

Mehanizmi nastajanja biokompozitnih materijala u sustavima kalcijeva karbonata i biološki značajnih molekula

Štajner, Lara

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:934363>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Lara Štajner

**MEHANIZMI NASTAJANJA BIOKOMPOZITNIH
MATERIJALA U SUSTAVIMA KALCIJEVA
KARBONATA I BIOLOŠKI ZNAČAJNIH MOLEKULA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Damir Kralj

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Lara Štajner

**FORMATION MECHANISMS OF BIOCOMPOSITES
BASED ON CALCIUM CARBONATES AND
BIOLOGICALLY RELEVANT MOLECULES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Damir Kralj

Zagreb, 2018.

Ova je disertacija izrađena u Laboratoriju za procese taloženja Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Damira Kralja, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija kemije (smjer fizikalna kemija) na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je vezan uz projekt HRZZ-IP-2013-11-5055 „Bioinspired materials – Formation Mechanisms and Interactions“.

Zahvala

Zahvaljujem se mentoru Damiru Kralju na usmjeravanju i vođenju mog doktorata. Znam da nije uvijek bilo lako sa mnom, ali hvala što ste ostali uz mene i na mojoj strani. Puno sam naučila od Vas.

Na pomoći se moram zahvaliti i kolegicama (suputnicama) mog laboratorija: Jasminki Kontrec, Vesni Babić-Ivančić, Branki Njegić Džakuli, Ivi Buljan Meić, Nives Matijaković. Posebno bi istaknula Ljerku Brečević koja mi je jako pomogla sa svojim znanjem i podrškom.

Moj doktorat ne bi bio tako bogat da nisam imala tako veliku grupu suradnika: Nadica Maltar-Strmečki, Daniel Mark Lyons, Milivoj Plodinec, Zlatko Brkljača, David Matthew Smith, Ana-Sunčana Smith, Marko Ukrainczyk, Matija Gredičak, Ivanka Jerić, Atiđa Selmani, Darija Domazet Jurašin, Maja Dutour Sikirić, Gulia Magnabosco, Giuseppe Falini, Demetra Giuri, Claudia Tomasini, Matija Cvetnić, Tomislav Bolanča. Hvala svima...

Moram dodatno zahvalit na slušanju, smirivanju i savjetovanju Sanji, Aleksandri i Atidi. Hvala i Tamari na njevoj energiji i pozitivu. Milivoju hvala za kave na klupici, a Zlatku na pomoć i savjetovanje za predavanja. Nadici ne znam kako bi zahvalila za sve škole, putovanja, EPR-ove, slušanja, podrške, a i ponajviše učenju o svemu.

Normalno, ni zahvale ni ničega ne bi bilo da nije bilo mojih roditelja i brata, koju su mi cijeli život podrška. Dodatno bi se zahvalila i Mirku i Tanji na brizi i skrbi.

Na kraju, ali i najvažnija osoba u mom život je moj vjerni pratitelj Kiki. Hvala što si uz mene kad sam sretna, živčana i tužna. Ovaj doktorat je tvoj koliko i moj...

Sadržaj

SAŽETAK.....	VII
ABSTRACT	VIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Biomimetika.....	5
2.2. Kalcijev karbonat.....	7
2.3. Biokompozitni materijali u sustavima kalcijeva karbonata i biološki značajnih molekula	10
2.3.1. Polimeri i gelatori male molekulske mase	11
2.3.2. Derivati salicilne kiseline.....	17
2.3.3. Aminokiseline	21
§ 3. TEORIJSKA OSNOVICA.....	24
3.1. Procesi taloženja.....	24
3.1.1. Nukleacija	28
3.1.2. Rast kristala	29
3.1.2.1. Rast kontroliran prijenosom tvari u otopini	31
3.1.2.2. Rast kontroliran procesima na površini	34
3.1.3. Transformacija metastabilnih čvrstih faza.....	42
3.2. Rast kristala kalcijeva karbonata.....	43
3.2.1. Kinetika rasta kristala kalcijeva karbonata	43
3.2.2. Utjecaj aditiva na kinetiku rasta kristala kalcijeva karbonata	45
3.2.2.1. Model Kubote i Mullina	49
§ 4. EKSPERIMENTALNI DIO	54
4.1. Materijali	54
4.2. Eksperimentalni postupak	60
4.3. Metode.....	62
4.3.1. Potencijometrija.....	63
4.3.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija	63
4.3.3. Difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku.....	64
4.3.4. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom	65
4.3.5. Elektronska paramagnetska rezonancija	66
§ 5. REZULTATI I RASPRAVA	68
5.1. Taložni dijagram.....	68

5.2. Djelovanje aminokiselina na spontano taloženje kalcijeva karbonata.....	71
5.2.1. <i>Morfologija</i>	73
5.2.2. <i>Polimorfizam.....</i>	77
5.2.3. <i>Distorzija kristalne rešetke</i>	79
5.3. Djelovanje asparaginske kiseline na transformaciju vaterita u kalcit	85
5.4. Rast iniciran dodatkom kristalnog sjemena kalcita.....	96
5.4.1. <i>Interakcije aminokiselina s površinom kalcita.....</i>	99
5.4.1.1. <i>Kinetike rasta kalcita.....</i>	99
5.4.1.2. <i>PXRD.....</i>	107
5.4.1.3. <i>EPR spektroskopija</i>	110
5.4.2. <i>Kinetike rasta kalcita uz dodatak dipeptida.....</i>	113
5.4.3. <i>Kinetike rasta kalcita uz dodatak derivata salicilne kiseline</i>	120
5.4.3.1. <i>Kiralnost.....</i>	121
5.4.3.2. <i>Fleksibilnost lanca</i>	127
5.5. Sinteza biokompozitnih materijala kalcita i gelatora male molekulske mase	134
§ 6. ZAKLJUČAK	140
§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	144
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	146
§ 9. ŽIVOTOPIS	IX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

MEHANIZMI NASTAJANJA BIOKOMPOZITNIH MATERIJALA U SUSTAVIMA KALCIJEVA KARBONATA I BIOLOŠKI ZNAČAJNIH MOLEKULA

Lara Štajner
Institut Ruđer Bošković

Biom mineralizacija je proces nastajanja slabo topljivih soli u živim organizmima, uz prisustvo biološki značajnih makromolekula. Nastajanje biokompozita specifičnih fizičko-kemijskih svojstava predložak je za biomimetičku sintezu novih funkcionalnih materijala. Kalcijev karbonat odabran je kao model biom mineralizacije zbog složenosti sustava i makromolekula koje u tom procesu sudjeluju.

Sustavno je istraženo djelovanje malih organskih molekula (aminokiseline, dipeptidi i derivati salicilne kiseline) i ionotropnosti (gelatori male molekulske mase) na nukleaciju te rast kalcita. Utjecaj na nukleaciju ispitan je indirektno eksperimentima spontanog taloženja, dok je utjecaj na rast istražen dodatkom kristalnog sjemena kalcita. Navedenim istraživanjima dobiven je uvid u mehanizam i doseg interakcija malih organskih molekula i površine kalcita određivanjem Langmuirovih konstanti adsorpcije.

Dokazano je da polarne aminokiseline utječu na nukleaciju i rast, a ne samo kisele aminokiseline. Dipeptidi imaju veći utjecaj zbog sinergijskog djelovanja dviju funkcionalnih skupina aminokiselina. Najveći utjecaj uočen je dodatkom salicilnih derivata, koji bi se mogli koristiti kao nosači lijekova.

(150 stranica, 65 slika, 14 tablica, 96 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: kalcijev karbonat/ aminokiseline/ dipeptidi/ salicilna kiselina/ nosač lijeka/ biomimetika/ biom mineralizacija

Mentor: dr. sc. Damir Kralj, zn. savj. u trajnom zvanju

Rad prihvaćen: 06. lipnja 2018.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Vladislav Tomišić
2. dr. sc. Jasminka Kontrec, zn. sur.
3. dr. sc. Daniel Mark Lyons, v. zn. sur.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

FORMATION MECHANISMS OF BIOCOMPOSITES BASED ON CALCIUM CARBONATES AND BIOLOGICALLY RELEVANT MOLECULES

Lara Štajner
Ruđer Bošković Institute

Biom mineralization is the formation of sparingly soluble salts in living organisms, strongly influenced by biologically active macromolecules. Formation of biocomposites, with specific physico-chemical properties, is a suitable model for the biomimetic approach of new materials synthesis. Calcium carbonate was selected as a biom mineralization model due to the complexity of the system and the macromolecules involved in this process.

Systematic research was carried out on small organic molecules' influence (amino acids, dipeptides and derivatives of salicylic acid) and ionotropy (low molecular weight galators) on nucleation and calcite growth. Their influence on nucleation was investigated by experiments on spontaneous precipitation, while seeded precipitation was used for observing their influence on growth. Insight into the interactions between small organic molecules and calcite surfaces was gained from Langmuir adsorption constants.

Polar amino acids also influenced nucleation and growth, apart from acidic amino acids. Higher influence of dipeptides was observed due to the synergistic effect of two amino acid functional groups. The strongest influence was noted for salicylic derivatives, which could be used as a drug delivery system.

(150 pages, 65 figures, 14 tables, 96 references, original in Croatian)

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

Keywords: calcium carbonate/ amino acids/ dipeptides/ salicylic acid/ drug delivery/ biomimetics/ biom mineralization

Supervisor: Dr. Damir Kralj, Senior Scientist

Thesis accepted: 6th June 2018

Reviewers:

Dr. Vladislav Tomišić, Professor
Dr. Jasminka Kontrec, Research Associate
Dr. Daniel Mark Lyons, Senior Scientific Associate

§ 1. UVOD

Biomimetika je oponašanje modela, sustava ili procesa iz prirode. Sukladno tome, nove biokompozitne materijale moguće je sintetizirati prema modelima iz prirode, odnosno oponašanjem biomineralizacije.¹⁻³ Biomineralizacija je proces kojim organizmi proizvode čvrsta tkiva, kao što su kosti, zubi ili ljuštore školjaka. Biominerali su funkcionalni organsko-anorganski kompozitni materijali nastali pri kontroliranim uvjetima. Upravo zbog kontroliranih uvjeta u kojima nastaju, mehanička i kemijska svojstva biominerala su znatno bolja u usporedbi s njihovim geološkim i sintetskim analogima, što je primarno posljedica interakcija organskih biološki značajnih molekula s površinom rastućeg kristala. Stoga, nije začuđujuće što znanstvenici ulažu veliki trud u istraživanje biomimetičke sinteze inovativnih funkcionalnih materijala za napredne primjene te uz minimalan utjecaj na prirodne resurse.

Kao relevantni modelni sustav za istraživanje biomimetičke sinteze kompozitnih materijala, odabran je kalcijev karbonat (CaCO_3), ne samo zbog uloge u biomineralizaciji, već i zbog njegove široke i sveobuhvatne primijenjivosti.⁴⁻⁶ Poznato je da kalcijev karbonat može taložiti u obliku hidratiziranih soli te u obliku polimorfa (kalcit, aragonit i vaterit). Pri atmosferskom tlaku i temperaturi kalcit je najstabilnija modifikacija, dok su aragonit i vaterit metastabilne faze podložne transformaciji.

Postoji nekoliko strategija kontrole procesa mineralizacije raznih biogenih minerala, što uključuje strukturnu, morfološku ili konstrukcijsku kontrolu, pri čemu su u slučaju biomimetičke sinteze inovativnih funkcionalnih materijala najrelevantnije kemijska i sterička.⁷ Pod pojmom kemijske kontrole podrazumijeva se regulacija ionskog sastava mineralizirajuće okoline, kao i prisutnost specifičnih makromolekula (proteina, glikoproteina, polisaharida i lipida). Analizom aminokiselina iz proteina ekstrahiranih iz tipičnih biomineralizirajućih vrsta, kao kamenica (*Pinctada fucata*), ili Petrovog uha (*Haliotis tuberculata*, *Haliotis laevigata*, *Haliotis rufescens*) uočena je njihova polianionska (kisela) priroda.^{8,9} Međutim, u proteinima ekstrahiranim specifično iz sedefastog dijela školjke Petrovog uha (*Haliotis rufescens*) uočeni su dijelovi molekula koje osim kiselih aminokiselina sadržavaju i aminokiseline s polarnim ograncima. Pretpostavka je da te aminokiseline mogu

sudjelovati u stvaranju vodikovih veza s karboksilnim skupinama na površini kristala kalcijeva karbonata.⁹ U literaturi su opisana istraživanja u kojima su korištene izolirane topljive frakcije proteina za *in vitro* taloženje kalcijeva karbonata, u svrhu procjene njihovog utjecaja na nukleaciju, rast i morfologiju kristala.^{10,11} Međutim, sastav i sekundarna struktura peptida izoliranih iz ljuštura školjaka izrazito su kompleksni i nisu dobro definirani, stoga će za rasvjetljavanje uloge organske matrice na biomineralizaciju kalcijeva karbonata biti korišteni jednostavniji modeli relevantni za biomineralizaciju, aminokiseline.

Objavljena istraživanja o djelovanju jednostavnih modelnih molekula, kao što su aminokiseline i male organske molekule, su teško usporediva zbog vrlo različitih uvjeta pod kojima su provedena.^{12–16} Zbog toga su sustavna istraživanja utjecaja asparaginske kiseline (Asp), lizina (Lys), asparagina (Asn), tirozina (Tyr), fenilalanina (Phe), serina (Ser) i alanina (Ala), na taloženje kalcijeva karbonata pogodan odabir za istraživanje jednostavnog modela biomineralizacije. Pri tome su Asp, Asn, i Lys odabrani zbog različitog naboja bočnih ogranaka, dok se Tyr i Phe te Ser i Ala razlikuju u polarnosti molekula. Eksperimentima spontanog taloženja očekuje se uočiti njihov utjecaj u fazi nukleacije, vidljiv kroz moguću promjenu polimornog sastava te morfologiju taloga.¹⁷ Istraživanjem rasta kristala kalcita uz dodatak kristalnog sjemena te odabranih aminokiselina bit će određeni kinetičkih parametri čijom analizom će se zaključivati o vrsti i dosegu veza između aminokiselina i površine kristala CaCO₃. Analiza će biti razrađena pomoću teorijskog modela predloženog od strane Kubote i Mullina.^{18,19}

Mehanizam mogućeg sinergijskog djelovanja nabijenih i polariziranih aminokiselina, bit će istražen rastom kristala kalcita uz dodatak kristalnog sjemena te odgovarajućih dipeptida. Tako su odabrani L-alanil-L-asparaginska kiselina (Ala-Asp), L-seril-L-asparaginska kiselina (Ser-Asp), L-seril-L-serin (Ser-Ser), L-aspartil-L-asparaginska kiselina (Asp-Asp), L-glutamil-L-glutaminska kiselina (Glu-Glu). Dipeptidi Ala-Asp i Ser-Asp se razlikuju u hidroksilnoj skupini koju Ser posjeduje, a Ala ne. Navedena razlika može omogućiti sinergijsko djelovanje hidroksilne skupine Ser i karboksilne skupine Asp. Istraženi su i homologni dipeptidi s dvije hidroksilne skupine (Ser-Ser) te dvije karboksilne skupine različitih duljina bočnih ogranaka (Asp-Asp i Glu-Glu).

Područje površinske kemije se u zadnje vrijeme značajno usmjerilo na razvijanje sustava koji mogu služiti za kontrolirano uvođenje i otpuštanje aktivnih farmaceutskih

spojeva (API) u živim organizmima i tkivima.^{20,21} Spoznaja i razumijevanje osnovnih međudjelovanja između CaCO_3 i aminokiselina, ali i dipeptida, može se koristiti za optimiziranje međudjelovanja aktivne tvari (lijeka) i nosača za njegovu distribuciju. Unatoč tome što se u isporuci lijekova uglavnom koriste organske sustavi, nedavno su se anorganski materijali počeli razmatrati kao nosači lijekova, upravo zbog njihovih jedinstvenih svojstava koja ih čine praktičnim za regulaciju otpuštanja (engl. *drug delivery*).^{22,23} Jedan od možda potencijalno najpogodnijih je, i u ovoj disertaciji istraživani, kalcit, koji je netoksičan, biokompatibilan i biodegradabilan, ali je ujedno i izrazito kemijski aktivan prema organskim molekulama s hidroksilnim i karboksilnim skupinama.²⁴⁻²⁶ Ranije je istraživani utjecaj salicilne kiseline i njenih derivata (5-amino salicilne kiseline, N-saliciloil-L-asparaginske kiseline i N-saliciloil-L-glutaminske kiseline na kinetiku rasta kristalnog sjemena romboedarskog i skalenodarskog kalcita.^{20,21} Kao što je opće poznato salicilna kiselina je često korišten protuupalni lijek. U ovoj disertaciji su odabrani derivati salicilne kiseline s motivom Asp tripeptida. Pri tome, proučeno je djelovanje kiralnosti unutar Asp tripeptida (N-saliciloil-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina, N-saliciloil-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina, N-saliciloil-glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina) i duljine poveznice između salicilne kiseline i tripeptida (N-saliciloil-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina, N-saliciloil-glicin-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina, N-saliciloil- β -glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina, N-saliciloil- γ -glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina, N-saliciloil- δ -glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina). Ova su istraživanja provedena s ciljem optimizacije međudjelovanja površine kalcita i aktivne tvari uslijed polarosti i negativnog naboja Asp te sinergijskog djelovanja hidroksidne skupine salicilne kiseline i Asp.

Za procjenu važnosti ionotropnosti na taloženje kalcijeva karbonata, kao relevantni modelni sustav odabran je biokompozitni materijal kalcita i gelatora male molekulske mase. Provedena su preliminarna mjerenja, koja će još biti razrađena. Navedeni biokompoziti se razvijaju kao potencijalna alternativa za konvencionalne metode obnove koštanog tkiva (engl. *bone repairing*).²⁷⁻³⁰ Inženjerstvo tkiva se bavi proizvodnjom 3D strukture slične tkivu koja simulira ekstracelularnu matricu u kojoj stanice mogu rasti. Prednost istraženih biokompozita je njihova tiksotropičnost, što uveliko olakšava njihovo korištenje u zahtjevnim sustavima.

Naime, tiksotropičnost gelova omogućuje injektiranje kompozita, koji se lakše prilagodi području u koje je injektiran te se ponovno uspostavlja forma gela. Kako se hidrogelovi uglavnom sastoje od vode (> 95 %) veoma su istraživani kao materijali za kulturu stanica i staničnu inkapsulaciju te mogu biti injektirani tako da djeluju lokalno na specifično područje bez operacijskog postupka. Osim toga, kalcit unutar biokompozita može služiti kao kristalno sjeme za obnavljanje kostiju zbog njegove sličnosti s kalcijevim fosfatima, konstituentima kostiju.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biomimetika

Razvoj modernog društva uvelike ovisi o osmišljavanju novih naprednih materijala, ali i o učinkovitom načinu njihove pripreme.³¹ Rješenje bi se moglo pronaći u prirodi. Čovjek je oduvijek pokušavao oponašati prirodu u različitim područjima istraživanja i djelovanja. Tako se razvio pristup istraživanja pod nazivom biomimetika u kojem se koristi znanje i razumijevanje procesa biomineralizacije za pripravu materijala željenih svojstava (biomaterijali), kao što su razni implantanti,³² nosači lijekova,³³ i sl.

Biomineralizacija¹ je u širem značenju interdisciplinarno područje znanosti koje se bavi istraživanjem biološki nastalih materijala tj. biominerala. Za proučavanje biomineralizacije potrebna su znanja iz područja kemije, biologije, geologije, znanosti o materijalima i mnogih drugih znanosti. Informacije dobivene proučavanjem biomineralizacije imaju veliki utjecaj na paleontologiju, sedimentologiju, geokemiju, oceanologiju i biomedicinu. U užem smislu, biomineralizacija je proces nastajanja funkcionalnih anorgansko-organskih materijala kontroliranim biološkim procesima u živim organizmima.

Procesom biomineralizacija organizmi proizvode čvrsta tkiva, kao što su kosti, zubi ili ljuštore školjaka, ali i neželjene taloge u slučaju patološke biomineralizacije.² Stoga, postoji više razloga istraživanja biomineralizacije. Osim razvijanja novih materijala, jedan od važnih razloga istraživanja biomineralizacije povezan je s rješavanjem medicinskih problema kao što je na primjer slučaj patološke mineralizacije. Česta pojava patološke mineralizacije je nastajanje kamenaca urinarnog trakta, žučnih kamenaca i kalcifikacija krvnih žila. Boljim razumijevanjem mehanizama nastajanja biominerala moguće je otkriti kako bolje liječiti, ali i spriječiti nastanak kamenaca.

Kao što je ranije navedeno, biominerali su funkcionalni organsko-anorganski kompozitni materijali nastali pri kontroliranim uvjetima. Upravo zbog kontroliranih uvjeta u kojima nastaju, mehanička i kemijska svojstva biominerala znatno su bolja u usporedbi s

njihovim geološkim i sintetskim analogima, što je prvenstveno posljedica međudjelovanja organskih biološki značajnih molekula (proteina, polisaharida) s površinom rastućeg kristala. Udio organskih makromolekula u navedenim biomaterijalima iznosi svega 3 do 5 % te je općenito poznato da nastaju iz vodenih otopina i pri relativno umjerenim uvjetima temperature, tlaka i pH. Stoga, nije začuđujuće što znanstvenici ulažu veliki trud u istraživanje biomimetičke sinteze inovativnih funkcionalnih materijala za napredne primjene uz minimalan utjecaj na prirodne resurse.^{1,2}

Za detaljnije objašnjenje procesa biomineralizacije potrebno je pobliže proučiti sam pojam biominerala.² Biominerali su anorganske soli koje talože iz otopina kompleksnog sastava unutar organske matrice. Otopine kompleksnog sastava, kao što su krv, mokraća te ekstrapalijarna otopina, imaju visoku ionsku jakost i sadrže biološke molekule, male organske molekule i anorganske ione. Biominerali su sastavni dio zubâ, kosti, ali i patoloških mineraliziranih tkiva (kamenci, karijes) u čovjeka i životinja. Biominerali su i sastavni dio vanjskog skeleta beskralježnjaka, kao što su školjke ili rakovi, bodlje ježinaca, ali isto tako i biljaka. Prema sastavu, biominerali su najčešće kalcijevi karbonati, kalcijevi fosfati, kalcijevi oksalati, kalcijevi sulfati i dr. U ovoj disertaciji odabran je kalcijev karbonat (CaCO_3) kao model anorganskog dijela biokompozitnih materijala.

2.2. Kalcijev karbonat

Kalcijev karbonat je teško topljiva sol ugljične kiseline.³⁴ Važan je u procesima vezanja toksičnih elemenata u tragovima, diogeneze i biomineralizacije. Njegove karakteristike su netoksičnost i velika dostupnost, stoga nalazi veliku primjenu u industriji kao punilo i pigment. Može taložiti u obliku hidratiziranih soli (kalcijev karbonat monohidrat, $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, kalcijev karbonat heksahidrat, $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, i amorfni kalcijev karbonat, $\text{CaCO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) ili polimorfa (kalcit, aragonit i vaterit). Pri atmosferskom tlaku i temperaturi kalcit je najstabilnija modifikacija, dok su aragonit i vaterit metastabilne faze podložne transformaciji.

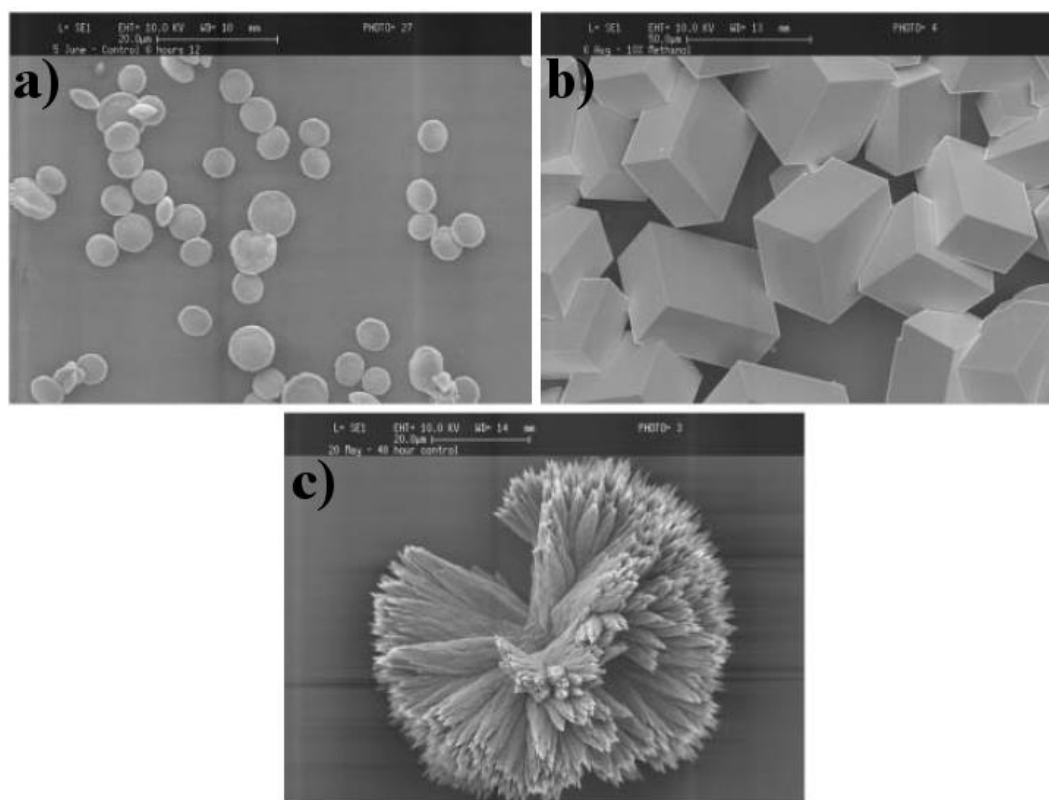
Kalcit je najstabilniji polimorf CaCO_3 i kao takav jedan od najzastupljenijih minerala u prirodi. Najčešće kristalizira u formi romboedra.³⁵ Nalazi se kao biomineral kod manje razvijenih beskralježnjaka (evolucijski starijih vrsta).

Aragonit nalazimo u obliku biominerala kod razvijenih beskralježnjaka. Iako je metastabilna modifikacija, aragonit je u velikim količinama prisutan u sedimentu morskog dna. U laboratoriju se dobiva pri povišenim temperaturama u formi igličastih kristala.³⁶

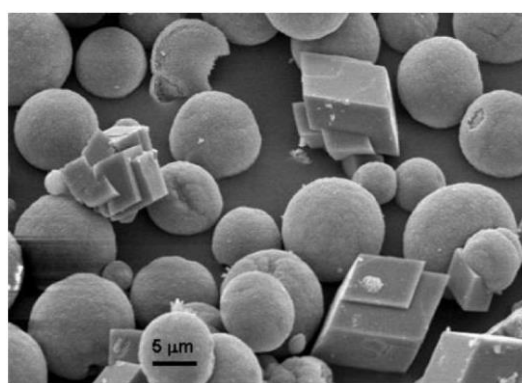
Vaterit je najmanje stabilna modifikacija kalcijevog karbonata. Zbog spontane transformacije u kalcit, rijetko ga se može naći u prirodi. Može ga se naći u biološkim sustavima, kao sastavni dio žučnog kamenca te u mineralnim tkivima nekih puževa i školjaka te otolitima riba. Čestice vaterita pripremljenog u laboratoriju najčešće su kuglastog oblika, pri čemu svaka pojedina čestica predstavlja agregat primarnih kristalita. Iako rijetko, vaterit se može pojaviti i u obliku pravilnih samostalnih heksagonskih kristala.³⁴

U ovoj disertaciji proučena je promjena morfologije polimorfa kalcijeva karbonata, osobito kalcita, nastalog pri različitim eksperimentalnim uvjetima, ili uz dodatak različitih aditiva. Slike, dobivene pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), različitih polimorfa kalcijevog karbonata³⁷ prikazane su na slici 2.1, dok je smjesa kalcita i vaterita³⁸ prikazan na slici 2.2. Kalcit kristalizira u heksagonskom sustavu i obično se pojavljuje u obliku romboedra (slika 2.1b), vaterit poprima kuglasti oblik (slika 2.2) ili rjeđe, oblik

šesterokutnih pločica (slika 2.1a) i kristalizira u heksagonskom sustavu. Aragonit kristalizira u rompskom sustavu u obliku štapičastih kristala i/ili agregata (slika 2.1c).

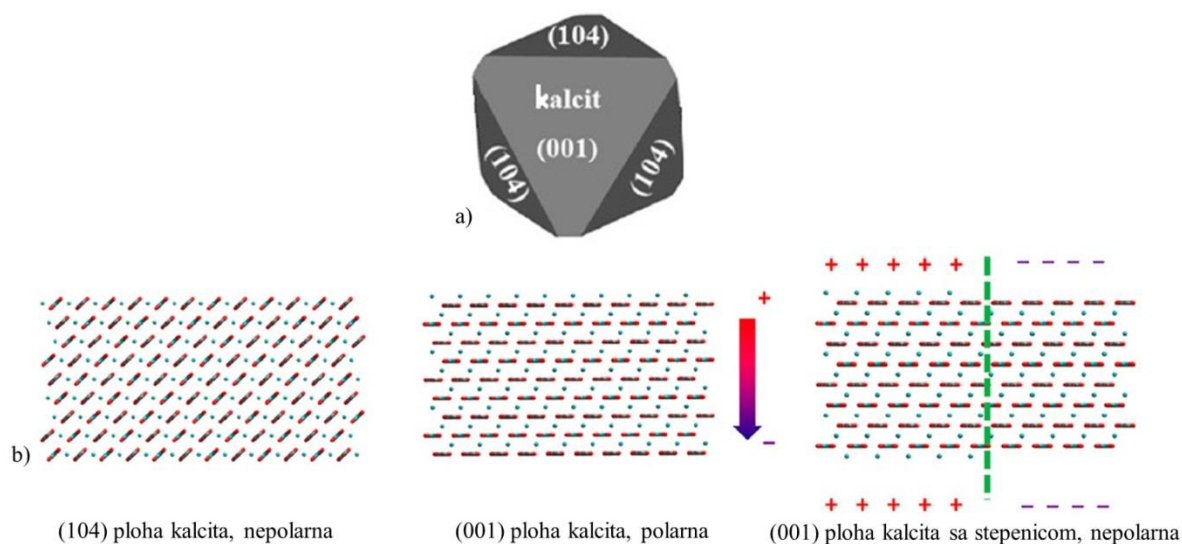


Slika 2.1. SEM slike polimorfa kalcijeva karbonata a) vaterit, b) kalcit, c) aragonit.³⁷



Slika 2.2. SEM slike smjese kristala kalcita i vaterita: kuglaste čestice su vaterit, a čestice s oštrim bridovima kalcit.³⁸

U ovoj disertaciji istražen je rast kristala kalcita.³⁹ Stoga je posebna pažnja dana njegovoj morfologiji (slika 2.3). Najstabilnija ploha kalcita je (104) ploha, stoga je najčešće i najizraženija u talozima pripravljenim pri približno standardnim uvjetima. Međutim, pod određenim uvjetima može doći do izražavanja nestabilne (001) plohe. Stabilnost ploha (104) i (001) posljedica je razmještaja iona na samoj površini kalcita. U slučaju (104) plohe pozitivan naboj kalcijevih iona (Ca^{2+}) i negativan naboj karbonatnih skupina (CO_3^{2-}) su ravnomjerno raspoređeni po površini, dok je kod (001) plohe jedan naboj bilo pozitivan ili negativan, što je razlog njene nestabilnosti.



Slika 2.3. Shematski prikaz površine kalcita (a) i površina (104) i (001) plohe kalcita korištene u molekulskim modeliranjima, plavom bojom su označeni Ca^{2+} atomi, a crveno-plavo su CO_3^{2-} skupine (b).³⁹

2.3. Biokompozitni materijali u sustavima kalcijeva karbonata i biološki značajnih molekula

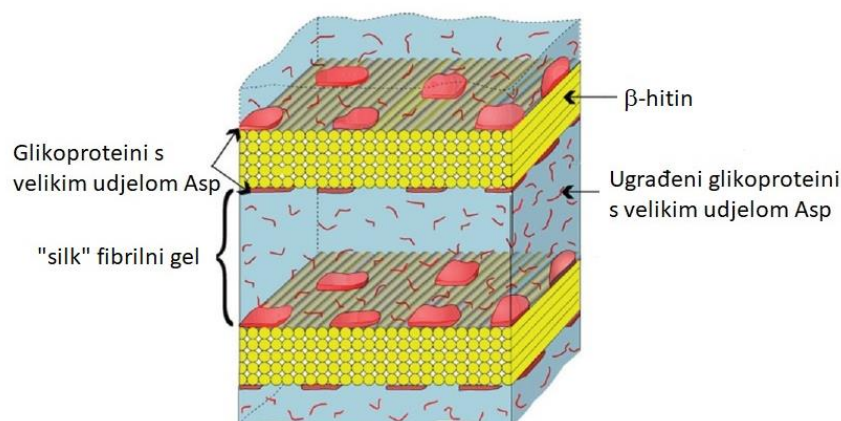
Sukladno biomimetičkom pristupu sintetizirani su biokompozitni materijali u sustavima kalcijeva karbonata i biološki značajnih molekula kao što su aminokiseline, mali peptidi, polimeri, koji su osim anorganske komponente sadržavali i odgovarajući udio organskih molekula. Nekoliko je strategija kontrole procesa mineralizacije raznih biogenih minerala, što uključuje strukturnu, morfološku ili konstrukcijsku kontrolu, pri čemu su u slučaju biomimetičke sinteze inovativnih funkcionalnih materijala najznačajnije kemijska i sterička.⁷ Pod pojmom kemijske kontrole podrazumijeva se regulacija ionskog sastava mineralizirajuće okoline, kao i prisutnost specifičnih makromolekula (proteina, glikoproteina, polisaharida i lipida). U literaturi su opisana istraživanja djelovanja različitih aditiva na kristalizaciju biominerala. Najčešće ispitivani aditivi su kationi i anioni^{40,41} ili organske molekule.^{20,21,42} Pretpostavljeno je da na rast kristala u prirodi najviše utječu ioni, međutim uočeno je da organska matrica ima jako veliku ulogu u kristalizaciji i rastu kristala u živim organizmima iako je prisutna u malom udjelu, svega 3 do 5 %. U organskoj matrici najzastupljeniji su proteini te se iz toga razloga, osim samih prirodnih proteina, koriste i sintetski analozi kao modelni sustavi za ispitivanje utjecaja raznih proteina. Osim polimera, istražen je i utjecaj malih organskih molekula, ali i samih aminokiselina.

2.3.1. Polimeri i gelatori male molekulske mase

U prirodi, iako prisutna u vrlo malom udjelu, organska matrica ima veliku ulogu u biološkoj kontroli usmjeravanja polimorfizma, orijentacije kristalnih ploha, morfologije te ugradnje u kristale.⁴³ Organsku matricu je teško ekstrahirati iz biominerala, pri tome se oštećuje i organski dio. Stoga, kvalitativan i kvantitativan sastav organske matrice nije dobro poznat. Međutim, zna se da je organska matrica uglavnom sastavljena od proteina i polisaharida. Glavni problem s proteinima je što ekstrakcijom nije moguće sačuvati početnu trodimenzionalnu strukturu.

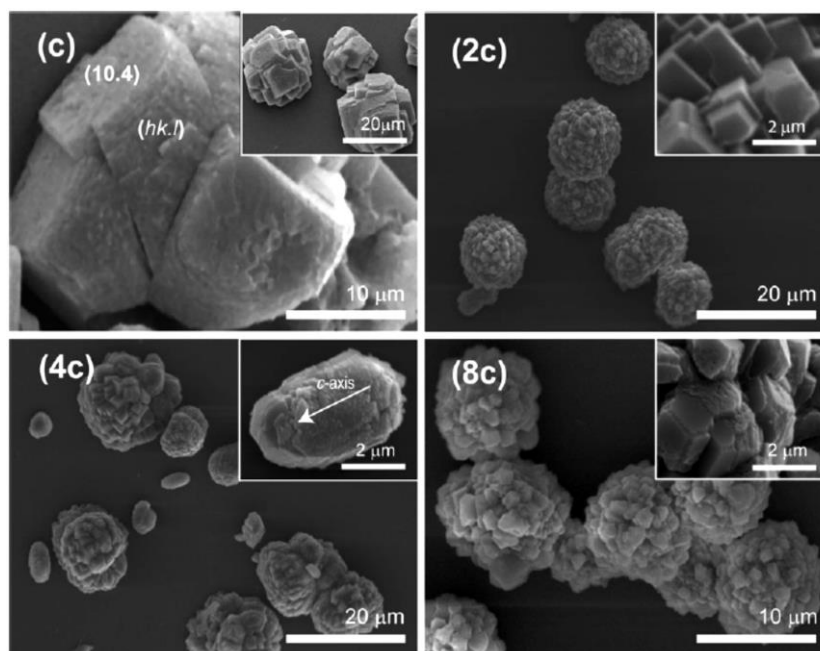
Proteini su heteropolimeri koji sadrže dvadesetak različitih aminokiselina, vezanih u jedan ili više polipeptidnih lanaca.⁴⁴ Neke aminokiselina polipeptidnog lanca sadrži kationsku ili anionsku skupinu, stoga su proteini poliamfoliti. Ogranci aminokiselina mogu se znatno razlikovati u polarnosti. Sastav aminokiselina u polipeptidnom lancu određuje trodimenzionalnu strukturu molekule proteina. Trodimenzionalna struktura je konačan rezultat međudjelovanja između segmenata unutar proteina, ali i segmenata proteina s okolinom, najčešće vodenom otopinom. Treba naglasiti da su proteini polielektroliti s niskom gustoćom naboja, upravo zbog toga što posjeduju istovremeno i pozitivno i negativno nabijene skupine te dijelove lanca koju su neutralni.

U slučaju beskralježnjaka često istraživani je sedef (engl. *nacre*), tj. svjetlucavi sloj koji se nalazi u unutrašnjosti školjaka. Sedef se sastoji od pločica aragonita koji u sebi sadrži organsku matricu od kiselih topljivih proteina, netopljivih β -hitinskih vlakana i „silk“ fibrilnog hidrogela. Addadi i suradnici⁴⁵ su svojim istraživanjima odredili sastav i strukturu organske matrice unutar aragonitnog mineralnog dijela Periske školjke (*Atrina rigida*) što je prikazano na slici 2.4. Pri tome, zaključeno je da β -hitin usmjerava kristalnu orijentaciju, dok se kiseli proteini nalaze na površini hitina u području mjesta nukleacije, tj. formiranja aragonita. Proteini „silk“ inhibiraju nastajanje kalcita, zbog čega se školjka sastoji isključivo od aragonita.



Slika 2.4. Shematski prikaz demineralizirane organske matrice školjke Periske.⁴⁵

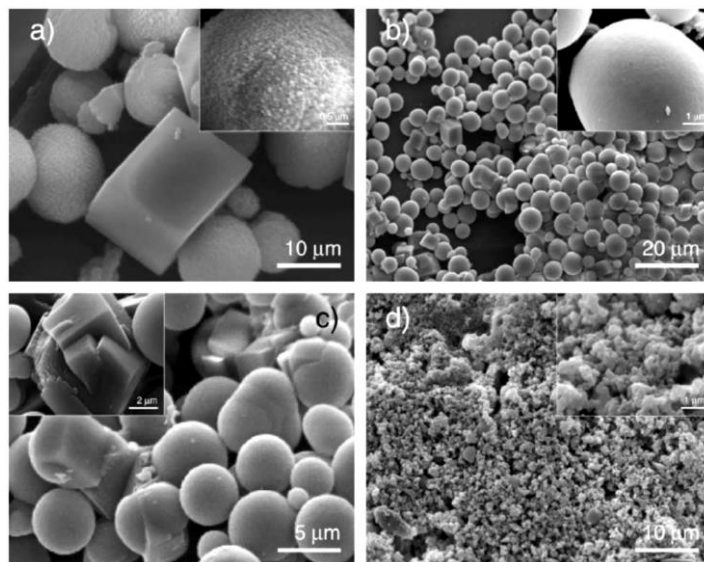
Napravljena su i istraživanja u kojima je određen aminokiselinski sastav kiselih topljivih proteina. Jedan takav primjer je napravljen na školjkama: kamenica (*Pinctada fucata*) i više vrsta Petrovog uha (*Haliotis tuberculata*, *Haliotis laevigata*, *Haliotis rufescens*).^{8,9} U tim je sustavima utvrđena njihova polianionska priroda, s velikim udjelom asparaginske kiseline (Asp) i glutaminske kiseline (Glu). Međutim, u proteinima ekstrahiranim specifično iz sedefastog dijela školjke Petrovog uha (*Haliotis rufescens*) uočeni su i dijelovi molekula koje osim kiselih aminokiselina sadržavaju i aminokiseline s polarnim ograncima te je pretpostavljeno da te aminokiseline mogu sudjelovati u stvaranju vodikovih veza s karboksilnim skupinama na površini kristala CaCO_3 .⁹ Djelovanje kiselih topljivih proteina istraženo je i u sustavima spontanog taloženja CaCO_3 , pri čemu je uočeno mijenjanje morfologije CaCO_3 (slika 2.5).



Slika 2.5. SEM slike CaCO_3 uz različite koncentracije fragmenta proteina iz školjke Petrova uha (*Haliotis refescens*): $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ (c) , $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ (2c), $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$ (4c), $3,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (8c).⁹

U literaturi su opisana istraživanja u kojima su korištene izolirane topljive frakcije proteina za *in vitro* taloženje kalcijeva karbonata, u svrhu procjene njihovog utjecaja na nukleaciju, rast i morfologiju kristala. Također, često su upotrebljavani i sintetički analozi prirodnih molekula, kojima se oponaša sastav aminokiselina i sekundarne strukture proteina, pri čemu su najčešće korištene poliasparaginska (pAsp) i poliglutaminska kiselina (pGlu).^{11,42,46} Tako je utjecaj naboja aminokiselinskih ogranaka istražen u sustavima u kojima su korištena poliasparaginska kiselina, poliglutaminska kiselina i polilizin (pLys) kao modelni sustavi.⁴² Navedeni spojevi su polielektroliti. Polielektroliti su polimerni spojevi čije skupine pri određenim uvjetima mogu biti električki nabijene.^{47,48} Tradicionalno se pod pojmom polielektrolit podrazumijeva polimerni spoj koji sadrži samo jednu vrstu poliiona čiji je naboj kompenziran jednostavnim protuionima. Protuioni mogu biti kondenzirani ili slobodni. Posebne karakteristike polielektrolita su polimerni lanac i velika gustoća naboja.⁴⁸ Utjecaj navedenih modelnih sustava ispitan je na spontano taloženje i kristalni rast kristala kalcita.

Spontanim taloženjem CaCO_3 u prisustvu kiselih poliaminokiselina zaključeno je da niske koncentracije polielektrolita mijenjaju polimorfni sastav i morfologiju (slika 2.6).⁴⁶ Pokazano je da istraživani polielektroliti stabiliziraju vaterit, a inhibiraju nukleaciju i rast kalcita.



Slika 2.6. SEM slike spontano istaloženog CaCO_3 u sustavu $c(\text{Ca}) = c(\text{CO}_3) = 2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $S_c - 1 = 12,7$ uz različite koncentracije pAsp: a) 0 ppm, b) 1 ppm, c) 1 ppm, d) 4 ppm.⁴⁶

Prilikom istraživanja utjecaja poliaminokiselina na rast kristala uočena je promjena mehanizma rasta.⁴² Pri ekvimolarnim koncentracijama reaktanata (CaCl_2 i Na_2CO_3) od $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ dobiveno je bolje slaganje s paraboličkim zakonom brzine rasta kristala, pa je zaključeno da je u slučaju sustava bez aditiva, rast kristala određen reakcijama na površini, tj. rastom na vijčanoj dislokaciji. Dodatkom modelnih polimera, dolazi do inhibicije brzine rasta kristala, mijenja se mehanizam te je utvrđeno da dodatak aditiva uzrokuje rast kontroliran nukleacijom na površini.

Međudjelovanje CaCO_3 s polimerima je biomimetički istraživano da bi se poboljšala kvaliteta cementa.⁴⁹ Za hidrataciju cementa i procesa karbonizacije jedan od bitnih koraka je nastajanje CaCO_3 . Stoga se u cement dodaju plastifikatorski (engl. *plasticizer*) aditivi, što su

uobičajeno sulfatni i karboksilatni polielektroliti. Utjecaj takvih polielektrolita ispitan je na taloženje CaCO_3 , pri čemu je uočena promjena polimorfnog sastava i morfologije. Prisutnost aditiva uzrokovala je inhibiciju taloženja, što je pripisano nespecifičnoj adsorpciji na kristalni nukleus i polielektrolitnu distribuciju naboja. Kao i ranije, uočen je nastanak vaterita, ali i promjena morfologije kalcita. Sulfonatni polielektroliti stabilizirali su (001) plohu kalcita.

Navedena pojava uočena je i kod taloženja CaCO_3 uz prisutstvo poli(stirensulfonata) (PSS), pri čemu je stabilizacija (001) plohe objašnjena međudjelovanjem sulfonatnih skupina s Ca^{2+} ionima na površini.^{50,51} Pri tome, nastaje dipol (slika 2.3), koji usmjerava rast kristala tako da se formira vrlo nestabilna (001) ploha. Osim eksperimentalnih mjerenja napravljena su i računalna istraživanja.³⁹ Utvrđeno je da se PSS jako veže na (001) plohu bilo direktnim vezanjem kisika sulfonatne skupine s Ca^{2+} ionima na površini, koji se koordinatno veže na tri Ca^{2+} iona, ili vezanjem kroz otopinu tako da stvara jake vodikove veze s vodom u hidratiziranom sloju uz samo površinu.

Utjecaj polimera, bilo prirodnih ili sintetskih, na taloženje CaCO_3 može biti dodatno pojačan zbog ionotopnog efekta.⁷ Ionotropni efekt je efekt mikrozatvorenog prostora koji omogućuje lokalno povećanje prezasićenosti i sa time mijenja samu kinetiku taloženja CaCO_3 . Mikrozatvoreni prostor se može postići geliranjem polimernih spojeva, ali i formiranjem hidrogela gelatorima male molekulske mase (LMWG).

Hidrogelovi LMWG-a se razvijaju kao potencijalna alternativa za konvencionalne metode obnove koštanog tkiva (engl. *bone repairing*).²⁷⁻³⁰ Regenerativna medicina je područje s rastućim interesom istraživanja zbog mogućnosti obnove tkiva nakon ozljeda i bolesti. Inženjerstvo tkiva uključuje korištenje biomaterijala kao modela za proizvodnju 3D strukture slične tkivu koja simulira ekstracelularnu matricu u kojoj stanice mogu rasti. Često tipičnim 2D kulturama stanice nedostaje sposobnost efektivne simulacije fiziološke okoline. Kako se hidrogelovi uglavnom sastoje od vode (>95 %) intenzivno su istraživani kao materijali za rast kultura stanica i staničnu inkapsulaciju te mogu biti injektirani tako da djeluju lokalno na specifično područje, bez operacijskog postupka. Za tu svrhu najčešće su istraživani hidrogelovi na temelju prirodnih biopolimera, kao što su kolagen, fibrin, hijaluronska kiselina, kitozan, celuloza, alginat i agaroza. Tipični nedostatak ovih biomaterijala je da ne zadovoljavaju istovremeno sve parametre za injekcijski gel (staničnu

adheziju, tjelesnu kompatibilnost i mehaničku čvrstoću), njihovo geliranje i mehanička svojstva se ne mogu prilagođavati s obzirom da trebaju biti korišteni bez kemijske modifikacije kako bi se održala biokompatibilnost.

Za razliku od biopolimera, LMWG sadrže nekoliko aromatskih prstenova unutar svoje strukture i preferiraju formiranje hidrogela s π - π međudjelovanjima te su biokompatibilni i mogu stvoriti hidrogel pri širokom rasponu eksperimentalnih uvjeta.²⁷ Na taj je način moguće precizno podesiti sva svojstva za postizanje optimalnih uvjeta za rast 3D staničnih kultura, kao i dobra mehanička svojstva. Kako se LMWG samoorganiziraju pomoću fizikalnih međudjelovanja, hidrogelovi mogu imati svojstvo tiksotropnosti: gel pod utjecajem mehaničkog djelovanja, miješanja, postaje tekućina, dok mirovanjem ponovno nastaje gel. Upravo zbog tiksotropnosti, LMWG su podobni za injektiranje, pri čemu se otopina lagano prilagodi području gdje je injektira te se potom uspostavlja forma gela.

