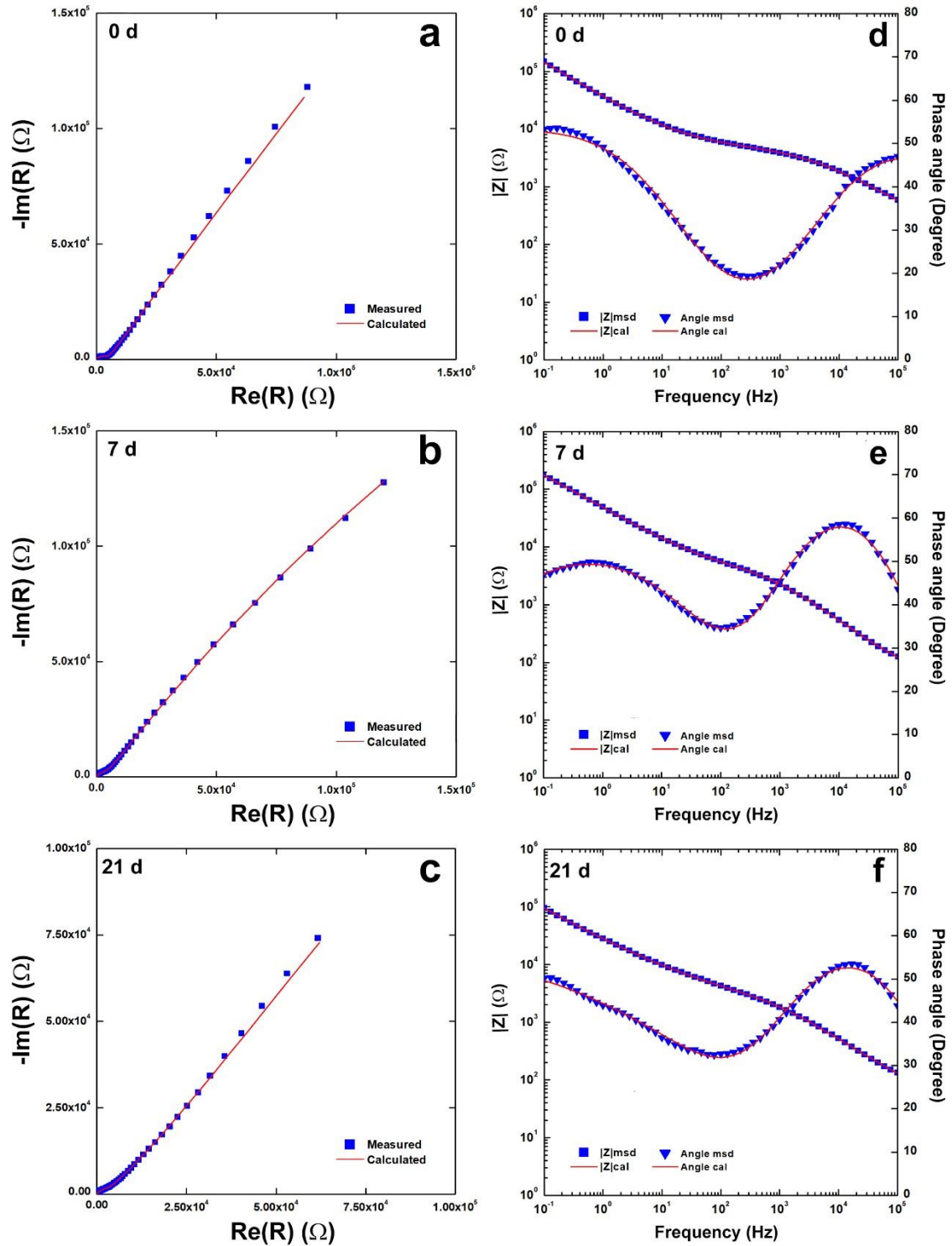


Fig. 6.11 Diagrammi di Nyquist e Bode del *coating* su acciaio AISI316L pretrattato tramite *electroetching*

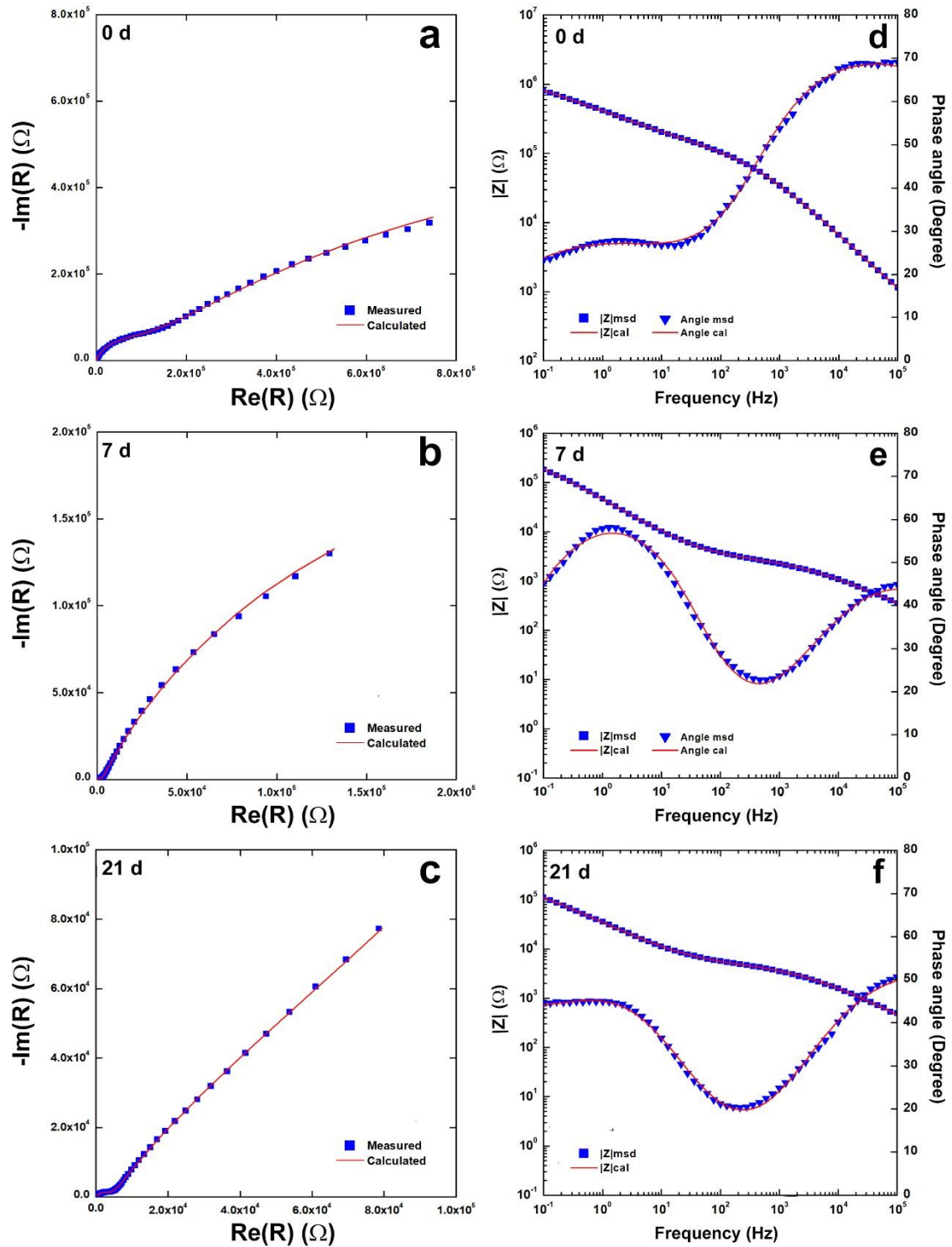


Fig. 6.12 Diagrammi di Nyquist e Bode del *coating* su acciaio AISI316L pretrattato tramite *anodizing*

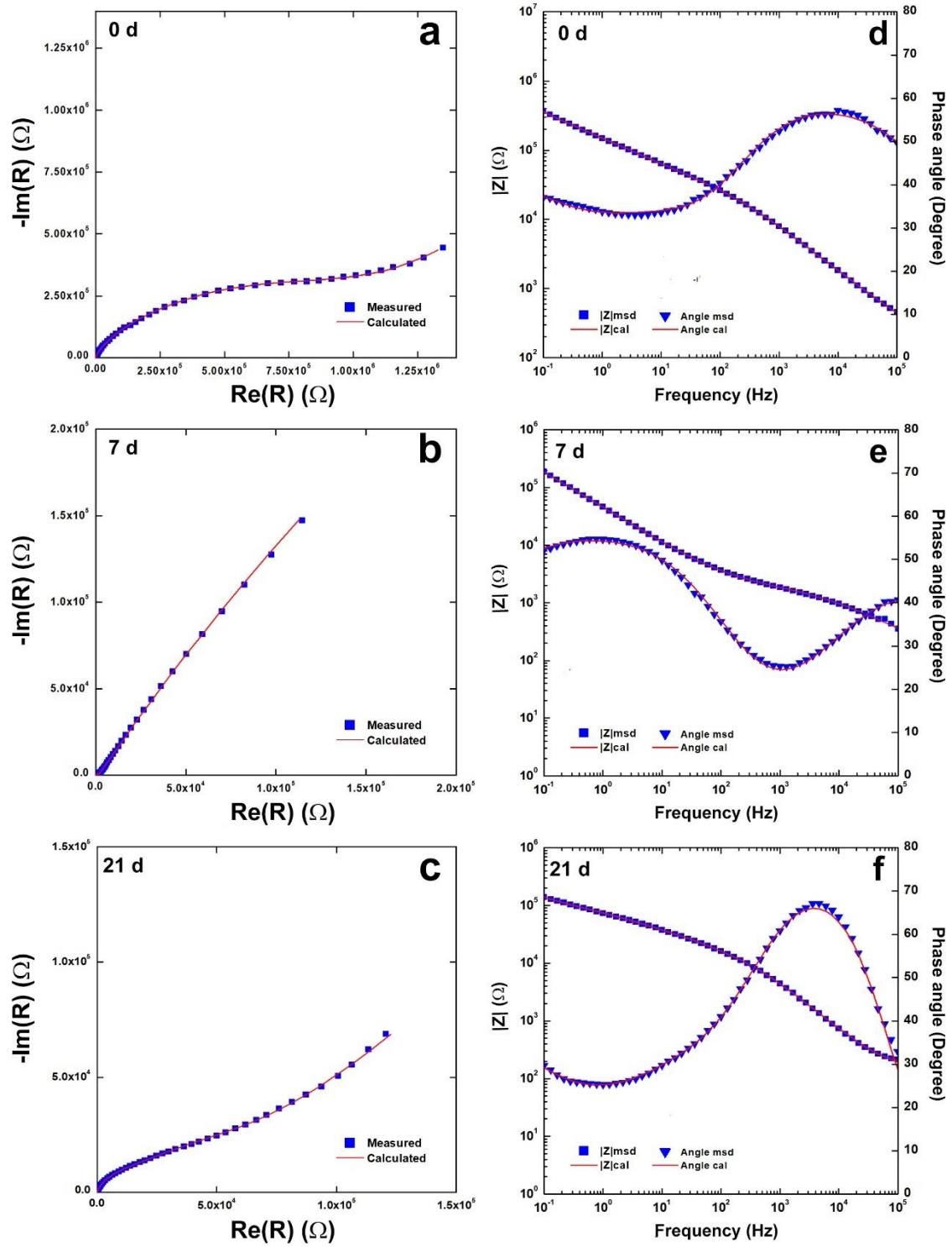


Fig. 6.13 Diagrammi di Nyquist e Bode del *coating* su acciaio AISI316L pretrattato tramite *phosphating*

Nella fattispecie il circuito equivalente è $R_s(CPE_1(R_1(CPE_2(R_2W))))$. In particolare, R_s è la resistenza della soluzione, il CPE_1 e R_1 modellano il comportamento dello strato poroso di deposito esterno a contatto con la soluzione di SBF, mentre CPE_2 e R_2 modellano il comportamento dello strato a contatto con il substrato metallico. L'elemento circuitale Warburg (W) è stato inserito per simulare i processi diffusivi all'interno della struttura porosa. L'utilizzo del CPE (*Constant Phase Element*) è stato utilizzato da Hinderliter per modellare *coating* non omogenei dovuti a varie geometrie, presenza di difetti e variazione di composizione¹⁷². Per quanto riguarda l'acciaio nudo, è stato utilizzato un circuito più semplice $R_s(CPE_2R_2)$ che tiene conto della capacità di doppio strato elettrico e le resistenze della soluzione e al trasporto di carica.

I parametri ottenuti con i circuiti equivalenti utilizzati sono riportati nelle tabb. 6.4, 6.5 e 6.6. I *fitting* sono stati ottenuti con un valore di χ^2 dell'ordine di 10^{-4} e l'errore relativo di ogni parametro è inferiore al 10%. In alcuni casi per migliorare il *fitting* è stato necessario utilizzare un altro circuito equivalente $R_s(CPE_1(R_1W))(CPE_2R_2)$ ¹⁷³. Indipendentemente dal tipo di pretrattamento, i parametri assumono valori diversi durante l'*aging*. Questo risultato è dovuto alla continua evoluzione del *coating* in SBF. In accordo alle curve di polarizzazione, la spettroscopia d'impedenza conferma che per il pretrattamento di *electroetching* si registra un valore di impedenza globale più basso rispetto agli altri due pretrattamenti, segno che le prestazioni circa la resistenza alla corrosione sono peggiori. Al giorno zero non è stato necessario utilizzare l'elemento di Warburg, dovuto all'assenza di fenomeni diffusivi e presenza di un *coating* più compatto. Tuttavia, i valori di R_2 sono paragonabili a quello dell'acciaio non rivestito. Il substrato pretrattato con il *phosphating* al giorno zero ha un modulo complessivo di impedenza molto elevato (maggiore di $10^6 \Omega$) dovuto alla presenza del *coating* di fosfati di zinco, confermato da valori

¹⁷² Cfr. S. Amand, M. Musiani, M. E. Orazem, N. Pébère, B. Tribollet, V. Vivier (2013). *Constant-phase-element behavior caused by inhomogeneous water uptake in anti-corrosion coatings* in *Electrochimica Acta*, 87, 693-700. Cfr. B. R. Hinderliter, S. G. Croll, D. E. Tallman, Q. Su, G. P. Bierwagen (2006). *Interpretation of EIS data from accelerated exposure of coated metals based on modeling of coating physical properties* in *Electrochimica acta*, 51(21), 4505-4515. Cfr. O. A. Stafford, B. R. Hinderliter, S. G. Croll (2006). *Electrochemical impedance spectroscopy response of water uptake in organic coatings by finite element methods* in *Electrochimica Acta*, 52(3), 1339-1348. Cfr. J. B. Jorcin, M. E. Orazem, N. Pébère, B. Tribollet (2006). *CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy* in *Electrochimica Acta*, 51(8-9), 1473-1479. Cfr. M. E. Orazem, B. Tribollet (2008). *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

¹⁷³ Cfr. W. Revie (Ed.) (2011). *Uhlig's corrosion handbook...*p.1151 Cfr. D. C. Silverman (1991). *On ambiguities in modeling electrochemical impedance spectra using circuit analogues* in *Corrosion*, 47(2), 87-89.

di E_{corr} e i_{corr} più bassi rispetto agli altri pretrattamenti, ma al termine dell'*aging* il suo valore diminuisce di un ordine di grandezza e si mantiene superiore a $10^5 \Omega$.

Tab. 6.4 Parametri di fitting delle misure di impedenza del *coating* su acciaio AISI316L pretrattato tramite electroetching. La deviazione standard media è del 3.4%.

	Tempo (Giorni)					AISI316L	
	0	1	7	14	21		
	R(Q(R(Q(RW))))				R(Q(RW))(QR)	R(QR)	
R_s	45	68.02	51.94	52.38	R_s	42.3	38
CPE1-Y	4.958E-07	3.67E-06	4.2E-07	4.33E-07	CPE1-Y	8.355E-07	-
CPE1-n	0.6093	0.7977	0.7605	0.75	CPE1-n	0.6987	-
R_1	5196	5764	4706	5437	R_1	3487	-
CPE2-Y	8.906E-06	5.52E-06	6.59E-06	7.31E-06	W	1.51E-05	-
CPE2-n	0.6094	0.5957	0.5918	0.5633	CPE2-Y	9.76E-05	6.11E-05
R_2	9.67E+06	9.99E+05	1.27E+06	9.02E+05	CPE2-n	0.9712	0.8682
W	4.43E-05	7.03E-05	5.00E-05	1.32E-05	R_2	9.88E+04	6.81E+04

Tab. 6.5 Parametri di fitting delle misure di impedenza del *coating* su acciaio AISI316L pretrattato tramite anodizing. La deviazione standard media è del 4.2%.

	Tempo (Giorni)					AISI316L
	0	1	7	14	21	
	R(Q(R(Q(RW))))					R(QR)
R_s	45	84.83	34	25	10	38
CPE1-Y	2.397E-08	9.8E-07	1.17E-06	6.77E-07	5.88E-07	-
CPE1-n	0.789	0.6446	0.5838	0.6084	0.6111	-
R_1	8.93E+04	9700	3234	4640	5078	-
CPE2-Y	1.20E-06	3.92E-06	4.75E-06	7.90E-06	8.38E-06	6.11E-05
CPE2-n	0.5264	0.6532	0.7269	0.6473	0.6281	0.8682
R_2	2.46E+06	8.55E+05	5.30E+05	2.07E+05	1.88E+05	6.81E+04
W	---	1.26E-06	4.52E-05	9.60E-06	7.19E-06	-

Tab. 6.6 Parametri di fitting delle misure di impedenza del *coating* su acciaio AISI316L pretrattato tramite phosphating La deviazione standard media è del 4.8%.

	Tempo (Giorni)					AISI 316L	
	0	1	7	14	21		
	R(Q(RW))(QR)		R(Q(R(Q(RW))))			R(QR)	
R_s	71.29	R_s	57	38	34	26	38
CPE1-Y	2.713E-07	CPE1-Y	3.19E-07	1.33E-06	1.60E-06	1.146E-07	-
CPE1-n	0.7258	CPE1-n	0.639	0.5709	0.5618	0.8536	-
R_1	27290	R_1	1604	2201	3590	1278	-
W	4.13E-06	CPE2-Y	1.76E-06	5.59E-06	5.47E-06	3.47E-06	6.11E-05
CPE2-Y	4.08E-06	CPE2-n	0.58	0.6435	0.6682	0.546	0.8682
CPE2-n	0.5416	R_2	2.53E+05	2.42E+06	2.63E+05	9.66E+04	6.81E+04
R_2	7.38E+04	W	6.70E-06	3.34E-04	5.25E-06	1.05E-05	-

Infine, anche le misure di impedenza del campione con *anodizing* attestano che il rivestimento possiede un comportamento simile al *phosphating* e ottiene al termine dei 21 giorni di *aging* un'impedenza globale di $10^5 \Omega$. Similmente all'*electroetching*, anche al giorno zero non è stato necessario utilizzare l'elemento di Warburg.

Un'altra informazione importante proviene da un'analisi effettuata all'ICP-OES che conferma la capacità del *coating* di limitare i fenomeni corrosivi. Infatti, è stata quantificata la concentrazione degli ioni metallici in soluzione che provengono dal substrato (Fe, Ni, Cr, Mo) al termine delle tre settimane di *aging* in SBF. Dalla tab. 6.7 è possibile notare che la concentrazione degli ioni metallici è molto bassa, al di sotto dei ppm e soprattutto sotto i limiti di soglia pericolosi per la salute dell'uomo¹⁷⁴.

Tab. 6.7 Concentrazione degli ioni in SBF dopo 21 giorni di *aging*. La deviazione standard media è 0.7%

	Fe	Ni	Cr	Mo	Ca	P
	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]
SBF mis.	0	0	0	0	89.75	31.74
SBF cal.	0	0	0	0	105	31
AISI 316L	0.088	0.197	0	0	89.16	28.82
<i>E.etching</i>	0.022	0.224	0	0	43.32	110.78
<i>Anodizing</i>	0.054	0.034	0	0	35.32	56.94
<i>Phosphating</i>	0.032	0.042	0	0	37.19	98.15

I dati riportati in tabella riflettono quanto è stato dedotto dalle curve di polarizzazione, ovvero che i *coating* riescono a rallentare il processo di corrosione del substrato. Sono state riportate inoltre le concentrazioni degli ioni calcio e fosforo perché confermano quanto detto riguardo l'equilibrio che si instaura tra brushite ed idrossiapatite. Infatti, la concentrazione degli ioni calcio è minore rispetto a quella calcolata in SBF. Questo fenomeno è dovuto all'incorporazione degli ioni calcio nella struttura cristallina del deposito, mentre la concentrazione degli ioni fosforo aumenta in base all'equilibrio riportato da Nur¹⁷⁵.

È stata inoltre valutata la citotossicità dei rivestimenti in idrossiapatite e si assumono integralmente le conclusioni di uno studio che dimostra che i *coating* in idrossiapatite realizzati con il metodo di deposizione galvanica non inibiscono l'attività dei

¹⁷⁴ Cfr. Y. S. Hedberg, I. Odnevall Wallinder (2016). *Metal release from stainless steel in biological environments: A review in Biointerphases*, 11(1), 018901.

¹⁷⁵ Cfr. A. Nur, *Electrochemical...*

preosteoblasti. In particolare, è stato notato che nel periodo di osservazione di 7 giorni i valori dell'assorbanza, che sono collegati direttamente al numero delle cellule, non hanno particolari differenze tra i terreni di coltura venuti in contatto con i campioni di acciaio 316L rivestiti in idrossiapatite e quelli non trattati, come mostrato in fig. 6.14¹⁷⁶.

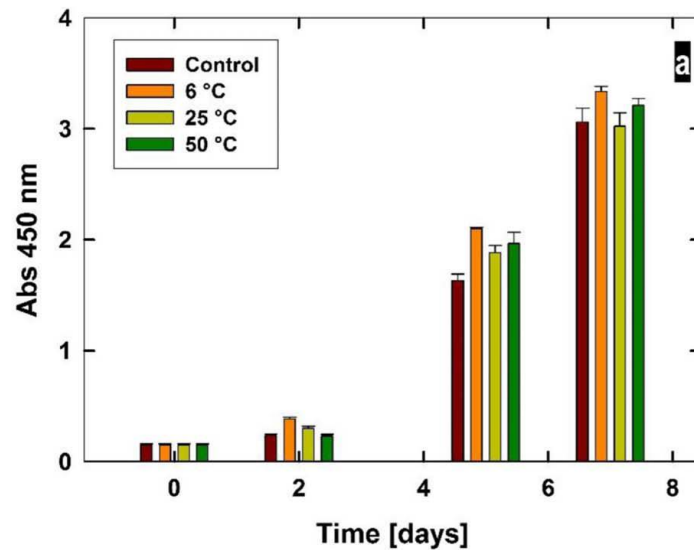


Fig. 6.14 Vitalità delle cellule MC3T3-E1 misurata con assorbanza a 450 nm usando CCK-8 kit a 0,2,5 e 7 giorni di coltura. Ogni istogramma si riferisce a diverse a diversi campioni realizzati a diverse temperature di deposizione galvanica (6, 25 e 50 °C)¹⁷⁷.

¹⁷⁶ Cfr. G. Blanda (2018) *In vitro corrosion...*

¹⁷⁷ Cfr. *ibid.*, p. G9.

Capitolo 7 – *Coating* compositi di fosfati di calcio e *Bioglass* su acciaio AISI 316L

In questo capitolo sarà presentato un *coating* composito a base di fosfati di calcio e *Bioglass*. La scelta di focalizzare l'attenzione su rivestimenti compositi ricade sulla possibilità di studiare l'interazione sinergica tra questi due biomateriali al fine di migliorare le prestazioni globali del *coating*.

La letteratura sull'argomento già ampiamente illustrata in par. 4.2, ci rammenta come l'utilizzo di codesti materiali sia soddisfacente come rivestimenti per metalli in campo ortopedico. Approvato dalla *Food and Drug Administration* e ampiamente utilizzato già in campo biomedico, il *Bioglass* si distingue dagli altri tipi di ceramici dalla capacità con la quale riesce facilmente a creare uno strato di idrossiapatite, fatto dovuto ad una serie di reazioni chimiche superficiali. Dunque, da un punto di vista applicativo il *Bioglass* risulta un materiale sia osteoconduttivo che osteoinduttivo, nella misura in cui induce le cellule primitive a differenziarsi per formare il tessuto osseo. Inoltre altro aspetto molto interessante del *Bioglass* è la sua proprietà antibatterica e antimicrobica. Da studi condotti *in vitro* si è dimostrato efficace su un'ampia varietà di batteri aerobici e anaerobici, in grado di uccidere i batteri o inibire la loro crescita, capace anche di una buona attività contro la formazione di biofilm¹⁷⁸, non sono altro che comunità microbiche responsabili di numerose infezioni nell'uomo come l'endocardite o le infezioni periprotetichesiche.

A differenza dei tradizionali metodi di deposizione come smaltatura, sol-gel, deposizione elettroforetica, *laser cladding* o *thermal sprayng*¹⁷⁹, la deposizione galvanica sarà quindi presentata come una strada alternativa per la deposizione del *coating* composito a base di fosfati di calcio e *Bioglass*. Oltre agli studi di biocompatibilità, saranno mostrate le caratteristiche chimico-fisiche e le *performance* in termine di protezione alla corrosione.

¹⁷⁸ Cfr. T. Waltimo, T. J. Brunner, M. Vollenweider, W. J. Stark, M. Zehnder (2007). *Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5* in *Journal of dental research*, 86(8), 754-757.

¹⁷⁹ N.O. Joy-anne (2019). *Bioactive glass coatings on...*

7.1 Procedure sperimentali

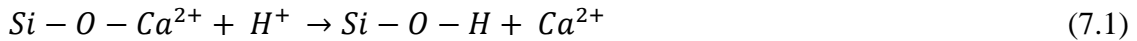
Prima della deposizione del rivestimento, l'acciaio AISI 316L e l'anodo di zinco sono stati sottoposti a trattamenti di pulizia secondo la procedura descritta in par. 5.2. La soluzione elettrolitica è costituita da: 0.061 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.036 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1 M NaNO_3 . Sono state condotte diverse deposizioni variando la quantità di *Bioglass* 45S5 (0.5 gL^{-1} , 1 gL^{-1} , 2 gL^{-1}), la cui composizione chimica è riportata in letteratura¹⁸⁰. La deposizione è stata condotta in agitazione a 400 rpm per mantenere sospese le particelle di *Bioglass* in soluzione, per un tempo pari a 24 ore a temperatura ambiente. Per la concentrazione più alta in *Bioglass* (2 gL^{-1}) inizialmente è stato realizzato un *coating* di fosfato di calcio per 24 ore a 25 °C con agitazione di 400 rpm. Successivamente è stato effettuato un secondo step di deposizione, in cui in soluzione è stato aggiunto il *Bioglass* (2 gL^{-1}) prolungando il tempo di deposizione per altre 24 ore alle stesse condizioni di temperatura e agitazione¹⁸¹. Dopo la deposizione, i campioni sono stati asciugati all'aria prima di procedere alle caratterizzazioni.

Le reazioni di formazione del deposito di fosfato di calcio sono descritte in par. 6.2.2. In letteratura è stato ampiamente analizzato il meccanismo di formazione di fosfati di calcio in presenza di *Bioglass*¹⁸². Per quanto riguarda il secondo componente del *coating* composito, la presenza di *Bioglass* funge da punto di nucleazione per la formazione di nuovi cristalli del rivestimento. In una prima fase si ha lo scambio di ioni tra H^+ dalla soluzione con gli Na^+ e Ca^{2+} del *Bioglass*, che porta alla formazione di gruppi di silanolo come conseguenza dell'idrolisi dei gruppi di silice. Questo processo determina un incremento netto del pH della soluzione dovuto all'aumentare degli ioni OH^- . Il meccanismo di reazione parte dalla seguente reazione (7.1):

¹⁸⁰ Cfr. L. L. Hench (2006). *The story of Bioglass®* in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967-978.

¹⁸¹ La scelta di avere condotto la deposizione in due step nasce dal fatto che l'aumento di concentrazione delle particelle di *Bioglass* non permetteva di creare un *coating* compatto e uniforme.

¹⁸² Cfr. C. Turdean-Ionescu, B. Stevansson, I. Izquierdo-Barba, A. García, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M. Edén (2016). *Surface reactions of mesoporous bioactive glasses monitored by solid-state NMR: Concentration effects in simulated body fluid* in *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(9), 4961-4974. Cfr. S. M. Rabiee, N. Nazparvar, M. Azizian, D. Vashae, L. Tayebi (2015). *Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review* in *Ceramics International*, 41(6), 7241-7251. Cfr. J. Heikkilä (2011). *Use of bioactive glasses as bone substitutes in orthopaedics and traumatology* in *Bioactive Glasses* (pp. 189-208). Woodhead Publishing.



Successivamente, il reticolo della silice viene attaccato a causa di un aumento del pH. La dissoluzione della silice porta alla formazione di acido silicico $Si(OH)_4$ sulla superficie del *Bioglass* secondo la seguente equazione (7.2):



Dunque, la dissoluzione del reticolo porta alla realizzazione di una forma insolubile di silice che fungerà da centro di nucleazione per la formazione di fosfati di calcio. Sulla superficie delle particelle di *Bioglass* si forma uno strato di gel di silice con uno spessore variabile da 1 a 2 μm . Si verifica la precipitazione e la migrazione di ioni calcio sulla superficie della ceramica, seguita dall'incorporazione di anioni idrossido e fosfati. Tuttavia, rispetto al *layout* di cella separata già discussa in par. 5.2 e illustrata in fig. 5.2b, è stato necessario introdurre un agitatore magnetico che potesse così tenere in sospensione le particelle di *Bioglass* (fig. 7.1). In questo modo il *coating* composto si forma proprio a partire dall'inglobamento fisico durante la deposizione dei fosfati di calcio.

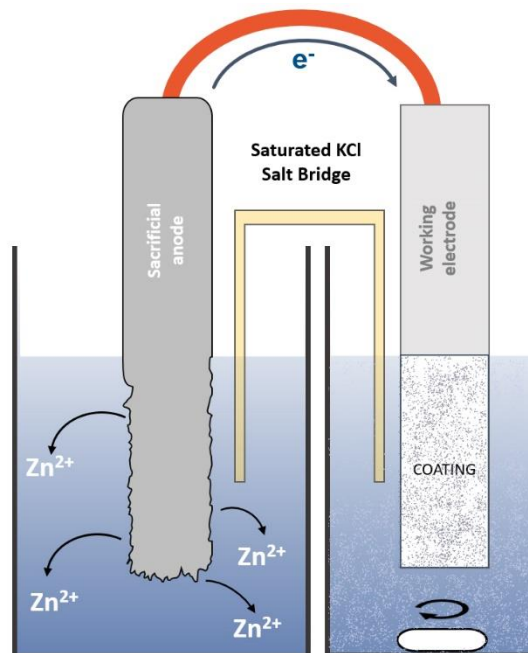


Fig. 7.1 Schema rappresentativo del *layout* di cella

7.2 Risultati

Prima di analizzare il *coating* composito, è stato necessario studiare l'effetto dell'agitazione per i *coating* in fosfato di calcio. In fig. 7.2a è mostrato il rivestimento in fosfato di calcio ottenuto tramite deposizione galvanica in condizioni statiche, mentre in fig. 7.2b lo stesso tipo di *coating* è realizzato agitando la soluzione elettrolitica.

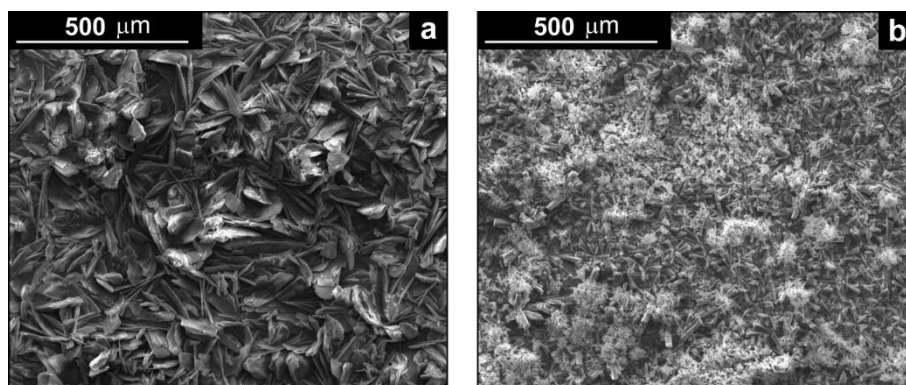


Fig. 7.2 Morfologia dei *coating* realizzati: a) senza agitazione statiche b) con agitazione

Da un punto di vista morfologico è possibile notare come l'effetto dell'agitazione conduca alla formazione di un *coating* con la tipica forma aghiforme dei fosfati di calcio e con una dimensione dei cristalli più piccola, se paragonati alle condizioni statiche della soluzione.

Azar ha studiato l'elettrocristallizzazione dei *coating* di idrossiapatite su Nitinol al variare delle condizioni fluidodinamiche della soluzione (fig. 7.3)¹⁸³. In particolare, ha constatato che l'accrescimento è un fenomeno più favorito rispetto alla nucleazione in condizioni fluidostatiche. Infatti, si crea all'interno dello strato diffusivo prossimo all'elettrodo un gradiente di concentrazione dei precursori. Questi vengono consumati sulla superficie del catodo e l'accrescimento dei cristalli avviene in maniera perpendicolare. In condizioni fluidodinamiche, lo strato diffusivo è più sottile e la concentrazione di

¹⁸³ Cfr. R. Abdel-Karim (2016). *Electrochemical Fabrication of Nanostructures* in *Handbook of Nanoelectrochemistry: Electrochemical Synthesis Methods, Properties, and Characterization Techniques*, 23-46. Cfr. R. Winand (1992). *Electrocrystallization-theory and applications* in *Hydrometallurgy*, 29(1-3), 567-598. Cfr. S. A. Calbeto (2011). *Nickel matrix micro/nano SiC composite electrodeposition* in *Escola Técnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona*. Cfr. Z. Azar, J. Khalil-Allafi, M. R. Etminanfar (2019). *Electro-crystallization of hydroxyapatite coatings on Nitinol rotating disk electrode* in *Materials Research Express*, 6(5), 055401.

bulk è pressoché simile a quella della superficie dell'elettrodo. Dunque, in questo caso il fenomeno della nucleazione è favorito rispetto all'accrescimento. Tuttavia, la concentrazione dei precursori è abbastanza alta da permettere la crescita dei cristalli parallelamente alla superficie¹⁸⁴.

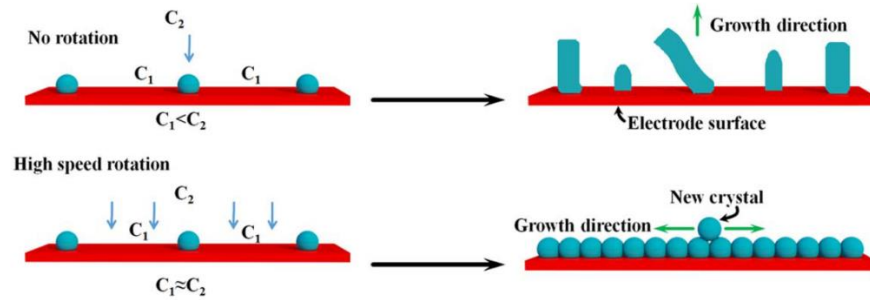


Fig. 7.3 Rappresentazione schematica del meccanismo di nucleazione e crescita proposto da Azar¹⁸⁵

Sono state analizzate e confrontate le diverse morfologie dei *coating* al variare della concentrazione di *Bioglass* in soluzione (fig. 7.4). In tutti i *coating* si può notare che il substrato metallico è ricoperto dal rivestimento in maniera uniforme. La tipica forma aghiforme dei fosfati di calcio (fig. 7.2b) scompare quando è presente il *Bioglass* in soluzione (fig. 7.4). In figg. 7.4c e 7.4f sono riportate le morfologie del campione ottenuto con deposizione a step, in cui si vede chiaramente una base formata dai cristalli dei fosfati di calcio. Durante il secondo step di deposizione è avvenuto l'inglobamento del *Bioglass* e la dimensione dei cristalli è paragonabile a quelli realizzati in assenza di *Bioglass* (fig. 7.4a). Nelle figg. 7.4d, 7.4e e 7.4f è possibile constatare la presenza di cristalli molto più piccoli, probabilmente dovuti all'inglobamento fisico del *Bioglass* durante la deposizione, che fungono da punti di nucleazione per i cristalli.

¹⁸⁴ Cfr. Z. Azar (2019). *Electro-crystallization ...*

¹⁸⁵ Cfr. *ibid.*

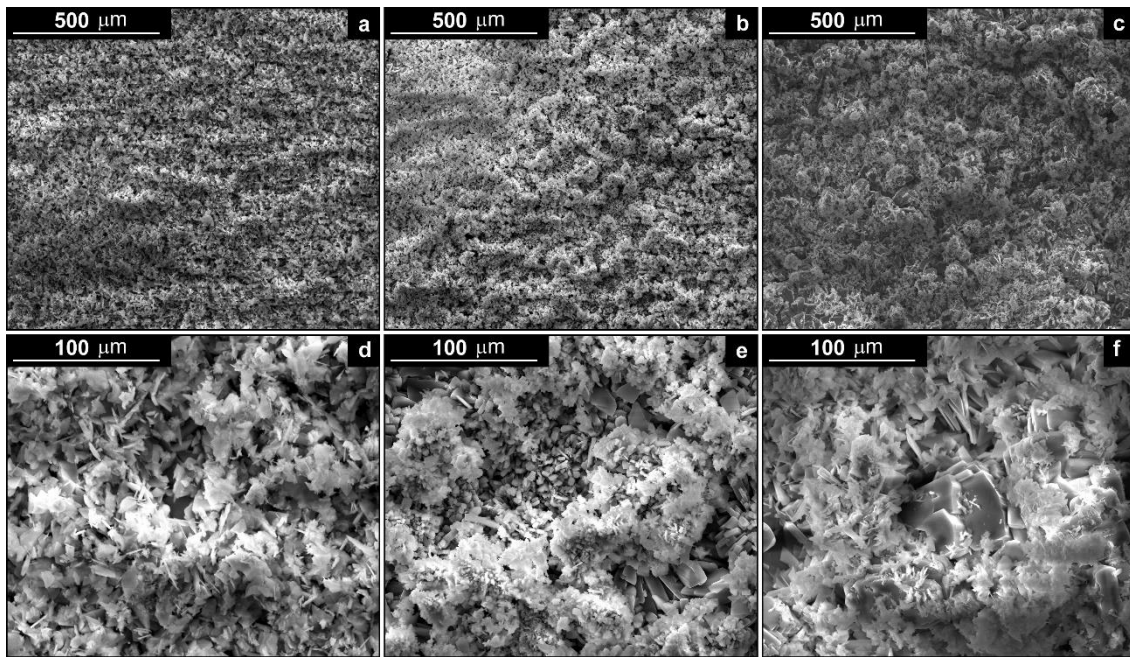
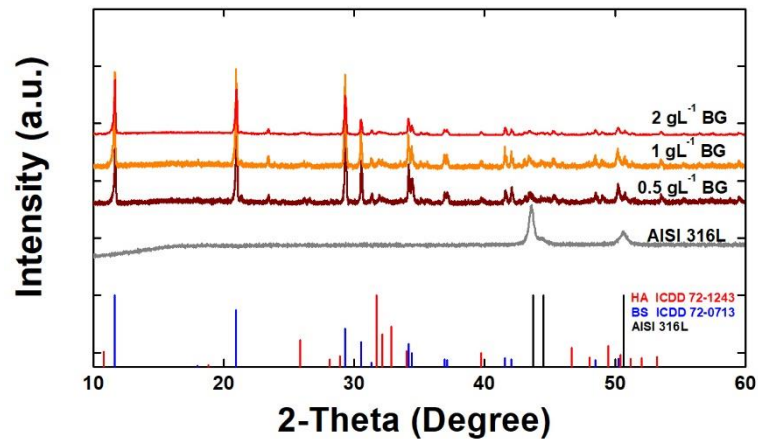
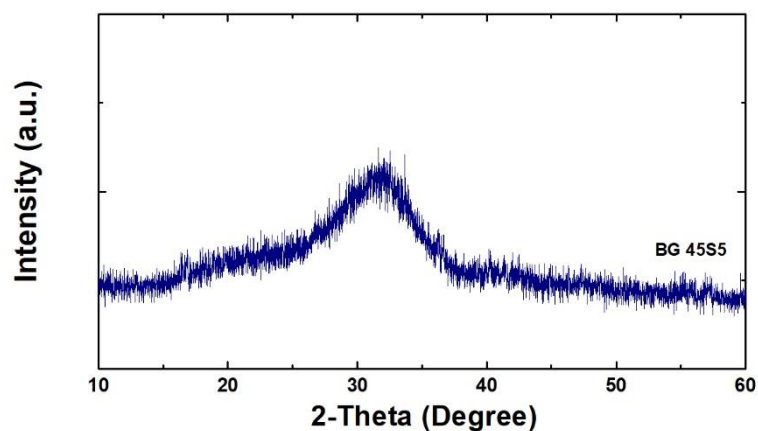


Fig. 7.4 Morfologie dei coating ottenuti: a-d) 0.5 gL⁻¹ BG; b-e) 1 gL⁻¹ BG; c-f) 2 gL⁻¹ BG

Attraverso l'analisi XRD è stato possibile valutare la composizione delle fasi del composito. In fig. 7.5 sono riportati i diffrattogrammi dei campioni realizzati al variare della concentrazione di *Bioglass*. Sono stati identificati i picchi caratteristici della brushite per valori di 2θ pari a 11.65° , 20.949° , 29.296° e 30.544° , come pure alcuni picchi di idrossiapatite con intensità minore. Sono presenti alcuni picchi provenienti dal substrato, ma il loro segnale è schermato dalla presenza del rivestimento¹⁸⁶. Data la sua natura amorfa, non è stato possibile rilevare alcun picco di diffrazione sul *Bioglass*. In fig. 7.6 è stato riportato il diffrattogramma effettuato sulla polvere di *Bioglass* 45S5, dove è presente una banda molto larga tipica dei materiali amorfi in prossimità di $2\theta=30^\circ$ ¹⁸⁷.

¹⁸⁶ Per l'identificazione dei picchi di diffrazione si è utilizzato come riferimento: ICDD Cards: Brushite (72-0713), Hydroxyapatite (72-1243). *International Centre for Diffraction Data, Power Diffraction File, 2007*. Pennsylvania USA. In aggiunta sono stati inseriti i picchi del substrato

¹⁸⁷ Cfr. A. Baranowska, M. Leśniak, M. Kochanowicz, J. Żmojda, P. Miluski, D. Dorosz (2020). *Crystallization Kinetics and Structural Properties of the 45S5 Bioactive Glass and Glass-Ceramic Fiber Doped with Eu³⁺ in Materials*, 13(6), 1281. Cfr. S. Bhakta, D. K. Pattanayak, H. Takadama, T. Kokubo, C. A. Miller, M. Mirsaneh, ... P. V. Hatton (2010). *Prediction of osteoconductive activity of modified potassium fluorrichterite glass-ceramics by immersion in simulated body fluid in Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(11), 2979-2988.


 Fig. 7.5 Diffratogrammi dei campioni ottenuti a diverse concentrazioni di *Bioglass*

 Fig. 7.6 Diffratogramma del *Bioglass* 45S5 in polvere

Dallo studio dei diffratogrammi ottenuti è stata ricavata la dimensione media dei grani tramite l'equazione di Scherrer¹⁸⁸, prendendo come riferimento i picchi di brushite localizzati intorno a 2θ pari 11.65° e 20.95° . I risultati sono riportati in fig. 7.7. Dall'analisi è emerso che la deposizione galvanica in condizioni statiche porta alla formazione di *coating* con una dimensione dei grani cristallini maggiore rispetto al sistema in agitazione, dato che il fenomeno dell'accrescimento dei cristalli è il processo predominante rispetto alla nucleazione, come già esposto in precedenza. Con l'aggiunta del *Bioglass* nella soluzione elettrolitica si è notato che la dimensione media dei cristalli subisce una diminuzione, probabilmente dovuta all'inglobamento del *Bioglass* nel composito che stimola la formazione di nuovi siti di nucleazione per i fosfati di calcio. Per quanto riguarda il campione ottenuto con una concentrazione di *Bioglass* di 2 gL^{-1} , si osserva un leggero

188

Cfr. nota 160

aumento delle dimensioni dei cristalli dovuta alla deposizione realizzata in due step. Tuttavia, un aumento della cristallinità comporta un tasso di dissoluzione più veloce in SBF¹⁸⁹.

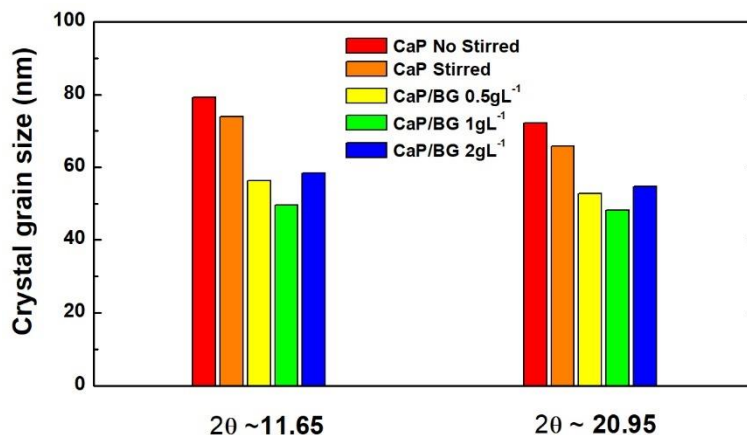


Fig. 7.7 Dimensione media dei cristalli utilizzando la formula di Scherrer

In fig. 7.8 sono presenti gli spettri RAMAN realizzati sui campioni al variare della concentrazione di *Bioglass* in soluzione. Anche qui, in linea con i risultati dell'XRD, sono presenti le fasi di brushite e idrossiapatite¹⁹⁰. I picchi RAMAN sono stati identificati nel cap. 6.

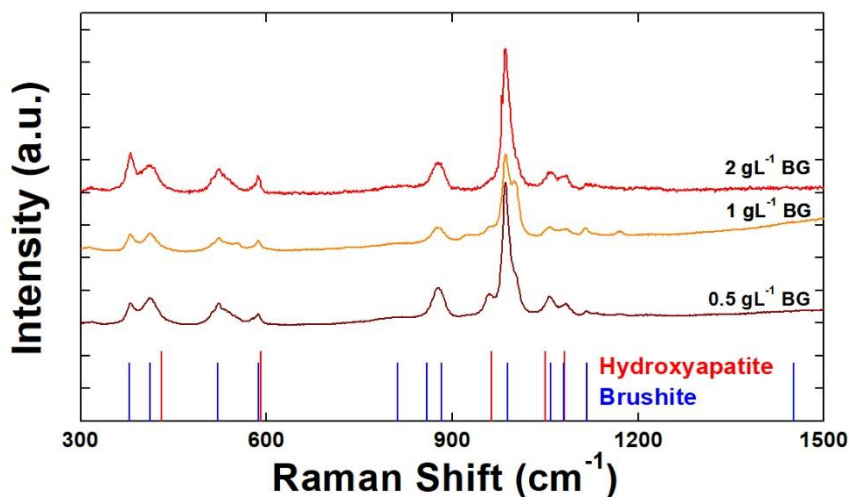


Fig. 7.8 Spettri RAMAN dei campioni al variare della concentrazione di *Bioglass*

¹⁸⁹ Cfr. M. P. Da Silva (2001) *Transformation of monetite...*

¹⁹⁰ Per l'identificazione dei modi vibrazionali è stato utilizzato come riferimento: Ruff Database. R.T. Downs, M. Hall-Wallace, The American Mineralogist Crystal Structure Database. Cfr. G. Penel (1999) Raman microspectrometry studies... Cfr. S. Koutsopoulos (2002). *Synthesis and characterization of hydroxyapatite...* Cfr. G. R. Sauer (1994). *Fourier transform Raman...*

Dopo l'*aging* in SBF, i campioni sono stati caratterizzati successivamente per 21 giorni di immersione per valutarne la composizione. In fig. 7.9 sono mostrate le morfologie dei campioni nei quali è possibile vedere che il *coating* ricopre ancora il substrato metallico. Tuttavia, sono presenti delle cricche sul rivestimento, dovute probabilmente all'asciugatura dei campioni una volta dalla soluzione di *aging* per eseguire le caratterizzazioni chimico-fisiche.

