



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ina Erceg

**UTJECAJ AMINOKISELINA NA
SPONTANO TALOŽENJE KALCIJEVIH
FOSFATA**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biokoloide i površinsku kemiju pod mentorstvom dr.sc. Maje Dutour Sikirić, v.zn.sur. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Vladislav Tomišić.

Zahvale

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici dr. sc. Maji Dutour Sikirić što me je ponajviše naučila koristiti stečeno znanje, pokazala mi kako biti dobar znanstvenik i još bolji kolega. Hvala na savjetima i pomoći pri izradi eksperimentalnog, a pogotovo pismenog dijela ovog diplomskog rada.

Hvala dr. sc. Atiđi Selmani na ogromnoj pomoći pruženoj tijekom pisanja rada, a najviše hvala na strpljenju i svom slobodnom vremenu potrošenom na čitanje svih verzija diplomskog rada. Hvala na razgovorima, smirivanju i što si bila divna cimerica.

Hvala dr. sc. Dariji Domazet Jurašin na svim savjetima i pomoći danim, što oko izrade i pisanja ovoga rada, što oko studiranja. Hvala što sam Vam se uvijek mogla obratiti za pomoć, a još više hvala što ste za sve uvijek imali riješenje.

Svim članovima Laboratorija za Biokoloide i površinsku kemiju zahvaljujem na podršci, savjetima i pomoći.

Hvala mojim roditeljima, Emi i Darku što su bili uz mene i što su mi bili podrška tijekom cijelog studiranja. Hvala vam što ste prolazili samnom svaki stres, ali i sreću oko ispita. Hvala Sandru koji je imao ogromno strpljenje samnom, koji je bio dio najgorih i najboljih iskustava mog studiranja i na kojeg sam uvijek mogla bezuvjetno računati. Hvala Zrinki na svim razgovorima, savjetima, smjehu i pomoći.

Hvala Danielu Lyonsu na snimljenim difraktogramima praha, Nives Matijaković na snimanju infracrvenih spektara i Mariji Čurlin na snimanju transmisijskih elektronskih mikrografija.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	17
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	19
2.1. Taložni procesi.....	19
2.1.1. Nukleacija	20
2.1.2. Kristalni rast	21
2.1.3. Sekundarni proces.....	22
2.1.4. Morfologija taloga.....	23
2.1.5. Utjecaj aditiva na taloženje	23
2.1.6. Biomineralizacija.....	25
2.2. Kalcijevi fosfati.....	27
2.2.1. Amorfni kalcijev fosfat	28
2.2.2. Oktakalcijev fosfat.....	30
2.2.3. Kalcij deficijentni hidroksiapatit.....	31
2.2.4. Hidroksiapatit	32
2.3. Aminokiseline	33
2.3.1. Fenilalanin.....	34
2.3.2. Asparaginska kiselina	35
2.3.3. Asparagin.....	35
2.3.4. Serin	36
2.3.5. Lizin.....	37
2.4. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti aminokiselina.....	38
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	41
3.1. Priprema ishodnih otopina.....	41
3.2. Priprema taložnih sustava.....	41
3.3. Metode.....	42
3.3.1. Potenciometrija.....	42
3.3.2. Karakterizacija taloga	42
3.3.3. FTIR spektroskopija.....	43
3.3.4. Rendgenska difrakcija na praškastom uzorku.....	43
3.3.5. Pretražna elektronska mikroskopija	44

3.3.6. <i>Transmisijska elektronska mikroskopija</i>	44
3.3.7. <i>Obrada podataka</i>	45
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	46
4.1. Utjecaj aminokiselina na vrijeme indukcije	46
4.2. Utjecaj aminokiselina na sastav i morfologiju taloga	49
4.2.1. <i>Kontrolni sustav</i>	49
4.2.2. <i>Fenilalanin</i>	53
4.2.3. <i>Asparaginska kiselina</i>	58
4.2.4. <i>Asparagin</i>	62
4.2.5. <i>Serin</i>	66
4.2.6. <i>Lizin</i>	70
§ 5. ZAKLJUČAK	75
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	76
§ 7. LITERATURNI IZVORI	78
§ 8. ŽIVOTOPIS	LXXXV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

UTJECAJ AMINOKISELINA NA SPONTANO TALOŽENJE KALCIJEVIH FOSFATA

Ina Erceg

Međudjelovanje malih organskih molekula i/ili makromolekula s anorganskim kristalima važno je za razumijevanje procesa taloženja u prirodi. Između različitih biominerala, kalcijevi fosfati privlače posebnu pažnju zbog uloge u biološkoj i patološkoj mineralizaciji i industrijskim procesima. U novije vrijeme, istraživanja utjecaja aditiva na nastajanje kalcijevih fosfata uglavnom su usmjerena na proteine. Iako su opći principi tih međudjelovanja poznati, uloga pojedinih aminokiselina nije još do kraja razjašnjena.

Cilj ovoga rada je istraživanje utjecaja aminokiselina koje pri fiziološkim uvjetima imaju bočne ogranke različitih naboja: fenilalanina (nenabijen), asparaginske kiseline (negativno nabijen), asparagina (polaran, nenabijen), serina (polaran, nenabijen) i lizina (pozitivno nabijen).

Napredovanje taloženja kalcijevih fosfata praćeno je potenciometrijski, što je omogućilo određivanje vremena indukcije. Nastali talog analiziran je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom, pretražnom elektronskom mikroskopijom, transmisijskom elektronskom mikroskopijom i difrakcijom rendgenskih zraka na praškastom uzorku.

Dobiveni rezultati ukazali su da utjecaj aminokiselina na svojstva kalcijevih fosfata ovisi o naboju njihovog bočnog ogranka.

(86 stranica, 29 slika, 15 tablica, 145 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: aminokiseline, biomineralizacija, kalcijevi fosfati, spontano taloženje

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

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Vladislav Tomišić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Vladislav Tomišić
 2. izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
 3. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Čindrić
- Zamjena: prof. dr. sc. Davor Kovačević

Datum diplomskog ispita:
12. listopada 2017.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

INFLUENCE OF AMINO ACIDS ON SPONTANEOUS PRECIPITATION OF CALCIUM PHOSPHATES

Ina Erceg

Mechanisms of interaction between soluble small organic molecules and/or macromolecules with inorganic crystals are of major importance for crystallization processes in nature. Among different biogenic crystals, calcium phosphates attract attention due to their role in the normal and pathological mineralization, as well as in industrial processes. Recent investigations of the influence of additives on the formation of calcium phosphates are mostly focused on protein and their building blocks, amino acids. Although general principles of these interactions are known, the role of specific amino acids is still unclear.

The aim of this research was to investigate the influence of amino acids with side chains of different properties at physiological conditions: phenylalanine (uncharged, hydrophobic), aspartic acid (negatively charged), arginine (uncharged, polar), serine (uncharged, polar) and lysine (positively charged).

The progress of precipitation was followed potentiometrically, which enabled determination of induction time. Fourier transform infrared spectroscopy, powder x - ray diffraction, scanning and transmission electron microscopy were used for characterization of the precipitates.

Given results show the influence of amino acids on properties of calcium phosphates. The obtained results show that the influence of amino acids on calcium phosphates' properties depends on the charge of their side chain.

(86 pages, 29 figures, 15 tables, 145 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: amino acids, biomineralization, calcium phosphates, spontaneous precipitation

Mentor: Dr. Maja Dutour Sikirić, Senior Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Vladislav Tomišić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Vladislav Tomišić, Professor
 2. Dr. Biserka Prugovečki, Associate Professor
 3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
- Substitute: Dr. Davor Kovačević, Professor

Date of exam:

12 October 2017.

§ 1. UVOD

Kalcijevi fosfati (CaP) imaju bitnu ulogu u biološkoj i patološkoj biomineralizaciji te se pojavljuju u više različitih faza. Glavna mineralna komponenta zubi i kostiju je hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) u kojem je dio fosfatnih iona zamijenjen karbonatnim ionima, dok se u patološkim depozitima CaP pojavljuju u obliku oktakalcijevog fosfata ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, OCP), kalcijevog hidrogenfosfata dihidrata ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, DCPD) i beta-trikalcijevog fosfata ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP).^[1]

Procesi nastajanja kalcijevih fosfata u organizmima mogu se smatrati procesima taloženja u prisutnosti organske matrice. Taloženje je proces nastajanja nove čvrste faze iz homogene roditeljske faze te se odvija u više koraka: nukleacija, kristalni rast i sekundarni procesi.^[2] Brzine i mehanizmi svakog koraka, a samim time i svojstva nastalog taloga, ovise o eksperimentalnim uvjetima kao što su koncentracija reaktanata, dodatak aditiva i način miješanja.

Ovisno o eksperimentalnim uvjetima, CaP mogu nastati direktno ili preko amorfne faze. U neutralnim i bazičnim otopinama obično nastaju u dva koraka. Prvi korak je nastajanje amornog kalcijevog fosfata (ACP, $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n \text{H}_2\text{O}$ ($3 < n < 4,5$)). ACP se ovisno o pH vrijednosti otopine i koncentraciji reaktanata može transformirati u OCP, kalcij deficitarni apatit ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$), CaDHA) ili HA.^{[3],[4]}

Od posebne važnosti za razumijevanje nastajanja CaP u organizmima je istraživanje utjecaja različitih organskih molekula na procese taloženja CaP. Dodatak aditiva, organskih molekula, makromolekula i površinski aktivnih tvari utječe na brzinu i mehanizam procesa taloženja, morfologiju i sastav čvrste faze.^[1] Za razumijevanje nastajanja CaP u organizmu, bitno je istraživanje njihovih međudjelovanja s proteinima.

Da bi se ta međudjelovanja bolje razumjela potrebno je odrediti utjecaj koji pojedine aminokiseline (AK) imaju na taloženje CaP. Usprkos brojnim istraživanjima, uloga AK nije u potpunosti razjašnjena. Tome doprinose i različiti eksperimentalni uvjeti u kojima su različita istraživanja izvedena, što onemogućuje njihovu usporedbu.^[5]

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj aminokiselina čiji su bočni ogranci u danim eksperimentalnim uvjetima različito nabijeni: fenilalanin (Phe), asparaginska kiselina (Asp), asparagin (Asn), serin (Ser) i lizin (Lys) na taloženje CaP. Pri pH 7,4 Phe ima hidrofoban nepolaran bočni

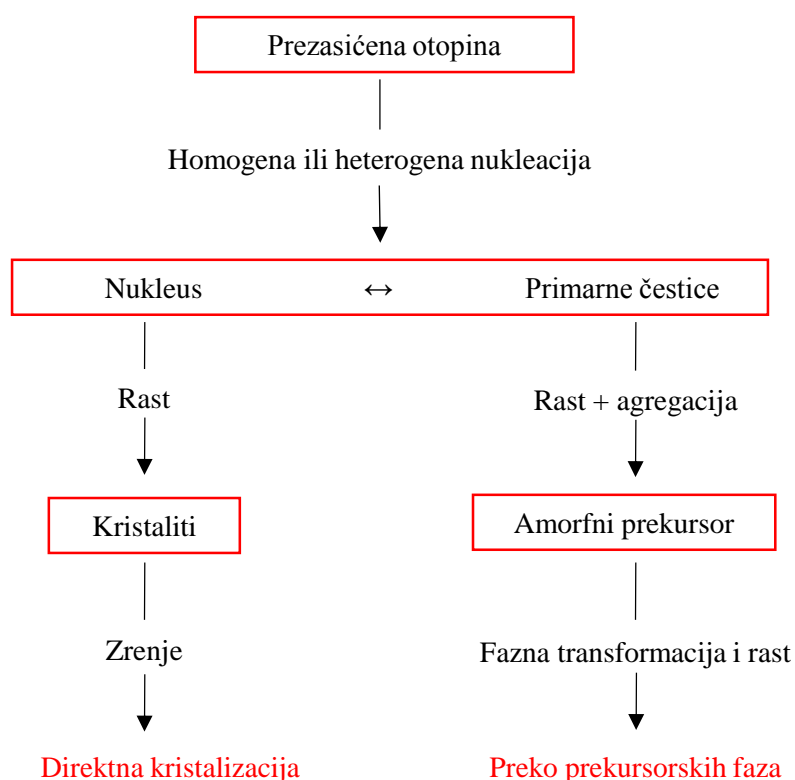
ogranak, Asp ima negativno nabijen bočni ogranak, Ser i Asn imaju polaran nenabijen bočni ogranak, a bočni ogranak Lys je polaran i pozitivno nabijen.^[6] U tu svrhu, ispitan je utjecaj različitih koncentracija aminokiselina na brzinu transformacije ACP-a te na sastav i morfologiju CaP.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Taložni procesi

Taloženje je proces nastajanja nove faze iz homogene roditeljske faze, kao što je nastajanje kapljica iz pare, mjehurića iz tekućine te krutine iz taline i otopine. Ukoliko je novonastala kruta faza kristalne strukture, proces njezina nastajanja naziva se kristalizacija.^[2]

Proces taloženja odvija se u nekoliko koraka (Slika 1.).



Slika 1. Taloženje iz prezasićenih otopina. Konstruirano prema referenci [1].

Taloženje započinje nukleacijom na nečistoćama ili klicama te nastajanjem embrija. Slijedi rast nukleusa u kristale koji je ponekad praćen nastajanjem sekundarnih nukleusa zbog čega su u otopini prisutni kristali različitih dimenzija. Kristali mogu postojati u stabilnoj suspenziji ili se mogu koagulirati. Kada kristali ili koagulirani agregati narastu dolazi do sedimentacije. To je obično posljednji stupanj procesa, čime prestaje rast pojedinačnih čestica. No, ukoliko se sustav prati kroz duže vrijeme, vidljivo je da se manje čestice otapaju, a veće i dalje rastu.

Termodinamički gledano, sustav nije stabilan dok se ne istaloži sav suvišak otopljene tvari u odnosu na topljivost. Time je taloženje i teoretski završilo.