2.3.2. Derivati salicilne kiseline

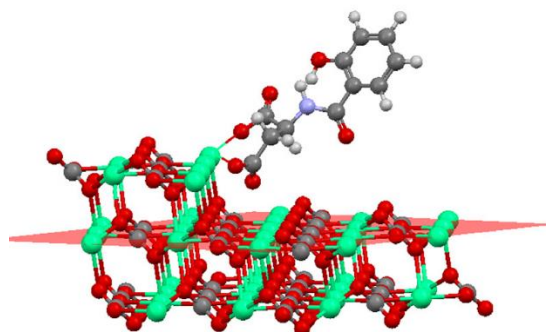
Područje površinske kemije se u zadnje vrijeme značajno usmjerilo na razvijanje sustava koji mogu služiti za kontrolirano uvođenje i otpuštanje aktivnih farmaceutskih spojeva (API) u živim organizmima i tkivima.^{20,21} Za to je potrebno znanje i razumijevanje osnovnih međudjelovanja između aktivne tvari (lijeka) i nosača za njegovu distribuciju. Nedavno su se anorganski nosači počeli razmatrati kao nosači lijekova zbog njihovih jedinstvenih svojstava koja ih čine praktičnim za regulaciju otpuštanja lijekova (engl. *drug delivery*).^{22,23} Jedan od možda potencijalno najpogodnijih je, i u ovoj disertaciji istraživani, kalcit zbog svoje netoksičnosti, biokompatibilnosti i biodegradacije, ali i izrazite afiniteta površine prema organskim molekulama s hidroksilnim i karboksilnim skupinama.²⁴⁻²⁶

U radu je istraženo djelovanje derivata salicilne kiseline na kinetiku rasta kristalnog sjemena romboedarskog i skalenoedarskog kalcita.^{20,21} Salicilna kiselina je korištena kao modelna molekula protuupalnog lijeka, a istraženo je djelovanje niza derivata: salicilne kiseline (SA), 5-amino salicilne kiseline (5-ASA), *N*-salicioil-L-asparaginske kiseline (*N*-Sal-Asp) i *N*-saliciloil-L-glutaminske kiseline (*N*-Sal-Glu) Učinak navedenih derivata salicilne kiseline proučen je na temelju analize kinetike rasta kristala, korištenjem teorijskog modela predloženog od strane Kubote i Mullina.^{18,19} Istraživanjima su dobivene vrijednosti Langmuirove konstante ravnoteže adsorpcije (K_{ad}) salicilnih derivata na površinu romboedarskog kalcita na temelju kinetičkih mjerenja rasta kristala, ali i na temelju adsorpcijskih mjerenja (Tablica 2.1). Vrijednosti K_{ad} dobivenih različitim pristupima u vrlo su dobrom slaganju, te je zaključeno da dodatak *N*-Sal-Asp i *N*-Sal-Glu značajno povećava inhibiciju kristalnog rasta u usporedbi sa SA i 5-ASA ($K_{ad}(\text{N-Sal-Asp}) \gg K_{ad}(\text{Sal})$)

Tablica 2.1. Langmuirove konstante ravnoteže adsorpcije (K_{ad}) salicilnih derivata na površinu romboedarskog kalcita izračunate prema eksperimentima kinetike kristalnog rasta i adsorpcije.²⁰

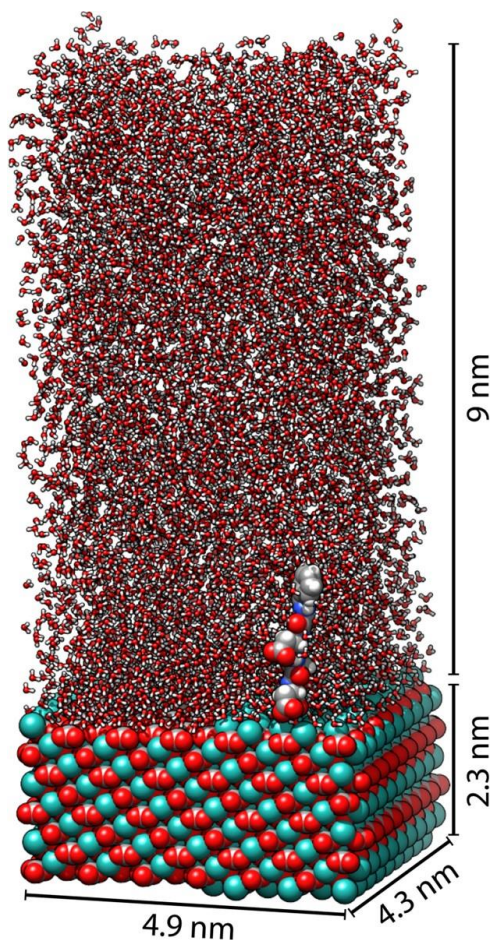
	$K_{ad} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$	
	Kinetika kristalnog rasta	Adsorpcija
SA	150 ± 21	204 ± 65
5-ASA	173 ± 14	204 ± 65
N-Sal-Glu	813 ± 55	904 ± 139
N-Sal-Asp	1633 ± 91	1723 ± 198

U navedenom istraživanju predložen je i model vezanja N-Sal-Asp, s kalcitom, te je utvrđeno da se veza ostvaruje preko kisikovih atoma karboksilnih skupina asparaginske kiseline (slika 2.7). Kisikovi atomi stvaraju međudjelovanje s Ca^{2+} ionima koji se nalaze na stepenicama rasta CaCO_3 .



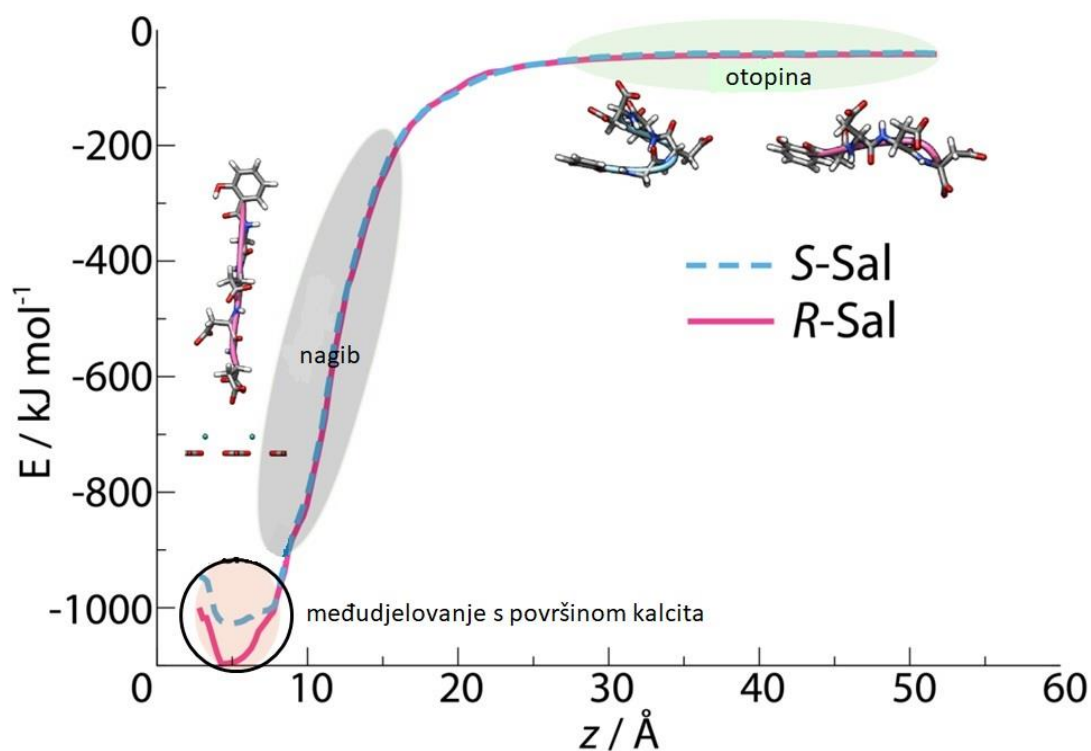
Slika 2.7. Međudjelovanje N-Sal-Asp s površinom romboedarskog kalcita.²⁰

Molekulskim modeliranjem proučeno je i vezanje većih salicilnih derivata i to: N-salicioil-glicin-S-asparaginska kiselina-S-asparaginska kiselina-S-asparaginska kiselina (S-Sal), N-salicioil-glicin-S-asparaginska kiselina-R-asparaginska kiselina-S-asparaginska kiselina (R-Sal). Na slici 2.8 prikazana je simulacijska ćelija površine kalcita.⁵²



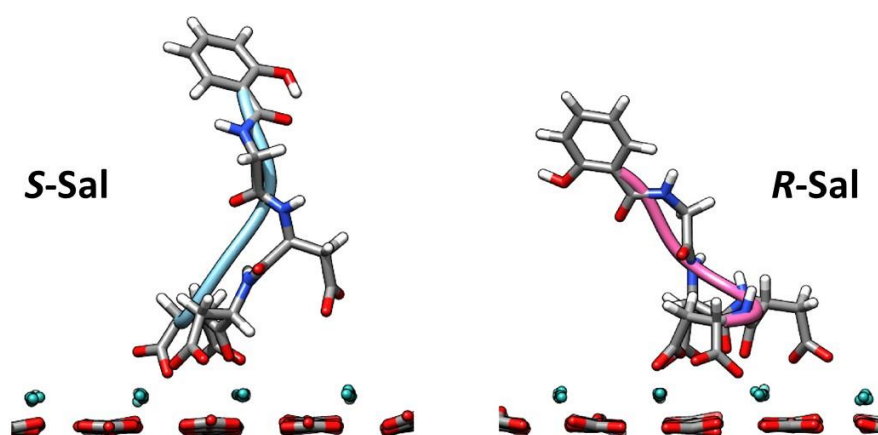
Slika 2.8. Simulacijska ćelija površine kalcita sa S-Sal i približno 8000 molekula vode.⁵²

Izračunate su energije vezanja na različitim udaljenostima između derivata i (001) plohe na površini kalcita (slika 2.9). Promjena energije s promjenom kiralnosti ukazuje da je kiralnost aminokiselina važna za vezanje proteina na površinu kalcita.



Slika 2.9. Energetski profili za S-Sal i R-Sal uzduž (001) plohe kalcita.⁵²

Utvrđeno je da se R-Sal jače veže jer stvara međudjelovanje sa (001) plohom kalcita preko sve četiri karboksilne skupine asparaginskih kiselina, dok S-Sal može uspostaviti međudjelovanje samo sa tri, a četvrta je udaljenija od površine (slika 2.10).



Slika 2.10. Međudjelovanje R-Sal i S-Sal s (001) plohom kalcita.⁵²

2.3.3. Aminokiseline

Istraživanje utjecaja aminokiselina na taloženje CaCO_3 je postalo veoma aktualno u posljednje vrijeme. Većina istraživanja napravljena je u sustavima spontanog taloženja.^{12,14-16,53} Pri tome praćen je polimorfni sastav taloga i morfologiju, ali i ugradnju aminokiselina u kristalnu rešetku CaCO_3 . Međutim, većina istraživanja su provedena pri različitim eksperimentalnim uvjetima, što onemogućuje direktnu usporedbu rezultata. Osim eksperimentalnih mjerenja u navedenim je sustavima napravljeno i molekulsko modeliranje.^{16,54}

Utjecaj aminokiselina istražen je i u početnim fazama kristalizacije CaCO_3 .¹³ Zaključeno je da je Asp jedina aminokiselina koja djeluje na sve faze. Asp potiče nastanak manje stabilne modifikacije i inhibira nukleaciju kalcita. Uslijed selektivne adsorpcije, nastali kristali su zaobljeniji, ali su i manjih dimenzija. Zaključeno je da je funkcionalnost bočnih ogranka aminokiselina bitna za međudjelovanje s kristalizirajućim CaCO_3 , pri čemu se pokazao najučinkovitiji negativni naboj bočnog ogranka i prisutnost hidroksilne skupine.

Prijašnjim istraživanjima zaključeno je da dodatkom kiselih i nenabijenih polarnih aminokiselina dolazi do stabilizacije vaterita, dok bazične aminokiseline imaju slabi utjecaj, a nepolarne ne pokazuju utjecaj na promjenu polimornog sastava.⁵⁵ Pretpostavljeno je da aminokiseline ugrađene u kristale CaCO_3 mogu dodatno utjecati na njegovu transformaciju u kalcit. Molekulskim modeliranjem pretpostavljeno je da se aminokiseline kovalentno vežu za CaCO_3 . Neka istraživanja⁵³ su pretpostavila da se stabilizacija vaterita s Asp javlja zbog nastanka kelata Ca^{2+} iona sa dvije Asp preko glavne karbonatne i amidne skupine. Međutim, dokazi za navedenu pretpostavku nisu detaljno razjašnjeni.

Orme i suradnici istražili su način vezanja Asp na površinu kalcita i došli do zaključka da Asp utječe na kristalizaciju tako da se adsorbira na stepenicu rasta kristala pri tome mijenja samu energiju stepenice.⁵⁶ Dokazano je da se Asp značajno ne veže na (104) plohu stoga se jedino može vezati na stepenicu rasta.

Borukhin i suradnici potvrdili su ugradnju aminokiselina u kristalnu strukturu, kao što su proteini ugrađeni u biogeni kalcit.¹⁴ Ugrađene aminokiseline uzrokuju distorziju kristalne rešetke. Zaključeno je da ugradnja ovisi o kiselosti ili bazičnosti te vrijednosti konstanta disocijacija (pK_a) njihovih glavnih funkcionalnih skupina, veličina i fleksibilnosti molekula. Autori su pokazali da se, ne samo Asp i Glu, već se i cistein lako ugrađuje, kao posljedica veze između tiolne skupine i iona Ca^{2+} na površini.

Grupa Fione C. Meldrum razvila je metodu za brzo istraživanje utjecaja kristalizacije $CaCO_3$ uz dodatak aminokiselina.¹⁵ Zaključili su da promjena u kristalnoj strukturi nije usko povezana s ugradnjom, što je uočeno na temelju aminokiselina koje su se ugradile, ali nisu značajno utjecale na morfologiju kristala. Na temelju rezultata zaključeno je da se Asp lako ugrađuje jer karboksilna skupina ($-COOH$) može zamijeniti CO_3^{2-} skupinu u karbonatnoj ravnini. Zaključili su da ugradnja pojedinih aminokiselina najviše ovisi o njihovom uklapanju u kristalnu strukturu po svojim svojstvima, što ne mora odgovarati promjeni morfologije nastalih kristala. Osim toga, dopiran je kalcit s aminokiselinama zbog povećanja tvrdoće kalcita.¹⁶ Postignuta je veoma velika ugradnja Asp i Gly u kalcitne kristale. Ugradnja je potvrđena s difrakcijom sinhotronskog zračenja rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (PXRD).

Osim istraživanja na spontanom taloženju napravljena su i istraživanja na kristalnom rastu kalcita.⁵⁷ Proučen je utjecaj utjecaj Asp i Gly i njihovih peptida pri pH 8,3. Za obradu eksperimentalnih podataka testirano je više modela adsorpcijskih izoterma i to:

- Langmuirova

$$\theta = \frac{KC}{1 + KC} \quad (1)$$

- Langmuir-Freundlichova

$$\theta = \frac{KC^n}{1 + KC^n} \quad (2)$$

- Flory-Hugginsova

$$\frac{\theta}{C} = K(1 - \theta)^j \quad (3)$$

gdje θ predstavlja parcijalnu prekrivenost, K konstanta afiniteta, C koncentraciju aditiva, n Langmuir-Freundlichovu konstantu, a j Flory-Hugginsovu konstantu. Iz izračunatih konstanti određena je Gibbsova energija adsorpcije (ΔG_{ads}) prema formuli:

$$\Delta G_{\text{ads}} = -RT \ln K \quad (4)$$

pri čemu je R plinska konstanta ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), a T temperatura (298 K).

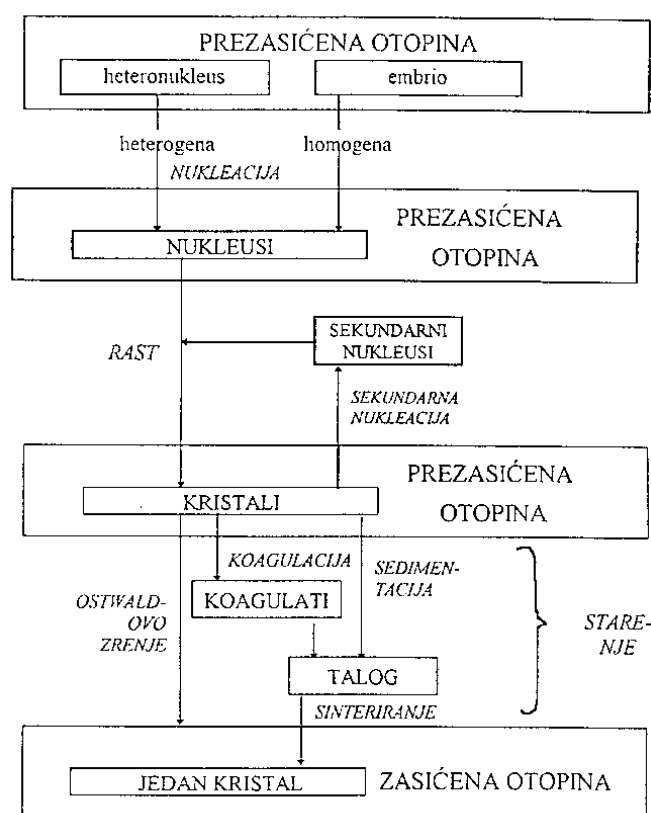
Navedena istraživanja se teško uspoređuju zbog različitih uvjeta sinteze. Stoga su u ovoj disertaciji sustavno proučeni utjecaji aminokiselina na taloženje kalcijeva karbonata. Utjecaj kiselih aminokiselina na taloženje CaCO_3 je često istraživano, za razliku od polarnosti. Ovisno o tome, molekule mogu uspostaviti vodikove veze s površinom kalcita preko CO_3^{2-} skupina.

§ 3. TEORIJSKA OSNOVICA

3.1. Procesi taloženja

Taloženje je pojam koji obuhvaća procese nastajanja nove faze iz nekog homogenog sustava, dok se u užem smislu pod pojmom taloženja podrazumijeva nastajanje čvrste faze iz vodenih, najčešće elektrolitnih otopina. Kristalizacija je uobičajeniji izraz za taloženje iz otopina i talina koje rezultira čvrstom fazom s kristalnom strukturom.⁵⁸

Taloženje je moguće izazvati miješanjem otopina reaktanata, mijenjanjem pH vrijednosti ili temperature sustava, odnosno promjenom sastava otopine. Sam proces zbiva se u nekoliko međufaza, što je opisano u opće prihvaćenoj *Nielsenovoj shemi*⁵⁹ procesa taloženja (slika 3.1).



Slika 3.1. *Nielsenova shema* mogućih stanja i faza uključenih u procese taloženja.^{35,59}

Kako bi razumijeli kinetika i mehanizmi nastanka kristala, potrebno je imati znanje o termodinamici i svojstvima otopina.⁶⁰⁻⁶² Elektrolitna otopina može biti stabilna (podzasićena i zasićena) ili nestabilna (prezasićena) s obzirom na sklonost izdvajanja elektrolita $A_\alpha B_\beta$ iz otopine. Stabilnost otopine, koja ima ili nema taloga, određena je odnosom koncentracije elektrolita u otopini, izraženom kao vrijednost produkta aktiviteta iona (π):

$$\pi \equiv a_A^\alpha a_B^\beta \quad (1)$$

i ravnotežne koncentracije tog elektrolita prikazane u obliku konstante ravnoteže otapanja (K_s). U slučaju kada je $\pi < K_s$ otopina je podzasićena, te nastajanje nove čvrste faze iz takve otopine nije moguće i kristali će se u dodiru s otopinom otapati. Pri $\pi = K_s$, otopina je zasićena i sustav je stabilan (nema ni taloženja, ni otapanja). Nastajanje jedne ili više krutih faza moguće je jedino u slučaju kada je $\pi > K_s$. Vremenski period od nastanka prezasićene otopine do prve uočljive promjene u sustavu, povezane sa nastajanjem kristala, naziva se induksijsko vrijeme. Induksijsko vrijeme može varirati od djelića sekunde do nekoliko godina, što je najvjerojatnije posljedica različitih mehanizama nukleacije pri različitim prezasićenostima.⁶⁰

Prezasićenost se može definirati kao:

$$\ln S = \frac{\Delta\mu}{RT} \quad (2)$$

gdje je R opća plinska konstanta, T termodinamička temperatura, a $\Delta\mu$ razlika između kemijskog potencijala otopljene tvari u prezasićenoj otopini, μ_2 , i kemijskog potencijala otopljene tvari u ravnoteži sa kristalom u otopini, μ_1 :

$$\Delta\mu = \mu_1 - \mu_2 \quad (3)$$

Obično se kemijski potencijal izražava kao:

$$\mu = \mu^\circ + RT \ln a \quad (4)$$

gdje je μ° standardni kemijski potencijal otopljene tvari te a aktivitet otopljene tvari.

Kombinacijom jednadžbi (2), (3) i (4) prezasićenost se definira kao:

$$S = \frac{a}{a_s} \quad (5)$$

pri čemu je S bezdimenzijska veličina, a je aktivitet otopljene tvari u prezasićenoj otopini i a_s aktivitet otopljene tvari u ravnoteži. Aktivitet se izražava kao $a = \gamma \frac{c}{c^\circ}$, gdje je γ koeficijent aktiviteta, c je koncentracija otopljene tvari i c° je standardna vrijednost koncentracije, te iznosi $c^\circ = 1 \text{ mol dm}^{-3}$. Koeficijent aktiviteta (γ) označava odstupanje realne otopine od idealne, u kojoj ioni međusobno ne djeluju jedni na druge te je vrijednost γ jednaka 1. Najčešće se u računima, a posebno u slučaju teško topljivih soli, koristi pojednostavljenje:

$$\frac{a}{a_s} \approx \frac{c}{c_s} \quad (6)$$

gdje je c koncentracija otopljene tvari u prezasićenoj otopini, a c_s je koncentracija otopljene tvari u ravnoteži ili tzv. Topljivost. Određivanje γ , a posebice u slučaju jako prezasićenih otopina, je zahtjevno. Obzirom da su takve otopine nestabilne, eksperimentalno određivanje koeficijenata aktiviteta nije pouzdano. Do točnijih rezultata moguće je doći primjenom Debye-Hückelove teorije.⁶³

Najčešći načini definiranja prezasićenosti su:

1. Omjer ionskih produkata

$$\frac{\pi}{K_s} \quad (7)$$

2. Stupanj zasićenosti

$$S = \frac{a}{a_s} \text{ ili } S = \left(\frac{\pi}{K_s} \right)^{1/\nu} \quad (8)$$

gdje je $\nu = \alpha + \beta$ za sol tipa $A_\alpha B_\beta$

3. Afinitet taloženja

$$\Phi = RT \ln \frac{\pi}{K_s} = \nu RT \ln \frac{a}{a_s} \quad (9)$$

4. Apsolutna prezasićenost

$$a - a_s \quad (10)$$

5. Relativna prezasićenost

$$\sigma = S - 1 = \frac{a - a_s}{a_s} \quad (11)$$

Odabir određene definicije ovisi o svojstvima elektrolitne otopine i često o dostupnim podacima. U ovoj disertaciji se pod pojmom prezasićenost podrazumijeva stupanj prezasićenosti.

3.1.1. Nukleacija

Prema *Nielsenovoj shemi*, da bi taloženje započelo, nužan uvjet je prezasićenje početne otopine.⁶⁰ U prezasićenoj otopini, nakon, tzv. indukcijskog vremena, dolazi do izdvajanja čvrste faze iz otopine. Pritom je prvi i energetski najzahtjevniji stupanj proces nukleacije. Nukleacija će otpočeti samo ukoliko bude svladana energetska barijera povezana sa površinskom energijom formiranja nukleusa. Da bi se osigurala pokretačka sila potrebna za svladavanje te energetske barijere potrebno je uspostaviti dovoljno prezasićenu otopinu. Do pojave kristala iz prezasićene otopine dolazi nakon indukcijskog vremena, koje može varirati u rasponu od djelića sekunde do nekoliko godina. Duljina indukcijskog vremena je direktno ovisna o prezasićenosti.

Sukladno klasičnoj teoriji nukleacije, nukleus je mali dio kristalne faze s jakim međuionskim vezama. Zbog činjenice da su dimenzije nukleusa vrlo male (stotinjak atoma, molekula ili iona), da je mjesto njihovog pojavljivanja u sustavu nemoguće predvidjeti te da su krajnje nestabilni, nukleaciju nije moguće pratiti direktno promatranjem, već i, na temelju broja, veličine i nekih drugih karakteristika čestica stvorenog taloga.⁶⁴

Nukleacija se može zbivati na česticama nečistoća koje se nalaze u otopini (heterogena nukleacija) ili stvaranjem ionskih ili molekulskih asocijata, embrija ili nukleusa (homogena nukleacija). Heterogena nukleacija započinje pri nižim prezasićenostima na česticama nečistoća prisutnih u otopini, a broj istaloženih čestica ($10^6 - 10^7$ čestica cm^{-3}) ovisi o broju nečistoća u sustavu. U slučaju homogene nukleacije, broj novonastalih čestica iznosi $10^8 - 10^{12} \text{ cm}^{-3}$. Oba ova mehanizma nukleacije nazivamo primarnom nukleacijom, za razliku od sekundarne nukleacije kod koje dolazi do nastajanja novih čestica u prezasićenoj otopini u kojoj već postoji čvrsta faza. Stvaranje sekundarnih nukleusa posljedica je interakcija već stvorenih kristala i prezasićene otopine, sudara između kristala te sudari između kristala i mješača ili reakcijske posude. Ovaj tip nukleacije je učestaliji kod taloženja dobro i umjereno topljivih soli.

3.1.2. Rast kristala

Procesom nukleacije nastaje zanemarivo mala količina taloga, pa se stoga niti prezasićenost otopine bitno ne mijenja. Tek rastom nukleusa u kristale, dolazi do izdvajanja većeg dijela čvrste faze, što rezultira i znatnom promjenom sastava otopine. Na molekulskom nivou rast kristala može se predočiti kao neprekidna nadogradnja jednog sloja (plohe) molekula ili iona površ drugog.

Iako su kemijska i fizikalna svojstva taloga, broj kristala i raspodjela veličine kristala, prvenstveno određeni mehanizmom i kinetikom nukleacije, ipak kinetika rasta kristala određuje brzinu smanjenja prezasićenosti otopine, a time djeluje i na nukleaciju. Mjerenjem brzine rasta kristala kao funkcije koncentracije otopine i usporedbom s teorijskim vrijednostima brzine rasta, moguće je odrediti mehanizam rasta kristala.

Naime, brzina rasta (v) se općenito može izraziti kao:

$$v = C \cdot f(c) \quad (12)$$

gdje je C konstanta, a $f(c)$ funkcija koncentracije. Postoji nekoliko načina izražavanja i mjerenja brzine rasta, pri čemu se koriste različite aproksimacije.

Kada su kristali dovoljno veliki, brzina rasta se može izraziti kao brzina linearnog rasta neke kristalne plohe (v_g) koju definira brzina pomaka navedene plohe u smjeru njezine okomice. Brzine linearnog rasta za različite kristalografske plohe obično su različite.

Također je moguće i izražavanje brzine rasta putem toka gustoće (J) kao količine taloga deponiranog na jedinicu površine (A) u nekom vremenu. Tok gustoće povezan je s tokom čestica (j) što se može prikazati jednadažbom:

$$J = \frac{j}{A} \quad (13)$$

te s brzinom linearnog rasta:

$$\nu_g = V_m J = \left(\frac{V_m}{A} \right) j \quad (14)$$

gdje je V_m molarni volumen taloga.

U slučajevima kada su kristali mali (nekoliko mikrometara) te kada njihove linearne dimenzije nije moguće točno odrediti, brzina linearnog rasta definira se kao promjena polumjera ekvivalentne kugle, tj. ukupnog volumena kristala u sustavu izraženog kao volumen kugle u vremenu, dr/dt . Ovo je uobičajen pristup sve dok se oblik čestica bitno ne razlikuje od kugle te ne vrijedi za igličaste, pločaste i dendritične kristale.

Rast kristala je rezultat niza procesa koji se zbivaju na nekoj udaljenosti od površine i na samoj površini kristala. Procesi u otopini (miješanje reakcijskih komponenata, transport materijala difuzijom ili konvekcijom do površine kristala) prethode procesima na površini (adsorpcija molekula i iona na površinu, njihova migracija po površini, dehidratacija-desolvatacija, stvaranje površinskih nukleusa i ugradnja u aktivna mjesta (*kinks*) kristalne rešetke). Najsporiji od tih procesa određuje ukupnu brzinu i predstavlja ključni mehanizam rasta kristala.⁶⁵ Na tome se zasniva i jedna od podjela mehanizama rasta kristala, prema kojoj rast može biti kontroliran prijenosom tvari u otopini ili procesima na površini kristala.

3.1.2.1. Rast kontroliran prijenosom tvari u otopini

Tvar se prenosi kroz otopinu do površine kristala difuzijom ili konvekcijom. Difuzijom kontrolirana kinetika rasta izvedena je iz prvog Fickovog zakona⁶⁴

$$\frac{dn}{dt} = D \cdot A \frac{dc}{dx} \quad (15)$$

Ova jednadžba opisuje količinu tvari koja u nekom vremenu (dn/dt) difundira kroz površinu A okomitu na os x . D je koeficijent difuzije, a dc/dx je gradijent koncentracije u smjeru osi x . Ako se oblik kristala aproksimira na oblik kugle, što je dosta dobra aproksimacija za opisivanje rasta kompaktnih kristala u otopini, koncentracijski gradijent je definiran:

$$\frac{dc}{dx} = \frac{c - c_s}{r}, \quad (16)$$

gdje je c koncentracija otopljene tvari u prezasićenoj otopini, a c_s koncentracija otopljene tvari u ravnoteži. Izraz $c - c_s$ je apsolutna prezasićenost.

Depozicijom materijala (dn) povećava se volumen kugle za dr :

$$dV = 4r^2 \pi \cdot dr \quad (17)$$

Ako se uzme u obzir da je molarni volumen (V_m):

$$V_m = \frac{4r^2 \pi \cdot dr}{dn} \quad (18)$$

Jednadžba (17) tada se može prikazati kao:

$$dV = V_m dn \quad (19)$$

Kombinacijom jednadžbi (15), (16) i (19) može se dobiti izraz za ukupnu brzinu rasta kontroliranog difuzijom, koja je izravno proporcionalna prezasićenosti, a obrnuto proporcionalna veličini čestice:

$$\frac{dr}{dt} = DV_m \frac{c - c_s}{r} \quad (20)$$

Iz jednadžbe (20) vidljivo je da manji kristali rastu brže od velikih, što rezultira dosta uniformnom raspodjelom veličine čestica sustava koji je na početku procesa rasta kontroliranog difuzijom bio polidisperzan.⁶² Jednadžba (20) vrijedi kada se koncentracija otopljene tvari (c) ili topljivost (c_s) mogu opisati jednim parametrom kao što je slučaj sa jednomolekularnim sustavima. Međutim za elektrolite, izraz je nešto kompleksniji, zbog toga što je difuzija različitih iona karakterizirana različitim koeficijentima difuzije. Stoga, za elektrolit tipa AB uz odgovarajuće koeficijente difuzije (D_A i D_B), te produkt topljivosti (K_{sp}), brzina rasta definira se kao:

$$\frac{dr}{dt} = \frac{V_m}{2r} \left[c_A D_A + c_B D_B - \sqrt{(c_A D_A - c_B D_B)^2 + 4 D_A D_B K_{sp}} \right] \quad (21)$$

S obzirom da se obično koeficijenti difuzije puno ne razlikuju, vrijedi aproksimacija $D_A \approx D_B \approx D$, te je jednadžbu (21) moguće pojednostaviti na:

$$\frac{dr}{dt} = \frac{DV_m}{2r} \left[c_A + c_B - \sqrt{(c_A - c_B)^2 + 4K_{sp}} \right] \quad (22)$$

Pretpostavka o difuzijski kontroliranom rastu može se relativno jednostavno testirati: ukoliko se brzina linearnog rasta kristala pri određenoj prezasićenosti mijenja s promjenom intenziteta miješanja sustava, s velikom se sigurnošću može tvrditi da je riječ upravo o difuzijski kontroliranom mehanizmu. Dodatna potvrda toj pretpostavci je određivanje brzine rasta kristala, kao i koeficijenta difuzije, korištenjem jednadžbe (20) te usporedba s empirijskim vrijednostima dobivenim u identičnim uvjetima (prezasićenost i veličina kristala). Dovoljna je čak i gruba procjena brzine rasta, obzirom da su brzine rasta kontrolirane procesima na površini, barem deset puta manje.

Uočeno je da povećanje brzine rasta ovisi, uglavnom, o veličini čestica ili o razlici gustoća čestica i otopine te o jačini miješanja otopine. Nielsen⁶⁶ je izveo izraz za veličinu čestica kod koje difuzija počinje značajno utjecati na difuzijski kontroliranu brzinu rasta:

$$r_{\text{CD}} = \left(\frac{9D\eta}{2g|\Delta\rho|} \right)^{1/3} \quad (23)$$

gdje je za umjereno miješanu suspenziju g gravitacijsko ubrzanje ($g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$), $\Delta\rho = \rho_0 - \rho$ je razlika u gustoći otopine i čestica, a η je dinamička viskoznost.

Učinak miješanja otopine na brzinu rasta, posljedica je postojanja nepokretnog sloja otopine debljine δ oko kristala. Miješanjem suspenzije nepokretni sloj se stanjuje i omogućuje brži prijenos iona. Ispravka za debljinu tog sloja unosi se u jednadžbu (20) pomoću faktora F :

$$\frac{dr}{dt} = DV_m \frac{c - c_s}{r} F = DV_m \frac{c - c_s}{\delta} \quad (24)$$

gdje je $\delta = r / F$. Za male kristale je $\delta = r$, dok se za velike kristale ($10 \text{ }\mu\text{m} < r < 1 \text{ mm}$) koji rastu u vodenoj otopini pri sobnoj temperaturi δ može izračunati prema formuli:

$$\delta \approx \frac{r}{(Pe^* + 1)^{0,285}} \quad (25)$$

gdje je Pe^* Pecletov broj za prijenos mase:

$$Pe^* = \frac{2r^3 g \Delta\rho}{9\eta D} \equiv \frac{r^3}{r_{\text{CD}}^3} \quad (26)$$

Za čestice veće od 1 mm, δ je proporcionalan $r^{0,15}$.

U slučaju velikih čestica koje rastu uz jako miješanje otopine, brzina rasta isključivo je kontrolirana difuzijom te se može izraziti kao:

$$\frac{dr}{dt} = 1.26 \left(\frac{\rho}{\rho_0} \right)^{1/3} L^{-1/3} V_m U (c - c_s) \quad (27)$$

gdje je L promjer reakcijske posude, a U ukupna brzina tekućine.

3.1.2.2. Rast kontroliran procesima na površini

Kao što je ranije navedeno, na proces rasta kristala u otopini utječu kako procesi prijenosa tvari kroz otopinu, tako i različiti procesi na površini kristala.^{63,67,68} Proces koji najviše utječu na kinetiku rasta su:

- adsorpcija iona ili molekula na površinu kristala
- difuzija po površini, površinska nukleacija i ugradnja
- vijčana dislokacija.

Kako je riječ o uzastopnim procesima, svaki od njih može određivati brzinu rasta. Nađeno je da brzinu rasta kristala iz elektrolitnih vodenih otopina najčešće određuju adsorpcija i ugradnja iona ili molekula u kristalnu rešetku.³⁵

Adsorpcija

Ovaj mehanizam rasta pretpostavlja da ioni u otopini, privučeni električnim nabojem na površini na svom putu od otopine do površine kristala moraju otpustiti dio ili sve molekule vode iz svog hidratacijskog sloja te proći kroz hidratacijski sloj oko kristala.⁶⁶

Brzina linearnog rasta kristala za slučaj mehanizma kontroliranog adsorpcijom i dehidracijom definirana je kao:

$$v_g = V_m d v_{ad} c_s (S - 1) = k_1 (S - 1) \quad (28)$$

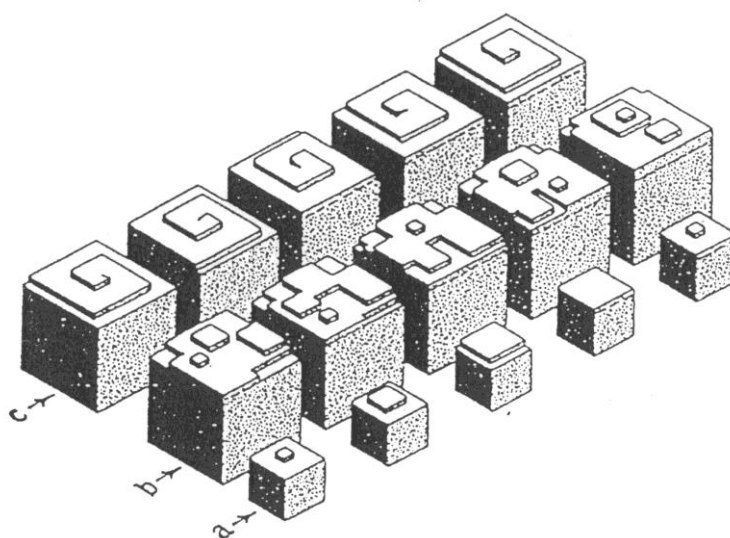
gdje je d promjer molekule (iona) i debljina sloja, v_{ad} je frekvencija skoka molekule (iona), c_s je topljivost soli, te je $S - 1$ relativna prezasićenost:

$$S - 1 = \frac{a - a_s}{a_s} \quad (29)$$

Brzinu adsorpcije mogu kontrolirati dehidracija iona ili što je još vjerojatnije prolazak iona kroz hidratizirani sloj kristala.

Površinska nukleacija

Mehanizam nastajanja površinskih dvodimenzionalnih nukleusa može se predočiti na sličan način kao i mehanizam nastajanja trodimenzionalnih nukleusa. Ioni adsorbirani na površini, migriraju po njoj i nasumično se sudaraju stvarajući stabilni nukleus, koji rastom stvara novu plohu. Broj nukleusa na površini ovisi o prezasićenosti otopine i veličini kristala. Pri određenim uvjetima (kristali manji od $0,1 \mu\text{m}$ i relativno mala prezasićenost) stvaranje površinskog nukleusa može biti proces koji određuje brzinu rasta kristala. Brzina rasta ovisi o brzini površinske nukleacije i o brzini dvodimenzionalnog rasta površinskog nukleusa što je prikazano na slici 3.2.



Slika 3.2. Shema rasta kristala: a) mehanizmom mononuklearnog sloja, b) mehanizmom polinuklearnog sloja i c) mehanizmom stvaranja neprekinute vijčane plohe.⁶⁰

Ako je dvodimenzionalni rast površinskih nukleusa brži od stvaranja novih nukleusa (slika 3.2a), rast kristala slijedi mehanizam tzv. *mononuklearnog sloja*, gdje je brzina

linearnog rasta proporcionalna raspoloživoj površini (A), brzini površinske nukleacije (J') i debljini sloja (d):

$$v_g = A d J' = A d (D_s / d^4) \exp(-\Delta G'^* / k_B T) = (6r^2 D_s / d^3) \exp\left(-\frac{\beta' \sigma^2 v^{4/3}}{(k_B T)^2 v \ln S}\right) \quad (30)$$

gdje je k_B Boltzmannova konstanta, $\Delta G'^*$ Gibbsova energija stvaranja kritičnog nukleusa, D_s površinski koeficijent difuzije, σ međupovršinska napetost, β' geometrijski faktor koji ovisi o površini i promjeru površinskog nukleusa te v broj iona u molekuli.⁶⁹ Izraz $\ln S$ je prezasićenost otopine. Pri tom se pretpostavlja da kristal rastom zadržava svoj oblik. U ovom slučaju radi se o obliku kocke brida duljine r ($A = 6r^2$).

Važno svojstvo procesa rasta kontroliranog mehanizmom mononuklearnog sloja je ovisnost brzine rasta o veličini površine kristala ili duljine brida kristala (A ili r u jednadžbi (30)). Uz pretpostavku da se koncentracija otopine u početku taloženja ne mijenja (budući da su kristali manji od 0,1 μm) jednadžba (30) poprima sljedeći oblik:

$$\frac{dr}{dt} = C \cdot r^2 \quad (31)$$

U sustavima u kojima je prezasićenost visoka, a kristali relativno veliki postoji vjerojatnost postojanja više nukleusa na površini koji stvaraju novi sloj, a koji je isto tako pravilan kao i prethodni (slika 3.2b). Brzina rasta kristala u ovom slučaju slijedi mehanizam tzv. *Polinuklearnog sloja*, u kojem nema ovisnosti o veličini kristala, budući da je površina cijelo vrijeme prekrivena nukleusima. Treba napomenuti da je teorija o rastu polinuklearnog sloja izvorno rađena za rast iz talina,⁷⁰ a tek kasnije je prilagođena za rast iz elektrolitnih otopina.⁶⁷ Brzina linearnog rasta (v_g) kontrolirana ovim mehanizmom dana je sljedećim izrazom:

$$v_g = k_e S^{7/6} (S - 1)^{2/3} (\ln S)^{1/6} \exp\left(\frac{-K_e}{\ln S}\right) \quad (32)$$

gdje je

$$k_e = 2 d v_{in} (K_{ad} c_s V_m)^{4/3} \exp\left(\frac{-\gamma}{k_B T}\right) \quad (33)$$

a v_{in} i γ su frekvencija ugradnje iona i slobodna energija brida, te

$$K_e = \frac{\pi \gamma^2}{3 k_B^2 T} \quad (34)$$

Predeksponencijalni faktor, $F(S) = S^{7/6} (S-1)^{2/3} (\ln S)^{1/6}$, može se za male vrijednosti od S aproksimirati s $F(S) \approx S^{7/6} (S-1)^{5/6}$, a za velike vrijednosti od S sa $S^{11/6}$.

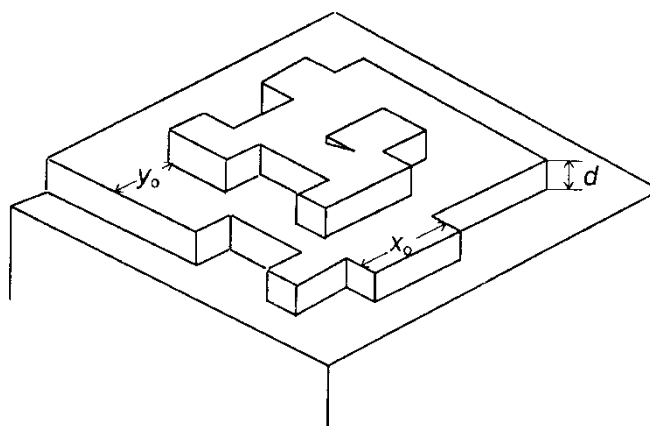
Za određeno uže područje prezasićenosti, brzinu rasta kontroliranu površinskom nukleacijom moguće je približno prikazati kao:

$$v_g = k_g (S-1)^n \quad (35)$$

gdje je n kinetički red reakcije rasta kristala koji može imati gotovo bilo koju pozitivnu vrijednost ovisno o prezasićenosti, fizičkim svojstvima čvrste faze ili čak o načinu izražavanja prezasićenosti.^{63,64}

Rast na vijčanoj dislokaciji

U realnim je sustavima uočeno da kristali rastu i pri uvjetima prezasićenosti koja je znatno niža od one potrebne za stvaranje površinskih nukleusa ($S - 1 \leq 0,01$). Objašnjenje proizlazi iz činjenice da realni kristali nisu savršeni te obično sadrže pogreške u strukturi, tzv. Dislokacije. Najčešći oblik dislokacije je vijčana dislokacija, koja omogućuje rast kristala *mehanizmom stvaranja neprekinute vijčane plohe* (slika 3.2c).^{60–62,64,65}



Slika 3.3. Struktura kristalne površine s vijčanom plohom; d -visina plohe, x_o -prosječna udaljenost između aktivnih mjesta rasta i y_o -udaljenost između dvije susjedne plohe.⁵⁸

Kao što je prikazano na slici 3.3, struktura kristalne površine s vijčanom plohom karakterizirana je visinom plohe (d), prosječnom udaljenosti između aktivnih mjesta rasta (x_o) i udaljenosti između dvije susjedne plohe (y_o):

$$x_o = d S^{1/2} \exp\left(\frac{\gamma}{k_B T}\right) \quad (36)$$

$$y_o = \frac{19 d \gamma}{k_B T \ln S} \quad (37)$$

Iz gore navedenih jednačbi (36) i (37) te upotrebom tipičnih vrijednosti, slobodnih energija brida (γ) za elektrolite koji rastu u vodenim otopinama, određeno je da je udaljenost između aktivnih mjesta rasta pri niskim prezasićenostima, manja od udaljenosti između dvije susjedne plohe ($x_o < y_o$ kad god je $1 < S < 1,6$). Površinska koncentracija aktivnih mjesta rasta dana je jednačbom:

$$\frac{1}{x_o y_o} = \frac{S^{1/2} \ln S}{19 d^2 (\gamma / k_B T) \exp (\gamma / k_B T)} \quad (38)$$

Pri višim relativnim prezasićenostima (do $S = 10$), $S^{1/2} \ln S$ se može aproksimirati sa $S - 1$, pa je jednačbu (38) moguće napisati kao:

$$\frac{1}{x_o y_o} \approx \frac{S - 1}{19 d^2 (\gamma / k_B T) \exp (\gamma / k_B T)} \quad (39)$$

Analizirajući kinetiku rasta za kristale s vijčanom dislokacijom, nađena je zadovoljavajuća parabolička zakonitost u širokom području prezasićenosti. Tako se kod vrlo niskih prezasićenosti, kada su adsorpcija i ugradnja iona relativno brze, može pretpostaviti da je difuzija po površini korak koji kontrolira brzinu rasta.

Pri $S < 1,6$ i $x_o < y_o$, brzina linearnog rasta kristalne plohe proporcionalna je brzini lateralnog rasta plohe ("adsorpcija" duž stepenice). Također, brzina lateralnog rasta proporcionalna je $(S-1)$ (28) i gustoći stuba, y_o^{-1} , (37) iz čega slijedi :

$$v_g = k_2 (S - 1) \ln S \quad (40)$$

Za $S \approx 1$, slijedi da je $\ln S \approx (S-1)$, te je dobivena sljedeća parabolička zakonitost:

$$v_g \approx k_2 (S - 1)^2 \quad (41)$$

gdje je k_2 konstanta brzine rasta kristala.

Parabolička zakonitost, uočena i pri daleko višim prezasićenostima, može se objasniti pretpostavkom da je ugradnja u aktivna mjesta proces koji određuje brzinu rasta. U tom slučaju brzina ovisi o difuziji iona do aktivnih mjesta i gustoći navedenih mjesta na površini, a jednačba za brzinu rasta poprima oblik:

$$v_g \approx k_2 (x_o y_o)^{-1} j \approx k_2 S^{1/2} (S-1) \ln S \quad (42)$$

U intervalu $1 < S < 30$ može se pokazati da se izraz može aproksimirati s $(S-1)^2$.

Uvođenjem izraza za paraboličku konstantu (k_2), koja je definirana nizom teorijskih parametara, u jednačbu (42) dobiva se:⁶⁸

$$v_g = \frac{2 v_{in} d^3 K_{ad} V_m c_s (S-1)}{x_o y_o} \approx \frac{0,1 v_{in} d K_{ad} V_m c_s}{(\gamma / k_B T) \exp (\gamma / k_B T)} (S-1)^2 \quad (43)$$

Tijekom procesa rasta kristala jedne čvrste faze može doći do promjene mehanizma koji kontrolira brzinu rasta. Kao što je ranije navedeno, kod mehanizama mononuklearnog sloja i difuzijom kontroliranog rasta, kojima brzine rasta ovise o veličini čestica, nakon postizanja neke određene veličine, moguće je da neki drugi mehanizmi postanu odgovorni za brzinu rasta čvrste faze. Kada se dva procesa zbivaju istovremeno, poput rasta na vijčanim dislokacijama i rasta kontroliranog površinskom nukleacijom, njihove se brzine zbrajaju.

3.1.3. Transformacija metastabilnih čvrstih faza

Prema Ostwaldovom pravilu, tijekom taloženja iz prezasićenih otopina, inicijalno nastaje najnestabilnija čvrsta faza (faza s najvećom topljivošću), koja s vremenom transformira u termodinamički stabilnu, najnetopljiviju fazu.⁷¹ Relativni odnosi brzina nukleacije i rasta kristala mogućih čvrstih faza su oni čimbenici koji određuju koja će od tih faza prije taložiti.⁷² Prema Gibbs-Thompson (Kelvin)-ovoj jednadžbi, koja definira ovisnost veličine kritičnog nukleusa (r^*) o napetosti površine (σ):¹⁸

$$r^* = \frac{\sigma V_m}{k_B T \nu \ln S} \quad (44)$$

vidljivo je da će kod određene prezasićenosti, faza s manjom površinskom napetošću, tj. manje stabilna, topljivija faza, tvoriti manji kritični nukleus koji se stabilizira rastom.