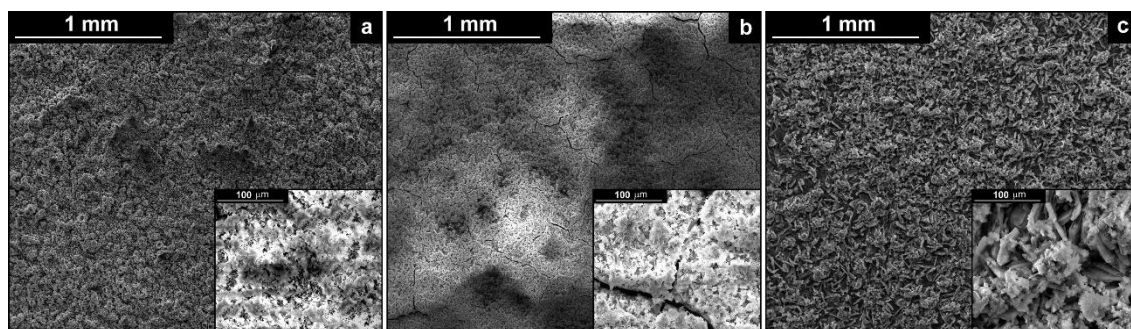


Fig. 7.9 Morfologie dei *coating* ottenute post *aging*: a) 0.5 gL⁻¹ BG; b) 1 gL⁻¹ BG; c) 2 gL⁻¹ BG

Dalle prove EDS condotte sui campioni prima e dopo l'*aging*, è stato possibile valutare la loro composizione chimica, studiando il rapporto Ca/P, mentre tramite il rapporto Ca/Fe è stato valutato qualitativamente lo spessore del deposito. I valori sono riportati in tab. 7.1¹⁹¹.

Tab. 7.1 Valori medi di Ca/P, Ca/Fe pre-*aging* e post *aging* dei campioni al variare della concentrazione di *Bioglass*

	Pre Aging		Post Aging	
	Ca/P	Ca/Fe	Ca/P	Ca/Fe
BG 0.5 gL⁻¹	1.05	57	1.78	No Fe
BG 1 gL⁻¹	1.03	92	1.66	No Fe
BG 2 gL⁻¹	1.1	No Fe	1.78	28.75

A seguito della deposizione galvanica, i campioni possiedono un rapporto Ca/P pressoché pari ad 1: ciò significa che il *coating* è costituito essenzialmente da brushite,

¹⁹¹ Con questa analisi permette di avere una stima della composizione chimica del deposito. Infatti, il rapporto Ca/P vale 1 per la brushite (CaHPO₄·2H₂O) e 1.66 per idrossiapatite (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂). Invece un'informazione qualitativa sullo spessore dei depositi proviene dal rapporto tra Ca/Fe: più alto è il valore di questo rapporto, maggiore sarà lo spessore.

risultato in accordo con quanto detto precedentemente a proposito delle caratterizzazioni XRD e RAMAN. Come è stato già illustrato in par. 6.3, dopo l'*aging* il rapporto Ca/P aumenta dovuto alla conversione della brushite in idrossiapatite¹⁹². In fig. 7.10 sono riportati gli spettri EDS dei *coating* nei quali è presente il picco dovuto alla presenza degli atomi di silicio appartenenti al *Bioglass*. Inoltre, è possibile notare la presenza di eteroatomi dovuti all'inglobamento degli ioni presenti in soluzione come sodio, magnesio o cloro contenuti all'interno della soluzione di *aging*.

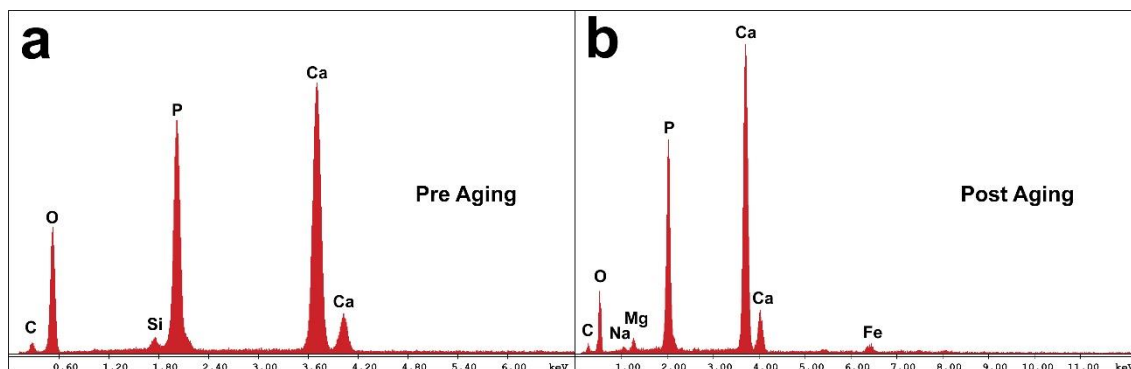


Fig. 7.10 Spettri EDS prima e dopo l'*aging* in SBF

Il risultato è confermato dalle caratterizzazioni eseguite all'XRD (fig. 7.11) nelle quali si nota la scomparsa dei picchi caratteristici della brushite ed emergono invece i picchi per 2θ pari 25.87° , 31.74° , 32.18° , 32.87° , 34.045° relativi all'idrossiapatite.

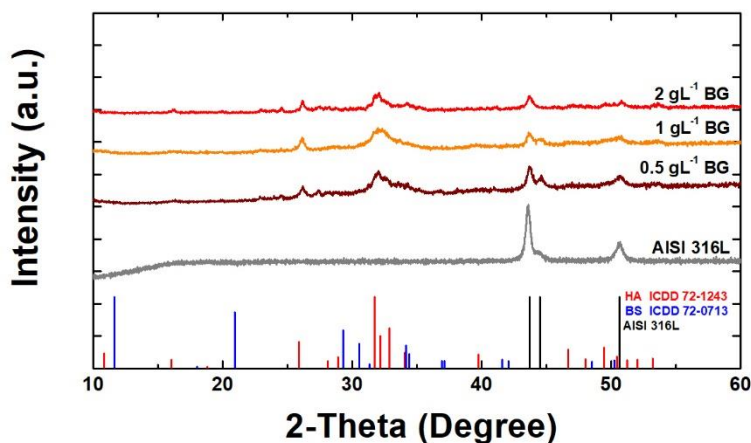


Fig. 7.11 Diffratogrammi dei campioni al termine dell'*aging* in SBF

¹⁹² Cfr. A. Nur (2014). *Electrochemical processes...*

Anche dalla spettroscopia RAMAN (fig. 7.12) effettuata sui campioni nel post *aging* si evince la scomparsa della fase brushite con la presenza del picco a 960 cm^{-1} dovuta a *stretching* simmetrico dello ione fosfato tipico dell'idrossiapatite¹⁹³.

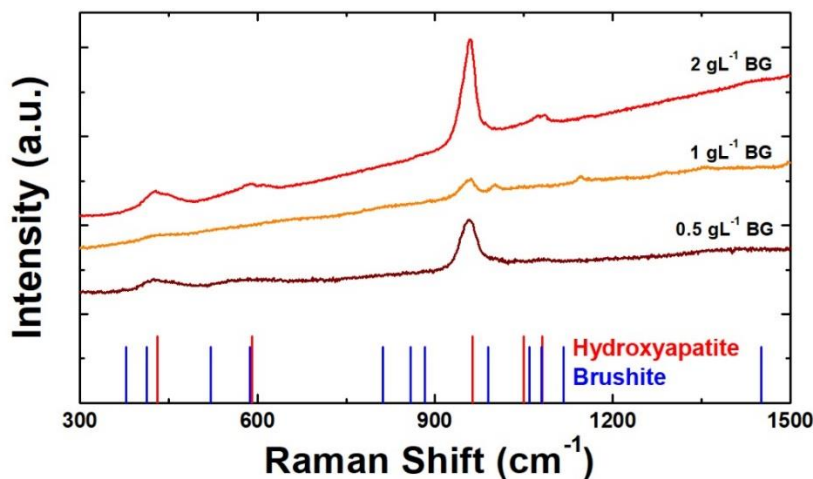


Fig. 7.12 Spettri RAMAN dei campioni al termine dell'*aging* in SBF

In fig. 7.13 è mostrato il monitoraggio della tensione di circuito aperto dell'OCP sui campioni presi in esame. Durante i 30 minuti di osservazione il potenziale è rimasto pressoché costante e non sono stati riscontrati bruschi cambiamenti, che potrebbero in questo caso verificarsi alla parziale solubilizzazione/precipitazione dei fosfati di calcio durante l'*aging*. Durante i 21 giorni di *aging* è stato notato che il valore del potenziale di circuito aperto si sposta verso valori più nobili rispetto all'acciaio nudo, segno che aumenta la resistenza alla corrosione.

Per il campione realizzato con BG 0.5 gL^{-1} , si osserva un potenziale costante durante i 30 minuti di osservazione. Le variazioni più consistenti si osservano invece nei primi giorni di immersione. Una diminuzione del potenziale di circuito aperto si osserva a partire dal quattordicesimo giorno: ciò è attribuibile al cambiamento di fase indotto dall'equilibrio brushite/idrossiapatite. Nonostante ciò, si registrano valori di OCP più nobili rispetto all'acciaio nudo. Il campione realizzato con BG 1 gL^{-1} mostra un andamento simile. Infatti, si nota un importante aumento dell'OCP dopo il primo giorno di

¹⁹³ Cfr. G. Penel (1998). *MicroRaman spectral...* Cfr. S. Baradaran, (2014). *Mechanical properties and biomedical...* Cfr. S. Koutsopoulos (2002). *Synthesis and characterization...*

immersione e successivamente si nota una variazione più bassa in accordo con l'equilibrio tra le fasi brushite/idrossiapatite. Si raggiunge un valore massimo di OCP di 0.081V al quattordicesimo giorno. Rispetto al campione precedente si registrano valori più alti, e probabilmente questo può essere dovuto alla maggior presenza del *Bioglass* che rende il *coating* più compatto. Infine, il campione realizzato con BG 2 gL⁻¹ presenta al giorno 0 un potenziale di circuito aperto di -0.08V e si evince che anch'esso subisce un rapido incremento fino a raggiungere un valore massimo di 0.061 V. Analogamente ai precedenti campioni, è presente una diminuzione del potenziale dal quattordicesimo giorno. Questo è il campione con l'OCP più basso, ma comunque più nobile rispetto all'acciaio nudo.

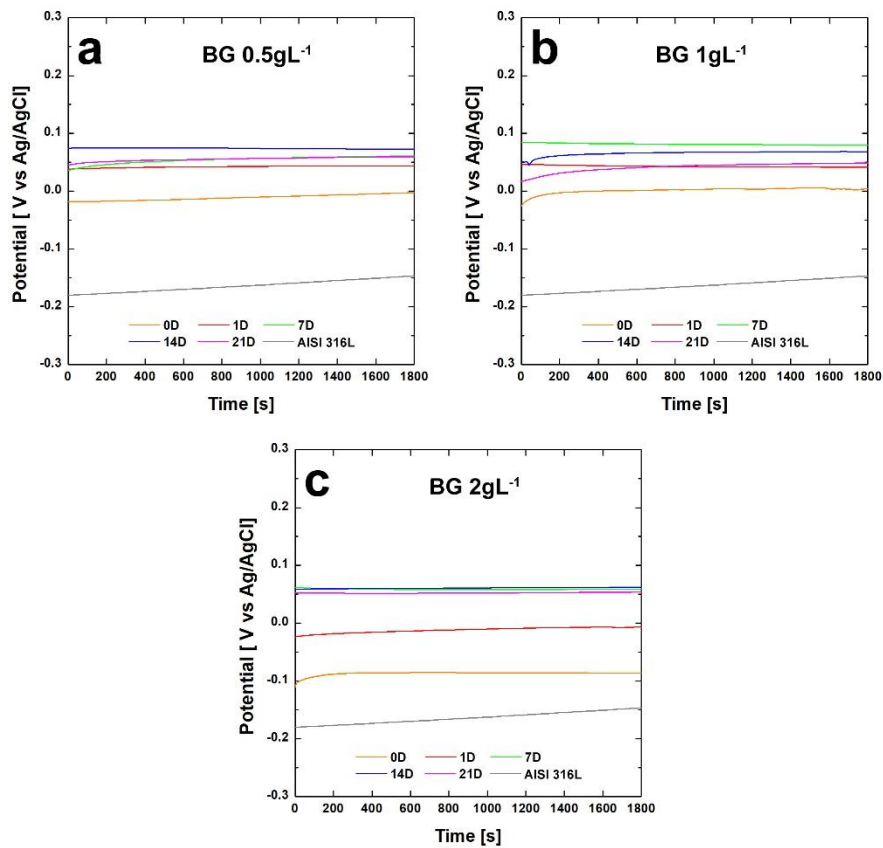


Fig. 7.13. Monitoraggio del potenziale di circuito aperto

Con lo studio dell'extrapolazione delle rette di Tafel dalle curve di polarizzazione è stato calcolato il potenziale di corrosione e la densità di corrente di corrosione, i cui valori sono riportati in tab. 7.3.

Tab. 7.3 Parametri di corrosione valutati a diversi tempi di giorni di *aging* per i campioni ottenuti a diversi pretrattamenti: potenziale di corrosione (E_{corr}) e densità di corrente di corrosione (i_{corr})

	Time					AISI 316L
	0	1	7	14	21	
0.5 BG gL⁻¹						
E_{corr} [V]	-0.088	-0.036	-0.057	-0.054	-0.088	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	4.83E-07	2.43E-07	4.31E-07	3.91E-07	6.14E-07	2.52E-06
1 BG gL⁻¹						
E_{corr} [V]	-0.068	0.056	-0.029	0.009	-0.048	-0.187
i_{corr} [Acm ⁻²]	8.85E-07	4.13E-07	4.07E-07	5.84E-07	8.16E-07	2.52E-06
2 BG gL⁻¹						
E_{corr} [V]	-0.163	-0.092	-0.043	-0.077	-0.088	-0.187
i_{corr} [Acm ⁻²]	5.62E-07	6.40E-07	5.60E-07	5.87E-07	5.21E-07	2.52E-06

Tutti i campioni mostrano un valore di E_{corr} e i_{corr} più basso rispetto all'acciaio nudo fin dal primo giorno. Il *coating* realizzato con 1 gL⁻¹ di *Bioglass* ha mostrato le *performance* migliori. In fig. 7.14 sono riportate le relative curve di polarizzazione nelle quali si nota uno spostamento di E_{corr} verso valori più alti durante l'*aging* in SBF. In accordo al monitoraggio del potenziale di circuito aperto, le variazioni di potenziale dopo il quattordicesimo giorno sono dovute all'equilibrio che si instaura tra brushite e idrossiapatite come già osservato da precedenti lavori¹⁹⁴. La cristallinità del rivestimento che posseggono i *coating* può essere posta in relazione alla resistenza verso i fenomeni corrosivi. Infatti, il *coating* che ha avuto le migliori prestazioni in termini di E_{corr} e i_{corr} è stato realizzato con una concentrazione di *Bioglass* pari a 1 gL⁻¹ e per quanto è stato detto in precedenza è il *coating* che ha la cristallinità più bassa, ossia con una dimensione dei grani più piccola (fig. 7.7). Dunque, è caratterizzato da una velocità di dissoluzione lenta in SBF che si traduce in una migliore azione protettiva nei confronti dei fenomeni corrosivi. Al contrario, il campione realizzato a due step con una concentrazione di *Bioglass* pari a 2 gL⁻¹ è caratterizzato da una cristallinità più alta ma anche da una velocità di dissoluzione più alta in SBF. Infatti ha mostrato una i_{corr} più alta. Invece il campione ottenuto a 0.5 gL⁻¹ di *Bioglass* ha un comportamento intermedio.

¹⁹⁴ Cfr. G. Blanda (2016). *Galvanic deposition...* Cfr. G. Blanda (2018). *In Vitro Corrosion...*

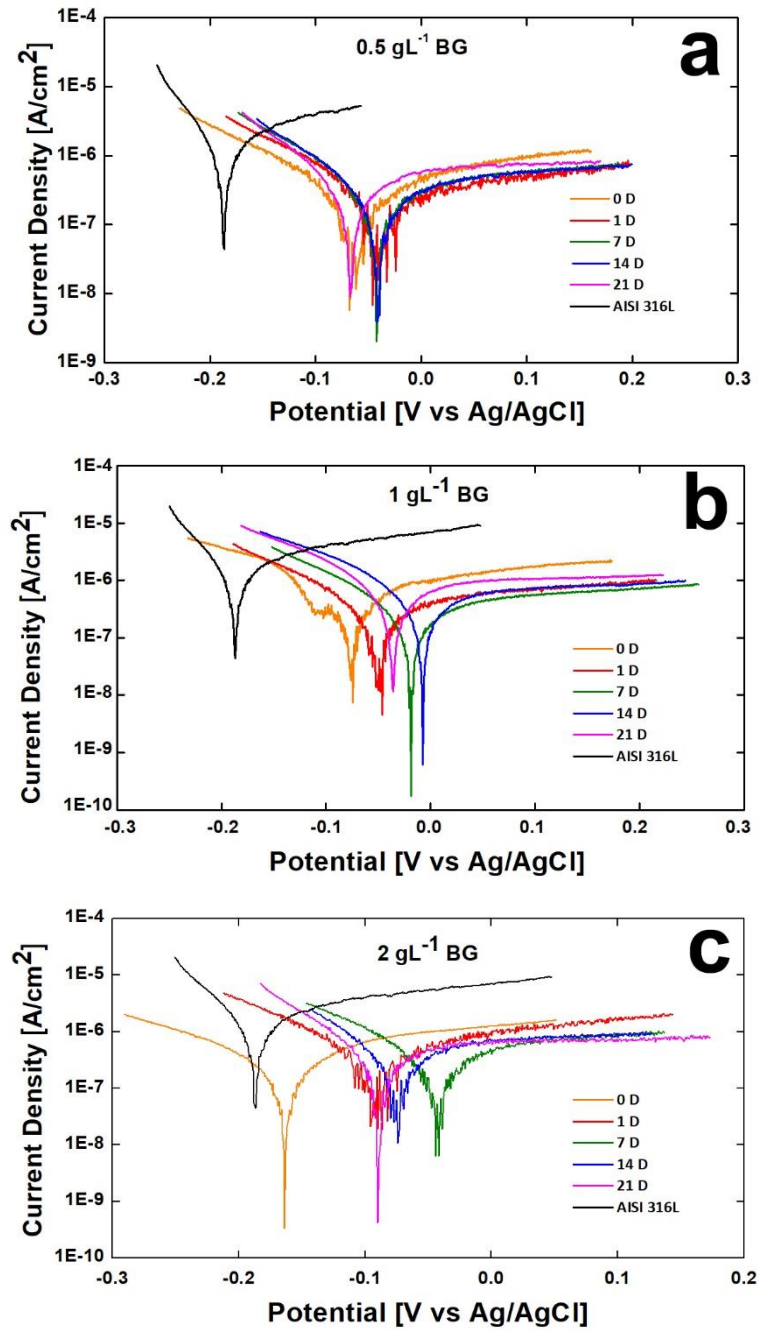


Fig. 7.14 Curve di polarizzazione sui campioni realizzati: a) 0.5 gL⁻¹ BG; b) 1 gL⁻¹ BG; c) 2 gL⁻¹ BG

Tab. 7.4 Parametri di fitting delle misure di impedenza del coating su acciaio AISI316L realizzato con 1gL^{-1} di Bioglass. La deviazione standard media è del 4.7%.

	0	1	7	14	21	AISI 316L
	R(Q(R(Q(RW))))					R(QR)
Rs	50	51.85	39.18	17	15	38
CPE₁-Y	1.48E-08	2.44E-05	3.86E-06	6.04E-06	2.23E-06	-
CPE₁-n	0.972	0.5495	0.5526	0.5191	0.5679	-
R₁	82.08	1059	5029	1816	2256	-
CPE₂-Y	7.84E-06	9.01E-07	1.56E-05	6.75E-06	4.46E-05	8.71E-06
CPE₂-n	0.6564	0.9214	0.6214	0.8176	0.5124	0.895
R₂	1.94E+04	5.09E+04	9.04E+04	1.10E+04	3.57E+04	7.54E+04
W	2.37E-05	1.50E-05	2.21E-06	3.33E-05	1.52E-06	-

Le misure di spettroscopia d'impedenza sono riportate in fig. 7.15 per le prove eseguite al giorno 0, 7 e 21 di *aging*.

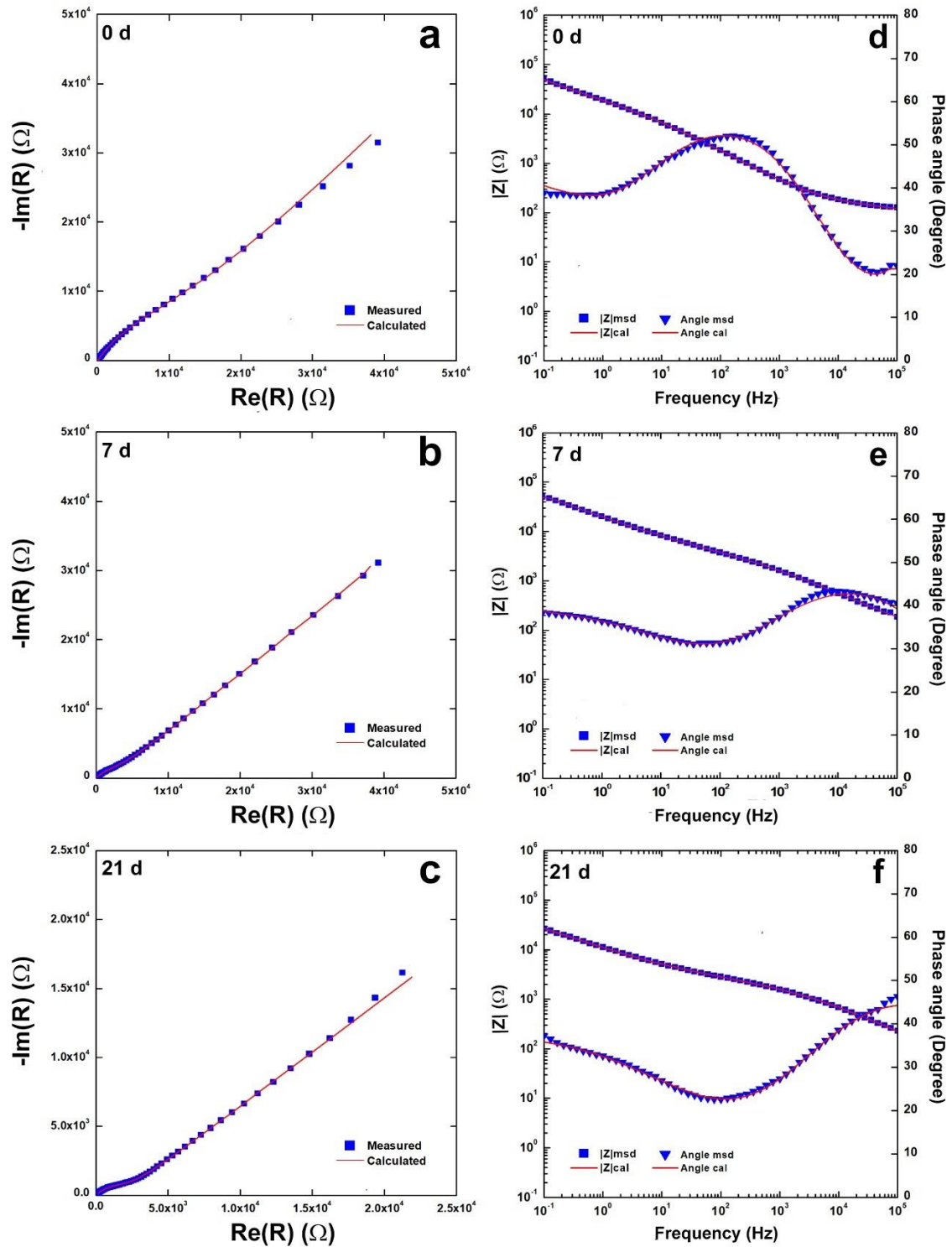


Fig. 7.15 Diagrammi di Nyquist e Bode del *coating* realizzato con 1gL^{-1} di *Bioglass* su acciaio

Il *fitting* migliore è stato ottenuto utilizzando il circuito $R_s(\text{CPE}_1(R_1(\text{CPE}_2(R_2W))))$, che tiene conto della presenza di un *coating* poroso in cui

avvengono processi diffusivi al loro interno, come già è stato descritto in par. 6.3. I *fitting* ottenuti hanno un valore di χ^2 dell'ordine di 10^{-4} e l'errore relativo di ogni parametro è inferiore al 10%. Durante l'*aging* è stata notata un'evoluzione del *coating* dovuta all'equilibrio tra brushite e idrossiapatite. I valori degli esponenti dei CPE, n_1 e n_2 , sono inferiori a quelli dell'acciaio non rivestito, dal momento che questo presenta una morfologia più complessa di un semplice film passivo. In ogni caso, dopo 21 giorni l'impedenza complessiva è maggiore di $10^4 \Omega$.

L'analisi ICP-OES conferma la capacità del *coating* di limitare la corrosione. Infatti, è stata quantificata la concentrazione degli ioni metallici in soluzione che provengono dal substrato (Fe, Ni, Cr, Mo) al termine delle 3 settimane di *aging* in SBF. Dalla tab. 7.5 è possibile notare che la concentrazione degli ioni metallici è molto bassa. In particolare, nel caso del ferro, che ricordiamo essere l'elemento maggiormente presente nell'acciaio, si ha una concentrazione dieci volte minore rispetto alla concentrazione nel caso dell'acciaio nudo. Si registra anche un valore molto basso anche nel caso del nichel. Per quanto riguarda la concentrazione di cromo e molibdeno resta pressoché invariata, nell'ordine dei ppb, ampiamente sotto i limiti di soglia per la salute dell'uomo¹⁹⁵.

Tab. 7.5 Concentrazione degli ioni in SBF dopo 21 giorni di *aging*. La deviazione standard media è di 0.7%

	Fe	Ni	Cr	Mo	Ca	P
	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]
SBF Mis.	0	0	0	0	89.75	31.74
SBF Cal.	0	0	0	0	105	31
AISI 316L	0.088	0.197	0	0	89.16	28.82
BG 1gL⁻¹	0	0.076	0	0	39.26	66.74

Come già visto anche in par. 6.3, si registra una diminuzione degli ioni calcio dovuto all'incorporazione nella struttura cristallina del deposito secondo l'equilibrio proposto da Nur¹⁹⁶.

La citotossicità del rivestimento composito di idrossiapatite e *Bioglass* (1 gL⁻¹) è stata testata *in vitro* utilizzando cellule preosteoblastiche secondo la norma ISO-10993-5. Le cellule sono state fatte crescere utilizzando terreni di coltura pre-incubati per 24 ore con i diversi campioni, opportunamente sterilizzati, a un rapporto volume/superficie di 5

¹⁹⁵ Cfr. Y. S. Hedberg (2016). *Metal release from stainless steel...*

¹⁹⁶ Cfr. Nur.A., *Electrochemical...*

mL cm⁻². La vitalità cellulare è stata valutata per un periodo di sette giorni di coltura e i risultati sono stati riportati in fig. 7.16.

Dopo 2 e 5 giorni di coltura non è stata osservata una differenza statistica tra le cellule cresciute con terreno incubato con l'acciaio nudo e quelle cresciute con terreno trattato con l'acciaio rivestito. Dopo 7 giorni si nota invece un valore superiore di cellule cresciute in terreno trattato con acciaio rivestito. Nel complesso, è possibile affermare che, per quanto riguarda il periodo di coltura preso in considerazione, la presenza del rivestimento sembrerebbe attenuare l'effetto citotossico basale dato dall'acciaio inossidabile.

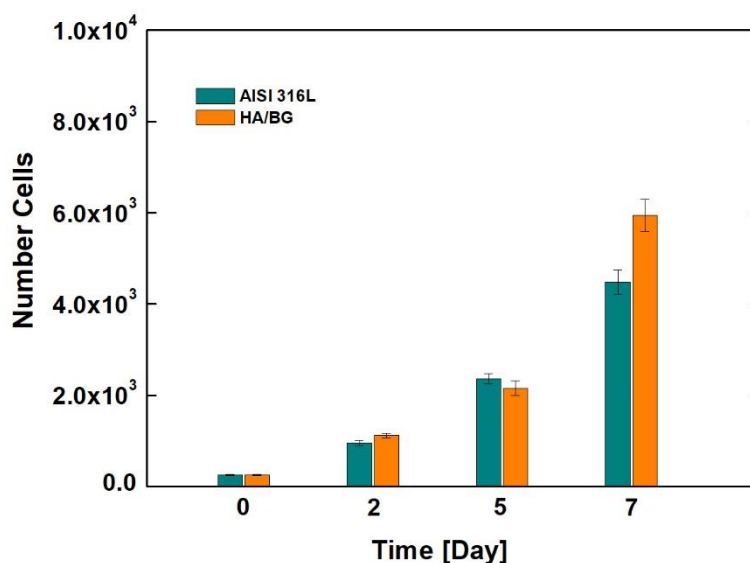


Fig. 7.16 Vitalità delle cellule MC3T3-E1 misurata con assorbanza a 450 nm usando CCK-8 kit a 0,2,5 e 7 giorni di coltura. Sono messi a confronto acciaio nudo e acciaio rivestito con HA/BG (1gL⁻¹)

Capitolo 8 – *Coating* compositi di fosfati di calcio e polivinilacetato su acciaio AISI 304

In questo capitolo sarà fatta luce sulla possibilità di realizzare *coating* compositi attraverso il metodo di deposizione galvanica su acciaio AISI 304, materiale già ampiamente adoperato in campo ortopedico, con un costo inferiore e migliori prestazioni meccaniche rispetto all'acciaio AISI 316L, e tuttavia caratterizzato da una minore resistenza alla corrosione, dovuta all'assenza di molibdeno, che può essere comunque ulteriormente migliorata tramite la deposizione di *coating*¹⁹⁷.

La realizzazione di un rivestimento biocompatibile su un substrato come l'acciaio AISI 304 risulterebbe più interessante, dal momento che complessivamente si potrebbero abbattere i costi globali del dispositivo ortopedico. D'altro canto, l'utilizzo di un materiale composito fa sì che si possano mettere insieme le proprietà dei singoli materiali per migliorare le *performance* globali di un rivestimento. In particolare, si tratta di una co-deposizione di fosfato di calcio e di un polimero, nella fattispecie polivinilacetato (PVAc).

Come è stato esposto già in par. 4.2.2, il PVAc è un biopolimero di natura sintetica, biodegradabile e biocompatibile, che non sviluppa alcun effetto tossico o cancerogeno per l'uomo, e inoltre contribuisce a minimizzare la citotossicità del *coating* e stimola la proliferazione cellulare, poiché migliora l'adesione degli osteoblasti. Secondo alcuni studi riportati in letteratura, la presenza del polimero in *coating* di idrossiapatite aumenta l'adesione del *coating* sul substrato: ciò si traduce in un duplice effetto benefico sia da un punto di vista di bioattività sia di resistenza alla corrosione¹⁹⁸.

¹⁹⁷ Cfr. Y. C. Tang, S. Katsuma, S. Fujimoto, S. Hiromoto (2006). *Electrochemical study of Type 304 and 316L stainless steels in simulated body fluids and cell cultures* in *Acta Biomaterialia*, 2(6), 709-715. Cfr. S. Paul, C. Mandal (2013). *Biocompatibly coated 304 stainless steel as superior corrosion-resistant implant material to 316L steel* in *Journal of materials engineering and performance*, 22(10), 3147-3154.

¹⁹⁸ Cfr. H. Hu (2003). *Electrochemical deposition of hydroxyapatite with vinyl acetate on titanium implants*. Cfr. H. Hu (2002). *A study on hybrid bioceramic coatings of HA/poly (vinyl acetate) co-deposited electrochemically on Ti-6Al-4V alloy surface*. Cfr. A. Abdal-Hay (2015). *A novel simple one-step air jet spinning approach for deposition of poly (vinyl acetate)/hydroxyapatite composite nanofibers on Ti implants*. Cfr. A. Afshar, M. Yousefpour, Y. Xiudong, X. Li, B. Yang, Y. Wu, ... Z. Xingdong (2006). *Investigation of morphology and bioactive properties of composite coating of HA/vinyl acetate on pure titanium* in *Materials Science and Engineering: B*, 128(1-3), 243-249.

8.1 Procedure sperimentali

Prima della deposizione del rivestimento, l'acciaio AISI 304 e gli anodi di zinco e di alluminio sono stati sottoposti a trattamenti di pulizia secondo la procedura descritta in par. 5.2.

Il processo di deposizione galvanica in questo caso è stato condotto utilizzando celle separate collegati ionicamente da un ponte salino in KCl saturo. Per lo scompartimento anodico, gli elettrodi sono stati immersi in una soluzione 1 M di NaCl. La soluzione catodica (50 mL) è costituita da $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.061 M e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.036 M. Al fine di creare il deposito composito, sono state aggiunte diverse quantità di vinilacetato (VAc) (0 mL, 0.75 mL, 1.5 mL) in soluzione catodica.

8.2 Risultati

Gli elettrodi, dopo essere stati pretrattati, sono immersi nelle loro rispettive soluzioni e cortocircuitati tramite un conduttore esterno. Nello scompartimento anodico si hanno le reazioni di corrosione degli anodi descritte nei capitoli precedenti.

Le reazioni che portano alla formazione del composito avvengono contemporaneamente sulla superficie catodica. Quelle che portano alla formazione di fosfati di calcio seguono lo stesso meccanismo già descritto in par. 6.2.2. Invece la deposizione del PVAc avviene attraverso un meccanismo di polimerizzazione radicalica del vinilacetato che è stato proposto da Samide¹⁹⁹.

L'elettropolimerizzazione consta di tre step: iniziazione, propagazione e interruzione. Durante il primo, sono generati i radicali liberi che danno inizio alla polimerizzazione. La loro formazione è indotta grazie alle reazioni di riduzione di specie adsorbite sulla superficie del catodo, ovvero dalle molecole del vinil acetato che rappresenta il precursore (8.1) (8.2):



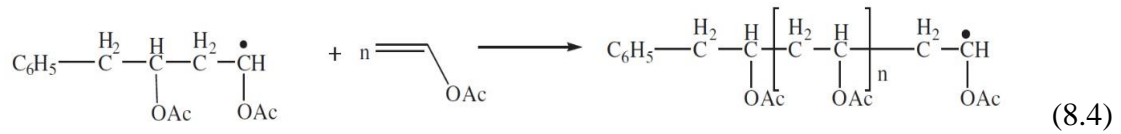
¹⁹⁹ Cfr. A. Samide, G. Brătulescu, C. Merișanu, N. Cioateră (2019). *Anticorrosive coating based on poly (vinyl acetate) formed by electropolymerization on the copper surface in Journal of Applied Polymer Science*, 136(14), 47320.



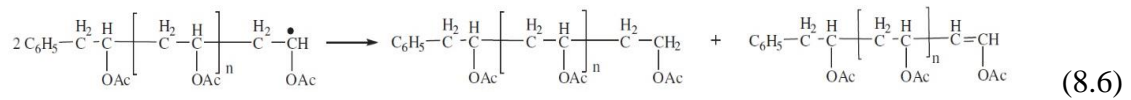
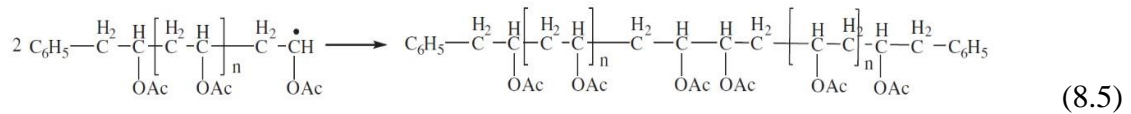
Questi radicali attivano altre molecole di vinil acetato adsorbite con la formazione di macroradicali che seguono la reazione (8.3):



Durante il secondo (propagazione), le catene radicaliche aggiungono monomeri alla catena in accrescimento secondo la reazione (8.4):



Nel terzo (terminazione) le reazioni radicaliche di catena che sono costituite da ricombinazione o disproporzionamento dei macroradicali di PVAc, tendono a chiudere le catene in accrescimento, come segue in (8.5) e (8.6):



Al fine di studiare diversi parametri di deposizione, il processo è stato condotto variando il tempo di deposizione (24 ore e 72 ore), la concentrazione del precursore, la temperatura (25 °C e 50 °C) e il differente anodo sacrificale (zinco e alluminio).

Per verificare la deposizione del PVAc tramite il metodo galvanico, è stata condotta in prima battuta una deposizione del solo PVAc. Per questo, si sono realizzate alcune prove *spot* in una soluzione costituita dal solo monomero precursore tramite l'elettropolimerizzazione. In particolare, la deposizione è stata condotta in una soluzione costituita da 1.5 mL vinil acetato in 50 mL di acqua e l'esperimento è stato condotto per 24 ore e per 72 ore ciascuna a 25 °C.

I campioni sono stati analizzati tramite caratterizzazione SEM (fig. 8.1). Il polimero si deposita solo in piccole aree del substrato, dato che il monomero in soluzione ha una concentrazione bassa. Infatti, è stata rilevata la presenza di carbonio e ossigeno e altri elementi del substrato tramite EDS (fig. 8.2).

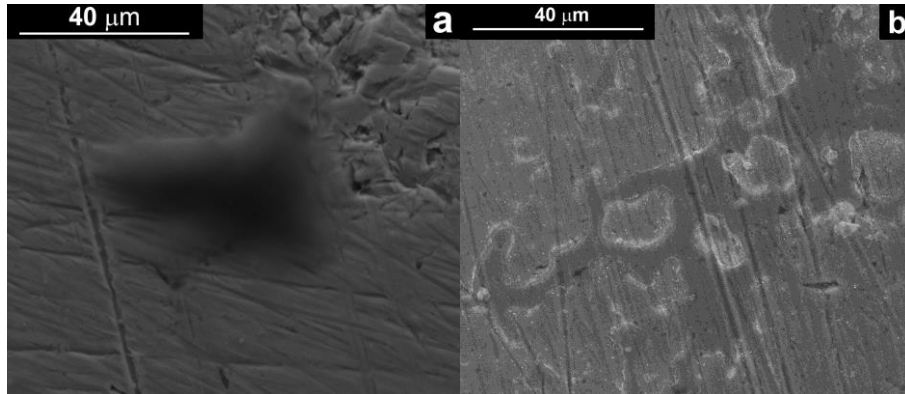


Fig. 8.1 Deposito di PVAc su AISI 304

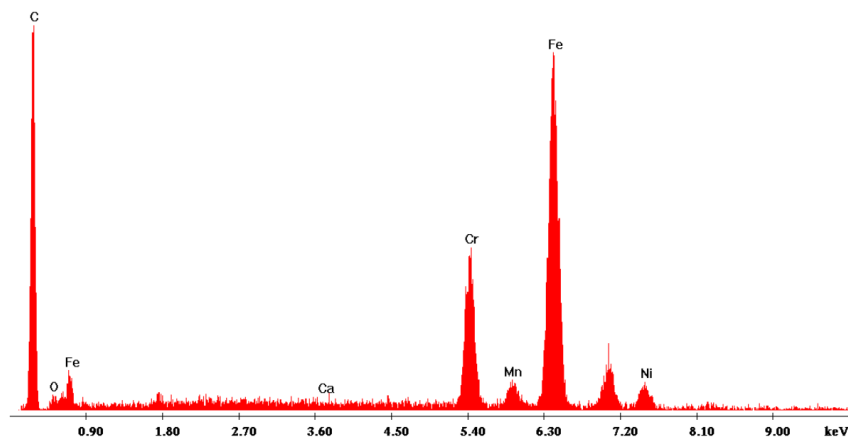


Fig. 8.2 EDS su PVAc depositato su acciaio tramite deposizione galvanica

Le morfologie dei *coating* compositi dopo la deposizione sono state riportate nelle figg. 8.3 e 8.4, nelle quali sono messe a confronto differenti temperature, concentrazioni di monomero e anodo sacrificale. In particolare, è possibile notare la tipica forma aghiforme dei cristalli di fosfato di calcio.

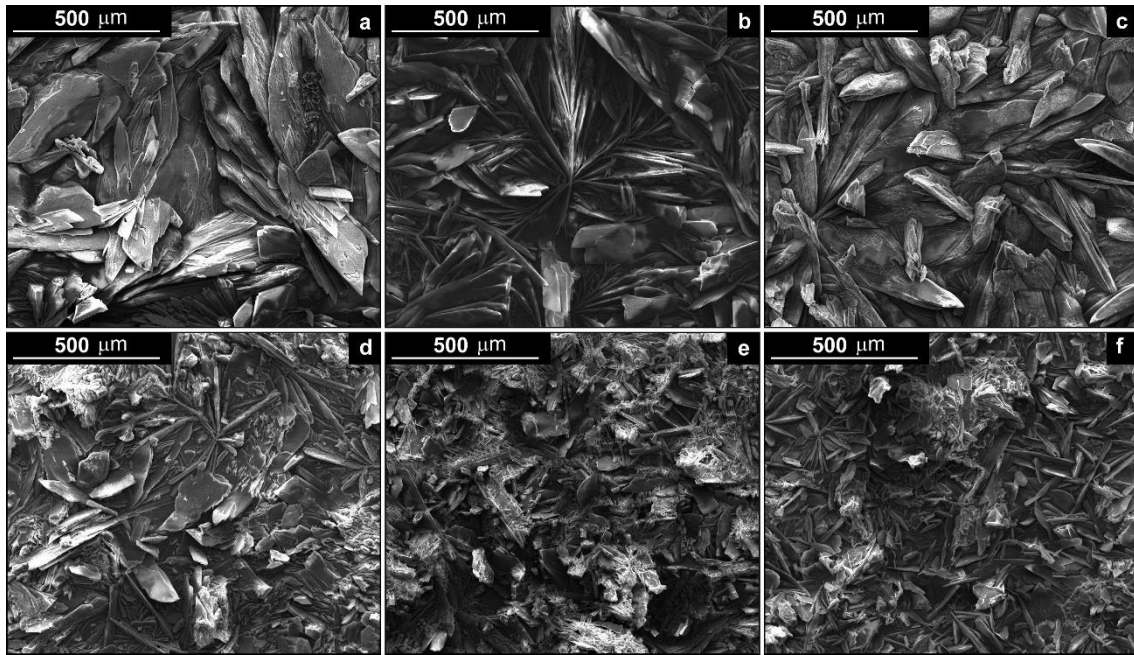


Fig. 8.3 Immagini SEM del composito ottenuto dopo 24 ore di deposizione utilizzando un anodo sacrificale in alluminio: a) 0mL Vac T=25 °C; b) 0.75 mL Vac T=25 °C; c) 1.5 mL Vac T=25 °C; d) 0mL Vac T=50 °C; e) 0.75 mL Vac T=50 °C; f) 1.5 mL Vac T=50 °C

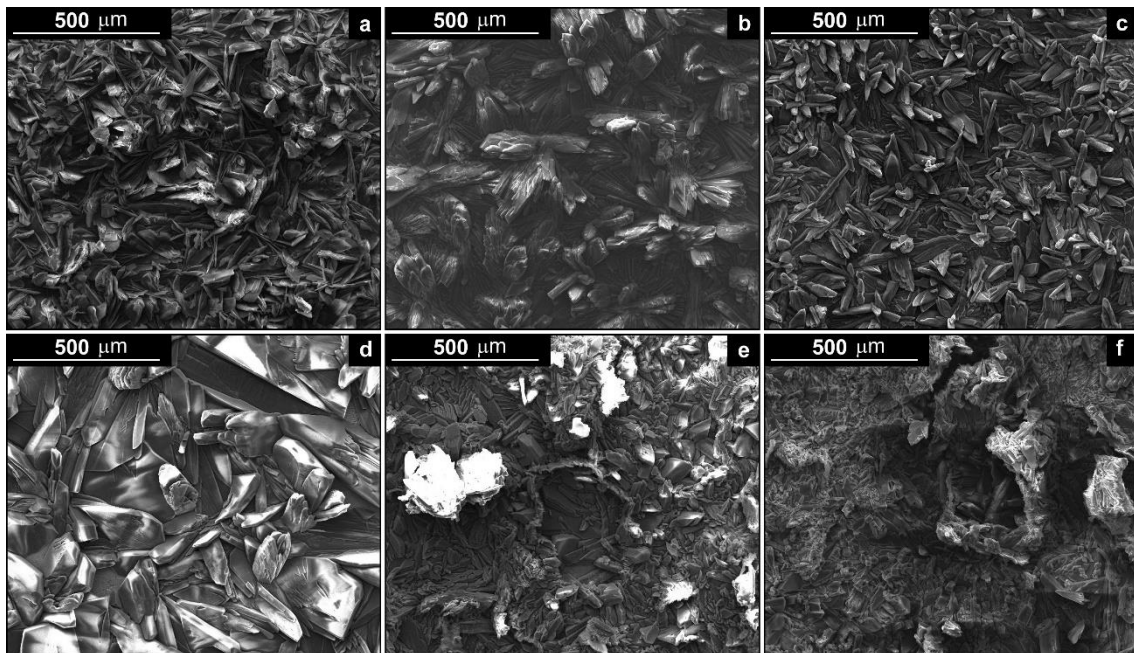


Fig. 8.4 Immagini SEM del composito ottenuto dopo 24 ore di deposizione utilizzando un anodo sacrificale in zinco: a) 0mL Vac T=25 °C; b) 0.75 mL Vac T=25 °C; c) 1.5 mL Vac T=25 °C; d) 0mL Vac T=50 °C; e) 0.75 mL Vac T=50 °C; f) 1.5 mL Vac T=50 °C

Sebbene si possa osservare in ogni campione una completa copertura del substrato metallico, le morfologie appaiono diverse tra loro. L'accoppiamento galvanico con

l'anodo di alluminio porta alla formazione di *coating* con cristalli di maggiori dimensioni rispetto all'anodo di zinco, e ciò è dovuto a una maggiore forza spingente fornita dal diverso potenziale di equilibrio redox. In entrambi gli accoppiamenti realizzati si nota che la temperatura del processo gioca un ruolo importante. Infatti, è stata riscontrata una morfologia meno ordinata per temperature maggiori, e ciò probabilmente è attribuibile a una deposizione più veloce, dato che le cinetiche di corrosione aumentano all'aumentare della temperatura e di conseguenza aumenta la generazione di ioni idrossidi alla superficie catodica.

In tab. 8.1 sono riportati i valori del consumo specifico degli anodi: ovviamente la dissoluzione del metallo aumenta per temperature più alte²⁰⁰. Questi risultati, quindi, confermano la possibilità di ottenere PVAc elettropolimerizzato tramite accoppiamento galvanico.