Kako bi nastali nukleusi nove faze, mora se prijeći energetska barijera – kritična prezasićenost. Prezasićenost (S) se definira kao razlika kemijskih potencijala prezasićene i stabilne zasićene otopine:

$$S = e^{-[\mu(a) - \mu(a_s)]/RT} \quad (1)$$

gdje je μ kemijski potencijal, a i a_s su aktiviteti otopljene tvari u prezasićenoj i stabilnoj zasićenoj otopini. U najjednostavnijem slučaju, pri konstantnom tlaku i temperaturi jednadžba (1) svodi se na:

$$S = \left(\frac{a}{a_s} \right)_{p,T} \quad (2)$$

jer je $\mu(a) = \mu^\circ + RT \ln a$. Za binarni elektrolit prezasićenost iznosi:

$$S = \left(\sqrt{\frac{a_A a_B}{K_{sp}}} \right) \quad (3)$$

gdje je K_{sp} konstanta produkta topljivosti, odnosno konstanta ravnoteže otapanja. Stoga kritično prezasićenje ili granica metastabilnosti predstavlja maksimalno stabilno prezasićenje. Velik broj, uglavnom termodinamičkih svojstava ovisi o prezasićenju, dok druga svojstva, poput kinetičkih i kemijskih, ovise i o odnosu koncentracija reaktanata. Stoga, kako bi se dobila pouzdana informacija o taloženju iz otopine potrebno je ispitati široko područje koncentracija reaktanata.^[1,2]

2.1.1. Nukleacija

Nukleacija je proces nastajanja centara na kojima može doći do spontanog rasta.^[7] Proučavanje procesa nukleacije je složeno zbog izuzetno malih dimenzija nukleusa (obično nekoliko stotina molekula ili iona), nemogućnosti predviđanja njihovog položaja u sustavu te nestabilnosti. Najčešće se eksperimentalni podatci o procesima nukleacije dobivaju na temelju opažanja u kasnijim procesima taložnog procesa kada su čestice dovoljno velike da se mogu detektirati.^[8] Prije same nukleacije dolazi do kontinuiranog nastajanja i otapanja ionskih ili molekulskih klastera koji su u ravnoteži sa svim ostalim prisutnim klasterima. Najveći klaster koji može

postojati prije nego što započne kristalni rast naziva se kritični klaster ili nukleus. Stabilni nukleus može nastati samo ako je postignut određeni stupanj prezasićenja.^[7]

Postoje dvije vrste nukleacije: homogena i heterogena. Heterogenu nukleaciju uzrokuju nečistoće u otopini koje služe kao centri kristalnog rasta. Nečistoće imaju katalitičku ulogu, one kataliziraju nukleaciju snižavajući energetska barijeru. Ukoliko je strukturno slaganje površine nečistoće s kristalom dobro, do nukleacije će doći pri koncentracijama nižim od onih u homogenim otopinama jer se tada smanjuje međupovršinska energija dviju krutina ili čvrstih faza u odnosu na energiju kristal/otopina. S druge strane, homogena se nukleacija odvija tek pri vrlo visokim prezasićenjima i uključuje nastanak velikog broja čestica.^[7]

2.1.2. Kristalni rast

Nukleaciju slijedi kristalni rast koji je rezultat niza procesa koji se odvijaju u otopini i na površini kristala: transport iona ili molekula kroz otopinu, adsorpcija na međupovršini kristal/otopina, difuzija na površini, reakcija na međupovršini (dehidratacija, nukleacija) i ugradnja u kristalnu rešetku. Brzina kristalnog rasta određena je najsporijim od tih koraka. Kristalni rast može biti kontroliran površinskim procesima (mononuklearni i polinuklearni mehanizam) i transportom materijala kroz otopinu (difuzija i konvekcija).^[2] Glavni parametri koji određuju brzinu i mehanizam kristalnog rasta su prezasićenje, veličina kristala, dostupna površina za rast i parametri kristalnih ploha.^[9]

Pri ekstremno malim prezasićenjima rast kristala opisuje se mehanizmom spontanog rasta prema kojem ovisnost brzine rasta o prezasićenosti otopine može biti dvojaka (parabolična ili linearna) što ukazuje na promjenu kontrolnog mehanizma. Ukoliko je ugradnja iona u kristalnu rešetku najsporiji proces, brzina kristalnog rasta parabolički ovisi o prezasićenju. Povećanjem prezasićenosti, adsorpcija na površini kristala postaje najsporiji proces i parabolička ovisnost prelazi u linearnu.^[9]

Pri niskim prezasićenjima kristalni rast kontroliran je površinskom nukleacijom tzv. mononuklearnim ili polinuklearnim mehanizmom. Kod mononuklearnog rasta nukleacija je stupanj koji određuje brzinu rasta, a nukleusi nastaju na glatkoj kristalnoj plohi i šire se u obliku monosloja.^[10] Polinuklearni rast odvija se pri višim prezasićenjima ili na većim kristalima kada je vrijeme potrebno za nastanak monosloja usporedivo ili duže od vremena nukleacije. Pri takvom rastu površina je uvijek prekrivena nukleusima koji se šire i srastaju jedan u drugi.^[10]

Nakon što se prijede određeno prezasićenje, kristalni rast postaje kontroliran transportom materijala. U procesima kontroliranim difuzijom, manji će kristali rasti brže pa će čestice nastalog taloga biti približno jednake veličine. U slučaju binarnog elektrolita, rast kristala kontroliran je transportom materijala, a pri velikom suvišku jedne ionske vrste brzina rasta bit će gotovo neovisna o koncentraciji komponente u suvišku. Tada će stupanj koji određuje brzinu biti transport deficitantne komponente. Konvekcija kao kontrolni mehanizam je zanemariva ako se taloženje odvija uz miješanje suspenzije.^[8]

Kinetičkim mjerenjima može se ustanoviti koji od mehanizama kontrolira brzinu kristalnog rasta u nekom sustavu. Ako je rast kontroliran transportom materijala, brzina rasta ovisit će o miješanju suspenzije jer se uslijed miješanja koncentracija u blizini površine kristala izjednačava sa onom u otopini pa proces postaje brži. U suprotnom, rast je kontroliran procesima na površini.^[9]

2.1.3. *Sekundarni proces*

Talog nastao u prethodno opisanim procesima podložan je fizikalnim i kemijskim promjenama (sekundarnim procesima) koji se odvijaju neovisno o tome da li je talog u dodiru s matičnicom ili nije. Neki od važnijih sekundarnih procesa su: agregacija, Ostwaldovo zrenje i transformacija metastabilnih faza. Posljedice agregacije čestica su smanjenje njihova broja i nastajanje čestica većih dimenzija, dok je sama agregacija rezultat djelovanja London - van der Waalsovih privlačnih sila, Coulombovih odbojnih sila i odbojnih sila uzrokovanih solvatacijom, adsorpcijom, itd.^{[9],[11]} Agregacijom se smanjuje površina dostupna za rast čime se smanjuje i brzina rasta sve dok u jednom trenutku ne postane beznačajna. Pri homogenoj nukleaciji, agregacija se odvija ili paralelno ili odmah nakon nukleacije.

Ostwaldovo zrenje je pojava otapanja dijelova kristala koji su veće energije (bridovi, uglovi, dendritni ogranci) te taloženje viška otopljene tvari na mjestima u kristalu koji su manje energije (stepenice, dislokacije). Tu pojavu prvi je opisao Ostwald koji je prvi opisao i procese nastajanja i transformacije metastabilnih faza. Zaključio je da kada u taložnom procesu može nastati nekoliko faza, prva će istaložiti faza najveće topljivosti, odnosno ona koja je najmanje stabilna. Drugim riječima, faza s najmanjom međupovršinskom energijom će se nukleirati prva iz prezasićene otopine.

2.1.4. *Morfologija taloga*

Morfologija taloga (broj, veličina i oblik istaloženih čestica) ovisi o mehanizmima i relativnim brzinama svih taložnih procesa. Morfologija taloga ovisi o procesima nukleacije (homogena ili heterogena), procesima starenja te o kemijskom sastavu matičnice.^[12]

Distribucija veličine čestica je funkcija prezasićenja i vremena. Prema teoriji nukleacije, maksimalna veličina čestice postiže se neposredno prije početka homogene nukleacije.^[13] Pri heterogenoj nukleaciji broj čestica je stalan ili se približava stalnoj vrijednosti, a čestice su veće što je prezasićenje veće. Ako u tom slučaju dođe do povećanja veličine čestica, vjerojatnije je da je to posljedica agregacije nego kristalnog rasta. Maksimalna veličina čestica ovisi o međupovršinskoj energiji i vrsti materijala.^[8]

Broj čestica nastalih u nekom sustavu ovisi o mehanizmu nukleacije. Za svaku eksperimentalnu tehniku postoji donja granica detekcije veličine čestica, pa eksperimentalno određen broj čestica može biti manji od stvarnog. Takav problem posebno je izražen kod homogene nukleacije. Osim toga, kod homogene nukleacije čestice dosežu granicu detekcije prvenstveno agregacijom, a ne kristalnim rastom. Iz tog razloga, detektirane čestice mogu biti agregati primarnih čestica. I u tom slučaju će broj eksperimentalno određenih čestica biti manji od stvarnog.^[8]

2.1.5. *Utjecaj aditiva na taloženje*

Aditivi se koriste u industrijskim procesima za ubrzavanje (koagulati u odvajanju otpada), inhibiranje (kamenci) ili modificiranje taloženja. Oni imaju važnu ulogu u kontroli biološke te inhibiciji patološke biomineralizacije. Ako su u taložnom sustavu prisutni aditivi, može se selektivno iskristalizirati jedan enantiomer ili nastati kristal željene morfologije.^[14-16]

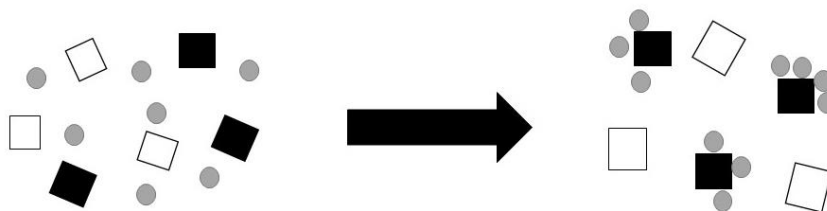
U širem smislu, utjecaj aditiva na morfologiju kristala sastoji se od promjene ravnotežnog oblika kristala, promocije ili inhibicije nukleacije, kristalnog rasta, transformacije metastabilnih faza, stabilizacije i agregacije. Učinak aditiva na taloženje ovisi o njihovoj vrsti i koncentraciji.^[17] Razumijevanje mehanizama međudjelovanja aditiva s nastajućom čvrstom fazom od velike je važnosti za sve procese u kojima su oblik i veličina kristala važni.

Osnova bilo kakvog proučavanja međudjelovanja aditiva s kristalima u otopini je detaljno poznavanje kinetike nastajanja proučavanog taloga ili strogo reproducibilna procedura taloženja. Ukoliko su faktori kao što su prezasićenje, omjer koncentracija reaktanata,

temperatura, način miješanja konstantni, aditivi preuzimaju kontrolu nad taložnim procesima.^[18]

Procesi nukleacije, rasta i otapanja kristala bit će inhibirani kada je adsorpcija sporiji korak od izmjene molekula između matičnice i kristala. Ukoliko je adsorpcija slaba, strani ioni ne blokiraju površinu, već smanjuju energiju nukleusa ili kristalnih ploha. Zato će se smanjiti energija aktivacije (E_a) nukleacije i kristalnog rasta te će se ti procesi ubrzati zbog adsorpcije stranih iona.

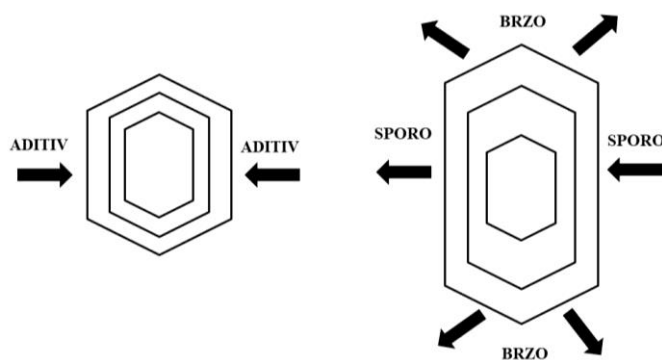
Posebno važan mehanizam djelovanja aditiva je selektivna adsorpcija aditiva na nukleuse i kristalne površine. Ako u otopini može nastati nekoliko faza, rast faze na čije se nukleuse aditiv selektivno adsorbira bit će usporen ili potpuno inhibiran, dok će nastati faza na čije se nukleuse aditiv nije adsorbirao (Slika 2.).



Slika 2. Prikaz selektivne adsorpcije aditiva na nukleuse jedne kristalne faze u otopini prezasićenoj s obzirom na dvije faze. Konstruirano prema referenci [19].

Jedan od načina proučavanja utjecaja aditiva je uspoređivanje morfologije kristala istaloženih u prisutnosti i bez aditiva. Na taj se način mogu odrediti učinci koji su posljedica specifične adsorpcije na neke kristalne plohe. Naime, morfologija kristala rezultat je relativnih brzina rasta različitih ploha. Što je brzina rasta u smjeru okomitom na neku plohu veća, ta će ploha biti manja.^[18]

Brzina rasta različitih kristalnih ploha ovisi o međumolekulskim djelovanjima u kristalu, ali i o otapalu, prezasićenju, temperaturi i prisutnim nečistoćama.^[18] Ako se neki inhibitor učinkovito adsorbira samo na određenu kristalnu plohu, ali ne i na ostale plohe, ta će ploha biti veća nego u originalnom kristalu (Slika 3.). Također je moguće da se u prisutnosti aditiva pojave nove kristalne plohe. Rezultat međudjelovanja bit će promjena habitusa kristala. U nekim slučajevima adsorbirane molekule mogu inicirati heterogenu, dvodimenzionalnu nukleaciju što također rezultira promjenom habitusa kristala.^[20]



Slika 3. Shematski prikaz promjene habitusa kristala uslijed selektivne adsorpcije aditiva na kristalne plohe. Konstruirano prema referenci [20].