Dva su moguća načina prijelaza iz jedne faze u drugu:⁵⁸

- unutarnjim preuređenjem strukture, tzv. transformacija u čvrstoj fazi
- otapanjem nestabilne i istovremenom nukleacijom i rastom stabilne faze, tzv. transformacija putem otopine.

Cardew i Davey⁷³ su predložili model transformacije putem otopine, prema kojem transformacija započinje uspostavom ravnoteže nestabilne faze s otopinom. Kako se u otopini nalaze i kristali stabilne faze, njihovim rastom otopina postaje podzasićena u odnosu na nestabilnu fazu te se ova počinje otapati. Tako se istovremeno zbivaju procesi otapanja nestabilne faze i rasta stabilne faze sve dok se ne uspostavi ravnoteža između stabilne faze i otopine. Ukupna brzina transformacije ovisi, kako o relativnom odnosu brzine otapanja nestabilne i brzine rasta stabilne faze, tako i o relativnim odnosima površina tih dviju čvrstih faza.

3.2. Rast kristala kalcijeva karbonata

3.2.1. Kinetika rasta kristala kalcijeva karbonata

Kinetika rasta kristala kalcijeva karbonata istraživana je različitim eksperimentalnim metodama.^{61,74} U ovoj disertaciji praćeno je spontano taloženje iz otopina koje sadrže konstitucijske ione (Ca^{2+} i CO_3^{2-}), transformaciju metastabilne modifikacije (vaterit) u stabilnu (kalcit) i rast kristala iniciran dodatkom kristalnog sjemena kalcita uz dodatak aditiva.

Na kinetiku rasta utječu promjena ionske jakosti i temperature, čime se mijenja i prezasićenost sustava (S). Ranijim istraživanjem spontanog taloženja vaterita,^{61,74} iz otopina CaCl_2 i Na_2CO_3 , dobiveno je da se porastom ionske jakosti produžuje induksijsko vrijeme. Zaključeno je da je u ispitivanom području brzina rasta kristala kontrolirana procesima na površini. Brzina rasta kristala je drugog reda i može se prikazati funkcijom:

$$\frac{dr}{A \cdot dt} = k(S-1)^2 \quad (45)$$

što odgovara *mehanizmu stvaranja neprekinute vijčane plohe* (rast na spiralnoj plohi), gdje je A površina taloga.

Pri stalnoj početnoj stehiometrijskoj koncentraciji reaktanata brzina se smanjuje povišenjem ionske jakosti, dok kod konstatne početne prezasićenosti brzina raste s povećanjem ionske jakosti. Eksperimentalno dobiveni izraz za koeficijent brzine reakcije je:

$$\log k = -0,275 + 0,228 \left[\sqrt{I} / (1 + \sqrt{I}) - 0,3I \right] \quad (46)$$

Promjenom temperature dobivena je ovisnost koeficijenta brzine reakcije o temperaturi, što se može prikazati jednadžbom:

$$\ln k = 22,490 - 6872/T \quad (47)$$

Iz jednadžbe (47) može se izračunati energija aktivacije, koja za danu reakciju iznosi 57,1 kJ / mol.

U slučaju promatranja transformacije vaterita⁷⁵⁻⁷⁷ u kalcit mehanizam i konstanta brzine reakcije određeni su s tri glavna procesa:

- rast kristala vaterita

$$v_v = k_{gv} (c - c_{Sv})^{n_{gv}} \quad (48)$$

- otapanje vaterita

$$v_{ov} = -k_{ov} (c_{Sv} - c)^{n_{ov}} \quad (49)$$

- rast kristala kalcita

$$v_k = k_k (c - c_{Sv})^{n_k} \quad (50)$$

gdje je r brzina reakcije, k_v konstanta brzine rasta vaterita, k_{ov} konstanta brzine otapanja vaterita, k_k konstanta brzine rasta kalcita, n je red reakcije, c_i početna koncentracija reaktanata, dok je c koncentracija u vremenu t . Otapanje kristala vaterita kontrolirano je difuzijom konstitucijskih iona u otopinu, što se zaključuje na temelju reda reakcije koji iznosi 1. Rast kristala kalcita je kao i u slučaju vaterita, može biti reda dva ili više.

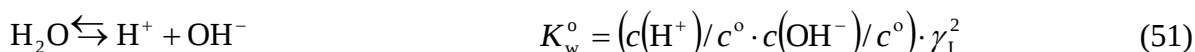
Za istraživanje kinetike i mehanizma rasta kristala najbolja metoda je rast iniciran dodatkom dobro definiranom kristalnom sjemena (engl. *seed*), pri čemu se veličina i morfologija kristala bitno ne mijenjaju, što omogućuje reproducibilnost mjerenja.

3.2.2. Utjecaj aditiva na kinetiku rasta kristala kalcijeva karbonata

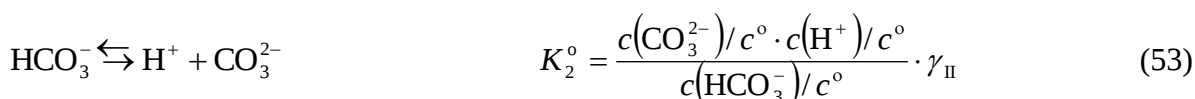
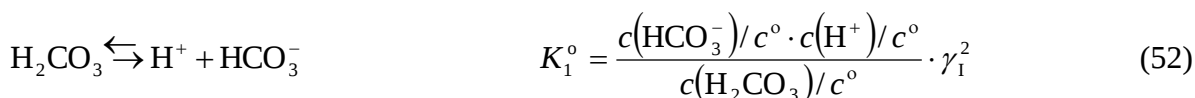
Utjecaj aditiva na kinetiku rasta najčešće je ispitivan metodom rasta na kristalnom sjemenu. Najčešće ispitivani aditivi su kationi i anioni^{40,41} ili organske molekule.^{20,21,42} U prirodi na rast kristala najviše utječu anorganski ioni, međutim uočeno je da iako je prisutna u malom udjelu, organska matrica ima jako veliku ulogu u biomineralizaciji tokom rasta kristala unutar organizama. U organskoj matrici najviše su zastupljeni proteini te su se iz toga razloga koriste polimeri aminokiselina kao modelni sustavi za ispitivanje utjecaja raznih proteina.

Za usporedbu utjecaja odabranih aditiva s obzirom na ispitivana svojstva aditiva praćena je promjena pH sustava. Iz te promjene izračunat je sastav reakcijske smjese. Pomoću početnih koncentracija dodanog CaCl_2 ($c_i(\text{Ca})_{\text{tot}}$) i Na_2CO_3 ($c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}}$) izračunavaju se koncentracije i aktiviteti relevantnih ionskih vrsta koje se mogu nalaziti u otopini (H^+ , OH^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , CaCO_3^0 , CaHCO_3^+ , CaOH^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^-). Potrebne jednadžbe za izračun izvode se iz konstanti ravnoteža:

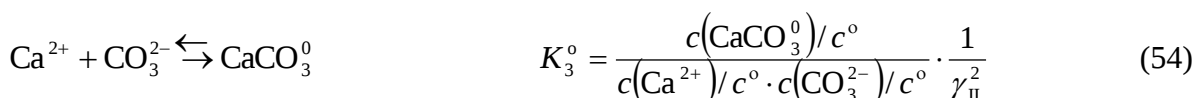
1. disocijacije vode:



2. disocijacije karbonatne kiseline:



3. nastajanja ionskih parova:



$$\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CaHCO}_3^+ \quad K_4^0 = \frac{c(\text{CaHCO}_3^+)/c^0}{c(\text{Ca}^{2+})/c^0 \cdot c(\text{HCO}_3^-)/c^0} \cdot \frac{1}{\gamma_{\text{II}}} \quad (55)$$

$$\text{Ca}^{2+} + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{CaOH}^+ \quad K_5^0 = \frac{c(\text{CaOH}^+)/c^0}{c(\text{Ca}^{2+})/c^0 \cdot c(\text{OH}^-)/c^0} \cdot \frac{1}{\gamma_{\text{II}}} \quad (56)$$

$$\text{Na}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{NaCO}_3^- \quad K_6^0 = \frac{c(\text{NaCO}_3^-)/c^0}{c(\text{Na}^+)/c^0 \cdot c(\text{CO}_3^{2-})/c^0} \cdot \frac{1}{\gamma_{\text{II}}} \quad (57)$$

4. čvrste faze i otopine:

$$\text{CaCO}_3(\text{s}) \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \quad K_s^0 = (c(\text{Ca}^{2+})/c^0 \cdot c(\text{CO}_3^{2-})/c^0) \cdot \gamma_{\text{II}}^2 \quad (58)$$

u kojima K^0 predstavljaju termodinamičke konstante ravnoteže, γ_{I} i γ_{II} su koeficijenti aktiviteta jednovalentnih odnosno dvovalentnih iona, dok je c^0 standardna molarna koncentracija (1 mol dm^{-3}).

Osim konstante ravnoteža potrebne su još i bilance masa:

$$c(\text{Ca})_{\text{tot}} = c(\text{Ca}^{2+}) + c(\text{CaCO}_3^0) + c(\text{CaHCO}_3^+) + c(\text{CaOH}^+) \quad (59)$$

$$c(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = c(\text{CO}_3^{2-}) + c(\text{HCO}_3^-) + c(\text{CaCO}_3^0) + c(\text{CaHCO}_3^+) + c(\text{NaCO}_3^-) \quad (60)$$

$$c_{\text{tot}} = c(\text{Ca})_{\text{tot}} = c(\text{CO}_3)_{\text{tot}} \quad (61)$$

$$c(\text{Cl}^-)_{\text{tot}} = 2 \cdot c_i(\text{CaCl}_2) \quad (62)$$

$$c(\text{Na})_{\text{tot}} = c(\text{Na}^+) + c(\text{NaCO}_3^-) \quad (63)$$

odnosno bilanca naboja

$$c(\text{H}^+) + 2c(\text{Ca}^{2+}) + c(\text{CaHCO}_3^+) + c(\text{CaOH}^+) + c(\text{Na}^+) = 2 \cdot c(\text{CO}_3^{2-}) + c(\text{HCO}_3^-) + c(\text{OH}^-) + c(\text{Cl}^-) + c(\text{NaCO}_3^-) \quad (64)$$

Koncentracije i aktiviteti pojedinih ionskih vrsta, te ionska jakost, izračunati su postupkom iteracije pomoću jednadžbi (51) – (64).⁷⁸ Koeficijenti aktiviteta izračunati su prema Daviesovoj jednadžbi:

$$-\log \gamma_{\pm} = A_{\text{DH}} z^2 \left(\frac{\sqrt{I_c / c^0}}{1 + \sqrt{I_c / c^0}} - 0,3(I_c / c^0) \right) \quad (65)$$

dok je ionska jakost računata prema:

$$I_c = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (c_i z_i^2) \quad (66)$$

gdje je c_i koncentracija iona, a z naboj iona. Koncentracije aditiva znatno su niže od koncentracija ostalih sudionika te nisu korištene u računu, osim u slučaju dodatka aminokiselina, što će biti dodatno objašnjeno u poglavlju rezultata i rasprave. Iz razlike koncentracije ukupno otopljenog kalcijevog iona ($c(\text{Ca})_{\text{tot}}$) i početne koncentracije kalcijevog iona ($c_i(\text{CaCl}_2)$) dobiva se koncentracija istaloženog CaCO_3 (c_{ppt}):

$$c_{\text{ppt}} = c_i(\text{CaCl}_2) - (c(\text{Ca}^{2+}) + c(\text{CaCO}_3^0) + c(\text{CaHCO}_3^+) + c(\text{CaOH}^+)) \quad (67)$$

Ukoliko se aditiv doda u velikim koncentracijama potrebno je dodatno uračunati konstante ravnoteže aditiva te odrediti koncentracije i aktivite relevantnih ionskih vrsta aditiva. U ovoj disertaciji korekcije su napravljene pri dodatku aminokiselina kao aditiva, a dodane su konstatne ravnoteže disocijacija aminokiselina i kompleksiranja s Ca^{2+} ionima.

Brzina rasta kristala (R) izračunata je numeričkim deriviranjem ukupne koncentracije otopljenog kalcijevog iona ($c(\text{Ca})_{\text{tot}}$) po vremenu (t) te je korigirana za površinu taloga (A):

$$R = - \frac{dc(\text{Ca})_{\text{tot}}}{A \cdot dt} \quad (68).$$

gdje je

$$A = A_i \left(1 + \frac{c_{\text{ppt}} M}{\gamma_i} \right)^{2/3} \quad (69)$$

u kojoj je M molarna masa CaCO_3 , A_1 površina kristalnog sjemena dodanog u otopinu te γ_i masena koncentracija sjemena.

Dobivenim vrijednostima testirani su odgovarajući kinetički modeli (parabolički, eksponencijalni) s ciljem utvrđivanja mehanizma koji dominantno kontrolira rast kristala pri istraživanim eksperimentalnim uvjetima prezasićenosti, temperature, ionske jakosti i/ili dodatka aditiva. Parabolička ovisnost brzine rasta kristala prikazana je izrazom:

$$R = k_s (S - 1) \ln S, \quad (70)$$

dok je eksponencijalna:

$$R = k_e F(S) \exp[-K_e / \ln S] \quad (71)$$

da bi se u ovisnosti o slaganju podataka s modelom testirao mehanizam rasta. Slaganje kinetičkih podataka s paraboličkim zakonom brzine rasta kristala ukazuje na rasta na vijčanom dislokacijom, dok slaganje s eksponencijalnim modelom ukazuje da je rast kontroliran nukleacijom na površini.⁴⁰

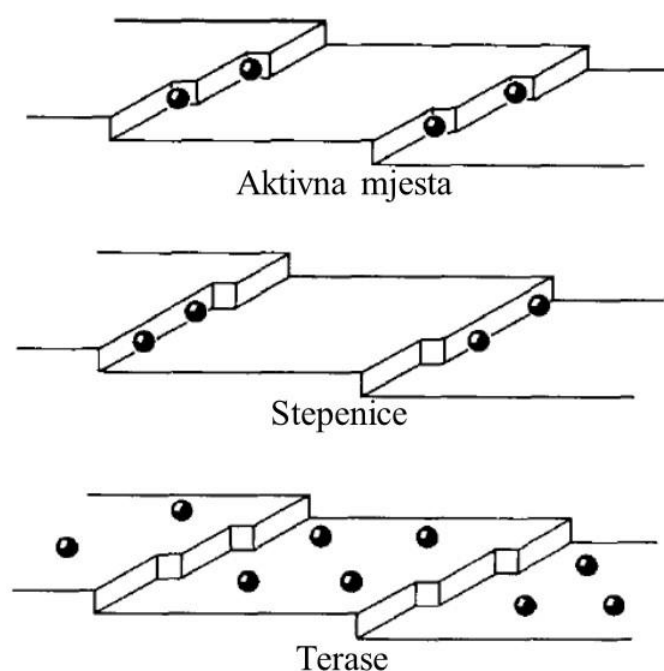
3.2.2.1. Model Kubote i Mullina

Kubota i Mullin^{19,70} su predložili teorijske modele kojima se može pratiti učinak aditiva na rast kristala. Prema navedenom modelu, smanjenje brzine rasta kristala uz dodatak određenih aditiva ovisi, kako o prekrivenosti aktivnih mjesta molekulama aditiva, tako i o djelotvornosti samog aditiva.

Adsorpcija aditiva na površinu kristala može uzrokovati smanjenje brzine rasta kristala, što je posljedica usporavanja napredovanja rastućih stepenica na kristalnim plohama (slika 3.4). Pri tome, širenje stepenice (čijim lateralnim širenjem kristal raste) u kontaktu s adsorbiranim aditivom zaustavljeno je kada je udaljenost između adsorbiranih molekula manja od pripadajućeg promjera kritičnog površinskog nukleusa. Također, model predviđa usporavanje rasta i promjenu morfologije kristala u slučajevima kada je udaljenost između adsorbiranih molekula veća od promjera kritičnog površinskog nukleusa, pri čemu se stepenica obavlja oko molekula aditiva.^{18,79–81} Rezultat djelovanja adsorpcije na rast kristala može biti manje ili više izražen, što primarno ovisi o mehanizmu adsorpcije. Pri tome je moguće razlikovati tri mjesta na kojima se aditivi mogu adsorbirati, i to na:

- Aktivna mjesta (engl. *kink sites*)
- Stepenice (engl. *steps*)
- Terasa (engl. *terraces*)

što je shematski prikazano na slici 3.4.



Slika 3.4. Shematski prikaz mjesta na površini kristala na kojima aditivi mogu adsorbirati.⁸¹

Djelovanje aditiva na brzinu rast kristala moguće je kvantitativno procijeniti na osnovu modela kojeg su predložili Kubota i Mullin.^{19,82,83} Prema ovom modelu, smanjenje brzine rasta kristala (inhibicija rasta kristala) u prisustvu određenih aditiva, je funkcija prekrivenosti površinskih aktivnih mjesta molekulama aditiva i djelotvornosti aditiva. Sukladno modelu, povećanje koncentracije aditiva ne mora nužno rezultirati povećanjem inhibicije rasta kristala. Relativna brzina rasta stepenice na kristalnoj plohi, v/v_0 , je sukladno modelu opisana jednačbom:

$$\frac{v}{v_0} = 1 - \alpha \cdot \theta_{eq} \quad (72)$$

gdje je v brzina rasta stepenice na kristalnoj plohi u sustavu s aditivom, v_0 je brzina rasta stepenice na kristalnoj plohi u sustavu bez aditiva, θ_{eq} je udio aktivnih mjesta na površini, zauzetih aditivima (površinska prekrivenost), a α je faktor djelotvornosti aditiva. Površinska prekrivenost, θ_{eq} , se može opisati adsorpcijskom izotermom, kao što je npr. Langmuirova:

$$\theta_{eq} = \frac{K_{ad} c_{ad}}{1 + K_{ad} c_{ad}} \quad (73)$$

gdje je K_{ad} je Langmuirova konstanta ravnoteže adsorpcije, i c_{ad} je koncentracija aditiva u otopini.

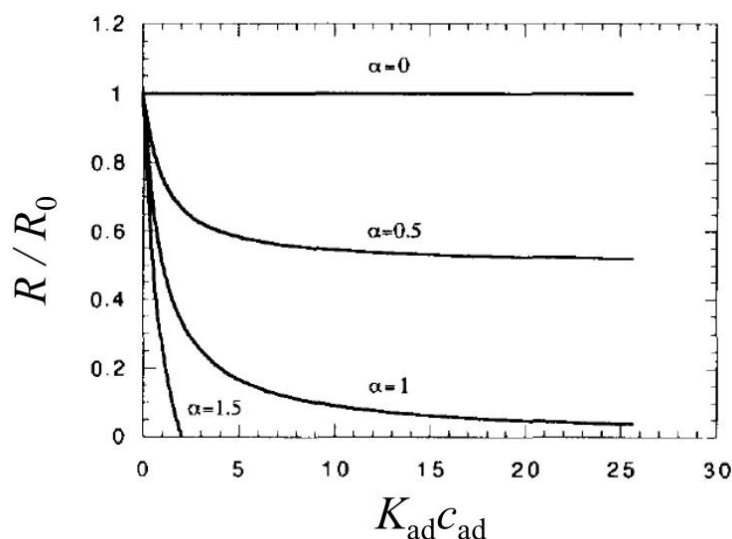
Iz jednadžbi (72) i (73) slijedi:

$$\frac{v}{v_0} = 1 - \alpha \frac{K_{ad} c_{ad}}{1 + K_{ad} c_{ad}} \quad (74)$$

Ukoliko vrijedi pretpostavka da je brzina rasta kristala proporcionalna brzini rasta stepenice, relativna brzina rasta stepenice na kristalnoj plohi, v/v_0 , može se zamijeniti relativnom brzinom rasta kristala, R/R_0 ,:

$$\frac{R}{R_0} = 1 - \alpha \frac{K_{ad} c_{ad}}{1 + K_{ad} c_{ad}} \quad (75)$$

Na slici 3.5 je prikazana ovisnost relativne brzine rasta stepenice na kristalnoj plohi (R/R_0) o bezdimenzijskoj koncentraciji aditiva ($K_{ad} c_{ad}$) za različite vrijednosti α .



Slika 3.5. Ovisnost relativne brzine rasta (R/R_0) o bezdimenzijskoj koncentraciji aditiva ($K_{ad} c_{ad}$) za različite vrijednosti faktora djelotvornosti aditiva (α).¹⁹

U slučajevima kada je $\alpha > 1$, R/R_0 postiže vrijednost 0 pri $\theta_{eq} < 1$ (nepotpuna prekrivenost), što znači da se može očekivati potpuna inhibicija kristalizacije već pri vrlo niskim koncentracijama adsorbiranih molekula (ireverzibilna i jaka adsorpcija na površini kristala).^{19,71} U slučaju kada je $\alpha = 1$, R/R_0 se asimptotski približava nuli ($R/R_0 = 0$ za $\theta_{eq} = 1$, potpuna prekrivenost). Kada je $\alpha = 0$, $R/R_0 = 1$, što ukazuje da relativna brzina rasta kristala ne ovisi o koncentraciji aditiva te da inhibicija nije izražena. Ukoliko je $\alpha < 1$ relativna brzina rasta kristala nikad ne postiže vrijednost 0, čak niti kad je $\theta_{eq} = 1$ što znači da rast kristala može biti značajno inhibiran, ali neće biti u potpunosti zaustavljen, čak niti pri vrlo visokim koncentracijama aditiva.

Djelotvornost aditiva (α) pri konstantnoj prezasićenosti i temperaturi se može izraziti kao funkcija polumjera kritičnog površinskog nukleusa (r_{2D}^*) i prosječne udaljenosti (L) između aktivnih mjesta adsorpcije:^{19,20,71,82}

$$\alpha = \frac{r_{2D}^*}{L} \quad (76)$$

Prosječna udaljenost između aktivnih mjesta adsorpcije (L) je parametar koji je povezan s adsorpcijskom karakteristikom adsorbata i specifična je za pojedinu kombinaciju aditiva i površine kristala te ne ovisi o koncentraciji aditiva. Minimalna vrijednost može biti slična vrijednosti za prosječnu veličinu konstitucijskih jedinica kristala (a), ali može biti i veća te ovisi o jačini veze između aditiva i površine kristala. Odnos veličine kritičnog nukleusa i prezasićenosti iskazan je izrazom izvedenim iz Gibbs-Thomsonove jednadžbe (44), uz prilagodbu za dvodimenzionalni nukleus:

$$r_{2D}^* = \frac{\gamma a^2}{k_B T \nu \ln S} \quad (77)$$

U gornjem izrazu γ je površinska energija bridova stepenice, a je prosječna veličina konstitucijskih iona kristala i ν je broj iona u jediničnoj formuli rastućeg kristala. Sukladno, relativna brzina rasta kristala kao funkcija prezasićenosti te dodatka aditiva određene koncentracije se može izraziti kao:

$$\frac{R}{R_0} = 1 - \frac{\gamma a^2}{k_B T \nu \ln SL} \left(\frac{K_{ad} c_{ad}}{1 + K_{ad} c_{ad}} \right) \quad (78)$$

Ukoliko se uvede konstanta, kritična prezasićenost (S^*) kao vrijednost prezasićenosti ispod koje kristal ne raste, $R = 0$:

$$\ln S^* = \frac{\gamma a^2}{k_B T \nu L} \left(\frac{K_{ad} c_{ad}}{1 + K_{ad} c_{ad}} \right) \quad (79)$$

izraz za opis brzine rasta kao funkcija reducirane (kritične) prezasićenosti uz dodatak aditiva, može se izvesti:

$$R = k_s (S - 1) (\ln S - \ln S^*) \quad (80)$$

pod pretpostavkom da je brzina rasta kristala određena spiralnim rastom (j. 40) prema Sangwalovom modelu.⁸⁰

§ 4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Materijali

U istraživanjima taloženja CaCO_3 korištene su vodene otopine pripremljene iz kemikalija *p.a.* čistoće i ultračiste deionizirane vode ($\kappa = 0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$). Kao izvor konstitucijskih iona korištene su standardizirane vodene otopine odgovarajućih topljivih soli kalcija i karbonata, kalcijev klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3) ili natrijev karbonat (Na_2CO_3), proizvođača Sigma Aldrich.

Za podešavanje ionske jakosti korištena je otopina natrijevog klorida (NaCl, Alfa Aesar), dok je početni pH namiješten pomoću otopina natrijevog hidroksida (NaOH, Carlo Erba) ili klorovodične kiseline (HCl, Kemika).

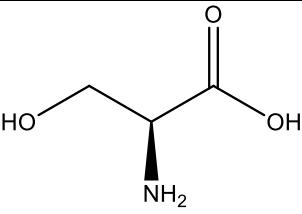
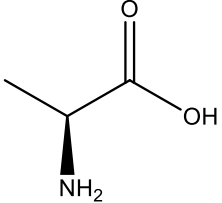
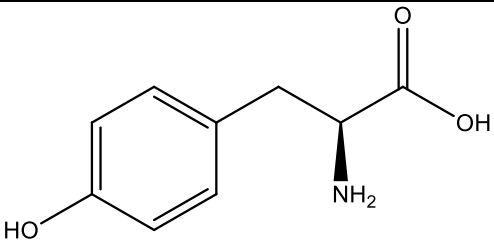
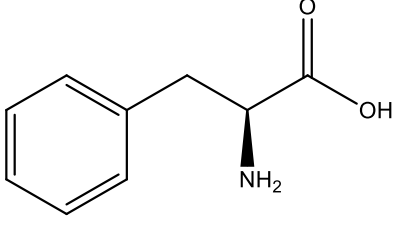
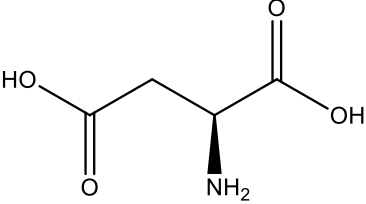
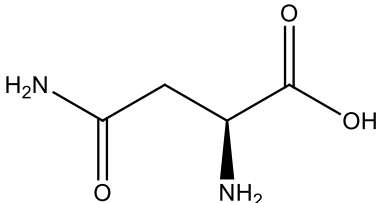
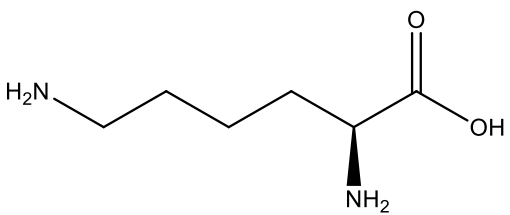
Korištene aminokiseline također su bile analitičke čistoće: L-asparaginska kiselina (Asp), L-tirozin (Tyr), L-fenilalanin (Phe), L-serin (Ser), proizvođača Alfa Aesar dok su L-alanin (Ala), L-asparagin (Asn), L-lizin (Lys) od proizvođača Sigma Aldrich (tablica 4.1).

Svi korišteni dipeptidi, L-alanil-L-asparaginska kiselina (Ala-Asp), L-seril-L-asparaginska kiselina (Ser-Asp), L-seril-L-serin (Ser-Ser), L-aspartil-L-asparaginska kiselina (Asp-Asp), L-glutamil-L-glutaminska kiselina (Glu-Glu) (tablica 4.2) su od proizvođača Bachem, dok su derivati salicilne kiseline, *N*-salicioil-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina (sLLL), *N*-salicioil-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina (sLDL), *N*-salicioil-glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina (sgLLL), *N*-salicioil-glicin-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina (sgLDL), *N*-salicioil- β -glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina (sbgLDL), *N*-salicioil- γ -glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina (sggLDL) i *N*-salicioil- δ -glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina (sdgLDL) (tablica 4.3) pripremljeni u Laboratoriju za biomimetičku kemiju, IRB.

Za pripravu kompozita CaCO_3 i hidrogela korišten je gelator 3-(3,4-bis(benziloksi)fenil)-2((*tert*butoksikarbonil)amino)propanska kiselina (tablica 4.4), pripremljen u grupi prof. Claudie Tomasini na Sveučilištu u Bologni.

Za mjerenja metodom elektronske paramagnetske rezonancije prilikom taloženja dodavan je manganov klorid tetrahidrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Alkaloid), dok su za mjerenja metodom HPLC / MS dobiveni kristali čišćeni s natrijevim hipokloritom (12 %, Gram-mol).

Tablica 4.1. Molekulske strukture odabranih aminokiselina i njihova svojstva.

Aditivi	Molekulske strukture
Ser	
Ala	
Aminokiseline	
	
	
Asn	
Lys	

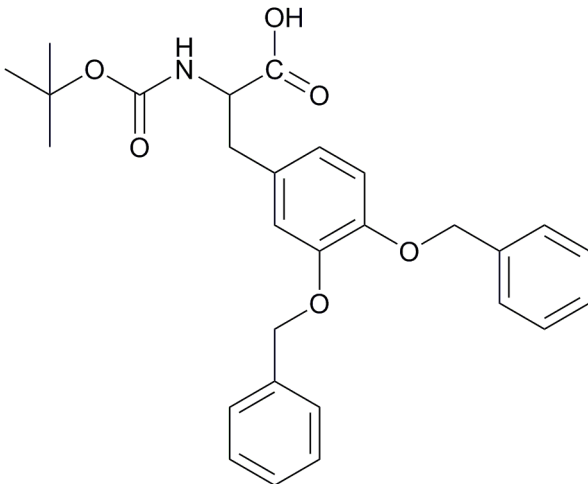
Tablica 4.2. Molekulske strukture odabrani dipeptide i njihova svojstva.

Aditivi	Molekulske strukture
Ala-Asp	
Ser-Asp	
Dipeptidi	

Tablica 4.3. Odabrani derivati salicilne kiseline i njihova proučavana svojstva.

Aditivi	Molekulske strukture
sLLL	
sgLLL	
sbgLDL	
sdgLDL	

Tablica 4.4. Odabran gelator i njegova svojstva.

Aditiv	Molekulske strukture
gelator	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)NCCc1ccc(OCc2ccccc2)c(OCc3ccccc3)c1</chem>

4.2. Eksperimentalni postupak

Svi eksperimenti provedeni su u staklenoj reakcijskoj posudi s dvostukim stijenkama, spojenoj na protočni termostat, pri čemu je temperatura održavana na 25 °C. U reaktor je stavljena otopina karbonatnih iona (Na_2CO_3 / NaHCO_3 / aditiv) volumena 200 mL. Uključeno je magnetsko miješanje (osim u eksperimentima spontanog taloženja uz prisutstvo aminokiselina, gdje je korišteno mehaničko miješanje), te je reaktor začepljen s teflonskim čepom s otvorima za elektrodu i uzorkovanje. Po potrebi je namiješten pH otopine. Dodana je otopina kalcijevih iona (CaCl_2) volumena 200 mL. Nastali talozi filtrirani su kroz Millipore sustav s celulozno nitratnim membranskim filterima pora veličine 0,22 μm i sušeni na 100 °C. Talozi su zatim kvalitativno i kvantitativno analizirani.

Na temelju rezultata eksperimenata spontanog taloženja izrađen je taložni dijagram, pomoću kojeg su odabrani sustavi pogodni za eksperimente spontanog taloženja uz dodatak aminokiselina i eksperimente uz dodatak aditiva i kristalnog sjemenja, definirane morfologije i polimorfnog sastava. Taložni dijagrami izrađen je za relevantno široko područje koncentracija reaktanta ($1 < c(\text{Na}_2\text{CO}_3) / \text{mmol dm}^{-3} < 20$; $1 < c(\text{CaCl}_2) / \text{mmol dm}^{-3} < 20$), pri početnoj pH vrijednosti $\text{pH} = 8,3$ i ionskoj jakosti $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$. Eksperimenti taloženja prekidani su nakon približnog uspostavljanja ravnoteže ($t = 1 \text{ h}$).

Djelovanje odabranih aminokiselina istraženo je u sustavima spontanog taloženja, kao i u sustavima u kojima je korišteno kristalno sjeme kalcijeva karbonata. Za istraživanje spontanog taloženja odabran je referentni sustav ($c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 10,76$; $\vartheta = 25 \text{ °C}$) u kojem inicijalno taloži smjesa kalcita i vaterita (83 % kalcita i 17 % vaterita), a talozi su analizirani nakon 30 minuta. Aminokiseline su dodavane u otopinu Na_2CO_3 , prije miješanja reaktanata. Analizirana je morfologija, polimorfni sastav i kristalna struktura taloga nastalog uz dodatak različitih koncentracija aminokiselina ($10 < c(\text{AA}) / \text{mmol dm}^{-3} < 75$). Za određivanje udjela aminokiselina u dobivenim kristalima, kristali su čišćeni da mi se uklonile apsorbirane AA s površine. Dobiveni talozi su tretirani s natrijevim hipokloritom (12 %) u kojem su ostavljeni 48 sati. Nakon čega su isprani s ultračistom vodom te otopljeni s 1 mL koncentrirane klorovodične kiseline.

Proučen je utjecaj Asp ($0,1 < c(\text{Asp}) / \text{mmol dm}^{-3} < 0,5$) na transformaciju vaterita u kalcit u početnim uvjetima: $c(\text{CaCl}_2) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 9,3$ i $I_c = 0,3 \text{ mmol dm}^{-3}$. Uzorkovanje je vršeno svakih 5000 s, dok su eksperimenti prekinuti nakon 1000 min. Količina neistaloženog kalcija određena je iz filtrata pomoću ionske kromatografije. Rast kalcita i vaterita istražen je u istim uvjetima kao i eksperimenti transformacije osim nižeg pH ($\text{pH}_i = 8,2$) dok je eksperiment otapanja vaterita istražen u čistoj vodi. Eksperimenti rasta vaterita i otapanja vaterita inicirani su dodatkom kristalnog sjemena vaterita ($s = 11,9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$).

Eksperimenti rasta kristala kalcita uz dodatak kemijski, strukturno i morfološki dobro definiranog kristalnog sjemena kalcita ($s = 2,2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), provedeni su u sustavu relativno niske početne prezasićenošći ($c(\text{CaCl}_2) = c(\text{NaHCO}_3) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,94$). Eksperimenti su inicirati dodatkom sjemena u metastabilnu otopinu CaCO_3 koja je sadržavala različite koncentracije aminokiselina ($10 < c(\text{AA}) / \text{mmol dm}^{-3} < 75$). Početne masene koncentracije kristalnog sjemena kalcita ($\gamma_i = 250,0 \text{ mg dm}^{-3}$) odabrane su tako da površina kristalnog sjemena iznosi $A_i = 0,55 \text{ m}^2 \text{ dm}^{-3}$. Eksperimenti su prekidani nakon dva sata. Na osnovi rezultata dobivenih kinetičkim mjerenjima rasta kristala uz dodatak aditiva, određene su konstante ravnoteže adsorpcije svake aminokiseline na površinu kalcijeva karbonata.

Istražen je i utjecaj dipeptida i derivata salicilne kiseline na rast kristala kalcita u istim uvjetima kao i u slučaju aminokiselina. Korištene koncentracije aditiva bile su znatno niže: dipeptidi ($10 < c(\text{dipeptid}) / \mu\text{mol dm}^{-3} < 1000$); derivati salicilne kiseline ($0,5 < c(\text{Sal-derivati}) / \mu\text{mol dm}^{-3} < 15,0$). Dodatak dipeptida uzrokovao je ranije postizanje ravnoteže, pa su u ovom slučaju pokusi prekidani nakon jednog sata.

Pripravljani su kompoziti gelatora male molekulske mase i CaCO_3 otapanjem gelatora u otopini karbonatnih iona pomoću ultrazvuka ($t = 15 \text{ min}$) i magnetske miješalice. Eksperimenti su napravljeni u staklenim testnim epruvetama promjera 8 mm. Dodatkom Ca^{2+} došlo je do sniženja pH, što je dovelo do formiranja gela te taloženja. Eksperimenti su prekidani nakon 18 sati sušenjem na 120°C .

4.3. Metode

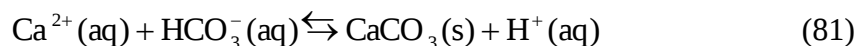
Specifična površina kristalnog sjemena određena je korištenjem Brunauer-Emmett-Teller (BET) metode pomoću instrumenta *Micrometrics, Gemini 2380*. Kemijska analiza provedena je ionskom kromatografijom pomoću instrumenta *Dionex, IC-1000*.

Udio asparaginske kiseline u kalcitu određen je metodom HPLC/MS na instrumentu *Shimadzu LCMS-2020* s kolonom Macherey-Nagel EC50/3 Nucleodur PolarTec, 50 x 3 mm, veličine čestica od 3 μm . Kao mobilna faza korištena je smjesa 20 mmol dm^{-3} amonijev acetat i acetonitrila. Asparaginska kiselina je određena pri $m/z = 134$. Mjerenja su provedena na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Reološka svojstva biokompozitnih materijala kalcita i gelatora male molekulske mase ispitana su pomoću instrumenta *Anton Paar rheometer MCR 102* u Zavodu za kemiju "Giacomo Ciamician" Sveučilišta u Bologni.

4.3.1. Potenciometrija

Taloženje kalcijeva karbonata (CaCO_3) je protolitička reakcija



pri kojoj dolazi do oslobađanja iona H^{+} zbog čega se mijenja i pH reakcijskog sustava pa se napredovanje i doseg reakcije mogu pratiti potenciometrijski mjerenjem promjene pH otopina. Taloženjem kalcijeva karbonata dolazi do pomicanja reakcije u desno što uzrokuje povećanje koncentracije H^{+} iona, tj. smanjenje pH reakcijske otopine. Na temelju navedene jednadžbe rast kristala CaCO_3 se može pratiti promjenom pH otopine.

U tu svrhu korištena je kombinirana staklena / kalomel elektroda (*Red Rod*) koja je bila povezana s digitalnim pH-metrom (*PHM 290, Radiometer*). Elektroda je baždarena pomoću standardnih pufera pH = 7,000 i pH 10,012 (*Radiometer analytical*).

4.3.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Morfologija nastalog taloga određena je pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM). Slike taloga dobivenog spontanom taloženjem i vaterita prije transformacije analizirane su pomoću instrumenata *JEOL GSM-7000F* u Laboratoriju za sintezu novih materijala Instituta Ruđer Bošković. Morfologija kalcita nakon transformacije istražena je u Zavodu za nanostrukturne materijale Instituta Jožef Štefan u Ljubljani (*FE-SEM JEOL 7610F*) Biokompozitni matetijali kalcita i gelatora male molekulske mase su karakterizirani pomoću instrumenta *Phenom FEI* u Zavodu za kemiju "Giacomo Ciamician" Sveučilišta u Bologni.

Suhi uzorci su nanošeni na ljepljivu ugljičnu traku (engl. *carbon tape*) bez dodatnog naparavanja.

4.3.3. Difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku

Rentgenska difrakcija se temelji na Braggovom zakonu, koji govori da će do konstruktivne interferencije (refleksije) doći u slučaju kada je duljina puta proporcionalna valnoj duljini (λ). Navedeni zakon se može prikazati jednadžbom:

$$2d \sin \theta = \lambda \quad (82)$$

gdje je d razmak između ploha jedinične ćelije kristala, dok je θ ulazni kut rentgenske zrake. Valna duljina ovisi o metalu koji se koristi kao izvor rentgenskih zraka. Udaljenost ploha se može izračunati pomoću Braggovog zakona (82), pomoću difrakcijskog kuta θ pri kojem se u difraktogramu nalazi određeni pik.

Difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (PXRD) istražena je u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju Instituta Ruđer Bošković (*Rigaku Ultima IV diffractometer*). Korišten je bakar, koji generira zračenje valne duljine od 154 pm te Bragg-Brentano parafokusna geometrija s Ni filterom, 5° Soller prorezom i proporcionalnim brojačem. Intenzitet difrakcije mjeren je u području kuta $20^\circ < 2\theta < 60^\circ$. Brzina mjerenja je bila $1^\circ 2\theta$ po minuti s korakom od $0,01^\circ 2\theta$. Dobiveni difraktogrami su analizirani pomoću Rigaku softvera (PDXL2).

Rentgenska difrakcija na polikristalu se koristila za identifikaciju krutine uspoređujući Korišteni su difraktogrami standarnih uzoraka koji se nalaze u bazi podataka koja se naziva *The powder diffraction file* (PDF), koju održava *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS). Navedena metoda se koristi kako za kvalitativno tako i za kvantitativno određivanje sastava uzoraka. Pomoću PXRD određena dimenzija kristalne rešetke te je određena distorzija kristalne rešetke uz dodatak aminokiselina.

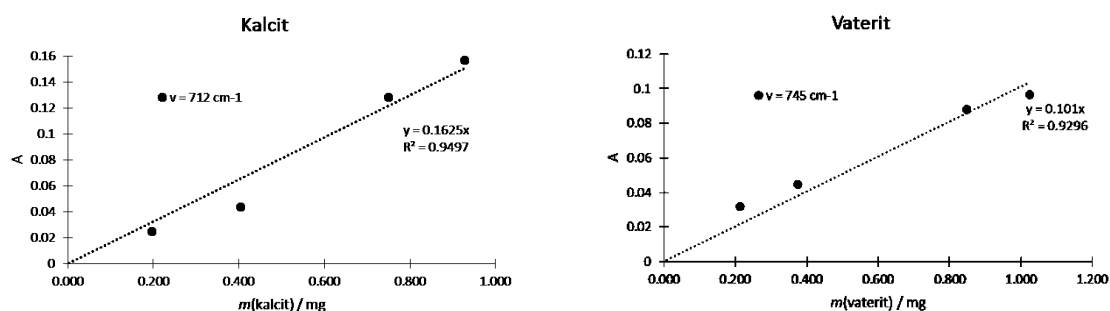
Maseni udjeli vaterita i kalcita određeni su metodom „*Reference Intensity Ratio*“ (RIR), koja se koristi za kvantitativnu analizu. Metoda RIR se temelji na skaliranju svih difrakcijskih podataka na difrakciju referentnog materijala. Udio kalcita je izračunat prema PDF podacima ICDD 01-071-3699, dok je za vaterit korišten referentni difraktogram ICDD 01-074-1867.

4.3.4. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) se često koristi u svrhu kvalitativnog određivanja polimorfa ili hidratnih oblika biominerala, ali isto tako i za semikvantitativno određivanje. Metodom FTIR kvantitativno je određivan sastav smjese polimorfa kalcijevih karbonata (kalcita, vaterita).^{84,85} Instrument je neophodno baždriti, odnosno odrediti konstante proporcionalnosti (k) između apsorbancije i mase čistih polimorfa pri karakterističnim vrpama (karakteristična vrpca za kalcit je pri valnom broju 713 cm^{-1} , za vaterit je 745 cm^{-1}). Jednadžba koja prikazuje proporcionalnost odgovara Lambert-Beerovom zakonu za čvrsto stanje, a može se prikazati kao:

$$A = k \cdot m \quad (83)$$

gdje A predstavlja apsorbanciju, k je konstanta proporcionalnosti te ujedno i nagib baždarnog pravca, dok m predstavlja masu polimorfa u mjerenoj KBr pastili. Dobiveni baždarni pravci prikazani su na slici 4.1.



Slika 4.1. Baždarni pravci za polimorfe kalcijeva karbonata (kalcit, vaterit)

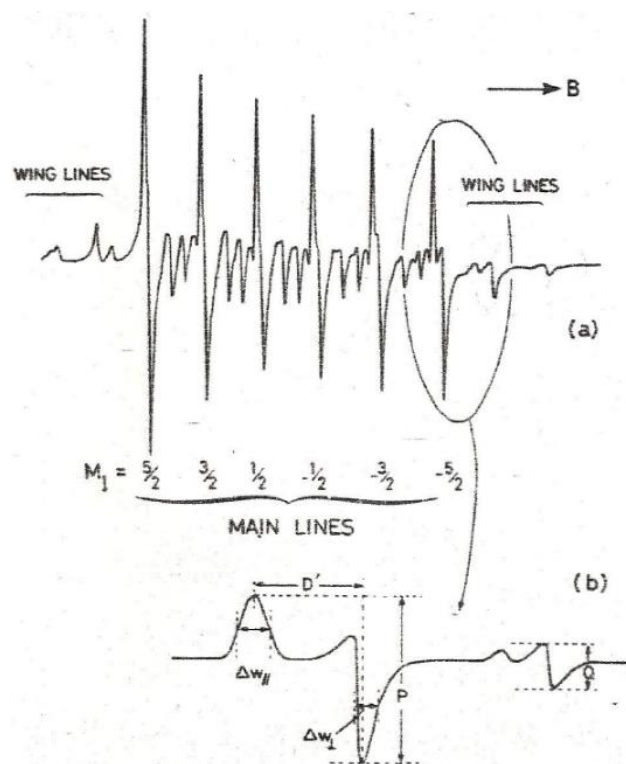
Nakon određivanja baždarnih pravaca za pojedine polimorfe snimi se spektar smjese te se korištenjem jednadžbe (83) može odrediti masa pojedinog polimorfa u smjesi. Naravno, iz dobivenih masa se mogu odrediti i maseni udjeli pojedinog polimorfa.

Za analiza polimorfnog sastava smjese kalcita i vaterita dobivenog spontanom taloženjem korišten je instrument *Tensor II spectrometer, Bruker*).

4.3.5. Elektronska paramagnetska rezonancija

Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) je metoda koja se temelji na detekciji nesparenih elektrona, tj. paramagnetskim svojstvima materijala.⁸⁶ Pomoću EPR metode proučena je lokalna distorzija kristalne rešetke kalcita uslijed ugradnje aditiva. S obzirom da kalcijev karbonat nema nesparenih elektrona, dodan je element s nesparenim elektronima Mn^{2+} . Dodatkom Mn^{2+} u malim količinama, reda veličine $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, prilikom taloženja, dolazi do izomorfne supstitucije pri čemu pojedine atome Ca^{2+} zamijenjuje Mn^{2+} . Zbog zanemarivo malog dodatka Mn^{2+} , nema promjene svojstava samog kalcijeva karbonata.

Karakterizacija uzoraka provedena je na temelju određivanja spektralnih parametara pri mjerenju spektra Mn^{2+} uz dodatak različitih koncentracija aminokiselina unutar kalcita.⁸⁷ Prvi spektralni parametar koji se određuje je aksijalni parametar distorzije (D'), koji se mijenja kao funkcija vrste i koncentracije dodatnog iona. Slika 4.2 prikazuje spektar praha Mn^{2+} u kalcitu, gdje se promjena D' vidi kao promjena cijepanja paralelne i okomite komponente širine EPR linije. Cijepanje je najveće za EPR liniju $M_1 = -5/2$, te se aksijalni parametar distorzije mjeri između maksimuma paralelne komponente i minimuma okomite komponente (D'), kao što je prikazano na slici 4.2. Promjenom D' prati se distorzija kristalne rešetke uslijed ugradnje Mn^{2+} na mjesto Ca^{2+} unutar kristalne rešetke.