Tab. 8.1 Consumo specifico di entrambi gli anodi sacrificali a diversi parametri di deposizione (VM: valore medio, SD: deviazione standard)

	24h, 25 °C		72h, 25 °C		24h, 50 °C		72h, 50 °C	
	VM	SD	VM	SD	VM	SD	VM	SD
	µg cm ⁻²	%	µg cm ⁻²	%	µg cm ⁻²	%	µg cm ⁻²	%
Zn	422.2	3.3	1245.7	2.4	748.1	2.6	3559.5	3.8
Al	271.6	6.5	455.6	1.1	685.2	4.7	1061.8	2.13

Ad alta temperatura di deposizione, le cinetiche di deposizione più alte favoriscono la nucleazione dei cristalli dei fosfati di calcio e conseguentemente la loro deposizione massiva, mentre a temperature più basse è favorito maggiormente il processo di accrescimento dei cristalli e dunque una morfologia più ordinata. La presenza del polimero non è visibile al SEM, perché intimamente inglobato nella struttura del deposito. Il suo effetto è riscontrabile in un deposito più omogeneo e uniforme, soprattutto nel caso in cui sono stati utilizzati anodi in alluminio. In fig. 8.5 sono mostrate le morfologie dei depositi a 25 °C in funzione della tipologia di anodo sacrificale usato: in esse non sono state riscontrate particolari differenze se non nell'aumento dello spessore, confermato dall'analisi all'EDS.

²⁰⁰ Va da sé che sebbene la deposizione sia stata condotta a celle separate, la precipitazione degli ossidi/idrossidi avviene sulla superficie del metallo. Per cui è stato utilizzato per ogni esperimento un nuovo anodo per garantire la riproducibilità.

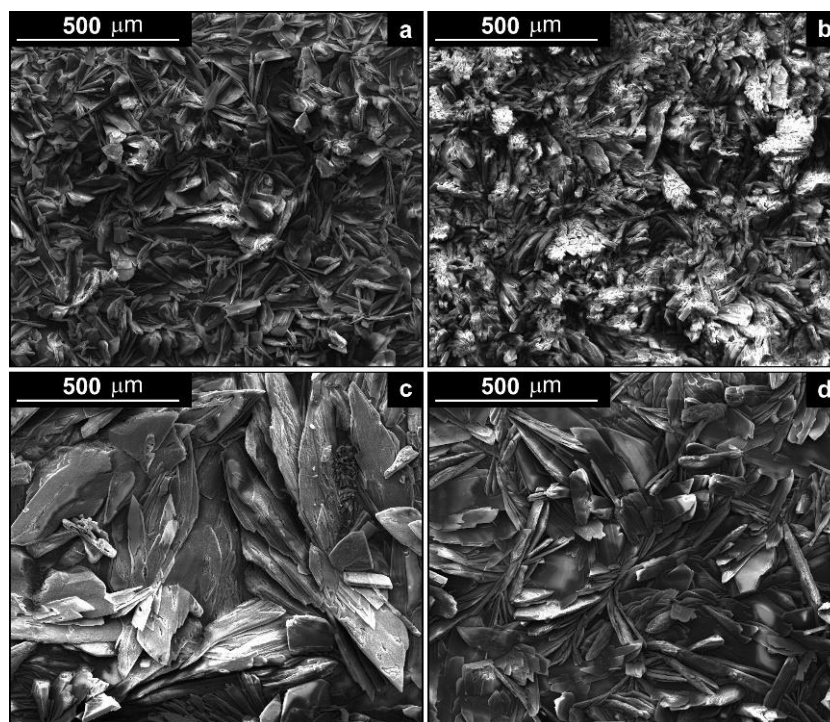


Fig. 8.5 Immagini SEM del composito ottenuto a 25 °C: a) 24 ore con anodo di zinco b) 72 ore con anodo di zinco c) 24 ore con anodo di alluminio d) 72 ore con anodo di alluminio

Tab. 8.2 Rapporti Ca/P e Ca/Fe dei coating misurati al termine della deposizione galvanica con diversi parametri operativi variando anodo sacrificiale, tempo, temperatura e concentrazione di VAc

VAc	Al, 24h, 25 °C		Al, 72h, 25 °C		Al, 24h, 50 °C		Al, 72h, 50 °C	
[mL]	Ca/P	Ca/Fe	Ca/P	Ca/Fe	Ca/P	Ca/Fe	Ca/P	Ca/Fe
0	1.37	12.31	1.59	22.81	1.57	27.2	1.69	34.57
0.75	1.42	14.23	1.61	23.86	1.66	29.01	1.59	35.84
1.5	1.39	13.47	1.57	21.66	1.65	26.4	1.62	32.98
VAc	Zn, 24h, 25 °C		Zn, 72h, 25 °C		Zn, 24h, 50 °C		Zn, 72h, 50 °C	
[mL]	Ca/P	Ca/Fe	Ca/P	Ca/Fe	Ca/P	Ca/Fe	Ca/P	Ca/Fe
0	1.45	18.28	1.69	59.07	1.55	81.76	1.66	196
0.75	1.37	17.22	1.66	48.83	1.52	82.52	1.76	no Fe
1.5	1.49	19.84	1.61	52.98	1.5	83.44	1.65	no Fe

I campioni sono caratterizzati tramite EDS per calcolare i rapporti Ca/Fe e Ca/P, i cui valori sono riportati in tab. 8.2. La presenza del polimero non influenza la composizione del deposito. Infatti i valori del rapporto Ca/P sono sopra 1.4 in tutte le deposizioni e aumentano fino a 1.7. Da questo risultato è evidente una formazione maggiore di idrossiapatite rispetto a brushite. Si osserva un cambiamento dello spessore al variare del

tempo di deposizione e della temperatura del processo. Infatti, si ottengono depositi più spessi a temperature più alte e il rapporto Ca/Fe è più alto per temperature di 50 °C.

I campioni ottenuti a diverse condizioni operative sono stati caratterizzati tramite XRD e i diffrattogrammi sono riportati in fig. 8.6²⁰¹. Per i campioni ottenuti tramite accoppiamento con alluminio si notano più picchi di diffrazione di brushite rispetto all'idrossiapatite dopo 72 ore di deposizione, se paragonato con i campioni dopo 24 ore di deposizione (fig. 8.6a). Per la deposizione galvanica ottenuta a 50 °C, il picco di idrossiapatite si identifica meglio rispetto a quelli della brushite (fig. 8.6b). Invece per quanto concerne i depositi ottenuti con l'accoppiamento con zinco, è possibile constatare lo stesso risultato, poiché i diffrattogrammi mostrano che i rivestimenti sono costituiti da una miscela di idrossiapatite e brushite. Allo stesso modo dell'accoppiamento con alluminio, i picchi di diffrazione dell'idrossiapatite sono maggiormente presenti per i campioni realizzati a 50 °C. Attraverso questa tecnica di analisi non si è ravvisata la presenza del PVAc, probabilmente a causa del suo basso contenuto e della sua natura amorfa, come è stato riportato già da uno studio di Abdelghany²⁰². Con l'aumento del tempo di deposizione, invece, i picchi di diffrazione della fase brushite tendono ad aumentare rispetto a quelli dell'idrossiapatite, a causa della lenta passivazione dell'alluminio con formazione di Al(OH)₃, che rallenta il processo di deposizione galvanica. Come già discusso in par. 6.4, se il pH non è mantenuto al di sopra di 12, avviene l'equilibrio tra brushite e idrossiapatite secondo quanto spiegato da Nur²⁰³.

La dimensione media dei grani²⁰⁴ è stata calcolata prendendo come riferimento i picchi di brushite localizzati intorno ad $2\theta=11^\circ$ presenti in fig. 8.6 e riportati in tab. 8.3. La dimensione dei grani aumenta con il tempo di deposizione, e ciò è dovuto ad una crescita graduale dei siti in cui avviene la nucleazione del cristallo, mentre per temperature più alte di deposizione la dimensione media dei grani è più piccola e tende a diminuire con il tempo di deposizione. Questo effetto può essere attribuito ad un incremento massivo degli ioni OH⁻. Pertanto, si può dedurre che a temperature più basse prevale

²⁰¹ Per l'identificazione dei picchi di diffrazione si è utilizzato come riferimento: ICDD Cards: Brushite (72-0713), Hydroxyapatite (72-1243). International Centre for Diffraction Data, Power Diffraction File, 2007. Pennsylvania USA. In aggiunta sono stati inseriti i picchi del substrato AISI 304.

²⁰² Cfr. A. M. Abdelghany, M. S. Meikhail, N. Asker (2019). *Synthesis and structural-biological correlation of PVC/PVAc polymer blends* in *Journal of Materials Research and Technology*, 8(5), 3908-3916

²⁰³ Cfr. Nur.A., *Electrochemical...*

²⁰⁴ Cfr. nota 160

l'accrescimento dei grani, mentre lo stesso è ostacolato a temperature più alte a causa di una presenza più massiccia di nuovi siti di nucleazione.

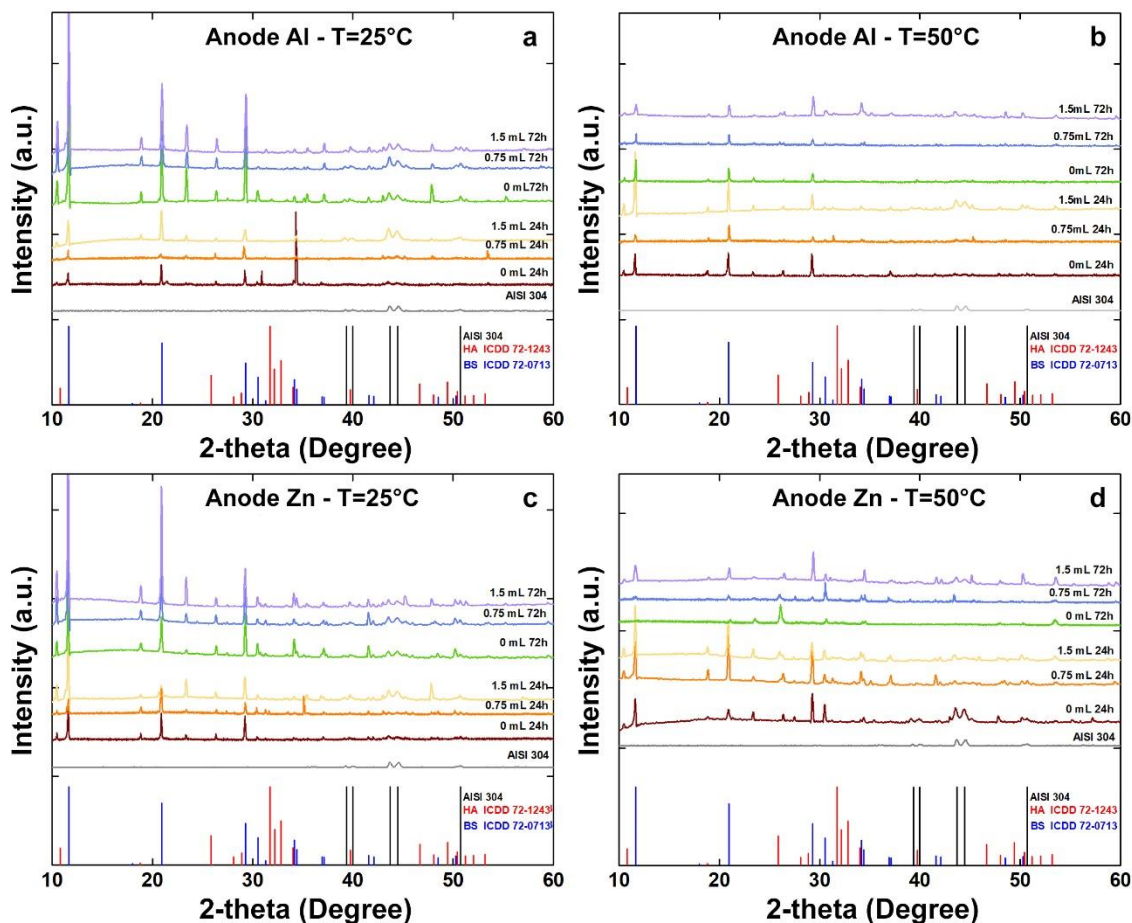


Fig. 8.6 Diffratogrammi sui campioni realizzati a diverse condizioni operative: Anodo in alluminio $T=25^{\circ}\text{C}$ (a) e $T=50^{\circ}\text{C}$ (b); Anodo in zinco $T=25^{\circ}\text{C}$ (c) e $T=50^{\circ}\text{C}$ (d)

Tab. 8.3 Dimensione media dei grani calcolata usando l'equazione di Sherrer. La deviazione standard è del 1.3%

	24h 0mLVAc	72h 0mLVAc	24h 1.5mLVAc	72h 1.5mLVAc
Zn 25°C	70.1	88.8	87.82	92.93
Zn 50°C	42.74	25.78	42.29	9.23
Al 25°C	43.2	68.31	52.93	74.69
Al 50°C	29.82	20.23	36.66	8.85

Per quanto riguarda i depositi ottenuti con l'accoppiamento con alluminio, per entrambe le temperature sono stati ottenuti grani più piccoli, fenomeno dovuto ad una forza spingente maggiore che facilita la nucleazione. Va da sé che per entrambi gli

accoppiamenti l'aumento di temperatura diminuisce la cristallinità dei rivestimenti, che comporta un tasso di dissoluzione più lento in SBF. In altre parole, un tempo sufficientemente più lungo è più idoneo per la crescita di un nuovo tessuto osseo all'interno dei pori dei *coating*²⁰⁵.

In linea con i risultati ottenuti all'XRD, gli spettri RAMAN mostrano che i picchi di brushite sono in quantità maggiore e più definiti rispetto all'idrossiapatite (fig. 8.7). La presenza del PVAc è stata identificata attraverso il picco a 900 cm^{-1} (C-C *stretching*) e 1135 cm^{-1} (C-O *stretching*), anche se è molto difficile rilevarlo, poiché vi è una piccola concentrazione e il segnale è molto vicino ai modi vibrazionali della brushite e dell'idrossiapatite. Tuttavia, il modo vibrazionale principale a 2930 cm^{-1} (C-H *stretching*) non è stato osservato. Nel caso dell'anodo di zinco, sono stati ottenuti risultati molto simili.

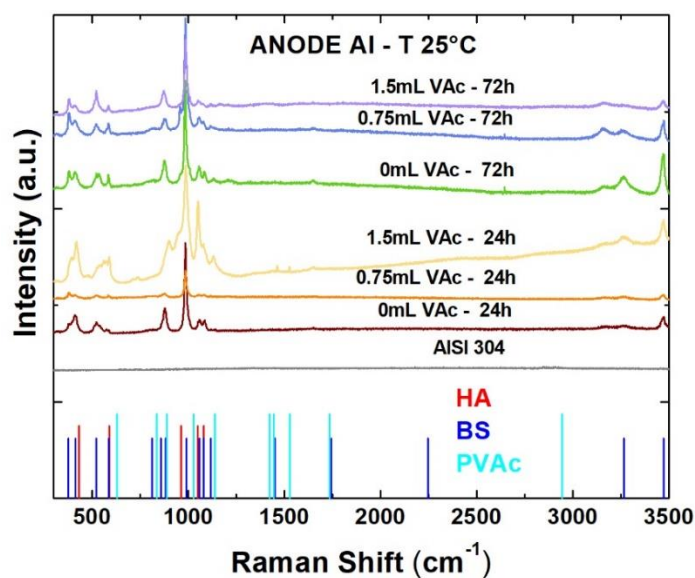


Fig. 8.7 Spettri RAMAN per campioni ottenuti con accoppiamento con alluminio a T di 25 °C

Dopo 21 giorni di *aging* in SBF i campioni sono stati sottoposti alle caratterizzazioni. Da un punto di vista morfologico i *coating* mantengono la stessa morfologia, sebbene ci siano delle variazioni nei parametri di deposizione, come è possibile notare in fig. 8.8. L'analisi EDS presenta un valore del rapporto Ca/P vicino a 1.8, che è attribuibile

²⁰⁵ Cfr. M. P. Da Silva (2001). *Transformation of monetite...*

alla presenza di ioni calcio che provengono da SBF in aggiunta alla struttura cristallina del *coating*. Inoltre in fig. 8.9 sono stati rilevati elementi come magnesio, sodio, zolfo, cloro e potassio che provengono dalla precipitazione dei sali di cloro o altri composti come cloroapatite e magnesio fosfato idrato dovuti all'incorporazione da SBF²⁰⁶. Invece, dai risultati ottenuti dalle analisi effettuate all'XRD e RAMAN (fig. 8.10) sono stati rilevati segnali che appartengono alla fase di idrossiapatite, mentre non sono stati rilevati picchi di diffrazione appartenenti alla fase brushite, dato che si verifica una continua dissoluzione e riprecipitazione dei fosfati di calcio durante i giorni di immersione in SBF. Inoltre, la fase polimerica è stata rilevata grazie al modo vibrazionale di stretching del PVAc che è visibile a 2930 cm^{-1} , che conferma quindi la presenza della fase organica.

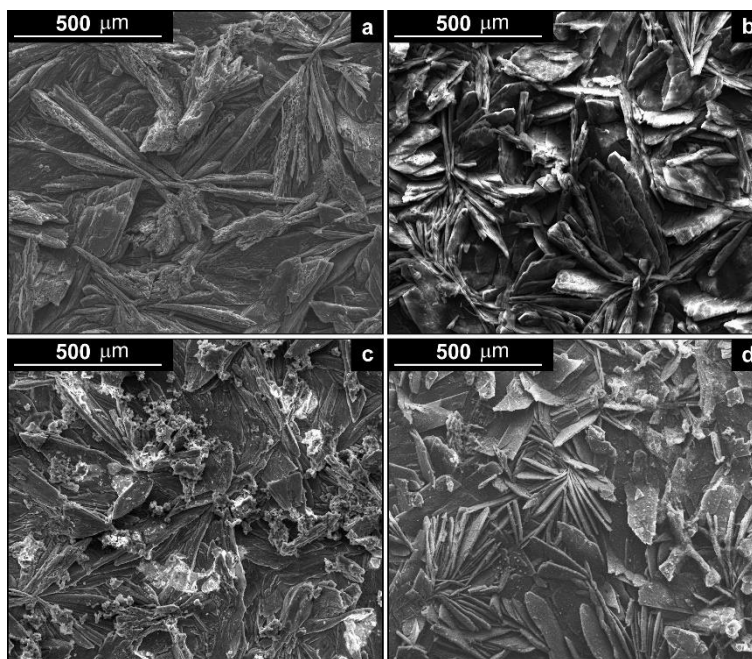
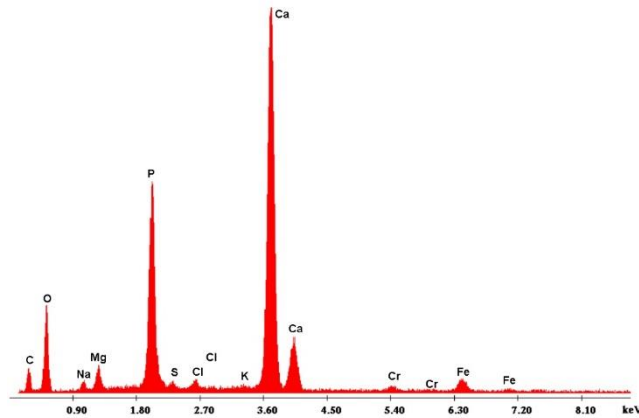
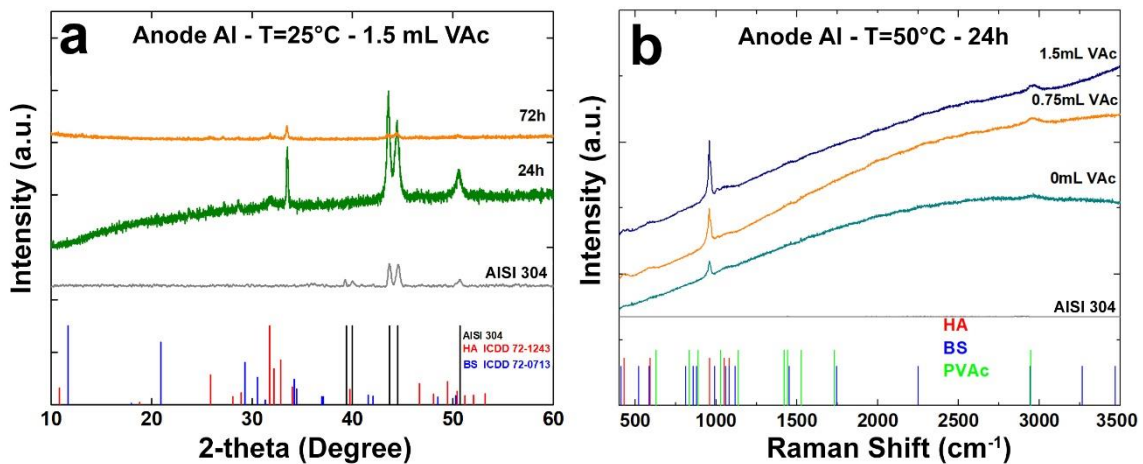


Fig. 8.8 Immagini SEM dei *coating* dopo 21 giorni di *aging* in SBF fabbricati con diversi parametri di deposizione galvanica a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ con alluminio: a) 0 mL VAc 24h b) 0 mL VAc 72h c) 1.5 mL VAc 24h d) 1.5 mL VAc 72h

²⁰⁶ Cfr. M. Wei, J. H. Evans, T. Bostrom, L. Grøndahl (2003). *Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite in Journal of materials science: materials in medicine*, 14(4), 311-320.


 Fig. 8.9 EDS al termine dei 21 giorni di *aging*

 Fig. 8.10 a) XRD post *aging* b) Spettro RAMAN post *aging*

Per verificare ulteriormente la presenza del polimero nel *coating* composito, è stata eseguita un'analisi FT-IR/ATR, i cui risultati sono mostrati in fig. 8.11. Prima dell'*aging* in SBF, i campioni che contengono PVAc sono caratterizzati da un picco di brushite molto intenso, sebbene il picco appartenente al polimero sia ben distinguibile²⁰⁷. In particolare, sono stati individuati due picchi a 2928 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} dovuto rispettivamente allo *stretching* vibrazionale simmetrico e asimmetrico del gruppo $-\text{CH}_2$. È

²⁰⁷ Cfr. D. Lee, P. N. Kumta (2010). *Chemical synthesis and stabilization of magnesium substituted brushite in Materials Science and Engineering: C*, 30(7), 934-943. Cfr. S. Singh, V. Singh, S. Aggarwal, U. K. Mandal (2010). *Synthesis of brushite nanoparticles at different temperatures in Chemical Papers*, 64(4), 491-498.

possibile osservare la vibrazione del legame C=O della fase polimerica grazie al picco rilevato a 1722 cm^{-1} . I picchi individuati a 1434 cm^{-1} e 1376 cm^{-1} sono dovuti alle vibrazioni rispettivamente $\delta(\text{CH}_2)$ e $\delta(\text{CH}_3)$ del PVAc, mentre il picco a 1238 cm^{-1} è causato dallo *stretching* asimmetrico del PVAc. Altri picchi caratteristici come C-C-C e C-C-O a 1121 cm^{-1} e C-C vibrazionale a 1025 cm^{-1} sono schermati dalla presenza di un segnale molto più intenso della fase brushite²⁰⁸. Anche attraverso questa analisi è stata rilevata la scomparsa della fase brushite al termine dei 21 giorni in SBF. Infatti, il deposito perde il tipico picco della brushite dovuto alle frequenze di vibrazione di *stretching* (νOH : $3540\text{-}3153\text{ cm}^{-1}$) e modo vibrazionale di *bending* (δOH : 1642 cm^{-1}), mentre emergono i segnali delle vibrazioni caratteristiche dell'idrossiapatite. Anche in questo caso, i campioni contenenti PVAc hanno mostrato i picchi caratteristici dopo l'*aging* in SBF ma meno intensi, una conseguenza dovuta alla perdita del polimero durante la formazione della fase di idrossiapatite.

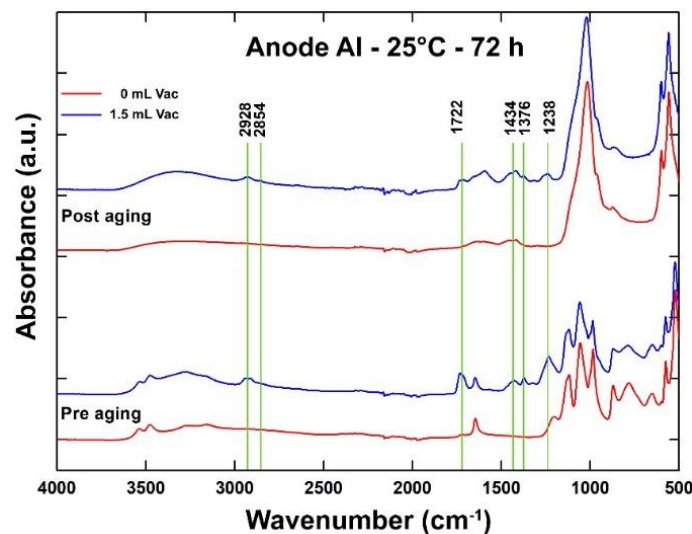


Fig. 8.11 Spettri FT-IR/ATR prima e dopo l'immersione in SBF per 21 giorni

²⁰⁸ Cfr. F. Lopresti, F. C. Pavia, I. Vitrano, M. Kersaudy-Kerhoas, V. Brucato, V. La Carrubba (2020). *Effect of hydroxyapatite concentration and size on morpho-mechanical properties of PLA-based randomly oriented and aligned electrospun nanofibrous mats* in *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 101, 103449. Cfr. A. M. Abdelghany (2019). *Synthesis and structural-biological correlation...*

Il valore dell'angolo di contatto, che è un indicatore della bagnabilità della superficie e della biocompatibilità, è stato determinato utilizzando sia acqua che SBF sul rivestimento prima e dopo l'*aging* (fig. 8.12).

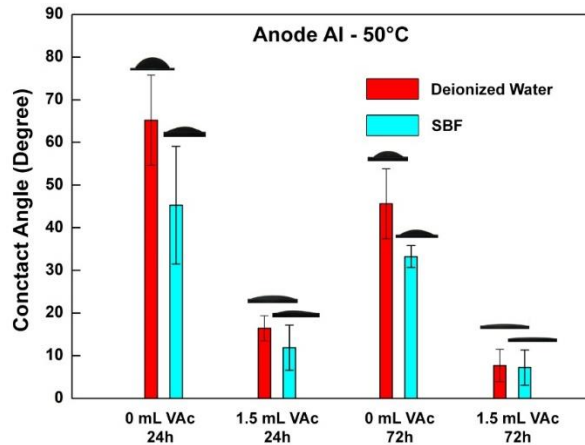


Fig. 8.12 Valori dell'angolo di contatto

Prima dell'*aging*, tutti i campioni che contengono il polimero mostrano un valore dell'angolo molto basso. Dopo l'*aging*, il comportamento tende ad essere differente. Paragonando i *coating* realizzati senza l'aggiunta di polimero dopo 24 e 72 ore di deposizione, è possibile notare come l'angolo di contatto diminuisca con l'incremento del tempo di deposizione. Questo risultato può essere messo in relazione con la rugosità e il cambio della grandezza dei grani dei *coating*, che aumenta con il tempo di deposizione. In particolare, è stato dimostrato che l'angolo di contatto sul *coating* senza PVAc diminuisce se possiede una morfologia con grani molto piccoli, poiché aumenta la superficie specifica²⁰⁹. Ciò è in linea con i dati ottenuti all'XRD: per i campioni ottenuti a 50 °C si osserva una diminuzione della grandezza dei grani con l'aumento del tempo di deposizione. Per quanto riguarda invece i campioni che contengono il polimero, l'angolo di contatto appare più piccolo rispetto ai campioni privi di polimero. In particolare, l'angolo di contatto medio del composito dopo 24 ore di deposizione è di 11.5° in acqua e 11.9° in SBF, mentre

²⁰⁹ Cfr. S. Bose, S. Dasgupta, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay (2010). *Microwave-processed nanocrystalline hydroxyapatite: Simultaneous enhancement of mechanical and biological properties* in *Acta biomaterialia*, 6(9), 3782-3790. Cfr. S. Dasgupta, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay, S. Bose (2013). *Effect of grain size on mechanical, surface and biological properties of microwave sintered hydroxyapatite* in *Materials Science and Engineering: C*, 33(5), 2846-2854.

per i campioni compositi ottenuti dopo 72 ore, l'angolo di contatto è minore di 10° . Dalle immagini SEM della fase di post *aging* mostrate in fig. 8.8, la morfologia appare abbastanza simile. Dunque, l'aumento dell'idrofilicità non è imputabile alla microrugosità del *coating* bensì alla presenza del polimero.

Dalle caratterizzazioni elettrochimiche effettuate sui rivestimenti sono state valutate le proprietà anticorrosive dei rivestimenti: si è notata una continua evoluzione del *coating* dovuta alla parziale solubilizzazione e rideposizione quando è in contatto con SBF. Dal monitoraggio del potenziale di circuito aperto (OCP) si nota come questo si sposti verso valori più nobili durante i giorni di *aging* rispetto all'acciaio privo di rivestimento dovuto ad un aumento dell'effetto protettivo (fig. 8.13). Se ne ha conferma dai valori del potenziale di corrosione (E_{corr}) e già dai primi giorni di *aging* è possibile constatare un aumento della nobiltà rispetto all'acciaio non rivestito (fig. 8.14). I valori dei parametri di corrosione sono riportati in tab. 8.4. Al termine delle tre settimane di osservazione il valore di E_{corr} supera il potenziale dell'acciaio nudo di 200 mV. Anche se dello stesso ordine di grandezza, si riscontra una diminuzione del valore della densità di corrente di corrosione (i_{corr}). Inoltre, è chiaro che la presenza del PVAc non influisce sulle caratteristiche dei rivestimenti, fatto probabilmente dovuto alla sua bassa concentrazione. Fluttuazioni nel valore della i_{corr} possono trovare una spiegazione nella continua modifica del *coating* dovuta all'equilibrio che si instaura tra brushite e idrossiapatite. La conseguenza di questo processo dinamico è la variazione dello spessore del rivestimento, che porta ad una diversa resistenza alla corrosione durante l'*aging* in SBF.

Un altro parametro da tenere in considerazione come effetto di una migliore prestazione contro la corrosione è la cristallinità del rivestimento. Infatti, una più bassa cristallinità del *coating* è indice anche di una velocità più bassa di dissoluzione in SBF: vale a dire che più bassa è la dissoluzione, maggiore sarà la proprietà protettiva nei confronti dei fenomeni corrosivi che il rivestimento fornisce al substrato. Infatti, i rivestimenti realizzati a 50°C (fig. 8.14b) hanno mostrato una i_{corr} leggermente più bassa rispetto a quelli realizzati a 25°C (fig. 8.14a), dovuta alla formazione di un rivestimento più spesso e meno cristallino. Con l'aumentare del tempo di invecchiamento, la microstruttura iniziale dei rivestimenti ha meno influenza perché i meccanismi di dissoluzione e riprecipitazione in SBF tendono a renderli simili.

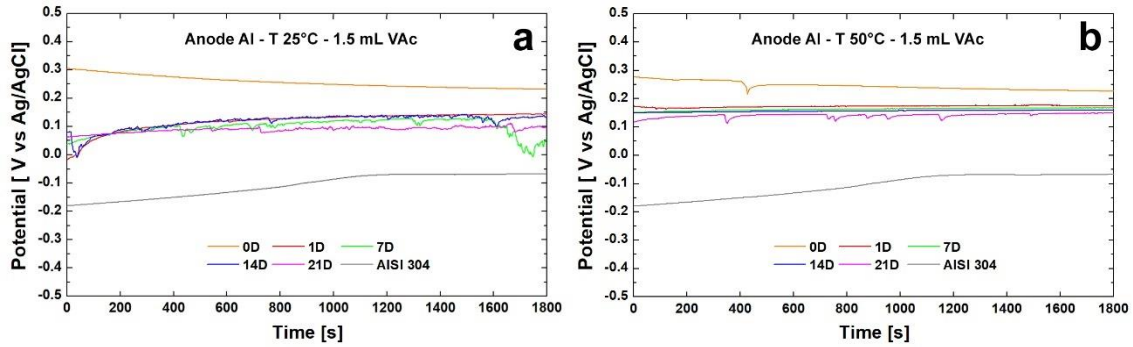


Fig. 8.13 Monitoraggio del potenziale di circuito aperto per campioni dopo 72 ore di deposizione

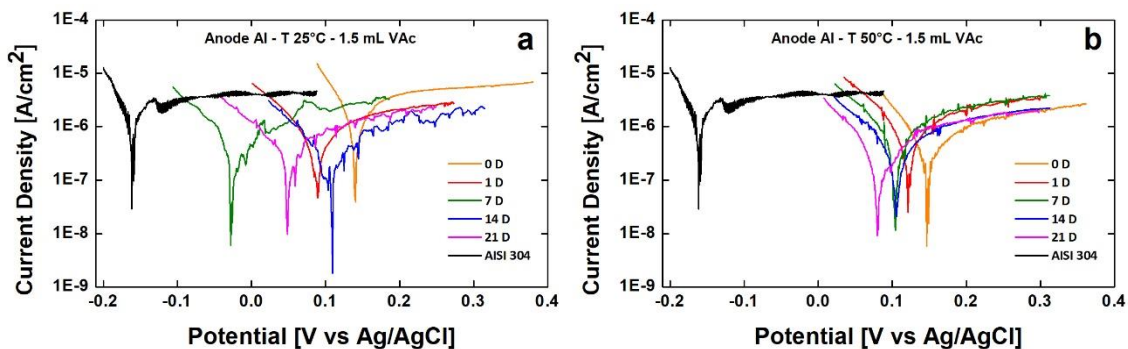


Fig. 8.14 Curve di polarizzazione per campioni dopo 72 ore di deposizione

Tab. 8.4 Parametri di corrosione valutati a diversi tempi di giorni di <i>aging</i> per i campioni ottenuti a 72h						
	Tempo [Giorni]					AISI 304
	0	1	7	14	21	
25°C 1.5 mL - Al						
E_{corr} [V]	0.14	0.088	-0.022	0.105	0.05	-0.16
i_{corr} [Acm ⁻²]	4.13 E -06	1.77 E -06	1.05 E -06	9.20 E -07	1.05 E -06	3.92E-06
50°C 1.5 mL - Al						
E_{corr} [V]	0.147	0.121	0.104	0.105	0.082	-0.16
i_{corr} [Acm ⁻²]	9.20E-07	1.87E-06	1.86E-06	1.10E-06	7.27E-07	3.92E-06

La quantificazione degli ioni metallici rilasciati in soluzione dopo 21 giorni di *aging* in SBF è stata effettuata tramite ICP-OES per verificare ulteriormente la proprietà protettiva dei *coating* contro i fenomeni corrosivi. La concentrazione misurata di ioni metallici è molto bassa al di sotto dei ppm (tab. 8.5). Si tratta di un risultato soddisfacente, che rientra sotto i valori limiti di soglia²¹⁰. In aggiunta si può notare come gli ioni calcio diminuiscano nel tempo, a causa dell'incorporazione all'interno della struttura del

²¹⁰ Cfr. Y. S. Hedberg (2016). *Metal release from...*

coating. Parallelamente gli ioni P liberati in soluzione sotto forma di ione fosfato sono rilasciati durante l'equilibrio tra brushite e idrossiapatite²¹¹.

Tab. 8.5 Concentrazione degli ioni in SBF dopo 21 giorni di *aging*. La deviazione standard media è 0.5%

	Fe	Cr	Ni	Ca	P
	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]
SBF (mis.)	0	0	0	103.75	31.74
SBF (calc.)	0	0	0	105	31
AISI 304	0.037	0	0	82.22	25.44
24h Vac 0mL	0	0.001	0.001	7.04	84.88
72h Vac 0 mL	0	0.002	0.0005	3.86	141.26
24h Vac 1.5 mL	0.022	0.001	0.005	11.96	55.22
72h Vac 1.5 mL	0.017	0.003	0.001	5.84	111.1

La spettroscopia d'impedenza ha dato ulteriori conferme con le curve di polarizzazione. Le misure effettuate sono rappresentate in fig. 8.15 e fanno riferimento alla prova realizzata al giorno 0, 7 e 21 di *aging*. Il miglior *fitting* è stato ottenuto utilizzando il circuito proposto nei precedenti capitoli. L'uso della CPE è attribuibile a varie cause come la rugosità superficiale eterogeneità, porosità e variazione della composizione del rivestimento che potrebbero essere tutti contemporaneamente presenti nel caso dei rivestimenti ottenuti²¹².

²¹¹ Cfr. H. Shibata, T. Yokoi, T. Goto, I. Y. Kim, M. Kawashita, K. Kikuta, C. Ohtsuki (2013). *Behavior of hydroxyapatite crystals in a simulated body fluid: effects of crystal face* in *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 121(1417), 807-812.

²¹² Cfr. J. B. Jorcin (2006). *CPE analysis by local...* Cfr. M. E. Orazem, B. Tribollet (2008). *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

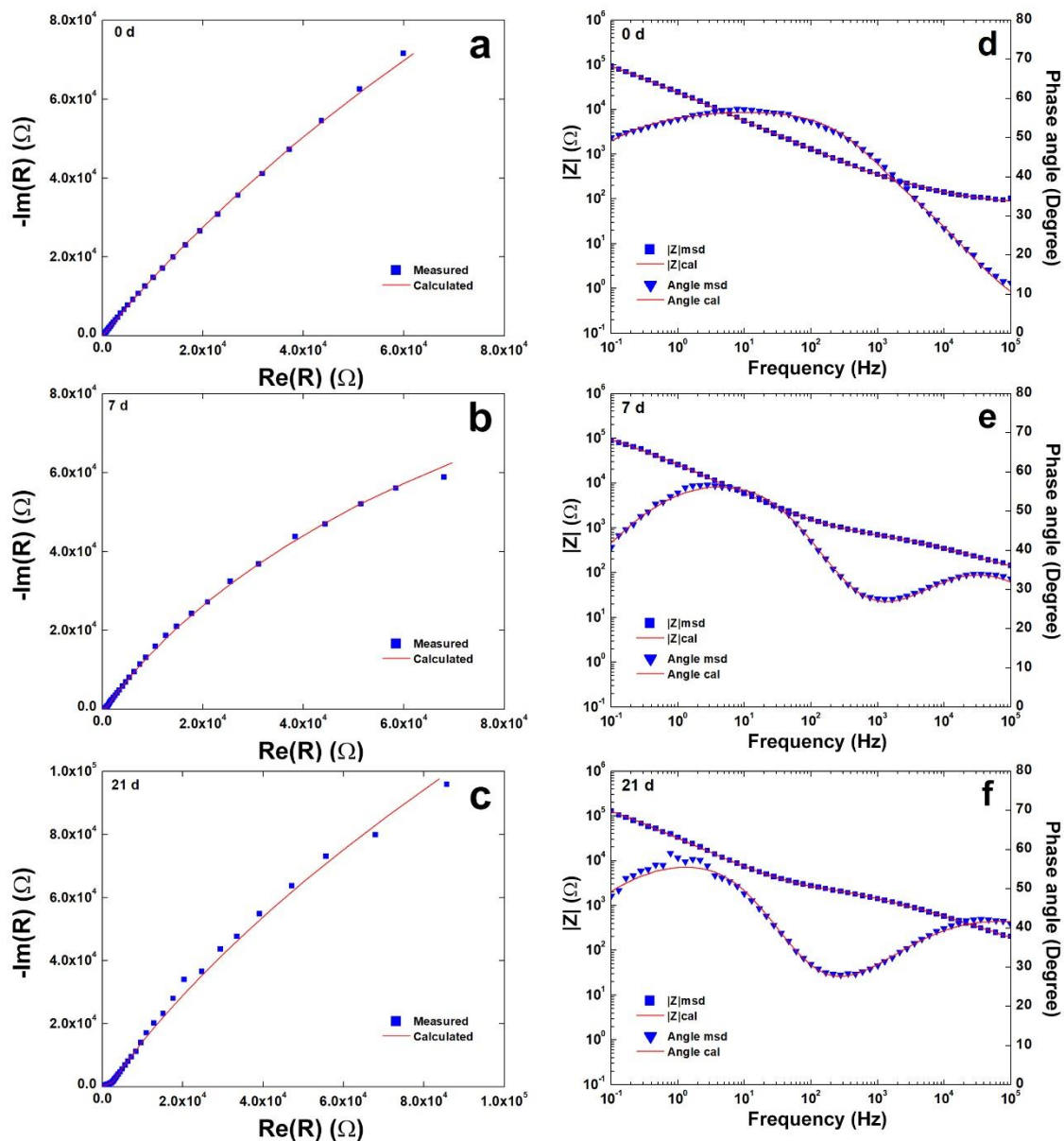


Fig. 8.15 Spettri di impedenza ottenuti sui *coating* realizzati utilizzando alluminio come anodo sacrificiale a 50 °C per 72 ore in presenza di 1.5mL di VAc.

Come evidente nella tab. 8.6, i valori dei parametri di *fitting* cambiano con il tempo di immersione, indice di una modifica da un punto di vista sia chimico sia morfologico del rivestimento durante l'*aging*. È importante sottolineare che lo strato vicino all'interfaccia del substrato ha una migliore qualità del film passivo che forma durante l'*aging*. Per questo motivo i valori R_2 sono di un ordine di grandezza superiori a quelli relativi al substrato metallico. Tuttavia, i valori che assume n_2 sono inferiori a quelli

dell'acciaio nudo, a conferma del fatto che i rivestimenti presentano una morfologia più complessa di un semplice film passivo. In ogni caso, dopo 21 giorni l'impedenza complessiva è maggiore superiore a $10^5 \Omega$ per tutti i campioni.

Tab. 8.6 Parametri di fitting delle misure di impedenza dei rivestimenti ottenuti mediante galvanica deposizione a 50 °C per 72 ore utilizzando accoppiamento con alluminio. La deviazione standard media è del 5.3%.

72h 1.5mL VAc	Tempo [giorni]					AISI304
	0	1	7	14	21	
R_s	76.65	69.47	47.15	29.52	18	91.4
CPE_{1-Y}	1.21E-05	3.45E-06	4.91E-06	3.53E-06	4.48E-06	-
CPE_{1-n}	0.619	0.638	0.5604	0.551	0.5297	-
R₁	950	954	931	2233	3257	-
CPE_{2-Y}	7.12E-07	8.31E-06	6.11E-06	7.40E-06	4.97E-06	8.71E-06
CPE_{2-n}	0.807	0.678	0.7262	0.684	0.7462	0.895
R₂	587000	558700	243500	119000	679200	75410
W	7.06E-05	2.33E-05	4.02E-05	1.64E-06	1.29E-05	-

La citotossicità dei rivestimenti compositi preparati in condizioni diverse è stata testata *in vitro* utilizzando cellule preosteoblastiche. Le colture cellulari sono state eseguite utilizzando terreni incubati per 24 ore con i diversi campioni a un rapporto volume/superficie stabilito. Nello specifico, sono stati condotti test di citotossicità sui campioni ottenuti con un anodo di alluminio a temperatura ambiente, con tempi di deposizione di 24 ore e 72 ore, con e senza 1.5 mL di VAc. La vitalità cellulare è stata verificata per sette giorni di coltura. I risultati di questi test sono riportati in fig. 8.16.

Dopo 2 giorni di coltura non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa tra i valori di assorbanza presenti nei controlli e nei campioni. Al quinto giorno sono stati registrati valori di assorbanza identici per il controllo e per i campioni con e senza polimero ottenuti dopo 24 ore di deposizione, mentre sono stati osservati valori leggermente inferiori per i campioni realizzati dopo 72 ore di deposizione. Tuttavia, i valori di assorbanza delle cellule coltivate in terreni normali e rivestiti erano superiori a quelli delle cellule cresciute nel mezzo trattato con metallo nudo (controllo negativo). Al settimo giorno i valori di assorbanza dei campioni trattati sono circa tre volte rispetto al controllo negativo, mentre sono inferiori rispetto al controllo positivo in un *range* che va dall'82 al 90%. È comunque importante sottolineare che in tutti i casi la vitalità delle

cellule cresciute con i terreni incubati è stata abbondantemente superiore al 70% rispetto al controllo positivo, a conferma così della non citotossicità dei materiali testati, secondo la norma ISO 10993-5²¹³. Nel complesso, è possibile affermare che, per quanto riguarda il periodo di coltura preso in considerazione, la presenza del rivestimento elimina l'effetto citotossico basale dato dall'acciaio inossidabile incontaminato senza effetti secondari sulla crescita cellulare fisiologica.

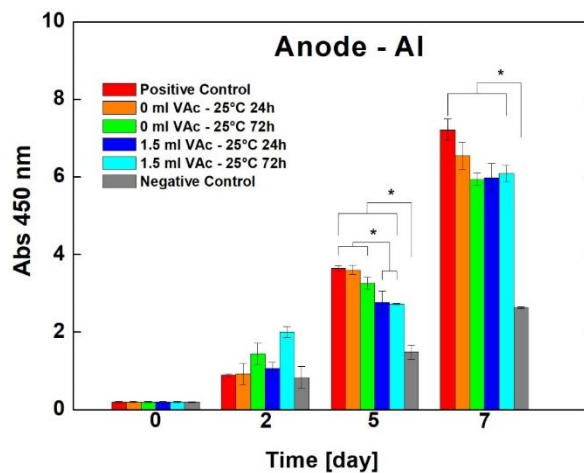


Fig. 8.16 Vitalità misurata mediante assorbanza a 450 nm utilizzando il kit CCK-8, di Cellule MC3T3-E1 coltivate in un mezzo non trattato (controllo positivo), acciaio non rivestito (controllo negativo) e supporti rivestiti trattati con campioni. Asterischi indicare differenze significative nella vitalità cellulare ($P < 0,05$).

²¹³ Cfr. ISO,10993-5, *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity*, 2009

Capitolo 9 – *Coating* compositi di fosfati di calcio, chitosano e collagene su acciaio AISI 304

In questo capitolo saranno presentati e discussi i risultati relativi alla fabbricazione e caratterizzazione di *coating* compositi a base di fosfato di calcio e biopolimeri naturali realizzato attraverso il metodo di deposizione galvanica su acciaio AISI 304²¹⁴. In particolare si discuterà la realizzazione di *coating* compositi di fosfati di calcio e chitosano che prevede anche l'introduzione del collagene, componente presente al 90% della componente organica della matrice ossea.

Come già esposto nel par. 4.2.2, il chitosano è un polisaccaride di origine naturale policationico che grazie alla presenza di gruppi amminici risulta solubile in soluzioni acide ($pK_a=6.3\sim 6.5$). Da un punto di vista tecnologico, è molto versatile ed infatti lo si utilizza in diverse applicazioni, dall'agricoltura al trattamento delle acque, dal biomedico all'alimentare. Per quanto riguarda l'ingegneria tissutale, risulta un biopolimero biocompatibile poiché non inibisce la proliferazione cellulare. Nel campo dei *coating* assume un ruolo non irrilevante, dato che migliora l'adesione delle cellule ossee e migliora la resistenza alla corrosione²¹⁵.

I risultati saranno presentati in maniera sintetica, sebbene lo studio in laboratorio abbia previsto prima un lavoro sul *coating* costituito da fosfato di calcio e chitosano e successivamente l'introduzione del collagene come terzo componente del *coating*. Saranno presentate e discusse anche la biocompatibilità e le *performance* in termini di resistenza alla corrosione del rivestimento.

²¹⁴ La scelta del substrato è stata già posta a disamina nell'introduzione del capitolo 8 e dunque la motivazione è del tutto analoga.

²¹⁵ Cfr. R. M. Jin, N. Sultana (2018). *Osteoblast adhesion and proliferation on porous chitosan/polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering application in Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 14(4), 495-499; Cfr. X. Wang, G. Wang, L. Liu, D. Zhang (2016). *The mechanism of a chitosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation in Scientific reports*, 6(1), 1-8; Cfr. S. Dhivya, A. Keshav Narayan, R. Logith Kumar, S. Viji Chandran, M. Vairamani, N. Selvamurugan (2018). *Proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on scaffolds containing chitosan, calcium polyphosphate and pigeonite for bone tissue engineering in Cell proliferation*, 51(1), e12408.