Ako se radi o malim i kompaktnim kristalima koji sadrže značajnu količinu površinskih defekata, aditivi se mogu jednoliko adsorbirati na svim ploham. U tom slučaju, habitus kristala možda se neće promijeniti, ali će rast i otapanje manjih kristala te transformacija metastabilnih faza biti inhibirani.^[18,20]

2.1.6. Biomineralizacija

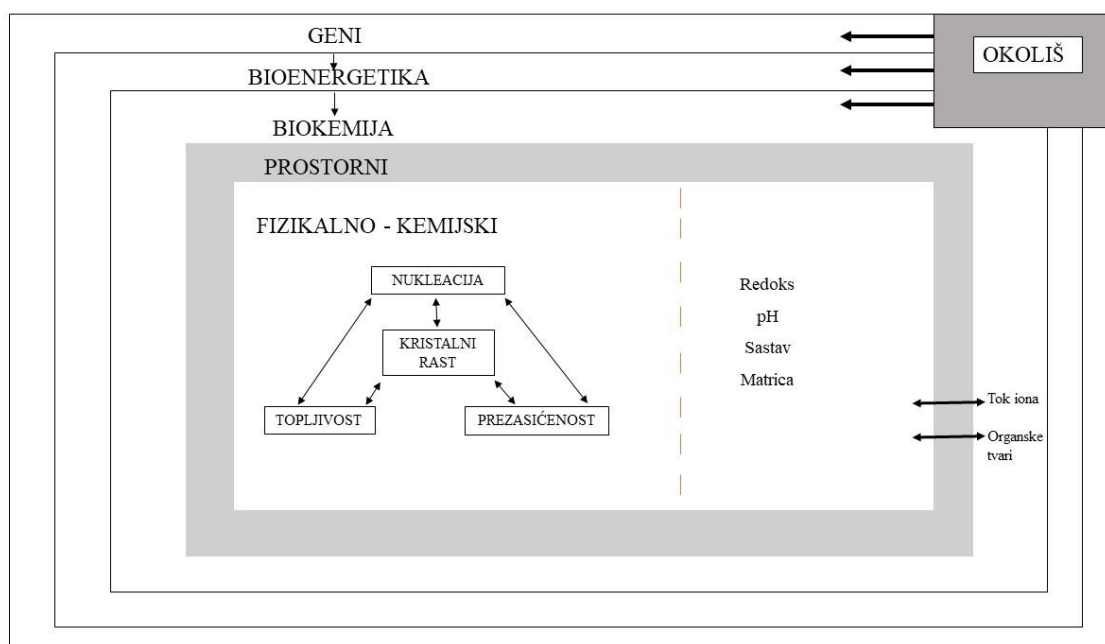
Biomineralizacija je proces taloženja anorganskih soli iz kompleksnih otopina (poput krvi i mokraće) unutar organske matrice. Na taj se način formiraju zubi, kosti te patološka mineralizirana tkiva kao što su kamenci i karijes. Mineralizirana tkiva su u stalnom kontaktu s tjelesnim tekućinama koje su izuzetno kompleksne, imaju visoku ionsku jakost, sadrže biološke makromolekule, male organske molekule i anorganske ione.^[21]

Iako su kristalografska struktura, kemijski sastav, većina kemijskih i fizikalnih svojstava biominerala poznati, fiziološki procesi koji upravljaju njihovim nastajanjem još uvijek nisu do kraja razjašnjeni. Osnovni problem je razlikovanje taložnih procesa *in vivo* od staničnih i metaboličkih aktivnosti uključenih u nastajanje izvanstanične matrice i razvoj tkiva. Mnogi fizikalno-kemijski principi nukleacije i rasta kristala razjašnjeni su proučavanjem otopina sintetskih analoga biominerala.^[21]

Postoje dva osnovna načina biomineralizacije. U biološki induciranoj biomineralizaciji organizam modificira svoj mikrookoliš i time stvara uvjete pogodne za kemijsko taloženje izvanstaničnih mineralnih faza. Na taj način proces mineralizacije nije strogo kontroliran pa nastale čestice nemaju jedinstvenu morfologiju, no imaju široku distribuciju veličine čestica. Drugi način biomineralizacije je na granici čime čestice nastaju unutar ili na nekoj organskoj

matrici koju je proizveo organizam. Za razliku od biološki inducirane mineralizacije, ovim mehanizmom postiže se stroga kontrola veličine, morfologije, sastava te kristalografske orijentacije čestica.^[22]

Utjecaj organskih makromolekula važan je za regulaciju rasta minerala, rezultirajuću kristalnu morfologiju i agregaciju čestica. Procese biomineralizacije kontroliraju vanjski (okolišni) i fizikalno-kemijski čimbenici (Slika 4.).



Slika 4. Kontrolni mehanizmi biomineralizacije. Konstruirano prema referenci [22].

Vanjski čimbenici ponajviše obuhvaćaju genetske učinke o čijem se načinu djelovanja malo zna. Pet ključnih kontrolnih mehanizama biomineralizacije su: kemijski, prostorni, strukturni, morfološki i konstitucijski. Četiri su ključna fizikalno-kemijska čimbenika: topljivost, prezasićenje, nukleacija i kristalni rast. U biomineralizaciji, oni su kontrolirani koordiniranim transportom iona te prisustvom inhibitora i promotora. Prostorna kontrola odnosi se na regulaciju veličine i oblika biominerala na način da se proces odvija u specifičnim prostorima kao što su vezikule ili porozna organska matrica. Strukturna kontrola obuhvaća preferiranu nukleaciju određene kristalne plohe ili osi molekularnim prepoznavanjem na površini organske matrice. Morfološka kontrola postiže se taloženjem unutar ili između organskih struktura. Konstitucijska kontrola odnosi se na niz integriranih procesa koji se odvijaju na različitim skalama veličine.^[22]

2.2. Kalcijevi fosfati

Kalcijevi fosfati imaju bitnu ulogu u tvorbi kostiju i zubi kralješnjaka te se pojavljuju kao glavna anorganska komponenta patoloških mineralnih depozita (kosti, zubi, mokraćni kamenci.).^[23–28] Sudjeluju i u procesima taloženja u prirodnim i otpadnim vodama, proizvodnji gnojiva i keramike.^[3] Posebno je važna njihova primjena kao biomaterijala za regeneraciju kostiju i zuba. Mogu se pronaći i u prirodi gdje su ponajviše zastupljeni kao depoziti apatita.^[29–31]

Kalcijevi fosfati se pojavljuju u nekoliko faza. Najvažniji oblik je HA budući da se pojavljuje u biološkoj mineralizaciji, gdje ima ulogu potporna u čvrstim tkivima te je odgovoran za čvrstoću kostiju, dentina i zubne cakline.^[32] U Tablici 1. nalazi se pregled CaP bitnih za ovaj rad.

Tablica 1. Biološki važni kalcijevi fosfati, njihove kemijske formule, kristalni sustavi, kratice te prisutnost u biološkim sustavima.^[33]

Ime	Skraćenica	Formula	Kristalni sustav	Prisutnost u biološkim sustavima
Amorfni kalcijev fosfat	ACP	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n \text{H}_2\text{O}$ ($3 < n < 4,5$)		Kalcifikacija mekog tkiva
Oktakalcijev fosfat	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Trikliniski	Zubni i mokraćni kamenac
Kalcij deficijentni hidroksiapatit	CaDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)		
Hidroksiapatit	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Heksagonski	Kosti, dentin, enamel

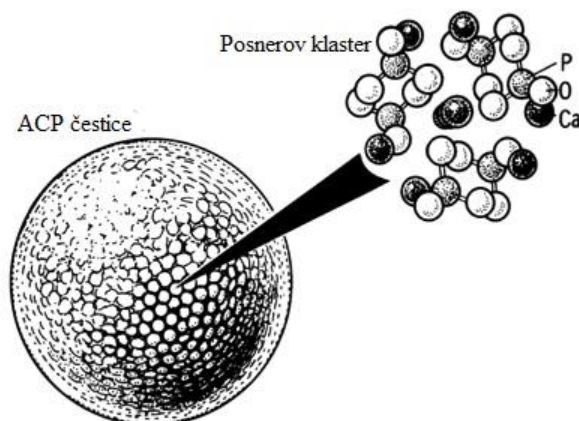
Prema definiciji, svi kalcijevi ortofosfati sadrže tri elementa: kalcij (u oksidacijskom stanju +2), fosfor (u oksidacijskom stanju +5) i kisik (u oksidacijskom stanju –2). Kemijski sastav mnogih kalcijevih ortofosfata uključuje vodik iz kiselih ortofosfatnih aniona poput HPO_4^{2-} ili H_2PO_4^- i/ili vodik iz vode kao što je slučaj u dihidratima ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).^[34] Većina kalcijevih ortofosfata je slabo topljiva u vodi, no dobro topljiva u kiselinama. Općenito, što je manji omjer Ca/P iona, CaP su topljiviji i kiseliji.^[35]

Taloženje CaP iz neutralnih i bazičnih otopina pri uvjetima bliskim fiziološkim, obično se odvija u dva koraka. Prvi korak je nastajanje metastabilnog amorfnoeg prekursora čiji sastav ovisi o uvjetima taloženja (temperatura, pH vrijednost, ionska jakost, odnos koncentracija reaktanata, utjecaj aditiva, način miješanja).^[36,37] Pri višim pH vrijednostima taj je prekursor hidratizirani kalcijev fosfat (TCP) koji se u dodiru s matičnicom, procesima starenja i hidrolize transformira u DCPD, OCP, CaDHA i HA.^[17,38,39]

2.2.1. Amorfni kalcijev fosfat

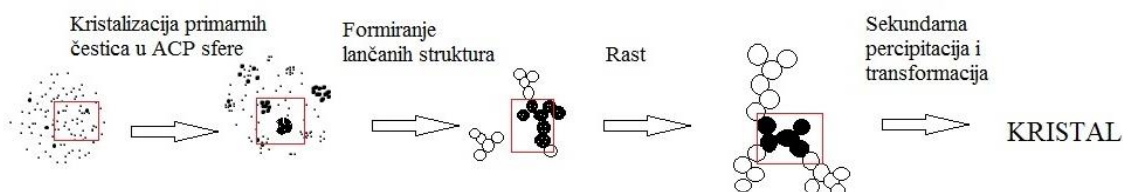
Amorfni kalcijev fosfat, ACP je prva čvrsta faza koja nastaje miješanjem otopina koje sadrže kalcijeve (Ca^{2+}) i fosfatne (PO_4^{3-}) ione pri $\text{pH} > 7$. Nastajanje CaP preko amorfne faze odvija se u organizmima, kao i u laboratorijskim uvjetima. Prisutnost ACP-a dokazana je u mitohondrijima i sarkoplazmatskom retikulumu nekih stanica, usnoj šupljini, mlijeku sisavaca, a u morskih beskralježnjaka najviše ga ima u zubima i egzoskeletnoj strukturi.^[40]

Zanimanje za procese nastajanja CaP započinje sredinom 50-tih godina 20-tog stoljeća kada se prvi put uočava nastanak amorfnoeg prekursora, no struktura takvih tvari riješena je tek 60-tih godina kada su razvijene metode kojima se moglo analizirati nestabilne krutine. Bazirajući se na relativno konstantnom omjeru Ca/P ACP-a nastalog u različitim uvjetima (različite koncentracije Ca^{2+} i PO_4^{3-} iona te različite temperature i pH vrijednosti otopina), Posner i Betts postavili su hipotezu da je ACP građen od sferičnih čestica promjera 300 do 1000 Å, koje sadrže molekule vode (Slika 5.). Kemijskom analizom dokazano je da su te nekristalinične čestice hidratizirani CaP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$) čiji kemijski sastav ovisi o pH vrijednosti otopine: ACP čestice s omjerom Ca/P u rasponu od 1,18:1 do 1,53:1 talože pri pH 6,6 dok se pri visokim pH vrijednostima poput 11,7 omjer povećava čak do 2,5:1.^[41] U tim je česticama centralni Ca^{2+} ion koordiniran sa 6 kisikovih atoma PO_4^{3-} skupina koje su nadalje sferično okružene s drugih 8 iona Ca^{2+} . Taj je neutralni ionski klaster, opće formule $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, nazvan Posnerovim klasterom. Računima je pokazano da su, između različitih vrsta klastera koji mogu nastati (npr. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ili $\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_4$), Posnerovi klasteri energetski najstabilniji.^[42] Oni su stabilni zbog elektrostatskih interakcija Ca^{2+} i PO_4^{3-} iona te hidrofobnih međudjelovanja molekula vode.^[43]



Slika 5. Model čestice ACP i Posnerov klaster. Konstruirano prema referenci [43].

Zanimljiva je činjenica da je raspored atoma u Posnerovom klasteru analogan onom u nekoliko drugih CaP, poput HA, OCP i β -TCP.^[37] Velik broj Posnerovih klastera nasumično je pakiran u sferične čestice ACP, koje se agregiraju u lančaste strukture (Slika 6.).



Slika 6. Shema taloženja CaP preko amornog prekursora. Konstruirano prema referenci [4].