Slika 4.2. Tipični EPR spektar dodanog Mn^{2+} u kalcitu, koji prikazuje prijelaz između $M_1 = +1/2 \leftrightarrow -1/2$ te asignaciju šest glavnih linija. Magnetsko polje (B) se povećava prema desno. Dodatak b prikazuje liniju pri $M_1 = -5/2$, krajnje linije (wing lines) te definicije mjerenih parametara⁸⁷

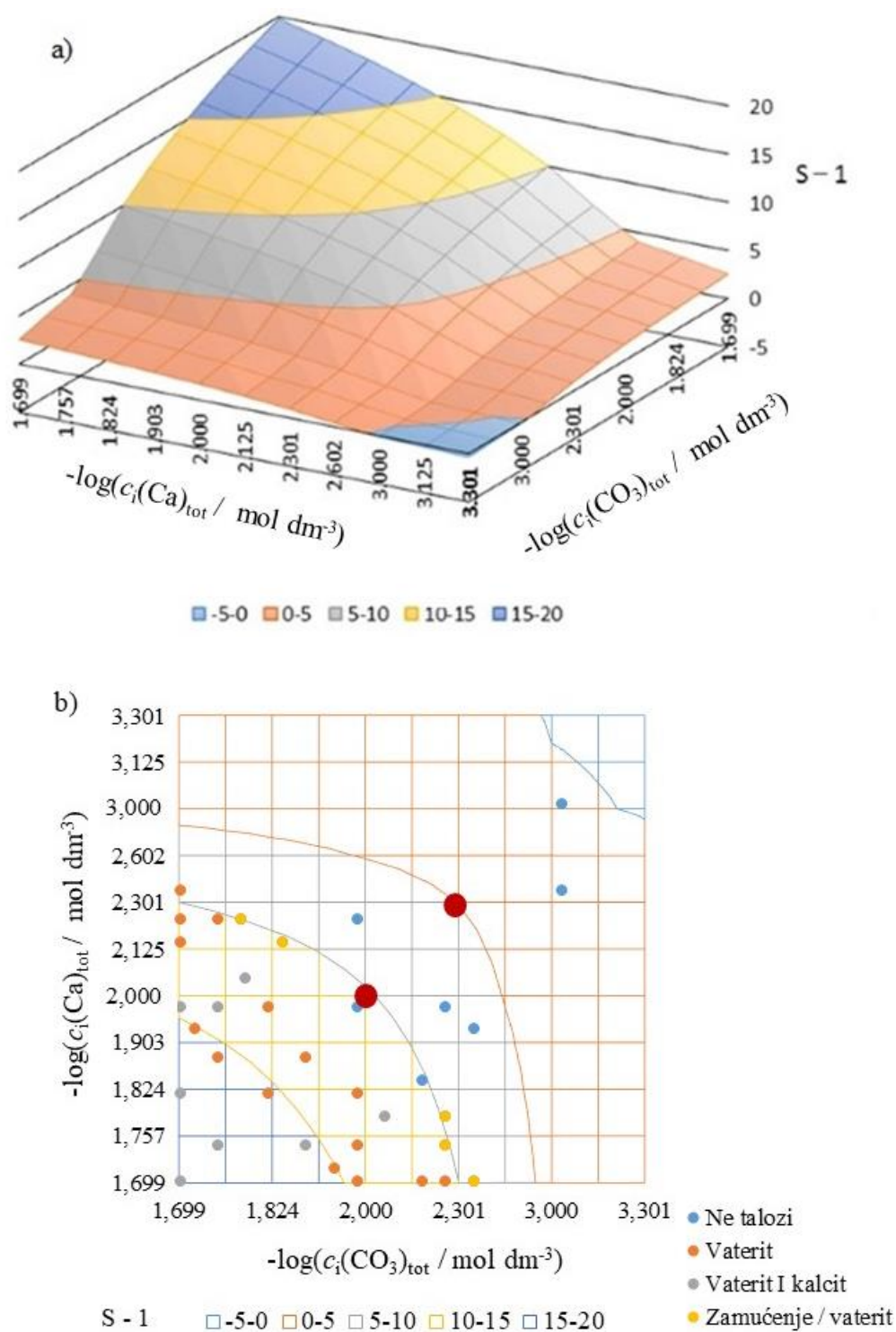
EPR mjerenja provedena su na instrumentu *Varian E-109 X-band* (frekvencije $\approx 9,5$ GHz) s *Bruker ER 4111 VT* jedinicom za kontrolu temperature pod strujom N_2 u Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta Ruđer Bošković. Za kalibraciju magnetskog polja korišten je standardni Varian „strong pitch“ s poynatim brojem spinova $3 \cdot 10^{15}$ spin / cm i g-vrijednosti $g = 2,0028$. Suhi uzorak ($m \approx 15-30$ mg) je stavljen u kvarcnu cjevčicu i spektri su snimljeni pri istim eksperimentalnim uvjetima. Korištena je amplituda modulacije od 0,1 mT i mikrovalna snaga od 2 mW.

§ 5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Taložni dijagram

Spontano taloženje je postupak dobivanja CaCO_3 naglim miješanjem otopina konstitucijskih iona (CaCl_2 i Na_2CO_3).³ Na svojstva nastalog taloga utječu razni uvjeti, kao na primjer temperatura, koncentracije reaktanata, miješanje, pH, ionska jakost, itd. Da bi se dobio željeni talog potrebno je sustavno pretražiti šire područje koncentracija reaktanata pri konstantnim uvjetima. Odabrani konstantni uvjeti su: ionska jakost, $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ (namještena dodatkom natrijevog klorida), početni pH reakcijske smjese, $\text{pH}_i = 8,3$, temperatura $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, vrijeme taloženja $t = 1 \text{ h}$ i magnetsko miješanje. Raspon koncentracija reaktanata je izabran između 1 mmol dm^{-3} i 20 mmol dm^{-3} , što je uzrokovalo promjenu relativne prezasićenosti otopine, što je prikazano na slici 5.1.a. Talozi su analizirani nakon jednog sata korištenjem FTIR spektroskopije. U istraženom području došlo je do taloženja vaterita i kalcita, pojedinačno ili u smjesi. Na temelju dobivenih podataka izrađen je taložni dijagram koji je prikazan na slici 5.1.b.

Na taložnom dijagramu se može vidjeti područje u kojem ne dolazi do taloženja (plave oznake), koje se nalazi pri nižim koncentracijama i relativnim prezasićenostima manjima od 5 ($((S - 1) < 5)$). Pri višim koncentracijama i relativnim prezasićenostima u području višem od 15 ($((S - 1) > 15)$) dolazi do taloženja smjese kalcita i vaterita (sive oznake), dok je pri umjerenim koncentracijama i relativnim prezasićenostima u području $10 < (S - 1) < 15$ dominantna faza vaterit. Navedena pojava se lako može objasniti, jer je vaterit metastabilna faza pa je moguće da je pri višim koncentracijama nastali vaterit većim dijelom transformirao u kalcit. Pri umjerenim koncentracijama reaktanata procesi su sporiji zbog niže prezasićenosti te nije došlo do transformacije. Granica taloženja je određena žutim područjem pri kojima je došlo do zamućenja reakcijske otopine, što se može pretpostaviti da je vaterit ($((S - 1) = 10)$). U području relativnim prezasićenosti $5 < (S - 1) < 10$ otopina je metastabilna.

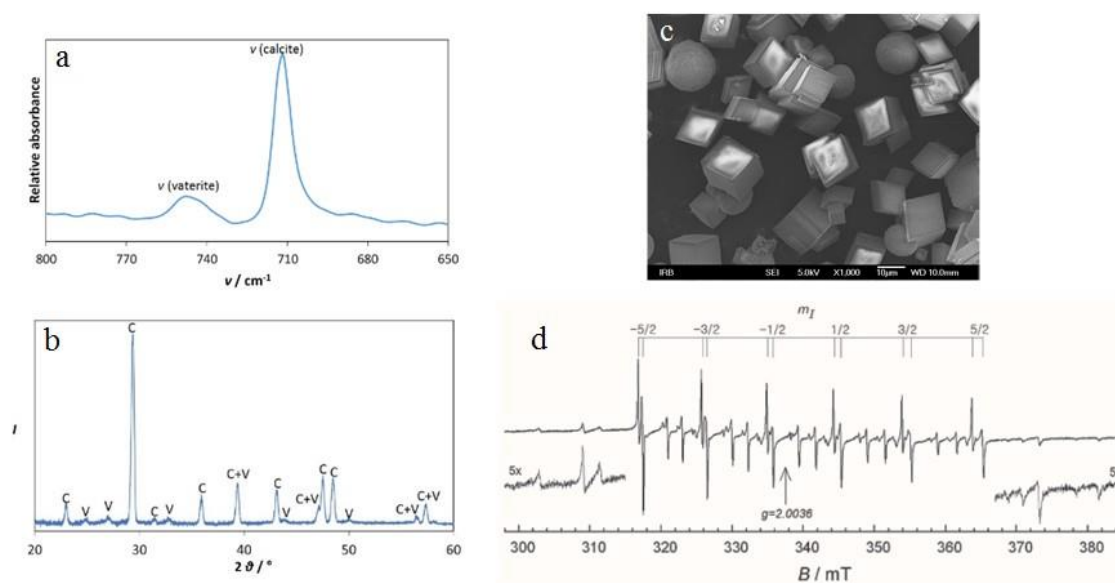


Slika 5.1. Dijagrami taloženja CaCO_3 u uvjetima $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 8,3$ i $\vartheta = 25^\circ\text{C}$, $t = 1 \text{ h}$, 3-D prikaz ovisnosti relativne prezasićenosti o koncentraciji reaktanata (a) i 2-D projekcija izračunatih vrijednosti prezasićenosti s točkama koje predstavljaju eksperimentalno pripremljene uzorke kojima je određen sastav taloga (b)

Na dijagramu (slika 5.1.b) su još označene koncentracije reaktanata (crvene velike oznake) koje predstavljaju odabir taložnog sustava za daljnje eksperimente spontanog taloženja i eksperimente rasta na kristalnom sjemenu. Taložni sustav za spontano taloženje odabran je pri višim koncentracijama, pri čemu je i relativna prezasićenost viša da bi se postigli uvjeti spontanog taloženja ($c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$). Druga oznaka je pri nižim koncentracijama reaktanata da bi imali metastabilnu prezasićenu otopinu, koja neće spontano taložiti u određenom periodu tako čime je smanjena mogućnost sekundarne nukleacije i postignuti uvjeti za ispitivanje samo rasta na dodanom kristalnom sjemenu ($c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$).

5.2. Djelovanje aminokiselina na spontano taloženje kalcijeva karbonata

Tijekom spontanog taloženja, dominantan je proces nukleacija, ali se istovremeno zbivaju i procesi otapanja kristala nestabilne faze i rasta stabilne i nestabilne. U ovoj disertaciji odabran je sustav u kojem inicijalno dolazi do taloženja smjese vaterita i kalcita (slika 5.2), kako bi se mogao uočiti utjecaj AA na spontano taloženje oba polimorfa CaCO_3 .¹⁷



Slika 5.2. Karakterizacija taloga nastalog spontanom taloženjem bez dodatka AA: FTIR (a), PXRD (b), SEM (c) i EPR (d).

Na slici 5.2 mogu se vidjeti rezultati karakterizacije taloga nastalog spontanom taloženjem pri odabranim eksperimentalnim uvjetima ($c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 10,7$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ uz mehaničko miješanje). Metodom FTIR i PXRD (slika 5.2a i b) određen je polimorfni sastav te je pronađeno da se talog sastoji od $83 \pm 3 \%$ kalcita, dok je ostatak vaterit. Na SEM slici (slika 5.2c) može se vidjeti romboedarska morfologija kalcita nastalog bez dodatka AA, ali i kuglaste čestice vaterita. Na EPR spektru (slika 5.2d) vidi se

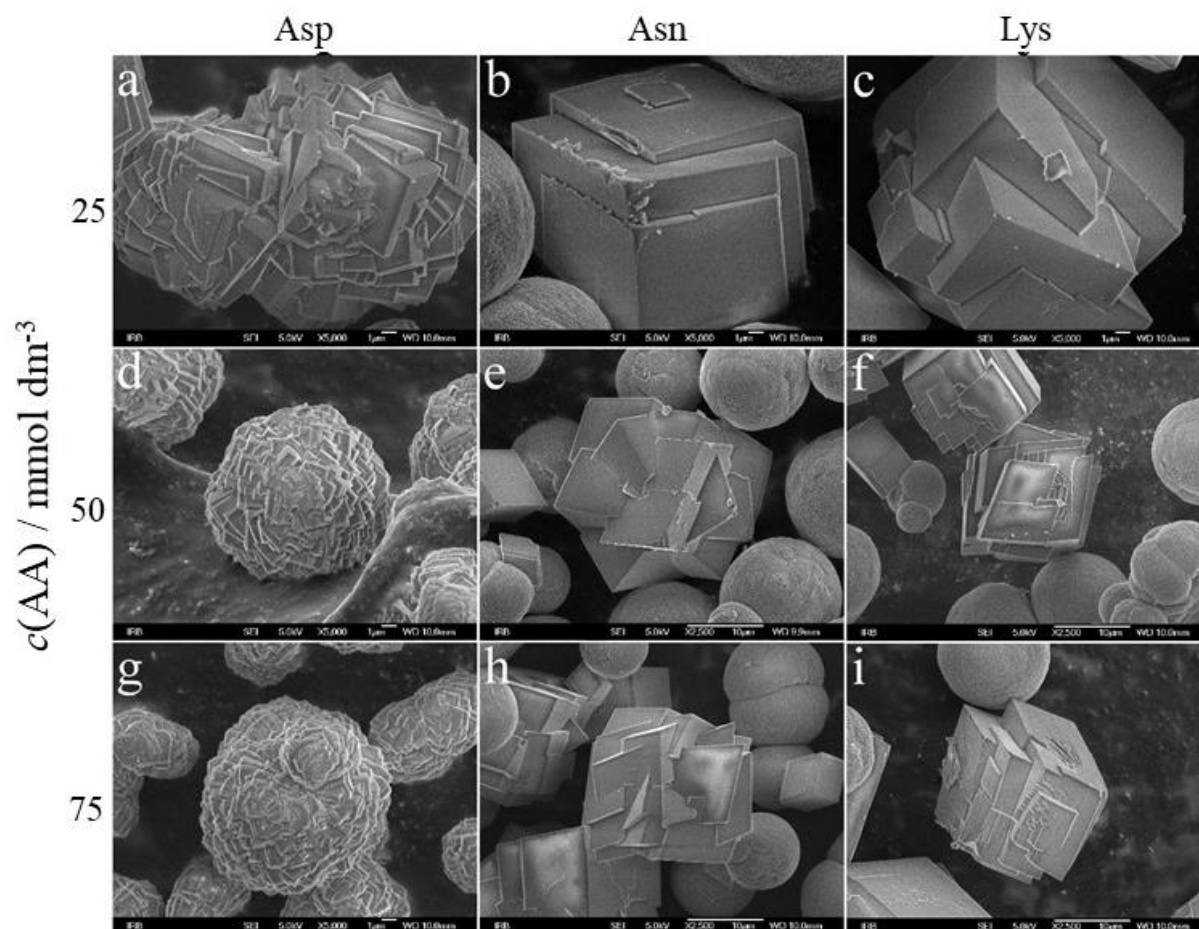
tipični EPR spektar Mn^{2+} probe ugrađene u kalcit, koji prikazuje prijelaz između spinskih stanja ($M_I = +5/2 \leftrightarrow -5/2$) te asignaciju šest glavnih linija.

Spontanim taloženjem se nukleacija ne prati direktno, već indirektno proučavanjem morfologije kristala, ali i promjene polimorfnog sastava, kao i distorzije kristalne rešetke kalcita.

5.2.1. Morfologija

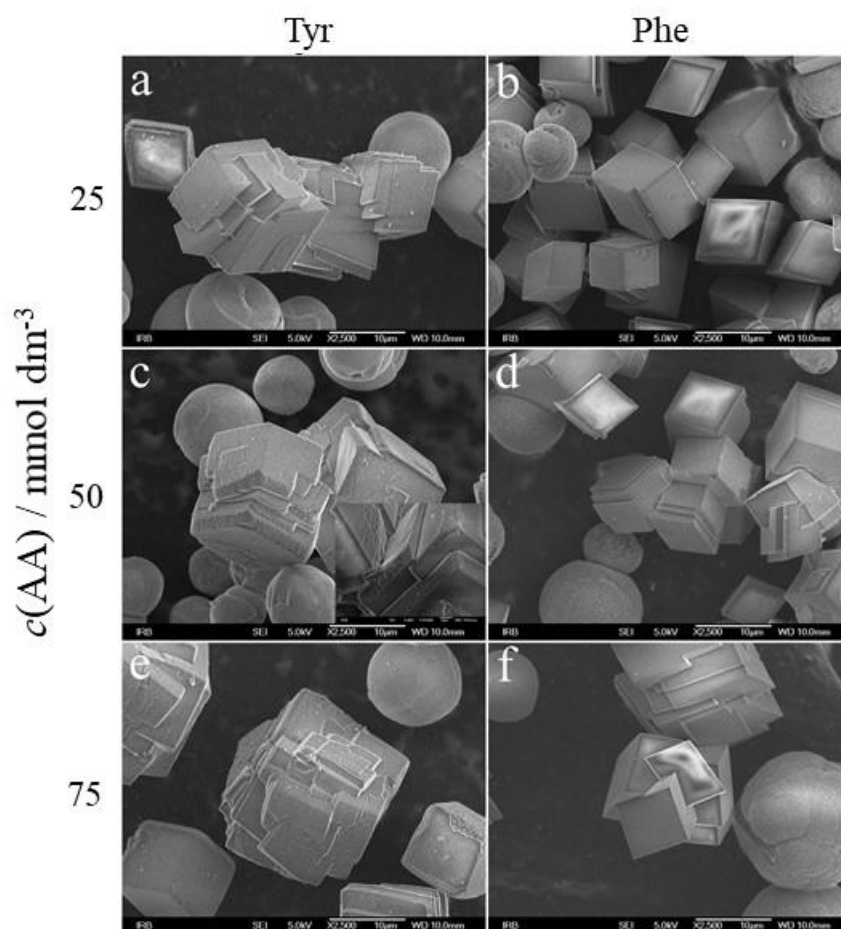
Proučavanjem morfologije kalcita nastalog spontanom taloženjem uz dodatak AA može se indirektno razjasniti utjecaj AA na nukleaciju kalcita.¹⁷ Stoga, proučena je morfologija kalcita taloženog uz različite koncentracije odabranih AA. Dodatkom svih AA došlo je do promjene morfologije, što se može vidjeti na slikama 5.3, 5.4 i 5.5. Povećanjem koncentracije svih odabranih AA povećava se promjena morfologije i efekti su više izraženi. Može se zaključiti da je primarni efekt zbog utjecaja α -skupine AA. U proteinima same α -skupine su unutar peptidnog lanca te ne sudjeluju u međudjelovanju proteina i CaCO_3 . Sve korištene AA nemaju zaštićene α -skupine, stoga se smatra da do razlika utjecaja između odabranih AA dolazi od razlika funkcionalnih skupina na bočnim ograncima.

Na slici 5.3 uspoređeni su kalciti nastali dodatkom aminokiseline s različitim nabojem bočnog ogranka. U fiziološkim uvjetima Asp bi bio negativan, Lys pozitivan, a Asn neutralan. Međutim, pri pH od 10,76 sve tri AA su negativno nabijene da bi sve bile isto nabijene kao i površina kalcita, ali im neto naboj raste istim redoslijedom. Pri eksperimentalnim uvjetima korištenim u ovoj disertaciji, Asp je najnegativniji, s neto nabojnim brojem od -1,93, a Lys najpozitivniji (neto naboj -0,72), dok je Asn s neutralnim bočnim ogrankom, vrijednost neto naboja, $Z = -0,99$, je između vrijednosti za Asp i Lys. Analize su pokazale da je u slučaju dodatka Asp utjecaj najveći te se može uočiti potpuna promjena morfologije, koja je nalik na ružu. Navedena pojava je uočena i u istraživanjima F. Meldrum i suradnika.¹⁶ Osim toga, dolazi do smanjenja veličine kristala povećanjem koncentracije Asp. Slabiji utjecaj se može uočiti kod dodatka Asn, dok je u slučaju Lys djelovanje još slabije. Smanjenjem naboja smanjuje se i utjecaj na morfologiju kalcita, a sa time i indirektno na nukleaciju kristala kalcita. Uočeno najsnažnije djelovanje Asp se slaže s literaturnim podacima^{14,16,56} i može se objasniti vezanjem Asp s karboksilnom skupinom ($-\text{COOH}$) bočnog lanca na stepenicu rasta. Zbog toga dolazi do prestanka rasta te stepenice i početka rasta nove. Zato se utjecaj AA može objasniti nastankom sve više stepenica.



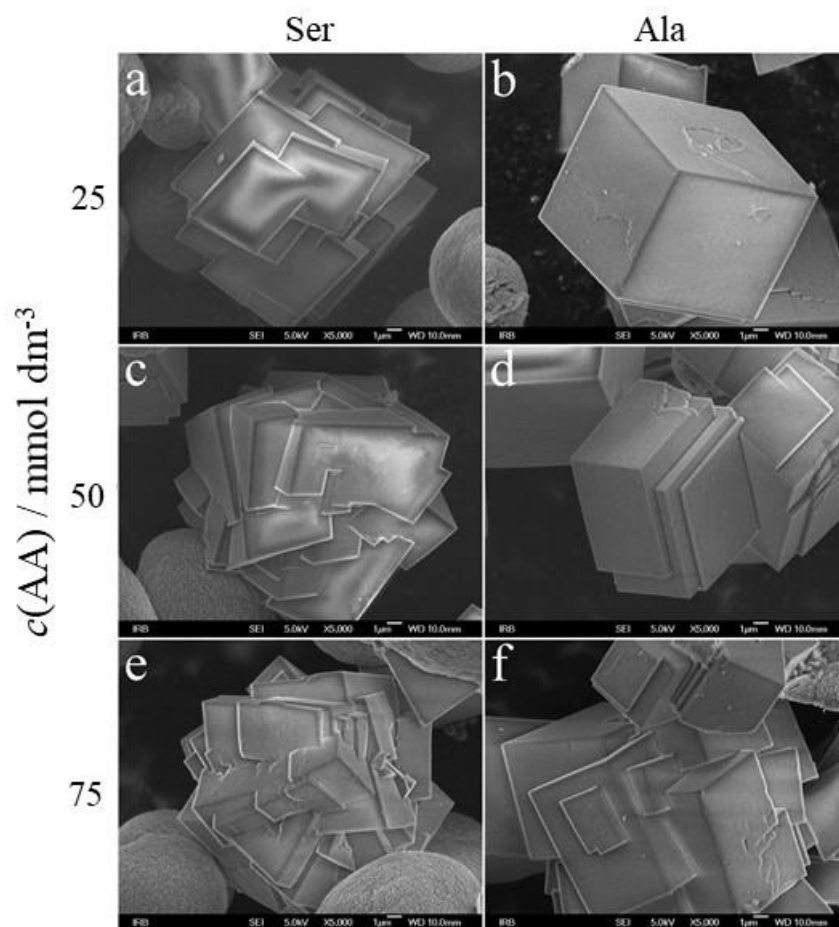
Slika 5.3. SEM slike kalcita dobivenog spontanom taloženjem pri različitim koncentracijama Asp, Asn i Lys u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 10,7$ i $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Osim naboja bočnih ogranka, utjecaj AA na morfologiju kalcita može biti uzrokovan vodikovim vezama između bočnih ogranka AA i površine kalcita. Stoga su istraženi utjecaji parova AA (Tyr / Phe i Ser / Ala) koji se razlikuju samo po $-\text{OH}$ skupini na bočnom ogranku, s kojom mogu dodatno međudjelovati s vodikovim vezama na površinu kalcita. Na slikama 5.4 i 5.5 se može uočiti da je utjecaj Tyr i Ser, koji imaju potencijal za dodatne vodikove veze preko $-\text{OH}$ skupine, veći od utjecaja njihovih parova Phe i Ala. Na temelju toga se može zaključiti da dodatna vodikova veza pogoduje jačem utjecaju AA na promjenu morfologije kalcita.



Slika 5.4. SEM slike kalcita dobivenog spontanom taloženjem pri različitim koncentracijama Tyr i Phe u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 10,7$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Treba istaknuti da dodatkom Tyr dolazi do nastanka nove plohe (001), što se može vidjeti na slici 5.4c. Nastanak nestabilne (001) plohe se može objasniti utjecajem fenolnog prstena na površinu kalcita, kao što je pretpostavljeno kod istraživanja utjecaja poli(stirensulfonata) (PSS) u literaturi.^{39,51}



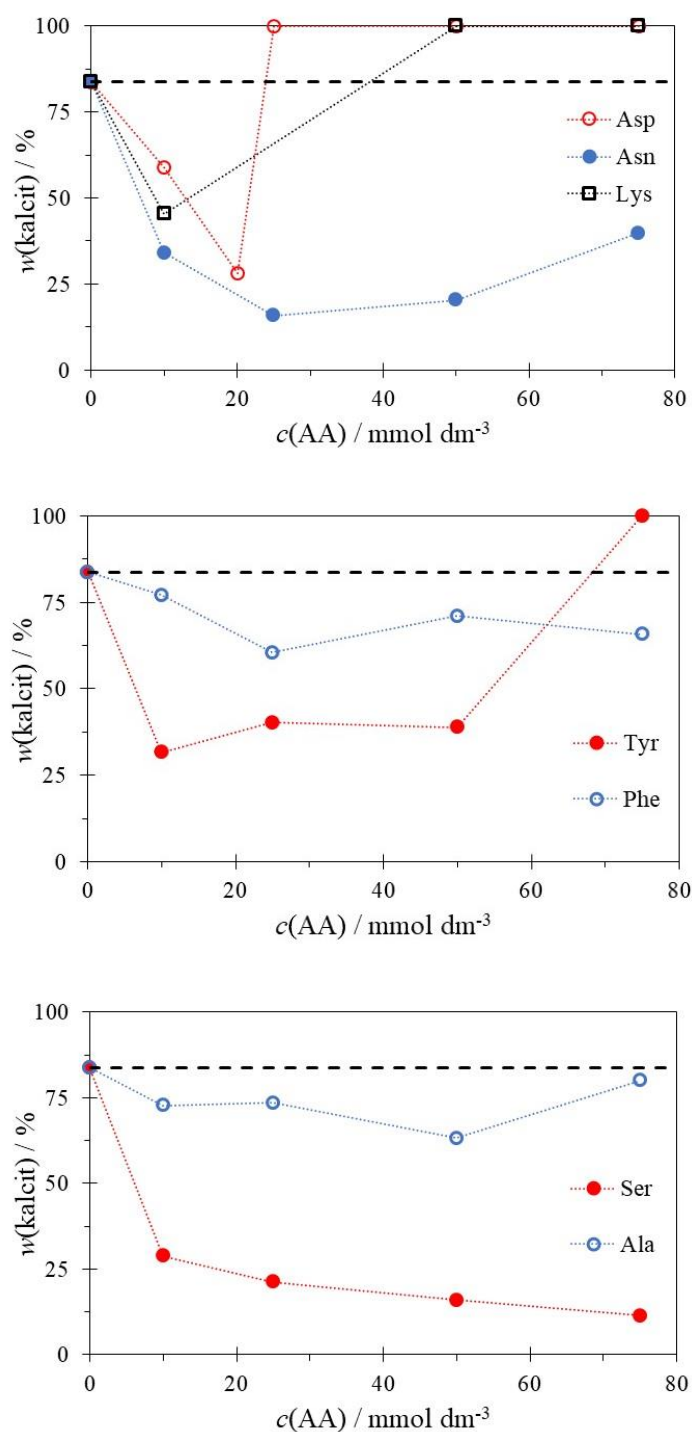
Slika 5.5. SEM slike kalcita dobivenog spontanom taloženjem pri različitim koncentracijama Ser i Ala u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 10,7$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.2.2. Polimorfizam

Utjecaj AA na polimorfizam je u ovoj disertaciji proučen kao promjena polimorfnog sastava smjese kalcita i vaterita pri spontanom taloženja uz različite koncentracije AA.¹⁷ Polimorfni sastav određen je pomoću FTIR i PXRD metoda. Pomoću obje metode dobijeni su usporedivi rezultati te je polimorfni sastav prikazan kao srednja vrijednost rezultata dviju metoda.

Na slici 5.6 prikazana je promjena masenog udjela pojedinog polimorfa nastalog u smjesi, uz dodatak različitih koncentracija AA. Pri nižim koncentracijama AA dolazi do smanjenja masenog udjela kalcita dodatkom odabranih AA. Utjecaj je najmanje izražen kod Ala i Phe, što je u skladu s pretpostavkom da nemaju potencijala za dodatne vodikove veze preko bočnog ogranka. Pri višim koncentracijama Asp, Lys i Tyr dolazi do taloženja kalcita kao dominantne faze. U slučaju Asp kalcit nastaje već pri koncentracijama od 25 mmol dm^{-3} , dok kod Lys pri koncentraciji od 50 mmol dm^{-3} , a Tyr tek kod koncentracije od 75 mmol dm^{-3} . Može se zaključiti da Asp pokazuje najizraženiji utjecaj. Porast koncentracije Asn uzrokuje porast udjela kalcita, ali manje izraženo nego kod navedene tri AA. Usporedbom Asp, Asn i Lys može se pretpostaviti da naboj, pozitivni ili negativni, na bočnom lancu pogoduje nastanku kalcita pri većim koncentracijama, a da polarna skupina na bočnom lancu isto pogoduje, ali puno slabije.

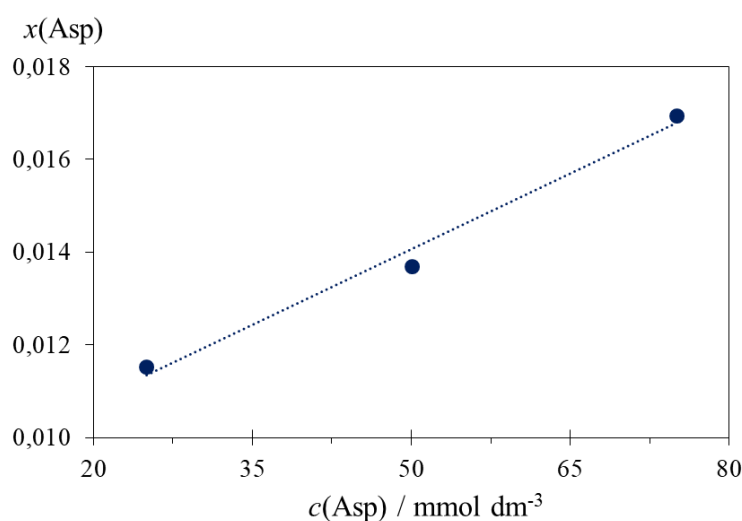
Promjena djelovanja AA je uočena nakon dodatka neke granične koncentracije, dvojni efekt aditiva (inhibicija i promocija), što je uočeno i ranije u literaturi.^{42,46} Dvojni efekt se može objasniti slabim i nespecifičnim međudjelovanjima sa površinom, pri čemu dolazi do adsorpcije aditiva na aktivna mjesta rasta i stepenice, što uzrokuje smanjenje kemijskog potencijala površine CaCO_3 i posljedično rasta efektivne energije kristalizacije.



Slika 5.6. Maseni udio kalcita u smjesi kalcita i vaterita dobivenoj spontanom taloženjem pri različitim koncentracijama Asp, Asn i Lys u uvjetima $c_1(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_1(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 10,7$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Crtkanom crnom linijom označen je maseni udio kalcita nastalog spontanom taloženjem bez dodatka AA.

5.2.3. Distorzija kristalne rešetke

Pretpostavka je da su adsorbirane molekule aminokiselina zarobljene u kristalima tijekom rasta kristala i doseg distorzije kristalne rešetke ovisi o količini ugrađene AA, ali i njene konformacije, fleksibilnosti, mjesta ugradnje i orijentacije s obzirom na konstitucijske ione unutar kristala. Stoga je određen molarni udio Asp u kristalu kalcita ($x(\text{Asp})$) pomoću HPLC/MS metode pri $m/z = 134$. Slika 5.7 predstavlja ugradnju Asp unutar kristalne rešetke kalcita izraženu kao molarni udio Asp u kalcitu s obzirom na koncentracije Asp u otopini ($c(\text{Asp})$). Uočena je linearna ovisno i dobro slaganje, što je u skladu s literaturom.¹⁴ Ostali dobiveni talozi su smjese kalcita i vaterita, pa nije bilo moguće egzaktno odrediti u koji se polimorf AA ugrađuje. Međutim, na primjeru Asp se može zaključiti da se distorzija kristalne rešetke može uspoređivati koncentracijom AA u otopini zbog linearne ovisnosti.



Slika 5.7. Ugradnja Asp u kristalnu rešetku kalcita izražene kao molarni udio Asp u kristalima kalcita ($x(\text{Asp})$) s obzirom na koncentraciju Asp u otopini ($c(\text{Asp})$).

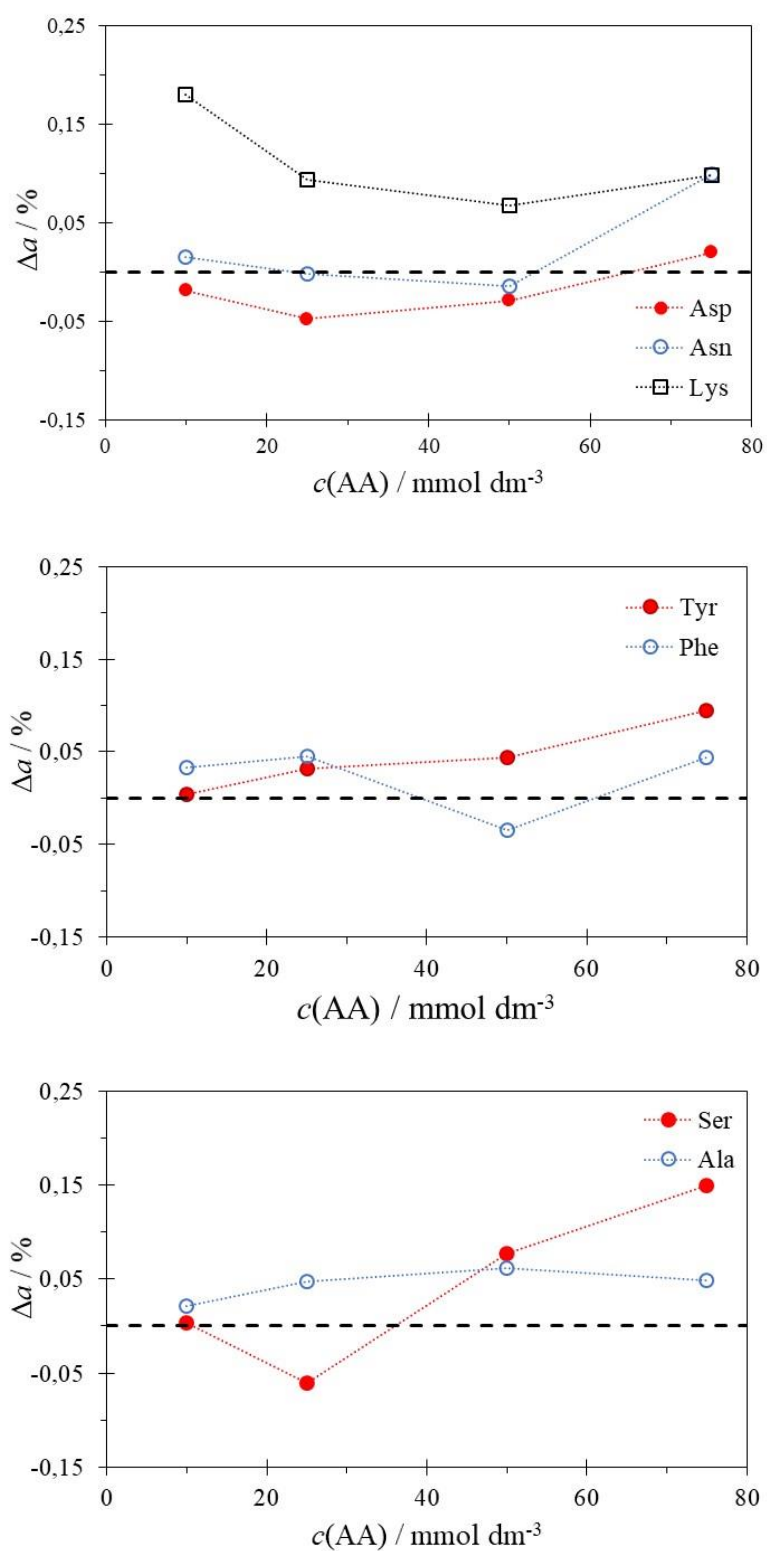
Distorzija kristalne rešetke kalcita proučena je pomoću dvije metode: PXRD i EPR. Promjena parametara osi a i osi c kristalne rešetke iskazana je kao relativna promjena (Δa i

Δc) tj. prema jednadžbi $(x_{\text{uzorak}} - x_{\text{ref}} / x_{\text{ref}}) \cdot 100$, pri čemu je sustav bez dodatka Asp smatran kao referentni sustav.^{40,88}

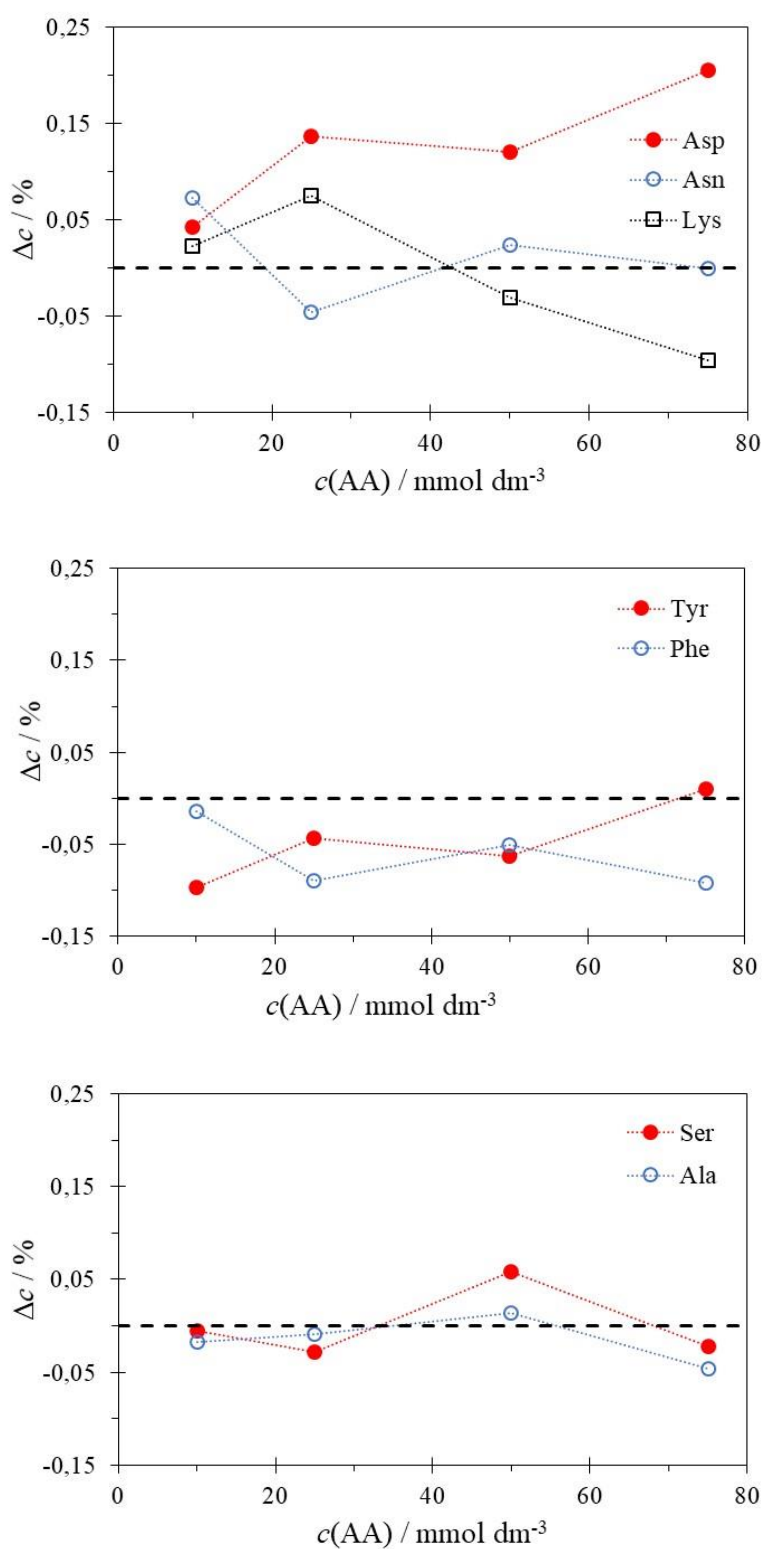
Relativne promjene parametara kristalne rešetke kalcita (Δa i Δc) dobivenog spontanom taloženjem uz dodatak različitih koncentracija odabranih AA prikazane su na slikama 5.8 i 5.9. Promjena je povezana s koncentracijom AA u otopini, što je u skladu sa ranijim istraživanjima.¹⁴ Uočena je značajna promjena parametra kristalne rešetke Δa pri dodatku Lys i s povećanjem koncentracije utjecaj se smanjuje. Kod taloženja sa Asn i Asp nije došlo do promjene parametra Δa . U slučaju proučavanja potencijala vodikovih veza uočeno je da Ser i Tyr povećavaju Δa , dok njihovi parovi Ala i Phe ne utječu značajno na distorziju.

Međutim, distorzija parametra Δc je značajna i najviše izražena dodatkom Asp, dok ostale AA ne pokazuju značajan utjecaj. Uočeno snažnije djelovanje Asp je sukladno sa ostalim već prikazanim rezultatima (promjena polimorfnog sastava i promjena morfologije). Također, ugradnja Asp je uskladu s ranijim eksperimentalnim istraživanjima i simulacijama molekulske dinamike,¹⁴ pri čemu se distorzija c osi može objasniti zamjenom CO_3^{2-} skupine kalcita s COOH skupinom bočnog ogranka Asp, pa molekula prolazi kroz sloj Ca^{2+} uzrokujući distorziju u smjeru c osi.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se AA mogu ugraditi u kristal, pri čemu uzrokuju distorziju kristalne rešetke. Koliku će distorziju pojedina AA uzrokovati ovisi o konformaciji, fleksibilnosti i naboju molekule, te mjestu ugradnje i orijentaciji unutar kristala.¹⁶ Što je naboj bočnog ogranka negativniji više se mijenja rešetka uzduž c osi, dok pozitivniji mijenja uzduž a osi. Istražene AA s potencijalom vodikove veze mijenjaju os a , dok AA bez potencijala ne utječu značajno na kristalnu rešetku. Do sad u literaturi se tvrdilo da vodikove veze ne utječu na distorziju.¹⁶ Međutim, može se pretpostaviti da iako se doprinos energiji interakcije molekula s površinom od strane vodikove veze može zanemariti u odnosu na elektrostatski ili kovalentni doprinos, vodikova veza može utjecati na orijentaciju AA prilikom adsorpcije i difuzije na kristalnoj plohi, posebice u području aktivnih mjesta i stepenica. Na taj je način potpomognuta uočena dodatna interakcija Ser, Asn ili Lys s kristalima kalcita.

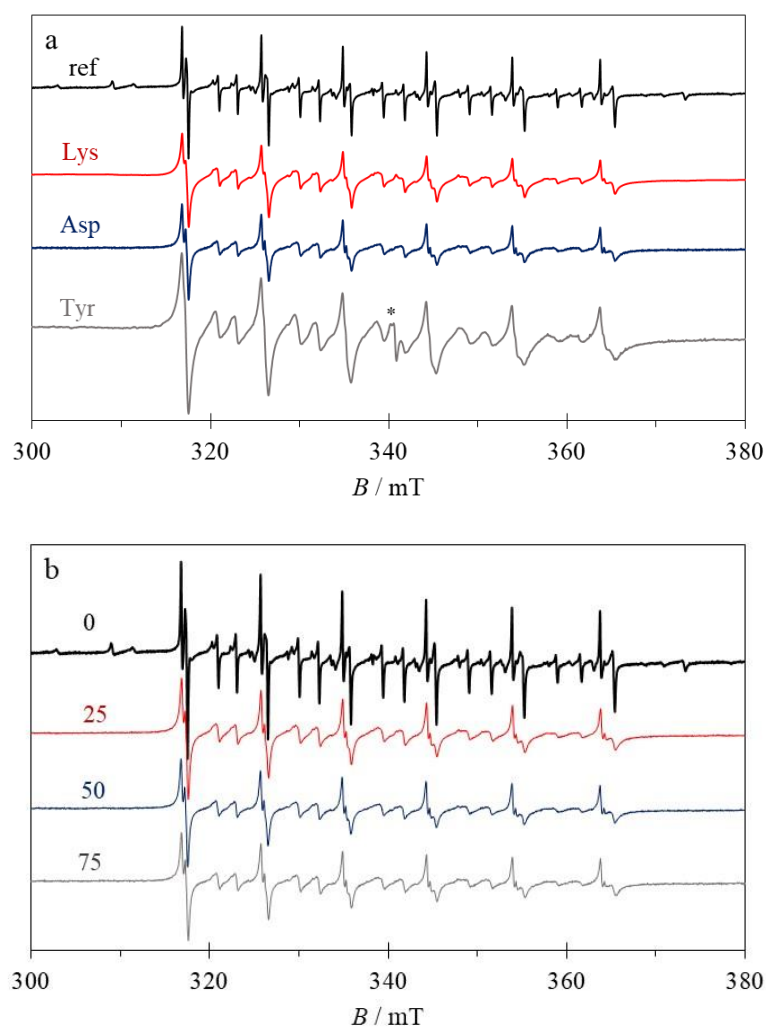


Slika 5.8. Relativne promjene parametra kristalne rešetke, Δa , za kalcit dobiven spontanom taloženjem pri različitim koncentracijama odabranih AA u uvjetima $c_1(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_1(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 10,7$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Referentni sustav bez AA prikazan je crtkanom crnom linijom.



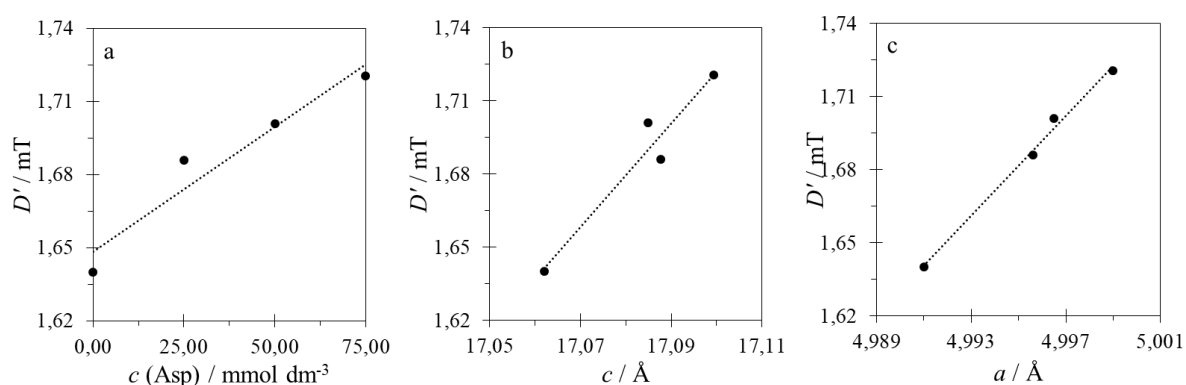
Slika 5.9. Relativne promjene parametra kristalne rešetke, Δc , za kalcit dobiven spontanom taloženjem pri različitim koncentracijama odabranih AA u uvjetima $c_1(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_1(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 10,7$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Referentni sustav bez AA prikazan je crtkanom crnom linijom.

Distorzija kristalne rešetke je dodatno potvrđena EPR spektroskopijom. Pri tome, analizirani su talozi u kojima je dominantna faza kalcit. Na slici 5.10a se može uočiti širenje linija dodatkom Lys, Asp i Tyr. S time da je sa zvjezdicom označena promjena linije kod dodanog Tyr koja se može objasniti nastankom nove plohe koja je uočena sa SEM metodom.



Slika 5.10. EPR spektar Mn^{2+} ugrađenog u kalcit dobivenog spontanom taloženjem pri koncentraciji od 75 mmol dm^{-3} različitih odabranih AA (a) i pri različitim koncentracijama Asp (b) u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 10,7$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Povećanjem koncentracije Asp može se vidjeti povećano širenje linija EPR spektra (slika 5.10b). Dobiveni spektri su dodatno analizirani i određen je parametar distorzije koji linearno raste s koncentracijom Asp, ali i relativnom promjenom parametara kristalne rešetke a i c (slika 5.11). Potvrđena je linearnost između ugradnje Asp i koncentracije u otopini prilikom taloženja.

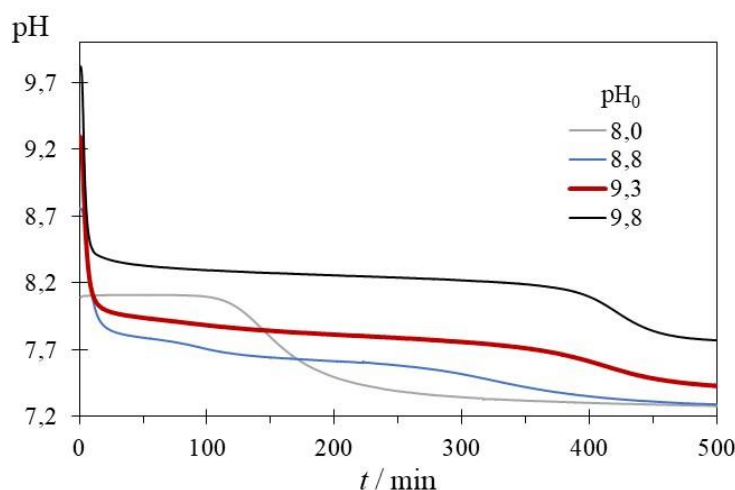


Slika 5.11. Parametar distorzije (D') izražen kao funkcija koncentracije Asp (a), i parametara kristalne rešetke a (b) i c (c) kalcita.

EPR rezultati su komplementarni sa strukturnom i morfološkom analizom taloga te stoga predstavljaju doprinos u izučavanju interakcija malih molekula i kristala kalcita.