9.1 Parte sperimentale

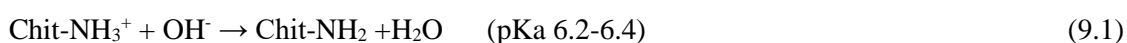
Prima della deposizione del rivestimento, l'acciaio AISI 304 e l'anodo di zinco sono stati sottoposti a trattamenti di pulizia secondo la procedura descritta in par. 5.2. La soluzione catodica è stata preparata portando a 40 °C in agitazione una soluzione di 50 mL costituita da $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.061 M, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.036 M, NaNO_3 0.1 M e 300 μL di acido lattico. Successivamente è stato aggiunto chitosano (2.5 gL^{-1} , 5 gL^{-1}) e collagene tipo I (0.1 gL^{-1} , 0.2 gL^{-1}). L'anodo sacrificale è stato invece immerso in una soluzione di NaCl 1M. La deposizione galvanica viene condotta a celle separate collegate tramite un ponte salino in KCl saturo e gli elettrodi sono cortocircuitati. Per ogni esperimento è stata utilizzata una soluzione fresca. Inoltre, il processo di deposizione galvanica è stato condotto a 50 °C per 24 ore. Dopo la deposizione, i campioni sono lavati con acqua distillata e lasciati ad asciugare in aria prima di procedere alle caratterizzazioni.

9.1.1 Deposizione galvanica

Dopo i pretrattamenti di pulitura e sgrassaggio delle superfici, gli elettrodi sono cortocircuitati tramite un conduttore esterno e immersi nelle loro rispettive soluzioni.

Trattandosi di una codeposizione, le reazioni che portano alla formazione del composto avvengono contemporaneamente. Nello scompartimento anodico si hanno le reazioni di corrosione degli anodi descritte nei capitoli precedenti. Quelle che portano alla formazione di fosfati di calcio seguono lo stesso meccanismo già descritto in par. 6.2.2.

Per quanto riguarda i biopolimeri, l'aggiunta di acido lattico provoca durante la fase di preparazione della soluzione elettrolitica la solubilizzazione delle catene, dovuta alla protonazione dei gruppi amminici presenti in quelle polimeriche. Per quanto concerne il meccanismo di deposizione del chitosano, questo si deposita grazie all'aumento del pH all'interfaccia tra elettrodo ed elettrolita dovuto alle reazioni di elettrogenazione di base. Tale aumento porta alla precipitazione del polimero secondo la reazione (9.1)²¹⁶:



²¹⁶ Cfr. X. Pang, I. Zhitomirsky (2007). *Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite chitosan coating* in *Materials Characterization*, 58(4), 339-348.

Il collagene è caratterizzato da un punto isoelettrico²¹⁷ intorno ad un pH pari a 7.4. In uno studio condotto da Ling²¹⁸ sui *coating* compositi di fosfati di calcio e collagene per deposizione elettrochimica, il gradiente di pH all'interfaccia elettrodo/elettrolita gioca un ruolo fondamentale per la formazione del composito. Infatti, l'aumento del pH provoca la formazione dei cristalli di fosfato di calcio e contemporaneamente le fibrille di collagene si assemblano e mineralizzano nei pressi della superficie catodica (fig. 9.1). Sebbene l'aumento del pH provochi la formazione di una carica negativa sui gruppi carbossilici, questi fungono da punti di nucleazione per i cristalli dei fosfati di calcio²¹⁹. Man mano che la deposizione procede, le fibre di collagene sono inglobate all'interno del *coating* e permettono infine di ottenere una struttura composita. Secondo uno studio di Wang, la presenza del chitosano può contribuire nella modifica del punto isoelettrico del collagene dal momento che si instaurano delle interazioni tra le catene dei biopolimeri²²⁰. In uno studio più recente di Zhuang è stato proposto lo stesso meccanismo di formazione del composito tra fosfati di calcio e proteine, collagene/BSA, per deposizione elettrochimica²²¹. A differenza di quanto succede per l'elettrodeposizione, per il metodo di deposizione galvanica, non è stato necessario introdurre all'interno della soluzione elettrolitica acqua ossigenata, come invece avveniva nei casi di cui agli studi appena citati. Ciò è avvenuto perché i tempi di deposizione sono più lunghi e la riduzione degli ioni nitrato è la principale reazione responsabile della basificazione della superficie dell'elettrodo di lavoro.

²¹⁷ Il punto isoelettrico (I_p) è il valore di pH al quale la molecola possiede carica elettrica netta pari a zero. la maggior parte delle molecole come le proteine o gli amminoacidi sono zwitterioni e contengono gruppi funzionali che in base al pH possono far assumere globalmente alla molecola una carica netta positiva o negativa. Nel caso del collagene, ad esempio, sotto l' I_p i gruppi amminici sono coinvolti nella seguente reazione di equilibrio $-NH_2 + H_2O \leftrightarrow -NH_3^+ + OH^-$ caricando positivamente la proteina. Mentre al di sopra dell' I_p i gruppi carbossilici caricano negativamente la proteina secondo la reazione di equilibrio $-COOH + H_2O \leftrightarrow -COO^- + H^+$.

²¹⁸ Cfr. T. Ling, J. Lin, J. Tu, S. Liu, W. Weng, K. Cheng, ... G. Han (2013). *Mineralized collagen coatings formed by electrochemical deposition in Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(12), 2709-2718.

²¹⁹ Cfr. G. K. Toworfe, R. J. Composto, I. M. Shapiro, P. Ducheyne (2006). *Nucleation and growth of calcium phosphate on amine-, carboxyl- and hydroxyl-silane self-assembled monolayers in Biomaterials*, 27(4), 631-642. Cfr. M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya, J. Tanaka (2001). *Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo in Biomaterials*, 22(13), 1705-1711.

²²⁰ Cfr. X. Wang, L. Sang, D. Luo, X. Li (2011). *From collagen-chitosan blends to three-dimensional scaffolds: the influences of chitosan on collagen nanofibrillar structure and mechanical property in Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 233-240.

²²¹ Cfr. J. Zhuang, J. Lin, J. Li, H. Wang, K. Cheng, W. Weng (2016). *Electrochemical deposition of mineralized BSA/collagen coating in Materials Science and Engineering: C*, 66, 66-76.

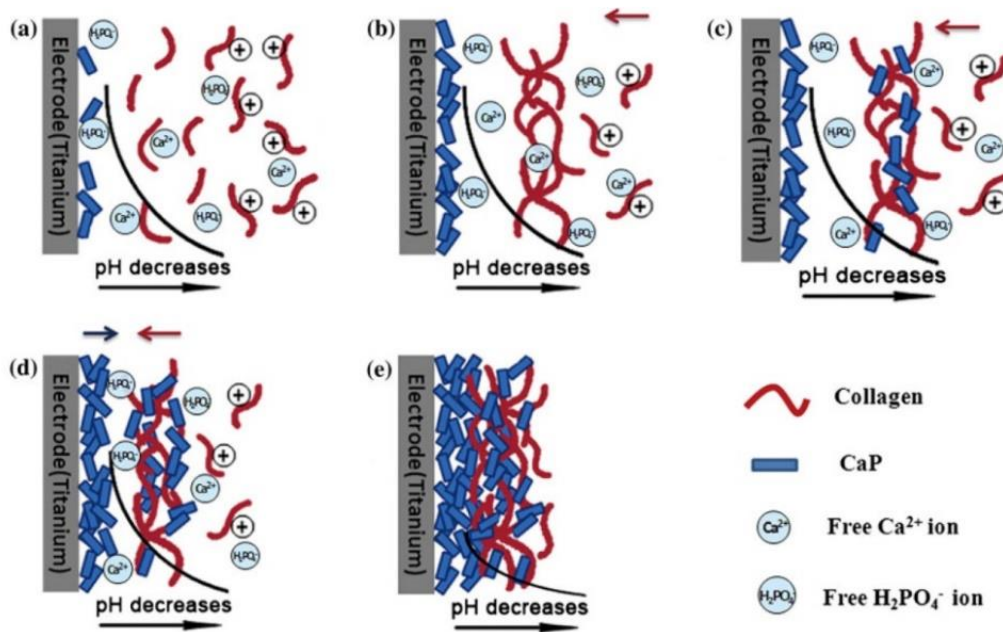


Fig. 9.1 Meccanismo di deposizione composito calcio fosfato e collagene secondo Ling²²²

9.2 Risultati

Lo studio della morfologia al microscopio elettronico è stato effettuato sui campioni al termine della deposizione galvanica. Le figg. 9.2 e 9.3 mostrano che i rivestimenti ricoprono interamente la superficie del metallo. I campioni ottenuti con una concentrazione di 5 gL^{-1} di chitosano (fig. 9.2b) presentano cristalli di fosfati di calcio più grandi rispetto al deposito ottenuto con 2.5 gL^{-1} (fig. 9.2a) inglobati nella struttura del composito. La tipica forma aghiforme dei fosfati di calcio è stata rilevata solo per alti ingrandimenti. Per quanto riguarda il chitosano, non è stato possibile individuarne la presenza, poiché si tratta di una codeposizione che crea un'intima struttura tra i cristalli dei fosfati di calcio e le macromolecole polimeriche²²³. Invece, in riferimento ai depositi con l'aggiunta del collagene in figg. 9.3a e 9.3b, non si riscontra alcun effetto particolare sulla morfologia.

²²² Cfr. Ling, T.(2013). Mineralized collagen...

²²³ Sebbene non sia stata individuata la presenza del chitosano, è stata già studiata la possibilità di realizzare *coating* in chitosano attraverso la deposizione galvanica. Per approfondimenti: Cfr. G. Blanda (2019). *Chitosan-coating deposition* ...

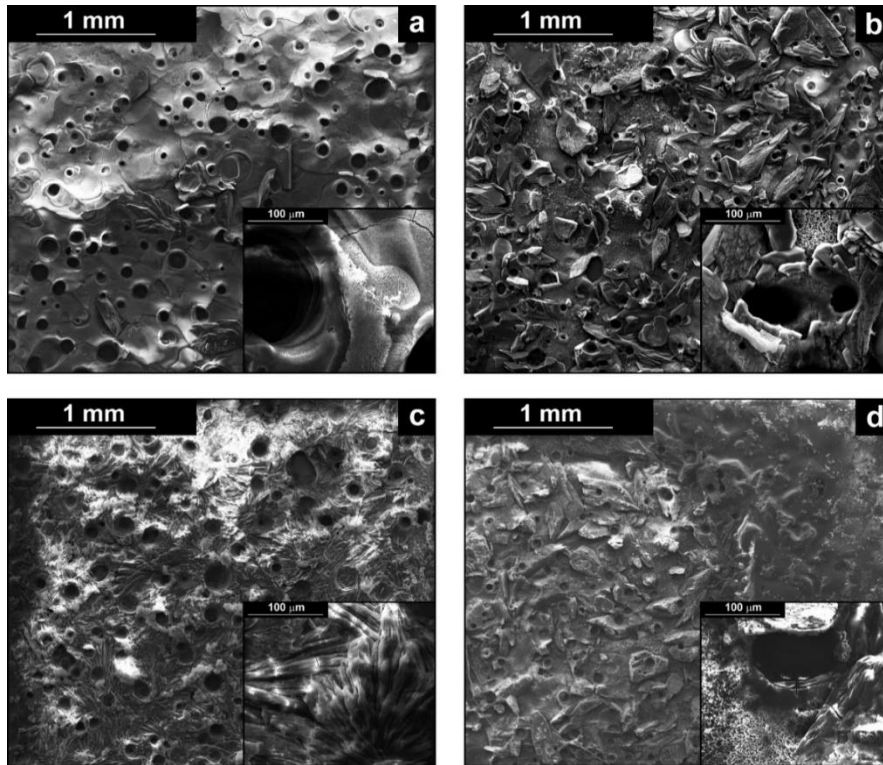


Fig. 9.2 Morfologia dei *coating* composito di fosfati di calcio e chitosano:
a) 2.5gL^{-1} CS pre *aging* b) 5gL^{-1} CS pre *aging* c) 2.5gL^{-1} CS post *aging* d) 5gL^{-1} CS post *aging*

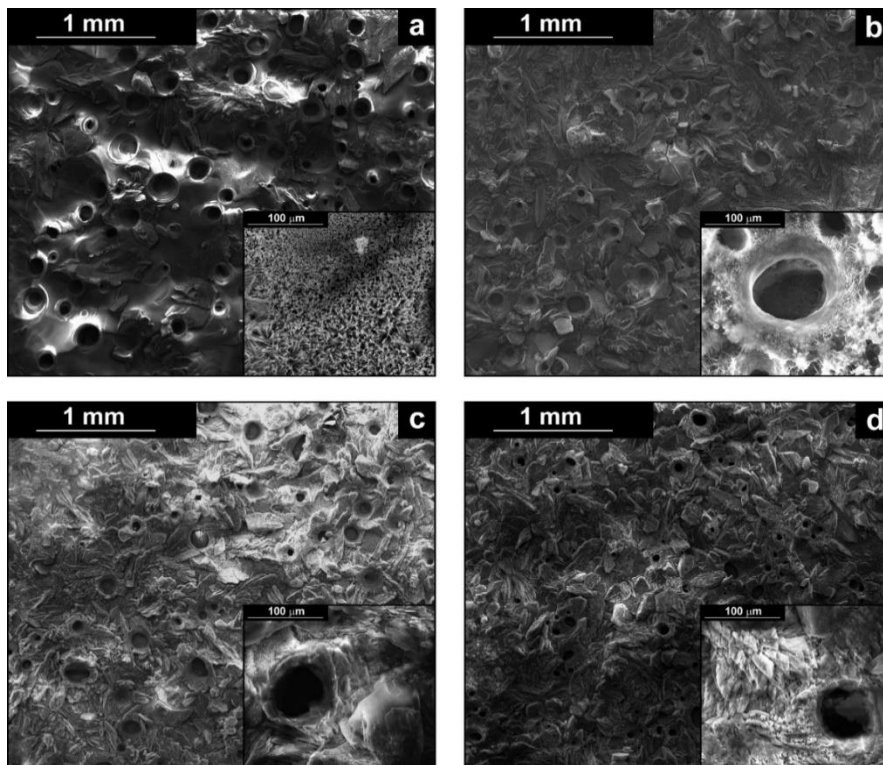


Fig. 9.3 Morfologia dei *coating* composito di fosfati di calcio, chitosano e collagene:
a) 0.1gL^{-1} CL pre *aging* b) 0.2gL^{-1} CL pre *aging* c) 0.1gL^{-1} CL post *aging* d) 0.2gL^{-1} CL post *aging*

A differenza dei *coating* a base di fosfati di calcio analizzati nei capitoli precedenti, è stata rilevata la presenza di macropori circolari. Questa particolarità è attribuibile alla presenza del chitosano in concomitanza alla reazione di sviluppo di idrogeno²²⁴. Secondo Mąkiewicz²²⁵, che affronta lo studio di un composito a base di idrossiapatite e chitosano per via elettrochimica, l'alta viscosità della soluzione favorisce l'adsorbimento delle bolle di idrogeno sulla superficie catodica durante la deposizione. Questo fenomeno crea una barriera dell'interfaccia tra elettrodo/elettrolita che limita la deposizione del rivestimento in quella zona. Superato un certo valore critico delle dimensioni, avviene il distacco della bolla col conseguente proseguimento della deposizione nella zona precedentemente occupata. Sebbene appaiano all'interno vuoti, i macropori hanno al loro interno uno strato di deposito (fig. 9.3b). In altri studi, è stato riportato che la generazione delle bolle di idrogeno non permette la formazione di *coating* omogenei. In particolare, l'effetto finale è la formazione di un *coating* poroso dato che le bolle fungono da *template* dinamico²²⁶.

Nelle figg. 9.2 c-d e 9.3 c-d sono mostrati i rivestimenti al termine dei 21 giorni di *aging* in SBF.

I *coating* conservano le stesse caratteristiche morfologiche, ma dai risultati delle analisi EDS (tab. 9.1) si registra un aumento del rapporto di Ca/P dato dall'equilibrio che si instaura tra idrossiapatite e brushite. A differenza di quanto evidenziato nei capitoli precedenti, in cui l'assenza di un composito con un polimero portava alla formazione per lo più di brushite, in questo caso il rapporto Ca/P è maggiore di 1.2. Qualitativamente, ciò si traduce con una maggiore presenza della fase di idrossiapatite all'interno della struttura cristallina del composito.

²²⁴ Cfr. K. Nawrotek, J. Grams (2021). *Understanding Electrodeposition of Chitosan-Hydroxyapatite Structures for Regeneration of Tubular-Shaped Tissues and Organs* in *Materials*, 14(5), 1288. Cfr. A. Wittecka, S. Valet, M. Basista, A. R. Boccaccini (2021). *Electrophoretically deposited high molecular weight chitosan/bioactive glass composite coatings on WE43 magnesium alloy* in *Surface and Coatings Technology*, 418, 127232. Ł. Pawłowski, M. Bartmański, G. Strugała, A. Mielewczyk-Gryń, M. Jażdżewska, A. Zieliński (2020). *Electrophoretic deposition and characterization of Chitosan/Eudragit E 100 coatings on titanium substrate* in *Coatings*, 10(7), 607.

²²⁵ Cfr. M. Mąkiewicz, R. A. Wach, K. Nawrote (2021). *Investigation of Parameters Influencing Tubular-Shaped Chitosan-Hydroxyapatite Layer Electrodeposition* in *Molecules*, 26(1), 104.

²²⁶ Cfr. J. Gong, W. Zhang, T. Liu, L. Zhang (2011). *Facile fabrication of chitosan-calcium carbonate nanowall arrays and their use as a sensitive non-enzymatic organophosphate pesticide sensor* in *Nanoscale*, 3(8), 3123-3131. Cfr. S. Yang, W. Z. Jia, Q. Y. Qian, Y. G. Zhou, X. H. Xia (2009). *Simple approach for efficient encapsulation of enzyme in silica matrix with retained bioactivity* in *Analytical chemistry*, 81(9), 3478-3484.

	Pre Aging		Post Aging	
	Ca/P	Ca/Fe	Ca/P	Ca/Fe
CaP-2.5gL ⁻¹ CS	1.21	40.07	1.82	no Fe
CaP-5gL ⁻¹ CS	1.29	11.7	1.85	no Fe
CaP- 0.1gL ⁻¹ CL - 5gL ⁻¹ CS	1.22	30.17	1.79	no Fe
CaP- 0.2gL ⁻¹ CL - 5gL ⁻¹ CS	1.29	no Fe	1.81	no Fe

Dalle analisi condotte tramite XRD è emerso che i rivestimenti costituiti da fosfati di calcio e chitosano (fig. 9.4) sono costituiti da una miscela brushite e idrossiapatite. Infatti, sono stati identificati i picchi di brushite per valori di 2θ pari a 11.65° , 20.95° , 29.29° e 30.54° ma anche un picco per 2θ pari a 25.87° relativo all'idrossiapatite (fig. 9.4a).

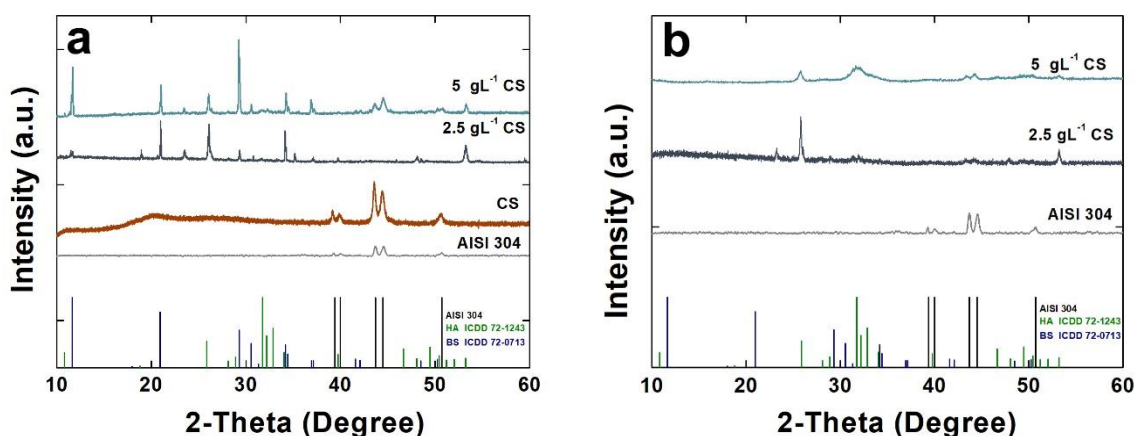


Fig. 9.4 Diffattogrammi dei coating in fosfati di calcio e chitosano: a) pre aging b) post aging

Sono presenti alcuni picchi provenienti dal substrato metallico ma il loro segnale è schermato dalla presenza del rivestimento²²⁷. Per un ulteriore confronto, è stato inserito il diffattogramma relativo al chitosano puro con le tipiche bande intorno a 2θ pari a 11.9° e 19.8° . Tuttavia, data la sua natura amorfa, non presenta picchi di diffrazione nel composito. In fig. 9.4b sono mostrati i diffattogrammi dei campioni dopo 21 giorni di aging in SBF, in cui si nota la scomparsa dei picchi caratteristici della brushite ma emergono invece i picchi per 2θ pari 25.87° , 31.74° , 32.18° , 32.87° , 34.045° relativi all'idrossiapatite.

²²⁷ Per l'identificazione dei picchi di diffrazione si è utilizzato come riferimento: ICDD Cards: Brushite (72-0713), Hydroxyapatite (72-1243). International Centre for Diffraction Data, Power Diffraction File, 2007. Pennsylvania USA. In aggiunta sono stati inseriti i picchi del substrato

In fig 9.5 sono riportati i diffrattogrammi dei compositi contenenti il collagene. Analogamente al chitosano, non è stato possibile rilevare la presenza del collagene attraverso questa tecnica. Tuttavia, è stato notato un incremento della fase idrossiapatite all'aumentare della concentrazione di collagene in soluzione. In particolare, per concentrazioni più alte di collagene (0.2gL^{-1}) il picco relativo all'idrossiapatite ($2\theta=25.87^\circ$) è quello più intenso, mentre non si è rilevato quello principale della fase brushite ($2\theta=11.65^\circ$) (fig. 9.5a). Dopo 21 giorni di *aging* in SBF, i picchi dell'idrossiapatite nell'intorno di 2θ pari a 31.74° , 32.18° , 32.87° appaiono più risolti rispetto al *coating* privo di collagene mentre i picchi di diffrazione per 2θ pari a 25.87° e 50.25° sono più intensi all'aumentare della concentrazione del collagene (fig. 9.5b).

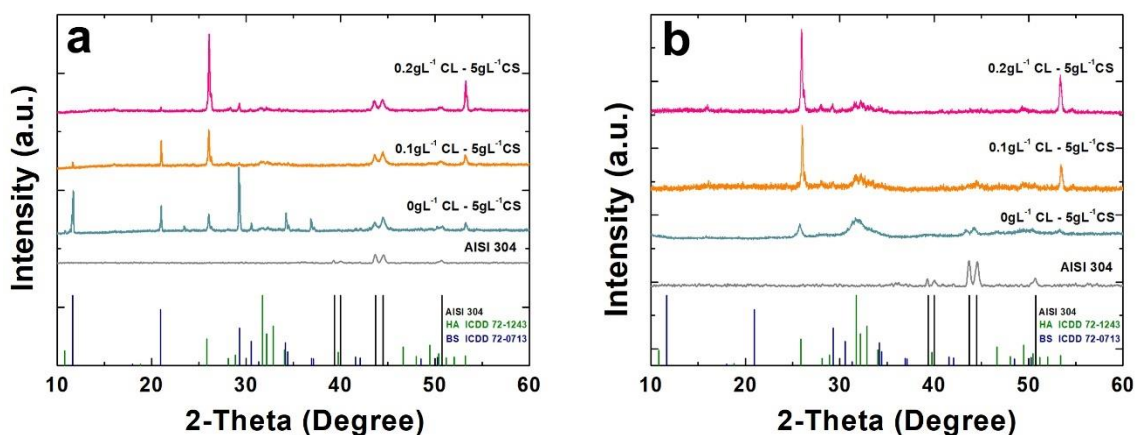


Fig. 9.5 Diffrattogrammi dei *coating* di fosfati di calcio, chitosano e collagene: a) pre *aging* b) post *aging*

Lo studio degli spettri RAMAN ha permesso di individuare la matrice polimerica all'interno della struttura del *coating*. In una fase preliminare sono stati studiati i *coating* costituiti da fosfati di calcio e chitosano. In linea con i risultati dell'XRD, in fig. 9.6a sono presenti le fasi di brushite e idrossiapatite in accordo a quanto presente in letteratura²²⁸. Per un miglior confronto in fig. 9.6a sono stati riportati anche gli spettri RAMAN di un

²²⁸ Per l'identificazione dei modi vibrazionali è stato utilizzato come riferimento: Ruff Database. R.T. Downs, M. Hall-Wallace, The American Mineralogist Crystal Structure Database. Cfr. G. Penel, N. Leroy, P. Van Landuyt, B. Flautre, P. Hardouin, J. Lemaitre, G. Leroy (1999). *Raman microspectrometry studies of brushite cement: in vivo evolution in a sheep model in Bone*, 25(2), 81S-84S. S. Koutsopoulos (2002). *Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods in Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 62(4), 600-612. Cfr. G. R. Sauer, W. B. Zunic, J. R. Durig, R. E. Wuthier (1994). *Fourier transform Raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates in Calcified tissue international*, 54(5), 414-420.

coating di solo fosfati di calcio (in assenza di polimero) e l'altro di solo chitosano puro. Come è possibile notare, in assenza di polimero non è presente l'interferenza dovuta alla fluorescenza, comportamento tipico attribuibile ai polimeri²²⁹. I segnali relativi al chitosano possono essere rintracciati nel range tra 1000 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} e sono dovuti allo stretching dei gruppi $-\text{CH}_2-$ del polimero²³⁰. Dopo 21 giorni di *aging* in SBF, è stato notato il tipico segnale dell'idrossiapatite a 960 cm^{-1} come unica fase cristallina, in accordo ai diffrattogrammi precedentemente mostrati. Si è rilevata anche in questo caso la tipica interferenza da fluorescenza, dovuta alla matrice polimerica del coating.

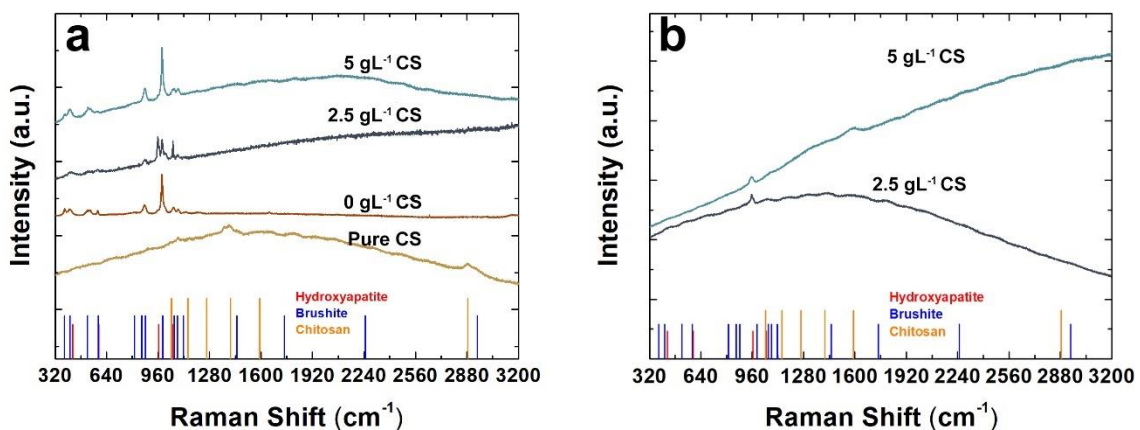


Fig. 9.6 Spettri RAMAN dei campioni di fosfati di calcio e chitosano: a) pre *aging* b) post *aging*

Successivamente sono stati studiati gli spettri RAMAN sui depositi costituiti da fosfati di calcio, chitosano e collagene mostrati in fig. 9.7. I campioni osservati hanno un andamento pressoché simile ai campioni in assenza di collagene. Per il campione realizzato a 0.1 gL^{-1} di collagene sono presenti gli stessi modi vibrazionali relativi alla brushite e all'idrossiapatite. Per quello ottenuto con una maggiore concentrazione di collagene, è stata notata l'assenza dei picchi relativi alla fase brushite, in accordo ai risultati ottenuti tramite XRD mentre è stato rilevato un picco a 960 cm^{-1} relativo all'idrossiapatite, ma

²²⁹ Cfr. F. J. Purcell, J. M. Bello (1990, November). *Fluorescence-free Raman spectra of polymers in Raman and Luminescence Spectroscopies in Technology II* (Vol. 1336, pp. 135-143). International Society for Optics and Photonics.

²³⁰ Cfr. A. Zając, J. Hanuza, M. Wandas, L. Dymińska (2015). *Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy in Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114-120. Cfr. G. Socrates (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and chart*, John Wiley & Sons. Cfr. D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W. G. Fateley, J. G. Grasselli (1991). *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. Elsevier.

anche segnali per 433cm^{-1} del *bending* (ν_2) del legame (O-P-O) del gruppo fosfato. La presenza del collagene è stata confermata dai modi RAMAN a 1289 cm^{-1} per l'Amide III, a 1349 cm^{-1} relativi alla deformazione (δCH), 1447 cm^{-1} e 2933 cm^{-1} sono relativi alle deformazioni rispettivamente di $-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}_3$ ²³¹.

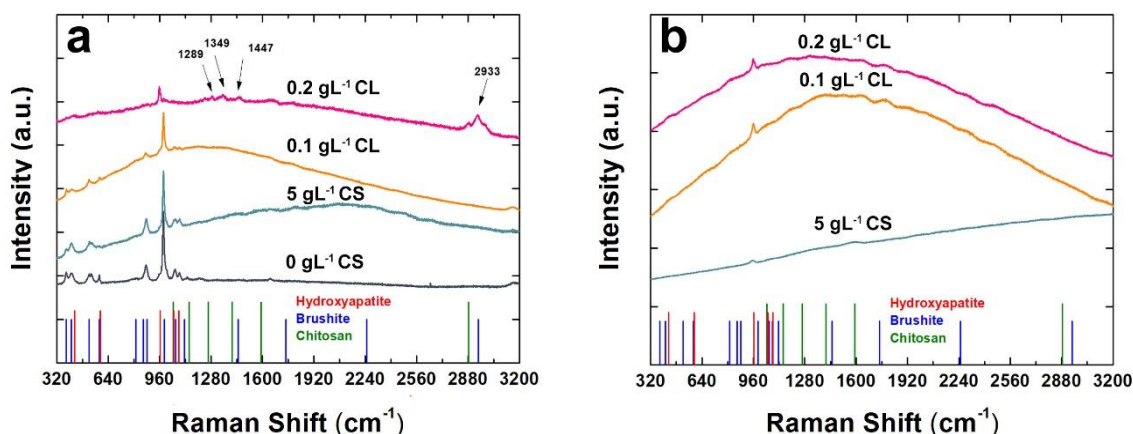


Fig. 9.7 Spettri RAMAN dei campioni di fosfati di calcio, chitosano e collagene:

a) pre aging b) post aging

Come già notato in fig. 9.6b, i campioni mostrano lo stesso comportamento: emerge soltanto il picco a 960 cm^{-1} dell'idrossiapatite ma anche l'interferenza da fluorescenza dovuta alla matrice polimerica. Non sono presenti segnali relativi al collagene. Probabilmente il fenomeno può essere attribuito alla mineralizzazione del collagene durante l'*aging* in SBF che è stimolata dalla presenza di cristalli di fosfati di calcio²³².

Per avere un'ulteriore conferma della presenza della matrice polimerica all'interno del rivestimento è stata eseguita un'analisi FT-IR/ATR. In fig. 9.8 sono mostrati gli spettri realizzati sui campioni. Per un miglior confronto, è stato riportato anche lo spettro relativo al rivestimento costituito da solo fosfato di calcio realizzato per via galvanica.

²³¹ Cfr. C. Gullekson, L. Lucas, K. Hewitt, L. Kreplak (2011). *Surface-sensitive Raman spectroscopy of collagen I fibrils in Biophysical journal*, 100(7), 1837-1845. Cfr. J. J. Cárcamo, A. E. Aliaga, R. E. Clavijo, M. R. Brañes, M. M. Campos-Vallette (2012). *Raman study of the shockwave effect on collagens in Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 86, 360-365.

²³² Cfr. F. Z. Cui, Y. Li, J. Ge (2007). *Self-assembly of mineralized collagen composites in Materials Science and Engineering: R: Reports*, 57(1-6), 1-27. Cfr. Y. Liu, D. Luo, S. Liu, Y. Fu, X. Kou, X. Wang, ... Y. Zhou (2014). *Effect of nanostructure of mineralized collagen scaffolds on their physical properties and osteogenic potential in Journal of biomedical nanotechnology*, 10(6), 1049-1060. Cfr. C. Du, F. Z. Cui, W. Zhang, Q. L. Feng, X. D. Zhu, K. De Groot (2000). *Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix in Journal of biomedical materials research*, 50(4), 518-527.

Per quanto riguarda il chitosano, sono stati rilevati picchi relativi nel *range* 1600-1200 cm^{-1} : un segnale a 1550 cm^{-1} è relativo al *bending* $\delta(\text{NH}_2)$, a 1377 cm^{-1} *bending* $\delta(\text{CH}_2)$ e 1320 cm^{-1} *stretching* $\nu(\text{CN})$ combinato al *bending in-plane* $\delta(\text{CH})$. La tipica banda larga relativa all'assorbimento dello *stretching* -OH del gruppo ossidrilico è visibile nel range 3600-3000 cm^{-1} nei campioni in cui è presente la matrice polimerica. Invece, segnali di assorbimento relativi alla presenza del collagene sono stati rilevati allo *stretching* $\nu(\text{C-O-C})$ a 1076 cm^{-1} e al *bending* $\delta(\text{N-H})$ a 1190 cm^{-1} . Per quanto riguarda la parte inorganica del rivestimento, si nota in tutti i campioni un picco di assorbimento definito per 1648 cm^{-1} relativo al *bending* del legame H-O-H. È interessante osservare come la fase di idrossiapatite sia presente nei compositi confermato dal picco molto intenso a 1040 cm^{-1} appartenente allo *stretching* asimmetrico del gruppo fosfato. In accordo ai risultati ottenuti tramite XRD, in entrambi i *coating* sono presenti sia la fase brushite che idrossiapatite tipico appunto della deposizione per accoppiamento galvanico²³³.

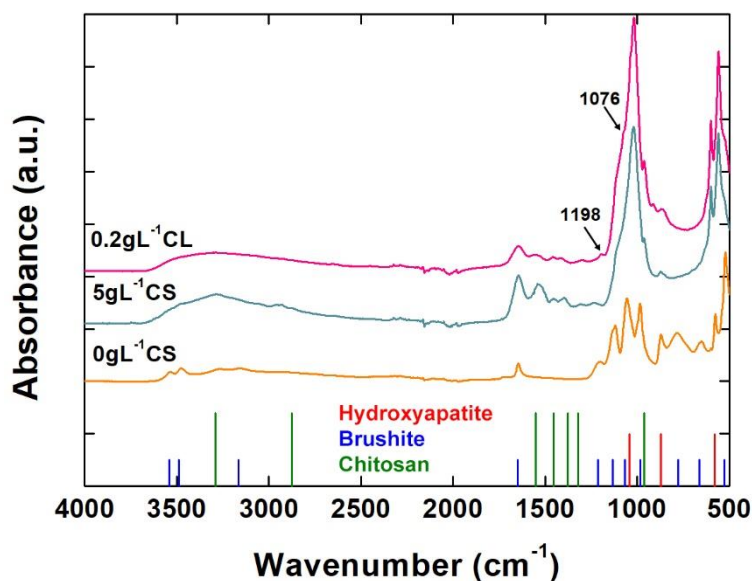


Fig. 9.8 Spettri FT-IR/ATR

²³³ Cfr. A. Zajac, J. Hanuza, M. Wandas, L. Dymińska (2015). *Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy* in *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114-120. Cfr. K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou, C. Petibois (2009). *Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy* in *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(3), 829-837. Cfr. H. Gheisari, E. Karamian, M. Abdellahi (2015). *A novel hydroxyapatite–Hardystonite nanocomposite ceramic* in *Ceramics International*, 41(4), 5967-5975. Cfr. M. P. Binitha, P. P. Pradyumnan (2013). *Dielectric property studies of biologically compatible brushite single crystals used as bone graft substitute*.

Le *performance* di resistenza alla corrosione dei *coating* realizzati sono state valutate tramite le caratterizzazioni elettrochimiche ed anche per questi depositi compositi è stata notata una continua evoluzione del *coating* in base all'equilibrio che si instaura tra brushite e idrossiapatite, che porta alla parziale solubilizzazione e rideposizione del *coating* (par. 6.3).

Dal monitoraggio del potenziale di circuito aperto (OCP) mostrato in fig. 9.9, si osserva in tutti i campioni studiati un valore di OCP più alto fin dal primo giorno rispetto all'acciaio nudo, e ciò è dovuto all'effetto barriera garantito dalla presenza del *coating*. Durante i 30 minuti di osservazione il valore è rimasto pressoché costante, indice di un rivestimento stabile. Infatti, un brusco cambiamento di OCP è conseguenza di danni ai rivestimenti. Dunque, sebbene dalle immagini SEM siano emerse morfologie irregolari e porose, questo fattore non inficia le capacità protettive del rivestimento nei riguardi del substrato.

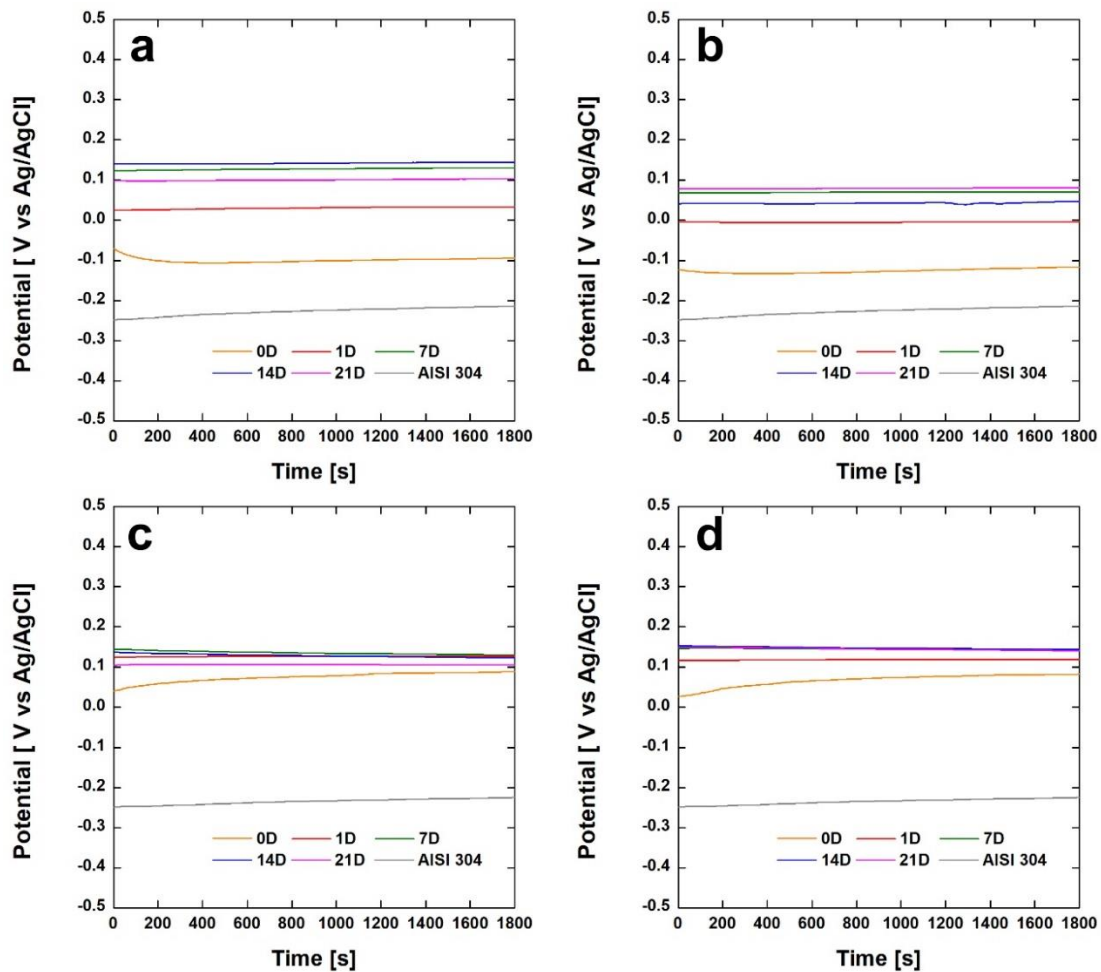


Fig. 9.9 Monitoraggio del potenziale di circuito aperto: a) CaP/CS 2.5 gL^{-1} b) CaP/CS 5 gL^{-1}
 c) CaP/CS 5 gL^{-1} /CL 0.1 gL^{-1} d) CaP/CS 5 gL^{-1} /CL 0.2 gL^{-1}

Questo comportamento è stato confermato anche dallo studio delle curve di polarizzazione, in cui si nota un potenziale di corrosione (E_{corr}) più alto rispetto all'acciaio privo di rivestimento, confermato dai valori del potenziale di corrosione (E_{corr}) riportati in tab. 9.2. Dai primi giorni di *aging* è possibile constatare un aumento della nobiltà rispetto all'acciaio non rivestito (fig. 9.10).

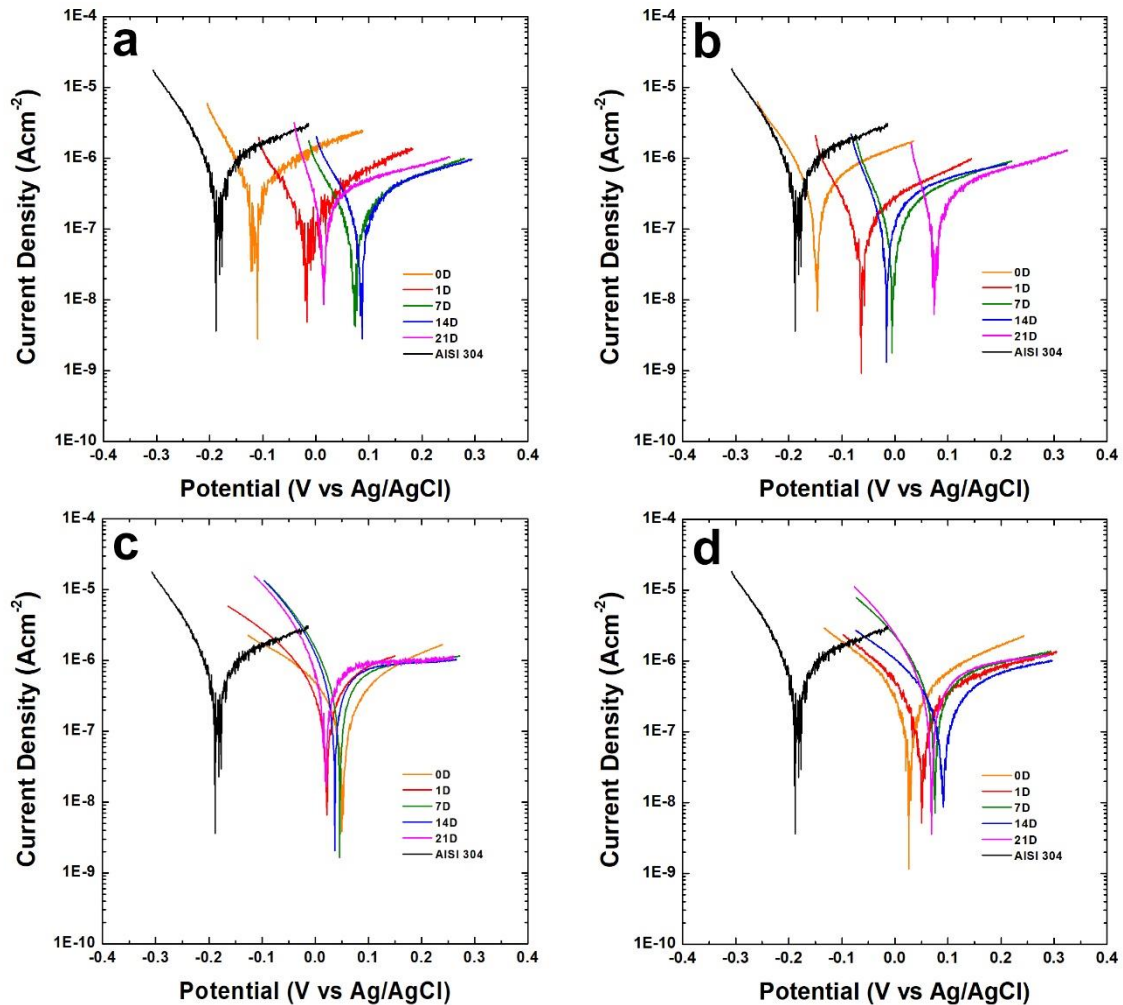


Fig. 9.10 Curve di polarizzazione: a) CaP/CS2.5 gL⁻¹ b) CaP/CS 5 gL⁻¹
 c) CaP/CS 5 gL⁻¹/CL 0.1 gL⁻¹ d) CaP/CS 5 gL⁻¹/CL 0.2 gL⁻¹

Dapprima sono stati studiati i composti di fosfati di calcio e chitosano variando la concentrazione di chitosano. Entrambi i rivestimenti hanno mostrato un comportamento simile durante i 21 giorni di *aging* in SBF. Il composto realizzato a 2.5 gL⁻¹ di chitosano mostra un aumento del potenziale di corrosione fino al quattordicesimo giorno fino a 0.083 V per poi scendere al ventunesimo a 0.014 V. Questo stesso comportamento

è stato constatato nei *coating* a base di fosfati di calcio realizzati con deposizione galvanica ed è dovuto all'inizio di un nuovo ciclo di dissoluzione-precipitazione del rivestimento²³⁴. Invece, con l'aumento della concentrazione del chitosano in soluzione (5 gL⁻¹) durante la deposizione galvanica è stato rilevato un aumento del potenziale al termine del ventunesimo giorno di circa 200 mV rispetto al giorno zero. Per quanto riguarda la densità di corrente di corrosione (i_{corr}), vi è una diminuzione dei valori durante le 3 settimane di *aging* (tab. 9.2). Le fluttuazioni nel valore della i_{corr} sono una ulteriore conferma della continua evoluzione in SBF del *coating*. La conseguenza di questo processo dinamico è anche la variazione dello spessore del rivestimento che porta ad una diversa resistenza alla corrosione durante l'*aging* in SBF.

Tab. 9.2 Parametri di corrosione valutati a diversi tempi di giorni di *aging* per i campioni ottenuti: potenziale di corrosione (E_{corr}) e densità di corrente di corrosione (i_{corr})

	Time					AISI 304
	0	1	7	14	21	
CaP/CS2.5 gL⁻¹						
E_{corr} [V]	-0.123	-0.321	0.204	0.083	0.014	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	5.45E-07	2.95E-07	3.24E-07	2.85E-07	2.25E-07	8.92E-07
CaP/CS 5 gL⁻¹						
E_{corr} [V]	-0.147	-0.067	-0.024	-0.038	0.068	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	4.86E-07	2.35E-07	2.13E-07	2.09E-07	2.12E-07	8.92E-07
CaP/CS 5 gL⁻¹/CL 0.1 gL⁻¹						
E_{corr} [V]	0.045	0.026	0.051	0.034	0.028	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	3.45E-07	3.75E-07	4.01E-07	3.92E-07	3.79E-07	8.92E-07
CaP/CS 5 gL⁻¹/CL 0.2 gL⁻¹						
E_{corr} [V]	0.024	0.043	0.0848	0.092	0.071	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	2.75E-07	2.12E-07	2.45E-07	2.15E-07	2.01E-07	8.92E-07

Successivamente si è passati alle caratterizzazioni elettrochimiche dei rivestimenti con il collagene in composito. Il monitoraggio dell'OCP segue un andamento simile ai campioni privi di collagene discussi prima. Un aspetto particolare da porre in evidenza è la posizione delle curve verso potenziali più nobili rispetto all'acciaio nudo e soprattutto per valori di potenziali positivi. Le curve di polarizzazione hanno mostrato il medesimo andamento. Sicuramente fin dal giorno zero i valori di E_{corr} si mantengono positivi e sempre al di sopra dell'acciaio nudo, mentre le curve di polarizzazione si spostano all'interno dell'intervallo tra 0-100 mV. In accordo con gli studi in letteratura si osserva una

²³⁴ Cfr. G. Blanda (2018). *In Vitro Corrosion and Biocompatibility ...*

diminuzione di E_{corr} al ventunesimo giorno allo stesso modo del campione ottenuto a 2.5 gL^{-1} di chitosano²³⁵. Anche qui i valori di i_{corr} presentano fluttuazioni durante l'*aging* dovute all'equilibrio tra brushite/idrossiapatite. In relazione ai campioni ottenuti per sola deposizione di idrossiapatite già visti in par. 8.3, la presenza della matrice polimerica incrementa la resistenza alla corrosione.