ACP je nestabilan te se stajanjem u matičnici transformira u stabilnije faze poput OCP, CaDHA ili HA. Stabilnost amornog prekursora u vodenim otopinama je funkcija ionske jakosti, pH vrijednosti otopine, prisutnosti molekula ili iona aditiva te temperature.^[44] Posnerovi klasteri nastaju u prvim trenucima taloženja, pri čemu ne dolazi do značajnije promjene pH vrijednosti suspenzije. No, na klasterima paralelno nastaju čestice kristalne strukture reakcijom iona i/ili klastera, otpuštajući protone. Kako raste broj čestica kristalne strukture, dolazi do razaranja Posnerovih klastera, a novonastale kristalne čestice uzrokuju brzo taloženje CaP što uzrokuje naglo smanjenje pH vrijednosti suspenzije. Može se zaključiti da je kristalizacija preko amornih faza glavni način taloženja CaP iz prezasićenih otopina.^[43]

ACP se koristi kako u biomedicinske tako i u industrijske svrhe. Dodatkom ACP-a određenim polimerima, dobivaju se bioaktivni materijali koji se koriste u medicini i stomatologiji.^{[45],[46]} Zahvaljujući relativno dobroj topljivosti ACP-a pri pH sličnom fiziološkom, neki se mikroorganizmi njime mogu hraniti. Iz tog razloga može se dodavati kao mineralna komponenta medijima za uzgoj kultura. U prehrambenoj industriji, ACP se koristi za čišćenje sirupa, a povremeno se može koristiti kao inertno punilo u granuliranim lijekovima. Osim toga, ACP se koristi u proizvodnji stakla i keramike te kao sirovi materijal pri proizvodnji nekih organskih fosfata.^{[47],[48]}

2.2.2. Oktakalcijev fosfat

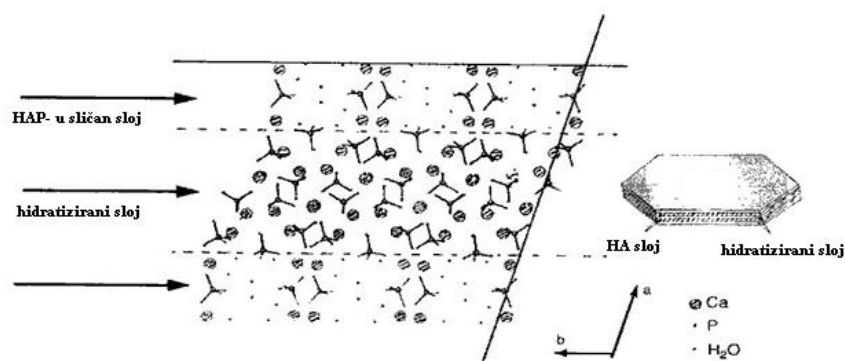
Oktakalcijev fosfat (oktakalcijev *bis(tetrahidro)tetrakis(fosfat)* pentahidrat), molekulske formule $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, jest čest nestabilni međuprodukt tijekom taloženja termodinamički stabilnijih CaP u vodenim otopinama. Ima značajnu biološku ulogu kao mogući prekursor tijekom nastajanja apatita u čvrstim tkivima kralježnjaka. Njegova je triklinska struktura vrlo slična heksagonalnoj strukturi hidroksiapatita jer se sastoji od apatitnih slojeva međusobno razdvojenih slojevima vode u kojima je raspored Ca^{2+} i PO_4^{3-} iona sličan onome u DCPD-u.^[49-51] U vodenim otopinama na površini kristala nalazi se hidratizirani sloj, što se odražava na morfologiju kristala tako da nastaju pločice s dominantnom (100) plohom.^[1] OCP je relativno nestabilan u odnosu na HA, a potpuna hidroliza OCP-a u HA traje oko 6 sati (ovisno o uvjetima) i odvija se prema reakciji:^[52]



Strukturna sličnost i transformacija OCP-a u HA predstavljaju temelj razumijevanja fiziološki važnih pojava kao što su mogući mehanizam ugradnje nečistoća i defekata u zubnu caklinu te razlike među zubima u osjetljivosti na karijes.^[53]

OCP se može pripremiti miješanjem otopina koje sadrže Ca^{2+} i PO_4^{3-} tako da se dobije prezasićena otopina u kojoj je omjer $\text{Ca/P} = 1,33$.^[50,52,54,55] Sam OCP može biti nestehiometrijski, kalcij deficijenti (tada je omjer $\text{Ca/P} = 1,26$) ili može uključivati višak Ca^{2+} iona u strukturi ($\text{Ca/P} = 1,48$). Moguće je prirediti i djelomično hidroliziran OCP u kojemu je

omjer $\text{Ca/P} = 1,37$, a može se pripremiti i faza u kojoj dolazi do zamjene Ca^{2+} ili PO_4^{3-} iona. Kristali OCP su obično mali, plosnati te se uvijek javljaju u obliku sraslaca.^[46] OCP ima značajnu biološku ulogu jer je jedna od stabilnih komponenti ljudskih bubrežnih i dentalnih kamenaca.^[56]



Slika 7. Struktura i tipična morfologija oktakalcijevog fosfata. Konstruirano prema referenci [1].

2.2.3. Kalcij deficijentni hidroksiapatit

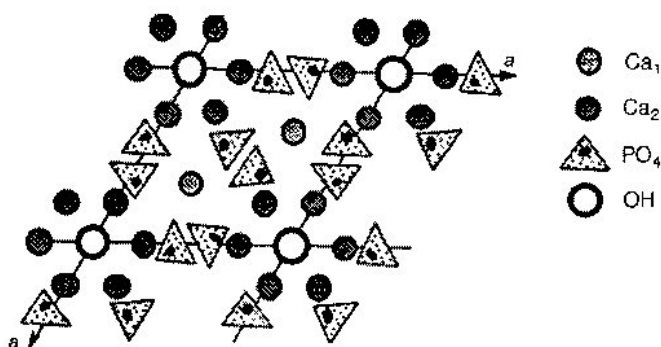
Kalcij deficijentni hidroksiapatit je spoj molekulske formule $(\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x})$, ($0 < x < 1$) koji se može prirediti istovremenim dodavanjem otopina koje sadrže Ca^{2+} i PO_4^{3-} ione (Ca/P između 1,50 – 1,67) u proključalu vodu. Takvu suspenziju potrebno je kuhati par sati, što se naziva faza starenja, pa se CaDHA u literaturi naziva i taložni hidroksiapatit (*eng. Percipitated Hydroxyapatite, PHA*).^[57,58] Tijekom faze starenja, ACP se transformira u CaDHA zbog čega postoje mnoge sličnosti u strukturi, svojstvima i primjeni CaDHA i ACP-a istaloženog u alkalnim uvjetima ($\text{pH} > 8$).

Budući da je nestabilna kristalna faza i nastaje u počecima kristalizacije, kristali CaDHA su djelomično kristalni i vrlo malih dimenzija, no karakterizira ih vrlo velika specifična površina ($26 - 100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Ovisno o Ca/P omjeru, CaDHA se može transformirati zagrijavanjem iznad $\sim 700 \text{ }^\circ\text{C}$, u β -TCP ($\text{Ca/P} = 1,5$), odnosno bifaznu smjesu HA i β -TCP ($1,5 < \text{Ca/P} < 1,67$).^[59] Nesupstituirani CaDHA, odnosno onaj koji sadrži samo ione Ca^{2+} , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} i OH^- ne postoji u biološkim sustavima. Supstituirani, u kojemu se Ca^{2+} može zamijeniti s Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ili Sr^{2+} ionima, a PO_4^{3-} ili HPO_4^{2-} ioni s CO_3^{2-} ionima, dok se OH^- ioni zamjenjuju s F^- , Cl^- i CO_3^{2-} ionima, zajedno s molekulama vode formira biološki apatit.^[60,61] Takav tzv. biološki

apatit ima bitnu ulogu u industrijskoj proizvodnji materijala za bioimplatante te kao sredstvo za dostavu lijekova u organizmu.^[62,63] CaDHA se koristi kao katalizator u proizvodnji bioplinova.^[64]

2.2.4. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit je termodinamički najstabilniji CaP koji kristalizira u heksagonskom ili monoklinskom kristalnom sustavu. Kemijski čist HA kristalizira u monoklinskoj prostornoj grupi $P2_1/b$, no pri temperaturi od približno 250 °C dolazi do transformacije u heksagonsku formu (prostorna grupa $P6_3/m$).^[65,66] U heksagonskoj formi, koja je građevna jedinica bioloških apatita, razmještaj iona omogućuje jednostavnu izmjenu kalcijevih iona stroncijevim, silicijevim ili manganovim ionima.^[33] U takvim kanalima vrlo lagano dolazi do ionske izmjene zbog čega su apatiti nađeni u prirodi često supstituirani.



Slika 8. Struktura kalcijevog hidroksiapatita. Konstruirano prema referenci [1].

HA može se pripremiti taloženjem, hidrotermalnom sintezom ili hidrolizom drugih CaP. U svim slučajevima potrebno je pomiješati otopine koje sadrže Ca^{2+} i PO_4^{3-} ione tako da omjer Ca/P bude točno jednak 1,67. No, čak i u idealnim stehiometrijskim uvjetima, najčešće nastaje nestehiometrijski HA što ukazuje na nastajanje prekursorke faze poput ACP-a.^[67]

Kemijski čist HA nikad se ne javlja u biološkim sustavima. Međutim, zbog kemijske sličnosti mineralima u kostima i zubima, HA je često korišten kao prevlaka na ortopedskim ili zubnim implantantima, a u posljednje vrijeme sve se češće koristi i HA biokeramika.^[68–74] Zbog sličnosti biološkom apatitu, HA se dugo vremena koristio u tekućinskoj kromatografiji za razdjeljivanje nukleinskih kiselina, proteina i ostalih bioloških smjesa, ali i u svrhe dostave lijekova u

organizmu.^[75–79] Osim toga, HA se dodaje u neke vrste pasti za zube kao blago polirajuće sredstvo umjesto kalcijevih karbonata.^[80,81] U industriji se koristi kao ekološki prihvatljiv filter za elastomere, stabilizator otrovnih kemijskih elemenata, materijal za zaštitu od ultraljubičastog zračenja te kao komponenta mnogih senzora.^[82–87]

2.3. Aminokiseline

Aminokiseline su organski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže amino skupinu ($-\text{NH}_2$) i karboksilnu skupinu ($-\text{COOH}$) te bočni ogranak ($-\text{R}$ skupina) karakterističan za svaku pojedinu aminokiselinu. Do sada je poznato oko 500 aminokiselina od kojih se 20 pojavljuje u genetičkome kodu. Mogu se podijeliti s obzirom na funkcionalne skupine smještene na ugljikovim atomima glavne okosnice (α -, β -, γ -, δ -... ugljikov atom) te vrsti i naboju bočnog ogranka (alifatski, ciklički, aromatski...).

α – aminokiseline, u kojima su $-\text{NH}_2$ i $-\text{COOH}$ skupine vezane na α – C atom su građevne jedinice proteina. U eukariota postoji 21 proteogena aminokiselina, 20 genetičkog koda i selenocistein.^[88] Ljudski organizam može sintetizirati 12 proteogenih aminokiselina, jedne iz drugih ili iz drugih molekula koje sudjeluju u metaboličkim procesima. Preostalih devet mora se unijeti u organizam, najčešće u obliku proteinskih derivata, stoga se zovu esencijalne aminokiseline. Ovoj skupini aminokiselina pripadaju histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan i valin.^[89]

Aminokiseline se najčešće dijele prema svojstvima bočnog ogranka na one koje imaju polaran i one koje imaju nepolaran. Nepolarni bočni ogranci mogu biti alifatski i aromatski, a polarni mogu sadržavati pozitivno ili negativno nabijene skupine.^[6] U ovome istraživanju korištene su sljedeće aminokiseline, čija su svojstva navedena u Tablici 2.: fenilalanin (Phe), asparaginska kiselina (Asp), asparagin (Asn), serin (Ser) i lizin (Lys).

Tablica 2. Svojstva aminokiselina korištenih u ovome istraživanju.^[6]

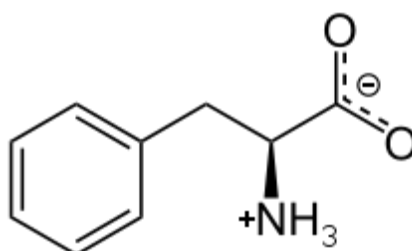
Vrsta bočnog ogranka	AK	Simbol	M/ g mol ⁻¹	pK _a vrijednosti			pI
				pK ₁ (-COOH)	pK ₂ (-NH ₃ ⁺)	pK _R	
Nepolaran, aromatski	Fenilalanin	Phe	165	1,83	9,13		5,48
Polaran, nenabijen	Serin	Ser	105	2,21	9,15		5,68
	Asparagin	Asn	132	2,02	8,80		5,41
Pozitivno nabijen	Lizin	Lys	146	2,18	8,95	10,5	9,74
Negativno nabijen	Asparaginska kiselina	Asp	133	1,88	9,60	3,65	2,77

2.3.1. Fenilalanin

Fenilalanin je α -amino kiselina formule C₉H₁₁NO₂. Pripada skupini esencijalnih aminokiselina, a sama molekula Phe je nepolarna zbog hidrofobne prirode bočnog ogranka, aromatskog prstena. Prekursor je tirozinu, dopaminu, noradrenalinu, adrenalinu i pigmentu melaninu.¹⁴

U prirodi se može pronaći u mlijeku sisavaca. U industriji se upotrebljava u proizvodnji hrane i pića, a može se koristiti i kao dodatak prehrani zbog svog analgetskog i antidepresivnog učinka. Također je i prekursor za sintezu fenetilamina, često korištenog dijetetskog proizvoda. Prvi opis Phe objavljen je u 19. st., dok su 1882. Erlenmeyer i Lipp prvi sintetizirali Phe iz fenilacetaldehida, cijanovodika i amonijaka. S obzirom da je esencijalna aminokiselina, ne može se sintetizirati metabolizmom već se mora unositi hranom. Najveći izvor Phe ili proteina bogatih ovom aminokiselinom su jaja, piletina, jetra, govedina, mlijeko i soja.

Koristi se u liječenju depresije, poremećaja pažnje i hiperaktivnosti, Parkinsonove bolesti, kroničnih bolova, vitiliga i nuspojava nakon liječenja alkoholizma.

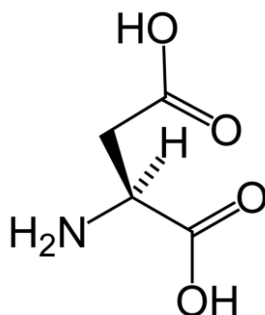


Slika 9. Shematski strukture fenilalanina pri fiziološkoj pH vrijednosti. Prema referenci [90].