5.3. Djelovanje asparaginske kiseline na transformaciju vaterita u kalcit

Transformacija vaterita u kalcit uočena je pri visokim koncentracijama reaktanata taložnog dijagrama te je navedena pojava pobliže istražena. Odabrani su početni eksperimentalni uvjeti: $c_i(\text{Ca}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c_i(\text{CO}_3) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, ionska jakost $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, temperatura $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ i magnetsko miješanje. Za istraživanje transformacije vaterita u kalcit odabran je taložni sustav u kojem inicijalno taloži vaterit. Napravljeni su eksperimenti pri različitim početnim vrijednostima pH (pH_i) i prikazani su na slici 5.12. Pri pH_i 8,0 može se uočiti dugo induksijsko vrijeme (100 min) za nukleaciju vaterit. Kod pH_i 8,8 induksijsko vrijeme se smanjilo na minutu, ali se na potenciometrijskoj krivulju može uočiti neravan plato, što nije dobro za daljnja istraživanja. Pri pH_i vrijednostima od 9,3 i 9,8 može se vidjeti tipična krivulja transformacije vaterita u kalcit:^{75,76,88} nagli pad pH odgovara nukleaciji i rastu vateritu ($0 < t/\text{min} < 10$), nakon kojeg slijedi plato ($10 < t/\text{min} < 400$). U tom razdoblju se istovremeno odvijaju procesi rasta vaterita, otapanje vaterita i rasta kalcita. Drugi malo blaži pad pH vrijednosti ($400 < t/\text{min} < 500$) predstavlja dio procesa u kojem dominira rast kalcita.

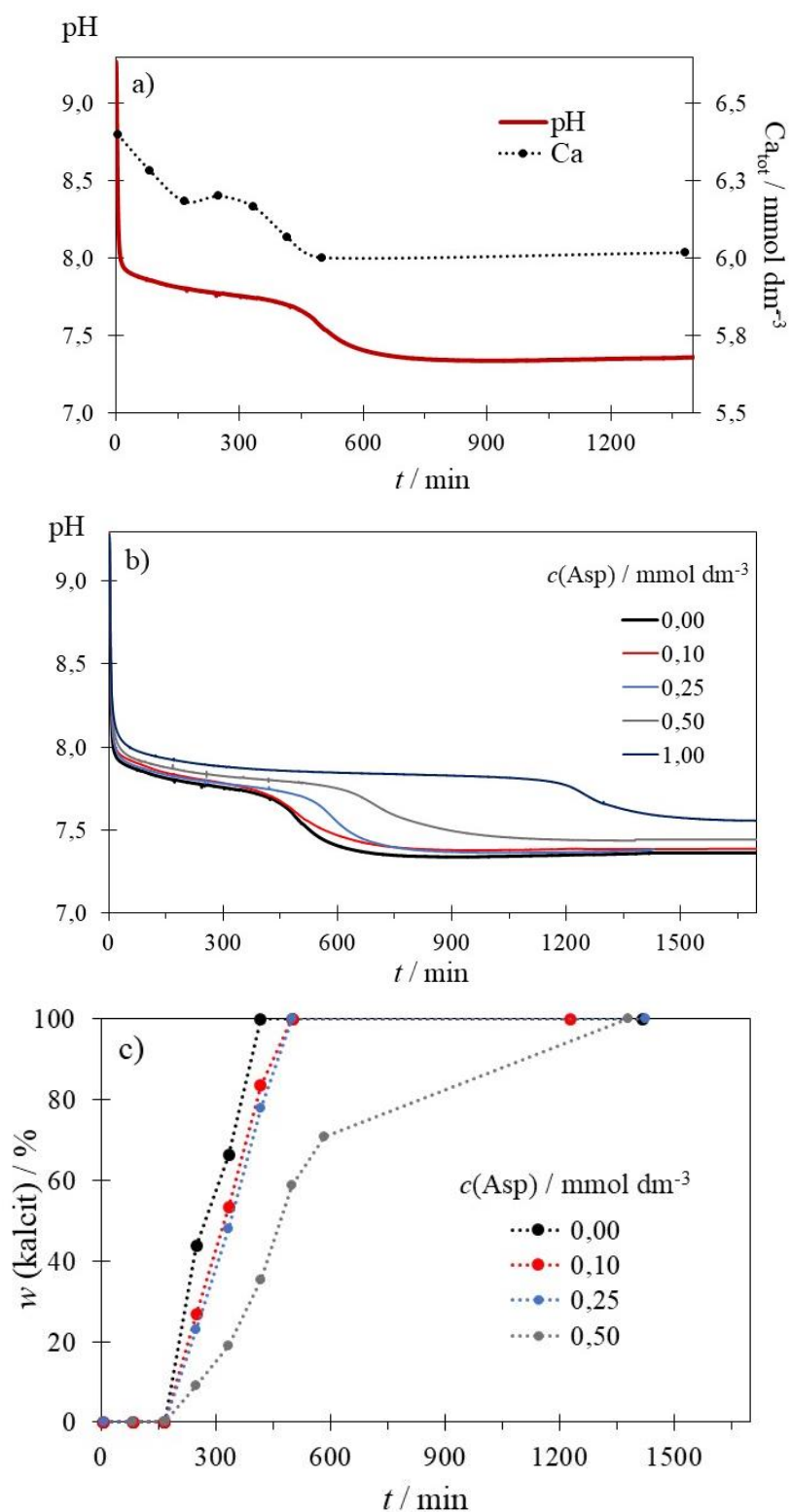


Slika 5.12. Potenciometrijske krivulje transformacije vaterita u kalcit pri različitim pH_i u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tijek transformacije vaterita u kalcit praćen je i kemijskom analizom tekuće faze reakcijske smjese, korištenjem ionske kromatografije. Provedeno je uzorkovanje svakih 83 min te je određena totalna koncentracija kalcija u tekućoj fazi, slika 5.13a. Može se uočiti da promjena koncentracije Ca^{2+} prati promjene pH: na početku procesa koncentracija pada što ukazuje da je dominantni proces rast taloga (vaterita i/ili kalcita), nakon čega je kratki plato tijekom kojega su brzina rasta kalcita i otapanja vaterita u ravnoteži. U posljednjoj fazi, koncentracija Ca^{2+} ponovno pada, što je rezultat dominantnog rasta kalcita. Koncentracijski plato u toj fazi, ukazuje na uspostavljanje ravnoteže između suspendiranog kalcita i otopine.

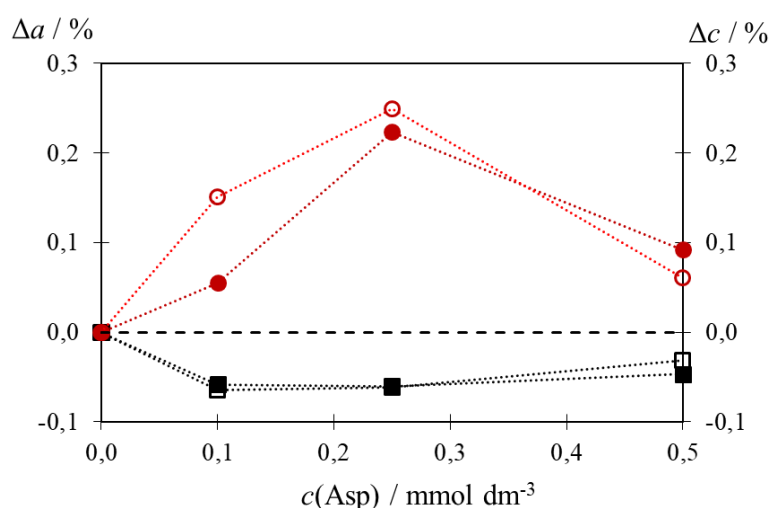
U cilju procjene djelovanja na taloženje, u navedeni sustav dodavana je Asp, pri različitim koncentracijama. Na slici 5.13b može se uočiti da je došlo do produljenja vremena transformacije, tj. uspostavljanja vrijednosti pH koja odgovara ravnotežnim uvjetima u sustavu kalcita i otopine.

Na temelju rezultata može se zaključiti da dodatak Asp produljuje vrijeme transformacije vaterita u kalcit, što može biti uzrokovano inhibicijom otapanja vaterita ili inhibicijom rasta kalcita.^{12,53} Da bi se pretpostavke potvrdile napravljeno je uzorkovanje svakih 83 min, pri čemu je talog profitriran i određen mu je polimorfni sastav korištenjem FTIR spektroskopije. Dobiveni podaci su prikazani na slici 5.13c. Potvrđeno je da povećanjem koncentracije Asp dolazi do usporavanja transformacije vaterita u kalcit.



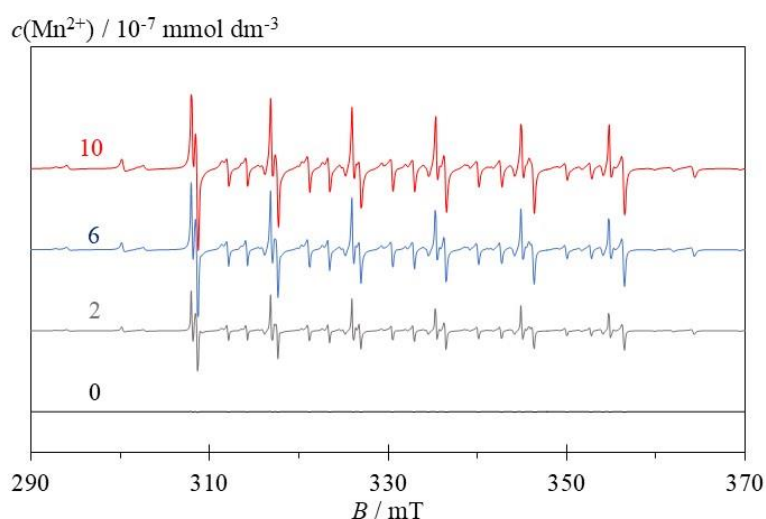
Slika 5.13. Potenciometrijske krivulje transformacije vaterita u kalcit i doseg reakcije izražen kao promjena ukupne koncentracije Ca^{2+} u modelnom sustavu (a), potenciometrijske krivulje pri različitim koncentracijama Asp (b) i promjena masenog udjela kalcita (c) u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 9,3$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Promjena parametara kristalne rešetke vaterita određena je na uzorcima izoliranim nakon jednoga sata, dok je kalcit analiziran nakon završetka transformacije. U tu je svrhu korištena PXRD. Proučavani su isti parametri kao i kod spontanog taloženja uz dodatak AA opisani u poglavlju 5.2.3. Na slici 5.14 može se uočiti da su oba parametra izraženija kod vaterita nego kalcita, što se može objasniti sa slabijom uređenošću strukture vaterita pa može lakše doći do distorzije. Uočena pojava je u skladu s literaturom. Meldrum i suradnici su uočili da Asp vrlo dobro ulazi u strukturu kalcita tako da --COOH skupina Asp zamjenjuje jednu od CO_3^{2-} skupina.⁸⁹



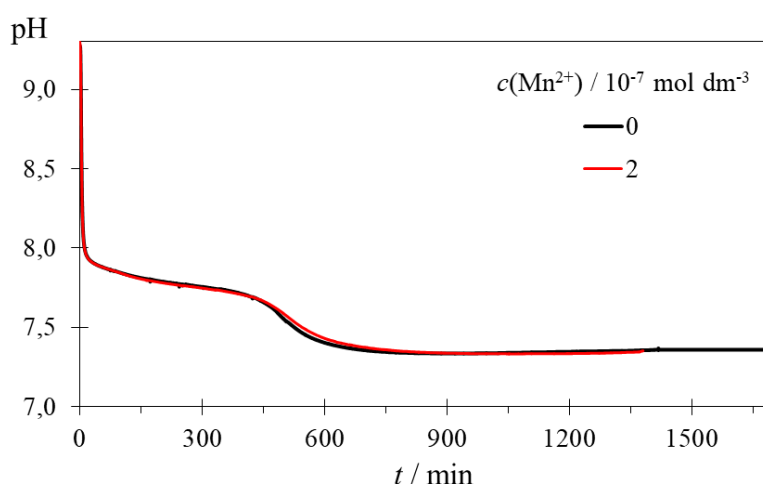
Slika 5.14. Relativne promjene parametara kristalne rešetke Δa , prazne oznake, i Δc , pune oznake, vaterita, kružići, i kalcita (kvadratići), izoliranih u sustavu $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 9,3$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ te uz različiti dodatak Asp. Referentni sustav bez AA prikazan je crtkanom crnom linijom.

Distorzija kristalne rešetke kalcita dodatno je proučena EPR spektroskopijom.^{40,88,90,91} Da bi se omogućila detekcija signala potrebni su nespareni elektroni, tj. atomi s paramagnetskim svojstvima. Stoga, pri početku reakcije dodan je Mn^{2+} za koji je poznato da se efikasno i izomorfno ugrađuje u strukturu kalcita. Ioni Mn^{2+} se nazivaju probom, koja se često koristi za proučavanje distorzije lokalnog magnetskog polja u kristalnoj rešetci kalcita.^{40,88} Da bi se istražilo koja je najniža koncentracija Mn^{2+} potrebna da bi se uočio signal napravljeni su eksperimenti pri različitim koncentracijama Mn^{2+} i snimljeni su EPR spektri koji su prikazani na slici 5.15. Može se vidjeti da se povišenjem koncentracije Mn^{2+} povećava i signal. Pri koncentraciji od $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ odziv mjerenja je pogodan, a ne utječe na druge parametre transformacije, stoga je navedena koncentracija odabrana za sva daljnja mjerenja.



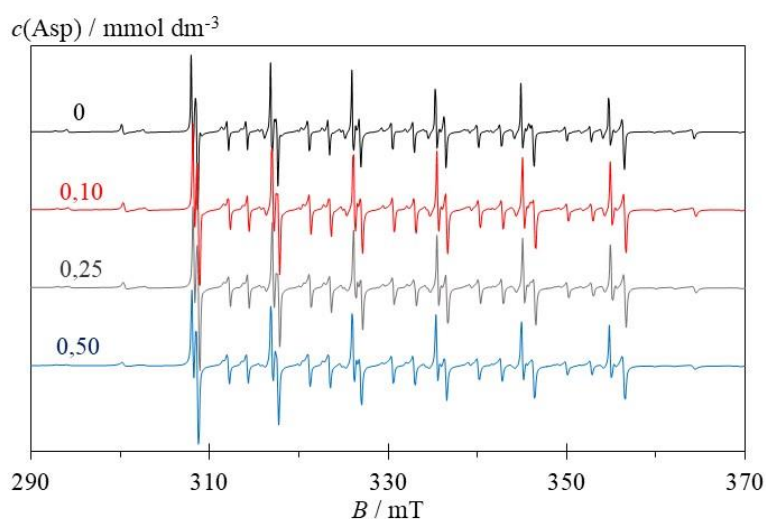
Slika 5.15. Spektri EPR mjerenja Mn^{2+} kao probe u kalcitu pri različitim koncentracijama Mn^{2+} .

Preliminarnim pokusima provjereno je utječe li dodatak Mn^{2+} na tijek transformacije. Rezultati usporednih kinetičkih mjerenja prikazani su na slici 5.16. Može se uočiti da potenciometrijske krivulje ne razlikuju, stoga Mn^{2+} ne utječe na transformaciju te je korišten kao proba.



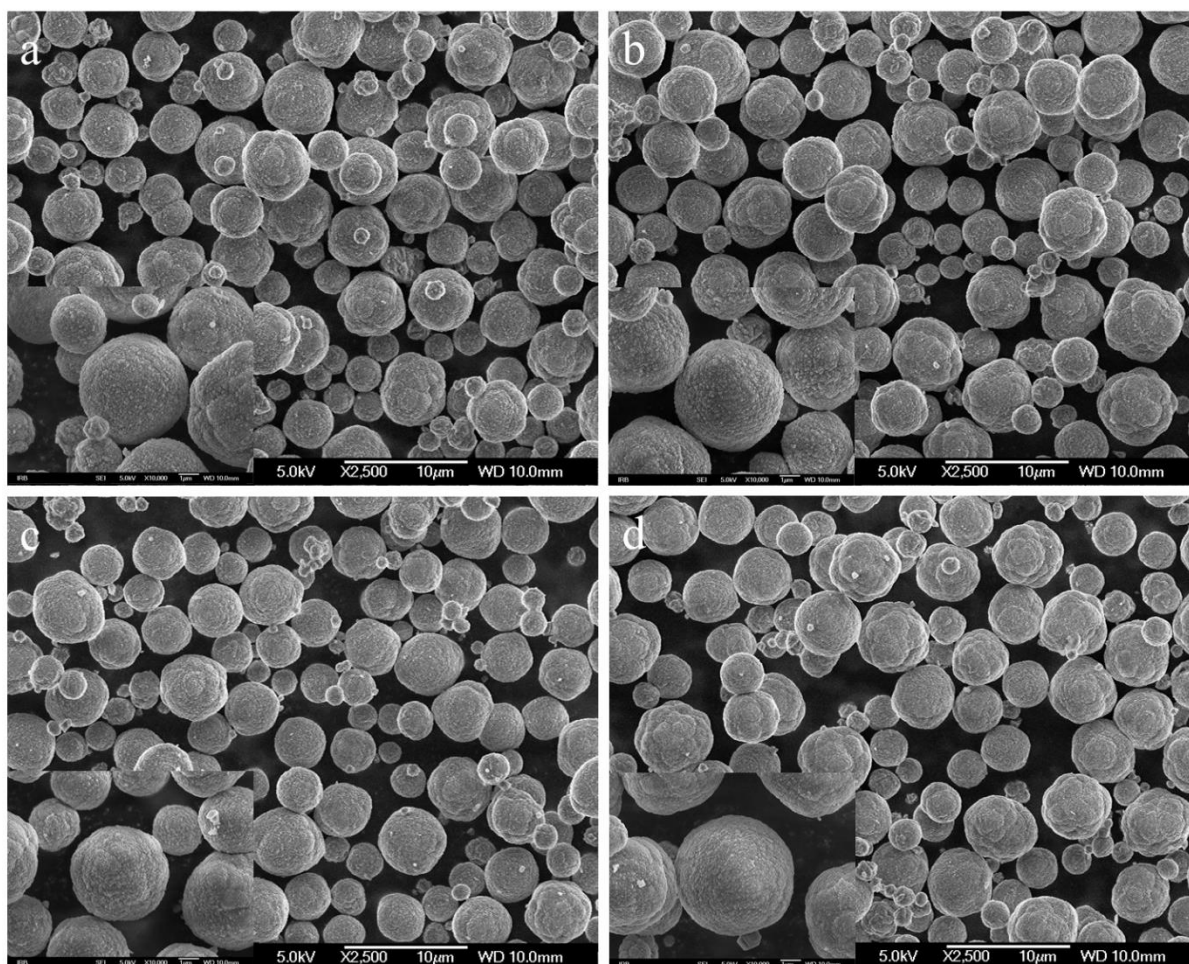
Slika 5.16. Potenciometrijske krivulje transformacije vaterita u kalcit bez Mn^{2+} i uz prisutstvo Mn^{2+} pri uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 9,3$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Promjenom koncentracije Asp dodane u taložni sustav nije uočena značajna promjena EPR spektra kalcita, kao što je prikazano na slici 5.17. Stoga se može zaključiti da je EPR u usporedbi s PXRD manje osjetljiva metoda za proučavanje distorzije kristalne rešetke kalcita.



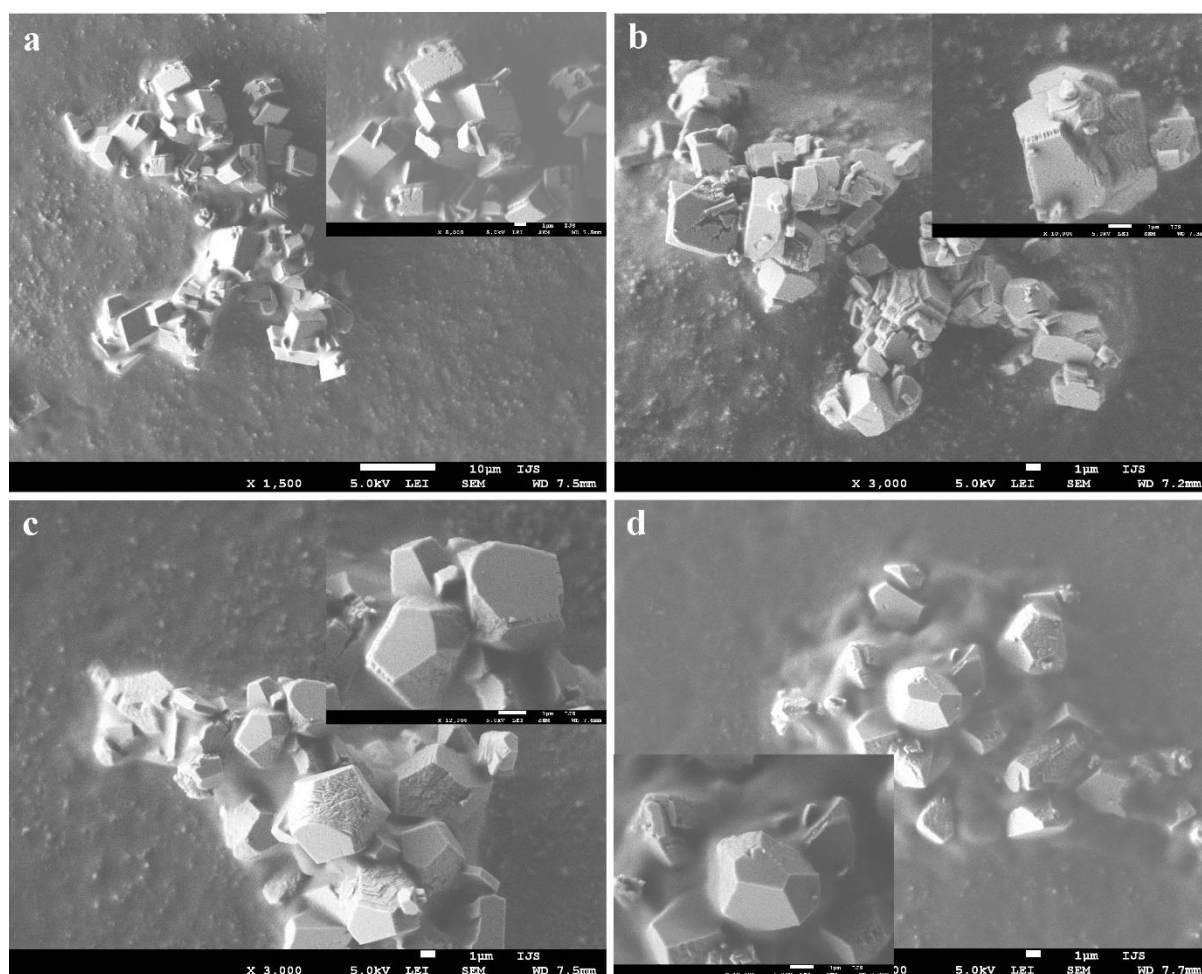
Slika 5.17. EPR spektar Mn^{2+} ugrađenog u kalcit prilikom transformacije vaterita u kalcit pri različitim koncentracijama Asp označenim na slici u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 9,3$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Utjecaj na morfologiju vaterita i kalcita proučen je pomoću SEM. Na slici 5.18 može se vidjeti da se morfologija vaterita nastalog u opisanom taložnom sustavu ne mijenja s promjenom koncentracije Asp u rasponu od 0,1 do 0,5 mmol dm⁻³.



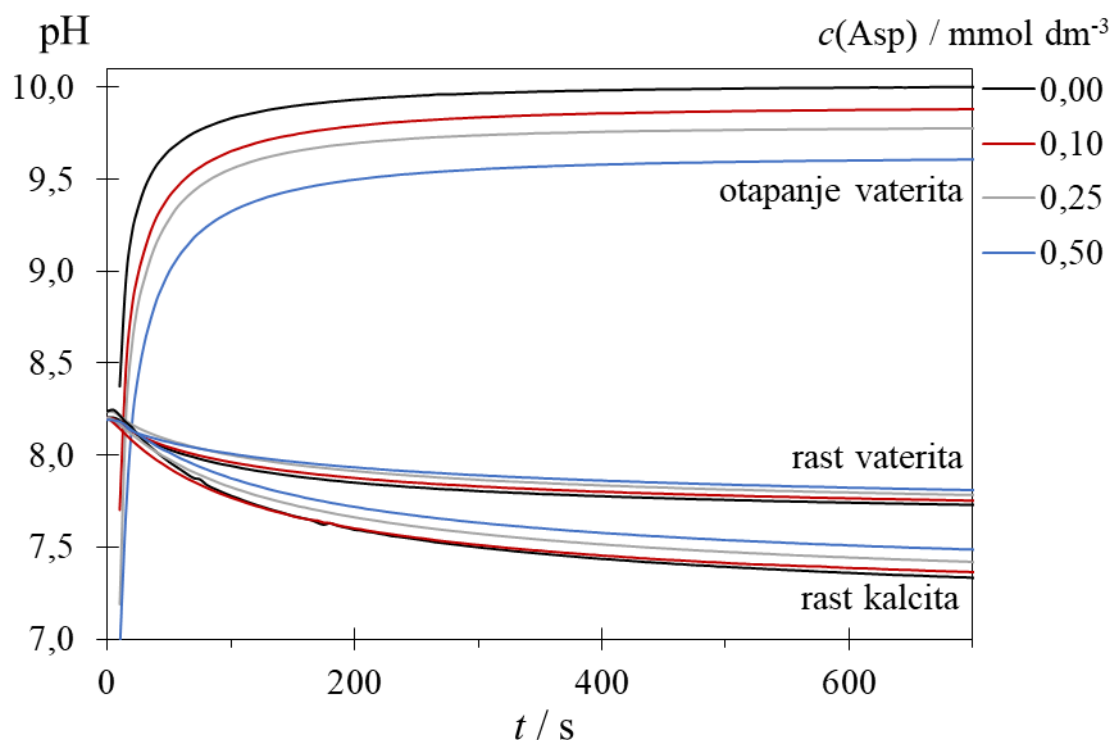
Slika 5.18. SEM slike kristala vaterita pri različitim koncentracijama Asp i: a) 0,00 mmol dm⁻³, b) 0,10 mmol dm⁻³, c) 0,25 mmol dm⁻³, d) 0,50 mmol dm⁻³ u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I_c = 0.3 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 9.3$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Za razliku, morfologija kalcita se mijenja povećanjem koncentracije Asp (slika 5.19). Pravilni romboedri kalcita vide se na slici 5.19a u slučaju bez dodatka Asp. Dodatkom Asp se vrhovi romboedra zaobljuju i postaju sve više okrhnuti te se pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji oblik romboedra teško prepoznaje. Slična promjena uočena je ranije u literaturi kod dodatka magnezijevih i sulfatnih iona.⁴¹ Zaobljavanje vrhova romboedra uočeno je u literaturi i kod spontanog taloženja uz prisustvo Asp.⁵³ Pretpostavka je da do zaobljavanja vrhova dolazi zbog selektivnog vezanja Asp na bridove stepenice rasta.⁵⁴ Zbog vezanja na stepenici dolazi do formiranja novih ploha.

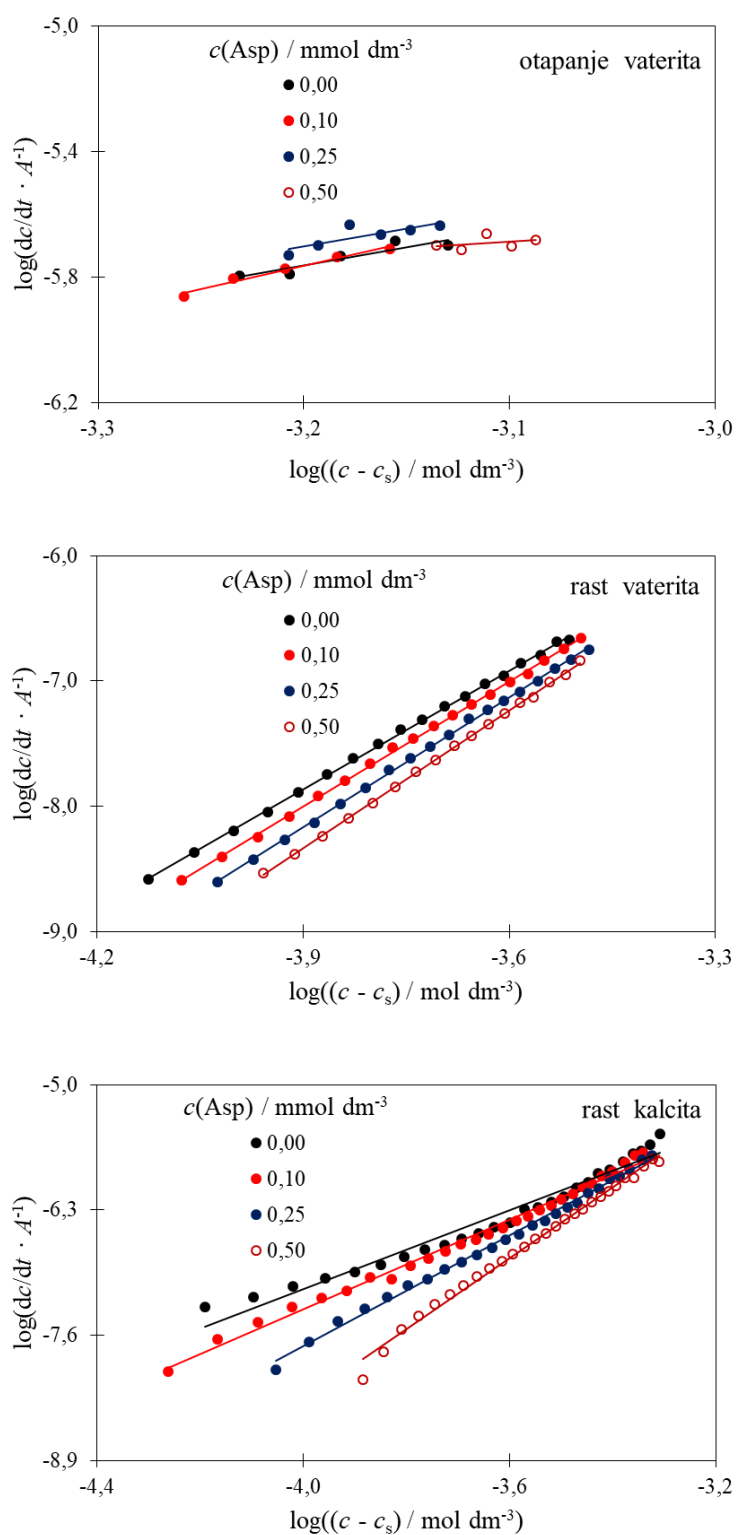


Slika 5.19. SEM slike kristala kalcita pri različitim koncentracijama Asp i: a) 0,00 mmol dm⁻³, b) 0,10 mmol dm⁻³, c) 0,25 mmol dm⁻³, d) 0,50 mmol dm⁻³ u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 9,3$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Kao što je već navedeno, tijekom transformacije vaterita u kalcit zbiva se više procesa istovremeno. Da bi se detaljnije proučili pojedinačni procesi provedeni su eksperimenti rasta na kristalnom sjemenu vaterita, otapanje vaterita i rasta na kristalnom sjemenu kalcita. Rast vaterita i kalcita istražen je eksperimentima pri nižem pH ($\text{pH}_i = 8,2$) da bi otopina bila metastabilna te su kristali odgovarajućih polimorfa dodavani u reakcijsku otopinu pri istim uvjetima kao što su provedeni eksperimenti transformacije ($c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Tijek reakcije praćen je potenciometrijski, što se može vidjeti na slici 5.20. Otapanje vaterita inicirano je naglim dodatkom taloga vaterita u čistu vodu. Na slici 5.20 može se uočiti porast pH, uzrokovan otapanjem.



Slika 5.20. Potenciometrijske krivulje rasta vaterita, rasta kalcita i otapanje vaterita pri različitim koncentracijama Asp u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 5.21. Prikaz brzina reakcija rasta vaterita, otapanja vaterita i rasta kalcita pri različitim koncentracijama Asp kao funkcije apsolutne prezasićenosti u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

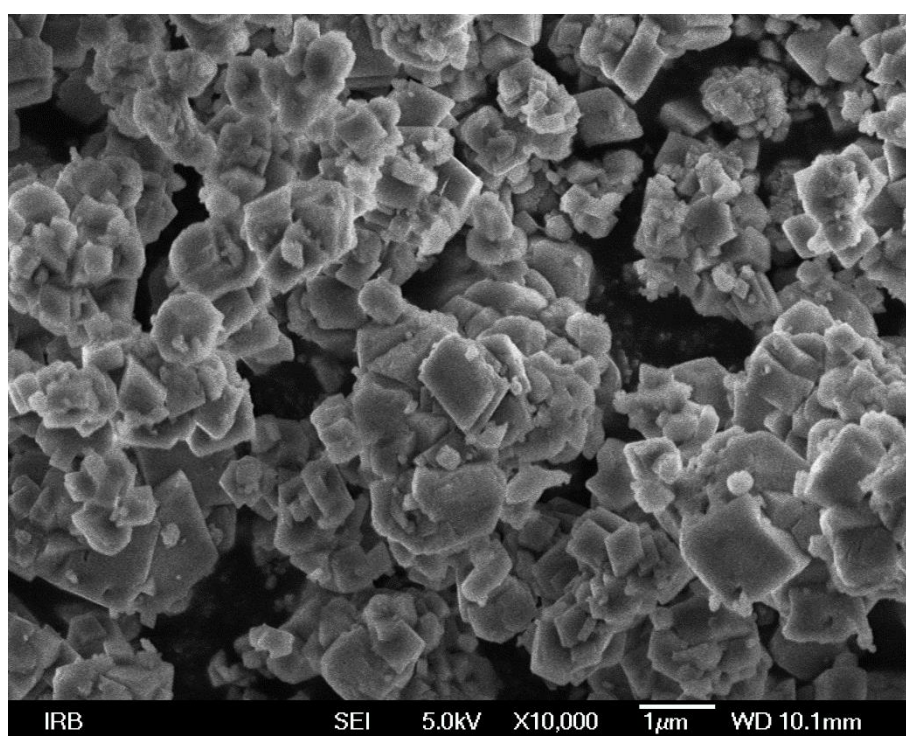
Iz navedenih potencijometrijskih krivulja koristeći jednadžbe (36), (37) i (38) određen je red reakcije rasta i/ili otapanja vaterita i/ili kalcita, pri različitim koncentracijama Asp (slika 5.21 i tablica 5.1). Povišenjem koncentracije Asp, red reakcije otapanja vaterita ($n = 1$) se ne mijenja značajno i sustavno, dok se red reakcije rasta vaterita i kalcita sustavno mijenja. Tako dobivene vrijednosti ukazuju da je došlo do promjene mehanizma rasta, te da dominantno spiralni mehanizam uočen u čistom sustavu kalcita postupno prelazi u rast kontroliran nukleacijom na površini. Vaterit u cijelom području koncentracija dodatka Asp raste prema mehanizmu površinske nukleacije ($n > 3$), pri čemu n sustavno raste, što ukazuje na njegov značajniji doprinos u odnosu na mogući rast na spiralnoj plohi. Otapanje vaterita je u cijelom području eksperimentalnih uvjeta kontrolirano difuzijom iona u otopini i nije uočeno značajno djelovanje dodatka Asp na taj proces. U literaturi⁵³ je pretpostavljeno da je rast kalcita inhibiran tijekom transformacije uz dodatak Asp.

Tablica 5.1. Red reakcije (n) rasta vaterita, otapanja vaterita i rasta vaterita

$c(\text{Asp}) / \text{mmol dm}^{-3}$	rast vaterita n_{gv}	otapanje vaterita n_{ov}	rast kalcita n_k
0,00	3,16	1,16	2,04
0,10	3,32	1,47	2,33
0,25	3,46	1,13	2,87
0,50	3,66	1,12	3,68

5.4. Rast iniciran dodatkom kristalnog sjemena kalcita

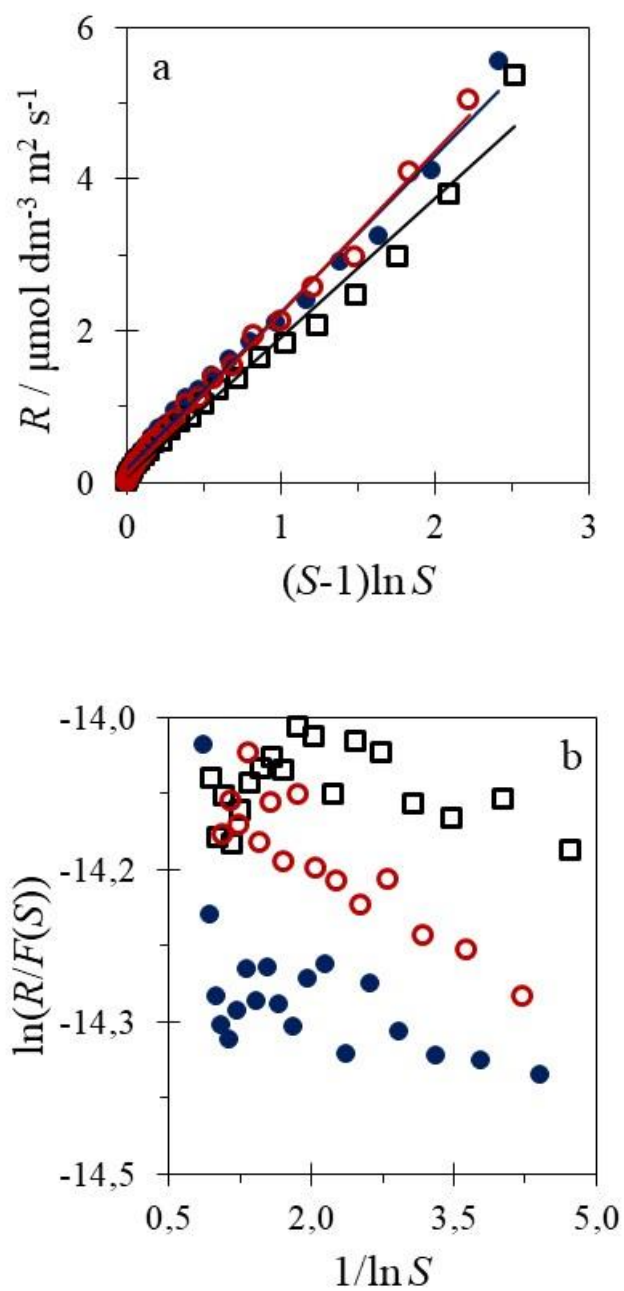
Kako bi bio procijenjen doseg interakcija pojedinih AA s površinom kalcita, provedena je analiza kinetike rasta kristala CaCO_3 iniciranog dodatkom kristalnog sjemena kalcita romboedarske morfologije (slika 5.22).



Slika 5.22. SEM slika kristalnog sjemena kalcita korištenog u eksperimentima rasta iniciranog dodatkom kristalnog sjemena

U tu je svrhu korišteno prethodno pripremljeno kristalno sjeme kalcita koje je bilo detaljno karakterizirano, a rast je proveden u sustavu relativno niske početne prezasićenosti (koncentracije reaktanata $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, pri $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $S_i = 3,6$). Dodatkom kristalnog sjemena u metastabilnu otopinu osigurano je da nema spontanog taloženja. Navedeni uvjeti potrebni su da bi se spriječila sekundarna nukleacija te da bi

rezultati odgovarali samo rastu kalcita. Dodatkom kristalnog sjemena dolazi do rasta kristala što je praćeno potenciometrijski. Da bi se ispitala reproducibilnost, eksperimenti su ponavljani više puta. Određen je mehanizam rasta kalcita testiranjem mehanizma spiralnog rasta (j. 70) i površinske nukleacije (j. 71), što je prikazano na slici 5.23.²⁰ Iz testa se može vidjeti da se rast kalcita zbiva mehanizmom spiralnog rasta, pri čemu su određene konstante brzine reakcije $k_{s,i} = (2,21 \pm 0,06) \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, dok je po definiciji paraboličkog rasta red reakcije 2. Dobivena konstanta brzine rasta kalcita je u skladu s konstantom dobivenom u literaturi.²⁰



Slika 5.23. Testiranje mehanizma spiralnog rasta (a) i mehanizma kontroliranog površinskom nukleacijom (b) za rast kalcita u referentnom sustavu (bez AA).

5.4.1. Interakcije aminokiselina s površinom kalcita

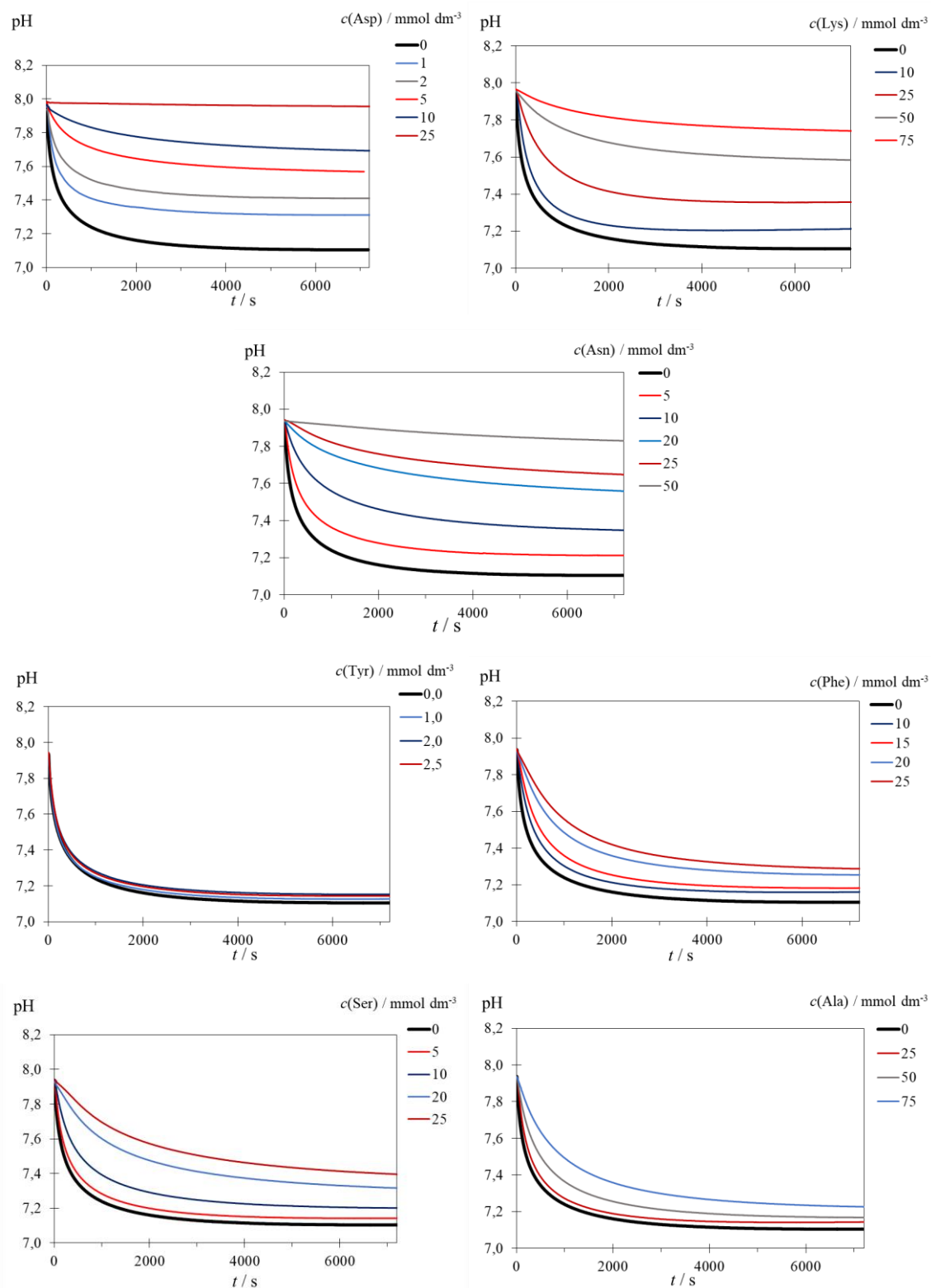
Utjecaj aminokiselina na rast kalcita istražen je dodatkom kristalnog sjemena kalcita da bi se relativno kvantificirale interakcije pojedine AA s površinom kalcita. Interakcije su proučene analizom kinetika i mehanizma rasta kristala i to tako da su određivane Langmuirove konstante adsorpcije. Na istim je uzorcima provedena strukturna analiza, korištenjem PXRD i EPR spektroskopija, te je određena distorzija kristalne rešetke.

5.4.1.1. Kinetike rasta kalcita

Kinetike rasta kalcita proučene su dodatkom različitih koncentracija AA. Naglim dodatkom kristalnog sjemena u metastabilnu otopinu koje je sadržavala odgovarajuće koncentracije različitih AA iniciran je rast kalcita. Rast se očituje padom pH vrijednosti (slika 5.24) te je uočeno da je u sustavu bez dodatka AA pad pH vrijednosti najstrmiji. Međutim, dodatkom svih odabranih AA dolazi do usporenja rasta (inhibicije) vidljive kao smanjenje nagiba odgovarajućih krivulja napredovanja procesa. Također je vidljivo da je dodatak AA uzrokovao zaustavljanje rasta (ravnotežni pH) pri višim pH vrijednostima. Povišenje koncentracije AA uzrokuje sustavni porast ravnotežnih pH vrijednosti.

Uspoređujući potenciometrijske krivulje sustava uz dodatak AA različitih naboja (slika 5.24), kvalitativnim pregledom se može zaključiti da Asp uzrokuje najsnažniju inhibiciju, zatim slijedi Asn, te Lys. Utjecaj Asp može se objasniti negativnim nabojem – COOH skupine bočnog lanca, dok se utjecaj Asn može pripisati dodatnom vodikovom vezom preko polarne skupine bočnog lanca ($-\text{CONH}_2$).

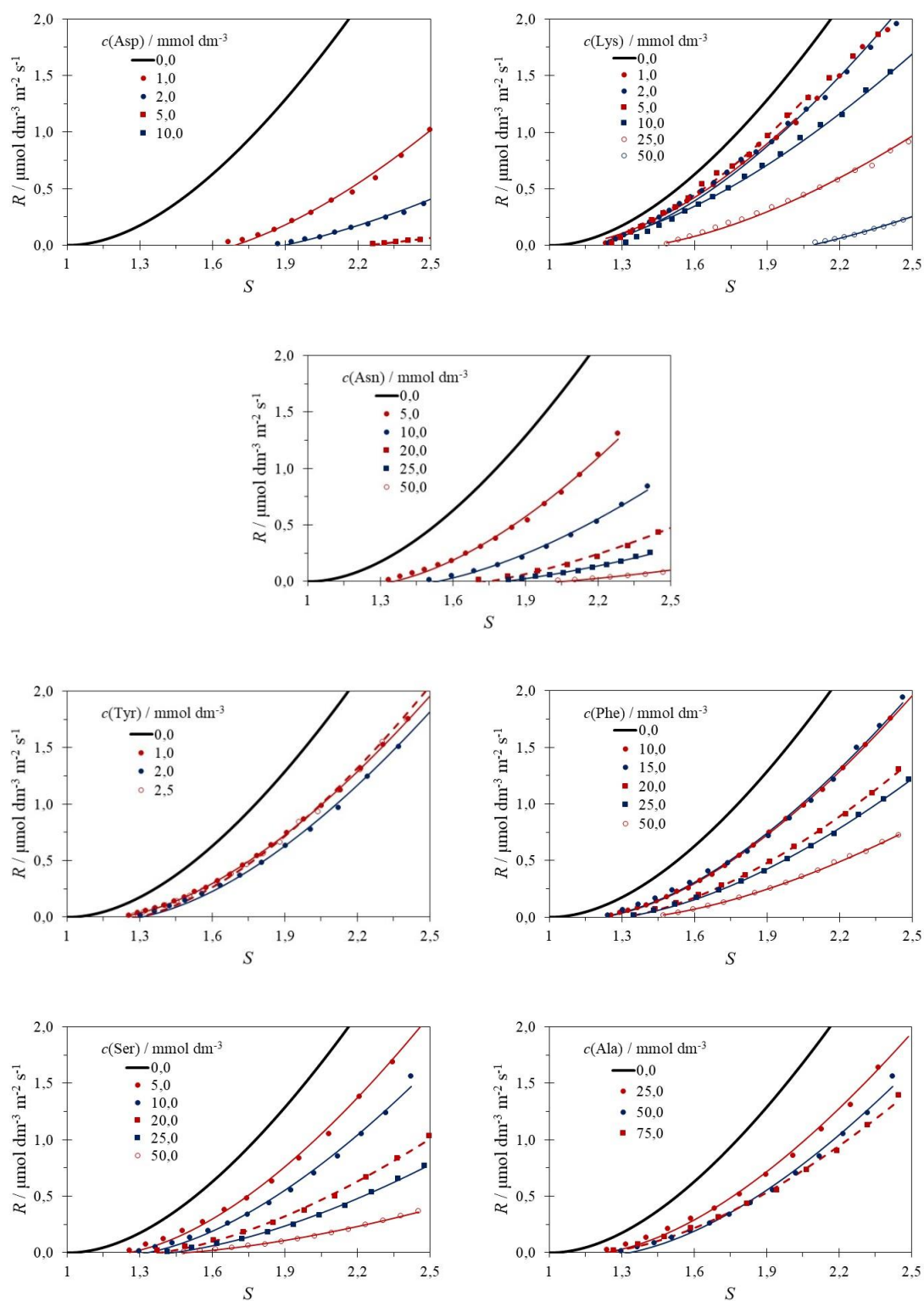
Uspoređujući Tyr i Phe (slika 5.24), može se uočiti da su već male koncentracije Tyr uzrokovale inhibiciju. Koncentracije Tyr nisu mogle biti više zbog slabe topljivosti pri ispitivanom pH. Stoga se iz samih potenciometrijskih titracija ne može odrediti koja AA ima veći utjecaj. Međutim, u slučaju Ser i Ala može se zaključiti već i na temelju potenciometrijskih krivulja napredovanja procesa da Ser snažnije inhibira rast kalcita od Ala koji nema potencijal za dodatne vodikove veze.