La spettroscopia d'impedenza è stata realizzata sui campioni di fosfati di calcio e chitosano e sui campioni in cui è presente il collagene. Le misure sono state riportate in figg. 9.11 e 9.12 e fanno alle prove eseguite al giorno 0, 7 e 21 di *aging*. I parametri di fitting sono riportati in tabb. 9.3 e 9.4.

Tab. 9.3 Parametri di fitting delle misure di impedenza del *coating* su acciaio AISI304 realizzato con 5gL^{-1} di chitosano. La deviazione standard media è del 3.7%.

	Tempo (Giorni)					AISI 304
	0	1	7	14	21	
	R(QR)(Q(R(QR)))					R(QR)
R_s	13.97	35	21.32	10	12	36.82
CPE _{1-Y}	5.45E-06	2.07E-05	2.34E-06	3.72E-06	1.87E-06	-
CPE _{1-n}	0.4907	0.514	0.5594	0.5178	0.5508	-
R_1	1775	1663	3646	2793	3745	-
CPE _{2-Y}	2.81E-05	5.89E-06	1.11E-05	1.74E-05	1.08E-05	-
CPE _{2-n}	0.7251	0.7278	0.8242	0.6598	0.8304	-
R_2	3.61E+04	1.44E+04	1.97E+04	4.70E+04	1.38E+04	-
CPE _{3-Y}	4.16E-05	5.80E-05	5.04E-05	3.88E-05	4.64E-05	3.60E-05
CPE _{3-n}	0.7949	0.8816	0.7027	0.7394	0.7383	0.8046
R_3	1.48E+06	7.84E+05	4.46E+05	1.44E+05	2.98E+05	5.07E+05

Tab. 9.4 Parametri di fitting delle misure di impedenza del *coating* su acciaio AISI304 realizzato con 5gL^{-1} di chitosano e 0.2gL^{-1} . La deviazione standard media è del 5.1%.

	Tempo (Giorni)					AISI 304
	0	1	7	14	21	
	R(QR)(Q(R(QR)))					R(QR)
R_s	52	47.3	23	17	13	36.82
CPE _{1-Y}	7.24E-05	9.36E-05	7.61E-06	3.50E-06	5.67E-06	-
CPE _{1-n}	0.9193	0.975	0.4906	0.524	0.5064	-
R_1	190	1010	1166	2738	2046	-
CPE _{2-Y}	2.77E-05	1.22E-05	5.12E-05	1.76E-05	2.59E-05	-
CPE _{2-n}	0.644	0.5325	0.526	0.6553	0.6061	-
R_2	6.39E+04	1.80E+05	2.65E+04	4.71E+04	3.25E+04	-
CPE _{3-Y}	4.89E-06	4.96E-05	3.88E-05	3.92E-05	4.12E-05	3.60E-05
CPE _{3-n}	0.5157	0.7521	0.8224	0.6799	0.7055	0.8046
R_3	1.12E+04	3.50E+04	1.00E+06	2.62E+05	3.46E+05	5.07E+05

²³⁵

Cfr. *ibid.*

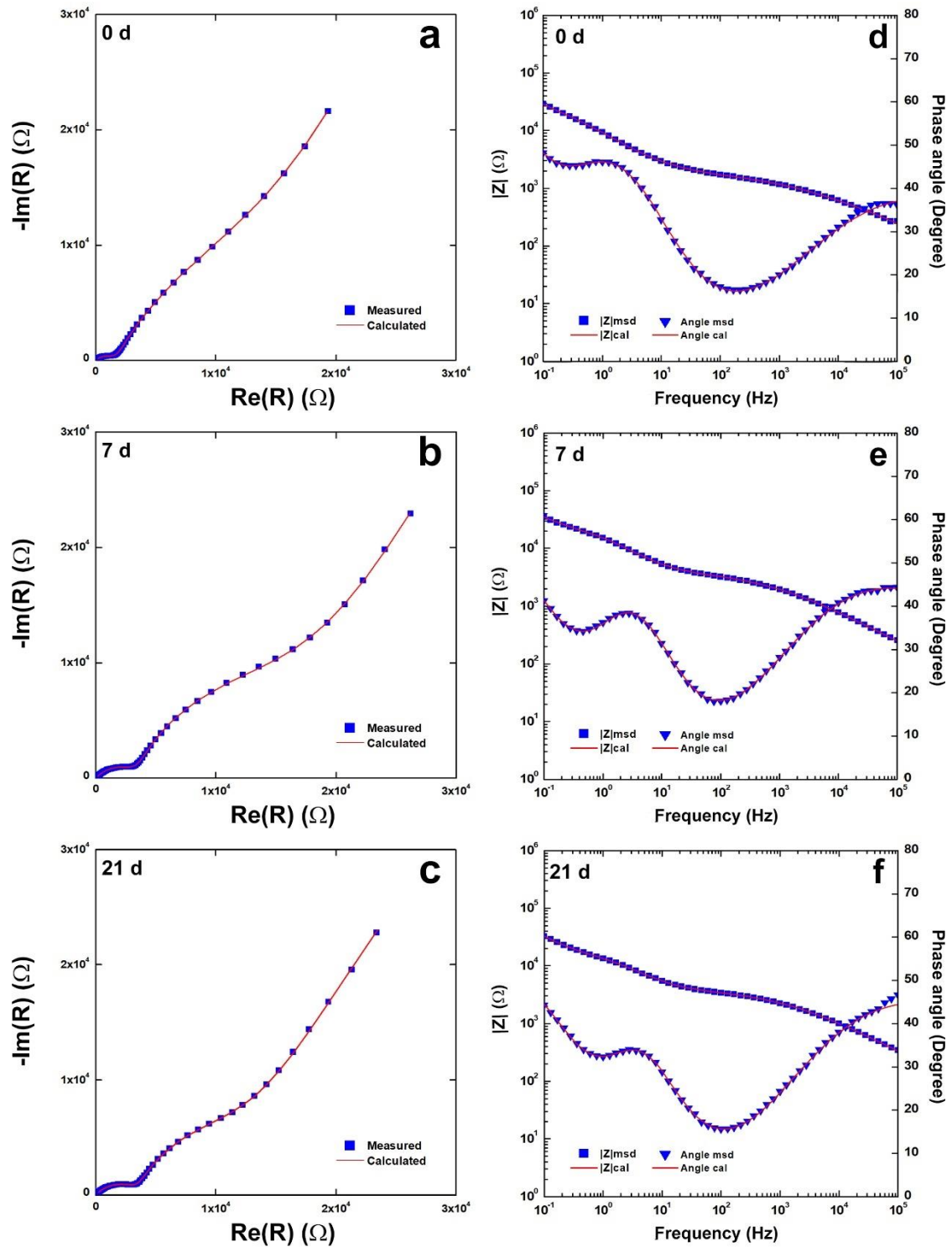


Fig. 9.11 Diagrammi di Nyquist e Bode su un campione di fosfati di calcio e chitosano

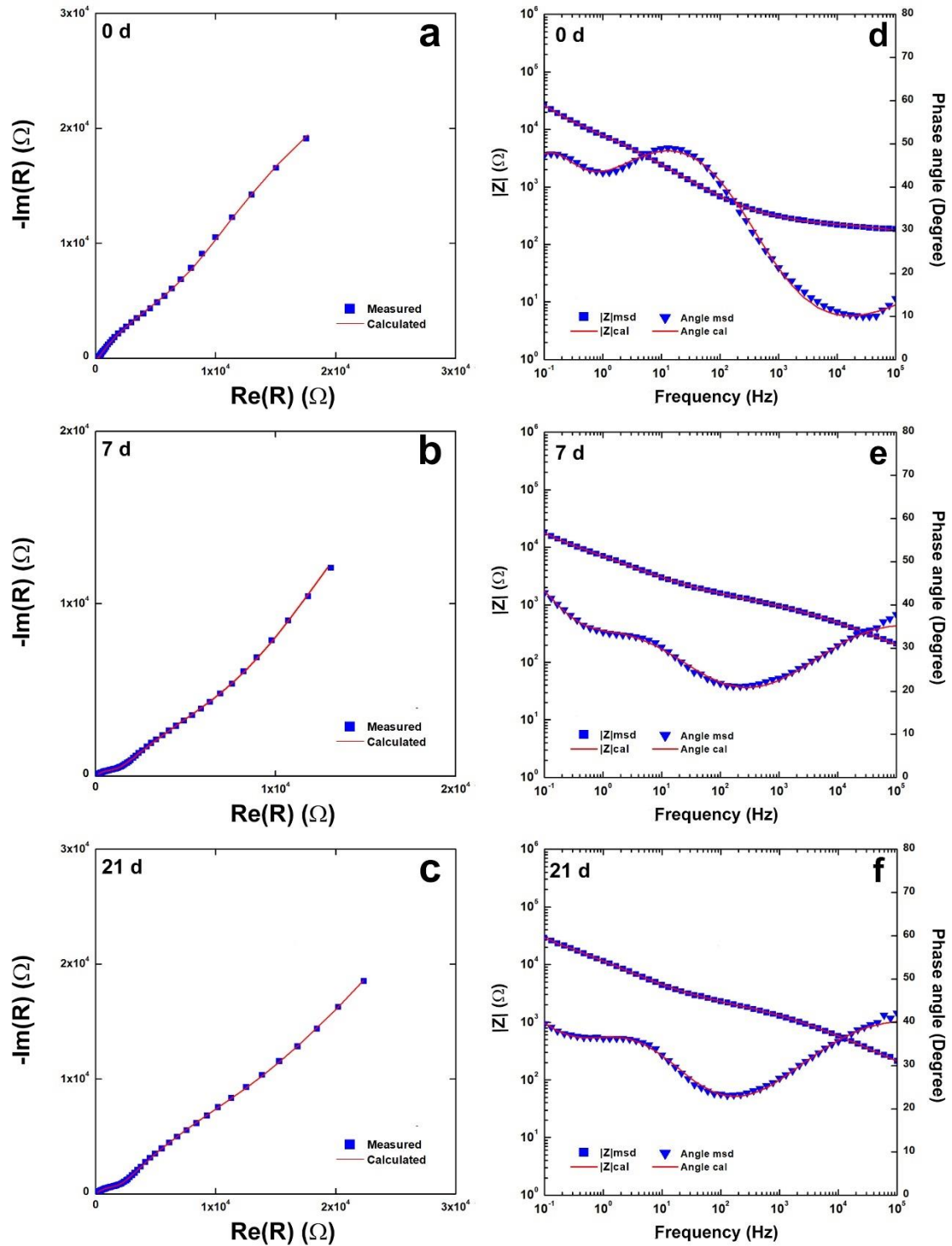


Fig. 9.12 Diagrammi di Nyquist e Bode su un campione di fosfati di calcio, chitosano e collagene

Il miglior *fitting* è stato ottenuto prendendo in riferimento il circuito equivalente proposto da Orazem e Tribollet²³⁶. In particolare, il circuito equivalente che è stato utilizzato per modellare il rivestimento è $R_s(CPE_1R_1)(CPE_2(R_2(CPE_3R_3)))$, si aggiunge in serie un'impedenza al modello di Jüttner, già utilizzato nei capitoli precedenti. Questa rappresentazione può andare bene per i sistemi con uno strato esterno più spesso di quello più interno, caratterizzato da pochi pori che creano resistenze al trasporto di massa ai fenomeni diffusivi. In base alle immagini SEM, questa ipotesi può essere plausibile, dal momento che l'interno dei macropori circolari vi è un rivestimento a contatto con il substrato più sottile. Per quanto riguarda l'acciaio nudo, è stato utilizzato un circuito più semplice $R_s(CPE_3R_3)$ che tiene conto della capacità di doppio strato elettrico e della resistenze della soluzione e al trasporto di carica. I circuiti equivalenti utilizzati hanno permesso di ottenere *fitting* con un valore di χ^2 dell'ordine di 10^{-4} e l'errore relativo di ogni parametro è inferiore al 10%. Si nota che durante l'*aging* i valori variano, e ciò – come abbiamo sottolineato più volte – è dovuto alla continua evoluzione del *coating*. I valori mostrano un aumento della resistenza all'interno dei pori, dovuto a fenomeni diffusivi. Complessivamente si ha un aumento dell'impedenza globale durante le 3 settimane di osservazione dello stesso ordine di grandezza dell'acciaio nudo per i campioni rivestiti.

La quantificazione degli ioni metallici rilasciati in soluzione dopo 21 giorni di *aging* in SBF è stata effettuata tramite ICP-OES. La concentrazione di ioni metallici misurata è molto bassa, ben al di sotto dei valori limiti di soglia pericolosi per la salute dell'uomo (tab. 9.5)²³⁷. In aggiunta si può notare come gli ioni calcio e fosforo presentino una variazione dovuta all'interazione con i campioni rivestiti, come già mostrato nei precedenti capitoli.

²³⁶ Cfr. M. E. Orazem, B. Tribollet (2008). *Electrochemical impedance spectroscopy*. New Jersey, 383-389. Cfr. M. Bockelmann, M. Becker, L. Reining, U. Kunz, T. Turek (2018). *Passivation of zinc anodes in alkaline electrolyte: Part i. determination of the starting point of passive film formation in Journal of The Electrochemical Society*, 165(13), A3048.

²³⁷ Cfr. F. P. Paloucek (2007). *Poisoning and toxicology handbook*. CRC Press.

Tab. 9.5 Concentrazione degli ioni in SBF dopo 21 giorni di *aging*. I valori sono stati riportati in ppm. La deviazione standard media è 0.6%

	Fe	Cr	Ni	Ca	P
SBF (mis.)	0	0	0	103.75	31.74
SBF (calc.)	0	0	0	105	31
AISI 304	0.037	0	0	82.22	25.44
CaP-5gL ⁻¹ CS	0.001	0	0	2	110
CaP-5gL ⁻¹ CS-0.2gL ⁻¹ CL	0.001	0	0	4	117

La citotossicità del rivestimento composito di fosfati di calcio e chitosano è stata testata *in vitro* utilizzando cellule preosteoblastiche secondo la norma ISO-10993-5. Le colture cellulari sono state eseguite utilizzando terreni incubati per 24 ore con i diversi campioni a un rapporto volume/superficie stabilito. La vitalità cellulare è stata valutata per un periodo di sette giorni di coltura e i risultati sono stati riportati in fig. 9.13.

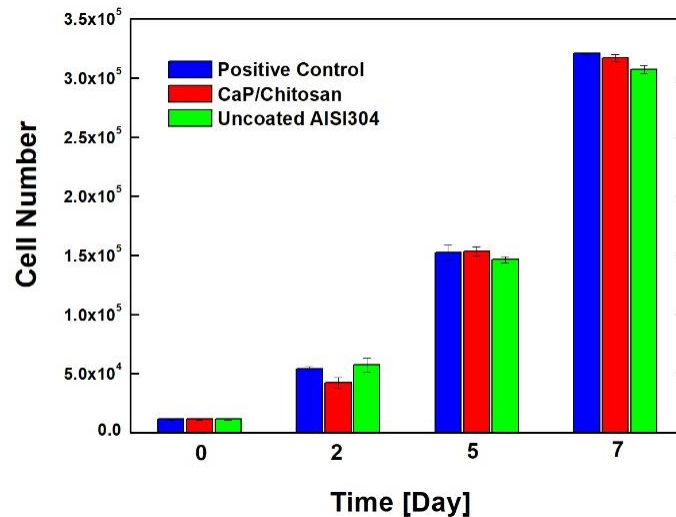


Fig. 9.13 Vitalità delle cellule MC3T3-E1 misurata con assorbanza a 450 nm usando CCK-8 kit a 0,2,5 e 7 giorni di coltura. Sono messi a confronto acciaio nudo e acciaio rivestito con CaP/CS

Come già mostrato nei capitoli precedenti, non si assiste a una particolare differenza di crescita al secondo giorno di coltura. Tuttavia, già dal quinto giorno il numero di cellule è superiore per il controllo positivo e il substrato rivestito rispetto all'acciaio nudo. Lo stesso *trend* è stato registrato anche al termine del settimo giorno di coltura. Dall'analisi dei dati, si evince che in tutti i tempi presi in considerazione, il numero di cellule cresciute con terreni trattati risulta essere sempre uguale a quello delle cellule cresciute nel terreno di controllo. Si può pertanto affermare che il *coating* di fosfati di calcio e

chitosano realizzato per deposizione galvanica non risulta citotossico. Questo risultato è stato ritrovato in letteratura per *coating* composti di chitosano e idrossiapatite realizzati con metodi diversi²³⁸. È stato valutato infine l'effetto dell'aggiunta del collagene all'interno del composito per valutare la risposta citotossica. In fig. 9.14 è riportata la *viability* dei preosteoblasti e globalmente non sono state rilevate particolari differenze. Dunque anche in questo caso, la presenza della proteina all'interno del composito non inibisce la crescita cellulare fisiologica.

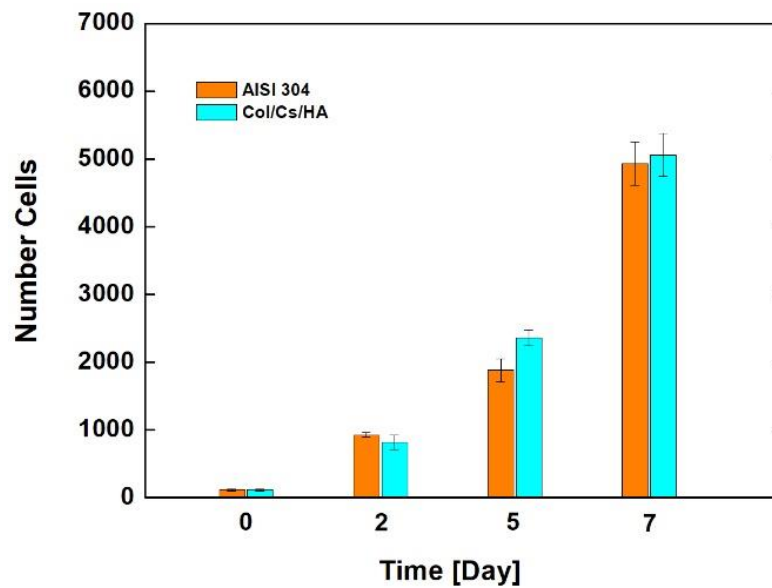


Fig. 9.14 Vitalità delle cellule MC3T3-E1 misurata con assorbanza a 450 nm usando CCK-8 kit a 0, 2, 5 e 7 giorni di coltura. Sono messi a confronto acciaio nudo e acciaio rivestito con CaP/CS

²³⁸ Cfr. Zhang, T., Zhang, X., Mao, M., Li, J., Wei, T., & Sun, H. (2020). *Chitosan/hydroxyapatite composite coatings on porous Ti6Al4V titanium implants: in vitro and in vivo studies in Journal of Periodontal & Implant Science*, 50(6), 392. Cfr. Li, B., Xia, X., Guo, M., Jiang, Y., Li, Y., Zhang, Z., ... & Wang, H. (2019). *Biological and antibacterial properties of the micro-nanostructured hydroxyapatite/chitosan coating on titanium in Scientific reports*, 9(1), 1-10.

Capitolo 10 – *Coating* compositi di chitosano e nanoparticelle di argento su acciaio AISI 304L

In questo capitolo tratteremo lo studio di *coating* che oltre ad avere le proprietà sopra citate hanno anche una funzione antibatterica. A tal fine sono stati realizzati compositi a base di chitosano e nanoparticelle di argento attraverso il metodo di deposizione galvanica su acciaio AISI 304L²³⁹.

10.1 *Coating* ad azione antibatterica

L'insorgenza di infezioni dei tessuti periprotetici è tra le complicanze più diffuse in chirurgia traumatologica e ortopedica. A causa di esse il paziente va incontro a terapie antibiotiche prolungate nel tempo, e talora è costretto a sottoporsi a trattamenti chirurgici multipli che potrebbero portare ad una resistenza batterica. Secondo alcuni dati, le infezioni articolari periprotetiche hanno un'incidenza tra l'1.3%, e il 22% dei pazienti sono sottoposti ad una seconda operazione per complicanze dovute ad infezioni. L'aumento del numero dei ricoveri ospedalieri è la principale causa di un aumento (fino a 7 volte) dei costi di ospedalizzazione di un paziente non infetto. Prevenire la colonizzazione batterica delle superfici biomediche è la chiave per limitare la diffusione delle infezioni²⁴⁰. I rivestimenti antibatterici sono diventati un campo di ricerca molto frequentato, fortemente stimolato dalla crescente urgenza di individuare alternative alla somministrazione tradizionale di antibiotici.

Oltre alle innumerevoli prestazioni e applicazioni tecnologiche (par. 4.2), il chitosano è stato oggetto di studio per le sue particolari proprietà antibatteriche nei confronti di funghi, Gram-positivi, Gram-negativi e lieviti²⁴¹. Il meccanismo dell'azione

²³⁹ La scelta del substrato è stata già posta a disamina nell'introduzione del cap. 8 e dunque la motivazione è del tutto analoga.

²⁴⁰ Cfr. D. De Meo, G. Ceccarelli, G. Iaiani, F. Lo Torto, D. Ribuffo, P. Persiani, C. Villani (2021). *Clinical Application of Antibacterial Hydrogel and Coating in Orthopaedic and Traumatology Surgery in Gels*, 7(3), 126. Cfr. C. Kenney, S. Dick, J. Lea, J. Liu, N. A. Ebraheim (2019). *A systematic review of the causes of failure of Revision Total Hip Arthroplast* in *Journal of orthopaedics*, 16(5), 393-395. Cfr. M. Khatod, G. Cafri, M. C. Inacio, A. L. Schepps, E. W. Paxton, S. A. Bini (2015). *Revision total hip arthroplasty: factors associated with re-revision surgery* in *JBJS*, 97(5), 359-366.

²⁴¹ Cfr. V. E. Tikhonov, E. A. Stepnova, V. G. Babak, I. A. Yamskov, J. Palma-Guerrero, H. B. Jansson, V. P. Varlamov (2006). *Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and*

antibatterica non è ancora ben chiaro e in base alla letteratura sono tre le principali cause di inibizione della crescita microbica:

- la permeabilità dello strato cellulare esterno da parte dei gruppi amminici (fig. 10.1a), caricati positivamente, che causano la rottura e il rilascio dei componenti intracellulari;
- l'inibizione dell'attività enzimatica attraverso la chelazione di metalli (fig. 10.1b);
- la complessazione citoplasmatica del DNA/mRNA che causa l'inibizione della sintesi proteica (fig. 10.1c).

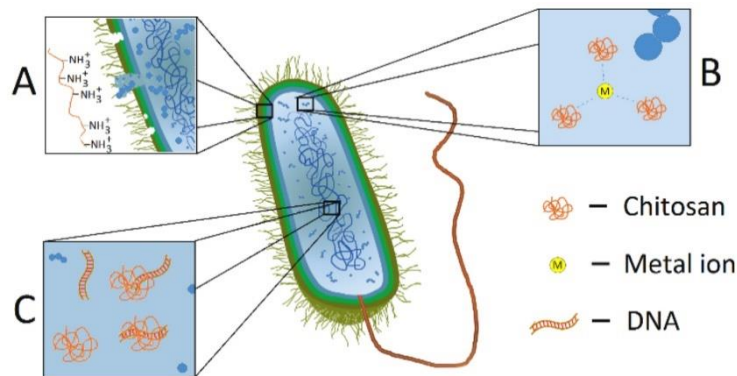
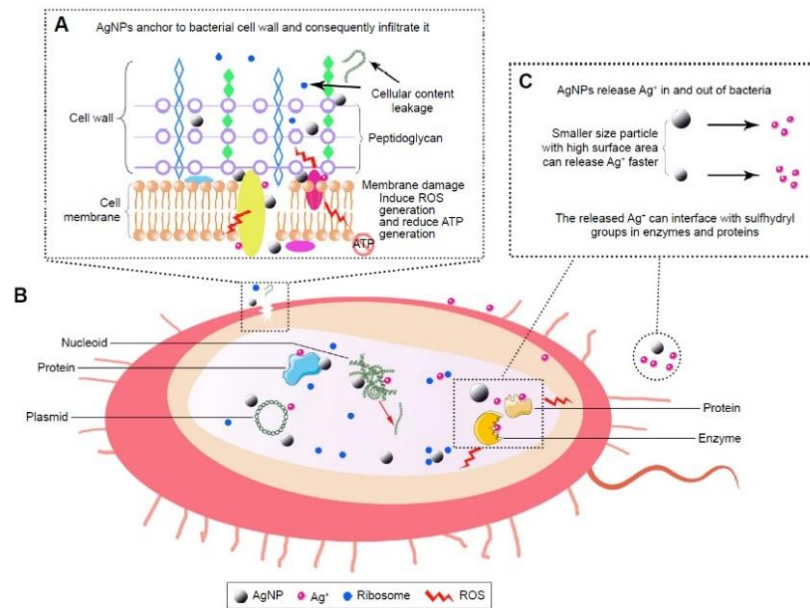


Fig. 10.1 Principali cause di inibizione della crescita microbica²⁴²

Anche le nanoparticelle di argento risultano essere una valida soluzione per migliorare le proprietà antibatteriche di un *coating*. Sono stati condotti diversi studi sulla loro efficacia in *coating* compositi che conferiscono al rivestimento un carattere battericida. In particolare, le nanoparticelle d'argento sono in grado di interagire fisicamente con la superficie cellulare di vari batteri (fig. 10.2). L'interazione cambia a seconda della forma e dimensioni delle nanoparticelle, ed è stato notato che nanoparticelle più piccole hanno una maggiore capacità di penetrare la membrana cellulare.

its N-2 (3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives in Carbohydrate polymers, 64(1), 66-72. Cfr. M. Kong, X. G. Chen, K. Xing, H. J. Park (2010). *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review in International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63. Cfr. F. Devlieghere, A. Vermeulen, J. Debevere (2004). *Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables in Food microbiology*, 21(6), 703-714.

²⁴² J. M. Vaz, D. Pezzoli, P. Chevallier, C. S. Campelo, G. Candiani, D. Mantovani (2018). *Antibacterial coatings based on chitosan for pharmaceutical and biomedical applications in Current pharmaceutical design*, 24(8), 866-885.


 Fig. 10.2 Meccanismo antibatterico delle AgNPs²⁴³

È stato anche dimostrato che l'effetto antibatterico delle nanoparticelle d'argento è più efficace sui batteri Gram-negativi che sui Gram-positivi. Esse infatti tendono ad aderire più facilmente alla loro membrana cellulare con la conseguenza di una migliore introduzione al loro interno. Una volta entrate all'interno del citoplasma, modificano la struttura intracellulare. I ribosomi possono essere denaturati con la conseguente inibizione della sintesi di proteine²⁴⁴.

Un altro meccanismo battericida delle nanoparticelle di argento consiste nella capacità di produrre elevati livelli di ROS e radicali liberi che non riescono ad essere espulsi, poiché le nanoparticelle intervengono anche sul sistema di deidrogenasi respiratoria. Inoltre, grazie alle loro dimensioni nanoscopiche, le nanoparticelle possono rilasciare sia

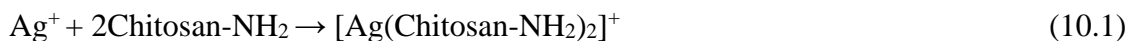
²⁴³ L. C. Yun'an Qing, R. Li, G. Liu, Y. Zhang, X. Tang, J. Wang, ... Y. Qin (2018). *Potential anti-bacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies in International journal of nanomedicine*, 13, 3311.

²⁴⁴ Cfr. A. Abbaszadegan, Y. Ghahramani, A. Gholami, B. Hemmateenejad, S. Dorostkar, M. Nabavizadeh, H. Sharghi (2015). *The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study in Journal of Nanomaterials*, 2015. Cfr. S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash (2007). *Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles in Nanotechnology*, 18(22), 225103. Cfr. M. Singh, S. Singh, S. Prasad, I. S. Gambhir (2008). *Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles in Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(3), 115-122.

all'interno che all'esterno ioni Ag^+ che risultano citotossici per i batteri, poiché interagiscono con le proteine e gli enzimi creando dei legami molto stabili²⁴⁵.

10.2 Procedure sperimentali

Prima della deposizione del rivestimento, l'acciaio AISI 304L e l'anodo di zinco sono stati sottoposti a trattamenti di pulizia secondo la procedura descritta in par. 5.2. La soluzione catodica è stata preparata attraverso vari step, in modo da consentire la formazione del complesso tra chitosano e ioni argento. In 100 mL di acqua Milli-Q a 70° C, è stato aggiunto 1 mL di acido acetico puro per favorire la solubilizzazione del chitosano (7.5 gL^{-1} e 10 gL^{-1}) attraverso la protonazione dei gruppi amminici. La presenza del chitosano funge sia da agente riducente, per trasformare gli ioni argento in argento metallico, sia come agente stabilizzante per permettere alle nanoparticelle di non agglomerare²⁴⁶. Una volta solubilizzato, sono stati aggiunti 1.7 g di nitrato di sodio (0.2 M). Ottenuta una soluzione omogenea, 1 mL di nitrato di argento 0.05 M (0.5 mM) è stato aggiunto alla soluzione. Durante la miscelazione, comincia a formarsi un complesso cationico dovuto ai gruppi amminici del chitosano che sono in grado di complessare gli ioni argento secondo la reazione (10.1)²⁴⁷:



Dopo circa dieci minuti, è stato raggiunto un pH pari a 5 con NaOH. La soluzione è stata posta in agitazione per 6 ore a 70 °C ad una velocità di 650 rpm. È stato notato un viraggio del colore da trasparente-giallo chiaro a bruno giallastro, dimostrazione della formazione delle nanoparticelle di argento²⁴⁸ (AgNPs) dovuta alla risonanza plasmonica

²⁴⁵ Cfr. G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli, M. Galdiero (2015). *Silver nanoparticles as potential antibacterial agents* in *Molecules*, 20(5), 8856-8874.

²⁴⁶ Cfr. S. Iravani, H. Korbekandi, S. V. Mirmohammadi, B. Zolfaghari (2014). *Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods* in *Research in pharmaceutical sciences*, 9(6), 385.

²⁴⁷ Cfr. P. Li, X. Zhang, R. Xu, W. Wang, X. Liu, K. W. Yeung, P. K. Chu (2013). *Electrochemically deposited chitosan/Ag complex coatings on biomedical NiTi alloy for antibacterial application* in *Surface and Coatings Technology*, 232, 370-375. Cfr. K. Vasilev, V. Sah, K. Anselme, C. Ndi, M. Mateescu, B. Dollmann, ... H. J. Griesser (2010). *Tunable antibacterial coatings that support mammalian cell growth* in *Nano letters*, 10(1), 202-207.

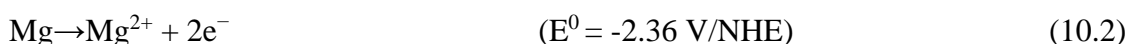
²⁴⁸ Cfr. P. K. Dara, R. Mahadevan, P. A. Digita, S. Visnuvinayagam, L. R. Kumar, S. Mathew, ... R. J. S. A. S. Anandan (2020). *Synthesis and biochemical characterization of silver nanoparticles grafted chitosan (Chi-Ag-NPs): in vitro studies on antioxidant and antibacterial applications* in *SN Applied Sciences*, 2(4), 1-12. Cfr. P. Sanpui, A. Chattopadhyay, S. S. Ghosh (2011). *Induction of apoptosis in cancer*

di superficie²⁴⁹. Secondo uno studio di Yadav, l'aggiunta di NaOH favorisce un effetto ipercromico per il quale vi è un aumento del picco di assorbimento della soluzione colloidale. Nella fattispecie, il ruolo dell'idrossido di sodio stimola la formazione dei nuclei e l'accrescimento delle nanoparticelle d'argento²⁵⁰.

Per quanto riguarda l'anodizzazione, è stata usata una soluzione di NaCl 1M. Al fine di non avere contaminazioni di cloruri, all'interno del catolita sono stati usati dei ponti salini in KNO₃. Le sommità delle lamine metalliche sono state cortocircuitate e la deposizione galvanica è stata condotta a 50 °C per 6 ore.

10.2.1 Deposizione Galvanica

A differenza dei capitoli precedenti in cui è stato utilizzato un anodo sacrificale in zinco o alluminio, per la deposizione di questo tipo di *coating* è stato scelto l'accoppiamento con una lega alluminio/magnesio, poiché offre una maggiore forza spingente da un punto di vista termodinamico. Nello scompartimento anodico si hanno le reazioni di corrosione dell'alluminio, descritta nei capitoli precedenti, e in questo caso avviene anche la dissoluzione del magnesio secondo la reazione:



cells at low silver nanoparticle concentrations using chitosan nanocarrier in ACS applied materials & interfaces, 3(2), 218-228.

²⁴⁹ Per comprendere il fenomeno è doveroso fare una piccola digressione al riguardo. I plasmoni di superficie localizzati sono eccitazioni degli elettroni di conduzione che non si propagano. Sono tipiche delle nanostrutture in metallo che interagiscono con un campo elettromagnetico. Questo fenomeno è causato dallo scattering di queste nanostrutture che hanno un diametro inferiore alla lunghezza d'onda della luce incidente. Questi modi plasmonici si creano dallo scattering di nanoparticelle molto piccole di diametro minore della lunghezza d'onda luminosa incidente. L'onda elettromagnetica luminosa che investe la nanoparticella interagisce con i dipoli elettrici indotti all'interno di essa. La superficie curva aiuta la particella ad esercitare una forza di ripristino su questi elettroni che porta ad una risonanza. L'amplificazione del campo, che avviene sia all'interno che all'esterno della particella, porta ad un fenomeno di scattering che viene osservato per un determinato picco di assorbimento. Questo fenomeno è comunemente chiamato risonanza plasmonica di superficie localizzata. Per maggiori approfondimenti sulla teoria che sta alla base e le applicazioni tecnologiche: Cfr. Maier, S. A. (2007). *Plasmonics: fundamentals and applications*. Springer Science & Business Media. Cfr. Noguez, C. (2007). *Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment in The Journal of Physical Chemistry C*, 111(10), 3806-3819. Cfr. Mulvaney, P. (1996). *Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles in Langmuir*, 12(3), 788-800.

²⁵⁰ Cfr. V. D. Yadav, R. Jain, P. Dandekar (2017). *Influence of sodium hydroxide in enhancing the surface plasmon resonance of silver nanoparticles in Materials Research Express*, 4(8), 085015.

Sul catodo, grazie agli elettroni provenienti dall'anodo sacrificale, avvengono le reazioni di elettrogenazione di base dei nitrati delle molecole d'acqua e dell'ossigeno disciolto in soluzione, che causano un aumento locale del pH all'interfaccia elettrodo/elettrolita (par. 6.3). La deposizione del chitosano avviene grazie all'aumento del pH, che porta alla deprotonazione dei gruppi amminici inglobando all'interno le nanoparticelle d'argento²⁵¹.

10.3 Risultati

Prima di procedere alle caratterizzazioni chimico-fisiche dei *coating*, in prima battuta è stata valutata la presenza delle nanoparticelle di argento in soluzione tramite spettroscopia UV-VIS.

In fig. 10.3 sono stati messi a confronto gli spettri di due soluzioni in cui è presente in una soltanto il chitosano (10 gL^{-1}) e nell'altra il chitosano e le nanoparticelle di argento. Dai risultati è emerso che la banda caratteristica di risonanza plasmonica di superficie è visibile a 420 nm, come riportato in letteratura²⁵². Invece sullo spettro relativo al solo chitosano non è stato rilevato nessun picco di assorbimento. Si può affermare che le nanoparticelle si sono formate e quindi che il chitosano svolge la duplice funzione di agente riducente e stabilizzante. La presenza di un solo picco di risonanza plasmonica ragguaglia sulla forma delle nanoparticelle di argento. In accordo alla teoria di Mie²⁵³, un picco singolo è tipico della forma sferica, dal momento che nanoparticelle con forma asimmetrica portano alla formazione di più picchi di risonanza.

²⁵¹ Cfr. Blanda (2019). *Chitosan-coating deposition...*

²⁵² Cfr. S. Akmaz, E. Dilaver Adıgüzel, M. Yasar, O. Erguven (2013). *The effect of Ag content of the chitosan-silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity* in *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013. Cfr. A. Murugadoss, A. Chattopadhyay (2007). A 'green' chitosan-silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst in *Nanotechnology*, 19(1), 015603. Cfr. Y. K. Twu, Y. W. Chen, C. M. Shih (2008). *Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions* in *Powder Technology*, 185(3), 251-257.

²⁵³ La teoria di Mie in base ad approssimazioni offre una soluzione esatta delle equazioni di Maxwell sullo scattering e assorbimento di particelle caratterizzate da una geometria sferica. Cfr. S. A. Maier (2007). *Plasmonics: fundamentals and applications* in *Springer Science & Business Media*. p.90 Cfr. X. Fan, W. Zheng, D. J. Singh (2014). *Light scattering and surface plasmons on small spherical particles* in *Light: Science & Applications*, 3(6), e179-e179.

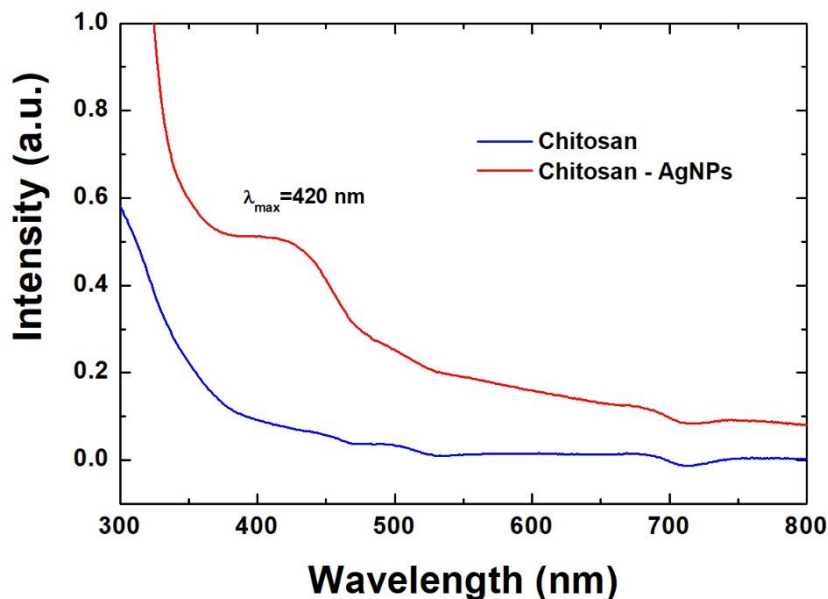


Fig. 10.3 Spettro di assorbimento UV-VIS

Per valutare la morfologia del rivestimento composito realizzato attraverso il processo di accoppiamento galvanico i campioni sono stati esaminati al SEM, e le relative immagini sono mostrate in fig. 10.4. Tutti i campioni analizzati (7.5 gL^{-1} e 10 gL^{-1} di chitosano) hanno mostrato una struttura omogenea e simile tra loro, caratterizzata da macropori circolari circondati da un *coating* compatto. La presenza di questi macropori circolari è imputabile alla generazione di bolle di idrogeno durante la deposizione, come già visto in par. 9.3. Infatti, l'alta viscosità della soluzione facilita il processo di adsorbimento delle bolle di gas sulla superficie del catodo. Questo fenomeno crea una barriera dell'interfaccia tra elettrodo ed elettrolita che limita la deposizione del rivestimento in quella zona. Nel momento in cui la bolla supera una certa dimensione critica, si distacca dall'elettrodo²⁵⁴. Tuttavia, questo fenomeno non risulta essere un problema, dal momento che il chitosano è un *hydrogel* e tende a rigonfiare una volta posto in soluzione.

²⁵⁴ Cfr. M. Mąkiewicz, R. A. Wach, K. Nawrotek (2021). *Investigation of Parameters Influencing Tubular-Shaped Chitosan-Hydroxyapatite Layer Electrodeposition in Molecules*, 26(1), 104.

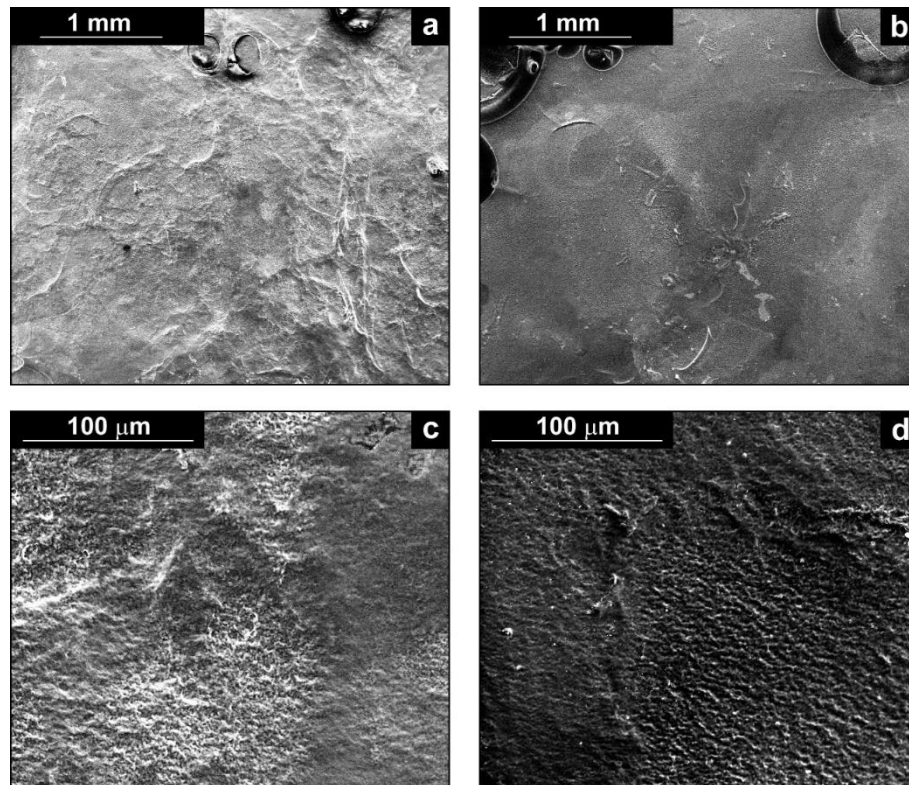


Fig. 10.4 Morfologia dei *coating* di Chitosano-AgNPs: a-c) 7.5 gL^{-1} CS b-d) 10 gL^{-1} CS

Si è riscontrata la presenza delle nanoparticelle di argento soltanto per ingrandimenti elevati, come mostrato in fig. 10.5, in cui è interessante notare come la matrice polimerica del chitosano riesca a inglobarle nella sua struttura. Attraverso l'analisi EDS (fig. 10.6) si sono ricavate ulteriori informazioni qualitative, come ad esempio la composizione atomica dei diversi elementi che costituiscono il *coating*.

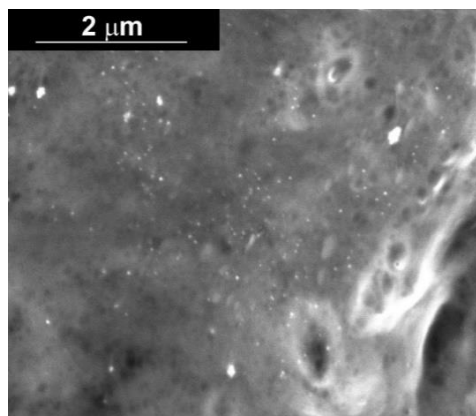


Fig. 10.5 Morfologia del *coating* in cui è possibile notare la presenza delle nanoparticelle

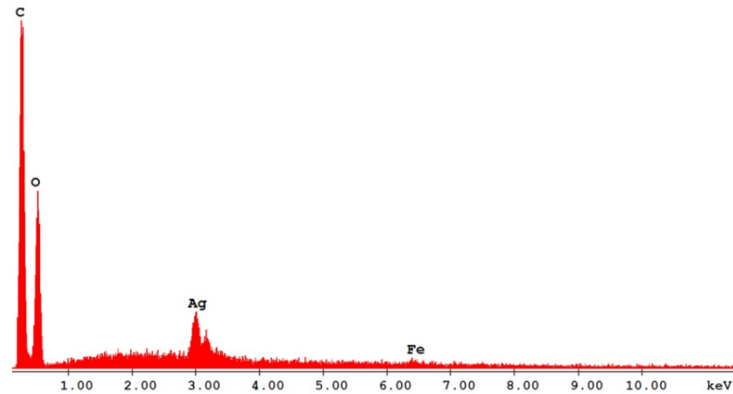


Fig. 10.6 EDS del *coating* composito di chitosano-AgNPs

In tutti i campioni è stata riscontrata sia la presenza di carbonio e ossigeno, che costituiscono lo scheletro idrocarburico del chitosano, sia un picco relativo agli atomi di argento dovuto alla presenza delle nanoparticelle. È interessante anche sottolineare la presenza di un piccolo segnale relativo agli atomi di ferro attribuibile all'acciaio: ciò è indice che il *coating* ha un buon grado di rivestimento e non lascia esposto il substrato all'ambiente esterno.

Sono stati analizzati al SEM i campione sottoposti ad un *aging* di 21 giorni in SBF. La morfologia mostrata in fig. 10.7 non è caratterizzata da sostanziali differenze morfologiche con il *coating* prima dell'immersione in SBF. Tuttavia, si nota la formazione di cristalli dovuti probabilmente alla disidratazione del *coating* necessaria per l'analisi SEM.

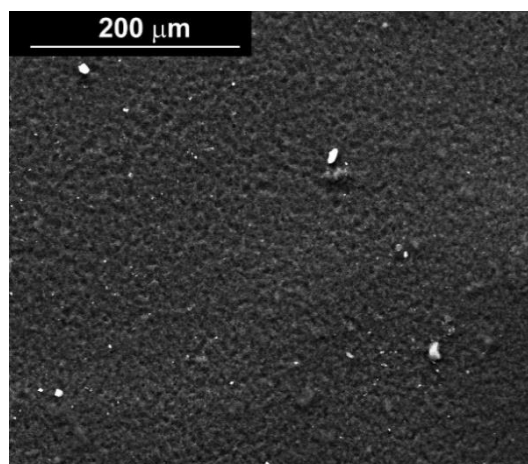


Fig. 10.7 Morfologia del *coating* post *aging*

Infatti, dalle analisi EDS è stata riscontrata la presenza di nuovi elementi chimici come cloro, sodio e zolfo presenti nella soluzione di SBF (fig. 10.8). È importante mettere in evidenza come il picco dell'argento si sia ridotto dopo l'*aging*, e ciò è dovuto al rilascio delle nanoparticelle che avviene durante l'immersione in SBF.