2.3.2. Asparaginska kiselina

Asparaginska kiselina je α -aminokiselina opće formule $C_4H_7NO_4$ koja se koristi u biosintezi proteina. Pri fiziološkim uvjetima, amino skupina je protonirana ($-NH_3^+$) dok je karboksilna deprotonirana ($-COO^-$). Bočni ogranak reagira s drugim aminokiselinama, proteinima i enzimima u tijelu te se pri fiziološkim uvjetima nalazi u deprotoniranom stanju ($-CH_2COO^-$). D-aspartat je jedna od dvije aminokiseline koje se u obliku ovog enantiomera može naći u sisavcima. L-izomer je jedna od 22 proteogene aminokiseline, koja se pri fiziološkim uvjetima klasificira kao kisela aminokiselina.

Prvi put je sintetizirana 1827. godine hidrolizom Asn koji je bio izoliran iz soka šparoge. Također se može sintetizirati metaboličkim putevima pa pripada skupini neesencijalnih aminokiseline. U ljudskome tijelu, Asp se najčešće sintetizira transaminacijom oksaloacetata, a nusprodukt je ciklusa uree.^[6] U biljkama i sisavcima, Asp je prekursor u sintezi nekoliko aminokiseline od kojih su neke esencijalne: metionin, treonin, izoleucin i lizin.



Slika 10. Shematski prikaz asparaginske kiseline. Prema referenci [91].

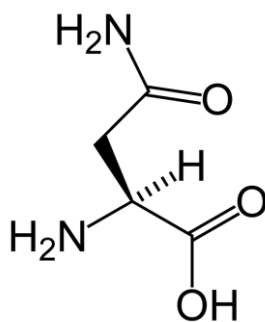
2.3.3. Asparagin

Asparagin je neesencijalna aminokiselina molekulske formule $C_4H_8N_2O_3$ koju bočni ogranak čini polarnom alifatskom aminokiselinom pri fiziološkim uvjetima.^[92]

Prvi je put izoliran 1806. godine u kristalnom obliku iz soka šparoge, po kojoj je dobio ime. Ta je aminokiselina česta građevna jedinica proteina. Kako bočni ogranak Asn može tvoriti vodikove veze, najčešće se može pronaći na početku α -uzvojnice, a tvori i tzv. amidne prstene u β -bačvama.^[6]

Prekursor u sintezi Asn je oksaloacetat.^[6] Osim metaboličkim putevima, u organizam se može unijeti i prehranom. Izvor Asn je govedina, perad, jaja, riba, mlijeko, šparoge, krumpir, lješnjaci, mahunarke i soja.

Potreban je za razvoj i funkcioniranje mozga, a u ljudskom tijelu ima važnu ulogu u sintezi amonijaka.^[93] Glikolizacija Asn ima važnu ulogu u strukturi proteina i njihovoj funkciji.^[94–96]



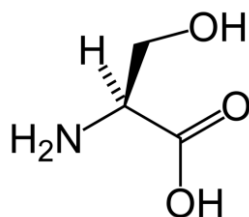
Slika 11. Shematski prikaz strukture asparagina. Prema referenci [97].

2.3.4. Serin

Serin je neesencijalna aminokiselina čiji bočni ogranak sadrži $-\text{CH}_2\text{OH}$ skupinu zbog čega se ta aminokiselina klasificira kao polarna. Jedna je od prirodno zastupljenih proteogenih aminokiselina. Prvi je put izoliran iz proteina svile 1854. godine, a ime je dobio prema latinskom nazivu za svilu, *sericum*. Struktura Ser riješena je 1902. godine.^[98]

U metabolizmu sinteza Ser započinje oksidacijom 3-fosfoglicerata (koji nastaje glikolizom) dok se u industrijske svrhe L-Ser dobiva fermentacijom. U laboratoriju se racemična smjesa Ser može dobiti iz metil akrilata u nekoliko koraka.

Bitna je aminokiselina u metabolizmu jer sudjeluje u biosintezi purina i pirimidina. Prekursor je nekoliko aminokiselina poput glicina i cisteina te triptofana u bakterijama. Jedna od bitnijih uloga Ser je katalitička funkcija enzima. Dokazano je da se pojavljuje u aktivnim mjestima kimotripsina i tripsina, ali i mogih drugih enzima. Mnogi insekticidi, uključujući otrovne plinove, djeluju na principu kombinacije bočnog ogranka Ser i aktivnog mjesta acetilkolin esteraze, potpuno inhibirajući enzim.



Slika 12. Shematski prikaz serina. Prema referenci [99].

2.3.5. Lizin

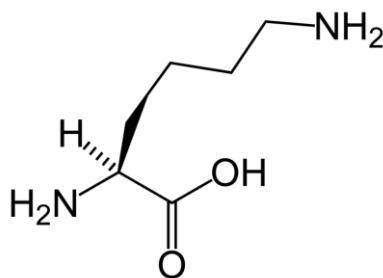
Lizin je α -aminokiselina molekulske formule $C_6H_{14}N_2O_2$ koju bočni ogranak pri fiziološkoj pH vrijednosti svrstava u skupinu pozitivno nabijenih alifatskih aminokiselina. Lizin je baza (poput arginina i histidina), a ϵ -amino skupina često tvori vodikove veze.^[6]

Lizin je esencijalna aminokiselina stoga se u tijelo mora unijeti hranom. U biljkama i većini bakterija, sintetizira se iz Asp. Iz Lys, metabolizmom u sisavaca, nastaje acetyl-CoA (acetyl koenzim A). Bakterijskim raspadanjem Lys, dekarboksilacijom, nastaje kadaverin. Njegovi derivati se koriste u sintezi elastina i kolagena.

Može se sintetizirati iz kaprolaktama pri čemu se dobije racemat. U industriji, L-Lys se najčešće dobiva procesom fermentacije *Corynebacterium glutamicum* čime se godišnje dobije preko 600 000 tona te aminokiseline.

Dobar izvor Lys je visokoproteinska hrana poput jaja, mesa (crveno meso, janjetina, svinjetina), soje, graška, sira (pogotovo *Parmesan*) i ribe, primjerice sardine. U jako malim koncentracijama se može pronaći i u žitaricama, dok je u mahunarkama zastupljen u mnogo većim koncentracijama.

Ima važnu ulogu u apsorpciji kalcija, gradnji mišićnih proteina, oporavku od sportskih ozljeda ili operacija i tjelesnoj proizvodnji hormona, enzima i antitijela.



Slika 13. Shematski prikaz lizina. Prema referenci [100].

2.4. Taloženje kalcijevih fosfata u prisutnosti aminokiselina

Biominerale, nastali u živim organizmima, često imaju izuzetna mehanička, električna i magnetska svojstva.^[101-105] To je posljedica prisustva organske matrice koja kontrolira nastajanje anorganske faze. Najpoznatiji i možda najsloženiji primjer je nastajanje kosti, organsko-anorganskog kompozitnog materijala građenog od kolagena, nekolagenskih proteina (*eng. Non-collagenous protein, NPC*) i HA.^[101] Kolagenska vlakna stvaraju tzv. izvanstaničnu matricu u kojoj dolazi do nukleacije i rasta HA. Nukleaciju HA iniciraju negativno nabijeni fosforizirani NPC-i povezani s izvanstaničnim matriksom. Takvi proteini privlače Ca^{2+} i PO_4^{3-} ione čime se povećava lokalna prezasićenost do razine dovoljne za stvaranje kritičnog nukleusa.^[101,102] Osim toga, NPC-i mogu stabilizirati HA u tkivima. Inhibitorski proteini su ili povezani s izvanstaničnim matriksom tkiva ili se nalaze u plazmi gdje spriječavaju nastajanje HA vezanjem na površinu početnog nukleusa čime onemogućavaju njegov daljnji rast.^[103]

Da bi se razumijeli osnovni principi biomineralizacije, potrebno je istražiti utjecaj manjih biomolekula, kao što su aminokiseline i peptidi, na mineralizaciju HA. Aminokiseline s negativno nabijenim bočnim ograncima, kao što su Asp, glutaminska kiselina (Glu) i fosfoserin (PSer) vrlo su zastupljene u kiselim domenama NPC-a. Novija istraživanja pokazala su da su i pozitivno i negativno nabijene aminokiseline zastupljene u dijelu strukture kolagena u kojemu dolazi do nukleacije HA.^[105]

In vitro istraživanja pokazala su da, slično kao i proteini, i nabijene aminokiseline imaju sposobnost inhibiranja ili induciranja mineralizacije HA.^[106-108] Aminokiseline mogu utjecati na morfologiju i kristalnu strukturu HA.^[107,109-111] Za razliku od proteina i peptida koji imaju dugačke lance i često se „smataju“ u trodimenzionalne konformacije, aminokiseline su mnogo manje (prosječno 7 nm) i imaju kratke bočne ogranke. Za razliku od proteina i peptida, jedna aminokiselina ne može se vezati na više kristala HA odjednom.^[112-115] S druge strane, aminokiseline koje inhibiraju mineralizaciju su potencijalni kandidati za liječenje patoloških bolesti prouzročenih prevelikom mineralizacijom HA u tkivima kao što su hrskavice, krvne žile i srčani zalisci.^[116,117]

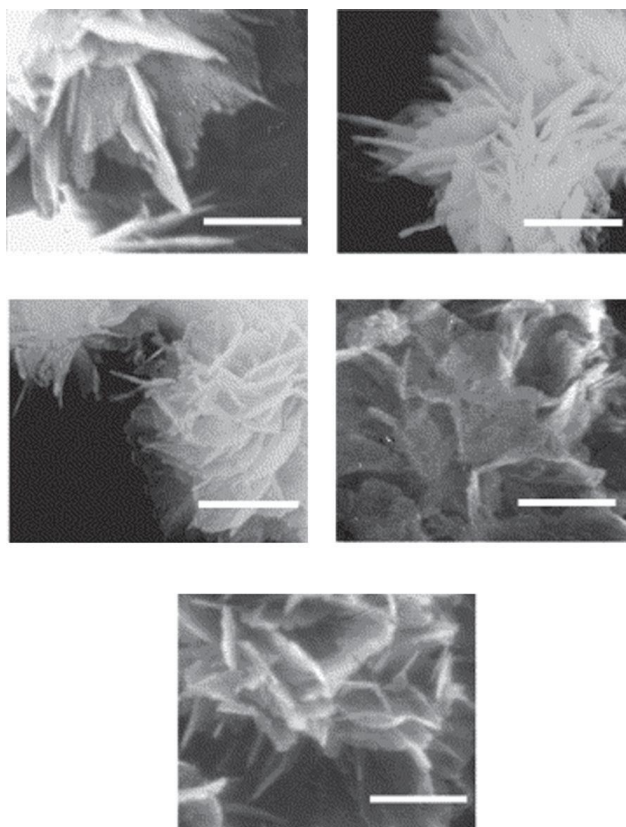
In vitro istraživanjima dokazano je da aminokiseline s nabijenim bočnim ograncima različito utječu na taloženje HA, ovisno o tome jesu li otopljene ili vezane na površinu.^[106,108,118-128] Otopljene aminokiseline mogu ili kelirati Ca^{2+} i PO_4^{3-} ione u otopini ili se adsorbirati na površinu nukleusa HA inhibirajući njegov daljnji rast.^[106,118-128] S druge strane, aminokiseline

vezane na površinu imaju mogućnost indukcije kristalizacije HA-a akumulirajući Ca^{2+} i PO_4^{3-} ione pri čemu dolazi do povećanja lokalnog prezasićenja što promovira heterogenu nukleaciju HA.^[108]

Neovisno o naboju, otopljene aminokiseline mogu inhibirati taloženje HA. Pri tome aminokiseline s nabijenim bočnim ograncima poput Glu, Asp, Asn i Lys pokazuju znatno veći utjecaj od nenabijenjenih.^[106,107,128] To posljedica jačeg međudjelovanja između nabijenih bočnih ograna aminokiselina i Ca^{2+} i PO_4^{3-} iona, kao i jače međudjelovanje s površinom već stvorenih čestica HA u otopini.^[129]

Adsorpcija aminokiselina na površinu HA ovisi o naboju bočnih ograna i povećava se u nizu: nepolarne (Phe) < pozitivno nabijene (Lys) < polarne (Ser) < negativno nabijene (Asp).^[128] Među nenabijenim aminokiselinama, tirozin (Tyr) i Phe pokazali su najveći afinitet prema površini HA što je posljedica prisustva aromatskog prstena.^[119,121] Aromatski prsten se na površini čestice može ponašati kao elektron donor i stvarati slabu vezu s površinom HA.

Novija istraživanja ukazuju da aminokiseline utječu i na morfologiju i na mehanizam transformacije HA.^{[123,130],[131]} Tao i sur. pokazali su kako dodatak glicina (Gly) u smjesu u kojoj dolazi do nukleacije HA rezultira stvaranjem jednodimenzionalnih štapićastih kristala, dok u prisutnosti Glu nastaju dvodimenzionalni pločasti kristali. Predložili su model prema kojemu se amorfna faza ponaša kao vezivni materijal koji povezuje štapićaste ili pločaste kristale kako bi se stvorio HA poput onog u kostima.^[130] Matsumoto i sur. dokazali su kako dodatkom Gly, Ser, Asp ili Glu u otopinu u kojoj dolazi do nukleacije i taloženja HA nastaju pahuljasti kristali (Slika 14.). Takva morfologija opažena je i u kontrolnom sustavu (sustavu bez dodatka aminokiselina), no u tom su slučaju pahuljasti kristali bili veći. Pretpostavlja se da navedene aminokiseline smanjuju stupanj kristalizacije HA stabilizirajući ACP.^[123] Kristali pahuljaste morfologije u prisustvu aminokiselina poput Asp, Glu i Ser dobili su i Eiden-Aßmann i sur.^[132]



Slika 14. Mikrografije dobivene pretražnom elektronskom mikroskopijom istaloženih kristala HA bez prisustva aminokiselina a) i s dodatkom b) Gly, c) Ser, d) Asp i e) Glu. Skala bara je 300 nm. Preuzeto iz reference [123].