Slika 5.24. Potenciometrijske krivulje napredovanja rasta kristala kalcita pri različitim koncentracijama odabranih AA u uvjetima $c_1(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_1(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_1 = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Iz nagiba potencijometrijskih krivulja određene su brzine rasta pri različitim koncentracijama AA, te su prikazane kao funkcije prezasićenosti (slika 5.25). Na slikama podebljana crna krivulja odgovara sustavu bez AA. Dodatkom svih AA nagibi krivulja se smanjuju. Dobiveni podaci su analizirani prema modelu inhibicije kristalnog rasta dodatkom aditiva prema Sangwalu⁸⁰ (j. 80) te su određene konstante brzine reakcije (k_s) i kritične prezasićenosti (S^*) koje su dane u tablici 5.2. Kritična prezasićenost raste povećanjem koncentracija svih odabranih AA, dok se konstante brzine reakcije smanjuju. Može se zaključiti da se sve AA adsorbiraju na površinu kalcita te da inhibiraju rast, ali ne u potpunosti.

Pomoću dobiveni kinetičkih parametara određena je relativna brzina rasta kalcita izražena kao omjer brzine rasta u sustavu s dodanom AA i brzine rasta bez dodatka AA. Relativna brzina je prikazana na slikama 5.26 kao funkcija koncentracije dodane AA. Dobiveni podaci su analizirani prema modelu Kubote i Mullina¹⁹ (j. 75) te su određene Langmuirove konstante adsorpcije (K_{ad}) i parametar djelotvornosti aditiva (α). Termodinamički parametri adsorpcije AA na površinu kalcita su dani u tablici 5.3.

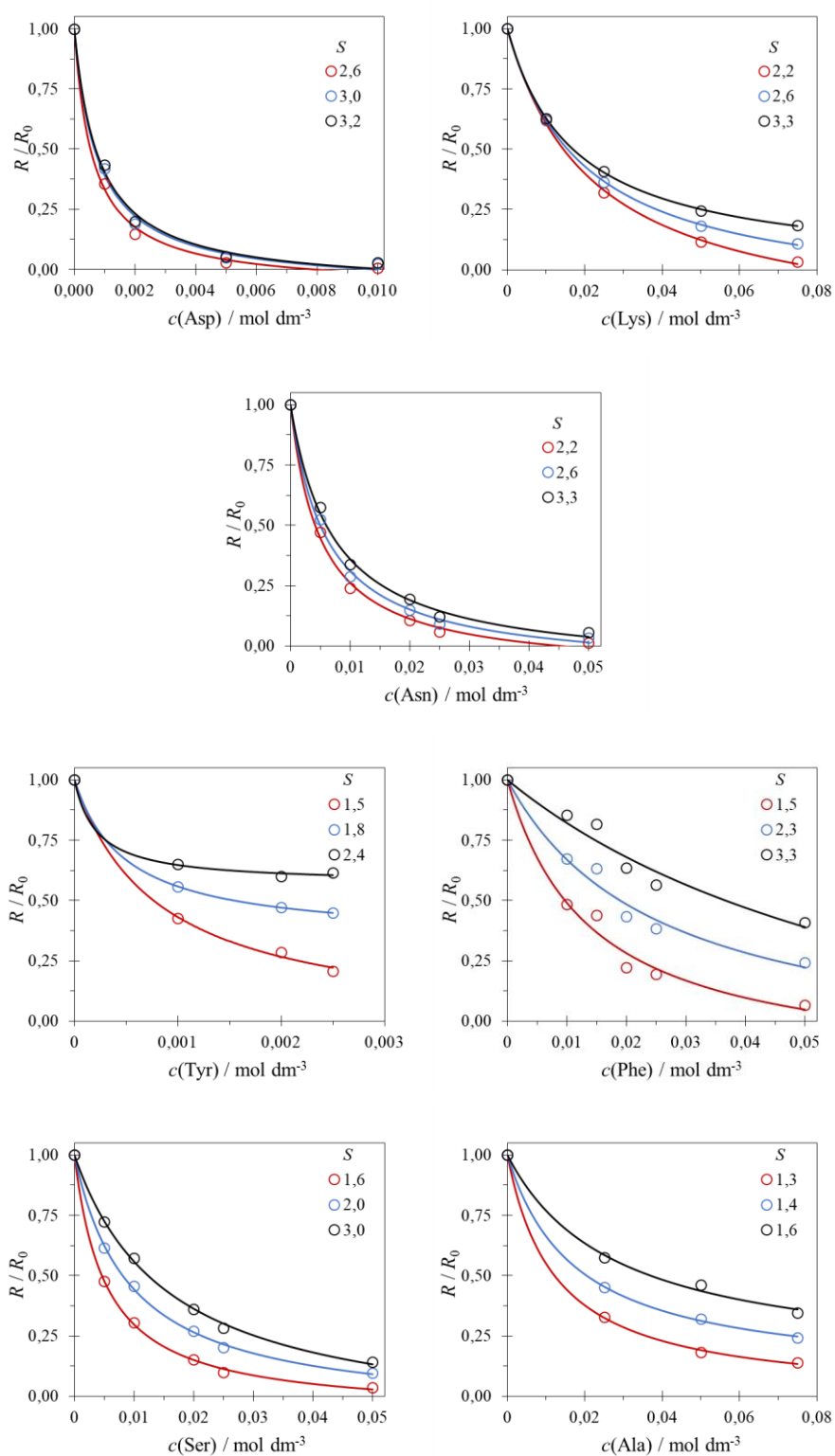


Slika 5.25. Prikaz brzine rasta kristala kalcita, pri različitim koncentracijama odabranih AA, izražen kao funkcija prezasićenosti u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 5.2. Kinetički parametri (kritična prezasićenost S^* i konstanta brzine reakcije k_s) dobiveni za rast kristala kalcita uz različite koncentracije AA.^a

AA	$c(\text{AA}) \text{ mmol dm}^{-3}$	$k_s / \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	S^*
Asp	1,0	$1,74 \pm 0,06$	$1,69 \pm 0,02$
	2,0	$0,98 \pm 0,04$	$1,90 \pm 0,02$
	5,0	$0,37 \pm 0,01$	$2,22 \pm 0,01$
	10,0	$0,30 \pm 0,01$	$2,50 \pm 0,01$
Lys	10,0	$1,27 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,03$
	25,0	$1,14 \pm 0,03$	$1,42 \pm 0,02$
	50,0	$0,97 \pm 0,02$	$1,83 \pm 0,01$
	75,0	$0,92 \pm 0,02$	$2,077 \pm 0,008$
Asn	5,0	$1,88 \pm 0,06$	$1,35 \pm 0,02$
	10,0	$1,28 \pm 0,05$	$1,53 \pm 0,02$
	20,0	$0,88 \pm 0,05$	$1,74 \pm 0,03$
	25,0	$0,59 \pm 0,02$	$1,81 \pm 0,02$
Tyr	1,0	$1,81 \pm 0,02$	$1,217 \pm 0,007$
	2,0	$1,86 \pm 0,04$	$1,30 \pm 0,02$
	2,5	$2,07 \pm 0,06$	$1,37 \pm 0,03$
Phe	10,0	$1,90 \pm 0,03$	$1,19 \pm 0,01$
	15,0	$1,82 \pm 0,06$	$1,21 \pm 0,02$
	20,0	$1,41 \pm 0,02$	$1,30 \pm 0,01$
	25,0	$1,26 \pm 0,01$	$1,304 \pm 0,009$
	50,0	$0,91 \pm 0,01$	$1,403 \pm 0,007$
Ser	5,0	$2,03 \pm 0,08$	$1,25 \pm 0,03$
	10,0	$1,73 \pm 0,08$	$1,33 \pm 0,03$
	20,0	$1,15 \pm 0,04$	$1,39 \pm 0,02$
	25,0	$0,93 \pm 0,03$	$1,43 \pm 0,02$
	50,0	$0,49 \pm 0,01$	$1,48 \pm 0,02$
Ala	25,0	$1,97 \pm 0,06$	$1,18 \pm 0,02$
	50,0	$1,82 \pm 0,08$	$1,23 \pm 0,03$
	75,0	$1,35 \pm 0,05$	$1,22 \pm 0,03$

^aNepouzdanosti su iskazane kao standardne devijacije.



Slika 5.26. Prikaz relativne brzine rasta kristala kalcita izražen kao funkcija koncentracije odabranih AA u uvjetima $c_1(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_1(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_1 = 7,9$ i $\vartheta = 25^\circ\text{C}$.

Tablica 5.3. Termodinamički parametri adsorpcije (parametar djelotvornosti aditiva α i Langmuirova konstanta adsorpcije K_{ad}) AA na površinu kalcita dobiveni iz podataka rasta kristala kalcita uz različite koncentracije AA.^a

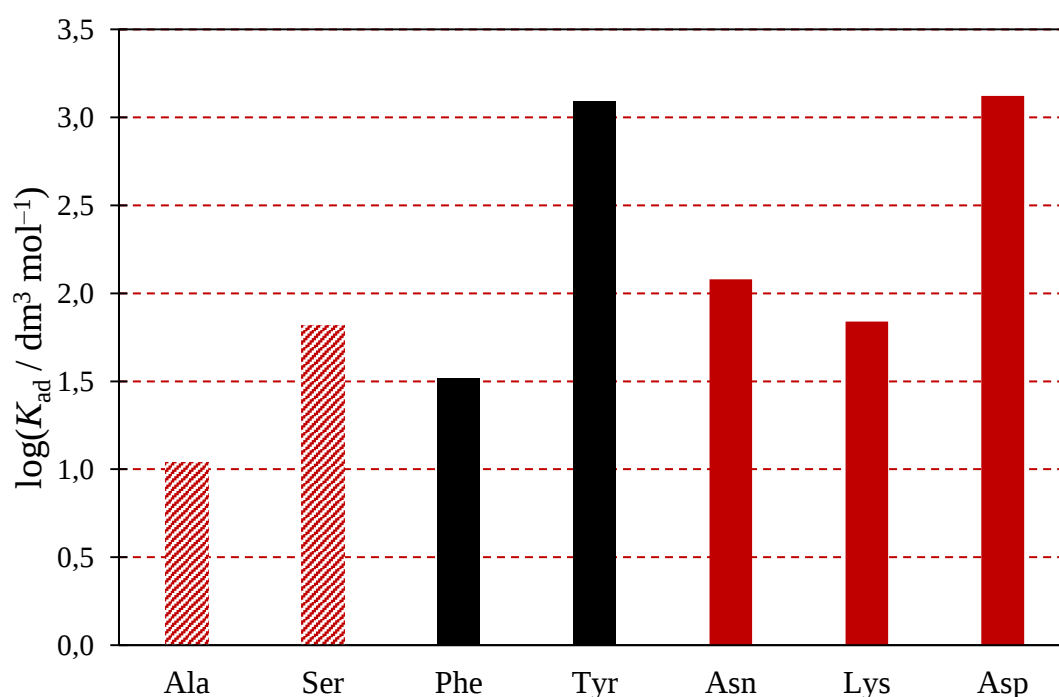
AA	S	α	$K_{ad} / \text{dm}^3\text{mol}^{-1}$
Asp	2,9	$1,08 \pm 0,03$	1325 ± 76
	3,0	$1,08 \pm 0,03$	
	3,2	$1,08 \pm 0,03$	
Lys	2,4	$1,125 \pm 0,006$	69 ± 4
	2,6	$1,078 \pm 0,009$	
	2,9	$1,04 \pm 0,01$	
Asn	2,8	$1,13 \pm 0,04$	120 ± 6
	3,0	$1,13 \pm 0,05$	
	3,2	$1,14 \pm 0,05$	
Tyr	1,43	$1,16 \pm 0,08$	1231 ± 70
	1,46	$1,09 \pm 0,07$	
	1,48	$1,02 \pm 0,06$	
Phe	2,6	$1,2 \pm 0,2$	33 ± 2
	2,8	$1,2 \pm 0,2$	
	3,0	$1,2 \pm 0,2$	
Ser	2,6	$1,12 \pm 0,03$	66 ± 5
	2,8	$1,14 \pm 0,03$	
	3,0	$1,15 \pm 0,03$	
Ala	2,4	$1,1 \pm 0,4$	11 ± 2
	2,8	$1,1 \pm 0,5$	
	3,0	$1,2 \pm 0,6$	

^aNepouzdanosti su iskazane kao standardne devijacije.

Parametar djelotvornosti aditiva je u slučaju svih dodanih AA približno jedan, što ukazuje da se AA vežu na aktivna mjesta rasta prema modelu Kubote i Mullina.¹⁹ Osim toga, udaljenost apsorbiranih AA na površinu je približno jednaka kritičnom promjeru dvodimenzionalnih nukleusa spiralnog rasta na površini kristala, tako da stepenica može nastaviti rasti između adsorbiranih AA, kao što je objašnjeno u Sangwalovom modelu.⁸⁰

Utjecaj odabranih AA na rast kalcita može se relativno kvantificirati prema vrijednostima Langmuirovih konstanti adsorpcije odabranih AA na površinu kalcita. Vrijednosti izračunanih konstanti prikazane su na slici 5.27. te se može uočiti da je najjače djelovanje izazvao dodatak Asp. Ovi rezultati sukladni su s literaturnima.^{16,54,92,93} Uspoređujući prema naboju bočnog ogranka Asn djeluje slabije dok je Lys najslabiji. Može se zaključiti da dodatna vodikova veza jače veže Asn od pozitivnog naboja Lys. Vezanje Asn na

kalcit je u literaturi objašnjeno polarnošću $-\text{CONH}_2$ skupine.¹⁵ Uspoređujući potencijal stvaranja vodikove veze, Tyr i Ser imaju veće vrijednosti konstante te se jače adsorbiraju od Phe i Ala. Adsorpcija Tyr relativno je snažna, što se može objasniti međudjelovanjem fenolnog prstena (π elektrona benzena) i površine kalcita, koji je jako negativan pa ga se može usporediti s Asp. Vezanje je dodatno pojačano jakim hidrofobnim Van der Waalsovima međudjelovanjima zbog hidrofobnosti benzenskog prstena i karbonatne skupine.



Slika 5.27. Vrijednosti Langmuirovih konstanti adsorpcije AA na površinu kalcita dobivenih iz kinetičkih podataka rasta kristala kalcita.

Konstante adsorpcije za odabrane AA rastu u nizu: $\text{Asp} > \text{Tyr} > \text{Asn} > \text{Lys} > \text{Ser} > \text{Phe} > \text{Ala}$. Najveća konstanta adsorpcije iznosi $1325 \text{ dm}^3 \text{mol}^{-1}$ i određena je za Asp. Navedena vrijednost dobro se slaže s vrijednošću iz literature za N-Sal-Asp, koja iznosi $1633 \text{ dm}^3 \text{mol}^{-1}$.²⁰ Viša vrijednost, a time i jače međudjelovanje s površinom kalcita, može se objasniti sinergijskim efektom dviju $-\text{COOH}$ skupina Asp i $-\text{OH}$ skupinom salicilne kiseline.

Aminokiselina Asp je dosta istraživana kako eksperimentalnim metodama tako i računalnim. Pokazano je da se Asp veže na površinu s obje $-\text{COOH}$ skupine.⁵⁴

Rezultati dobiveni analizom kinetike rasta kalcita uz dodatak aminokiselina ukazuju da, ne samo negativno nabijene AA, nego i AA koje stvaraju vodikovu vezu putem bočnoga lanca mogu jako utjecati na rast kalcita.

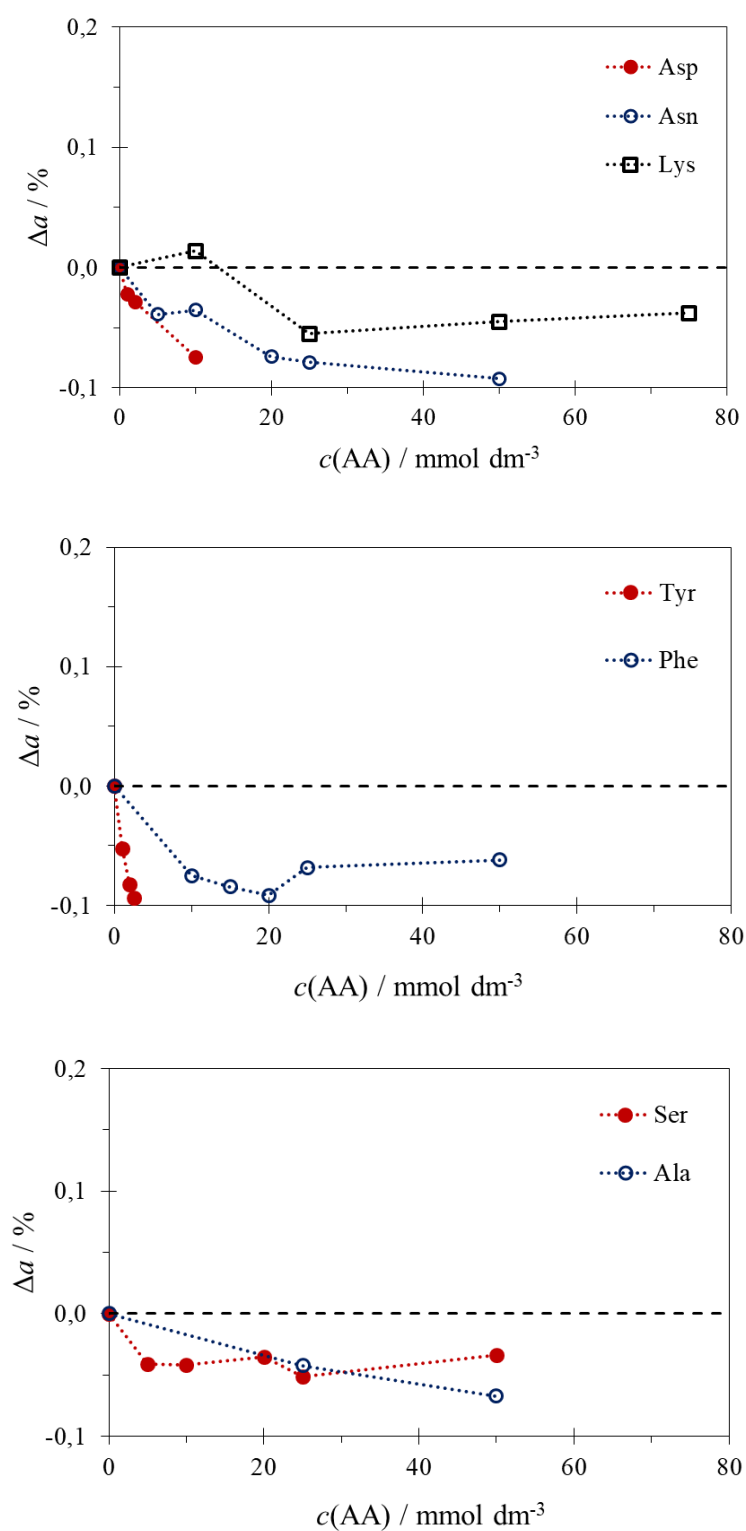
5.4.1.2. PXRD

Distorzija kristalne rešetke izražena je kao relativna promjena parametara kristalne rešetke Δa i Δc , korištenjem metoda opisanih u literaturi.^{40,94} Odabrane AA dodavane su prilikom dodatka kristalnog sjemena tako da su uočene promjene isključivo na sloju kristala koji je narastao za vrijeme eksperimenta. Po tome se rezultati razlikuju od onih dobivenih spontanom taloženjem (poglavlje 5.2.1).

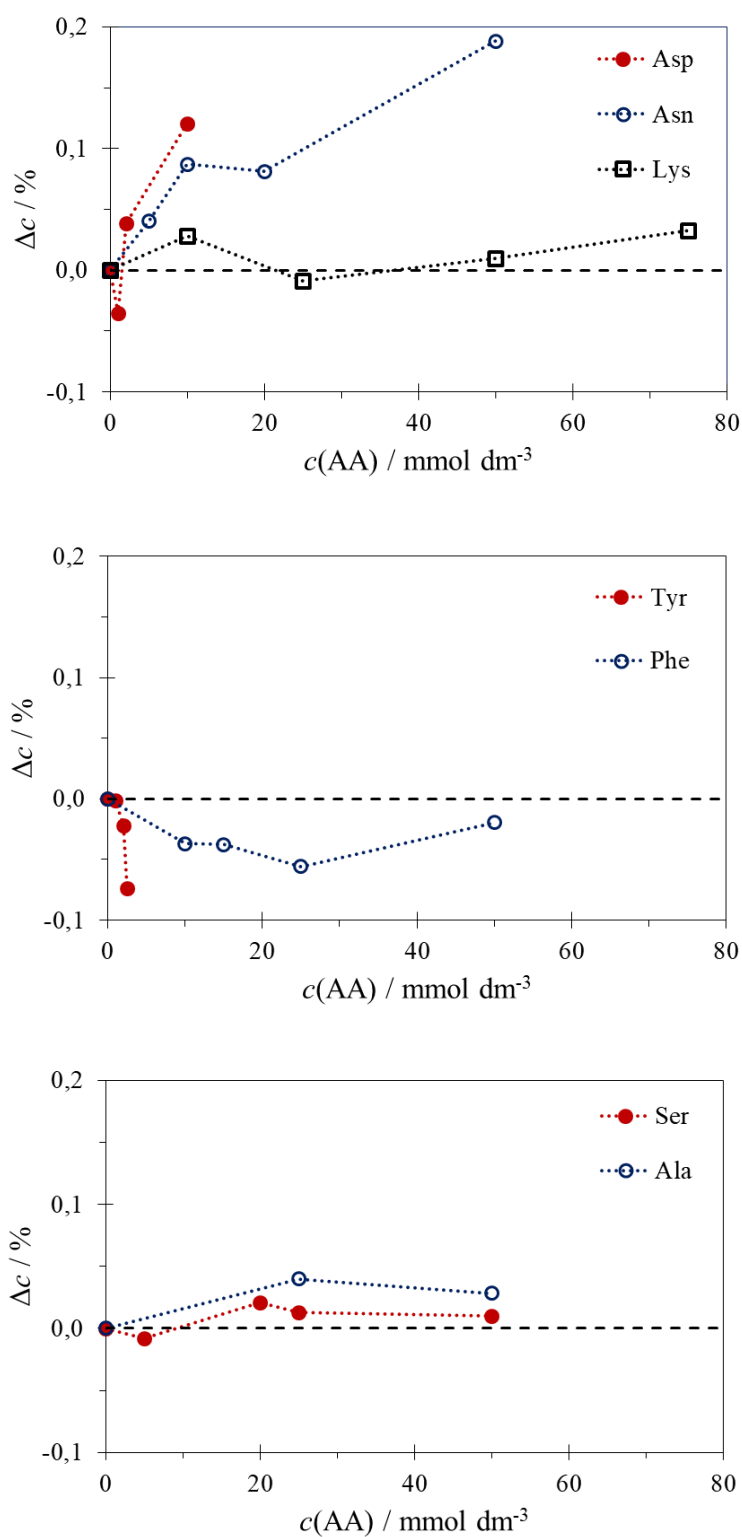
Relativna promjena parametra kristalne rešetke Δa prikazana je kao funkcija koncentracija odabranih AA na slici 5.28. Može se uočiti da dodatak svih AA kontrahira rešetku u smjeru osi a . Uspoređujući AA prema naboju, Asp pri najmanjim koncentracijama značajno smanjuje Δa , pri čemu Asn djeluje slabije, dok je utjecaj Lys najslabiji. Uspoređujući potencijal stvaranja vodikove veze, Tyr i Ser pri nižim koncentracijama značajnije smanjuju Δa za razliku od Phe i Ala.

U slučaju relativne promjene parametra kristalne rešetke u smjeru osi c , Δc , uočen je porast uslijed dodatka AA koje imaju različit naboj bočnog ogranka (slika 5.29). Pri tome, djelovanje AA je slično kao u slučaju promjene Δa : dodatak Tyr smanjuje Δc jače od Phe, dok Ser i Ala djeluju vrlo slabo (slika 5.29). Može se pretpostaviti da je razlog tome što su molekule Ser i Ala puno manje od Tyr i Phe, stoga Ser i Ala ne uzrokuju značajnu distorziju kristalne rešetke, određenu na temelju analize kinetike rasta kalcita.¹⁵

Rezultati su konzistentni s dobivenim vrijednostima Langmuirovih konstanti adsorpcije odabranih AA na površinu kalcita (slika 5.27).



Slika 5.28. Relativne promjene parametra kristalne rešetke Δa za kalcit dobiven rastom kristala pri različitim koncentracijama odabranih aminokiselina u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Referentni sustav bez AA prikazan je crtkanom crnom linijom.

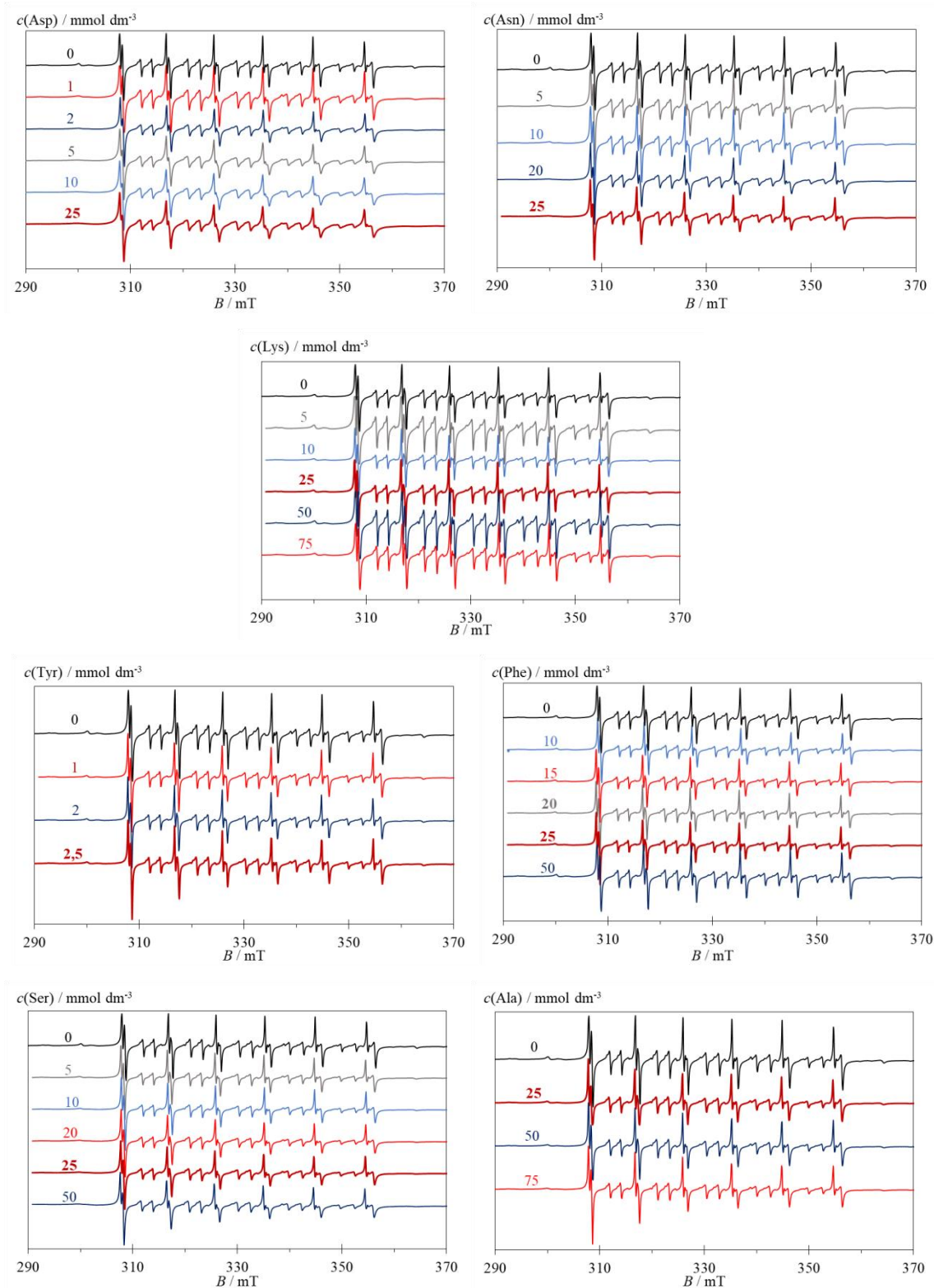


Slika 5.29. Relativne promjene parametra kristalne rešetke Δc za kalcit dobiven rastom kristala pri različitim koncentracijama odabranih aminokiselina u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Referentni sustav bez AA prikazan je crtanom crnom linijom.

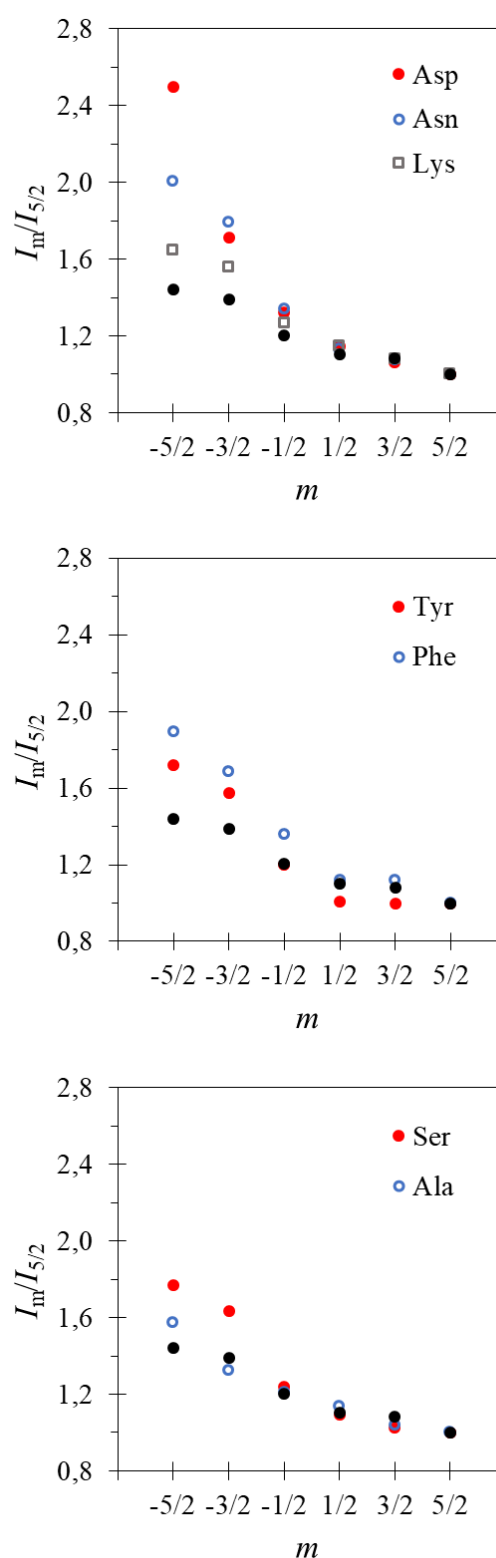
5.4.1.3. EPR spektroskopija

Distorzija kristalne rešetke kalcita dodatno je procijenjena korištenjem EPR spektroskopije. Kao i u slučaju analize korištenjem PXRD-a, proučavan je samo sloj kalcita koji je narastao tokom eksperimenta, što je postignuto s time da je proba Mn^{2+} dodavana u prezasićenu metastabilnu otopinu tijekom rasta na sjemenu. Ioni Mn^{2+} nisu bili prisutni u prethodno pripremljenom kristalnom sjemenu.

Dobiveni EPR spektri prikazani su na slici 5.30. Može se uočiti da se spektri mijenjaju tako da se linije šire u slučaju svih AA, te se efekt povećava povećanjem koncentracije AA. Analizom spektara određeni su intenziteti dozvoljenih prijelaza (I_m) i intenzitet rezonantne linije pri najvećem magnetskom polju ($I_{5/2}$) za odabrane AA pri koncentracijama od 25 mmol dm^{-3} (EPR spektri označeni podebljano crveno na slici 5.30). Jedina iznimka je Tyr, kod kojeg koncentracija od 25 mmol dm^{-3} nije bila korištena, zbog slabe topljivosti pri eksperimentalnom pH te su intenziteti izračunani za spektar pri 2,5 mmol dm^{-3} . Parametar distorzije može se izraziti kao omjer određenih intenziteta.⁹¹ Tako je na slici 5.31 prikazan parametar distorzije kao funkcija koncentracija odabranih AA. Najveća razlika dodatkom odabranih AA može se uočiti kod omjera intenziteta dobivenog pri prijelazu $M_1 = -5/2$. Uspoređujući AA koje posjeduju različit naboj bočnoga lanca, Asp pokazuje najveću distorziju, dok su Asn i Lys slabiji. Uspoređujući prema potencijalu za dodatne vodikove veze Tyr pokazuje manji efekt, no treba uzeti u obzir da je njegova koncentracija 10 puta niža. Slijedom navedenog, može se zaključiti da Tyr uzrokuje veću distorziju. Sukladno uočenom trendu da aminokiseline sa sposobnošću stvaranja dodatne vodikove veze preko bočnoga lanca snažnije međudjeluju s kalcitom, može se primijetiti da Ser uzrokuje jaču distorziju od Ala. Rezultati dobiveni EPR metodom potvrđuju rezultate dobivene PXRD metodom, ali i rezultate Langmuirovih konstanti adsorpcije.



Slika 5.30. EPR spektar Mn^{2+} u kalcitu, dobivenog rastom kristala pri različitim koncentracijama odabranih AA u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25^\circ\text{C}$.



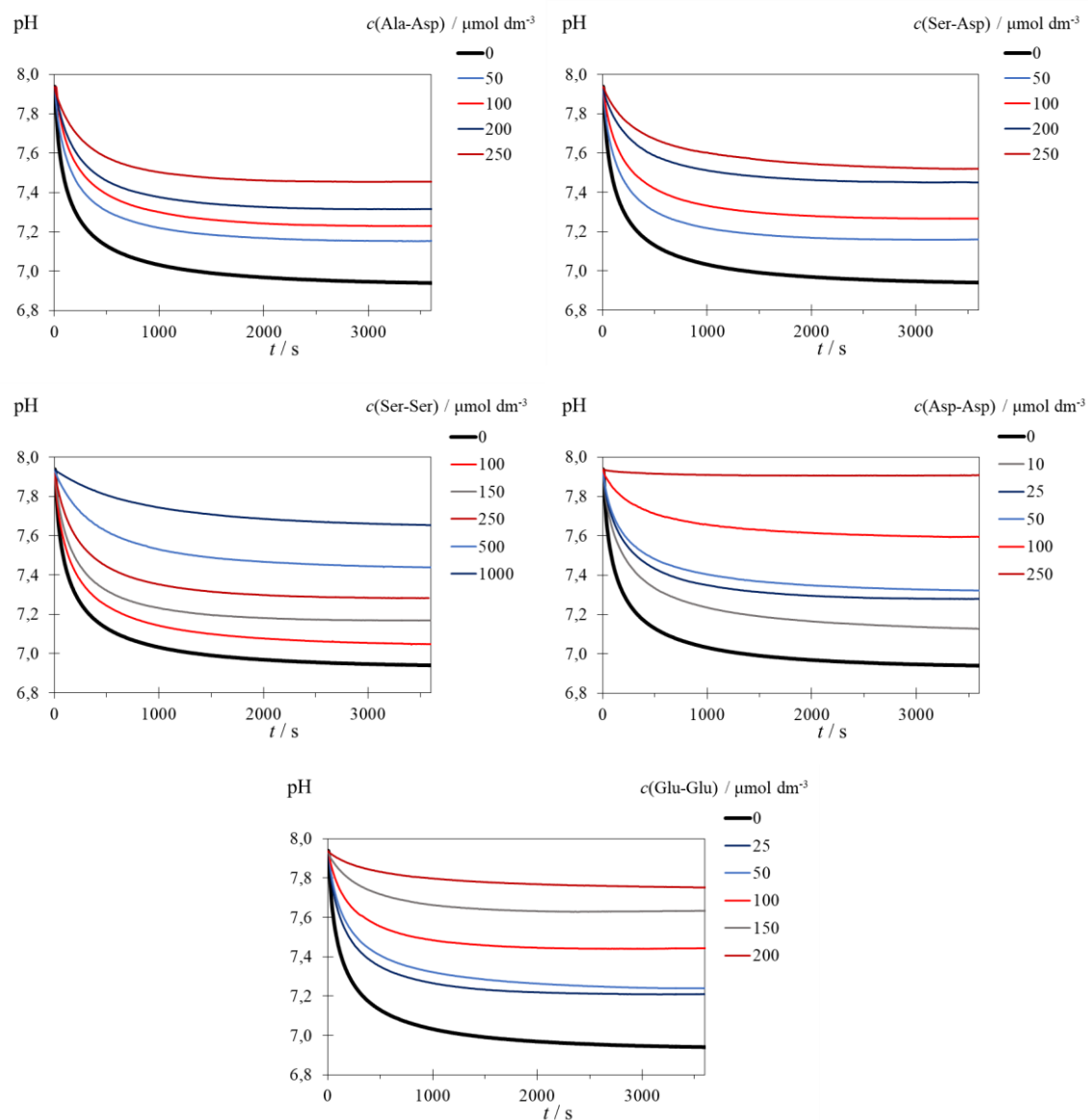
Slika 5.31. Parametar distorzije (D -parametar) definiran kao omjer intenziteta ($I_m/I_{5/2}$) dozvoljenog prijelaza i rezonantne linije pri najvećem polju pri koncentraciji $c(\text{AA}) = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$, osim u slučaju Tyr pri kojem je korištena koncentracija $c = 2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Crne oznake su za talog bez dodatka AA.

5.4.2. Kinetike rasta kalcita uz dodatak dipeptida

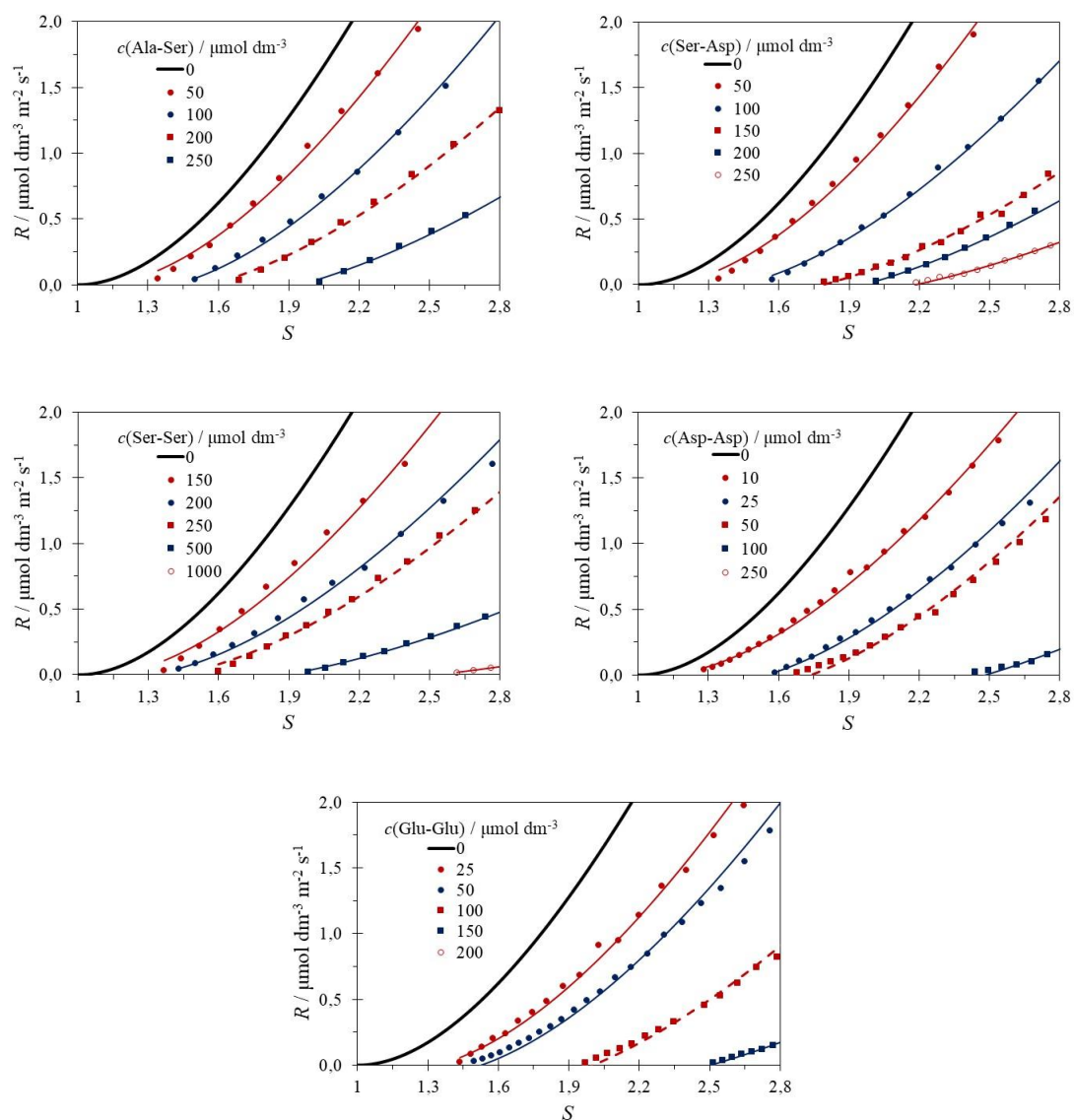
Istraživanje kinetike rasta kristalnog sjemena kalcita provedeno je i rezultati su analizirani uz dodatak odabranih dipeptida, pri istim eksperimentalnim uvjetima kao i uz dodatak AA. Dipeptidi su odabrani na temelju pretpostavke da dvije AA sinergijski djeluju na rast kristala, uslijed zbirnog djelovanja njihovih bočnih lanaca. Zbog toga, odabrani su parovi peptida: Ala-Asp i Ser-Asp, kako bi se proučilo djelovanje –dodatne OH iz Ser. Također, proučavani su dipeptidi s istovrsnim bočnim ogrankom: Ser-Ser, Asp-Asp i Glu-Glu.

Potenciometrijske krivulje rasta kalcita uz prisutstvo različitih koncentracija dipeptida prikazane su na slici 5.32. S obzirom na usporedive koncentracije aditiva, već i kvalitativnim pregledom može se uočiti da dodatak Ser-Asp jače inhibira rast kalcita nego dodatak Ala-Asp. Najsnajnije inhibicijsko djelovanje pokazao je dipeptid Asp-Asp, dok je Glu-Glu nešto slabije djelotvoran. Također je vidljivo da je najslabija inhibicija uočena dodatkom Ser-Ser.

Iz potenciometrijskih krivulja izračunani su brzine reakcija te su izražene kao funkcija prezasićenosti (slika 5.33). Prema Sangwalovom modelu⁸⁰ (j. 56) određene su k_s i S^* za svaku koncentraciju dipeptida. Dobivene vrijednosti su dane u tablici 5.4. Relativne brzine reakcija uz različite koncentracije dipeptida izražene su kao funkcije koncentracije dipeptida (slika 5.34). Daljnjom analizom prema modelu Kubote i Mullina¹⁹ (j. 51) određene su K_{ad} i α za adsorpcije dipeptida na površinu kalcita (tablica 5.5).



Slika 5.32. Potenciometrijske krivulje napredovanja kristalnog rasta kalcita pri različitim koncentracijama dipeptida u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25^\circ\text{C}$.

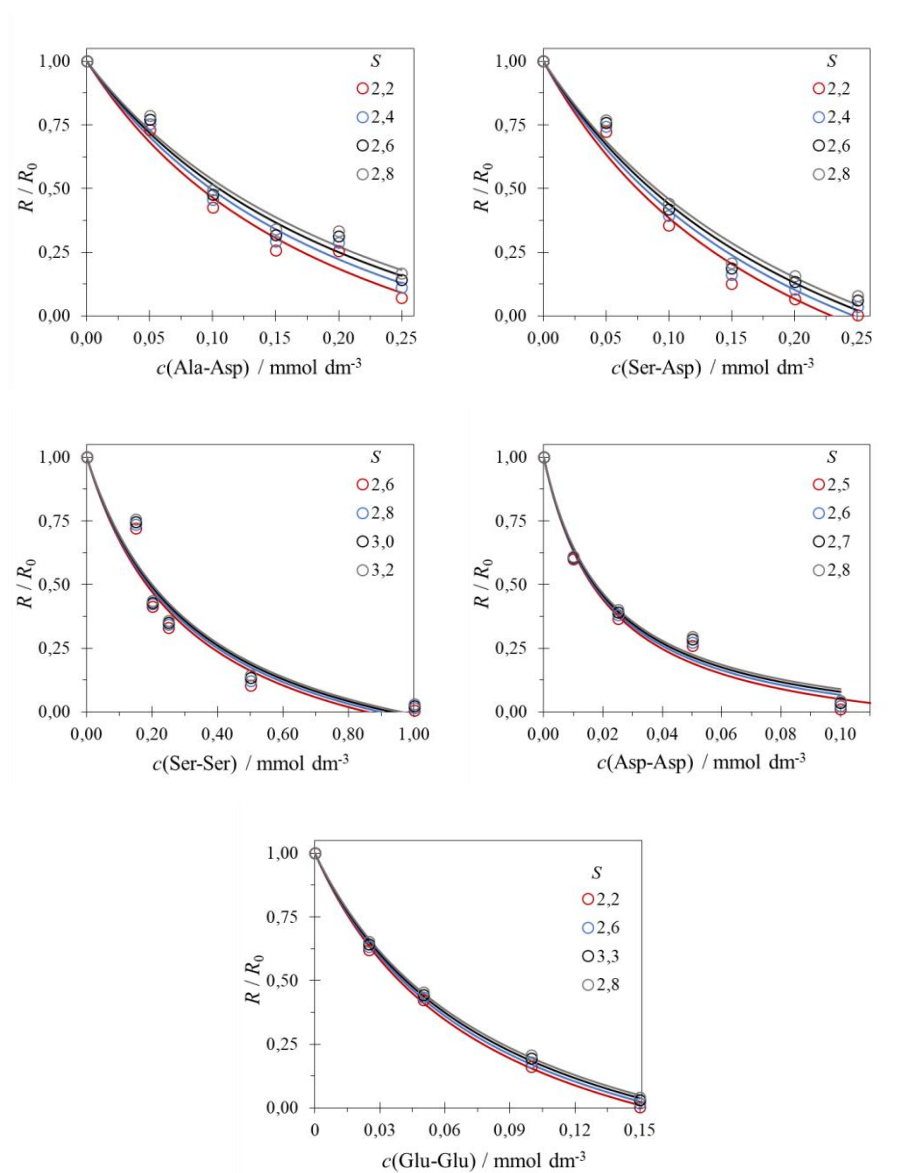


Slika 5.33. Prikaz brzine rasta kristala kalcita izražen kao funkcija prezasićenosti pri različitim koncentracijama dipeptida u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Referentni sustav (bez AA) prikazan je zadebljanom crnom linijom.

Tablica 5.4. Kinetički parametri (kritična prezasićenost S^* i konstanta brzine reakcije k_s) adsorpcije dipeptida na površinu kalcita dobiveni iz podataka rasta kristala kalcita uz različite koncentracije dipeptida.^a

dipeptid	$c(\text{dipeptid}) / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_s / \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	S^*
Ala-Asp	50	$2,13 \pm 0,09$	$1,21 \pm 0,02$
	100	$1,59 \pm 0,08$	$1,38 \pm 0,02$
	150	$1,35 \pm 0,04$	$1,58 \pm 0,01$
	200	$1,30 \pm 0,04$	$1,56 \pm 0,02$
	250	$1,06 \pm 0,03$	$1,96 \pm 0,01$
Ser-Asp	50	$1,76 \pm 0,06$	$1,11 \pm 0,03$
	100	$1,42 \pm 0,03$	$1,44 \pm 0,02$
	150	$1,04 \pm 0,03$	$1,78 \pm 0,02$
	200	$0,10 \pm 0,02$	$1,96 \pm 0,01$
	250	$0,7 \pm 0,02$	$2,18 \pm 0,01$
Ser-Ser	150	$2,0 \pm 0,1$	$1,23 \pm 0,03$
	200	$1,18 \pm 0,05$	$1,23 \pm 0,03$
	250	$1,09 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,02$
	500	$0,72 \pm 0,01$	$1,908 \pm 0,008$
	1000	$0,333 \pm 0,008$	$2,52 \pm 0,01$
Asp-Asp	10	$1,53 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,02$
	25	$1,51 \pm 0,03$	$1,52 \pm 0,01$
	50	$1,29 \pm 0,04$	$1,66 \pm 0,01$
	100	$0,69 \pm 0,04$	$2,41 \pm 0,02$
	250	$0,38 \pm 0,06$	$3,515 \pm 0,005$
Glu-Glu	25	$2,03 \pm 0,09$	$1,35 \pm 0,02$
	50	$1,55 \pm 0,02$	$1,438 \pm 0,007$
	100	$1,29 \pm 0,02$	$1,940 \pm 0,006$
	150	$0,75 \pm 0,01$	$2,475 \pm 0,005$
	200	$0,32 \pm 0,01$	$2,899 \pm 0,004$

^aNepouzdanosti su iskazane kao standardne devijacije.