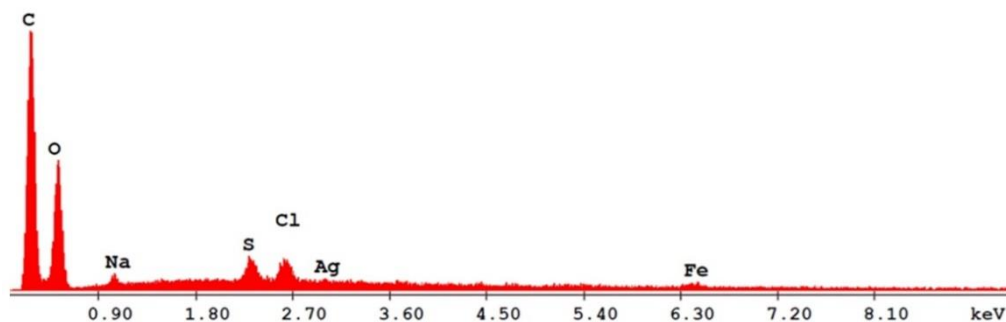


Fig. 10.8 Spettro EDS post *aging* di 21 giorni in SBF

I campioni ottenuti tramite deposizione galvanica sono stati sottoposti ad analisi XRD e i risultati sono mostrati in fig. 10.9²⁵⁵. In entrambi i depositi a diverse concentrazioni di chitosano sono stati rilevati i picchi caratteristici di chitosano e dell'argento. Il chitosano mostra una natura semi-cristallina, in accordo alla letteratura²⁵⁶. I due picchi di diffrazione sono attribuibili alle due forme cristalline: il primo per 2θ pari a 9.6° (020) è relativo alla struttura idratata; il secondo per 2θ pari a 19.8° (110) è dovuto ai segmenti della catena α -chitina. Va da sé che i picchi relativi al chitosano diventano più intensi per una concentrazione di chitosano in soluzione. Una conferma della presenza delle nanoparticelle di argento proviene dal picco per 2θ pari a 38.07° (111). Purtroppo, il picco secondario caratteristico dell'argento per 2θ pari a 44.43° non è visibile, perché è predominante il segnale che proviene dal substrato metallico. È importante sottolineare che questi picchi sono presenti ma con un'intensità più attenuata, dovuta a *coating* che

²⁵⁵ Per l'identificazione dei picchi di diffrazione si è utilizzato come riferimento: ICDD Cards: Chitosan (39-1894), Silver (04-0783). *International Centre for Diffraction Data, Powder Diffraction File*, 2007. Pennsylvania USA. In aggiunta sono stati inseriti i picchi relativi al substrato metallico.

²⁵⁶ Cfr. B. W. S. Souza, M. A. Cerqueira, J. T. Martins, A. Casariego, J. A. Teixeira, A. A. Vicente (2010). *Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings in Food Hydrocolloids*, 24(4), 330-335. Cfr. I. Corazzari, R. Nisticò, F. Turci, M. G. Faga, F. Franzoso, S. Tabasso, G. Magnacca (2015). *Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity in Polymer Degradation and Stability*, 112, 1-9.

schermata i picchi di diffrazione dell'acciaio. Quindi si può affermare che il campione possiede un *coating* spesso e con un buon grado di rivestimento.

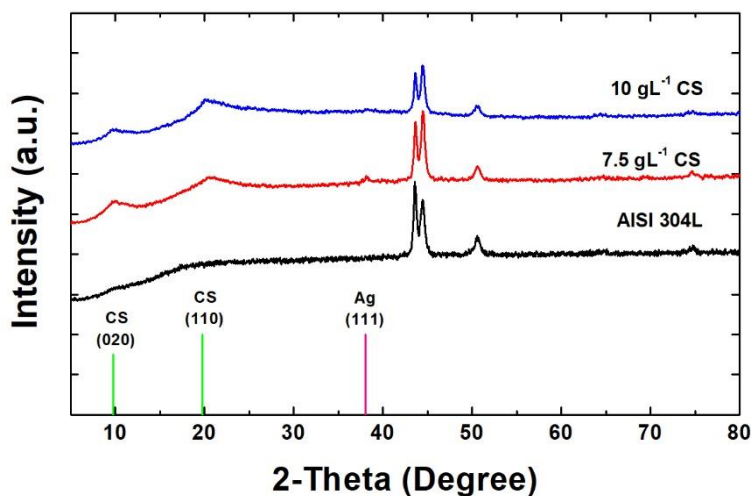


Fig. 10.9 Diffratogrammi dei *coating* di chitosano/AgNPs pre *aging*

In fig. 10.10 è riportato un confronto tra due diffratogrammi pre e post *aging* di 21 giorni in SBF di un campione ottenuto a 7.5 gL^{-1} di chitosano. I picchi nel post *aging* sono meno definiti, come se avessero perso in cristallinità e aumentato la loro natura amorfa. Il picco dell'argento invece si è leggermente ridotto.

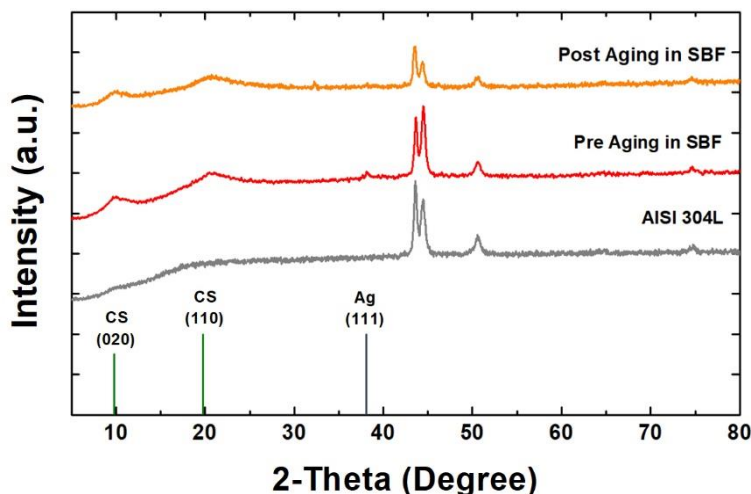


Fig. 10.10 Diffratogrammi dei *coating* di chitosano/AgNPs post *aging*

Attraverso un'analisi DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) è stato possibile studiare la cristallinità del *coating*. In fig. 10.11 sono stati confrontati un *coating* di solo chitosano e uno di chitosano e nanoparticelle di argento, a parità di concentrazione di chitosano in soluzione (10 gL^{-1}). Il picco endotermico del rivestimento di chitosano puro

è stato rilevato intorno a 120 °C. Lo stesso è stato rilevato sulla polvere di chitosano a basso peso molecolare. Per quanto riguarda il *coating* composito, è stato osservato uno shift del picco endotermico da 120 °C a 135 °C. Questo fenomeno è tipico dei sistemi con nanocompositi, in cui si registra una temperatura maggiore di fusione. Infatti, le nanoparticelle aumentano la cristallizzazione del polimero, poiché fungono da siti di nucleazione. Inoltre, è stato registrato il piccolo incremento dell'entalpia di fusione (tab. 10.1) conferma dell'effetto nucleante delle nanoparticelle di argento²⁵⁷.

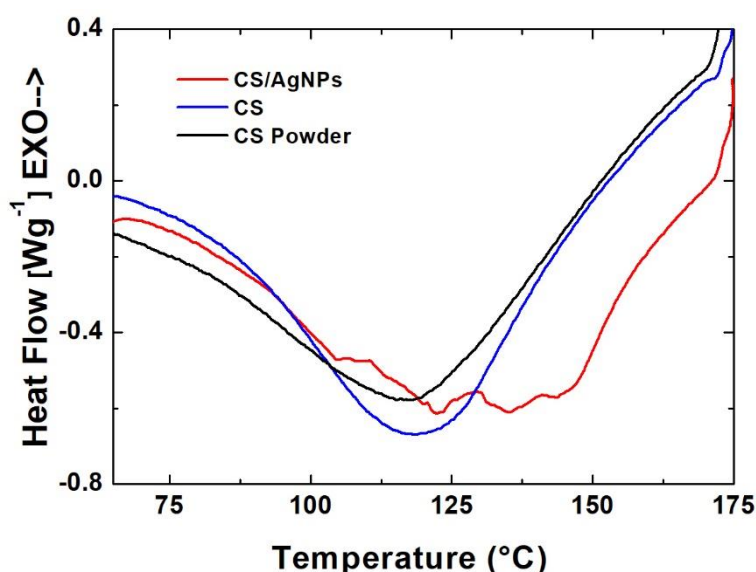


Fig. 10.11 Analisi DSC

Tab. 10.1 Entalpia di fusione calcolata tramite DSC

	ΔH [J/g]
Polvere chitosano LMW	252
Chitosano	213
Chitosano/AgNPs	237

L'analisi FT-IR è stata utile per analizzare la presenza dei diversi gruppi funzionali del chitosano e come questi si modificano in seguito all'interazione con le

²⁵⁷ Cfr. A. Sonseca, S. Madani, G. Rodríguez, V. Hevilla, C. Echeverría, M. Fernández-García, ... D. López (2020). *Multifunctional PLA blends containing chitosan mediated silver nanoparticles: Thermal, mechanical, antibacterial, and degradation properties in Nanomaterials*, 10(1), 22. Cfr. D. W. Chae, B. C. Kim (2005). *Physical properties of isotactic poly (propylene)/silver nanocomposites: dynamic crystallization behavior and resultant morphology in Macromolecular Materials and Engineering*, 290(12), 1149-1156. Cfr. S. C. Tjong, S. Bao (2007). *Structure and mechanical behavior of isotactic polypropylene composites filled with silver nanoparticles in e-Polymers*, 7(1).

nanoparticelle d'argento. Gli spettri riportati in fig. 10.12 mostrano delle differenze tra loro, in accordo con i dati in letteratura²⁵⁸.

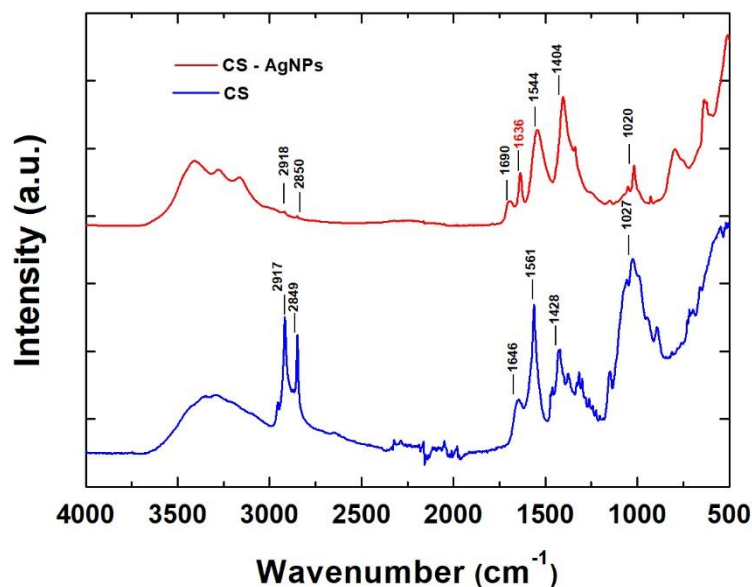


Fig. 10.12 Analisi FT-IR/ATR sul campione di Chitosano/AgNPs

La banda del chitosano relativa ai gruppi idrossidi $-OH$ (3330 cm^{-1}) si dividono in tre bande più piccole dovute probabilmente all'interazione dei gruppi ammidici e amminici con le nanoparticelle di argento. Le bande delle ammidi A e B nello spettro di CS/AgNPs sono meno ampie rispetto a quelle del chitosano e ciò indica la riduzione del legame idrogeno. Per 2919 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} troviamo rispettivamente i segnali relativi allo *stretching* del $\nu(CH_3)$ e $\nu(CH_2)$. Inoltre, il picco a 1647 cm^{-1} si sposta a 1636 cm^{-1} e la sua intensità è ridotta, per cui si desume l'interazione fra le nanoparticelle di argento con i gruppi amminici e idrossili del chitosano. La presenza di questo picco conferma il fatto che le interazioni che si instaurano tra le macromolecole del chitosano e le nanoparticelle di argento non modificano la struttura secondaria del chitosano durante la reazione di riduzione che porta alla formazione delle nanoparticelle. A 1560 cm^{-1} si riscontra il tipico modo vibrazionale dell'amide II. Inoltre, i picchi intorno a 1020 cm^{-1} sono

²⁵⁸ Cfr. S. Hajji, R. B. S. B. Salem, M. Hamdi, K. Jellouli, W. Ayadi, M. Nasri, S. Boufi (2017). *Nanocomposite films based on chitosan–poly (vinyl alcohol) and silver nanoparticles with high antibacterial and antioxidant activities in Process Safety and Environmental Protection*, 111, 112-121. Cfr. P. K. Dara, R. Mahadevan, P. A. Digita, S. Visnuvinayagam, L. R. Kumar, S. Mathew, ... R. J. S. A. S. Anandan (2020). *Synthesis and biochemical characterization of silver nanoparticles grafted chitosan (Chi-Ag-NPs): in vitro studies on antioxidant and antibacterial applications in SN Applied Sciences*, 2(4), 1-12. Cfr. Q. Chen, H. Jiang, H. Ye, J. Li, J. Huang (2014). *Preparation, antibacterial, and antioxidant activities of silver/chitosan composites in Journal of Carbohydrate Chemistry*, 33(6), 298-312.

attribuibili allo *stretching* antisimmetrico di C-O-C del polisaccaride. I picchi invece tra 1000 cm^{-1} e 500 cm^{-1} sono relativi alle catene idrocarburiche e la deformazione di -OH del composito CS/AgNPs.

Le *performance* di resistenza alla corrosione dei *coating* realizzati sono state valutate tramite le caratterizzazioni elettrochimiche. Per quanto riguarda il monitoraggio del potenziale di circuito aperto, a differenza dei capitoli precedenti, è stato necessario aumentare il tempo di osservazione da 30 minuti ad un'ora, dal momento che il chitosano rigonfia una volta a contatto con l'SBF e il potenziale si stabilizza per tempi maggiori (fig. 10.13).

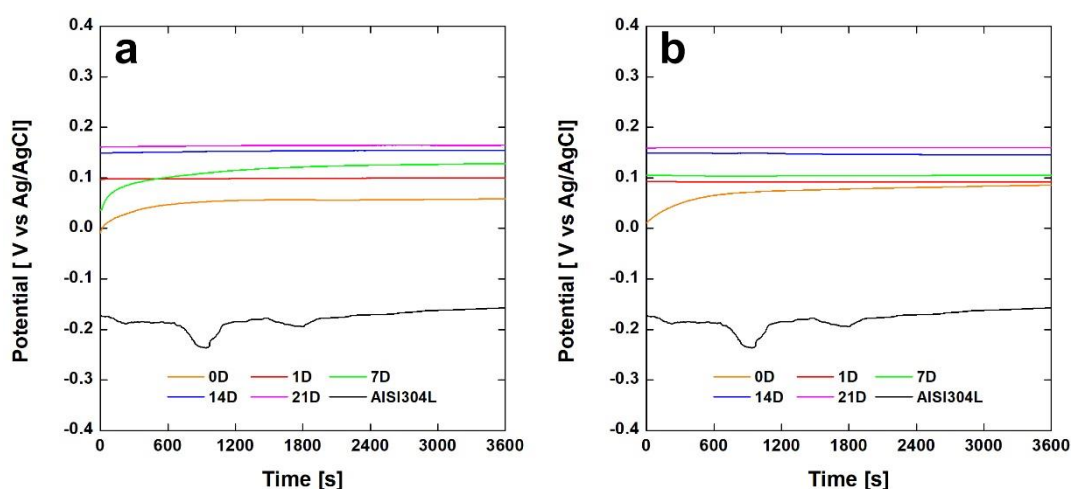


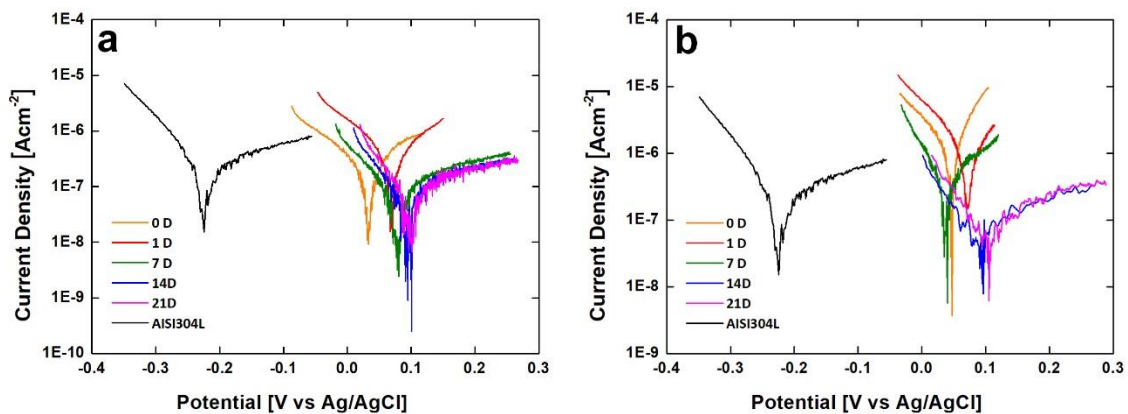
Fig. 10.13 Monitoraggio del potenziale di circuito aperto: a) 7.5 gL^{-1} CS/AgNPs b) 10 gL^{-1} CS/AgNPs

Indipendentemente dalla concentrazione di chitosano, il potenziale di circuito aperto dell'acciaio ricoperto dal *coating* mantiene durante l'*aging* valori superiori rispetto all'acciaio nudo. Si nota che i dati registrati aumentano all'aumentare del tempo di immersione. Durante i primi 30 minuti dell'immersione al giorno 0 si nota un aumento del potenziale dovuto allo *swelling* del chitosano a contatto con la soluzione. Nei giorni successivi l'andamento del potenziale è pressoché costante. Questo comportamento è indice di un *coating* abbastanza stabile e che non subisce sostanziali modifiche.

Con lo studio delle curve di polarizzazione si è constatato lo stesso risultato: si riscontra un potenziale di corrosione (E_{corr}) più alto rispetto all'acciaio privo di rivestimento, confermato dai valori del potenziale di corrosione (E_{corr}) riportati in tab. 10.2. Dai primi giorni di *aging* è possibile vedere un aumento della nobiltà rispetto all'acciaio non rivestito (fig. 10.14).

Tab. 10.2 Parametri di corrosione valutati a diversi tempi di giorni di *aging* per i campioni ottenuti a diversi pretrattamenti: potenziale di corrosione (E_{corr}) e densità di corrente di corrosione (i_{corr})

	Time					AISI 304L
	0	1	7	14	21	
7.5gL⁻¹CS						
E_{corr} [V]	0.03	0.069	0.078	0.081	0.094	-0.225
i_{corr} [Acm ⁻²]	7.02E-07	5.52E-07	7.78E-08	8.52E-08	9.06E-08	2.47E-07
10gL⁻¹CS						
E_{corr} [V]	0.046	0.063	0.035	0.085	0.091	-0.225
i_{corr} [Acm ⁻²]	2.89E-06	5.23E-07	4.22E-07	6.24E-08	7.32E-08	2.47E-07


 Fig. 10.14 Curve di polarizzazione del *coating* Chitosano/AgNPs: a) 7.5 gL⁻¹ CS b) 10 gL⁻¹ CS

Per quanto riguarda il campione ottenuto a 7.5gL⁻¹, il potenziale di corrosione aumenta durante il periodo di osservazione da 0.029V a 0.094V, dato che si mantiene sempre al di sopra del potenziale di corrosione dell'acciaio 304L per valori di E_{corr} positivi. Un risultato leggermente diverso è stato raggiunto dal secondo campione ottenuto a 10 gL⁻¹, che mostra al termine dell'*aging* un aumento del potenziale fino a 0.0916 V, sebbene al settimo giorno sia stata registrata una diminuzione del potenziale per un valore di E_{corr} pari a 0.0355V.

Se analizziamo l'andamento della densità di corrente di corrosione, si può notare che al termine dell'*aging*, a differenza di quanto preso in esame nei precedenti capitoli, essa non diminuisce rispetto al substrato privo di rivestimento. Questo risultato potrebbe apparire inatteso, dal momento che il *coating*, ricoprendo la superficie del metallo e quindi opponendo una barriera ai fluidi corporei, dovrebbe influire sulla i_{corr} facendola diminuire. D'altro canto però, poiché il chitosano è un polimero che in soluzione tende a rigonfiare, il rivestimento continua a mantenere l'effetto barriera e rallenta l'arrivo delle

specie aggressive sul substrato metallico. Lo stesso risultato è stato riscontrato in letteratura, dalla quale infatti emerge che il *coating* di chitosano realizzato per deposizione galvanica non è sufficiente a proteggere il substrato ma può essere utile per realizzare rivestimenti compositi, come peraltro già mostrato in precedenza²⁵⁹.

Le misure di spettroscopia d'impedenza sono riportate in fig. 10.15 per il *coating* realizzato a 10 gL⁻¹ di chitosano. Il *fitting* migliore è stato ottenuto utilizzando il circuito $R_s(CPE_1(R_1(CPE_2(R_2W))))$, impiegato per la modellazione in un precedente studio condotto su *coating* di chitosano per accoppiamento galvanico²⁶⁰. I *fitting* ottenuti (tab. 10.3) hanno un valore di χ^2 dell'ordine di 10⁻⁴ e l'errore relativo di ogni parametro è inferiore al 10%. La presenza dell'elemento di Warburg è indice dei fenomeni diffusivi che si instaurano all'interno del *coating*, dal momento che il chitosano tende a rigonfiare quando è posto in soluzione. Sebbene i valori di CPE₂, n₂ e R₂ sono dello stesso ordine dell'acciaio nudo, abbiamo una maggiore resistenza al trasporto di carica, in linea con i risultati della polarizzazione lineare in tab. 10.2.

Tab. 10.3 Parametri di *fitting* delle misure di impedenza del *coating* su acciaio AISI304L realizzato con 10 gL⁻¹ di chitosano. La deviazione standard media è del 3.7%.

	Tempo (Giorni)					AISI 304L R(QR)
	0	1	7	14	21	
	R(Q(R(Q(RW))))					
R _s	77.81	82.89	79.26	75.49	73.42	32.62
CPE ₁ -Y	4.59E-05	3.09E-05	5.04E-05	6.19E-05	6.16E-05	-
CPE ₁ -n ₁	0.6489	0.653	0.5419	0.5076	0.5218	-
R ₁	237.4	564.2	1053	1728	1612	-
CPE ₂ -Y	4.77E-05	4.06E-05	3.23E-05	3.3E-05	3.41E-05	5.51E-05
CPE ₂ -n ₂	0.7602	0.7297	0.7465	0.7953	0.8123	0.7665
R ₂	1.14E+05	4.97E+05	4.48E+04	1.55E+06	9.21E+05	5.38E+05
W	4.36E-05	2.61E-05	4.11E-06	2.85E-05	1.98E-05	-

²⁵⁹ Cfr. G. Blanda (2019). *Chitosan-coating deposition ...*

²⁶⁰ Cfr. *ibid.*, p.1721

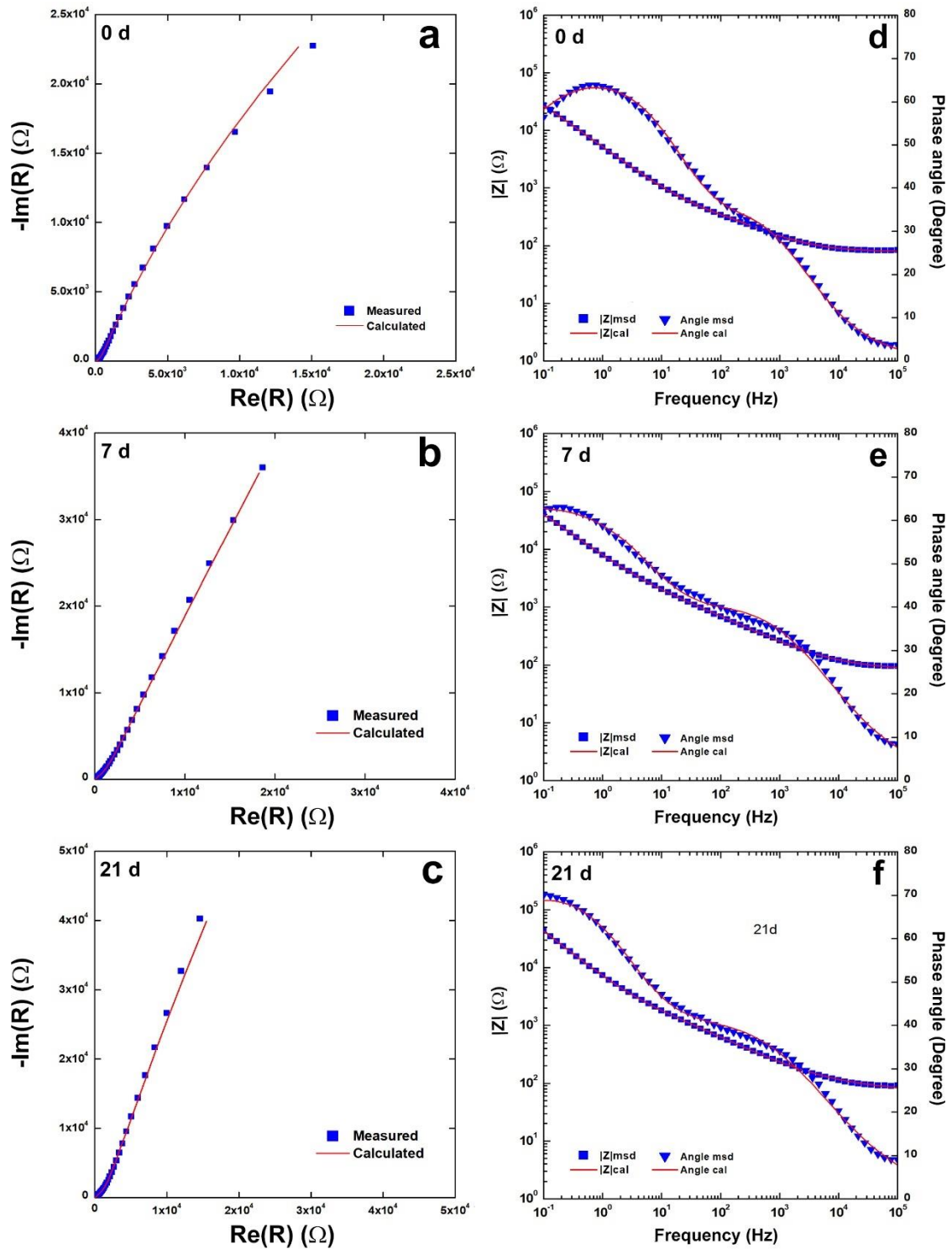


Fig. 10.15 Diagrammi di Bode e Nyquist del *coating* di chitosano/AgNPs (10gL^{-1} CS)

Al fine di valutare il rilascio di argento in SBF, un *coating* con un'area di circa 2 cm² è stato tenuto in immersione in un volume di 15 mL di SBF a 37 °C. È stato utilizzato un tempo complessivo di rilascio di 144 ore, durante le quali il campione è stato immerso in una soluzione fresca di SBF a diversi intervalli di tempo, come mostrato in tab. 10.4. Di seguito vengono riportati i dati relativi al rilascio di AgNPs, in ordine sia alla quantità in peso che alla concentrazione, funzione del tempo di immersione in SBF. È possibile notare in fig. 10.16 come nella prima ora di immersione il rivestimento rilasci quasi il 50% della quantità complessiva. Dopo circa 24 ore la quantità complessiva raggiunge il suo valore massimo di rilascio. Successivamente si ha un andamento praticamente lineare, in accordo ai dati di letteratura: questo fenomeno è controllato da un trasporto diffusivo²⁶¹.

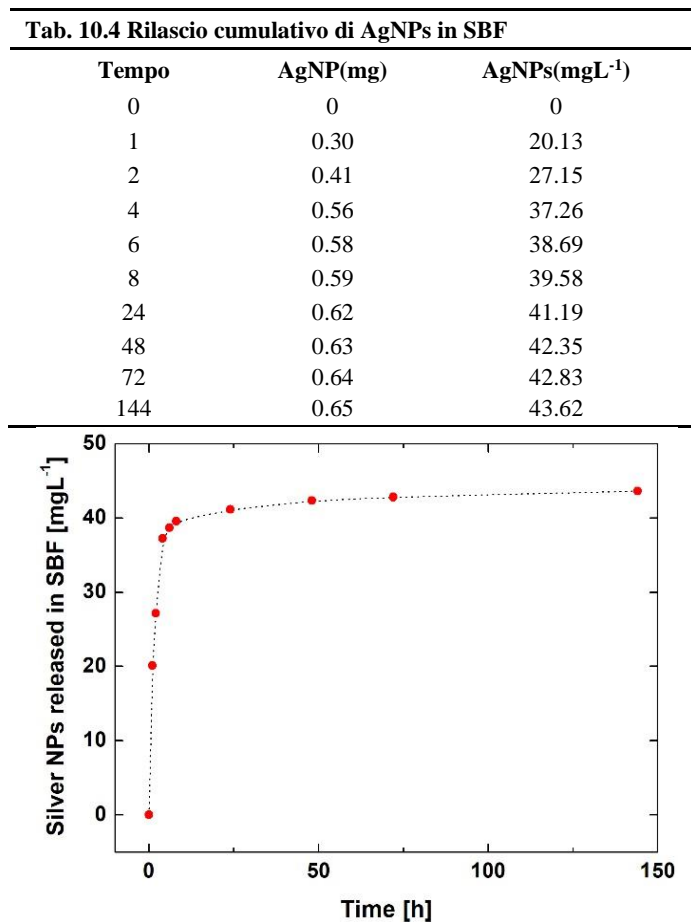


Fig. 10.16 Profilo di rilascio cumulativo di AgNPs in SBF a 37 °C

²⁶¹ Cfr. F. Pishbin, V. Mourino, J. B. Gilchrist, D. W. McComb, S. Kreppel, V. Salih, ... A. R. Boccaccini (2013). *Single-step electrochemical deposition of antimicrobial orthopaedic coatings based on a bioactive glass/chitosan/nano-silver composite system* in *Acta biomaterialia*, 9(7), 7469-7479.

Conclusioni

Abbiamo cercato di mostrare come il tema della nostra ricerca si riveli interessante, stimolante e sempre più oggetto di approfondimento nel corso degli ultimi anni: lo dimostra la corposa bibliografia citata, che contiene soprattutto contributi di recente pubblicazione. Tuttavia, la letteratura disponibile non contempla l'applicazione di questa tecnologia nel campo ortopedico, né d'altro canto abbiamo notizia di studi sull'argomento contemporanei al nostro: si tratta quindi di una nuova proposta per la realizzazione di rivestimenti, che auspichiamo possa essere tenuta nella debita considerazione.

In base a quanto emerso dalla ricerca, la deposizione galvanica è un processo che permette di fabbricare rivestimenti su substrati metallici in campo ortopedico senza l'apporto di energia elettrica dall'esterno tramite un generatore di potenza: la chiave di volta dell'intera tecnologia è lo sfruttamento del potenziale di accoppiamento tra substrato e anodo sacrificale. Inoltre, la realizzazione del processo condotta su materiali non particolarmente costosi, non richiede una strumentazione sofisticata e la sua gestione è facilmente controllabile, poiché si basa sul rapporto tra le aree degli elettrodi.

Gli studi precedentemente condotti nel nostro laboratorio, sui quali l'intero progetto di ricerca si è innestato, avevano previsto soltanto la realizzazione di *coating* caratterizzati solo da un componente²⁶². Ad eccezione del cap. 6, nel quale è stato analizzato l'effetto dei pretrattamenti del substrato metallico sulle prestazioni dei rivestimenti di fosfato di calcio, l'ulteriore passo in avanti di questa nostra ricerca ha previsto la creazione di compositi di fosfato di calcio con altri biomateriali (*Bioglass*, polivinilacetato, chitosano e collagene) e del composito a base di chitosano/nanoparticelle d'argento.

La strategia di indagine condotta su tre livelli paralleli – chimico-fisico, elettrochimico e biologico – ha permesso di comprendere maggiormente le caratteristiche e le prestazioni di ogni *coating* realizzato. L'analisi delle tre linee di indagine è stata comunque trasversale, ha messo in attenzione soprattutto i loro punti di tangenza e ha quindi confermato i risultati ottenuti.

Considerato l'elevato numero di variabili presentate – substrato, pretrattamenti, tipologia di *coating*, parametri di deposizione –, si passeranno adesso in rassegna in modo

²⁶² Cfr. G. Blanda (2016). *Galvanic deposition and characterization...*; Cfr. G. Blanda (2018). *In Vitro Corrosion and Biocompatibility...*; Cfr. Blanda (2019). *Chitosan-coating deposition ...*

critico i risultati ottenuti per evidenziare punti di forza e di debolezza delle varie tipologie di *coating* studiati.

Analisi chimico-fisiche a confronto

Da un punto di vista morfologico, ogni *coating* presenta caratteristiche peculiari che dipendono non solo dal tipo di rivestimento ma anche dalla morfologia del substrato utilizzato. Quest'ultimo aspetto emerge chiaramente analizzando i rivestimenti di fosfato di calcio depositati su acciaio AISI 316L differentemente pretrattato, che sono stati analizzati nel cap. 6. I risultati, infatti, hanno mostrato morfologie diverse: considerato che sono stati ottenuti a parità di condizioni operative, essi sono dovuti senza dubbio alla rugosità superficiale che il substrato di acciaio assume in seguito al pretrattamento (figg. I a-b-c).

Ovviamente i *coating* di fosfati di calcio presentano caratteristiche morfologiche differenti da quelli compositi. In particolare i depositi di fosfato di calcio e *Bioglass* non presentano la morfologia aghiforme tipica dell'idrossiapatite/brushite. Questo risultato è imputabile non solo all'inglobamento delle particelle di *Bioglass* ma anche alla deposizione galvanica condotta in una soluzione non stagnante (fig. I d). Il deposito di fosfato di calcio/PVAc presenta i cristalli di brushite/idrossiapatite (fig. I e) ed è stato inoltre osservato che parametri quali temperatura, quantità di monomero, tempo e anodo sacrificale giocano un ruolo non irrilevante sulla struttura morfologica. I compositi con chitosano (figg. I f-g) invece sono caratterizzati da una struttura eterogenea con presenza di macropori circolari sulla superficie: questa caratteristica è dovuta sia alla presenza del polisaccaride che aumenta la viscosità della soluzione, sia alla concomitanza della reazione di sviluppo di idrogeno. L'aggiunta del collagene in composito non modifica sostanzialmente la forma. Per quanto infine riguarda il composito a base di chitosano e nanoparticelle di argento, la morfologia si presenta abbastanza compatta e omogenea su tutta la superficie, malgrado la presenza di macropori (fig. I h).

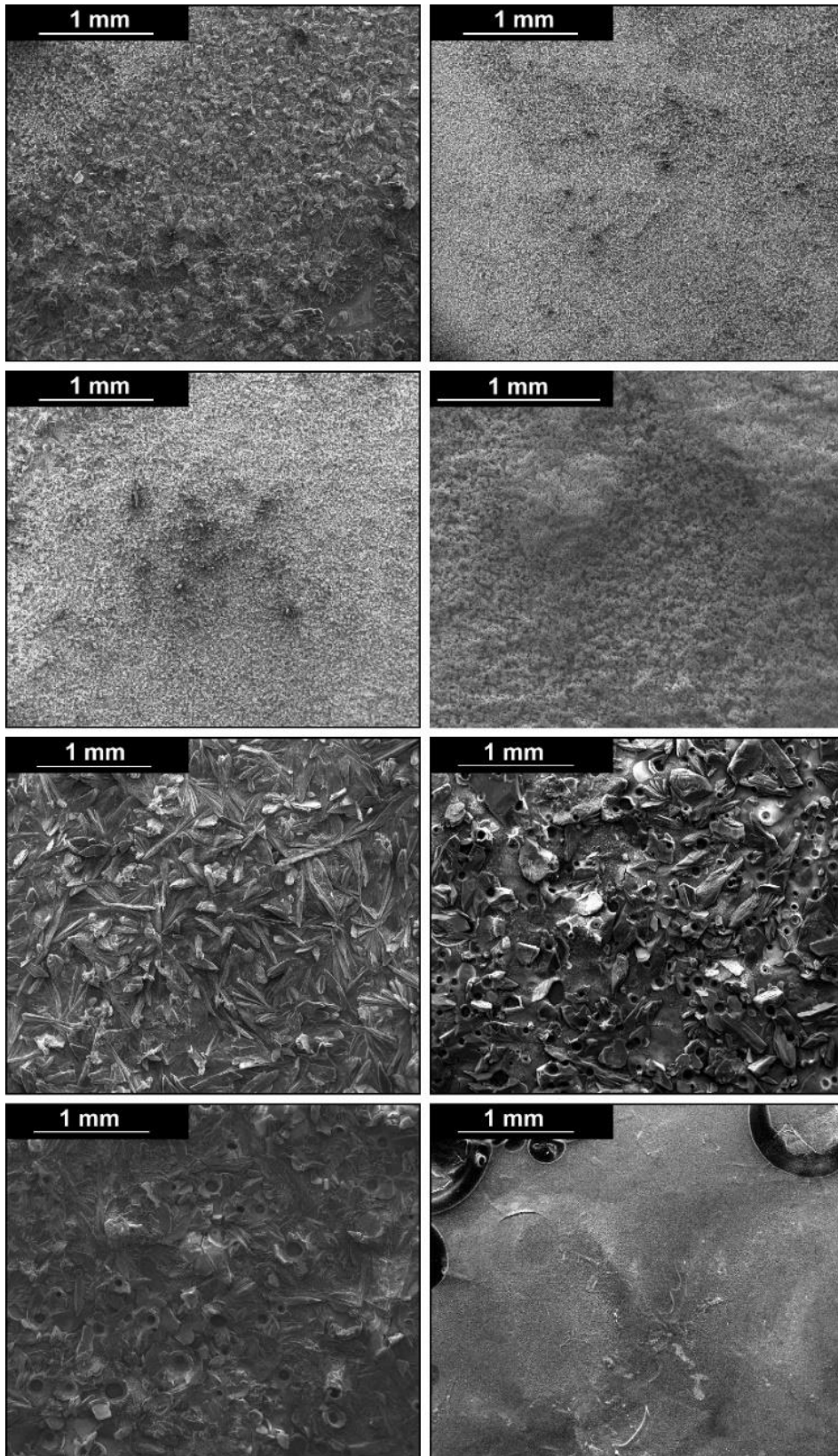


Fig. I a) *Electroetching* b) *Anodizing* c) *Phosphating*
d) *CaP/BG* e) *CaP/PVAc* f) *CaP/CS* g) *CaP/CS/Col* h) *CS/AgNPs*

Per quanto riguarda la resistenza alla corrosione, la presenza dei macropori non rappresenta un aspetto negativo poiché il chitosano tende a rigonfiare una volta posto in soluzione e quindi ricopre le eventuali aree scoperte.

Un'analisi morfologica al termine dell'*aging* di 21 giorni in SBF ha mostrato che i *coating* conservano la loro struttura macroscopica. Tuttavia, è stata osservata la formazione di una microrugosità dovuta ai fenomeni di conversione, dissoluzione e riprecipitazione che coinvolgono la brushite e l'idrossiapatite in SBF.

Questi risultati sono in accordo con le caratterizzazioni effettuate, da cui sono state ricavate informazioni circa la composizione chimica e le fasi presenti. Il rapporto Ca/Fe dimostra che al termine della deposizione i rivestimenti ricoprono totalmente la superficie del substrato e nel *post aging* si nota un aumento dello spessore. Questo risultato è stato dedotto dall'assenza dei picchi appartenenti agli atomi di ferro negli spettri EDS. In accordo al meccanismo di reazione descritto in par. 6.2.2, al termine della deposizione galvanica è sempre presente sia la fase di idrossiapatite sia la fase di brushite, dato che questa funge da precursore. In base ai risultati ottenuti, la fase brushite è in maggior presenza sui depositi in cui vi è assenza di biopolimeri, ed infatti i valori del rapporto Ca/P sono prossimi a 1. Sono stati comunque rilevati picchi di diffrazione e modi vibrazionali RAMAN tipici dell'idrossiapatite, che sono un chiaro segnale della presenza di questa fase. La presenza di polimeri quali PVAc o chitosano stimolano la formazione della fase idrossiapatite ed infatti i valori del rapporto Ca/P sono più alti (Tab. I). Tuttavia, a prescindere dal tipo di *coating*, al termine dei 21 giorni di *aging* in SBF, è stata constatata la completa conversione di brushite in idrossiapatite. Questo risultato è anche in accordo con i risultati rilevati all'ICP-OES nei quali la concentrazione degli ioni calcio nella soluzione di SBF *post aging* diminuisce e aumenta invece quella del fosforo.

Tab. I - Valori di Ca/P, Ca/Fe dei *coating* realizzati tramite deposizione galvanica

	Pre Aging		Post Aging	
	Ca/P	Ca/Fe	Ca/P	Ca/Fe
<i>Electroetching</i>	1.09	no Fe	1.49	no Fe
<i>Anodizing</i>	1	5.55	1.4	no Fe
<i>Phosphating</i>	1.1	no Fe	1.37	13.58
CaP/BG	1.03	92	1.39	no Fe
CaP/PVAc	1.28	54.19	1.55	no Fe
CaP/CS	1.29	11.7	1.39	no Fe
CaP/CS/Col	1.29	no Fe	1.43	no Fe

È doverosa un'osservazione di diverso tenore per il composito chitosano-nanoparticelle di argento, dal momento che in esso non sono presenti fosfati di calcio. In questo caso le caratterizzazioni sono state utili per verificare la presenza delle nanoparticelle all'interno del *coating*. In particolare, tramite EDS è stata rilevata la presenza di atomi di argento. Le analisi XRD hanno rivelato i picchi di diffrazione caratteristici sia del chitosano ma anche dell'argento metallico. Lo *shift* dei picchi caratteristici del chitosano puro, osservato nelle analisi FT-IR/ATR, ha invece confermato l'interazione tra il chitosano e le nanoparticelle. Un'ulteriore prova proviene dalla calorimetria differenziale a scansione: è stato, infatti, rilevato uno *shift* del picco endotermico, tipico dei sistemi nanocompositi, in cui le nanoparticelle fungono da siti di nucleazione e aumentano la cristallizzazione del polimero.

Analisi elettrochimiche a confronto

Le caratterizzazioni elettrochimiche hanno permesso di valutare le prestazioni di resistenza alla corrosione dei campioni ma anche di studiarne l'evoluzione durante i 21 giorni di *aging* in SBF. Per avere una visione globale dei risultati ottenuti, saranno messi a confronto per ogni tipologia di *coating* ottenuto solo i dati concernenti il deposito con le migliori *performance*.

Dal monitoraggio dell'OCP è stato visto che per tutti i campioni presi in esame il potenziale si stabilizza durante i 30 minuti di osservazione, durante i quali non sono stati registrati *spike* di potenziale, segno di una buona stabilità del rivestimento durante l'*aging*. Per il campione di chitosano/AgNPs, invece, è stato necessario aumentare il tempo di osservazione fino ad un'ora, per assicurare il completo *swelling* del rivestimento.

Per tutti i diversi *coating* è stato registrato un aumento del valore di OCP nei 21 giorni di *aging* che è risultato strettamente collegato ai test di polarizzazione. Per un confronto diretto, in fig. II sono state riportate le curve di Tafel al giorno 0 e al giorno 21.

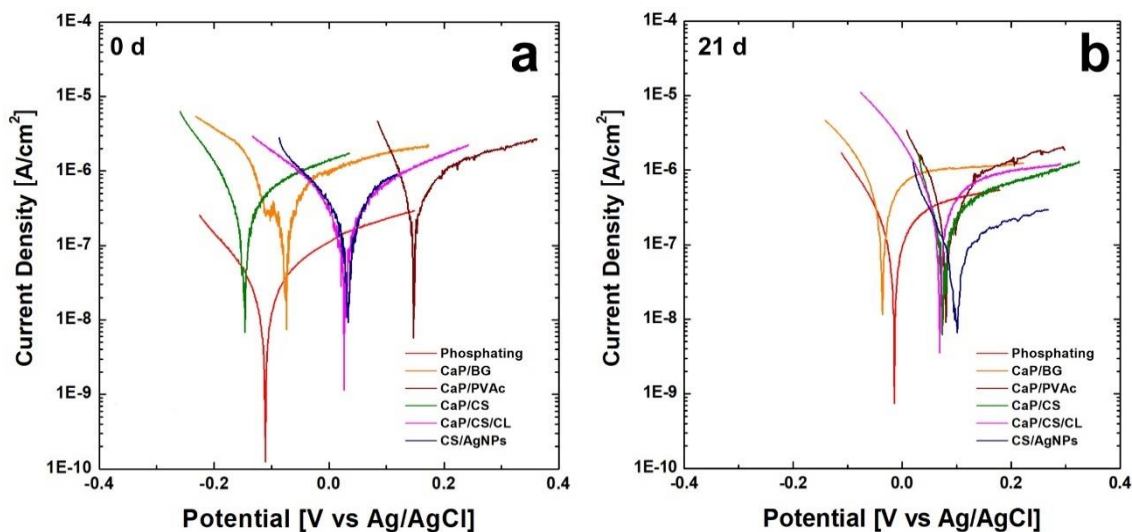


Fig. II Curve di polarizzazione dei *coating* studiati

Come si può notare, una caratteristica che accomuna pressoché la maggior parte dei campioni è lo *shift* delle curve verso potenziali più nobili rispetto al substrato di partenza. In alcuni casi è stato osservato un progressivo aumento di E_{corr} , come nel caso dei rivestimenti di chitosano e fosfato di calcio. Infatti, la presenza del composito con il biopolimero ha avuto un effetto benefico, dal momento che aumenta il potenziale di corrosione verso potenziali più nobili, mitigando i fenomeni corrosivi. In altri casi, invece, a causa del continuo equilibrio di conversione, dissoluzione e riprecipitazione tra brushite ed idrossiapatite, il potenziale di corrosione mostrava delle continue fluttuazioni che, al termine dell'*aging*, restavano comunque al di sopra dell'acciaio non rivestito. Per quanto riguarda la densità di corrente di corrosione, sono state osservate variazioni che si mantenevano sempre al di sotto dell'acciaio nudo. La spettroscopia d'impedenza ha dato un'ulteriore conferma su questo aspetto. Dai diagrammi di Bode e Nyquist, riportati rispettivamente in figg. III e IV, si evince come i *coating* riescano ad aumentare l'impedenza globale d'elettrodo al termine dei 21 giorni nei campioni in cui è presente una matrice polimerica in composito, mentre si è riscontrato una diminuzione dell'impedenza globale sui i rivestimenti di fosfato di calcio realizzato dopo il *phosphating* e il composito con *Bioglass*.

La modellazione delle misure d'impedenza tramite l'uso di opportuni circuiti equivalenti ha permesso di ricavare informazioni ulteriori sui *coating* e il miglior *fitting*

è stato ottenuto prendendo in riferimento modelli in letteratura che simulano depositi di-
somogenei in presenza di difetti.