Unatoč potencijalnoj ulozi aminokiselina u kontroli taloženja HA, mehanizam međudjelovanja aminokiselina s Ca^{2+} i PO_4^{3-} ionima i kristalima HA, čime se inducira ili inhibira biomineralizacija, još nije do kraja razjašnjen. Naime, različite grupe došle su do kontradiktornih rezultata o promotorskim ili inhibitorским učincima pojedinih aminokiselina, što je posljedica različitih eksperimentalnih uvjeta primjenjenih u pojedinim istraživanjima. To omogućuje donošenje vrlo općenitih zaključaka, bez stvarnog uvida u mehanizam djelovanja.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Priprema ishodnih otopina

Ishodne otopine kalcijevog klorida i natrijevog hidrogenfosfata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) te natrijevog klorida ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) pripremljene su otapanjem točne odvage analitički čistih $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich), Na_2HPO_4 (Riedel-de Haen) i NaCl (Sigma Aldrich) u MiliQ vodi. Sve kemikalije prethodno su bile sušene u vakuum sušioniku preko noći.

Ishodne otopine Phe, Asp, Asn, Ser i Lys (Sigma Aldrich) pripremljene su na jednak način.

3.2. Priprema taložnih sustava

Za pripremu taložnih sustava korištene su otopine anionske i kationske komponente dobivene razrjeđivanjem ishodnih otopina Na_2HPO_4 i CaCl_2 na koncentraciju $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$. Objе komponente sadržavale su i $0,15 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$. U otopini anionske komponente, pH ($\text{pH}_{\text{poč}}$) je podešen na 7,4 upotrebom koncentrirane klorovodične kiseline (Kemika).

Kontrolni taložni sustavi dobiveni su brzim miješanjem jednakih volumena (20 mL) otopina anionske i kationske komponente tako da su početne koncentracije reaktanata u taložnim sustavima iznosile $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,005 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$. Svi eksperimenti su provedeni na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ uz magnetsko miješanje.

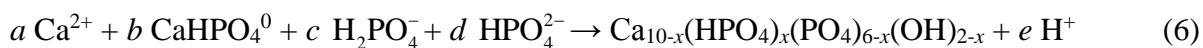
Potrebni volumeni ishodnih otopina aminokiselina dodavani su u otopine anionske komponente. Taložni sustavi koji su sadržavali aminokiseline pripremljeni su na jednak način kao i kontrolni sustav. Koncentracije aminokiselina u taložnim sustavima iznosile su 1 mol dm^{-3} , $2,5 \text{ mol dm}^{-3}$ i 5 mol dm^{-3} .

Uzorci za analizu dobiveni su filtriranjem suspenzija nakon 10, 30 i 60 min kroz Milipore filter papir promjera pora $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. Dobiveni talozi isprani 3 puta s MiliQ vodom, 1 puta s etanolom, osušeni u struji dušika i čuvani u eksikatoru do daljnje analize.

3.3. Metode

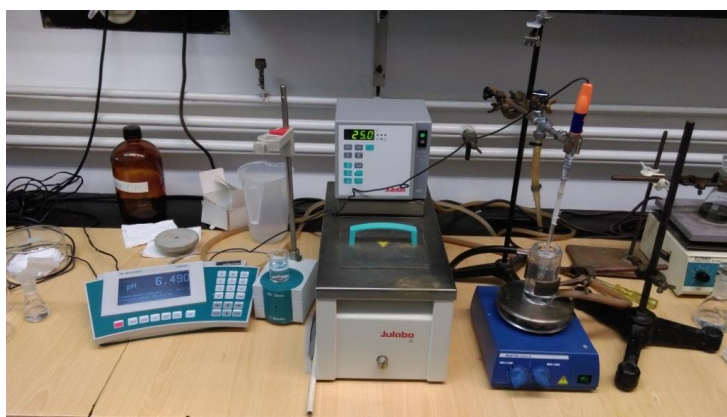
3.3.1. Potencijometrija

Taloženje kalcijevih fosfata praćeno je promjenom pH:



pa praćenje promjene pH omogućava praćenje napredovanja reakcije.

Za mjerenje pH taložni sustavi pripremljeni su u termostatiranoj posudi kako bi se omogućila kontrola temperature (Slika 15.). Promjena pH se pratila na Metrohm 701 pH/ion metru pomoću staklene elektrode Sentek baždarene s Metrohm puferima pH 4, 7 i 9. Za svaki taložni sustav mjerenja su ponovljena najmanje 3 puta. Taložni eksperimenti provedeni su pri 25 °C uz magnetsko miješanje.



Slika 15. Aparatura za pripremu taložnih sustava i potencijometrijsko praćenje napredovanja reakcije.

3.3.2. Karakterizacija taloga

Na temelju mjerenja pH određeni su vremenski intervali u kojima se analizirao nastali talog pomoću *Fourier-transform* infracrvenom spektroskopijom (FTIR), difrakcijom na polikristalnom uzorku (PXRD), pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) i transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM).

3.3.3. FTIR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija jedna je od najčešće korištenih spektroskopskih tehnika za određivanje sastava uzorka. Temelji se na interakciji infracrvenog dijela elektromagnetskog zračenja i uzorka. Molekula može apsorbirati infracrveno (IR) zračenje samo onda kada se tijekom vibracije mijenja dipolni moment. Što je promijena dipolnog momenta veća, IR apsorpcijska vrpca jačeg je intenziteta. Frekvenciju i valni broj (ν) vibracije određuju jačina veze i mase atoma sa svake strane veze.^[133] Spektar dobiven IR analizom je u vremenskoj domeni pa se Fourierovom transformacijom pretvara u spektar u frekvencijskoj domeni, FTIR spektar. Transmisijski spektri omogućuju kvalitativnu, a apsorpcijski kvantitativnu analizu. Infracrvenom spektroskopijom mogu se snimati kruti, tekući i plinoviti uzorci, a moguća je i kombinacija IR spektrometra sa mikroskopom što omogućuje IR oslikavanje i mapiranje.^[134] Uzorci su snimljeni metodom prigušene totalne refleksije (ATR) pri čemu se uzorak stavlja na ATR element odnosno tvar visokog indeksa loma i slabe topljivosti u vodi (ZnSe, Ge, dijamant). FTIR spektri snimljeni su na Tensor II Brücker spektrofotometru na Zavodu za kemiju materijala, Institut Ruđer Bošković.

3.3.4. Rendgenska difrakcija na praškastom uzorku

Difrakcija rendgenskih zraka na praškastom uzorku analitička je metoda za određivanje kemijskog sastava i kristalografskih karakteristika. Difrakcija je posljedica raspršenja rendgenskih zraka na elektronima. Rezultat rendgenske difrakcijske analize je difraktogram koji prikazuje ovisnost intenziteta raspršenog zračenja o kutu 2θ . Iz difraktograma polikristalnog uzorka mogu se dobiti informacije o kristalnoj strukturi, karakteristikama uzorka i parametrima instrumenta. Iz položaja difrakcijskog maksimuma mogu se dobiti informacije o parametrima jedinične ćelije, dok se iz intenziteta mogu dobiti informacije o kristalnoj strukturi. Iz širine i oblika difrakcijskog maksimuma mogu se dobiti informacije o deformaciji kristalne rešetke, dok se iz intenziteta i oblika šuma može izračunati eventualni udio amorfne faze u uzorku.^[135]

Difraktogrami praškastih uzoraka dobiveni su na Rigaku Ultima IV Multipurpose difraktometru korištenjem $\text{CuK}\alpha$ zračenja (CIM, Rovinj, Institut Ruđer Bošković). Uzorak je sekniran u

području 2θ od 3° do 60° u koracima po $0,02^\circ$. Dobiveni difraktogrami su uspoređeni s onima u literaturi.

3.3.5. Pretražna elektronska mikroskopija

Elektronski mikroskop je vrsta mikroskopa kod kojeg se uzorak promatra pomoću snopa elektrona. Ubrzani se elektroni u vakuumu ponašaju poput svjetlosti vrlo kratke valne duljine, a električno i magnetno polje na njih imaju isti učinak kao što staklene leće i zrcala imaju na svjetlosne zrake. Moć razlučivanja elektronskih mikroskopa je oko 1 \AA .^[136]

SEM se koristi za određivanje strukture i mikrostrukture uzorka. Pomoću sustava elektromagnetskih leća elektroni se usmjeravaju prema površini uzorka, a razlučivanje i dubina prodiranja (od nekoliko nm do nekoliko μm) ovise o naponu, materijalu uzorka i veličini *spota* (presjek snopa na mjestu dodira s uzorkom). SEM slika nastaje kada fokusirani snop elektrona skenira površinu ispitivanog uzorka (niz međusobno paralelnih linija) te se istovremeno iscrtava u puno većem mjerilu na fluorescentnom zastoru. SEM metoda ima prednost pred drugim metodama jer ima mogućnost da objekti različite „visine“ na površini uzorka ostanu u fokusu (tzv. dubina polja). Uzorci za SEM analizu mogu biti u bilo kojem stanju, no moraju biti vodljivi. Uzorke koje nisu vodljivi je potrebno naporiti vodljivim materijalom, najčešće oko 2 nm električnog vodiča (C, Au, Al ili Pt). Važni SEM signali su sekundarni elektroni (SE), elektroni raspršeni unazad (*eng. Backscattered electrons, BSE's*) i rendgenske zrake. SE su elektroni atoma koji su izbačeni uslijed međudjelovanja s primarnim elektronima iz snopa. BSE su primarni elektroni iz snopa koji su se odbili nazad od površine uzorka uslijed elastičnih međudjelovanja s jezgrom atoma iz uzorka. Rendgenske zrake služe za kvalitativnu elementarnu analizu.^[136]

Uzroci za SEM analizu pripremljeni su nanošenjem suhog praha taloga na nosač prekriven ugljikovim ljepljivom. SEM mikrofotografije snimljene su na JSM 7000F pretražnom elektronskom mikroskopu na Zavodu za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković.

3.3.6. Transmisijska elektronska mikroskopija

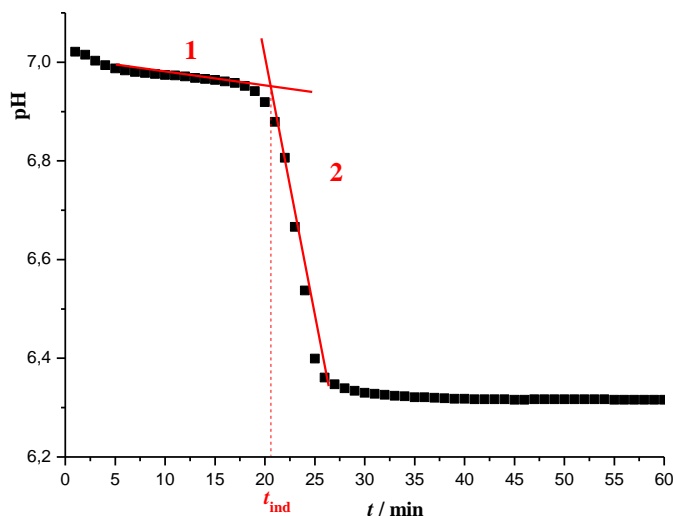
Transmisijski elektronski mikroskop kao izvor elektrona koristi termionski top (termička emisija) ili topove koje rade na principu emisije poljem. Ubrzavajući potencijal ove tehnike je od 80 do 400 kV, a odgovarajuća razlučivost od 0,56 do 0,13 nm. U TEM se koriste

transmitirani i difraktirani elektroni za dobivanje mikrografija i difrakcijskih slika, a emitirano rentgensko zračenje za kemijsku analizu. Za TEM analizu, uzorak mora biti jako tanka folija (100 nm). Osim krutih uzoraka, ovom tehnikom je moguće snimati i tekuće uzorke.^[136]

TEM mikrografije uzoraka dobivene su koristeći Zeiss TEM 20A (Oberkochen, Njemačka) instrument koji radi pri 80 kV. Za analizu transmisijskom elektronskom mikroskopijom, kap suspenzije je postavljena na bakrenu mrežicu presvučenu Formvar membranom. Supernatant je uklonjen filterpapirom, a talozi su isprani tri puta MiliQ vodom. Nakon uklanjanja suviška vode, talozi su osušeni u struji dušika i čuvani u hladnjaku do daljnje analize.

3.3.7. Obrada podataka

Vrijeme indukcije (t_{ind}), vrijeme proteklo od iniciranja taložnog procesa do početka transformacije ACP-a, određuje se prateći promjenu pH vrijednosti taložnih sustava s vremenom. Dobivena krivulja je sigmoidalnog oblika, a vrijeme indukcije određuje se iz presjecišta dvaju pravaca dobivenih linearnom regresijom dijelova krivulja različitog nagiba (1 i 2), Slika 16.



Slika 16. Potenciometrijsko određivanje vremena indukcije.