Slika 5.34. Prikaz relativne brzine rasta kristala kalcita izražen kao funkcija koncentracije dipeptida u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 5.5. Termodinamički parametri adsorpcije (parametar djelotvornosti aditiva α i Langmuirova konstanta adsorpcije K_{ad}) odabranih dipeptida na površinu kalcita dobiveni iz podataka rasta kristala kalcita uz različite koncentracije dipeptida.^a

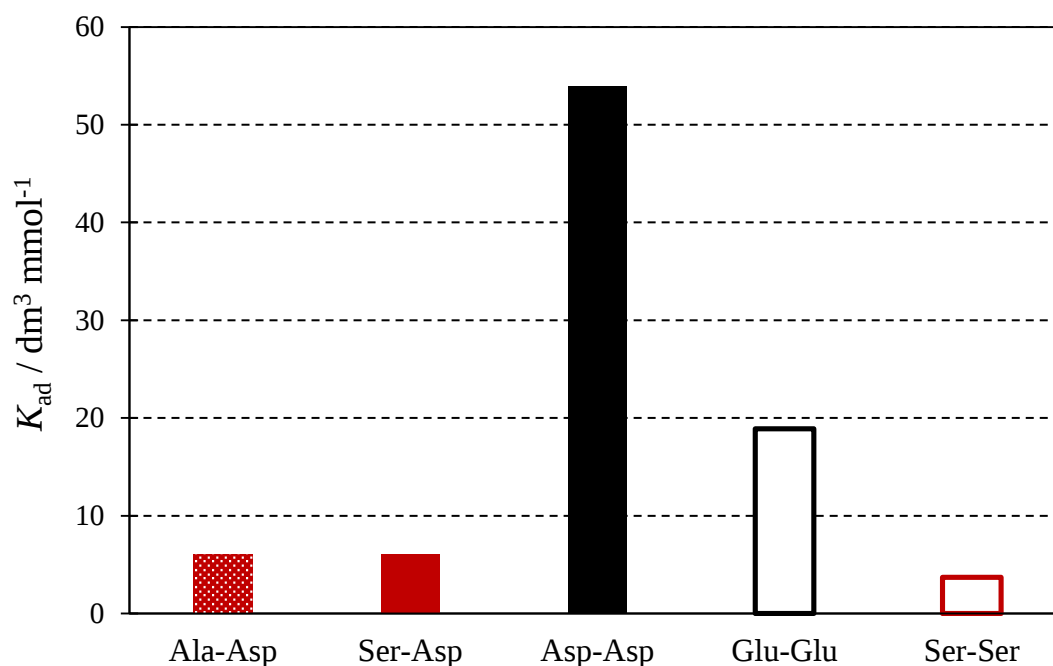
dipeptid	S	α	$K_{ad} / \text{dm}^3 \text{mmol}^{-1}$
Ala-Asp	2,2	$1,7 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,4$
	2,4	$1,7 \pm 0,4$	
	2,6	$1,7 \pm 0,4$	
	2,8	$1,7 \pm 0,4$	
Ser-Asp	2,2	$1,8 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,1$
	2,4	$1,7 \pm 0,3$	
	2,6	$1,7 \pm 0,3$	
	2,8	$1,7 \pm 0,3$	
Ser-Ser	2,6	$1,4 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,1$
	2,8	$1,4 \pm 0,2$	
	3,0	$1,4 \pm 0,2$	
	3,2	$1,4 \pm 0,2$	
Asp-Asp	2,5	$1,14 \pm 0,09$	$54,0 \pm 0,5$
	2,6	$1,13 \pm 0,09$	
	2,7	$1,12 \pm 0,09$	
	2,8	$1,10 \pm 0,09$	
Glu-Glu	2,5	$1,51 \pm 0,04$	$18,9 \pm 0,5$
	2,6	$1,50 \pm 0,04$	
	2,7	$1,50 \pm 0,04$	
	2,8	$1,49 \pm 0,04$	

^aNepouzdanosti su iskazane kao standardne devijacije.

Na slici 5.35 uspoređene su vrijednosti Langmuirove konstante adsorpcije dipeptida na površinu kalcita, određene na temelju kinetičkih mjerenja rasta. Treba skrenuti pažnju na jedinicu prema kojoj je izražena K_{ad} . U usporedbi s AA (slika 5.27), kod kojih je konstanta bila izražena u $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$, u slučaju dipeptida konstante su izražene u $\text{mmol}^{-1} \text{dm}^3$. Dobivene vrijednosti su znatno više od odgovarajućih rezultata za aminokoseline: efekt je približno 1000 puta izraženiji za dipeptide.

Uspoređujući Ala-Asp i Ser-Asp može se uočiti da se Ser-Asp jače adsorbira, što ukazuje da –OH skupina povećava adsorpciju. Sličan sinergijski efekt je uočen i u sustavu Asp derivata salicilne kiseline, opisan u literaturi.²⁰

Rezultati također ukazuju da se od svih dipeptida Asp-Asp najjače adsorbira na površinu kalcita, dok je djelovanje Glu-Glu slabije, što nedvojbeno ukazuje na interakcije dvije –COOH skupine. Međutim, uočeno je snažnije djelovanje Asp-Asp u odnosu na Glu-Glu je objašnjeno dodatnom –CH₂ skupinom bočnog ogranka koji udaljava –COOH skupinu bočnog ogranka od terminalne α-COOH skupine. Dipeptid Ser-Ser najslabije djeluje, što se može objasniti činjenicom da posjeduje samo α-COOH skupine, za razliku od ostalih dipeptida. Sinergijski utjecaj već je uočen u literaturi povećanjem broja karboksilnih skupina⁹⁵ i broja Asp vezanih u peptidni lanac.^{92,96}



Slika 5.35. Langmuirove konstante adsorpcije dipeptida na površinu kalcita.

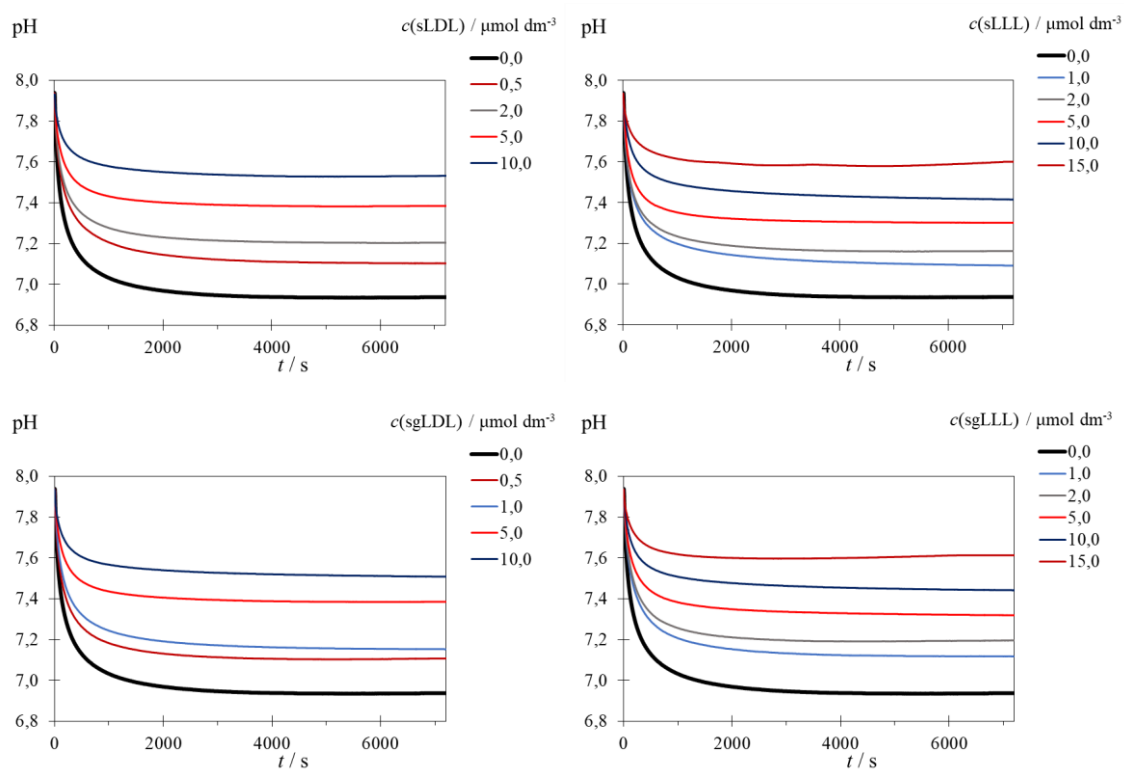
5.4.3. Kinetike rasta kalcita uz dodatak derivata salicilne kiseline

Na temelju rezultata zaključeno je da Asp od svih AA uspostavlja najjače međudjelovanje s površinom kalcita. Povećanjem broja Asp povećava se i međudjelovanje. Zbog toga je razmatrana mogućnost korištenja asparaginske kiseline za modifikaciju potencijalnih farmaceutskih proizvoda koji bi se koristili kao modeli kontrolirane isporuke lijeka. Pri tome, odabrani su tripeptidi Asp za vezanja salicilne kiseline kao lijeka na površinu kalcita. Pripravljeno je sedam derivata salicilne kiseline, kojima je testirana njihova djelotvornost s obzirom na različitu kiralnost i fleksibilnost lanca. Derivatima salicilne kiseline s tripeptidima različite kiralnosti mijenjan je kiralnost srednje Asp. Na taj je način postignuto da su u slučaju L-Asp-D-Asp-L-Asp epimera sve tri $-\text{COOH}$ skupine bočnih lanaca s iste strane peptidne okosnice, dok je kod L-Asp-L-Asp-L-Asp $-\text{COOH}$ skupina srednje Asp s druge strane peptidne okosnice. Također su korišteni i derivati s Gly kao poveznicom između salicilne kiseline i tripeptida, ali i derivati bez Gly.

Fleksibilnost je istražena tako da su pripremljeni spojevi s produljenjom poveznicom: molekuli Gly je dodavane $-\text{CH}_2$ skupine između $-\text{NH}_2$ skupine i $-\text{COOH}$. Tako je poveznica s dvije $-\text{CH}_2$ skupine nazvana β -Gly, s tri γ -Gly, a s četiri δ -Gly, dok su odgovarajući Sal-derivati označeni kraticama sbgLDL, sggLDL i sdgLDL. Da bi se uočio samo utjecaj fleksibilnosti, a ne i kiralnosti, odabran je tripeptid L-Asp-D-Asp-L-Asp za sve derivate s različitim poveznicama. Sukladno literaturnim podacima L-Asp-D-Asp-L-Asp trebao bi iskazati jače međudjelovanje s površinom kalcita.⁵²

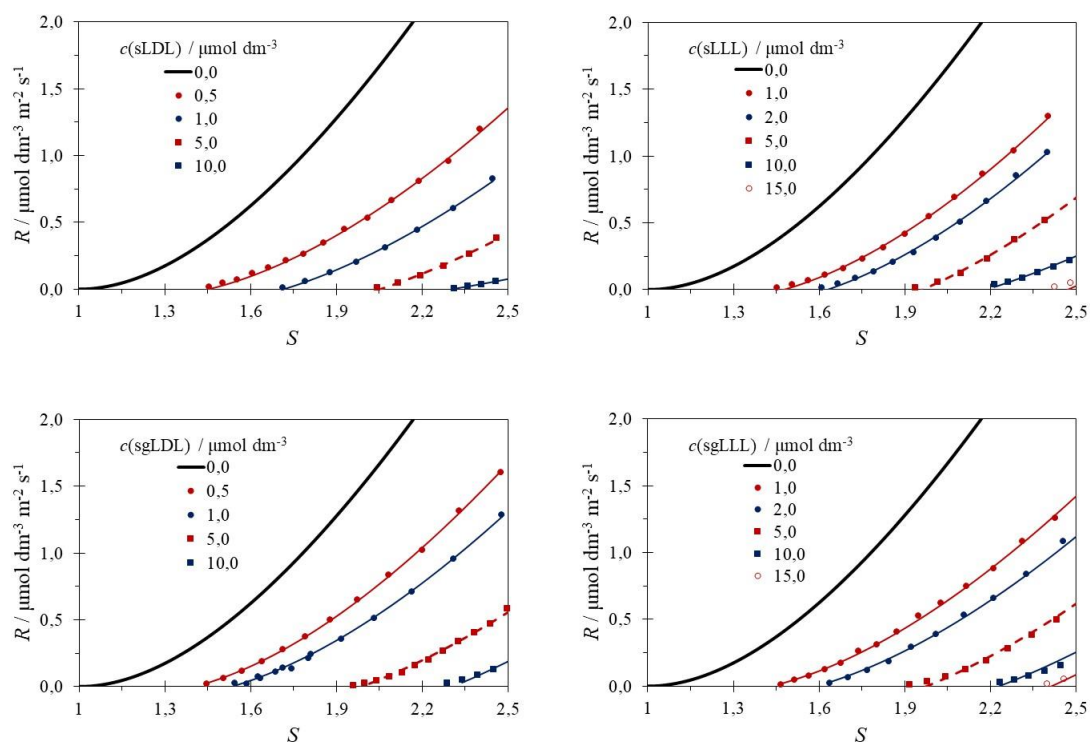
5.4.3.1. Kiralnost

Utjecaj kiralnost ispitan je promjenom kiralnosti srednje Asp tripeptida (LDL i LLL), ali i s Gly poveznicom (sgLDL i sgLLL) i bez (sLDL i sLLL). Razlika djelovanja istraženih Sal-derivata nije toliko izražena kao kod AA i dipeptida, kao što se može procijeniti na temelju kinetičkih krivulja rasta (slika 5.36). Međutim, može se uočiti da Sal-derivati s LLL tripeptidom slabije inhibiraju rast kalcita od derivata s LDL tripeptidom.



Slika 5.36. Potenciometrijske krivulje napredovanja rasta kristala kalcita pri različitim koncentracijama salicilnih derivata različite kiralnosti u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Određene su brzine reakcije uz dodatak različitih koncentracija Sal-derivata, te su prikazane kao funkcija prezasićenosti na slici 5.37. Izračunane su vrijednosti k_s i S^* prema modelu Sangwala⁸⁰ (j. 56) te su prikazane u tablici 5.6.



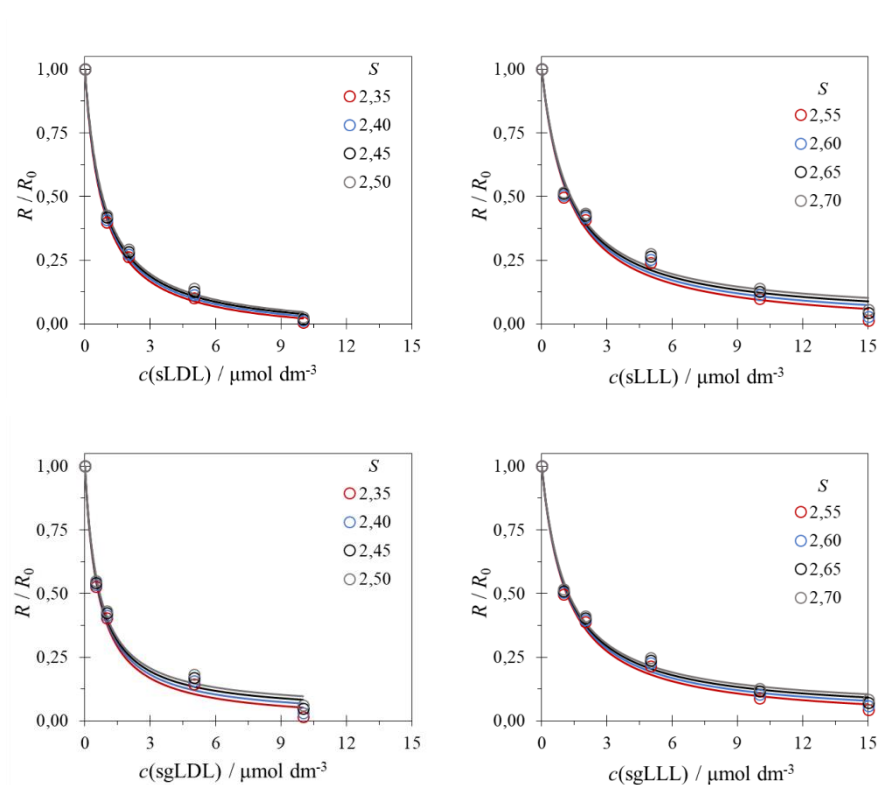
Slika 5.37. Prikaz brzine rasta kristala kalcita pri različitim koncentracijama salicilnih derivata različitih kiralnosti izražen kao funkcija prezasićenosti u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Referentni sustav (bez AA) prikazan je zadebljanom crnom linijom.

Tablica 5.6. Kinetički parametri (kritična prezasićenost S^* i konstanta brzine reakcije k_s) adsorpcije Sal-derivata na površinu kalcita dobiveni iz podataka rasta kristala kalcita uz različite koncentracije Sal-derivata različitih kiralnosti.^a

Sal-derivat	$c(\text{Sal-derivat}) / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_s / \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	S^*
sLDL	1,0	$1,84 \pm 0,05$	$1,56 \pm 0,01$
	2,0	$1,57 \pm 0,03$	$1,716 \pm 0,009$
	5,0	$1,46 \pm 0,06$	$2,06 \pm 0,01$
	10,0	$0,62 \pm 0,05$	$2,30 \pm 0,01$
sLLL	1,0	$1,88 \pm 0,03$	$1,477 \pm 0,009$
	2,0	$1,89 \pm 0,04$	$1,63 \pm 0,01$
	5,0	$1,88 \pm 0,08$	$1,96 \pm 0,01$
	10,0	$1,80 \pm 0,05$	$2,28 \pm 0,01$
	15,0	$1,7 \pm 0,1$	$2,51 \pm 0,02$
sgLDL	0,5	$1,93 \pm 0,02$	$1,403 \pm 0,007$
	1,0	$1,79 \pm 0,02$	$1,533 \pm 0,007$
	5,0	$1,63 \pm 0,06$	$1,99 \pm 0,01$
	10,0	$1,56 \pm 0,07$	$2,31 \pm 0,01$
sgLLL	1,0	$1,82 \pm 0,04$	$1,449 \pm 0,007$
	2,0	$1,76 \pm 0,02$	$1,616 \pm 0,006$
	5,0	$1,75 \pm 0,04$	$1,97 \pm 0,01$
	10,0	$1,65 \pm 0,05$	$2,28 \pm 0,01$
	15,0	$1,64 \pm 0,07$	$2,42 \pm 0,01$

^aNepouzdanosti su iskazane kao standardne devijacije.

Na slici 5.38 prikazane su relativne brzine reakcije kao funkcije koncentracije Sal-derivata odabrane prema kiralnosti. Analizom podataka prema Kuboti i Mullinu¹⁹ (j. 51) određene su Langmuirove konstante adsorpcije Sal-derivata, raličitih kiralnosti, na površinu kalcita (tablica 5.7).



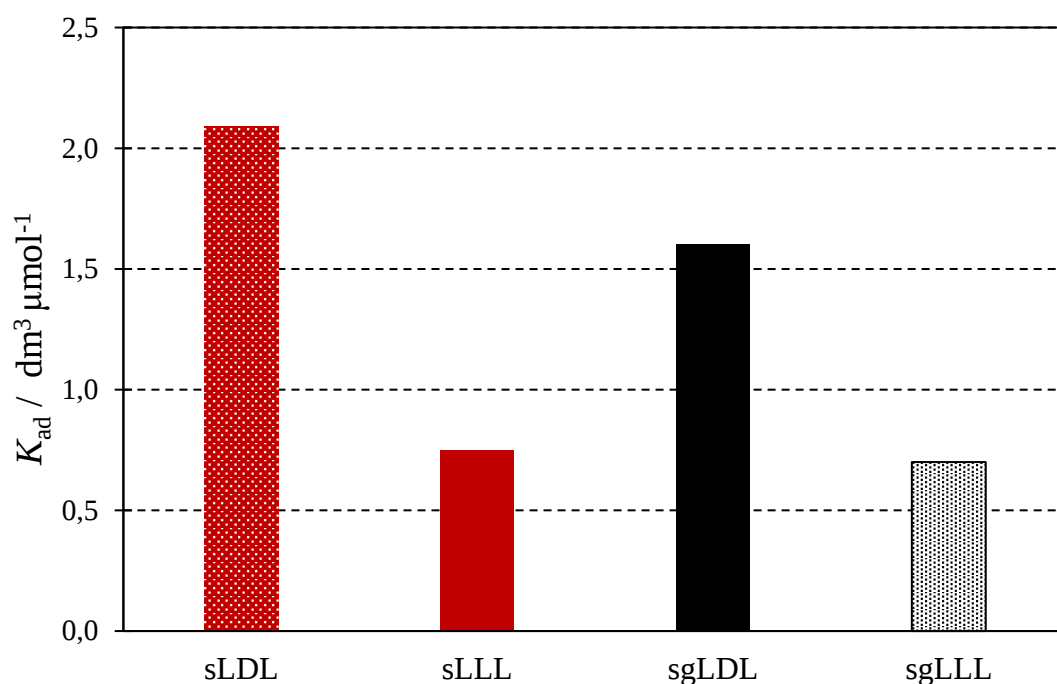
Slika 5.38. Prikaz relativne brzine rasta kristala kalcita izražen kao funkcija koncentracije salicilnih derivata različitih kiralnosti u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 5.7. Termodinamički parametri adsorpcije (parametar djelotvornosti aditiva α i Langmuirova konstanta adsorpcije K_{ad}) Sal-derivata na površinu kalcita dobiveni iz podataka rasta kristala kalcita uz različite koncentracije Sal-derivata različitih kiralnosti.^a

Sal-derivat	S	α	$K_{ad} / \text{dm}^3 \mu\text{mol}^{-1}$
sLDL	2,35	$1,06 \pm 0,02$	$1,20 \pm 0,04$
	2,40	$1,05 \pm 0,02$	
	2,45	$1,04 \pm 0,02$	
	2,50	$1,04 \pm 0,03$	
sLLL	2,55	$1,02 \pm 0,05$	$0,785 \pm 0,003$
	2,60	$1,00 \pm 0,05$	
	2,65	$0,99 \pm 0,05$	
	2,70	$0,97 \pm 0,04$	
sgLDL	2,35	$1,01 \pm 0,04$	$1,5853 \pm 0,0007$
	2,40	$0,99 \pm 0,03$	
	2,45	$0,97 \pm 0,03$	
	2,50	$0,96 \pm 0,03$	
sgLLL	2,55	$1,01 \pm 0,03$	$0,869 \pm 0,005$
	2,60	$0,99 \pm 0,03$	
	2,65	$0,97 \pm 0,03$	
	2,70	$0,96 \pm 0,03$	

^a Nepouzdanosti su iskazane kao standardne devijacije.

Vrijednosti izračunatih konstanti, koje su prikazane na slici 5.39, ukazuju da je adsorpcija Sal-derivata za tri reda veličine snažnija od adsorpcije odgovarajućih dipeptida, a 6 redova veličine od AA. U oba slučaja su epimeri s LDL Asp tripeptidom pokazali veću sposobnost za adsorpcije od LLL Asp tripeptida.

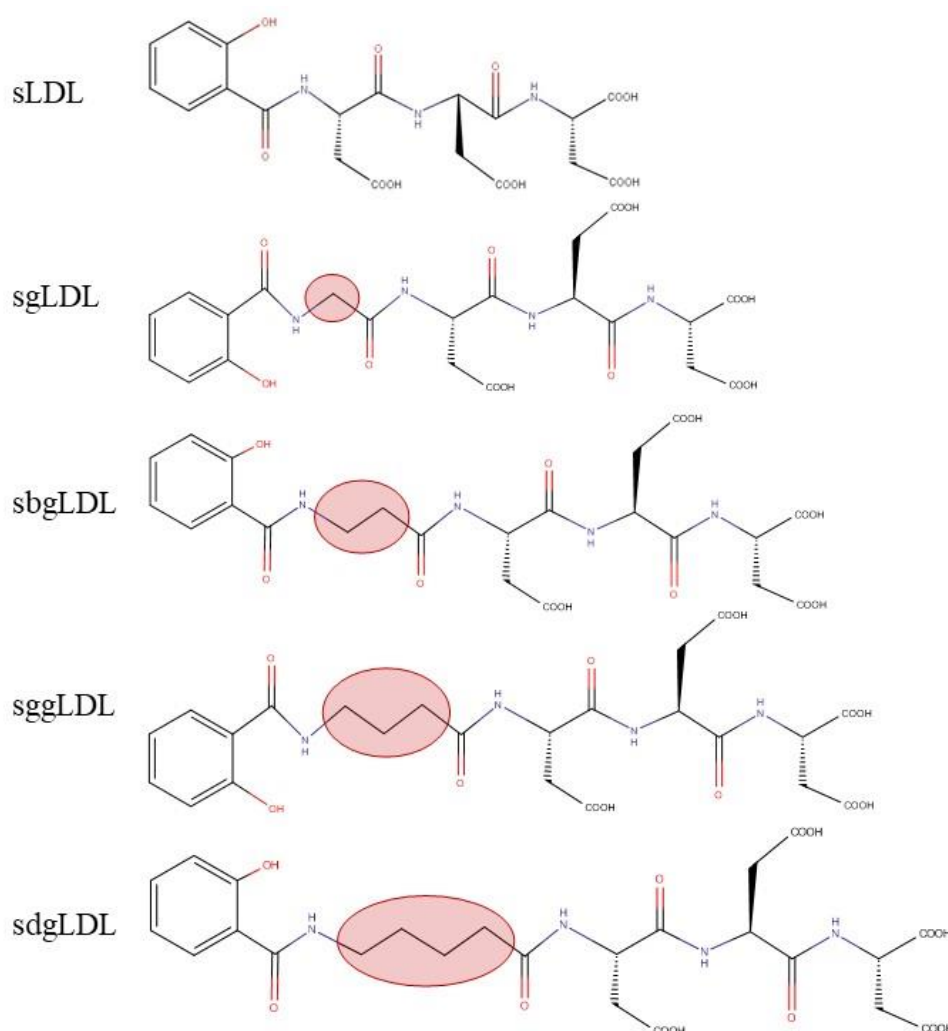


Slika 5.39. Langmuirove konstante adsorpcije derivata salicilne kiseline različitih kiralnosti na površinu kalcita.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da intenzitet međudjelovanja Sal-derivata s površinom kalcita jako ovisi o kiralnosti tripeptida te da je najveći efekt kod molekula kod kojih su sve tri $-\text{COOH}$ skupine na istoj strani peptidnog lanca. Također, pokazalo se i da poveznica, u ovom slučaju Gly, smanjuje adsorpciju. Dobiveni rezultati mogu se usporediti s rezultatima molekulskog modeliranja međudjelovanja⁵² *R*-Sal (sLDL) i *S*-Sal (sLLL). Sukladno tim rezultatima (slika 2.10), sLDL se veže na površinu kalcita sa sve 4 $-\text{COOH}$ skupine, dok se sLLL veže s tri $-\text{COOH}$ dok je $-\text{COOH}$ skupina Asp kiseline najbliže poveznici i salicilnoj kiselini udaljenija od površine.

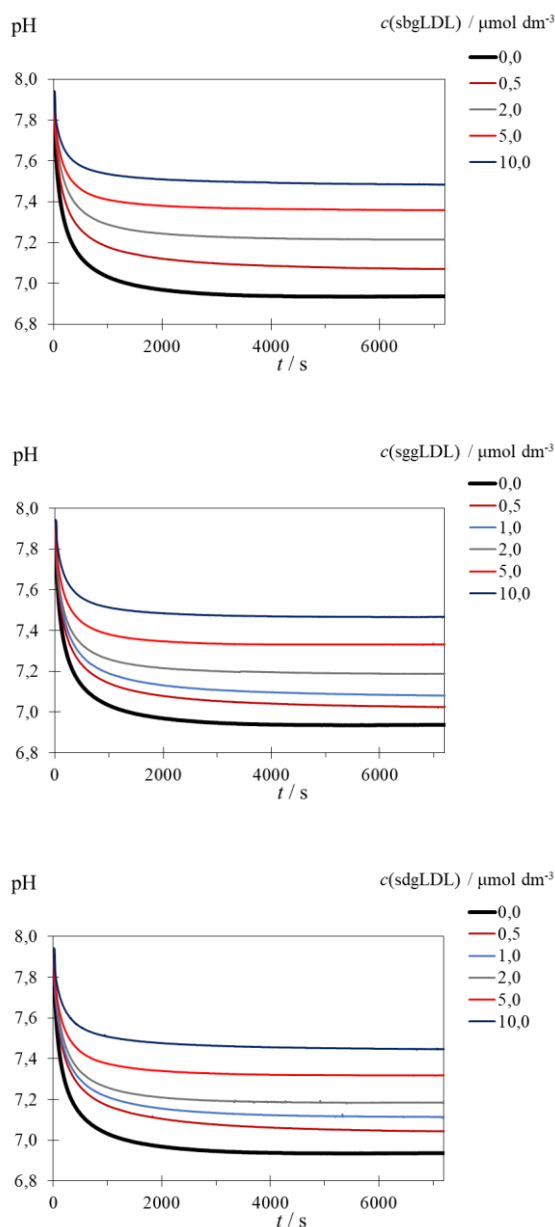
5.4.3.2. *Fleksibilnost lanca*

Utjecaj fleksibilnosti Sal-derivata istražen je na molekulama kojima je mijenjana duljina poveznice između salicilne kiseline i Asp tripeptida. Na slici 5.40 shematski su prikazane pripravljene molekule, pri čemu je osnovna jedinica poveznice Gly, kojoj su dodavane $-\text{CH}_2$ skupina. Povećavanje poveznice omogućuje peptidnom lancu da se savija, što može utjecati na međudjelovanje salicilne kiseline s površinom.



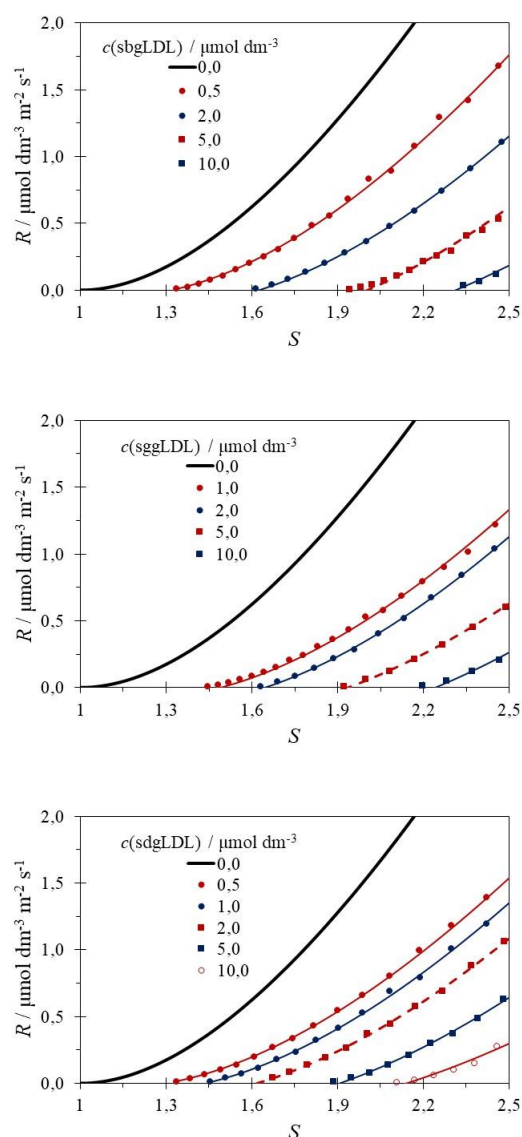
Slika 5.40. Shematski prikaz molekula kojima je produživana poveznica između Asp tripeptida i salicilne kiseline s čime se mijenja i fleksibilnost lanca.

Iz potenciometrijskih krivulja (slika 5.41) ne može se vidjeti značajna razlika adsorpcije uzrokovane povećanjem fleksibilnost lanca Sal-derivata. Određene su brzine rasta kalcita, uz dodatak različitih koncentracija odgovarajućih derivata.



Slika 5.41. Potenciometrijske krivulje napredovanja rasta kristala kalcita pri različitim koncentracijama sbgLDL, sggLDL i sdgLDL u uvjetima $c_i(\text{Ca}) = c_i(\text{CO}_3) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na slici 5.42 prikazane su brzine rasta izražene kao funkcije prezasićenosti. Analizom dobivenih rezultata prema Sangwalovom modelu⁸⁰ određene su odgovarajuće vrijednosti k_s i S^* , koje su prikazane u tablici 5.8.



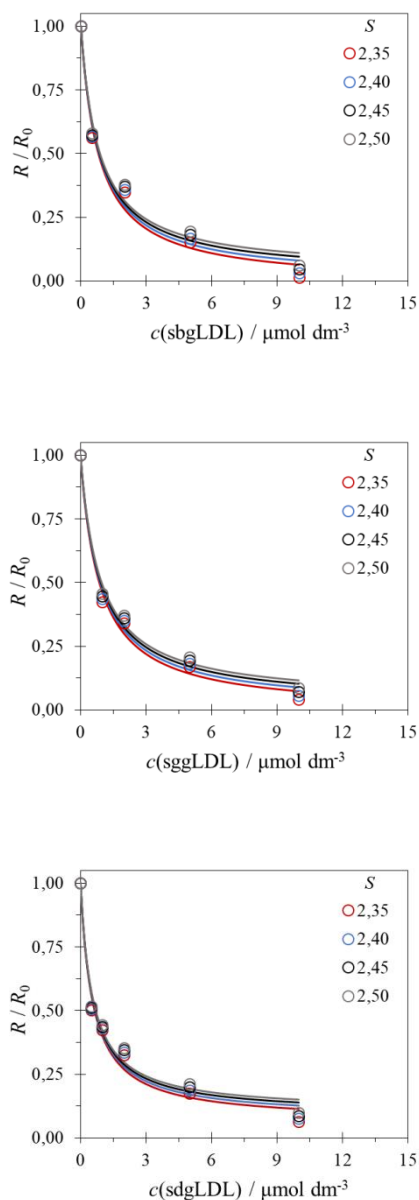
Slika 5.42. Prikaz brzine rasta kristala kalcita pri različitim koncentracijama Sal-derivata različitih fleksibilnosti lanca izražen kao funkcija prezasićenosti u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Referentni sustav (bez AA) prikazan je zadebljanom crnom linijom.

Tablica 5.8. Kinetički parametri (kritična prezasićenost S^* i konstanta brzine reakcije k_s) adsorpcije Sal-derivata na površinu kalcita dobiveni iz podataka rasta kristala kalcita uz različite koncentracije Sal-derivata različitih fleksibilnosti lanca.^a

Sal-derivat	$c(\text{Sal-derivat}) \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_s / \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	S^*
sbgLDL	0,5	$1,83 \pm 0,03$	$1,32 \pm 0,01$
	2,0	$1,78 \pm 0,01$	$1,62 \pm 0,01$
	5,0	$1,68 \pm 0,05$	$1,98 \pm 0,01$
	10,0	$1,59 \pm 0,07$	$2,31 \pm 0,02$
sggLDL	1,0	$2,0 \pm 0,1$	$1,58 \pm 0,04$
	2,0	$1,80 \pm 0,02$	$1,64 \pm 0,06$
	5,0	$1,63 \pm 0,03$	$1,933 \pm 0,008$
	10,0	$1,61 \pm 0,06$	$2,24 \pm 0,02$
sdgLDL	0,5	$1,64 \pm 0,02$	$1,316 \pm 0,005$
	1,0	$1,62 \pm 0,02$	$1,437 \pm 0,009$
	2,0	$1,63 \pm 0,02$	$1,611 \pm 0,06$
	5,0	$1,58 \pm 0,04$	$1,907 \pm 0,009$
	10,0	$1,28 \pm 0,08$	$2,14 \pm 0,02$

^aNepouzdanosti su iskazane kao standardne devijacije.

Prema dobivenim kinetičkim parametrima određene su relativne brzine rasta uz prisustvu Sal-derivata različitih fleksibilnosti lanca i prikazane kao funkcije koncentracije Sal-derivata (slika 5.43). Prema Kuboti i Mullinu¹⁹ određene su termodinamički parametri inhibicije rasta (tablica 5.9).



Slika 5.43. Prikaz relativne brzine rasta kristala kalcita izražen kao funkcija koncentracije Sal-derivata različitih fleksibilnosti lanca u uvjetima $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH}_i = 7,9$ i $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

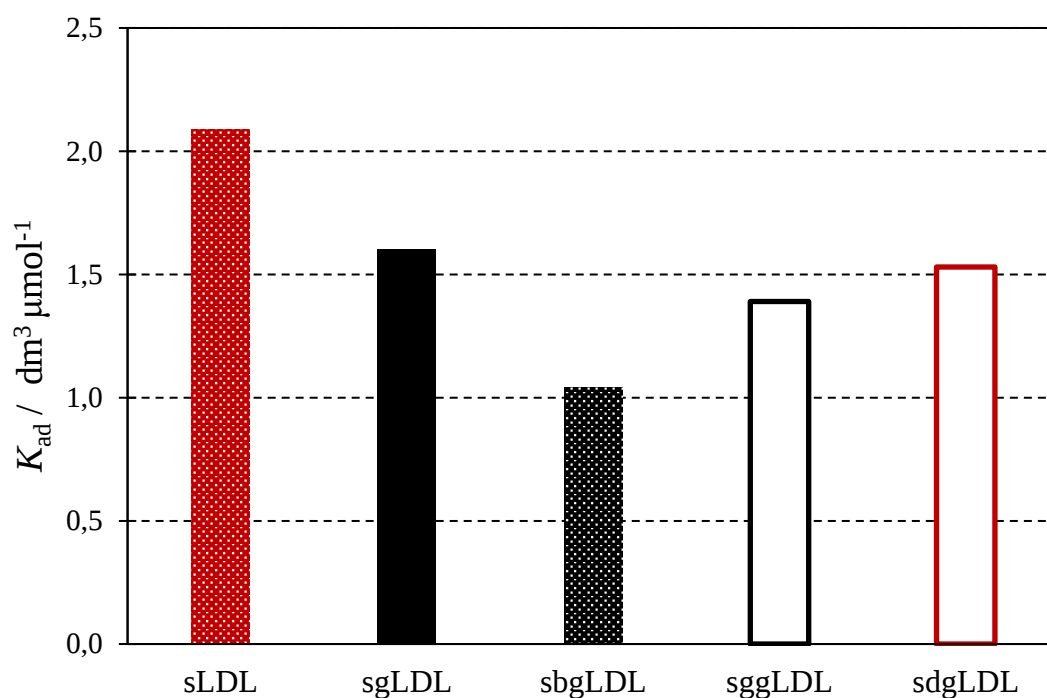
Tablica 5.9. Termodinamički parametri adsorpcije (parametar djelotvornosti aditiva α i Langmuirova konstanta adsorpcije K_{ad}) Sal-derivata na površinu kalcita dobiveni iz podataka rasta kristala kalcita uz različite koncentracije Sal-derivata različitih fleksibilnosti lanca.^a

Sal-derivat	S	α	$K_{ad} / \text{dm}^3 \mu\text{mol}^{-1}$
sbgLDL	2,35	$1,01 \pm 0,06$	$1,226 \pm 0,008$
	2,40	$0,99 \pm 0,06$	
	2,45	$0,98 \pm 0,06$	
	2,50	$0,96 \pm 0,06$	
sggLDL	2,35	$1,01 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,01$
	2,40	$0,99 \pm 0,05$	
	2,45	$0,97 \pm 0,04$	
	2,50	$0,96 \pm 0,04$	
sdgLDL	2,35	$0,93 \pm 0,05$	$1,80 \pm 0,01$
	2,40	$0,92 \pm 0,05$	
	2,45	$0,91 \pm 0,05$	
	2,50	$0,90 \pm 0,05$	

^aNepouzdanosti su iskazane kao standardne devijacije.

U cilju usporedbe efekta fleksibilnosti molekule na njena adsorpcijska svojstva, na slici 5.44 prikazani su i rezultati Sal-derivati s istom kiralnošću tripeptida (LDL). Vidljivo je da se povećanjem fleksibilnosti smanjuje adsorpcija do poveznice β -Gly, kojoj odgovara najniža vrijednost K_{ad} , nakon koje adsorpcija raste. Zanimljivo je da se adsorpcija ne mijenja linearno s promjenom poveznice.

Sukladno objavljenim rezultatima molekulskog modeliranja interakcija Sal derivata sgLDL, u literaturi naznačenog kao *R*-Sal (slika 2.10)⁵² tripeptid međudjeluje s površinom kalcita preko sve 4 $-\text{COOH}$ skupine, a salicilna kiseline ne sudjeluje u međudjelovanju. Dodatkom više od dvije $-\text{CH}_2$ skupine (sggLDL i sdgLDL) može doći do svijanja peptidnog lanca, pa salicilni prsten može pridonijeti međudjelovanju Sal-derivata s površinom kalcita.



Slika 5.44. Langmuirove konstante adsorpcije derivata salicilne kiseline različitih fleksibilnosti lanca na površinu kalcita.

5.5. Sinteza biokompozitnih materijala kalcita i gelatora male molekulske mase

Sinteza biokompozitnih materijala kalcita i hidrogela omogućena je svojstvima gelatora male molekulske mase (LMWG). Gelator se otapa u lužnatim uvjetima, a gelira spuštanjem pH što je povezano s taloženjem CaCO_3 . Ispitan je utjecaj masenog udjela gelatora na taloženje, ali i koncentracije konstitucijskih iona, što je prikazano u tablici 5.10. Da bi se to lakše pratilo uvedene su oznake za kompozite, tablica 5.10.

Tablica 5.10. Uvjeti sinteze kompozitnih materijala CaCO_3 i LMWG

oznaka	$c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} / \text{mmol dm}^{-3}$	$c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} / \text{mmol dm}^{-3}$	w(gelator) / %
A	-	20	1,0
B	10	10	1,0
C	20	20	0,5
D	50	100	0,5
E	20	20	1,0
F	50	100	1,0
G	100	100	1,0

Kao referentni sustav (hidrogel A) pripremljen je hidrogel bez dodatka CO_3^{2-} , umjesto kojeg je dodan NaOH da bi se gelator otopio. Dodatak Ca^{2+} iona tvori netopljivu sol gelatora koji se organizira u vlakna pri pH blizu fiziološkom (pH = 8).

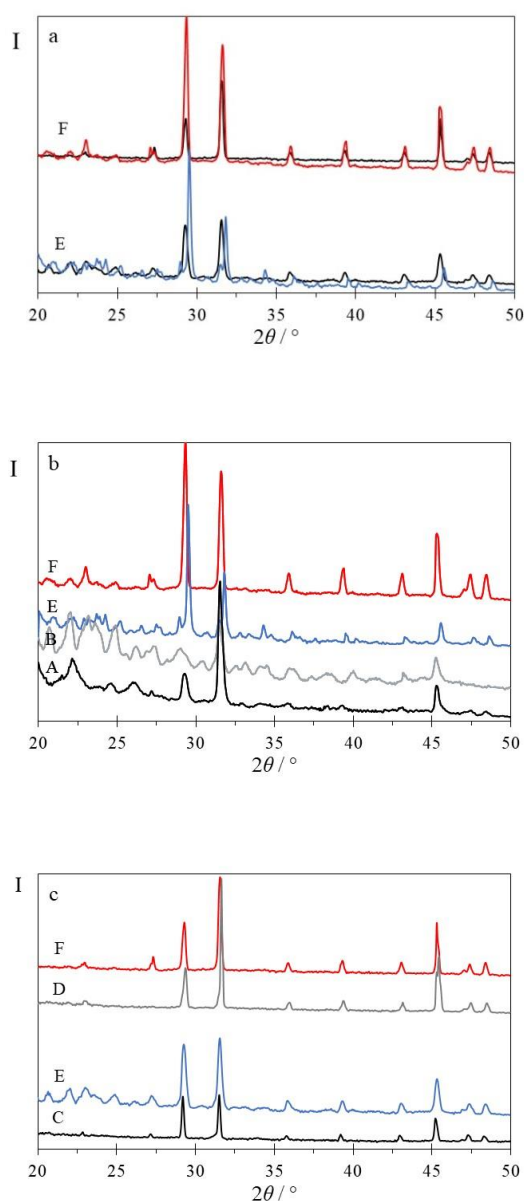
U svim ispitanim slučajevima nastao je bijeli hidrogel, osim u slučaju najviše koncentracije CaCl_2 i Na_2CO_3 , što bi se moglo objasniti naglim nastajanjem CaCO_3 , što uzrokuje nedostatak dostupnog Ca^{2+} nužnog za nastajanje hidrogela (slika 5.45). Pri najnižoj

koncentraciji Ca^{2+} i CO_3^{2-} (kompozit B) dobiven je hidrogel, ali ne i kalcit, na što ukazuje izostanak difrakcijske linije na $29^\circ / 2\theta$ (slika 5.46b).



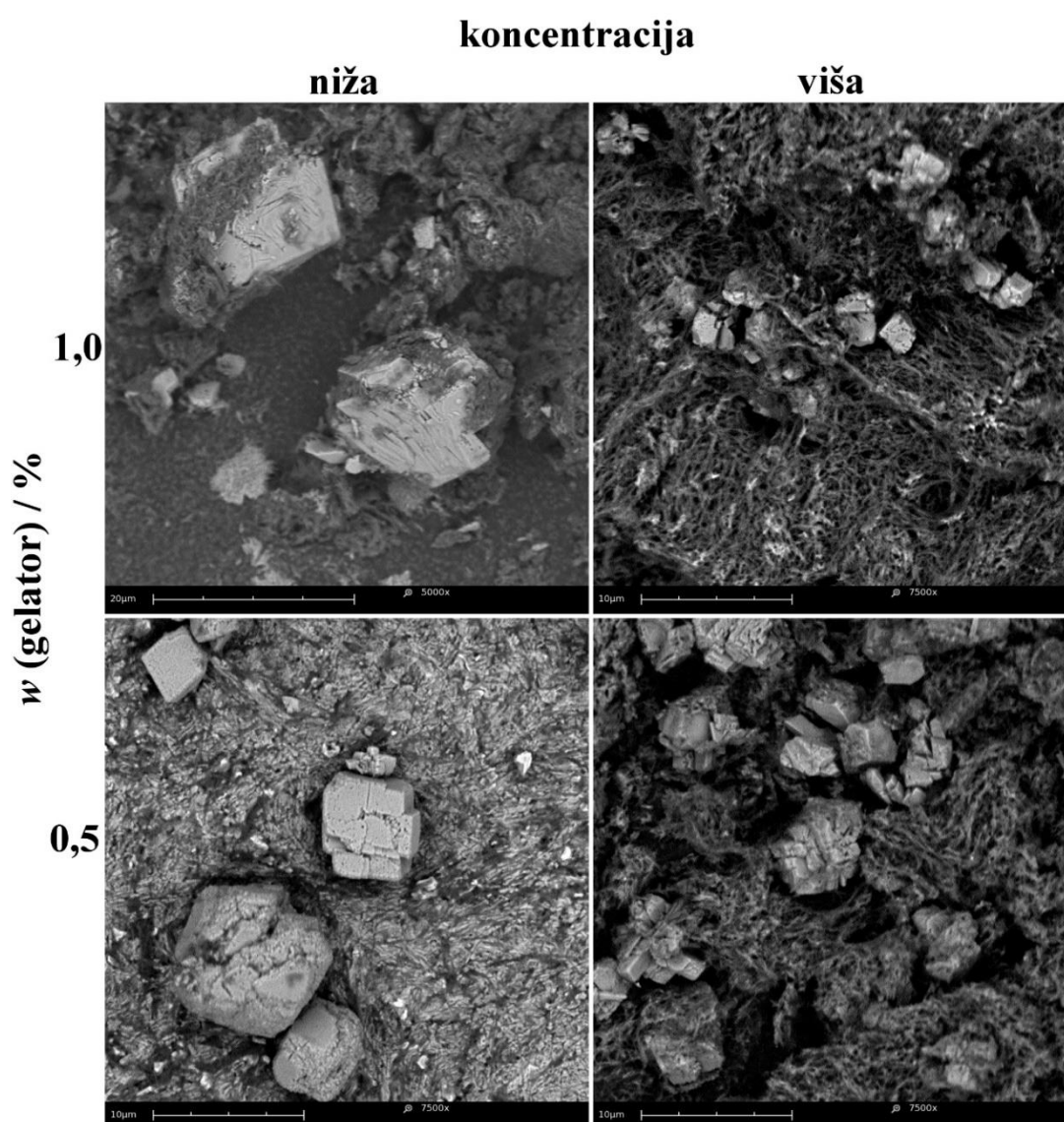
Slika 5.45. Fotografije kompozitnih materijala CaCO_3 i LMWG pri različitim masenim udjelima gelatora, te $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}}$ i $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}}$ prema oznakama u tablici 5.10.