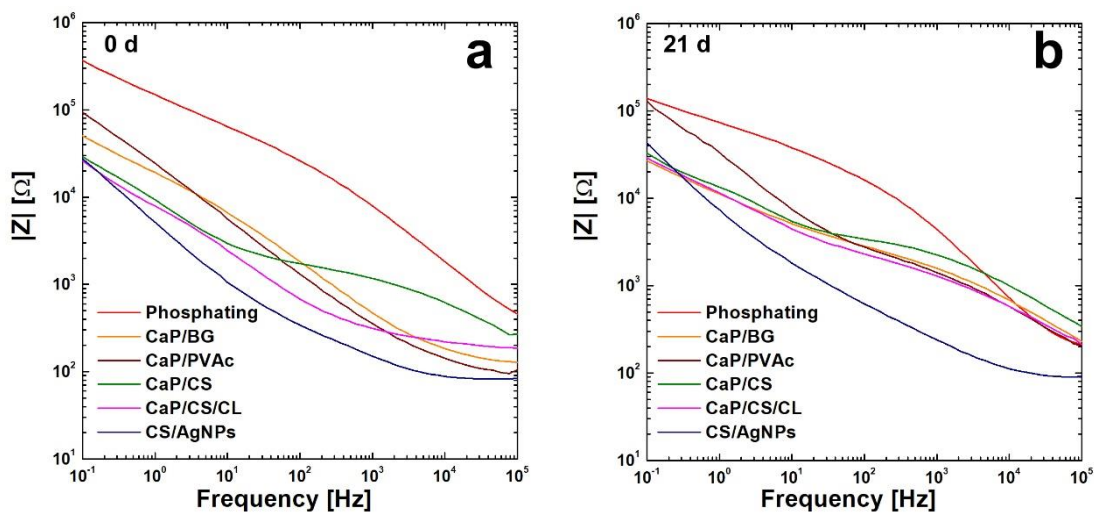


Fig. III Diagrammi di Bode

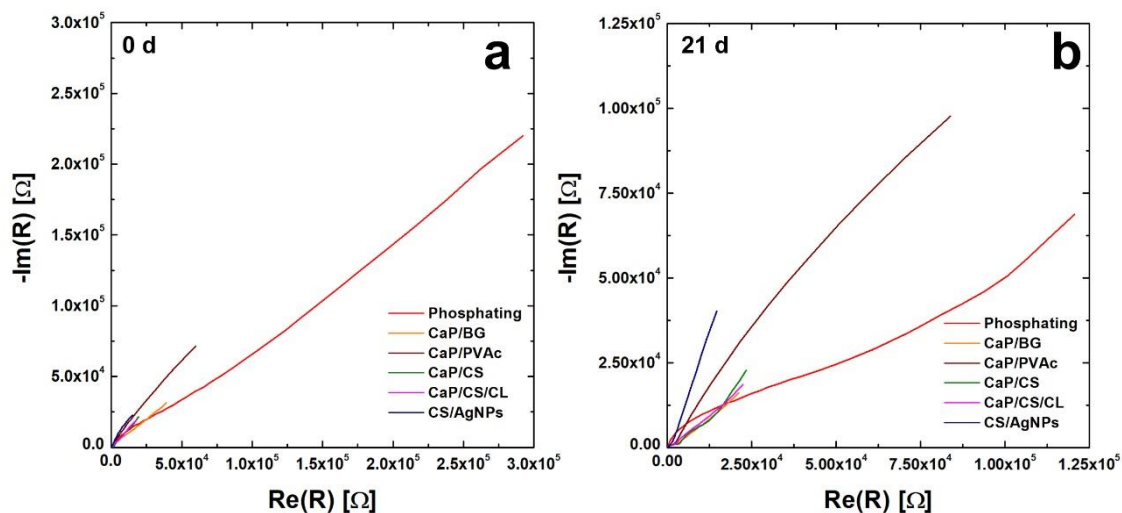


Fig. IV Diagrammi di Nyquist

Nel corso degli esperimenti fin qui condotti abbiamo avuto modo di verificare
altri dati che, non essendo strettamente necessari al disegno complessivo del lavoro ep-
pure non meramente accessori, vengono riportati per una maggiore completezza. In par-
ticolare, per valutare le prestazioni al variare del substrato, sono stati depositati *coating*
di fosfati di calcio con un *layout* sia a cella unita che a celle separate²⁶³. In fig. V sono

²⁶³ La deposizione galvanica è stata realizzata tramite accoppiamento con un anodo di zinco in una
soluzione di 0.061 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.036 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.1 M NaNO_3 a 25°C per 24 ore un rapporto

riportate le relative curve di polarizzazione effettuate durante l'*aging* SBF e i relativi valori di E_{corr} e i_{corr} sono riportati tabb. II e III. Si nota anche qui che il potenziale di corrosione si sposta verso potenziali più nobili, mentre i_{corr} subisce delle fluttuazioni che restano sempre al di sotto del substrato nudo. In base a questi risultati si evince che la scelta di una configurazione rispetto all'altra potrebbe influenzare poco da un punto di vista delle *performance* alla corrosione. Tranne che per i rivestimenti depositati sugli acciai pretrattati discussi in cap. 6, si è scelto di operare comunque a celle separate, per evitare contaminazioni da reazione di dissoluzione dell'anodo sacrificale, soprattutto nel caso in cui si utilizzano anodi poco nobili come leghe di magnesio o alluminio.

Tab. II - Parametri di corrosione valutati a diversi tempi di giorni di *aging* per i campioni ottenuti con un layout a cella unita: potenziale di corrosione (E_{corr}) e densità di corrente di corrosione (i_{corr})

	Tempo (Giorni)					Acciaio nudo
	0	1	7	14	21	
AISI 316L						
E_{corr} [V]	-0.082	-0.046	-0.023	0.025	-0.028	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	1.09E-06	2.25E-07	1.05E-07	1.57E-07	1.21E-07	2.52E-06
AISI 304						
E_{corr} [V]	-0.143	-0.083	-0.037	-0.003	-0.002	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	2.40E-07	2.35E-07	1.47E-07	2.10E-07	1.27E-07	8.92E-07
AISI 304L						
E_{corr} [V]	-0.153	-0.079	-0.104	-0.0359	0.067	-0.225
i_{corr} [Acm ⁻²]	1.55E-07	1.78E-07	1.55E-07	3.25E-07	1.24E-07	2.47E-07

Tab. III - Parametri di corrosione valutati a diversi tempi di giorni di *aging* per i campioni ottenuti con un layout a celle separate: potenziale di corrosione (E_{corr}) e densità di corrente di corrosione (i_{corr})

	Tempo (Giorni)					Acciaio nudo
	0	1	7	14	21	
AISI 316L						
E_{corr} [V]	-0.133	-0.064	0.0151	0.017	0.018	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	2.75E-07	2.35E-07	1.88E-07	1.91E-07	1.77E-07	2.52E-06
AISI 304						
E_{corr} [V]	-0.136	-0.082	-0.011	0.003	-0.012	-0.183
i_{corr} [Acm ⁻²]	4.01E-07	2.06E-07	1.10E-07	1.91E-07	1.71E-07	8.92E-07
AISI 304L						
E_{corr} [V]	-0.122	-0.082	-0.039	-0.033	-0.031	-0.225
i_{corr} [Acm ⁻²]	1.88E-07	2.85E-07	1.55E-07	2.35E-07	1.71E-07	2.47E-07

tra area anodica e area catodica di 27:1. Per il layout a celle separate, l'anodo sacrificale è stato immerso in una soluzione di 1M NaCl e dei ponti salini in KCl saturo tra le due celle.

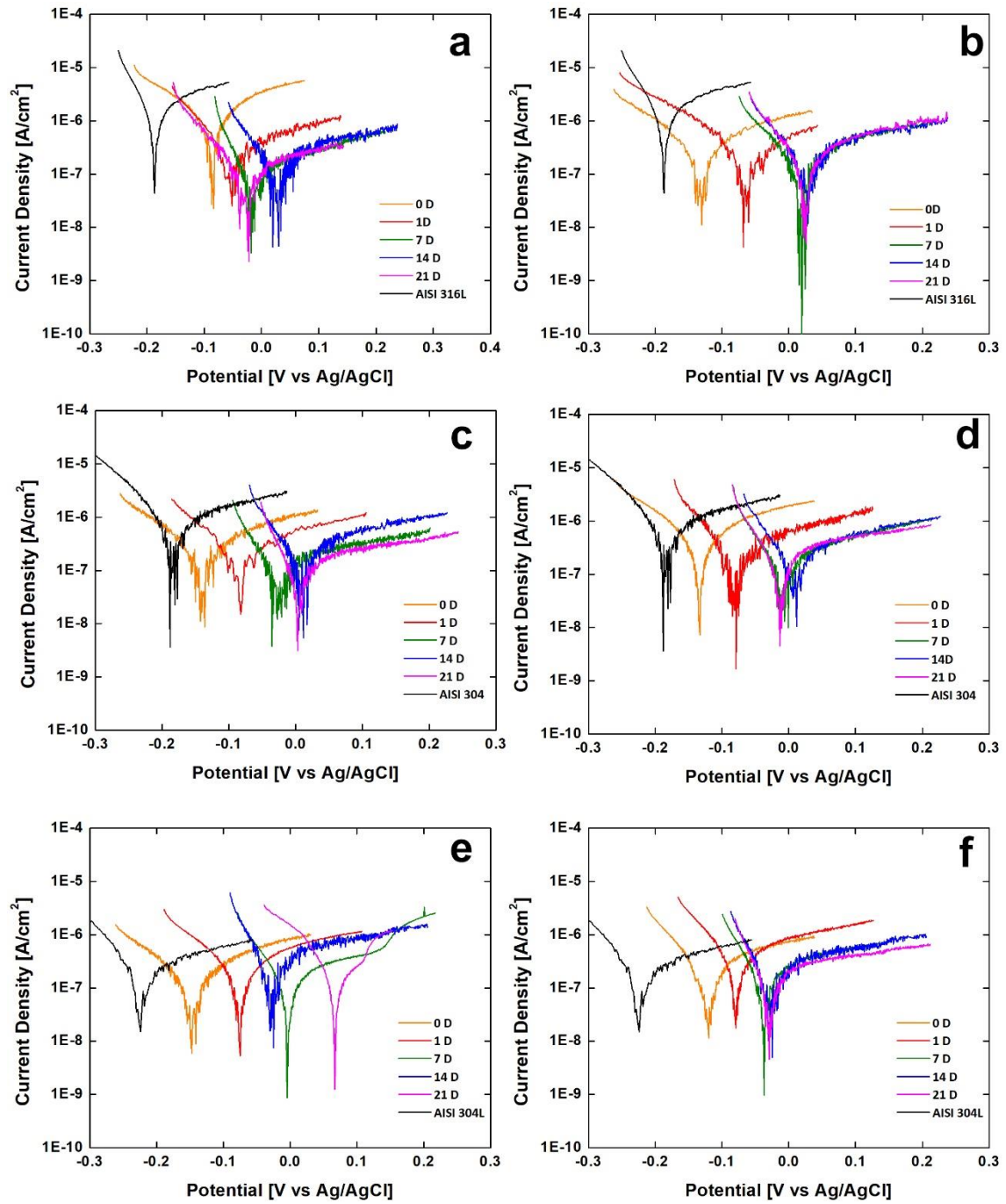


Fig. V Curve di polarizzazione. *Layout a cella unita:* a) AISI 316L c) AISI 304 e) AISI 304L;
Layout a cella separata: b) AISI 316L d) AISI 304 f) AISI 304L

Analisi biologiche a confronto

Anche se i depositi presi in esame non sono in grado di inibire l'insorgere di fenomeni corrosivi, essi agiscono come una barriera fisica che si interpone tra il substrato e l'ambiente in cui sono immersi. Infatti, il rilascio di ioni metallici in soluzione di *aging* è più blando rispetto all'acciaio nudo e le concentrazioni si mantengono al di sotto dei valori limiti di soglia. Questo risultato è in accordo anche con i test di citotossicità effettuati sui depositi in cui la presenza elimina l'effetto citotossico di base crescita dei preosteoblasti senza effetti secondari sulla crescita cellulare fisiologica.

La brevità di questa sezione evidentemente rispecchia un ambito della ricerca per il quale non si hanno competenze sufficienti per un grande approfondimento: il focus del nostro lavoro riguarda infatti la chimica fisica applicata e sfiora soltanto marginalmente l'aspetto biologico, ad ulteriore riprova di come la *Biomaterial Science* sia aperta ad indagini inter- e multidisciplinari.

Ulteriori valutazioni generali

Al termine delle valutazioni complessive, può essere interessante interpretare i risultati con altre chiavi di lettura.

In ordine ai tre acciai nudi, sebbene abbiano valori di E_{corr} e i_{corr} differenti, hanno mostrato lo stesso comportamento durante l'*aging* a parità di *coating*, come si è evidenziato nel confronto delle analisi elettrochimiche, ma in un'ottica più ampia per una possibile applicazione in campo ortopedico, la fabbricazione di rivestimento su un acciaio AISI 304 – meno costoso rispetto agli altri due – risulterebbe una soluzione per abbattere i costi globali di un dispositivo.

Dal punto di vista dei pretrattamenti, il *phosphating* rappresenta il migliore rispetto a tutti gli altri: offre una maggiore resistenza alla corrosione ma anche un elevato valore di impedenza globale di elettrodo. Tuttavia, dato che i lavori presentati nei diversi capitoli non sono stati concepiti come consequenziali, esso figura soltanto nel cap.6. Come si ricorderà, infatti, per tutti gli altri rivestimenti si è utilizzato un pretrattamento di tipo meccanico tramite carte abrasive.

Senza dubbio i rivestimenti compositi a base di fosfati di calcio e chitosano hanno presentato buone caratteristiche sia da punto di vista della composizione sia da quello della resistenza alla corrosione, come risulta dalla comparazione con tutti i campioni realizzati. Infatti, dalle caratterizzazioni chimico fisiche, è emerso che la presenza del biopolimero tende a stimolare la formazione della fase di idrossiapatite già al termine della deposizione galvanica, soprattutto in presenza del collagene. Questo fattore contribuisce all'aumento della biocompatibilità, dato che la sua struttura emula la composizione chimica delle ossa umane. Da un punto di vista delle *performance* di resistenza alla corrosione, il valore di E_{corr} , a differenza degli altri campioni, ha mostrato un *trend* via via crescente durante l'*aging*. Anche il *coating* a base di chitosano e nanoparticelle di argento ha mostrato degli ottimi risultati al termine delle caratterizzazioni elettrochimiche, ma la scalabilità di questo processo deve essere ancora ottimizzata.

Ipotesi di sviluppi futuri della ricerca

Dalle valutazioni generali affiorate finora, è chiaro che questo metodo di deposizione riesce efficacemente a ricoprire per intero la superficie del substrato metallico, fattore importante per migliorare la principale funzione biomimetica del rivestimento. La ricerca ha permesso di verificare i suoi punti di forza, peraltro già noti da precedenti studi²⁶⁴. È un processo controllabile, riproducibile e scalabile, a seconda dell'adeguata modifica dei parametri di deposizione. Inoltre, data la semplicità di esecuzione, tale tecnica non rende necessaria la presenza di un'*equipe* specializzata nel settore elettrochimico. Infine, è un processo *low cost*, nella misura in cui il costo globale è limitato essenzialmente ai materiali di partenza e ai reagenti.

Tuttavia, è doveroso mettere sulla bilancia anche alcune criticità cui è soggetta questa tecnologia. A differenza delle altre, sicuramente è un processo *time consuming*, poiché l'accoppiamento galvanico mette in gioco basse densità di corrente. In ogni caso, nonostante la dilatazione dei tempi di deposizione, risulta notevole la qualità dei rivestimenti in termini di adesione sul substrato, sebbene questo aspetto non sia stato

²⁶⁴ Cfr. G. Blanda et al. (2016) *Galvanic deposition and characterization...* Cfr. G. Blanda et al. (2018) *In Vitro Corrosion and Biocompatibility...* Cfr. Blanda et al. (2019) *Chitosan-coating deposition...*

ulteriormente verificato con opportuni test, e in termini di composizione chimica. Un altro aspetto limitante riguarda la scelta dei biomateriali, dal momento che con questa tecnologia sono realizzabili soltanto deposizioni catodiche.

Questa nostra ricerca ha inteso almeno provocare una suggestione di un nuovo filone di studi e di approfondimenti, che auspichiamo possano essere condotti in futuro per avere una maggiore completezza sull'argomento.

Atteso che non si volesse dare un contributo alla ricerca su nuovi biomateriali, ci si è soffermati su un metodo di deposizione innovativo (quindi si è approfondito un aspetto pratico), e crediamo si possano compiere ulteriori indagini da un punto di vista chimico-fisico. Inoltre, potranno per esempio essere presi in considerazione altri substrati, come leghe di titanio o di cromo/cobalto.

Questo lavoro ci ha permesso di lambire anche campi che non sono di nostra stretta competenza. Per questo motivo, in base al concetto di multidisciplinarietà della *Biomaterial Science*, sarebbe interessante implementarlo con ulteriori test biologici sui rivestimenti: ad esempio, valutare la crescita cellulare direttamente sul *coating* e studiarne l'adesione per una potenziale installazione *in vivo*; un altro interessante filone di indagine potrebbe essere la realizzazione di *coating* a rilascio di farmaco per studiarne l'effetto antibatterico nei confronti di batteri quali *E. Coli* e *S. Aureus*²⁶⁵.

Un altro aspetto che potrebbe aprire ad un ulteriore approfondimento è senza dubbio un'analisi dei costi. Come più volte è stato evidenziato, la deposizione galvanica è un processo *low cost* in un contesto sociale – quello odierno – particolarmente sensibile a questa tematica. Ciò potrebbe costituire senz'altro una motivazione della ricerca su questo versante. I costi poi si potrebbero ulteriormente abbattere con l'utilizzo di materiali di riciclo in funzione di anodi sacrificali: ad esempio, le lattine in alluminio per le bibite potrebbero essere una potenziale sorgente dalla quale attingere. In questo modo oltre ad abbattere i costi, si può dare un valore aggiunto a questi materiali di scarto e classificare la deposizione galvanica anche come *eco-friendly*, tema anche questo notoriamente al centro delle attenzioni della nostra società globale.

²⁶⁵ Cfr. G. Tan, J. Xu, W. M. Chirume, J. Zhang, H. Zhang, X. Hu (2021). *Antibacterial and Anti-Inflammatory Coating Materials for Orthopedic Implants: A Review* in *Coatings*, 11(11), 1401.

Ci sembrano questi, oltre alle motivazioni di tipo tecnico e scientifico, gli ambiti senza dubbio significativi per i quali il nostro contributo potrebbe avere una potenziale applicazione e un importante sviluppo.

Bibliografia

- Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., Gholami, A., Hemmateenejad, B., Dorostkar, S., Nabavizadeh, M., & Sharghi, H. (2015). *The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study* in *Journal of Nanomaterials*, 2015.
- Abdal-Hay, A. (2015). *A novel simple one-step air jet spinning approach for deposition of poly (vinyl acetate)/hydroxyapatite composite nanofibers on Ti implants*.
- Abdal-hay, A., Barakat, N. A., & Lim, J. K. (2013). *Influence of electrospinning and dip-coating techniques on the degradation and cytocompatibility of Mg-based alloy* in *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 420, 37-45.
- Abdal-Hay, A., Hamdy, A. S., Khalil, K. A., & Lim, J. H. (2015). *A novel simple one-step air jet spinning approach for deposition of poly (vinyl acetate)/hydroxyapatite composite nanofibers on Ti implants* in *Materials Science and Engineering: C*, 49, 681-690.
- Abdelghany, A. M., Meikhaail, M. S., & Asker, N. (2019). *Synthesis and structural-biological correlation of PVC/PVAc polymer blends* in *Journal of Materials Research and Technology*, 8(5), 3908-3916.
- Abdel-Karim, R. (2016). *Electrochemical Fabrication of Nanostructures in Handbook of Nanoelectrochemistry: Electrochemical Synthesis Methods, Properties, and Characterization Techniques*, 23-46.
- Adamo, S. et al., (1975), *Istologia di Monesi – 7 ed.* 2018
- Afshar, A., Yousefpour, M., Xiudong, Y., Li, X., Yang, B., Wu, Y., ... & Xingdong, Z. (2006). *Investigation of morphology and bioactive properties of composite coating of HA/vinyl acetate on pure titanium* in *Materials Science and Engineering: B*, 128(1-3), 243-249.
- Agrò, F. E., & Vennari, M. (2013). *Physiology of body fluid compartments and body fluid movements* In *Body Fluid Management* (pp. 1-25). Springer, Milano.
- Akmaz, S., Dilaver Adıgüzel, E., Yasar, M., & Erguven, O. (2013). *The effect of Ag content of the chitosan-silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity* in *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013.
- Amand, S., Musiani, M., Orazem, M. E., Pébère, N., Tribollet, B., & Vivier, V. (2013). *Constant-phase-element behavior caused by inhomogeneous water uptake in anti-corrosion coatings* in *Electrochimica Acta*, 87, 693-700.
- Anjaneyulu, U., & Vijayalakshmi, U. (2017). *Preparation and characterization of novel sol-gel derived hydroxyapatite/Fe₃O₄ composites coatings on Ti-6Al-4V for biomedical applications* in *Materials Letters*, 189, 118-121.
- Anselme, K. (2000). *Osteoblast adhesion on biomaterials* in *Biomaterials*, 21(7), 667-681.
- Antoniac, I. (Ed.). (2012). *Biologically responsive biomaterials for tissue engineering (Vol.)*. Springer Science & Business Media.

- Aparicio, C., Manero, J. M., Conde, F., Pegueroles, M., Planell, J. A., Vallet-Regi, M., & Gil, F. J. (2007). *Acceleration of apatite nucleation on microrough bioactive titanium for bone-replacing implants* in *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 82(3), 521-529.
- Apple, D. J., & Trivedi, R. H. (2002). *Sir Nicholas Harold Ridley, Kt, MD, FRCS, FRS: contributions in addition to the intraocular lens* in *Archives of Ophthalmology*, 120(9), 1198-1202.
- Arthanareeswari, M., Narayanan, T. S. N., Kamaraj, P., & Tamilselvi, M. (2010). *Influence of galvanic coupling on the formation of zinc phosphate coating*.
- Ashassi-Sorkhabi, H., & Kazempour, A. (2020). *Chitosan, its derivatives and composites with superior potentials for the corrosion protection of steel alloys: A comprehensive review* in *Carbohydrate polymers*, 237, 116110.
- Asoh, H., Nakatani, M., & Ono, S. (2016). *Fabrication of thick nanoporous oxide films on stainless steel via DC anodization and subsequent biofunctionalization* in *Surface and coatings technology*, 307, 441-451.
- Asri, R. I. M., Harun, W. S. W., Hassan, M. A., Ghani, S. A. C., Buyong, Z. (2016). *A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol-gel and electrochemical depositions on biocompatible metals* in *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 57, 95-108.
- Assadian, M., Jafari, H., Ghaffari Shahri, S. M., Idris, M. H., & Gholampour, B. (2014). *Corrosion resistance of EPD nanohydroxyapatite coated 316L stainless steel* in *Surface engineering*, 30(11), 806-813.
- ASTM E 1558-99: *Standard guide for electrolytic polishing of metallographic specimens*. Pennsylvania: ASTM; 1999.
- Aulus Cornelius Celsus, *De medicina*, VII,12
- Avcu, E., Baştan, F. E., Abdullah, H. Z., Rehman, M. A. U., Avcu, Y. Y., & Boccaccini, A. R. (2019). *Electrophoretic deposition of chitosan-based composite coatings for biomedical applications: A review* in *Progress in Materials Science*, 103, 69-108.
- Awan, T. I., Bashir, A., & Tehseen, A. (2020). *Chemistry of Nanomaterials: Fundamentals and Applications*. Elsevier.
- Azar, Z., Khalil-Allafi, J., & Etminanfar, M. R. (2019). *Electro-crystallization of hydroxyapatite coatings on Nitinol rotating disk electrode* in *Materials Research Express*, 6(5), 055401.
- Baino, F., Hamzehlou, S., Kargozar, S. (2018). *Bioactive glasses: where are we and where are we going?* in *Journal of functional biomaterials*, 9(1), 25.
- Baino, F., Verné, E. (2017). *Glass-based coatings on biomedical implants: A state-of-the-art review* in *Biomedical Glasses*, 3(1), 1-17.
- Balakrishnan, P., Sreekala, M. S., Thomas, S. (Eds.). (2018). *Fundamental Biomaterials: Metals*. Woodhead Publishing.
- Ban, S., & Hasegawa, J. (2002). *Morphological regulation and crystal growth of hydrothermal-electrochemically deposited apatite* in *Biomaterials*, 23(14), 2965-2972.
- Baradaran, S., Moghaddam, E., Basirun, W. J., Mehrali, M., Sookhakian, M., Hamdi, M., ... & Alias, Y. (2014). *Mechanical properties and biomedical*

- applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced graphene oxide composite in Carbon*, 69, 32-45.
- Baranowska, A., Leśniak, M., Kochanowicz, M., Żmojda, J., Miluski, P., & Dorosz, D. (2020). *Crystallization Kinetics and Structural Properties of the 45S5 Bioactive Glass and Glass-Ceramic Fiber Doped with Eu³⁺ in Materials*, 13(6), 1281.
 - Battaglia, M., Piazza, S., Sunseri, C., & Inguanta, R. (2013). *Amorphous silicon nanotubes via galvanic displacement deposition in Electrochemistry communications*, 34, 134-137.
 - Becker, M. J. (2003). *Etruscan gold dental appliances in Molecular and Structural Archaeology: Cosmetic and Therapeutic Chemicals* (pp. 11-27). Springer, Dordrecht.
 - Behera, R. R., Das, A., Hasan, A., Pamu, D., Pandey, L. M., & Sankar, M. R. (2020). *Effect of TiO₂ addition on adhesion and biological behavior of BCP-TiO₂ composite films deposited by magnetron sputtering in Materials Science and Engineering: C*, 114, 111033.
 - Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G., & Petibois, C. (2009). *Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy in Analytical and bio-analytical chemistry*, 395(3), 829-837.
 - Berni, M., Lopomo, N., Marchiori, G., Gambardella, A., Boi, M., Bianchi, M., ... Marccacci, M. (2016). *Tribological characterization of zirconia coatings deposited on Ti6Al4V components for orthopedic applications in Materials Science and Engineering: C*, 62, 643-655.
 - Besra, L., & Liu, M. (2007). *A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD) in Progress in materials science*, 52(1), 1-61.
 - Bhakta, S., Pattanayak, D. K., Takadama, H., Kokubo, T., Miller, C. A., Mirsaneh, M., ... & Hatton, P. V. (2010). *Prediction of osteoconductive activity of modified potassium fluorrichterite glass-ceramics by immersion in simulated body fluid in Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(11), 2979-2988.
 - Bhattacharya, P., & Neogi, S. (2017). *Techniques for deposition of coatings with enhanced adhesion to bio-implants in Adhes. Pharm. Biomed. Dent. Fields; John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA*, 235-255.
 - Bhushan, B. (2013). *Principles and applications of tribology in John Wiley & Sons*. p.884
 - Binitha, M. P., & Pradyumnan, P. P. (2013). *Dielectric property studies of biologically compatible brushite single crystals used as bone graft substitute*.
 - Blanda, G., Brucato, V., Carfi, F., Conoscenti, G., La Carrubba, V., Piazza, S., ... & Inguanta, R. (2019). *Chitosan-coating deposition via galvanic coupling in ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(4), 1715-1724.
 - Blanda, G., Brucato, V., Pavia, F. C., Greco, S., Piazza, S., Sunseri, C., & Inguanta, R. (2016). *Galvanic deposition and characterization of brushite/hydroxyapatite coatings on 316L stainless steel in Materials Science and Engineering: C*, 64, 93-101.
 - Blanda, G., Brucato, V., Pavia, F. C., Greco, S., Piazza, S., Sunseri, C., & Inguanta, R. (2018). *In Vitro Corrosion and Biocompatibility of*

- Brushite/Hydroxyapatite Coatings Obtained by Galvanic Deposition on 316LSS in Journal of The Electrochemical Society*, 165(2), G1.
- Bockris, J. O. M., Reddy, A. K., & Gamboa-Aldeco, M. (2000). *Electrodics in Modern Electrochemistry 2A: Fundamentals of Electrodics*
 - Bolelli, G., Cannillo, V., Gadow, R., Killinger, A., Lusvarghi, L., Manfredini, T., & Müller, P. (2015). *Properties of Al₂O₃ coatings by High Velocity Suspension Flame Spraying (HVSFS): Effects of injection systems and torch design in Surface and Coatings Technology*, 270, 175-189.
 - Bose, S., Dasgupta, S., Tarafder, S., & Bandyopadhyay, A. (2010). *Microwave-processed nanocrystalline hydroxyapatite: Simultaneous enhancement of mechanical and biological properties in Acta biomaterialia*, 6(9), 3782-3790.
 - Burleigh, T. D., Dotson, T. C., Dotson, K. T., Gabay, S. J., Sloan, T. B., & Ferrell, S. G. (2007). *Anodizing steel in KOH and NaOH solutions in Journal of The Electrochemical Society*, 154(10), C579.
 - Caha, I., Alves, A. C., Affonço, L. J., Lisboa-Filho, P. N., da Silva, J. H. D., Rocha, L. A., ... & Toptan, F. (2019). *Corrosion and tribocorrosion behaviour of titanium nitride thin films grown on titanium under different deposition times in Surface and Coatings Technology*, 374, 878-888.
 - Calbeto, S. A. (2011). *Nickel matrix micro/nano SiC composite electrodeposition in Escola Tecnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona*.
 - Cárcamo, J. J., Aliaga, A. E., Clavijo, R. E., Brañes, M. R., & Campos-Vallette, M. M. (2012). *Raman study of the shockwave effect on collagens in Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 86, 360-365.
 - Cardenas, L., MacLeod, J., Lipton-Duffin, J., Seifu, D. G., Popescu, F., Siaj, M., ... & Rosei, F. (2014). *Reduced graphene oxide growth on 316L stainless steel for medical applications in Nanoscale*, 6(15), 8664-8670.
 - Cardiff, P. (2012). *Development of the finite volume method for hip joint stress analysis*.
 - Chae, D. W., & Kim, B. C. (2005). *Physical properties of isotactic poly (propylene)/silver nanocomposites: dynamic crystallization behavior and resultant morphology in Macromolecular Materials and Engineering*, 290(12), 1149-1156.
 - Chang, J., & Zhou, Y. L. (2018). *Surface modification of bioactive glasses in Bioactive Glasses* (pp. 119-143). Woodhead Publishing.
 - Chen, L., Yan, X., Tan, L., Zheng, B., Muhammed, F. K., Yang, K., & Liu, Y. (2019). *In vitro and in vivo characterization of novel calcium phosphate and magnesium (CaP-Mg) bilayer coated titanium for implantation in Surface and Coatings Technology*, 374, 784-796.
 - Chen, Q., Cordero-Arias, L., Roether, J. A., Cabanas-Polo, S., Virtanen, S., & Boccaccini, A. R. (2013). *Alginate/Bioglass® composite coatings on stainless steel deposited by direct current and alternating current electrophoretic deposition in Surface and Coatings Technology*, 233, 49-56.
 - Chen, Q., Jiang, H., Ye, H., Li, J., & Huang, J. (2014). *Preparation, antibacterial, and antioxidant activities of silver/chitosan composites in Journal of Carbohydrate Chemistry*, 33(6), 298-312.
 - Cheng, Y., Luo, X., Betz, J., Payne, G. F., Bentley, W. E., & Rubloff, G. W. (2011). *Mechanism of anodic electrodeposition of calcium alginate in Soft Matter*, 7(12), 5677-5684.

- Christensen, A. M., Passalacqua, N. V., & Bartelink, E. J. (2019). *Forensic anthropology: current methods and practice*, Academic Press.
- Clarke, B. (2008). *Normal bone anatomy and physiology* in *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), S131-S139.
- Cocchiara, C., Inguanta, R., Piazza, S., & Sunseri, C. (2016). *Nanostructured anode material for li-ion battery obtained by galvanic process* in *Chemical Engineering Transactions*, 47, 73-78.
- Cometa, S., Bonifacio, M. A., Mattioli-Belmonte, M., Sabbatini, L., De Giglio, E. (2019). *Electrochemical strategies for titanium implant polymeric coatings: The why and how* in *Coatings*, 9(4), 268.
- Corazzari, I., Nisticò, R., Turci, F., Faga, M. G., Franzoso, F., Tabasso, S., & Magnacca, G. (2015). *Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity* in *Polymer Degradation and Stability*, 112, 1-9.
- Crubzy, E., Murail, P., Girard, L., & Bernadou, J. P. (1998). *False teeth of the Roman world* in *Nature*, 391(6662), 29-29.
- Cui, F. Z., Li, Y., & Ge, J. (2007). *Self-assembly of mineralized collagen composites* in *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 57(1-6), 1-27.
- Da Rocha, D. N., Da Silva, M. H. P., De Campos, J. B., Marçal, R. L. S. B., Mijares, D. Q., Coelho, P. G., & Cruz, L. R. (2018). *Kinetics of conversion of brushite coatings to hydroxyapatite in alkaline solution* in *Journal of materials research and technology*, 7(4), 479-486.
- Da Silva, M. P., Lima, J. H. C., Soares, G. A., Elias, C. N., De Andrade, M. C., Best, S. M., & Gibson, I. R. (2001). *Transformation of monetite to hydroxyapatite in bioactive coatings on titanium* in *Surface and Coatings Technology*, 137(2-3), 270-276.
- Dara, P. K., Mahadevan, R., Digita, P. A., Visnuvinayagam, S., Kumar, L. R., Mathew, S., ... & Anandan, R. J. S. A. S. (2020). *Synthesis and biochemical characterization of silver nanoparticles grafted chitosan (Chi-Ag-NPs): in vitro studies on antioxidant and antibacterial applications* in *SN Applied Sciences*, 2(4), 1-12.
- Dasgupta, S., Tarafder, S., Bandyopadhyay, A., & Bose, S. (2013). *Effect of grain size on mechanical, surface and biological properties of microwave sintered hydroxyapatite* in *Materials Science and Engineering: C*, 33(5), 2846-2854.
- De Meo, D., Ceccarelli, G., Iaiani, G., Lo Torto, F., Ribuffo, D., Persiani, P., & Villani, C. (2021). *Clinical Application of Antibacterial Hydrogel and Coating in Orthopaedic and Traumatology Surgery* in *Gels*, 7(3), 126.
- Dehghanhadikolaei, A., & Fotovvati, B. (2019). *Coating techniques for functional enhancement of metal implants for bone replacement: a review* in *Materials*, 12(11), 1795
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). *Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables* in *Food microbiology*, 21(6), 703-714.
- Dhivya, S., Keshav Narayan, A., Logith Kumar, R., Viji Chandran, S., Vairamani, M., & Selvamurugan, N. (2018). *Proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on scaffolds containing chitosan, calcium*

- polyphosphate and pigeonite for bone tissue engineering in Cell proliferation*, 51(1), e12408.
- Domínguez-Jaimes, L. P., Arenas Vara, M. Á., Cedillo-González, E. I., Ruiz Valdés, J. J., De Damborenea, J. J., Conde Del Campo, A., ... & Hernández-López, J. M. (2019). *Corrosion Resistance of Anodic Layers Grown on 304L Stainless Steel at Different Anodizing Times and Stirring Speeds in Coatings*, 9(11), 706.
 - Du, C., Cui, F. Z., Zhang, W., Feng, Q. L., Zhu, X. D., & De Groot, K. (2000). *Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix in Journal of biomedical materials research*, 50(4), 518-527.
 - El Hadad, A. A., Peón, E., García-Galván, F. R., Barranco, V., Parra, J., Jiménez-Morales, A., Galván, J. C. (2017). *Biocompatibility and corrosion protection behaviour of hydroxyapatite sol-gel-derived coatings on Ti6Al4V alloy in Materials*, 10(2), 94.
 - Eliaz, N. (2019). *Corrosion of metallic biomaterials: a review in Materials*, 12(3), 407.
 - Enderle, J. (2012). *Introduction to biomedical engineering*, Academic press.
 - Fan, X., Zheng, W., & Singh, D. J. (2014). *Light scattering and surface plasmons on small spherical particles in Light: Science & Applications*, 3(6), e179-e179.
 - Fan, Y., Duan, K., & Wang, R. (2005). *A composite coating by electrolysis-induced collagen self-assembly and calcium phosphate mineralization in Bio-materials*, 26(14), 1623-1632.
 - Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). *Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—A comprehensive review in Advanced drug delivery reviews*, 107, 367-392.
 - Finšgar, M., Uzunalić, A. P., Stergar, J., Gradišnik, L., & Maver, U. (2016). *Novel chitosan/diclofenac coatings on medical grade stainless steel for hip replacement application in Scientific reports*, 6(1), 1-17.
 - Fiume, E., Barberi, J., Verné, E., Baines, F. (2018). *Bioactive glasses: from parent 45S5 composition to scaffold-assisted tissue-healing therapies in Journal of functional biomaterials*, 9(1), 24.
 - Fotovvati, B., Namdari, N., & Dehghanhadikolaei, A. (2019). *On coating techniques for surface protection: A review in Journal of Manufacturing and Materials Processing*, 3(1), 28
 - Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). *Silver nanoparticles as potential antibacterial agents in Molecules*, 20(5), 8856-8874.
 - Frost, H. M. (1994). *Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians in The Angle Orthodontist*, 64(3), 175-188.
 - Fujishiro, Y., Sugimori, A., Okuwaki, A., & Sato, T. (2001). *Coating of hydroxyapatite on various substrates via hydrothermal reactions of Ca (edta) 2- and phosphate in Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(4), 333-337.

- Gadow, R., Killinger, A., & Rauch, J. (2008). *New results in high velocity suspension flame spraying (HVSFS) in Surface and Coatings Technology*, 202(18), 4329-4336.
- Gao, C., Peng, S., Feng, P., & Shuai, C. (2017). *Bone biomaterials and interactions with stem cells in Bone research*, 5(1)
- Garcia-Lobato, M. A., Mtz-Enriquez, A. I., Garcia, C. R., Velazquez-Manzanares, M., Avalos-Belmontes, F., Ramos-Gonzalez, R., Garcia-Cerda, L. A. (2019). *Corrosion resistance and in vitro bioactivity of dense and porous titania coatings deposited on 316L SS by spraying method in Applied Surface Science*, 484, 975-980.
- Geuli, O., Metoki, N., Zada, T., Reches, M., Eliaz, N., Mandler, D. (2017). *Synthesis, coating, and drug-release of hydroxyapatite nanoparticles loaded with antibiotics in Journal of Materials Chemistry B*, 5(38), 7819-7830
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Kolahreez, D., Ramakrishna, S., & Williams, D. (2019). *Key terminology in biomaterials and biocompatibility in Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10, 45-50.
- Gheisari, H., Karamian, E., & Abdellahi, M. (2015). A novel hydroxyapatite–Hardystonite nanocomposite ceramic. *Ceramics International*, 41(4), 5967-5975.
- Ghiasi, B., Sefidbakht, Y., Rezaei, M. (2019). Hydroxyapatite for biomedicine and drug delivery in *Nanomaterials for Advanced Biological Applications* (pp. 85-120). Springer, Cham.
- Gilbert, J. L., & Kubacki, G. W. (2016). *Oxidative stress, inflammation, and the corrosion of metallic biomaterials: Corrosion causes biology and biology causes corrosion in Oxidative Stress and Biomaterials*
- Gittens, R. A., Olivares-Navarrete, R., Schwartz, Z., Boyan, B. D. (2014). *Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants in Acta biomaterialia*, 10(8), 3363-3371.
- Goel, A. (2015). *Surgical Sutures-A Review in The Official Scientific Journal of Delhi Ophthalmological Society*, 26(3), 159-162.
- Gong, J., Zhang, W., Liu, T., & Zhang, L. (2011). *Facile fabrication of chitosan–calcium carbonate nanowall arrays and their use as a sensitive non-enzymatic organophosphate pesticide sensor in Nanoscale*, 3(8), 3123-3131.
- Gullekson, C., Lucas, L., Hewitt, K., & Kreplak, L. (2011). *Surface-sensitive Raman spectroscopy of collagen I fibrils in Biophysical journal*, 100(7), 1837-1845.
- Gunpath, U., & Le, H. (2017). *Composite coatings for implants and tissue engineering scaffolds in Biomedical Composites*. Woodhead Publishing.
- Guo, B., Yang, M., Liang, D., Yang, L., Cao, J., & Zhang, L. (2012). *Cell apoptosis induced by zinc deficiency in osteoblastic MC3T3-E1 cells via a mitochondrial-mediated pathway in Molecular and cellular biochemistry*, 361(1), 209-216.
- Guo, Y., Su, Y., Gu, R., Zhang, Z., Li, G., Lian, J., & Ren, L. (2020). *Enhanced corrosion resistance and biocompatibility of biodegradable magnesium alloy modified by calcium phosphate/collagen coating in Surface and Coatings Technology*, 401, 126318.
- Haidopoulos, M., Turgeon, S., Sarra-Bournet, C., Laroche, G., & Mantovani, D. (2006). *Development of an optimized electrochemical process for*

- subsequent coating of 316 stainless steel for stent applications in Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(7), 647-657.
- Hajji, S., Salem, R. B. S. B., Hamdi, M., Jellouli, K., Ayadi, W., Nasri, M., & Boufi, S. (2017). *Nanocomposite films based on chitosan–poly (vinyl alcohol) and silver nanoparticles with high antibacterial and antioxidant activities in Process Safety and Environmental Protection*, 111, 112-121
 - Hamdi, D. A., Jiang, Z. T., No, K., Rahman, M. M., Lee, P. C., Truc, L. N. T., ... & Dlugogorski, B. Z. (2019). *Biocompatibility study of multi-layered hydroxyapatite coatings synthesized on Ti-6Al-4V alloys by RF magnetron sputtering for prosthetic-orthopaedic implant applications in Applied Surface Science*, 463, 292-299.
 - Han, J. Y., Yu, Z. T., & Zhou, L. (2008). *Hydroxyapatite/titania composite bioactivity coating processed by the sol–gel method in Biomedical Materials*, 3(4), 044109.
 - Han, W., & Fang, F. (2019). *Fundamental aspects and recent developments in electropolishing in International Journal of Machine Tools and Manufacture*, 139, 1-23.
 - Hanawa, T. (2012). *Degradation of dental implants. In Degradation of Implant Materials* (pp. 57-78). Springer, New York, NY.
 - Haque, J., Munna, A. H., Ayon, A. S. R., Shaitee, Z. R., & Saha, A. (2020). *A Comprehensive Overview of the Pertinence and Possibilities of Bioactive Glass in the Modern Biological World in Journal of Biomaterials*, 4(2), 23.
 - Harun, W. S. W., Asri, R. I. M., Alias, J., Zulkifli, F. H., Kadirgama, K., Ghani, S. A. C., Shariffuddin, J. H. M. (2018). *A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials in Ceramics International*, 44(2), 1250-1268.
 - Hasirci, V., Hasirci, N. (2018). *Fundamentals of biomaterials*. Verlag: Springer New York.
 - Hayakawa, T., Kawashita, M., & Takaoaka, G. H. (2008). *Coating of hydroxyapatite films on titanium substrates by electrodeposition under pulse current in Journal of the Ceramic Society of Japan*, 116(1349), 68-73.
 - Hedberg, Y. S., & Odnevall Wallinder, I. (2016). *Metal release from stainless steel in biological environments: A review in Biointerphases*, 11(1), 018901.
 - Hedberg, Y. S., & Odnevall Wallinder, I. (2016). *Metal release from stainless steel in biological environments: A review in Biointerphases*, 11(1), 018901.
 - Heikkilä, J. (2011). *Use of bioactive glasses as bone substitutes in orthopaedics and traumatology in Bioactive Glasses* (pp. 189-208). Woodhead Publishing.
 - Heise, S., Rivera, L. R., & Boccaccini, A. R. (2019). *Bioactive glass containing coatings by electrophoretic deposition: development and applications in Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses* (pp. 3-33). Woodhead Publishing.
 - Henao, J., Sotelo-Mazon, O., Giraldo-Betancur, A. L., Hincapie-Bedoya, J., Espinosa-Arbelaez, D. G., Poblano-Salas, C., ... & Martinez-Gomez, L. (2020). *Study of HVOF-sprayed hydroxyapatite/titania graded coatings under in-vitro conditions in Journal of Materials Research and Technology*, 9(6), 14002-14016.
 - Hench, L. L. (2006). *The story of Bioglass® in Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967-978.

- Hench, L. L., Jones, J. R. (2015). *Bioactive glasses: frontiers and challenges in Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 194.
- Hildebrand, H. F. (2013). *Biomaterials—a history of 7000 years in BioNano-Materials*, 14(3-4), 119-133.
- Hinderliter, B. R., Croll, S. G., Tallman, D. E., Su, Q., & Bierwagen, G. P. (2006). *Interpretation of EIS data from accelerated exposure of coated metals based on modeling of coating physical properties in Electrochimica acta*, 51(21), 4505-4515.
- Höhn, S., Braem, A., Neirinck, B., & Virtanen, S. (2017). *Albumin coatings by alternating current electrophoretic deposition for improving corrosion resistance and bioactivity of titanium implants in Materials Science and Engineering: C*, 73, 798-807
- Horsley, G. H. R. (Ed.). (2011). *Galen Method of Medicine* (Vol. 517). Harvard University Press. p.420.
- Hossain, A., Roy, S., & Guin, P. S. (2017). *The importance of advance bio-materials in modern technology: a review in Asian Journal of Research in Chemistry*, 10(4), 441-453.
- Hosseini, S. H., Kazemian, M., Ghorbanzadeh, S. (2015). *A brief overview of cellular and molecular mechanisms of osseointegration in Bone*, 12, 13.
- Hu, H. B., Lin, C. J., Hu, R., & Leng, Y. (2002). *A study on hybrid bioceramic coatings of HA/poly (vinyl acetate) co-deposited electrochemically on Ti–6Al–4V alloy surface in Materials Science and Engineering: C*, 20(1-2), 209-214.
- Hu, H., Lin, C., Lui, P. P. Y., & Leng, Y. (2003). *Electrochemical deposition of hydroxyapatite with vinyl acetate on titanium implants in Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 65(1), 24-29.
- Hu, Y., Wang, Z., Ai, J., Bu, S., & Liu, H. (2021). *Preparation of coating on the titanium surface by micro-arc oxidation to improve corrosion resistance in Coatings*, 11(2), 230.
- Huang, J., & Best, S. (2014). *Ceramic biomaterials for tissue engineering in Tissue engineering using ceramics and polymers*, 3-34.
- Huang, Y. S., McGowan, T., Lee, R., & Ivanovski, S. (2017). *7.23 dental implants: Biomaterial properties influencing osseointegration*.
- Hudecki, A., Kiryczyński, G., Łos, M. J. (2019). *Biomaterials, definition, overview in Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine* (pp. 85-98). Academic Press.
- Hussain, M., Askari Rizvi, S. H., Abbas, N., Sajjad, U., Shad, M. R., Badshah, M. A., Malik, A. I. (2021). *Recent Developments in Coatings for Orthopedic Metallic Implants in Coatings*, 11(7), 791.
- Hussein, S. M., & Mohammed, M. T. (2019). *Pure and bilayer sol-gel nanolayers derived on a novel Ti surface for load bearing applications in Materials Today: Proceedings*, 18, 2217-2224.
- Inguanta, R., Ferrara, G., Piazza, S., & Sunseri, C. (2012). *A new route to grow oxide nanostructures based on metal displacement deposition in Lanthanides oxy/hydroxides growth in Electrochimica acta*, 76, 77-87.