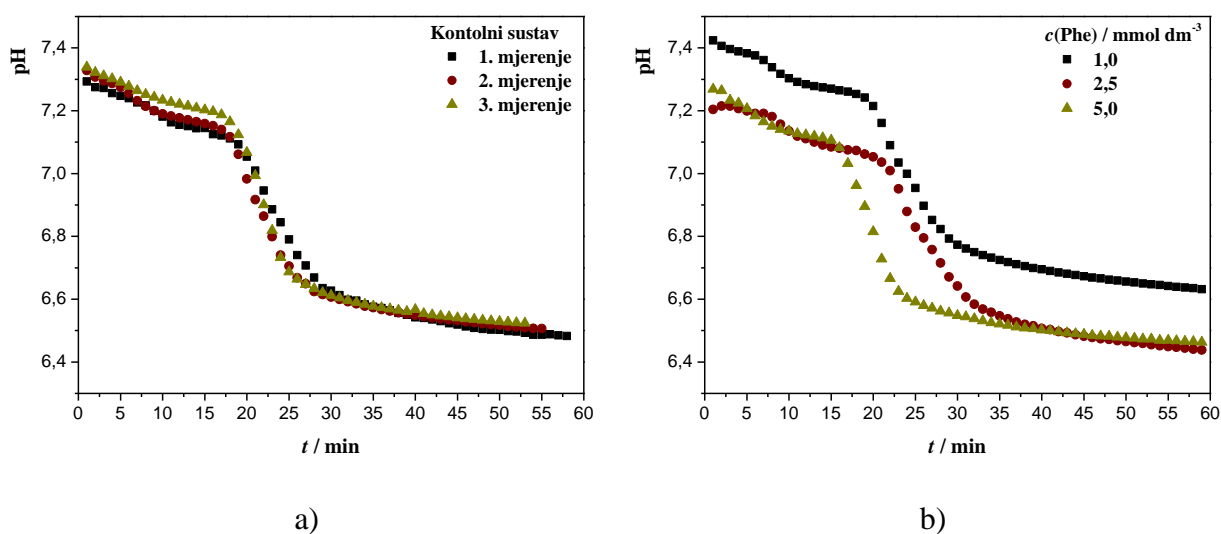
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Utjecaj aminokiselina na vrijeme indukcije

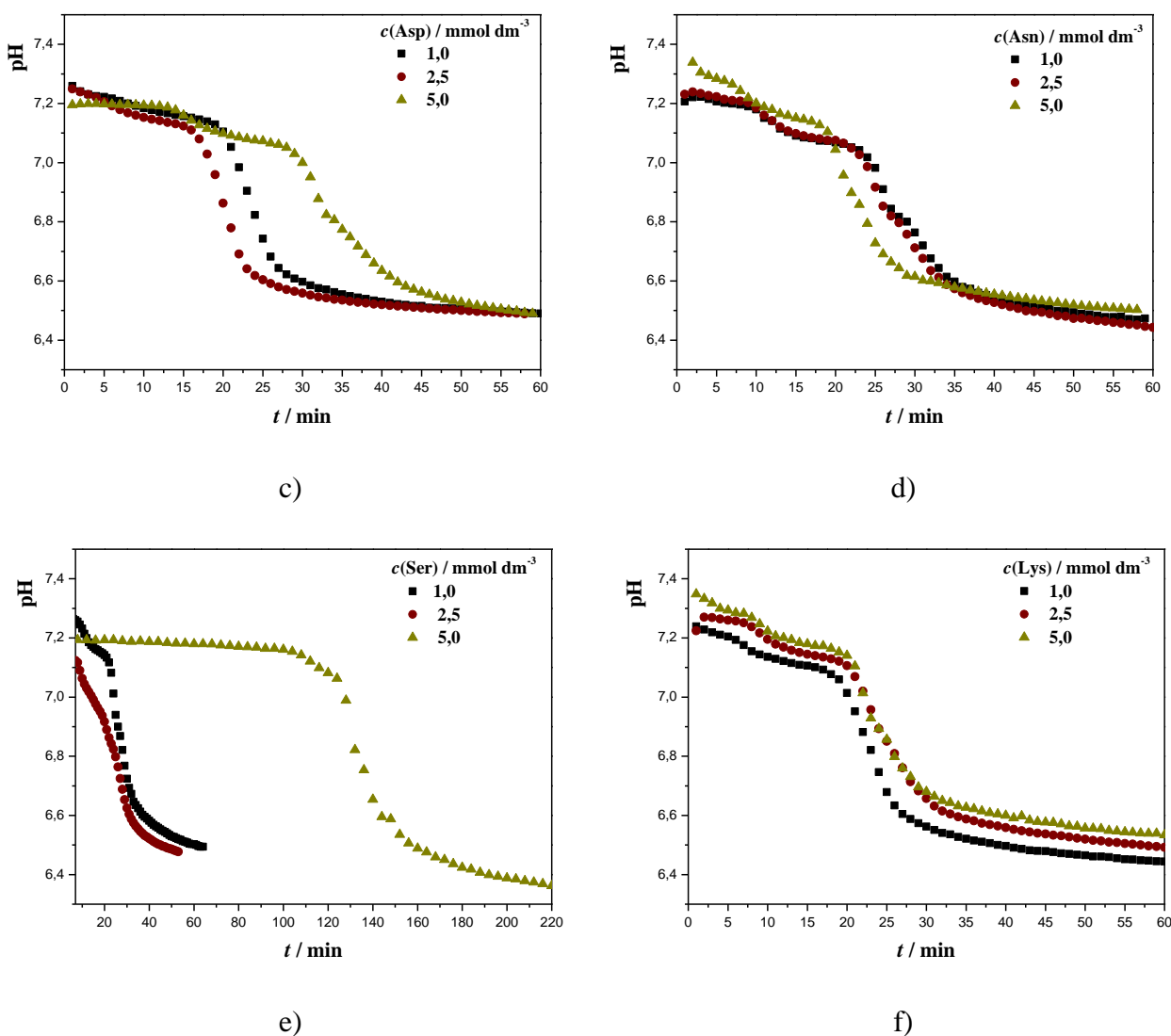
Na Slici 17. prikazane su pH krivulje dobivene taloženjem CaP u proučavanim taložnim sustavima. Sigmoidalan oblik tih krivulja karakterističan je za reakcije koje uključuju nukleaciju i nastajanje kristala. Tri karakteristična područja na krivuljama odgovaraju:

1. nastajanju ACP-a tijekom kojega ne dolazi do značajnije promjene pH,
2. sekundarnom taloženju kristalne faze na ACP-u praćenom značajnom promjenom pH,
3. kristalnom rastu i transformaciji tijekom kojeg se pH značajno ne mijenja.

Vremena indukcije (t_{ind}) dobivena su iz presjecišta pravaca dobivenih linearnom regresijom na prva dva dijela krivulje (Tablica 3.). Za svaku koncentraciju aminokiseline, kao i za kontrolni sustav, provedeno je najmanje 3 mjerenja.



Slika 17. Promjena pH vrijednosti u ovisnosti o vremenu u a) kontrolnom sustavu početnih koncentracija reaktanata $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i sustavima s dodatkom aminokiselina: b) Phe, c) Asp, d) Asn, e) Ser, f) Lys koncentracija 1, 2,5 i 5 mmol dm^{-3} . Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.



Slika 17. Nastavak.

Tablica 3. Vremena indukcije (t_{ind}) i pripadna standardna odstupanja za kontrolni sustav ($c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$) i sustave s različitim koncentracijama aminokiselina. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

Kontrolni sustav	$(t_{\text{ind}} \pm \text{SD}) / \text{min}$				
	$17,9 \pm 0,5$				
$c(\text{AK}) / \text{mmol dm}^{-3}$	Phe	Asp	Asn	Ser	Lys
1,0	$18,8 \pm 1,1$	$21,4 \pm 1,5$	$21,5 \pm 0,7$	$20,3 \pm 1,0$	$17,4 \pm 1,1$
2,5	$20,8 \pm 0,5$	$16,4 \pm 0,5$	$22,2 \pm 0,2$	$18,8 \pm 1,6$	$19,7 \pm 0,3$
5,0	$15,9 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,2$	$16,7 \pm 0,9$	$113,7 \pm 6,3$	$19,3 \pm 0,1$

Na temelju određenih vremena indukcije vidljivo je da istraživane aminokiseline pokazuju mali inhibitori učinak na taloženje CaP. Naime, t_{ind} kontrolnog sustava manje je od t_{ind} sustava u kojima su dodane aminokiseline. Značajniji inhibitori učinak opažen je jedino u prisutnosti 5 mmol dm⁻³ Ser. Nadalje, nije uočena korelacija između vremena indukcije i koncentracije pojedine aminokiseline.

U dosadašnjim istraživanjima pokazano je da otopljene aminokiseline mogu inhibirati taloženje i rast CaP. Polarne aminokiseline s pozitivno ili negativno nabijenim bočnim ograncima pokazuju najveći inhibitori učinak. Takav učinak, u nešto manjoj mjeri imaju i nenabijene aminokiseline od kojih su se kao jači inhibitori pokazale polarne aminokiseline u odnosu na nepolarne.^[129] To je i za očekivati s obzirom da su međudjelovanja malih molekula i kristala uglavnom elektrostatske prirode.^[11]

Koutsopoulos i Dalas pokazali su kako među aminokiselinama s hidrofobnim bočnim ogrankom, Phe ima najveći inhibitori učinak.^[119] Navedena skupina aminokiselina općenito ima najmanji adsorpcijski afinitet prema površini HA, što je objašnjeno stereokemijskim čimbenicima.^[137] Pri fiziološkim uvjetima (pH ≈ 7,4) navedene aminokiseline su nenabijene i zato ne dolazi do međudjelovanja s pozitivno i negativno nabijenim dijelovima površine HA. Unatoč tome, Phe je snažan inhibitor kristalizacije HA čak i pri malim koncentracijama što je posljedica toga da, pri adsorpciji, planarni aromatski prsten bočnog ogranka zauzima veliku površinu kristala HA. Pretpostavljeno je da se aromatski prsten ponaša kao mogući elektron π -donor što rezultira stvaranjem slabe veze između Phe i površine HA.^[119,138]

Tavafoghi i sur. pokazali su da Asp najučinkovitije inhibira nukleaciju HA.^[129] To je pripisano nastajanju kompleksa veće stabilnosti Asp s Ca²⁺ i PO₄³⁻ ionima. Suprotno tome, Boanini i sur. su pokazali da Asp ne inhibira nukleaciju CaP.^[139] No, obje skupine autora složile su se kako Asp inhibira kristalni rast CaP.

Spanos i sur. pokazali su da Ser inhibira nastajanje kristala HA adsorpcijom na površinu čime se blokiraju aktivna mjesta rasta. Adsorpcija slijedi Langmuirovu izotermu i objašnjava se elektrostatskim međudjelovanjem između negativno nabijenih područja površine kristala HA (PO₄³⁻ ili OH⁻ ioni) i pozitivnog naboja na -NH₂ skupini Ser.^[140]

Jack i sur. su utvrdili da pozitivno nabijeni Lys ima jači afinitet prema površini HA u odnosu na negativno nabijene aminokiseline. Tu su pojavu objasnili smanjenjem odbojnih međudjelovanja između ukupnog negativnog naboja na površini kristala HA i bilo kojeg negativno nabijenog dijela aminokiseline.^[106]

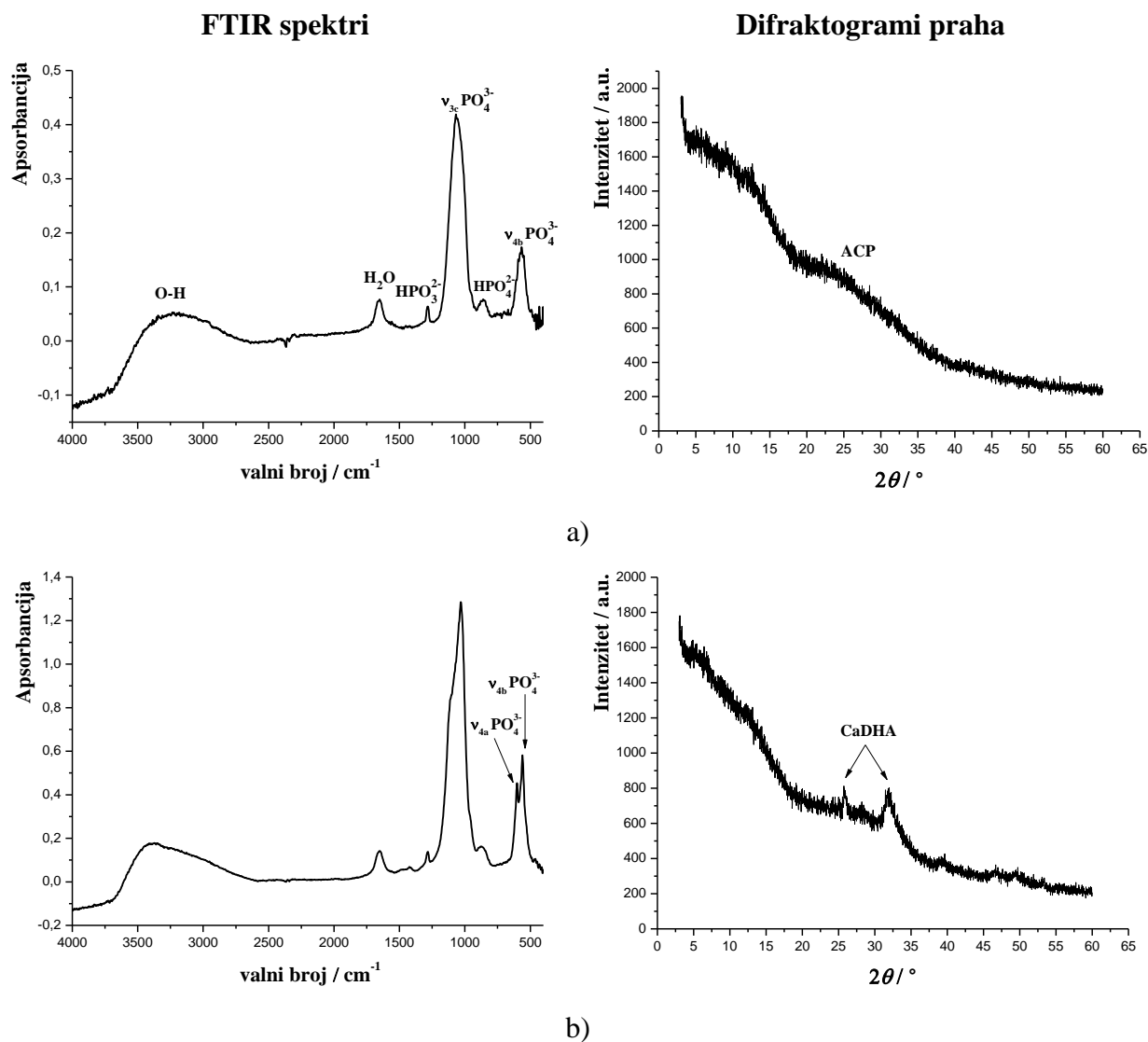
4.2. Utjecaj aminokiselina na sastav i morfologiju taloga

Na temelju potenciometrijskih mjerenja odabrani su vremenski intervali u kojima je izoliran talog te je podvrgnut daljnjoj fizičko-kemijskoj analizi. Vremenski intervali odabrani su tako se prati svaki od tri karakteristična koraka procesa taloženja (nastajanje ACP-a, sekundarno taloženje i kristalni rast). Za karakterizaciju su odabrani oni sustavi u kojima je dodano 5 mmol dm^{-3} aminokiselina (najveća istražena koncentracija).