Reproducibilnost je ispitana ponavljanjem eksperimenta s 1,0 % gelatora i pri višoj i nižoj koncentraciji Ca^{2+} i CO_3^{2-} (E i F) Na slici 5.46a može se vidjeti da je u svim sustavima nastao kalcit i da se difraktogrami u oba slučaja preklapaju pri čemu se može zaključiti da je sinteza kompozita reproducibilna. Usporedbom odgovarajućih difraktograma sustava u kojima je rasla koncentracija Ca^{2+} i CO_3^{2-} (slika 4.46b) uočava se i povećanje udjela kalcita. Usporedbom kompozita s 0,5 % gelatora i 1,0 % gelatora može se uočiti da u oba slučaja nastaje kalcit prema piku na $29^\circ / 2\theta$.



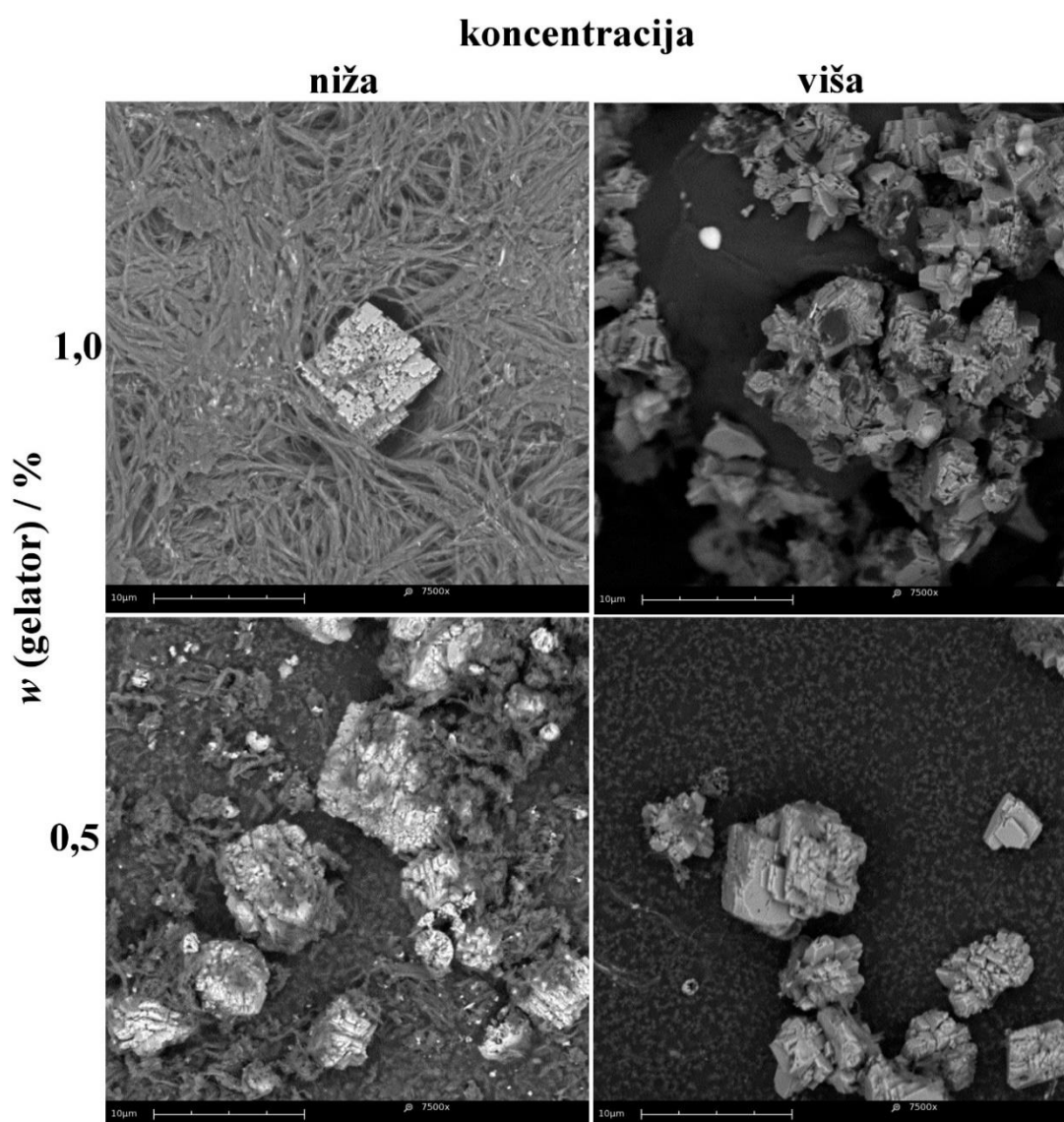
Slika 5.46. PXRD spektri osušenih kompozitnih materijala CaCO_3 i hidrogelova, uspoređujući prema reproducibilnosti (a), koncentraciji $c_i(\text{Ca})_{\text{tot}}$ i $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}}$ (b) te masenom udjelu gelatora (c). Oznake kompozita prema tablici 5.10.

Na slici 4.47 prikazana je morfologija kristala kalcita pri različitim eksperimentalnim uvjetima. Na slici je ujedno vidljivo i umrežavanje hidrogela u strukturu kalcita. Slike ukazuju da su kristali kalcita manji ako su pripremljeni pri višoj koncentraciji konstitucijskih iona, što se može objasniti većim brojem nukleusa, a time i manji kristali. Osim promjene u obliku kristala kalcita, uočljive su i promjene teksture gela. Pri većem masenom udjelu gelatora vidi se i veći utjecaj na morfologiju, više stepenica i razlomljenih kristala, što se može usporediti s ranije spomenutim efektima aminokiselina.¹⁷

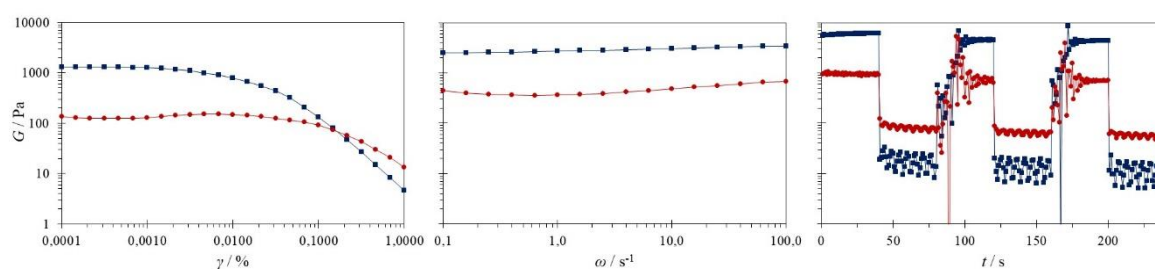


Slika 4.47. SEM slike kalcita u kompozitnim materijalima CaCO_3 i hidrogela pri različitim masenim udjelima gelatora te nižoj ($c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, kompozit E i C) i višoj koncentraciji ($c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, kompozit F i D).

Da bi se bolje proučila morfologija kalcita kompoziti su isprani s etanolom, a rezultati su prikazani na slici 4.48. Može se uočiti optimalno međudjelovanje LMWG-a i kalcita pri 1 % gelatora i nižoj koncentraciji (kompozit E), jer kalcit ima prepoznatljivu romboedarsku morfologiju, ali je jako porozan dok su vlakna hidrogela duga. Stoga su reološka svojstva ispitana na tom kompozitu (slika 4.49)



Slika 4.48. SEM slike kalcita u kompozitnim materijalima CaCO_3 i hidrogela pri različitim masenim udjelima gelatora, te nižoj ($c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, kompozit E i C) i višoj koncentraciji ($c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, kompozit F i D) nakon ispiranja s etanolom.



Slika 4.49. Ovisnost modula pohrane (G' , plavi kvadratići) i gubitka (G'' , crveni kružići) o deformaciji (γ) i kutnoj frekvenciji (ω), te test tiksotropnosti za kompozit s 1 % gelatora i pri nižoj koncentraciji ($c_i(\text{Ca})_{\text{tot}} = c_i(\text{CO}_3)_{\text{tot}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, kompozit E).

Iz ovisnosti modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') o deformaciji i kutnoj frekvenciji može se zaključiti da je gel relativno čvrst.²⁷ U oba slučaja je G' za red veličine veći od G'' što ukazuje da se hidrogel ponaša slično krutini (engl. *solidlike*). Iz ovisnosti o kutnoj frekvenciji može se zaključiti da hidrogelovi ne ovise o frekvenciji u cijelom ispitanom području, što dodatno potvrđuje svojstvo slično krutini. Ispitivanjem tiksotropnosti utvrđeno je da je dobiveni kompozit tiksotropan, jer se povećanjem potiska G' smanjuje ispod G'' i nije konstantan, što ukazuje da je došlo do nastanka tekuće faze. Smanjivanjem potiska hidrogelu je potrebno određeno vrijeme, ali se svejedno ponovno vrati u stanje gela ($G' > G''$). Ponavljanjem potiskivanja i otpuštanja potiska ponašanje se ponavlja. Navedeno ponašanje je uočeno ranije kod hidrogelova LMWG koji geliraju dodatkom Ca^{2+} .²⁷ Tiksotropnost olakšava potencijalnu upotrebu kompozita kao injekcijskog hidrogela, jer je u tekućoj fazi kad se injektira, a očvrstne kad miruje. Za razliku od hidrogelova LMWG bez kalcita, hidrogelovi LMWG s kalcitom veoma brzo geliraju.

Dodatak kalcita omogućuje da nastali gel ima viši pH što je uvijek problem kod sinteze hidrogelova s LMWG, jer pri nižem pH nisu biokompatibilni. Osim toga, kalcit je veoma sličan kalcijevim fosfatima koji su sastavni dio kosti pa mogu služiti kao nukleus za regeneraciju kostiju.

§ 6. ZAKLJUČAK

U ovoj disertaciji opisana su sustavna istraživanja djelovanja jednostavnih modelnih molekula, kao što su aminokiseline i male organske molekule, na taloženje kalcijeva karbonata. Pomoću izrađenog taložnog dijagrama odabrane su koncentracije kalcijevih iona i karbonata pogodne u istraživanjima spontanog taloženja kalcijeva karbonata, transformacije kalcita u vaterit te rasta na kristalnom sjemenu kalcita.

Kao jednostavni modeli molekula koje sudjeluju u procesu biomineralizacije kalcijeva karbonata ljuštura školjaka, odabrane su aminokiseline: asparaginske kiseline (Asp), lizina (Lys), asparagina (Asn), tirozina (Tyr), fenilalanina (Phe), serina (Ser) i alanina (Ala). Pri tome su Asp, Asn i Lys odabrani zbog različitog naboja bočnih ogranaka, dok se parovi Tyr / Phe te Ser / Ala razlikuju u polarnosti molekula. U eksperimentima spontanog taloženja uočen je njihov utjecaj u fazi nukleacije, vidljiv kroz promjenu morfologiju kalcita (SEM), polimorfnog sastava (FTIR i PXRD) te distorziju kristalne rešetke kalcita (PXRD i EPR). Morfologija kalcita promijenjena je dodatkom svih korištenih aminokiselina, pri čemu su nastale stepenice na romboedrima. Značajnim povišenjem koncentracije aditiva, uočene su potpune promjene romboedarske morfologije u morfologiju sličnu ruži, u slučaju Asp. Pod utjecajem nižih koncentracija odabranih aminokiselina povećanjem koncentracije aminokiselina povećavao se udio vaterita. Također je uočeno da je pri višim koncentracijama aditiva došlo do nastanka čistog kalcita, ali promjenjene morfologije. Najveći utjecaj na distorziju kristalne rešetke kalcita uočen je dodatkom Asp. Sve navedene promjene upućuju da na nukleaciju kalcijeva karbonata ne utječu samo negativno nabijene aminokiseline nego i aminokiseline s potencijalom stvaranja dodatne vodikove veze preko bočnoga lanca.

Istraživanjem djelovanja aminokiselina uočeno je nastajanje dva polimorfa: vaterita i kalcita. Očigledno je u sustavu došlo do transformacije vaterita u kalcit. Najizraženiji utjecaj je pokazala Asp, pa je ispitano njeno djelovanje pri niskih koncentracija na transformaciju kalcita u vaterit. Potenciometrijskim mjerenjima i semikvantitativnom FTIR analizom uočeno je produljenje vremena transformacije uslijed povećanja koncentracije asparaginske kiseline, što može biti rezultat inhibicije rasta kalcita ili otapanja vaterita. Dodatak Asp uzrokuje

mjerljivu promjenu kristalne rešetke vaterita i kalcita, što je utvrđeno PXRD metodom. Za razliku, korištenjem EPR spektroskopije te Mn^{2+} kao probe, nije uočena promjena kristalne rešetke, iz čega se može zaključiti da je EPR manje osjetljiva metoda od PXRD pri primijenjenim uvjetima istraživanja. Na SEM slikama nije uočena značajna promjena morfologije vaterita pri povećanju koncentracije Asp, ali su se romboedri nastalih kalcita zaoblili te su se razvile nove plohe. Rezultati ukazuju da promjena kristalne rešetke ne mora biti usko povezana s promjenom morfologije. Da bi se detaljnije proučilo produljenje vremena transformacije uslijed povećanja koncentracije asparaginske kiseline te se odgovorilo na pitanje je li produljenje rezultat inhibicije rasta kalcita ili otapanja vaterita, provedeni su eksperimenti rasta na kristalnom sjemenu vaterita, otapanja vaterita i rasta na kristalnom sjemenu kalcita. Utvrđeno je da se povišenjem koncentracije Asp redovi reakcije rasta vaterita ($n = 3$) i otapanja vaterita ($n = 1$) značajno ne mijenjaju, dok se red reakcije rasta kalcita promjeni s 2 na 3, što ukazuje da je došlo do promjene mehanizma rasta iz mehanizma spiralnog rasta u mehanizam površinske nukleacije. Kinetički rezultati ukazuju da vaterit raste mehanizmom površinske nukleacije, dok je otapanje kontrolirano difuzijom reaktanata u otopini.

Istraživanjem rasta kristala kalcita uz dodatak kristalnog sjemena te odabranih aminokiselina određeni su kinetičkih parametri čijom analizom je definirana vrsta i doseg veza između aminokiselina i površine kristala kalcita. Analiza je provedena primjenom modela Kubote i Mullina i Sangwalovog modela. Određene su Langmuirove konstante adsorpcije odabranih aminokiselina na površinu kalcita, prema kojima se utjecaj aminokiselina može kvantitativno izraziti kao vrijednost konstante adsorpcije. Pri tome je uočen redoslijed djelovanja: Asp > Tyr > Asn > Lys > Ser > Phe > Ala. Redoslijed je usporediv s rezultatima dobivenim spontanom taloženjem. Osim toga, utvrđeno je da i aminokiseline s potencijalom stvaranja dodatne vodikove veze, djeluju na rast kalcijeva karbonata. Djelovanje aminokiselina potvrđeno je i mjerenjem distorzije kristalne rešetke kalcita, određenom PXRD i EPR spektroskopijom, a rezultati su sukladni s kinetičkim.

Mehanizam mogućeg sinergijskog djelovanja nabijenih i polariziranih aminokiselina bio je istražen u sustavima u kojima je kristalno sjeme kalcita raslo uz dodataka odabranih dipeptida. Određene su Langmuirove konstante adsorpcije dipeptida L-alanil-L-asparaginska kiselina (Ala-Asp), L-seril-L-asparaginska kiselina (Ser-Asp), L-seril-L-serin (Ser-Ser), L-

aspartil-L-asparaginska kiselina (Asp-Asp) i L-glutamil-L-glutaminska kiselina (Glu-Glu) na površinu kalcita. Dipeptidi Ala-Asp i Ser-Asp razlikuju se u hidroksilnoj skupini koju Ser posjeduje, dok Ala ne. Pokazano je da navedena razlika omogućuje sinergijsko djelovanje hidroksilne skupine Ser i karboksilne skupine Asp. Istraženi su i efekti dipeptida s dvije hidroksilne skupine (Ser-Ser), dvije karboksilne skupine te različitih duljina bočnih ogranka (Asp-Asp / Glu-Glu). Utvrđeno je da se Asp-Asp najjače adsorbira na površinu kalcita, dok je utjecaj Glu-Glu slabiji. Rezultati ukazuju da dvije –COOH skupine uzrokuju jaču adsorpciju molekula. Također je utvrđeno usporedbom Asp-Asp i Glu-Glu dipeptida da dulji lanac značajno smanjuje adsorpciju na površinu kalcita. Smanjenje se može objasniti udaljavanjem –COOH skupina bočnog ogranka od terminalne α -COOH skupine. Od istraženih dipeptida, Ser-Ser najslabije djeluje, što se može objasniti tim što posjeduje samo α -COOH skupine, za razliku od ostalih dipeptida.

Znanje i razumijevanje osnovnih međudjelovanja između CaCO_3 i aminokiselina, ali i dipeptida, može se koristiti za optimiziranje međudjelovanja aktivne tvari (lijeka) i nosača za njegovu distribuciju. Kalcit je odabran kao referentni anorganski nosač lijekova (engl. *drug delivery*) upravo zbog netoksičnosti, biokompatibilnosti i biodegradacije, ali i izrazite kemijske aktivnosti prema organskim molekulama s hidroksilnim i karboksilnim skupinama. Za primjer aktivne supstance odabrana je salicilna kiselina koja je često korišten protuupalni lijek. Određene su Langmuirove konstante adsorpcije za odabrane derivate salicilne kiseline s motivom Asp tripeptida. Pri tome, proučen je utjecaj kiralnosti unutar Asp tripeptida, kao i duljine poveznice između salicilne kiseline i tripeptida u svrhu optimizacije međudjelovanja površine kalcita i aktivne tvari. Može se zaključiti da međudjelovanju Sal-derivata s površinom kalcita ovisi o kiralnost tripeptida te da je izraženije kada su sve tri –COOH skupine na istoj strani peptidnog lanca. Povećanjem fleksibilnosti smanjuje se adsorpcija do poveznice glicina s dvije –CH₂ skupine nakon koje adsorpcija raste. Uočeno djelovanje moguće je objasniti svijanjem peptidnog lanca, tako da i skupine na salicilnom prstenu mogu pridonijeti međudjelovanju derivata salicilne kiseline s površinom kalcita.

Za procjenu važnosti ionotropnosti na taloženje kalcijeva karbonata kao relevantni modelni sustav sintetiziran je biokompozitni materijal kalcita i gelatora male molekulske mase, koji se razvija kao potencijalna alternativa za konvencionalne metode obnove koštanog tkiva (engl. *bone repairing*). Provedana su preliminarna mjerenja. Uočena je promjena

morfologije kalcita koji je potpuno umrežen u hidrogel gelatora male molekulske mase. Prednost sintetiziranog biokompozita je tiksotropičnost što znači da gel pod utjecajem miješanja postaje tekućina te mirovanjem ponovno formira gel. Osim toga, kalcit unutar biokompozita može služiti kao kristalno sjeme za obnavljanje kostiju zbog toga što je kalcijev karbonat sličan kalcijevim fosfatima koji tvore kosti.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Popis oznaka i kratica

AA	aminokiseline
Ala-Asp	L-alanil-L-asparaginska kiselina
Asp-Asp	L-aspartil-L-asparaginska kiselina
BET	Brunauer-Emmet-Teller metoda određivanja specifične površine
CaCO ₃	kalcijev karbonat
EPR	elektronska paramagnetska rezonancija
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
Glu-Glu	L-glutamil-L-glutaminska kiselina
LMWG	gelatori male molekulske mase
PXRD	difrakcija rendgenskih zraka na polikristalnom uzorku
sbgLDL	N-salicioil-β-glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina
sdgLDL	N-salicioil-δ-glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
Ser-Asp	L-seril- L-asparaginska kiselina
Ser-Ser	L-seril-L-serin
sgLDL	N-salicioil-glicin-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina
sgLLL	N-salicioil-glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina
sggLDL	N-salicioil-γ-glicin-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina
sLDL	N-salicioil-L-asparaginska kiselina-D-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina
sLLL	N-salicioil-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina-L-asparaginska kiselina

Popis simbola

Δa	relativna promjena parametara kristalne rešetke u smjeru osi a
A_i	površina kristalnog sjemena kalcita dodanog u reakciju
Δc	relativna promjena parametara kristalne rešetke u smjeru osi c
c_i	početna koncentracija
c_{ad}	koncentracija aditiva
c_{ppt}	koncentracija istaloženog kalcijevog karbonata
c_{tot}	ukupna koncentracija otopljene tvari
F	predeksponencijalni faktor
ΔG	promjena Gibbsove energije
K_{ad}	Langmuirova konstanta ravnoteže adsorpcije
k_B	Boltzmanova konstanta
k_s	koeficijent brzine rasta kristala mehanizmom spiralnog rasta
K_s	konstanta raznoteže otapanja
L	udaljenost između aktivnih mjesta adsorpcije
l	udaljenost između adsorbiranih molekula
m_i	početna masa kalcitnog sjemena
r^*	radijus kritičnog nukleusa
R	brzina rasta kristala, opća plinska konstanta
R_0	brzina rasta kristala u sustavu bez aditiva
S	prezasićenost
S^*	kritična prezasićenost
s	specifična površina
α	faktor djelotvornosti aditiva
θ_{eq}	udio aktivnih mjesta na površini

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. L. A. Estroff, *Chem. Rev.* **108** (2008) 4329–4331.
2. L. B. Gower, *Chem. Rev.* **108** (2008) 4551–4627.
3. I. Buljan Meić, J. Kontrec, D. Domazet Jurašin, B. Njegić Džakula, L. Štajner, D. M. Lyons, M. Dutour Sikirić, D. Kralj, *Cryst. Growth Des.* **17** (2017) 1103–1117.
4. A. Declet, E. Reyes, O. M. Suarez, *Rev. Adv. Mater. Sci.* **44** (2016) 87–107.
5. L. Kabalah-Amitai, B. Mayzel, Y. Kauffmann, A. N. Fitch, L. Bloch, P. U. P. A. Gilbert, B. Pokroy, *Science (80-.)*. **340** (2013) 454–457.
6. B. Pokroy, L. Kabalah-Amitai, I. Polishchuk, R. T. Devol, A. Z. Blonsky, C. Y. Sun, M. A. Marcus, A. Scholl, P. U. P. A. Gilbert, *Chem. Mater.* **27** (2015) 6516–6523.
7. S. Mann, *Biomimicry: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford University Press, New York, 2001
8. M. Michenfelder, G. Fu, C. Lawrence, J. C. Weaver, B. A. Wustman, L. Taranto, J. S. Evans, D. E. Morse, *Biopolymers* **70** (2003) 522–533.
9. A. Adamiano, S. Bonacchi, N. Calonghi, D. Fabbri, G. Falini, S. Fermani, D. Genovese, D. Kralj, M. Montalti, B. Njegić Džakula, L. Prodi, G. Sartor, *Chem. Eur. J.* **18** (2012) 14367–14374.
10. B. Njegić-Džakula, M. Reggi, G. Falini, I. Weber, L. Brečević, D. Kralj, *Croat. Chem. Acta* **86** (2013) 39–47.
11. B. Njegić-Džakula, L. Brečević, G. Falini, D. Kralj, *Croat. Chem. Acta* **84** (2011) 301–314.
12. A. J. Xie, Y. H. Shen, C. Y. Zhang, Z. W. Yuan, X. M. Zhu, Y. M. Yang, *J. Cryst. Growth* **285** (2005) 436–443.
13. A. Picker, M. Kellermeier, J. Seto, D. Gebauer, H. Cölfen, *Zeitschrift für Krist. - Cryst. Mater.* **227** (2012) 744–757.
14. S. Borukhin, L. Bloch, T. Radlauer, A. H. Hill, A. N. Fitch, B. Pokroy, *Adv. Funct. Mater.* **22** (2012) 4216–4224.
15. D. C. Green, J. Ihli, Y. Y. Kim, S. Y. Chong, P. A. Lee, C. J. Empson, F. C. Meldrum, *Cryst. Growth Des.* **16** (2016) 5174–5183.

16. Y. Kim, J. D. Carloni, B. Demarchi, D. Sparks, D. G. Reid, M. E. Kunitake, C. C. Tang, M. J. Duer, C. L. Freeman, B. Pokroy, K. Penkman, J. H. Harding, L. A. Estroff, S. P. Baker, F. C. Meldrum, *Nat. Mater.* **15** (2016) 903–910.
17. L. Štajner, J. Kontrec, B. Njegić Džakula, N. Maltar-Strmečki, M. Plodinec, D. M. Lyons, D. Kralj, *J. Cryst. Growth* **486** (2018) 71–81.
18. K. Sangwal, *Additives and crystallization processes*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007
19. N. Kubota, J. W. Mullin, *J. Cryst. Growth* **152** (1995) 203–208.
20. M. Ukrainczyk, M. Gredičak, I. Jerić, D. Kralj, *J. Colloid Interface Sci.* **365** (2012) 296–307.
21. M. Ukrainczyk, M. Gredic, I. Jeric, D. Kralj, *Cryst. Growth Des.* **14** (2014) 4335–4346.
22. M. Fujiwara, K. Shiokawa, K. Morigaki, Y. Zhu, Y. Nakahara, *Chem. Eng. J.* **137** (2008) 14–22.
23. C. Wang, C. He, Z. Tong, X. Liu, B. Ren, F. Zeng, *Int. J. Pharm.* **308** (2006) 160–167.
24. Y. Ueno, H. Futagawa, Y. Takagi, A. Ueno, Y. Mizushima, *J. Control. Release* **103** (2005) 93–98.
25. D. Ogomi, T. Serizawa, M. Akashi, *J. Control. Release* **103** (2005) 315–323.
26. K. Gopal, Z. Lu, M. M. De Villiers, Y. Lvov, *J. Phys. Chem. B* **110** (2006) 2471–2474.
27. N. Zanna, S. Focaroli, A. Merlettini, L. Gentilucci, G. Teti, M. Falconi, C. Tomasini, *ACS Omega* **2** (2017) 2374–2381.
28. N. Castellucci, G. Sartor, N. Calonghi, C. Parolin, G. Falini, C. Tomasini, *Beilstein J. Org. Chem.* **9** (2013) 417–424.
29. N. Castellucci, G. Angelici, G. Falini, M. Monari, C. Tomasini, *European J. Org. Chem.* (2011) 3082–3088. doi:10.1002/ejoc.201001643
30. N. Zanna, A. Merlettini, C. Tomasini, *Org. Chem. Front.* **3** (2016) 1699–1704.
31. F. Nudelman, N. A. J. M. Sommerdijk, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51** (2012) 6582–6596.
32. M. Dutour Sikirić, C. Gergely, R. Elkaim, E. Wachtel, F. J. G. Cuisinier, H. Füredi-Milhofer, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **89** (2008) 759–771.
33. J. L. Wu, C. Q. Wang, R. X. Zhuo, S. X. Cheng, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **123** (2014) 498–505.
34. D. Kralj, *Nastajanje i transformacija vaterita, metastabilne modifikacije kalcij*

- karbonata , Doktorski rad, Institut Ruđer Bošković, Sveučilište u Zagrebu, 1990, str. 33-35.
35. M. Ukrainczyk, *Interakcije salicilne kiseline i njenih derivata s kristalima kalcita različite strukture površine* , Doktorski rad, Prirodoslovno-matematičkog fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2012, str. 8-19.
36. B. Njegić-Džakula, *Djelovanje sintetičkih kiselih polipeptida na taloženje kalcijeva karbonata* , Doktorski rad, Prirodoslovno-matematičkog fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010, str. 9-10.
37. S. R. Dickinson, K. M. McGrath, *J. Mater. Chem.* **13** (2003) 928–933.
38. J. Rieger, T. Frechen, G. Cox, W. Heckmann, C. Schmidt, J. Thieme, *Faraday Discuss.* **136** (2007) 265–277.
39. J. W. Shen, C. Li, N. F. A. Van Der Vegt, C. Peter, *J. Phys. Chem. C* **117** (2013) 6904–6913.
40. J. Kontrec, D. Kralj, L. Brečević, G. Falini, S. Fermani, V. Noethig-Laslo, K. Miroslavljević, *Eur. J. Inorg. Chem.* **23** (2004) 4579–4585.
41. S. L. Tracy, C. J. P. François, H. M. Jennings, *J. Cryst. Growth* **193** (1998) 374–381.
42. B. Njegic, L. Brečević, G. Falini, D. Kralj, *Cryst. Growth Des.* **9** (2009) 2425–2434.
43. E. Asenath-Smith, H. Li, E. C. Keene, Z. W. Seh, L. A. Estroff, *Adv. Funct. Mater.* **22** (2012) 2891–2914.
44. W. Norde, *Colloids and Interfaces in Life Science*, Marcel Dekker, 2003, str. 223-262.
45. Y. Levi-Kalisman, G. Falini, L. Addadi, S. Weiner, *J. Struct. Biol.* **135** (2001) 8–17.
46. B. Njegić-Džakula, G. Falini, L. Brečević, Ž. Skoko, D. Kralj, *J. Colloid Interface Sci.* **343** (2010) 553–563.
47. M. Cohen Stuart, R. de Vries, *Fundamentals of Interface and Colloid Science, Volume V* , Elsevier, Amsterdam, 2005, str. 2.1-3.1.
48. J. Koetz, S. Kosmella, *Polyelectrolites and nanoparticles*, Springer, Berlin, 2007, str. 1-7.
49. G. Falini, S. Manara, S. Fermani, N. Roveri, M. Goisis, G. Manganeli, L. Cassar, *CrystEngComm* **9** (2007) 1162–1170.
50. T. Wang, H. Cölfen, M. Antonietti, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 3246–3247.
51. T. Wang, M. Antonietti, H. Cölfen, *Chem. - A Eur. J.* **12** (2006) 5722–5730.
52. Z. Brkljača, *Application of Computational Methods to the Structural and Functional*

- Properties of Flexible Chiral Molecules*, Doktorski rad, Naturwissenschaftlichen Fakultät, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, 2016
53. J. Luo, F. Kong, X. Ma, *Cryst. Growth Des.* **16** (2016) 728–736.
54. H. Nada, *J. Phys. Chem. C* **118** (2014) 14335–14345.
55. A. Kai, K. Fujikawa, T. Miki, *Jpn. J. Appl. Phys.* **41** (2002) 439–444.
56. C. A. Orme, A. Noy, A. Wierzbicki, M. T. McBride, M. Grantham, H. H. Teng, P. M. Dove, J. J. De Yoreo, *Nature* **411** (2001) 775–779.
57. G. Montanari, L. Z. Lakshtanov, D. J. Tobler, K. Dideriksen, K. N. Dalby, N. Bovet, S. L. S. Stipp, *Cryst. Growth Des.* **16** (2016) 4813–4821.
58. L. Brečević, D. Kralj, u *Interfacial Dyn.*, (ur. N. Kallay) Mercel Dekker, New York, 2000 435–474.
59. A.-E. Nielsen, *Croat. Chem. Acta* **42** (1970) 319–333.
60. A.-E. Nielsen, *Treatise on Analytical Chemistry*, Wiley, New York, 1983
61. L. Brecevic, D. Kralj, *Croat. Chem. Acta* **80** (2007) 467–484.
62. D. Kralj, *Kem. Ind* **45** (1996) 13–26.
63. A. E. Nielsen, *J. Cryst. Growth* **67** (1984) 289–310.
64. A. E. Nielsen, *Kinetics of Precipitation*, Pergamon Press, Oxford, 1964
65. P. Bennema, *J. Cryst. Growth* **24/25** (1974) 76–83.
66. A.-E. Nielsen, *Croat. Chem. Acta* **53** (1980) 255–279.
67. A. E. Nielsen, J. Christoffersen, *Biological Mineralization and Demineralization*, Springer, Berlin, 1982
68. A. E. Nielsen, J. M. Toft, *J. Cryst. Growth* **67** (1984) 278–288.
69. O. Sohnel, J. Gaside, *Precipitation: Basic Principles and Industrial Application*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1992
70. W. B. Hilling, *Acta Metall.* **14** (1966) 1868–1869.
71. W. Ostwald, *Grundriss der Allgemeinen Chemie*, Leipzig, 1899, str. 6.
72. W. J. Dunning, *Particle Growth in Suspensions*, Academic Press, London, 1973, str. 3–28.
73. P. T. Cardew, R. J. Davey, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **398** (1985) 415–428.
74. D. Kralj, L. Brečević, A. E. Nielsen, *J. Cryst. Growth* **104** (1990) 793–800.
75. D. Kralj, L. Brecevic, J. Kontrec, *J. Cryst. Growth* **177** (1997) 248–257.
76. T. Ogino, T. Suzuki, K. Sawada, *Geochim. Cosmochim. Acta* **51** (1987) 2757–2767.

77. N. Spanos, P. G. Koutsoukos, *J. Cryst. Growth* **191** (1998) 783–790.
78. M. 14.0.0.163,
79. N. Cabrera, D. A. Vermilyea, *Growth and Perfection of Crystals*, Wiley, New York, 1958, str. 393–408.
80. K. Sangwal, *J. Cryst. Growth* **203** (1999) 197–212.
81. R. J. Davey, J. W. Mullin, *J. Cryst. Growth* **26** (1974) 45–51.
82. N. Kubota, M. Yokota, J. W. Mullin, **182** (1997) 86–94.
83. N. Kubota, M. Yokota, J. W. Mullin, *J. Cryst. Growth* **212** (2000) 480–488.
84. N. V. Vagenas, A. Gatsouli, C. G. Kontoyannis, *Talanta* **59** (2003) 831–836.
85. F. a. Andersen, D. Kralj, *Appl. Spectrosc.* **45** (1991) 1748–1751.
86. J. A. Weil, J. R. Bolton, *Electron Paramagnetic Resonance*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2006 doi:10.1002/0470084987
87. J. G. Agnus, J. B. Raynor, M. Robson, *Chem. Geol.* **27** (1979) 181–205.
88. D. Kralj, J. Kontrec, L. Brečević, G. Falini, V. Nöthig-Laslo, *Chem. - A Eur. J.* **10** (2004) 1647–1656.
89. Y. Y. Kim, M. Semsarilar, J. D. Carloni, K. R. Cho, A. N. Kulak, I. Polishchuk, C. T. Hendley, P. J. M. Smeets, L. A. Fielding, B. Pokroy, C. C. Tang, L. A. Estroff, S. P. Baker, S. P. Armes, F. C. Meldrum, *Adv. Funct. Mater.* **26** (2016) 1382–1392.
90. A. W. Ritchie, M. I. T. Watson, R. Turnbull, Z. Z. Lu, M. Telfer, J. E. Gano, K. Self, H. F. Greer, W. Zhou, *CrystEngComm* **15** (2013) 10266.
91. B. T. Allen, *J. Chem. Phys.* **43** (1965) 3820–3826.
92. S. Elhadj, E. A. Salter, A. Wierzbicki, J. J. De Yoreo, N. Han, P. M. Dove, *Cryst. Growth Des.* **6** (2006) 197–201.
93. P. Malkaj, E. Dalas, *Cryst. Growth Des.* **4** (2004) 721–723.
94. L. Brečević, V. Nothig-Laslo, D. Kralj, S. Popović, *J. Chem. Soc. Trans.* **92** (1996) 1017–1022.
95. N. Wada, K. Kanamura, T. Umegaki, *J. Colloid Interface Sci.* **233** (2001) 65–72.
96. S. Elhadj, J. J. De Yoreo, J. R. Hoyer, P. M. Dove, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (2006) 19237–19242.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime	Lara Štajner
Boravište	Maksimirska 55, 10000 Zagreb
Prebivalište	Katalinića Jeretova 36, 52000 Pula
E-mail	stajner.lara@gmail.com
LinkedIn Profil	hr.linkedin.com/pub/lara-štajner/38/766/607/

Obrazovanje

2014. –	Poslijediplomski studij , Kemijski odsjek Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu
2010. - 2012.	Istraživački smjer Diplomskog studija kemije, Kemijski odsjek Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu Naziv diplomskog rada: „Kompleksiranje lizozima s natrijevim poli(stirensulfonatom), pod vodstvom D. Kovačevića
2007. - 2010.	Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu
2003. – 2007.	Gimnazija Pula

Radno iskustvo

07.01.2015. –	Institut Ruđer Bošković, Zavod za kemiju materijala, Laboratorija za procese taloženja, Stručni suradnik na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Bioinspired materials – Formation Mechanisms and Interactions“
01.09.2014. –	Kemijski odsjek Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu, Asistent u Praktikum fizikalne kemije 1 i Praktikum fizikalne kemije 2 unutar preddiplomskog studija kemije
31.12.2013. – 30.05.2014.	Institut Ruđer Bošković, Zavod za kemiju materijala, Laboratorija za procese taloženja, Stručno osposobljavanje za rad
07.01.2013. – 31.08.2013.	Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Laboratorij za biomineralizaciju, nanostrukture i radioekologiju, Stručni suradnik na projektu Hrvatske zaklade za znanost 02.05/17 „Development of a nanotechnology-based targeted recognition system for biomacromolecules“

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima

- L. Štajner, J. Kontrec, B. Njegić Džakula, N. Maltar-Strmečki, M. Plodinec, D. M. Lyons, D. Kralj, *The effect of different amino acids on spontaneous precipitation of calcium carbonate polymorphs*, Journal of Crystal Growth **486** (2018) 71-81.
- I. Buljan Meić, J. Kontrec, D. Domazet Jurašin, B. Njegić Džakula, L. Štajner, D. M. Lyons, M. Dutour Sikirić, D. Kralj, *Comparative study of calcium carbonates and calcium phosphates precipitation in model systems mimicking the inorganic environment for biomineralization*, Crystal growth & design **17** (2017) 1103-1117.
- P. Burić, Ž. Jakšić, L. Štajner, M. Dutour Sikirić, D. Jurašin, C. Cascio, L. Calzolari, D. M. Lyons, *Effect of silver nanoparticles on Mediterranean sea urchin embryonal development is species specific and depends on moment of first exposure*, Marine environmental research **111** (2015) 50-59.
- L. Štajner, J. Požar, D. Kovačević, *Complexation between lysozyme and sodium poly(styrenesulfonate): the effect of pH, reactant concentration and titration direction*, Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects **483** (2015) 171-180.

Sažeci u zbornicima skupova

- N. Maltar-Strmečki, L. Štajner, *EPR Study of Copper(II) Complexes with Chiral Amino Acids*, 4th International Scientific Meeting of COST Action CM1306 "Understanding Movement and Mechanism in Molecular Machines", Zagreb, Hrvatska, 21. – 24. 03. 2018. (poster)
- V. Babić Ivančić, L. Štajner, *Biomineralization – how to investigate it?*, Third regional roundtable: Refractory, process industry, nanotechnologies and nanomedicine ROSOV PINN 2017, Beograd, Srbija, 01. – 02. 06. 2017. (predavanje V. Babić-Ivančić)
- J. Kontrec, I. Buljan Meić, B. Njegić Džakula, L. Štajner, D. M. Lyons, N. Maltar-Strmečki, M. Plodinec, A. Gajović, M. Čeh, Miran; D. Kralj, *Precipitation of amorphous and metastable CaCO₃ phases in the systems with different chemical complexity*, 20th International Symposium on Industrial Crystallization (ISIC20), Dublin, Irska, 03. – 06. 09. 2017. (poster)
- N. Maltar-Strmečki, L. Štajner, *Dynamics of Copper(II) Complexes with Chiral Amino Acids Studied by EPR*, Solid-State Science & Research, Zagreb, Hrvatska, 28.-30. 06.2017, (poster)
- L. Štajner, Z. Brkljača, A. Jakas, M. Gredičak, D. M. Smith, A.-S. Smith, D. Kralj, *Interactions of tripeptide derivatives of salicylic acid with calcite surfaces*, 25. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera s međunarodnim sudjelovanjem 3. simpozij „Vladimir Prelog“, Poreč, Hrvatska 19. – 22. 04. 2017. (predavanje).
- L. Štajner, J. Kontrec, B. Njegić Džakula, D. M. Lyons, N. Maltar- Strmečki, D. Kralj, *Comparison of PXRD and EPR technique for monitoring distortion of calcite lattice in the presence of selected amino acids*, , 3rd Meeting COST ACTION CM1306 Dynamics of biomolecular machines, Bugibba, Malta, 27 – 28. 03. 2017. (predavanje).
- M. Ukrainczyk, L. Štajner, Z. Brkljača, R. Stepić, D. M. Smith, A.-S. Smith, M. Gredičak, I. Jerić, A. Jakas, D. Kralj, *Surface interactions between oligopeptide derivatives of salicylic acid and calcite as a model of an inorganic drug delivery system*, The 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Dubrovnik, Hrvatska, 25. – 28. 06. 2017. (poster)
- L. Štajner, J. Kontrec, B. Njegić Džakula, D. M. Lyons, N. Maltar- Strmečki, D. Kralj, *The role of amino acids as simple models of organic matrix molecules participating in calcium carbonate biomineralization*, 3rd European Crystallography School (ECS3), Bol, Hrvatska, 25. 09. –02. 10. 2016. (poster)

- M. Dutour Sikirić, I. Buljan, J. Kontrec, D. Domazet Jurašin, B. Njegić Džakula, L. Štajner, D. M. Lyons, N. Maltar Strmečki, M. Plodinec, M. Čeh, A. Gajović, D. Kralj, *Comparative study of amorphous phases formation and transformation in calcium phosphate and calcium carbonate precipitation systems*, 30th Conference of The European Colloid and Interface Society (ECIS), Rim, Italija, 04. – 09. 09. 2016. (poster)
- L. Štajner, B. Njegić Džakula, J. Kontrec, N. Maltar-Strmečki, D. Kralj, *Investigation of selected amino acids influence on calcium carbonate precipitation - simple model of biomineralization* 13th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics, od Uni Split do Uni Zadar, 01- 10.09.2016. (predavanje)
- L. Štajner, B. Njegić Džakula, J. Kontrec, D. Kralj, *Interactions of calcite surfaces with selected amino acids*, Workshop Innovative Surfaces and Materials, Primošten, Hrvatska, 28-31.08.2016. (predavanje)
- I. Buljan, J. Kontrec, D. Domazet Jurašin, B. Njegić Džakula, L. Štajner, D. M. Lyons, N. Maltar-Strmečki, M. Dutour Sikirić, D. Kralj, *The comparison of precipitation conditions and physical chemical properties of salts relevant for biomineralization, calcium phosphates and calcium carbonates*, 6th International Colloids Conference, Berlin, Njemačka, 19-22.06.2016. (poster)
- I. Buljan, J. Kontrec, D. Jurašin Domazet, B. Njegić Džakula, L. Štajner, D. M. Lyons, N. Maltar-Strmečki, A. Gajović, M. Dutour Sikirić, D. Kralj, *Comparative study of calcium phosphate and calcium carbonate precipitation in model systems of increased complexity*, MC Meeting, WG Meeting, Workshop of COST Action NEWGEN MP13001, Aveiro, Portugal, 17 – 18.03.2016. (poster)
- L. Štajner, J. Kontrec, B. Njegić Džakula, D. M. Lyons, N. Maltar Strmečki, D. Kralj, *Utjecaj aminokiselina kao jednostavnih modela organskog matriksa na biomineralizaciju kalcijeva karbonata*, Simpozij studenata doktorskih studija PMF, Zagreb, Hrvatska, 26.02.2016. (poster, najbolji poster)
- N. Maltar-Strmečki, L. Štajner, J. Kontrec, B. Njegić Džakula, I. Buljan, D. Kralj, *Investigation of incorporation of amino acid into calcite using Mn^{2+} ions as paramagnetic probe*, The 3rd MC Meeting of the CM1306 COST Action and 2nd scientific meeting “Dynamics of Biomacromolecular Machines”, Lisbon, Portugal, 24. – 26.02.2016. (poster)
- L. Štajner, D. Kralj, *The role of alanine, aspartic acid and lysine as simple models of organic matrix molecules participating in calcium carbonate biomineralization*, 5th European Conference on Crystal Growth, Bologna, Italija, 09. – 11.09.2015. (poster)
- H. Kuveždić, D. Šimunović, J. Kontrec, L. Štajner, V. Babić-Ivančić, *Analiza naslaga na JJ protezu*, 11. Osječki urološki dani, Osijek, Hrvatska, 21. – 23.05.2015. (poster)
- V. Babić-Ivančić, J. Kontrec, L. Štajner, T. Opačak-Bernardi, S. Horvatić, S. Njegovec, E. Zimprich, V. Bermanec, *Pogled kemičara i geologa mikroskopom u bubrežnim i/ili mokraćni kamenac*, 11. Osječki urološki dani, Osijek, Hrvatska, 21. – 23.05.2015. (predavanje V. Babić-Ivančić)
- L. Štajner, B. Njegić Džakula, J. Kontrec, T. Dražić, D. Jurašin, M. Dutour Sikirić, D. Kralj, *Usporedba taložnih dijagrama biomineralizirajućih soli kalcijevih karbonata i kalcijevih fosfata*, 24 hrvatski skup kemičara i kemijskih tehnologa, Zagreb, Hrvatska, 21. – 24.04.2015. (poster)
- L. Štajner, B. Njegić Džakula, J. Kontrec, N. Nekić, D. Jurašin, M. Dutour Sikirić, D. Kralj, *Utjecaj alanina, asparaginske kiseline i lizina na taloženje kalcijevih karbonata i kalcijevih fosfata*, 24 hrvatski skup kemičara i kemijskih tehnologa, Zagreb, Hrvatska, 21. – 24.04.2015. (poster)

- Ž. Jakšić, P. Burić, L. Štajner, D. M. Lyons, *The effect of industrially-relevant engineered nanoparticles on marine invertebrates*, 9th NanoBio-Europe Conference Abstract Booklet., Toulouse, Francuska, 2013. 94-95 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
- L. Štajner, J. Požar and D. Kovačević, *Formation and properties of protein-polyelectrolyte complexes on the example of lysozyme-NaPSS complexation*, Joint Meeting of WG 3, WG 4 and WG 5, COST Action CM1101, La Valletta, Malta, 24. - 25. 01. 2013. (predavanje D. Kovačevića)
- L. Štajner, J. Požar, D. Kovačević, *Complexation of lysozyme with sodium poly(styrenesulfonate)*, 26th Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS), Malmo, Švedska, 02. – 07. 09. 2012. (poster)

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima i radionicama bez priopćenja

- BioBash Workshop, Zagreb, Hrvatska, 29.9.2015.
- The 1st European School on Crystal Growth, Bologna, Italija, 5. – 8.9.2015.
- Symposium & Workshop on Microscale Thermophoresis, Zagreb, Hrvatska, 30.6. – 01.07.2015.
- The InnoMol Molecular Interactions Workshop, Zagreb, Institut Ruđer Bošković, 01.– 02.06 2015.
- InnoMol Bioimaging Workshop, Zagreb, Institut Ruđer Bošković, 20. – 22.08.2014.
- COST ES1205 Annual General Meeting 2014, Pula, Hrvatska, 03. – 04.06.2014.
- 12M Meeting SmartNano, Pula, 25.-26. 6. 2013.
- ITS-NANO Workshop, Venecija, 21.-22. 03. 2013.
- Položen tečaj „Dopunske izobrazbe o primjeni mjere zaštite od ionizirajućeg zračenja“ pri radu u radioizotopnim laboratorijima i u znanstveno istraživačkoj djelatnosti, Zagreb, 02. – 03.07.2013.

Uredničke knjige

- 4th International Scientific Meeting of COST Action CM1306 “Understanding Movement and Mechanism in Molecular Machines”, Book of Abstracts, Zagreb, 21-24, March, 2018., urednici: N. Maltar-Strmečki, L. Štajner, A. Maršavelski, Ruđer Bošković Institute, 2018 (zbornik).

Studijski boravci u inozemstvu:

- 2018. Department of Chemistry „Giacomo Ciamician“, University of Bologna, Bologna, Italija, 1 mjesec.

Članstvo u profesionalnim organizacijama

- Hrvatsko kemijsko društvo (HKD) – Sekcija za organsku kemiju
- Hrvatska udruga kristalografa (HUK)
- Hrvatsko mikroskopijsko društvo (HMD)