- Inguanta, R., Piazza, S., & Sunseri, C. (2008). Novel procedure for the template synthesis of metal nanostructures. *Electrochemistry Communications*, 10(4), 506-509.
- Inguanta, R., Piazza, S., & Sunseri, C. (2009). *Synthesis of self-standing Pd nanowires via galvanic displacement deposition in Electrochemistry communications*, 11(7), 1385-1388.
- *International Centre for Diffraction Data, Powder Diffraction File, 2007. Pennsylvania USA*
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). *Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods in Research in pharmaceutical sciences*, 9(6), 385.
- Isa, N. N. C., Mohd, Y., & Yury, N. (2012, December). *Electrodeposition of hydroxyapatite (HAp) coatings on etched titanium mesh substrate in 2012 IEEE Colloquium on Humanities, Science and Engineering (CHUSER)* (pp. 771-775). IEEE.
- ISO,10993-5, BiologicalEvaluationofMedicalDevices – Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity, 2009
- İzmir, M., Ercan, B. (2019). *Anodization of titanium alloys for orthopedic applications in Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 13(1), 28-45.
- Jaafar, A., Hecker, C., Árki, P., & Joseph, Y. (2020). *Sol-gel derived hydroxyapatite coatings for titanium implants: A review in Bioengineering*, 7(4), 127, p.5
- Jacquet, P. A. (1956). *Electrolytic and chemical polishing in Metallurgical Reviews*, 1(1), 157-238.
- Jakubowicz, J., & Adameks, G. (2013). *Porous Nanostructure Ti Alloys for Hard Tissue Implant Applications in Nanomaterials* (pp. 97-136). Apple Academic Press.
- Jang, Y., Choi, W. T., Johnson, C. T., García, A. J., Singh, P. M., Breedveld, V., ... & Champion, J. A. (2018). *Inhibition of bacterial adhesion on nanotextured stainless steel 316L by electrochemical etching in ACS biomaterials science & engineering*, 4(1), 90-97.
- Jegannathan, S., Narayanan, T. S., Ravichandran, K., & Rajeswari, S. (2006). *Formation of zinc phosphate coating by anodic electrochemical treatment in Surface and Coatings Technology*, 200(20-21), 6014-6021.
- Jin, R. M., & Sultana, N. (2018). *Osteoblast adhesion and proliferation on porous chitosan/polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering application in Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 14(4), 495-499;
- Jin, W., Chu, P. K. (2019). *Orthopedic implants. In Encyclopedia of Biomedical Engineering* (pp. 425-439). Elsevier.
- Jing, W., Zhang, M., Jin, L., Zhao, J., Gao, Q., Ren, M., & Fan, Q. (2015). *Assessment of osteoinduction using a porous hydroxyapatite coating prepared by micro-arc oxidation on a new titanium alloy in International Journal of Surgery*, 24, 51-56.
- Jorcin, J. B., Orazem, M. E., Pébère, N., & Tribollet, B. (2006). *CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy in Electrochimica Acta*, 51(8-9), 1473-1479.

- Joy-anne, N. O., Su, Y., Lu, X., Kuo, P. H., Du, J. Zhu, D. (2019). *Bioactive glass coatings on metallic implants for biomedical applications* in *Bioactive materials*, 4, 261-270.
- Jüttner, K. (1990). *Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) of corrosion processes on inhomogeneous surfaces* in *Electrochimica Acta*, 35(10), 1501-1508.
- Kaliaraj, G. S., Bavanilathamuthiah, M., Kirubaharan, K., Ramachandran, D., Dharini, T., Viswanathan, K., Vishwakarma, V. (2016). *Bio-inspired YSZ coated titanium by EB-PVD for biomedical applications* in *Surface and Coatings Technology*, 307, 227-235.
- Kaliaraj, G. S., Vishwakarma, V., Kirubaharan, K., Dharini, T., Ramachandran, D., Muthaiah, B. (2018). *Corrosion and biocompatibility behaviour of zirconia coating by EBPVD for biomedical applications* in *Surface and Coatings Technology*, 334, 336-343.
- Karatutlu, A., Barhoum, A., & Sapelkin, A. (2018). *Liquid-phase synthesis of nanoparticles and nanostructured materials. In Emerging applications of nanoparticles and architecture nanostructures* (pp. 1-28). Elsevier.
- Kathavate, V. S., Pawar, D. N., Bagal, N. S., & Deshpande, P. P. (2020). *Role of nano ZnO particles in the electrodeposition and growth mechanism of phosphate coatings for enhancing the anti-corrosive performance of low carbon steel in 3.5% NaCl aqueous solution* in *Journal of Alloys and Compounds*, 823, 153812.
- Kavitha, C., Narayanan, T. S., Ravichandran, K., Park, I. S., & Lee, M. H. (2014). *Deposition of zinc-zinc phosphate composite coatings on steel by cathodic electrochemical treatment* in *Journal of Coatings Technology and Research*, 11(3), 431-442.
- Kenney, C., Dick, S., Lea, J., Liu, J., & Ebraheim, N. A. (2019). *A systematic review of the causes of failure of Revision Total Hip Arthroplasty* in *Journal of orthopaedics*, 16(5), 393-395.
- Khatod, M., Cafri, G., Inacio, M. C., Schepps, A. L., Paxton, E. W., & Bini, S. A. (2015). *Revision total hip arthroplasty: factors associated with re-revision surgery* in *JBJS*, 97(5), 359-366.
- Khelifi, K., Dhiflaoui, H., Ben Rhouma, A., Faure, J., Benhayoune, H., & Ben Cheikh Laarbi, A. (2021). *Nanomechanical Behavior, Adhesion and Corrosion Resistance of Hydroxyapatite Coatings for Orthopedic Implant Applications* in *Coatings*, 11(4), 477.
- Kiilakoski, J., Puranen, J., Heinonen, E., Koivuluoto, H., & Vuoristo, P. (2019). *Characterization of powder-precursor HVOF-sprayed Al₂O₃-YSZ/ZrO₂ coatings* in *Journal of Thermal Spray Technology*, 28(1), 98-107.
- Kikuchi, M., Itoh, S., Ichinose, S., Shinomiya, K., & Tanaka, J. (2001). *Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo* in *Biomaterials*, 22(13), 1705-1711.
- Kim, H. W., Kim, H. E., Salih, V., Knowles, J. C. (2005). *Sol-gel-modified titanium with hydroxyapatite thin films and effect on osteoblast-like cell responses* in *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials*,

- and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 74(3), 294-305.
- Kołodziejczak-Radzimska, A., & Jesionowski, T. (2014). Zinc oxide—from synthesis to application: a review in *Materials*, 7(4), 2833-2881.
 - Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review in *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63.
 - Koutsopoulos, S. (2002). Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods in *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 62(4), 600-612.
 - Kühn, C. G. (1821). *Claudii Galeni opera omnia*, XIII, pp.941-942. Leipzig: Knobloch, 1833.
 - Kumari, R., & Majumdar, J. D. (2017). Studies on corrosion resistance and bio-activity of plasma spray deposited hydroxylapatite (HA) based TiO₂ and ZrO₂ dispersed composite coatings on titanium alloy (Ti-6Al-4V) and the same after post spray heat treatment in *Applied Surface Science*, 420, 935-943
 - Łabowska, M. B., Michalak, I., & Detyna, J. (2019). Methods of extraction, physicochemical properties of alginates and their applications in biomedical field—a review in *Open Chemistry*, 17(1), 738-762.
 - Landolt, D. (1987). Fundamental aspects of electropolishing in *Electrochimica Acta*, 32(1), 1-11.
 - Lavos-Valereto, I. C., Woly nec, S., Deboni, M. C. Z., & König Jr, B. (2001). In vitro and in vivo bio-compatibility testing of Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating in *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 58(6), 727-733.
 - Lazzari, L., Pedferri, P., & Ormellese, M. (2006). Protezione catodica. poli press.
 - Lee, D., & Kumta, P. N. (2010). Chemical synthesis and stabilization of magnesium substituted brushite in *Materials Science and Engineering: C*, 30(7), 934-943.
 - LeGeros, R. Z. (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates in *Clinical Orthopaedics and Related Research*[®], 395, 81-98.
 - Li, H. Y., Huang, D. N., Ren, K. F., & Ji, J. (2020). Inorganic-polymer composite coatings for biomedical devices in *Smart Materials in Medicine*.
 - Li, P., Zhang, X., Xu, R., Wang, W., Liu, X., Yeung, K. W., & Chu, P. K. (2013). Electrochemically deposited chitosan/Ag complex coatings on biomedical NiTi alloy for antibacterial application in *Surface and Coatings Technology*, 232, 370-375.
 - Ling, T., Lin, J., Tu, J., Liu, S., Weng, W., Cheng, K., ... & Han, G. (2013). Mineralized collagen coatings formed by electrochemical deposition in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(12), 2709-2718.
 - Lin-Vien, D., Colthup, N. B., Fateley, W. G., & Grasselli, J. G. (1991). *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. Elsevier.

- Liu, D. M., Yang, Q., & Troczynski, T. (2002). *Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates* in *Biomaterials*, 23(3), 691-698.
- Liu, X., Morra, M., Carpi, A., & Li, B. (2008). *Bioactive calcium silicate ceramics and coatings* in *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(8), 526-529.
- Liu, Y., Luo, D., & Wang, T. (2016). *Hierarchical structures of bone and bio-inspired bone tissue engineering* in *Small*, 12(34), 4611-4632
- Liu, Y., Luo, D., Liu, S., Fu, Y., Kou, X., Wang, X., ... & Zhou, Y. (2014). *Effect of nanostructure of mineralized collagen scaffolds on their physical properties and osteogenic potential* in *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(6), 1049-1060.
- Lopresti, F., Pavia, F. C., Vitrano, I., Kersaudy-Kerhoas, M., Brucato, V., & La Carrubba, V. (2020). *Effect of hydroxyapatite concentration and size on morpho-mechanical properties of PLA-based randomly oriented and aligned electrospun nanofibrous mats* in *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 101, 103449.
- Maier, S. A. (2007). *Plasmonics: fundamentals and applications*. Springer Science & Business Media.
- Mańkiewicz, M., Wach, R. A., & Nawrotek, K. (2021). *Investigation of Parameters Influencing Tubular-Shaped Chitosan-Hydroxyapatite Layer Electrodeposition* in *Molecules*, 26(1), 104.
- Manam, N. S., Harun, W. S. W., Shri, D. N. A., Ghani, S. A. C., Kurniawan, T., Ismail, M. H., & Ibrahim, M. H. I. (2017). *Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review* in *Journal of Alloys and Compounds*, 701, 698-715.
- Marin, E., Boschetto, F., & Pezzotti, G. (2020). *Biomaterials and biocompatibility: An historical overview* in *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(8), 1617-1633.
- Martín-Palma, R. J., & Lakhtakia, A. (2013). *Vapor-deposition techniques in Engineered Biomimicry* (pp. 383-398). Elsevier Inc.
- Mas-Moruno, C., Su, B., Dalby, M. J. (2019). *Multifunctional coatings and nanotopographies: toward cell instructive and antibacterial implants* in *Advanced healthcare materials*, 8(1), 1801103.
- McKeen, L. W. (2014). *Plastics used in medical devices* in *Handbook of polymer applications in medicine and medical devices*. William Andrew Publishing.
- Minagar, S., Berndt, C. C., Wang, J., Ivanova, E., & Wen, C. (2012). *A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces* in *Acta biomaterialia*, 8(8), 2875-2888.
- Minozzi, S., Fornaciari, G., Musco, S., & Catalano, P. (2007). *A gold dental prosthesis of Roman Imperial Age*. In *The American journal of medicine*, 120(5), e1-e2.
- Mittal, M., Nath, S. K., & Prakash, S. (2011). *Characterization of plasma sprayed hydroxyapatite coatings on AISI 316L SS and titanium substrate and their corrosion behavior in simulated body fluid* in *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering*, 10(11), 1041-1049.
- Mohandoss, S., Sureshkumar, S., Balasubramani, V., Venkatachalapathy, B., Sridhar, T. M. (2017). *Bioinert nano yttria stabilized zirconia coatings on 316L SS for dental applications* in *J. Ceram. Process. Res*, 18, 313-319.

- Moore, B., Asadi, E., & Lewis, G. (2016). *Deposition methods for microstructured and nanostructured coatings on metallic bone implants: a review* in *Advances in Materials Science and Engineering*, 2017
- Muffly, T. M., Tizzano, A. P., & Walters, M. D. (2011). *The history and evolution of sutures in pelvic surgery* in *Journal of the royal society of medicine*, 104(3), 107-112.
- Mulvaney, P. (1996). *Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles* in *Langmuir*, 12(3), 788-800.
- Murugadoss, A., & Chattopadhyay, A. (2007). *A 'green' chitosan - silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst* in *Nanotechnology*, 19(1), 015603.
- Nagarajan, S., Rajendran, N. (2009). *Surface characterisation and electrochemical behaviour of porous titanium dioxide coated 316L stainless steel for orthopaedic applications* in *Applied Surface Science*, 255(7), 3927-3932.
- Nair, L. S., Laurencin, C. T. (2007). *Biodegradable polymers as biomaterials* in *Progress in polymer science*, 32(8-9), 762-798.
- Nawrotek, K., & Grams, J. (2021). *Understanding Electrodeposition of Chitosan–Hydroxyapatite Structures for Regeneration of Tubular-Shaped Tissues and Organs* in *Materials*, 14(5), 1288.
- Niinomi, M., Narushima, T., Nakai, M. (Eds.). (2015). *Advances in metallic Biomaterials: Tissues, materials and biological reactions* (Vol. 3). Springer
- Noguez, C. (2007). *Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment* in *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(10), 3806-3819
- Nourouzi, S., Azizpour, M. J., & Salimijazi, H. R. (2014). *Parametric study of residual stresses in HVOF thermally sprayed WC–12Co coatings* in *Materials and Manufacturing Processes*, 29(9), 1117-1125.
- Nur, A., Setyawan, H., Widjaja, A., & Lenggono, I. W. (2014). *Electrochemical processes for the formation of hydroxyapatite powders* in *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 9(3), 168.
- Ong, K. L., Lovald, S., & Black, J. (2014). *Orthopaedic biomaterials in research and practice*. CRC press.
- Orazem, M. E., & Tribollet, B. (2008). *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- P. Pedferri (2015). *Corrosione e protezione dei materiali metallici*, polipress
- Paital, S. R., & Dahotre, N. B. (2009). *Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies* in *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 66(1-3), p.47
- Paloucek, F. P. (2007). *Poisoning and toxicology handbook*. CRC Press.
- Pan, C., Zhou, Z., Yu, X. (2018). *Coatings as the useful drug delivery system for the prevention of implant-related infections* in *Journal of orthopaedic surgery and research*, 13(1), 1-11.
- Pang, X., & Zhitomirsky, I. (2007). *Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite chitosan coating* in *Materials Characterization*, 58(4), 339-348.
- Patel, K. D., El-Fiqi, A., Lee, H. Y., Singh, R. K., Kim, D. A., Lee, H. H., & Kim, H. W. (2012). *Chitosan–nanobioactive glass electrophoretic coatings*

- with bone regenerative and drug delivering potential in *Journal of Materials Chemistry*, 22(47), 24945-24956.
- Patella, B., Inguanta, R., Piazza, S., & Sunseri, C. (2017). A nanostructured sensor of hydrogen peroxide. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 245, 44-54.
 - Paul, S., & Mandal, C. (2013). Biocompatibly coated 304 stainless steel as superior corrosion-resistant implant material to 316L steel in *Journal of materials engineering and performance*, 22(10), 3147-3154.
 - Pawłowski, Ł., Bartmański, M., Strugała, G., Mielewczyk-Gryń, A., Jażdżewska, M., & Zieliński, A. (2020). Electrophoretic deposition and characterization of Chitosan/Eudragit E 100 coatings on titanium substrate in *Coatings*, 10(7), 607.
 - Paz Martínez-Viademonte, M., Abrahami, S. T., Hack, T., Burchardt, M., & Terryn, H. (2020). A review on anodizing of aerospace aluminum alloys for corrosion protection in *Coatings*, 10(11), 1106.
 - Pedferri, P., & Ormellese, M. (2018). *Corrosion science and engineering*. Italy: Springer.
 - Penel, G., Leroy, G., Rey, C., & Bres, E. (1998). MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO vibrational modes in synthetic and biological apatites in *Calcified tissue international*, 63(6), 475-481.
 - Penel, G., Leroy, N., Van Landuyt, P., Flautre, B., Hardouin, P., Lemaitre, J., & Leroy, G. (1999). Raman microspectrometry studies of brushite cement: in vivo evolution in a sheep model in *Bone*, 25(2), 81S-84S
 - Pishbin, F., Mourino, V., Gilchrist, J. B., McComb, D. W., Kreppel, S., Salih, V., ... & Boccaccini, A. R. (2013). Single-step electrochemical deposition of antimicrobial orthopaedic coatings based on a bioactive glass/chitosan/nano-silver composite system in *Acta biomaterialia*, 9(7), 7469-7479.
 - Pishbin, F., Simchi, A., Ryan, M. P., & Boccaccini, A. R. (2011). Electrophoretic deposition of chitosan/45S5 Bioglass® composite coatings for orthopaedic applications in *Surface and Coatings Technology*, 205(23-24), 5260-5268.
 - Purcell, F. J., & Bello, J. M. (1990, November). Fluorescence-free Raman spectra of polymers in *Raman and Luminescence Spectroscopies in Technology II* (Vol. 1336, pp. 135-143). International Society for Optics and Photonics.
 - Rabiee, S. M., Nazparvar, N., Azizian, M., Vashae, D., & Tayebi, L. (2015). Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review in *Ceramics International*, 41(6), 7241-7251.
 - Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103-25108.
 - Ralston, S. H. (2013). Bone structure and metabolism in *Medicine*, 41(10), pp.581-585.
 - Rath, P. C., Besra, L., Singh, B. P., & Bhattacharjee, S. (2012). Titania/hydroxyapatite bi-layer coating on Ti metal by electrophoretic deposition: Characterization and corrosion studies in *Ceramics International*, 38(4), 3209-3216.
 - Reddy, M., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds in *Polymers*, 13(7), 1105.
 - Revie, R. W. (Ed.). (2011). *Uhlig's corrosion handbook* (Vol. 51). John Wiley & Sons.
 - Richardson, T. J. (2009). *Shreir's corrosion*. Elsevier.

- Roberge, P. R. (2019). *Handbook of corrosion engineering*. McGraw-Hill Education.
- Robertson, S. F., Bandyopadhyay, A., Bose, S. (2019). *Titania nanotube interface to increase adhesion strength of hydroxyapatite sol-gel coatings on Ti-6Al-4V for orthopedic applications in Surface and Coatings Technology*, 372, 140-147.
- *Ruff Database*. R.T. Downs, M. Hall-Wallace, The American Mineralogist Crystal Structure Database.
- Saberi, F., Boroujeny, B. S., Doostmohamdi, A., Baboukani, A. R., Asadikiya, M. (2018). *Electrophoretic deposition kinetics and properties of ZrO₂ nano coatings in Materials Chemistry and Physics*, 213, 444-454.
- Saidi, R., Raeissi, K., Ashrafizadeh, F., & Kharaziha, M. (2021). *The effect of zinc oxide coating morphology on corrosion performance of Ti-6Al-4V alloys in Journal of Alloys and Compounds*, 160771.
- Saladin, K. S., & Porth, C. (2010). *Anatomy & physiology: the unity of form and function (Vol. 5)*. New York, NY, USA: McGraw-Hill.
- Samide, A., Brătulescu, G., Merișanu, C., & Cioateră, N. (2019). *Anticorrosive coating based on poly (vinyl acetate) formed by electropolymerization on the copper surface in Journal of Applied Polymer Science*, 136(14), 47320.
- Sankara Narayanan, T. S. N. (2005). *Surface pretreatment by phosphate conversion coatings-A review in Reviews in Advanced Materials Science*, 9, 130-177.
- Sanpui, P., Chattopadhyay, A., & Ghosh, S. S. (2011). *Induction of apoptosis in cancer cells at low silver nanoparticle concentrations using chitosan nanocarrier in ACS applied materials & interfaces*, 3(2), 218-228.
- Sarkar, P., & Nicholson, P. S. (1996). *Electrophoretic deposition (EPD): mechanisms, kinetics, and application to ceramics in Journal of the American Ceramic Society*, 79(8), 1987-2002.
- Sauer, G. R., Smith, D. M., Cahalane, M., Wu, L. N., & Wuthier, R. E. (2003). *Intracellular zinc fluxes associated with apoptosis in growth plate chondrocytes in Journal of cellular biochemistry*, 88(5), 954-969.
- Sauer, G. R., Zunic, W. B., Durig, J. R., & Wuthier, R. E. (1994). *Fourier transform Raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates in Calcified tissue international*, 54(5), 414-420.
- Sharp, P. A., & Langer, R. (2011). *Promoting convergence in biomedical science in Science*, 333(6042), 527-527.
- Shchigolev, P. V. (1970). *Electrolytic And Chemical Polishing Of Metals*.
- Shen, X., Hu, Y., Xu, G., Chen, W., Xu, K., Ran, Q., ... & Cai, K. (2014). *Regulation of the biological functions of osteoblasts and bone formation by Zn-incorporated coating on microrough titanium in ACS applied materials & interfaces*, 6(18), 16426-16440.
- Shi, Y. Y., Li, M., Liu, Q., Jia, Z. J., Xu, X. C., Cheng, Y., & Zheng, Y. F. (2016). *Electrophoretic deposition of graphene oxide reinforced chitosan-hydroxyapatite nanocomposite coatings on Ti substrate in Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(3), 48.
- Shibata, H., Yokoi, T., Goto, T., Kim, I. Y., Kawashita, M., Kikuta, K., & Ohtsuki, C. (2013). *Behavior of hydroxyapatite crystals in a simulated body*

- fluid: effects of crystal face* in *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 121(1417), 807-812.
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., & Dash, D. (2007). *Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles* in *Nanotechnology*, 18(22), 225103.
 - Sikkema, R., Baker, K., & Zhitomirsky, I. (2020). *Electrophoretic deposition of polymers and proteins for biomedical application* in *Advances in Colloid and Interface Science*, 102272.
 - Singh, H., Rana, P. K., Singh, J., Singh, S., Prakash, C., & Królczyk, G. (2020). *Plasma Spray Deposition of HA–TiO₂ Composite Coating on Ti–6Al–4V Alloy for Orthopedic Applications* in *Advances in Materials Processing* (pp. 13-20). Springer, Singapore.
 - Singh, J., Chatha, S. S., & Singh, H. (2021). *Characterization and corrosion behavior of plasma sprayed calcium silicate reinforced hydroxyapatite composite coatings for medical implant applications* in *Ceramics International*, 47(1), 782-792.
 - Singh, M., Singh, S., Prasad, S., & Gambhir, I. S. (2008). *Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles* in *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(3), 115-122.
 - Singh, S., Singh, V., Aggarwal, S., & Mandal, U. K. (2010). *Synthesis of brushite nanoparticles at different temperatures* in *Chemical Papers*, 64(4), 491-498.
 - Sivashankari, P. R., Prabakaran, M. (2017). *Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan* in *Chitosan Based Biomaterials Volume 1* (pp. 117-133). Woodhead Publishing.
 - Snyder, R. L., & Jenkins, R. (2012). *Introduction to X-ray powder diffractometry*. Wiley-Interscience.
 - Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. John Wiley & Sons.
 - Song, J., Winkeljann, B., & Lieleg, O. (2020). *Biopolymer-Based Coatings: Promising Strategies to Improve the Biocompatibility and Functionality of Materials Used in Biomedical Engineering* in *Advanced Materials Interfaces*, 7(17), 2000850
 - Song, Y., Dong, K., Shan, D., & Han, E. H. (2013). *Investigation of a novel self-sealing pore micro-arc oxidation film on AM60 magnesium alloy* in *Journal of Magnesium and Alloys*, 1(1), 82-87.
 - Sonseca, A., Madani, S., Rodríguez, G., Hevilla, V., Echeverría, C., Fernández-García, M., ... & López, D. (2020). *Multifunctional PLA blends containing chitosan mediated silver nanoparticles: Thermal, mechanical, antibacterial, and degradation properties* in *Nanomaterials*, 10(1), 22.
 - Sorkhi, L., Farrokhi-Rad, M., & Shahrabi, T. (2019). *Electrophoretic deposition of hydroxyapatite–chitosan–titania on stainless steel 316 L* in *Surfaces*, 2(3), 458-467.
 - Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Martins, J. T., Casariego, A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). *Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings* in *Food Hydrocolloids*, 24(4), 330-335

- Stafford, O. A., Hinderliter, B. R., & Croll, S. G. (2006). *Electrochemical impedance spectroscopy response of water uptake in organic coatings by finite element methods* in *Electrochimica Acta*, 52(3), 1339-1348.
- Stevanovic, M., Došić, M., Jankovic, A., Kojic, V., Vukasinovic-Sekulic, M., Stojanovic, J., ... & Miskovic-Stankovic, V. (2018). *Gentamicin-loaded bioactive hydroxyapatite/chitosan composite coating electrodeposited on titanium* in *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(12), 3994-4007.
- Sturmberg, J. P., & Martin, C. (Eds.). (2013). *Handbook of systems and complexity in health*. Springer Science & Business Media.
- Sumita, M., Hanawa, T., Ohnishi, I., & Yoneyama, T. (2003). *Failure processes in biometallic materials*.
- Surmenev, R. A., Surmeneva, M. A., & Ivanova, A. A. (2014). *Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis—a review* in *Acta biomaterialia*, 10(2), 557-579.
- Talha, M., Ma, Y., Kumar, P., Lin, Y., & Singh, A. (2019). *Role of protein adsorption in the bio corrosion of metallic implants—A review* in *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 494-506.
- Tan, G., Xu, J., Chirume, W. M., Zhang, J., Zhang, H., & Hu, X. (2021). *Anti-bacterial and Anti-Inflammatory Coating Materials for Orthopedic Implants: A Review* in *Coatings*, 11(11), 1401.
- Tang, Y. C., Katsuma, S., Fujimoto, S., & Hiromoto, S. (2006). *Electrochemical study of Type 304 and 316L stainless steels in simulated body fluids and cell cultures* in *Acta Biomaterialia*, 2(6), 709-715.
- Thanh, D. T. M., Nam, P. T., Phuong, N. T., Van Anh, N., Hoang, T., & Dai Lam, T. (2013). *Controlling the electrodeposition, morphology and structure of hydroxyapatite coating on 316L stainless steel* in *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 2037-2045.
- Tikhonov, V. E., Stepnova, E. A., Babak, V. G., Yamskov, I. A., Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., ... & Varlamov, V. P. (2006). *Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2 (3)-(dodec-2-enyl) succinoyl-derivatives* in *Carbohydrate polymers*, 64(1), 66-72.
- Tjong, S. C., & Bao, S. (2007). *Structure and mechanical behavior of isotactic polypropylene composites filled with silver nanoparticles* in *e-Polymers*, 7(1).
- Toledo-Pereyra, L. H. (1973). *Galen's contribution to surgery* in *Journal of the history of medicine and allied sciences*, 28(4), 357-375.
- Toworfe, G. K., Composto, R. J., Shapiro, I. M., & Ducheyne, P. (2006). *Nucleation and growth of calcium phosphate on amine-, carboxyl- and hydroxyl-silane self-assembled monolayers* in *Biomaterials*, 27(4), 631-642.
- Trino, L. D., Dias, L. F., Albano, L. G., Bronze-Uhle, E. S., Rangel, E. C., Graeff, C. F., & Lisboa-Filho, P. N. (2018). *Zinc oxide surface functionalization and related effects on corrosion resistance of titanium implants* in *Ceramics International*, 44(4), 4000-4008.
- Trivedi, R. H., Apple, D. J., Pandey, S. K., Werner, L., Izak, A. M., Vasavada, A. R., & Ram, J. (2003). *Sir Nicholas Harold Ridley. He changed the world, so that we might better see it* in *Indian journal of ophthalmology*, 51(3), 211-216.
- Turdean-Ionescu, C., Stevansson, B., Izquierdo-Barba, I., García, A., Arcos, D., Vallet-Regí, M., & Edén, M. (2016). *Surface reactions of mesoporous*

- bioactive glasses monitored by solid-state NMR: Concentration effects in simulated body fluid* in *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(9), 4961-4974.
- Twu, Y. K., Chen, Y. W., & Shih, C. M. (2008). Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions. *Powder Technology*, 185(3), 251-257.
 - Vasilev, K., Sah, V., Anselme, K., Ndi, C., Mateescu, M., Dollmann, B., ... & Griesser, H. J. (2010). *Tunable antibacterial coatings that support mammalian cell growth* in *Nano letters*, 10(1), 202-207.
 - Vaz, J. M., Pezzoli, D., Chevallier, P., Campelo, C. S., Candiani, G., & Mantovani, D. (2018). *Antibacterial coatings based on chitosan for pharmaceutical and biomedical applications* in *Current pharmaceutical design*, 24(8), 866-885.
 - Velashjerdi, M., Soleymani, M., Mehrizi, M. Z. (2020). *Preparation of crack-free TiO₂ coating by active screen plasma annealing method* in *Materials Today Communications*, 25, 101316.
 - Wadhvani, C., Brindis, M., Kattadiyil, M. T., O'Brien, R., & Chung, K. H. (2018). *Colorizing titanium-6aluminum-4vanadium alloy using electrochemical anodization: Developing a color chart* in *The Journal of prosthetic dentistry*, 119(1), 26-28.
 - Wagner, W. R., Sakiyama-Elbert, S. E., Zhang, G., Yaszemski, M. J. (Eds.), (2020). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic Press.
 - Waltimo, T., Brunner, T. J., Vollenweider, M., Stark, W. J., & Zehnder, M. (2007). *Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5* in *Journal of dental research*, 86(8), 754-757.
 - Wang, D., & Bierwagen, G. P. (2009). *Sol-gel coatings on metals for corrosion protection* in *Progress in organic coatings*, 64(4), 327-338.
 - Wang, W., Wan, P., Liu, C., Tan, L., Li, W., Li, L., & Yang, K. (2015). *Degradation and biological properties of Ca-P contained micro-arc oxidation self-sealing coating on pure magnesium for bone fixation* in *Regenerative biomaterials*, 2(2), 107-118.
 - Wang, X. X., Hayakawa, S., Tsuru, K., & Osaka, A. (2001). *A comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H₂O₂-, and NaOH-treated titanium surfaces* in *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 54(2), 172-178.
 - Wang, X., Sang, L., Luo, D., & Li, X. (2011). *From collagen-chitosan blends to three-dimensional scaffolds: the influences of chitosan on collagen nanofibrillar structure and mechanical property* in *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 233-240.
 - Wang, X., Wang, G., Liu, L., & Zhang, D. (2016). *The mechanism of a chitosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation* in *Scientific reports*, 6(1), 1-8;
 - Warcaba, M., Kowalski, K., Kopia, A., & Moskalewicz, T. (2021). *Impact of Surface Topography, Chemistry and Properties on the Adhesion of Sodium Alginate Coatings Electrophoretically Deposited on Titanium Biomaterials* in *Metallurgical and Materials Transactions A*, 1-14.
 - Wei, M., Evans, J. H., Bostrom, T., & Grøndahl, L. (2003). *Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and*

- fluorapatite in *Journal of materials science: materials in medicine*, 14(4), 311-320.
- Williams, D. F. (2008). *On the mechanisms of biocompatibility in Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.
 - Winand, R. (1992). *Electrocrystallization-theory and applications in Hydrometallurgy*, 29(1-3), 567-598.
 - Silverman, D. C. (1991). *On ambiguities in modeling electrochemical impedance spectra using circuit analogues in Corrosion*, 47(2), 87-89.
 - Witecka, A., Valet, S., Basista, M., & Boccaccini, A. R. (2021). *Electrophoretically deposited high molecular weight chitosan/bioactive glass composite coatings on WE43 magnesium alloy in Surface and Coatings Technology*, 418, 127232.
 - Wu, W. Y., Chan, M. Y., Hsu, Y. H., Chen, G. Z., Liao, S. C., Lee, C. H., & Lui, P. W. (2019). *Bioapplication of TiN thin films deposited using high power impulse magnetron sputtering in Surface and Coatings Technology*, 362, 167-175.
 - Xia, F., & Jiang, L. (2008). *Bio-inspired, smart, multiscale interfacial materials in Advanced materials*, 20(15), 2842-2858.
 - Xue, T., Attarilar, S., Liu, S., Liu, J., Song, X., Li, L., ... & Tang, Y. (2020). *Surface modification techniques of titanium and its alloys to functionally optimize their biomedical properties: thematic review in Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1261.
 - Yadav, V. D., Jain, R., & Dandekar, P. (2017). *Influence of sodium hydroxide in enhancing the surface plasmon resonance of silver nanoparticles in Materials Research Express*, 4(8), 085015.
 - Yang, C. C., Huang, C. Y., Lin, C. C., & Yen, S. K. (2010). *Electrolytic Deposition of Collagen/HA Composite on Post HA/TiO₂ Coated Ti6Al4V Implant Alloy in Journal of The Electrochemical Society*, 158(2), E13.
 - Yang, H. H., Wang, X. S., Wang, Y. M., Wang, Y. L., & Zhang, Z. H. (2017). *Microarc oxidation coating combined with surface pore-sealing treatment enhances corrosion fatigue performance of 7075-T7351 Al alloy in different media in Materials*, 10(6), 609.
 - Yang, S., Jia, W. Z., Qian, Q. Y., Zhou, Y. G., & Xia, X. H. (2009). *Simple approach for efficient encapsulation of enzyme in silica matrix with retained bioactivity in Analytical chemistry*, 81(9), 3478-3484.
 - Yao, H. L., Hu, X. Z., Wang, H. T., Chen, Q. Y., Bai, X. B., Zhang, M. X., & Ji, G. C. (2019). *Microstructure and corrosion behavior of thermal-sprayed hydroxyapatite/magnesium composite coating on the surface of AZ91D magnesium alloy in Journal of Thermal Spray Technology*, 28(3), 495-503.
 - Yao, H. L., Wang, H. T., Bai, X. B., Ji, G. C., & Chen, Q. Y. (2018). *Improvement in mechanical properties of nano-structured HA/TiO₂ multilayer coatings deposited by high velocity suspension flame spraying (HVSFS) in Surface and Coatings Technology*, 342, 94-104.
 - Yun'an Qing, L. C., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., Wang, J., ... & Qin, Y. (2018). *Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies in International journal of nanomedicine*, 13, 3311.

- Zając, A., Hanuza, J., Wandas, M., & Dymińska, L. (2015). *Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy in Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114-120.
- Zanca, C., *Fabbricazione e caratterizzazione di thin film di perovskite* (tesi per la laurea magistrale in Ingegneria Chimica, 2018).
- Zarras, P., & Stenger-Smith, J. D. (2015). *Smart inorganic and organic pre-treatment coatings for the inhibition of corrosion on metals/alloys in Intelligent coatings for corrosion control*, 59-91
- Zeng, S., Ye, J., Cui, Z., Si, J., Wang, Q., Wang, X., ... & Chen, W. (2017). *Surface biofunctionalization of three-dimensional porous poly (lactic acid) scaffold using chitosan/OGP coating for bone tissue engineering in Materials Science and Engineering: C*, 77, 92-101.
- Zhang, J. X., & Hoshino, K. (2019). *Fundamentals of nano/microfabrication and scale effect. Molecular Sensors and Nanodevices; Zhang, JXJ, Hoshino, K., Eds*, 43-111
- Zhang, L. C., & Chen, L. Y. (2019). *A review on biomedical titanium alloys: recent progress and prospect. Advanced engineering materials*, 21(4), 1801215.
- Zhang, L., Pei, J., Wang, H., Shi, Y., Niu, J., Yuan, F., ... & Yuan, G. (2017). *Facile preparation of poly (lactic acid)/brushite bilayer coating on biodegradable magnesium alloys with multiple functionalities for orthopedic application in ACS applied materials & interfaces*, 9(11), 9437-9448.
- Zhang, X., Xiao, G. Y., Liu, B., Jiang, C. C., Li, N. B., & Lu, Y. P. (2016). *The formation of hydroxyapatite layer onto hopeite coating on stainless steel substrate in Corrosion Science*, 111, 216-229
- Zhang, Z., Sun, J., Hu, H., Wang, Q., & Liu, X. (2011). *Osteoblast-like cell adhesion on porous silicon-incorporated TiO₂ coating prepared by micro-arc oxidation in Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 97(2), 224-234.
- Zhao, X., Corcoran, S. G., & Kelley, M. J. (2011). *Sulfuric acid–methanol electrolytes as an alternative to sulfuric–hydrofluoric acid mixtures for electropolishing of niobium in Journal of Applied Electrochemistry*, 41(6), 633-643.
- Zhao, X., Li, H., Xu, Z., Li, K., Cao, S., & Jiang, G. (2017). *Selective preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/collagen coatings with three-dimensional network structure in Surface and Coatings Technology*, 322, 227-237.
- Zhao, Z., Wan, Y., Yu, M., Wang, H., Cai, Y., Liu, C., & Zhang, D. (2021). *Biocompatibility evaluation of micro textures coated with zinc oxide on Ti-6Al-4V treated by nanosecond laser in Surface and Coatings Technology*, 422, 127453.
- Zhou, A., Yu, H., Liu, J., Zheng, J., Jia, Y., Wu, B., Xiang, L. (2020). *Role of hippo-YAP signaling in osseointegration by regulating osteogenesis, angiogenesis, and osteoimmunology in Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 780.
- Zhu, H., Ji, J., Lin, R., Gao, C., Feng, L., & Shen, J. (2002). *Surface engineering of poly (d, l-lactic acid) by entrapment of chitosan-based derivatives for the promotion of chondrogenesis in Journal of Biomedical Materials Research:*

An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 62(4), 532-539.

- Zhuang, J., Lin, J., Li, J., Wang, H., Cheng, K., & Weng, W. (2016). *Electrochemical deposition of mineralized BSA/collagen coating in Materials Science and Engineering: C*, 66, 66-76.
- Zoroddu, M. A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., & Nurchi, V. M. (2019). *The essential metals for humans: a brief overview in Journal of inorganic biochemistry*, 195, 120-129.

Sitografia

<https://www.fnfresearch.com/news/global-orthopedic-implants-market>

<http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.02.0141%3Abook%3D7%3Achapter%3D12>

[http://www.pharmacy180.com/article/microscopic-anatomy-\(bone-cells\)-3487](http://www.pharmacy180.com/article/microscopic-anatomy-(bone-cells)-3487)

Ringraziamenti

Durante il corso degli anni di dottorato, numerose sono state le persone che hanno contribuito al raggiungimento di questo importante traguardo.

Ringrazio la prof.ssa Rosalinda Inguanta, che ha creduto fin da subito in me. Ricordo ancora quando, un mese dopo il mio ingresso nel laboratorio di Chimica Fisica Applicata, mi chiese:

- Se ti proponessi di partecipare all'esame di ammissione per il dottorato di ricerca, tu cosa mi risponderesti?
- Il dottorato?! Ma se ho appena iniziato il laboratorio!
- Pensaci.

Da quel giorno sono passati più di cinque anni: durante questi sono accaduti molteplici eventi che mi hanno fatto crescere sia professionalmente sia umanamente e per questo le sono molto grato.

Ringrazio tutti i colleghi del laboratorio di Chimica Fisica Applicata – e tra essi anche i numerosi tesisti che sono transitati durante gli anni – con i quali non solo ci siamo supportati (e sopportati) – una leggenda narra che il mancato inserimento di questa locuzione comporta l'invalidazione del titolo di dottore di ricerca – ma anche abbiamo condiviso momenti di leggerezza e allegria. Ho avuto modo di conoscere persone belle con le quali è nata una amicizia sincera: per me il laboratorio ChiFiApp è stata una seconda famiglia.

Ringrazio il prof. Francesco Carfi Pavia, la collega Elisa Capuana e il dott. Francesco Lopresti – appartenenti al laboratorio di *Tissue Engineering* diretto dai proff. Vincenzo La Carrubba e Valerio Brucato –: grazie al loro contributo la nostra ricerca ha avuto un significativo approfondimento da un punto di vista biologico.

Ringrazio la moltitudine di amici che per mia scelta non saranno qui citati dato che la memoria comincia a venir meno con l'avanzare dell'età: non potrei sopportare di dimenticare qualcuno. Anche a voi tutta la mia gratitudine per il vostro supporto.

Ringrazio la mia famiglia che mi ha dato la forza per andare avanti, un punto di riferimento in tutti questi anni. Questo ennesimo traguardo è il minimo compenso che da figlio dedico a loro per i numerosi sacrifici che hanno compiuto per i miei studi.

Un ultimo ringraziamento lo dedico alla mia compagna di vita, la musica: un'arte nobile che ho coltivato fin da bambino e che si è concretizzata con gli studi accademici al Conservatorio. Mi ha dato il dono della pazienza, dello spirito di abnegazione e del vedere al di là delle cose. Come un elettrone che può essere visto ora come onda ora come particella, così la mia vita sarà sempre un dualismo tra un musicista ed un ingegnere chimico.

Ricordati che sei sempre un musicista (cit.)

Claudio,

Palermo, 12 febbraio 2022

Attività divulgativa

Durante il periodo di dottorato, è stata svolta un'attività tecnico divulgativa con la partecipazione a convegni nazionali ed internazionali:

- *Galvanic deposition of Hydroxyapatite/Chitosan/Collagen coatings on 304 SS*, C.Zanca, G. Cordaro, E. Capuana, V. Brucato, F. Carfi Pavia, V. La Carrubba, G. Ghersi, R. Inguanta, The 15th International Conference on Chemical and Process Engineering - Napoli (Online), 23/05/2021 – 26/05/2021, Oral Presentation
- *Galvanic deposition of Chitosan-AgNPs as antibacterial coating*, C. Zanca, S. Carbone, B. Patella, F. Lopresti, V. Brucato, F. Carfi Pavia, V. La Carrubba, R. Inguanta, 72nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry - Jeju (Online), 29/08/2021 – 03/09/2021, Poster presentation
- *Hydroxyapatite/chitosan/collagen coating by galvanic coupling*, C. Zanca, G. Cordaro, E. Capuana, V. Brucato, F. Carfi Pavia, V. La Carrubba, G. Ghersi, R. Inguanta, 71st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry - Belgrade (Online), 31/08/2020 – 04/09/2020, Poster Presentation
- *Coatings compositi di HA/CS e HA/PVAc per applicazioni in campo ortopedico*, C.Zanca, I. Mendolia, G. Blanda, V. Brucato, F. Carfi Pavia, E. Capuana, G. Ghersi, V. La Carrubba, S. Piazza, C. Sunseri, R. Inguanta, Convegno Gricu 2019 – Palermo, 30/06/2019 – 03/07/2019, Poster presentation
- *Co-Deposition and characterization of Hydroxyapatite-Chitosan and Hydroxyapatite-Polyvinylacetate coatings on 304 SS for biomedical devices*, C. Zanca, I. Mendolia, G. Blanda, V. Brucato, F. Carfi Pavia, E. Capuana, G. Ghersi, V. La Carrubba, S. Piazza, C. Sunseri, R. Inguanta, 33rd International Conference on Surface Modification Technologies – Napoli, 26/06/2019 – 29/06/2019, Oral Presentation
- *Deposition and characterization of Hydroxyapatite-Chitosan coatings on 304 SS for biomedical devices*, C. Zanca, G. Blanda, V. Brucato, F. Carfi Pavia, E. Capuana, G. Ghersi, V. La Carrubba, S. Piazza, C. Sunseri, R. Inguanta, Eurofillers Polymerblends 2019 – Palermo, 24/04/2019 – 26/04/2019, Oral Presentation

Il lavoro di ricerca svolto ha finora prodotto le seguenti pubblicazioni su riviste:

- C. Zanca, V. Piazza, S. Agnello, B. Patella, F. Ganci, G. Aiello, S. Piazza, C. Sunseri, R. Inguanta, *Controlled solution-based fabrication of perovskite thin films directly on conductive substrate*, Thin Solid Films - Volume 733, 1 September 2021, 138806, <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2021.138806>
- I. Mendolia, C. Zanca, F. Ganci, G. Conoscenti, F. Carfì Pavia, V. Brucato, V. La Carrubba, F. Lopresti, S. Piazza, C. Sunseri, R. Inguanta, *Calcium phosphate/polyvinyl acetate coatings on SS304 via galvanic co-deposition for orthopedic implant applications*, Surface and Coatings Technology - Volume 408, 25 February 2021, 126771, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126771>
- C. Zanca, G. Cordaro, E. Capuana, V. Brucato, F. Carfì Pavia, V. La Carrubba, G. Gherzi, R. Inguanta, *Galvanic Deposition of Hydroxyapatite/Chitosan/Collagen Coatings on 304 Stainless Steel*, Chemical Engineering Transactions - Vol. 86, 2021, 10.3303/CET2186234
- C. Zanca, G. Cordaro, E. Capuana, V. Brucato, F. Carfì Pavia, V. La Carrubba, G. Gherzi, R. Inguanta, *Co-deposition and characterization of hydroxyapatite-chitosan and hydroxyapatite-polyvinylacetate coatings on 304 SS for biomedical devices*, Key Engineering Materials (Volume 813), 2019, 10.4028/www.scientific.net/KEM.813.1

Indice

Introduzione	1
Sezione I – <i>Status Quaestionis</i>	5
Capitolo 1 – <i>Biomaterial Science</i> : cenni storici e caratteri generali	6
1.1 Cenni storici	6
1.2 Biomateriale e biocompatibilità: un binomio inscindibile	10
1.2.1 Classificazione dei biomateriali	12
Capitolo 2 – Tessuto osseo e osteointegrazione: aspetti generali.....	14
2.1 Il tessuto osseo	14
2.1.1 Anatomia, morfologia e composizione delle ossa.....	15
2.2 Osteogenesi e rimodellamento osseo	19
2.3 Osteointegrazione.....	22
Capitolo 3 – Biomateriali metallici e corrosione.....	23
3.1 I metalli in campo ortopedico.....	24
3.1.1 Acciai	25
3.1.2 Leghe di cobalto.....	26
3.1.3 Leghe di titanio.....	27
3.2 Corrosione nel corpo umano	28
3.2.1 Tipi di corrosione	31
Capitolo 4 – <i>Coating</i> per metalli: materiali e metodi di deposizione.....	37
4.1 <i>Coating</i> : non solo una strategia di osteointegrazione.....	37
4.2 Materiali per <i>coating</i>	40
4.2.1 Materiali ceramici	41
4.2.2 Materiali polimerici.....	45
4.3 Metodi di deposizione	50
4.3.1 <i>Sol-gel</i>	51
4.3.2 <i>Electrochemical deposition</i>	53
4.3.3 <i>High Velocity Suspension Flame-Spray</i>	55
4.3.4 <i>Plasma Spraying</i>	57
4.3.5 <i>Micro Arc Oxydation (MAO)</i>	58
4.3.6 <i>Physical Vapor Deposition</i>	60
Sezione II – Progetto di ricerca	62
Capitolo 5 – Metodo di deposizione galvanica: aspetti generali.....	63

5.1	Il metodo di deposizione galvanica	63
5.2	Preparazione del substrato e anodi sacrificali	67
5.3	Preparazione SBF.....	68
5.4	Caratterizzazioni.....	69
5.4.1	Caratterizzazioni chimico-fisiche.....	69
5.4.2	Caratterizzazioni elettrochimiche.....	70
5.4.3	Citotossicità.....	70
Capitolo 6 – Studio dei pretrattamenti su acciaio AISI 316L per <i>coating</i> a base di fosfati di calcio		72
6.1	Pretrattamenti	72
6.1.1	<i>Electroetching</i>	72
6.1.2	<i>Anodizing</i>	74
6.1.3	<i>Phosphating</i>	76
6.2	Procedure sperimentali.....	77
6.2.1	Pretrattamenti: <i>electroetching, anodizing, phosphating</i>	78
6.2.2	Deposizione galvanica.....	78
6.3	Risultati	80
Capitolo 7 – <i>Coating</i> compositi di fosfati di calcio e <i>Bioglass</i> su acciaio AISI 316L		99
7.1	Procedure sperimentali.....	100
7.2	Risultati	102
Capitolo 8 – <i>Coating</i> compositi di fosfati di calcio e polivinilacetato su acciaio AISI 304		117
8.1	Procedure sperimentali.....	118
8.2	Risultati	118
Capitolo 9 – <i>Coating</i> compositi di fosfati di calcio, chitosano e collagene su acciaio AISI 304		137
9.1	Parte sperimentale	138
9.1.1	Deposizione galvanica.....	138
9.2	Risultati	140
Capitolo 10 – <i>Coating</i> compositi di chitosano e nanoparticelle di argento su acciaio AISI 304L		157
10.1	<i>Coating</i> ad azione antibatterica	157
10.2	Procedure sperimentali	160
10.2.1	Deposizione Galvanica.....	161
10.3	Risultati	162
Conclusioni		175
Analisi chimico-fisiche a confronto		176
Analisi elettrochimiche a confronto		179

Analisi biologiche a confronto	184
Ulteriori valutazioni generali	184
Ipotesi di sviluppi futuri della ricerca	185
Bibliografia	188
Sitografia	210
Ringraziamenti	211
Attività divulgativa.....	213