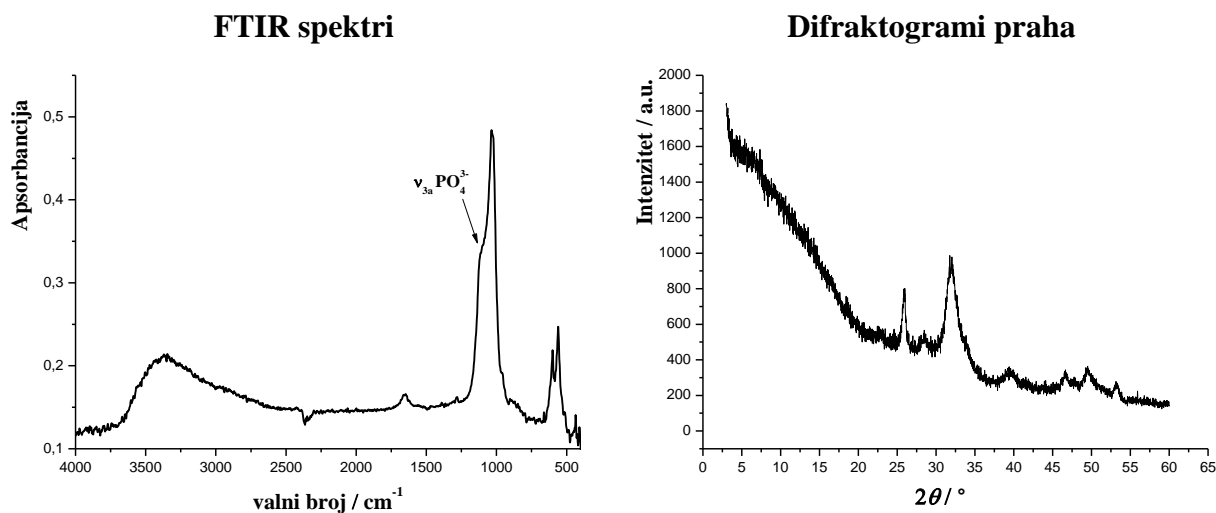
4.2.1. Kontrolni sustav

FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalih u kontrolnom sustavu nakon 10, 30 i 60 min prikazani su na Slici 18., a njihova asignacija dana je u Tablicama 4. i 5.

FTIR spektar i difraktogram praha taloga nastalog nakon 10 minuta ukazuje da je prva nastala faza ACP. U FTIR spektru opažene su vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine ($1283, 1059, 859$ i 572 cm^{-1}), hidroksilne skupine ($3704 - 2797 \text{ cm}^{-1}$) i vode (1644 cm^{-1}).^{[43],[141]} U difraktogramu praha vidljiva je fluktuacija intenziteta pri $2\theta \sim 21^\circ - 34^\circ$ što potvrđuje nastajanje ACP-a (Slika 18. a). Cijepanje vrpce pri $1034, 865, 607, 555 \text{ cm}^{-1}$ u FTIR spektru taloga nastalog nakon 30 minuta kao i pojava difrakcijskih maksimuma pri $2\theta \sim 26^\circ$ i 32° u difraktogramu praha (Slika 18. b) ukazuju na početak transformacije ACP.^[142] Izražajnije cijepanje vrpce pri $1119, 1033, 893, 559$ i 443 cm^{-1} u FTIR spektru taloga nastalog nakon 60 minuta kao i pojava difrakcijskih maksimuma pri višim kutovima karakterističnih za CaDHA^[142] ukazuje da je transformacija ACP-a nakon 60 min završila, a da se kristaliničnost sustava povećava s vremenom (Slika 18. c).



Slika 18. FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalog u kontrolnom sustavu nakon: a) 10 min, b) 30 min i c) 60 min. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.



c)

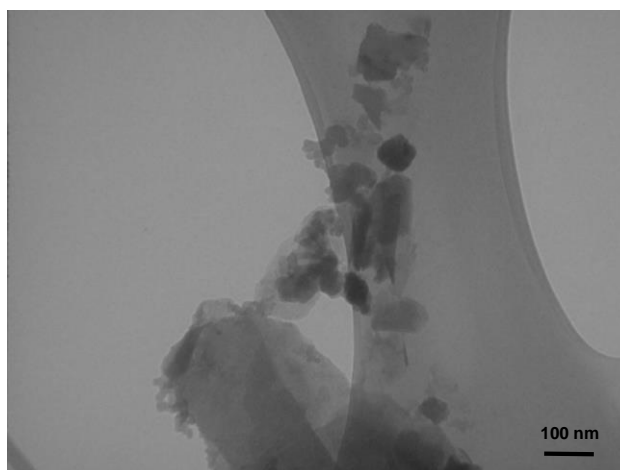
Slika 18. Nastavak.

Tablica 4. Asignacija vrpci FTIR spektra kontrolnog sustava nakon 10, 30 i 60 min. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

ν / cm^{-1}			Asignacija	Ref.
10 min	30 min	60 min		
3704 – 2797	3693 – 2584	3693 – 3040	O–H istezanje (H_2O)	[141]
1644	1655	1648	H–O–H deformacija (H_2O)	[141]
1283	1282		HPO_3^{2-}	[141]
		1119	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
1059	1032	1033	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
859	860	893	HPO_4^{2-}	[143]
	608	606	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
572	547	559	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]

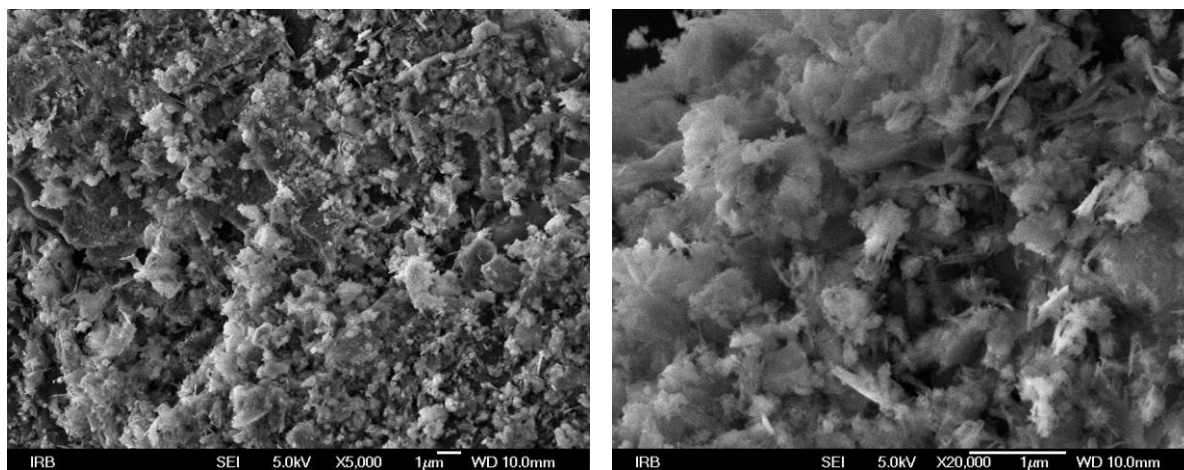
Tablica 5. Asignacija difrakcijskih maksimuma difraktograma praha kontrolnog sustava nakon 30 i 60 min. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

$2\theta / ^\circ$		Faza	Ref.
30 min	60 min		
25,7	26,0	CaDHA	[43,142]
28,2	28,5	CaDHA	[142]
32,1	31,9	CaDHA	[142]
39,2	39,5	CaDHA	[142]
46,7	46,6	CaDHA	[142]
49,8	49,6	CaDHA	[142]
53,3	53,2	CaDHA	[142]

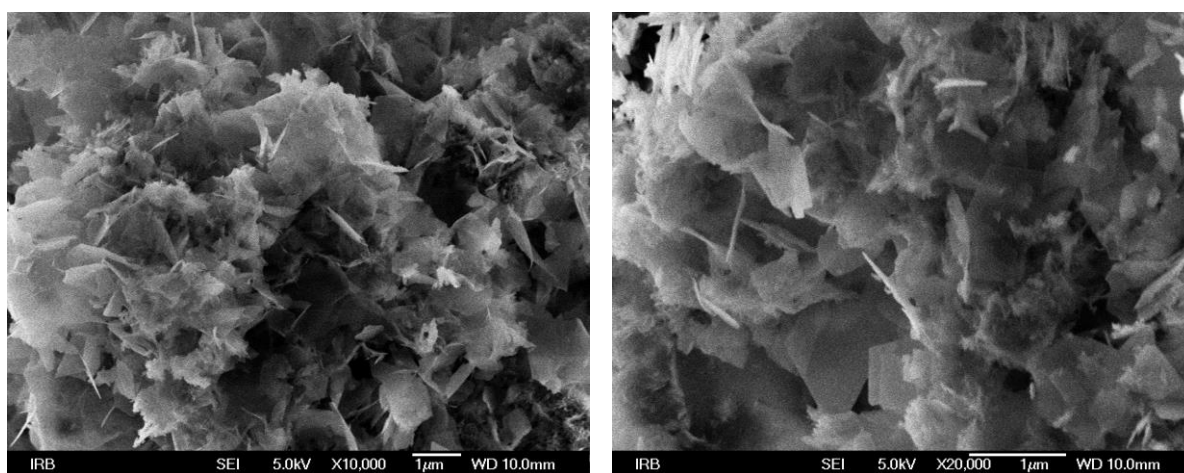


a)

Slika 19. a) TEM mikrogafija taloga nastalog u kontrolnom sustavu nakon 10 min te SEM mikrogafije taloga nastalog nakon b) 30 min i c) 60 min. Početne koncentracije reaktanata iznose: $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.



b)



c)

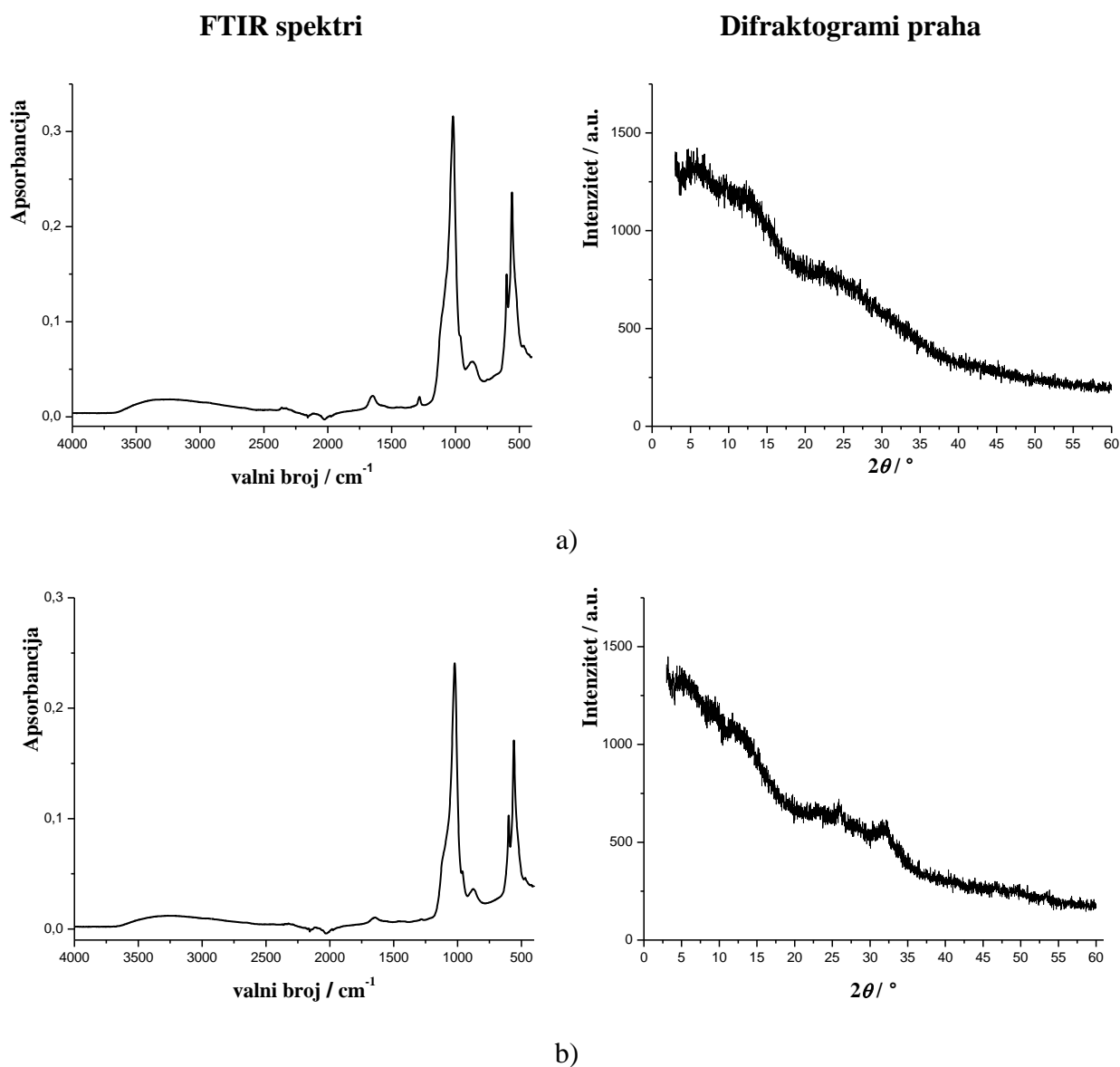
Slika 19. Nastavak.

Opažena transformacija ACP u CaDHA potvrđena je TEM i SEM mikrografijama. Na TEM mikrografiji taloga nastalog nakon 10 minuta vidljivi su karakteristični lančasti agregati sferičnih kuglica ACP-a (Slika 19. a).^[4,43,144] U dodiru s matičnicom, nakon 30 minuta vidljivi su sferični agregati lističavih kristala karakteristični za CaDHA (Slika 19. b).^[43] Daljnjim starenjem (60 min) nastaju veći kristali, a uz sferične agregate uočeni su i pojedinačni kristali (Slika 19. c).

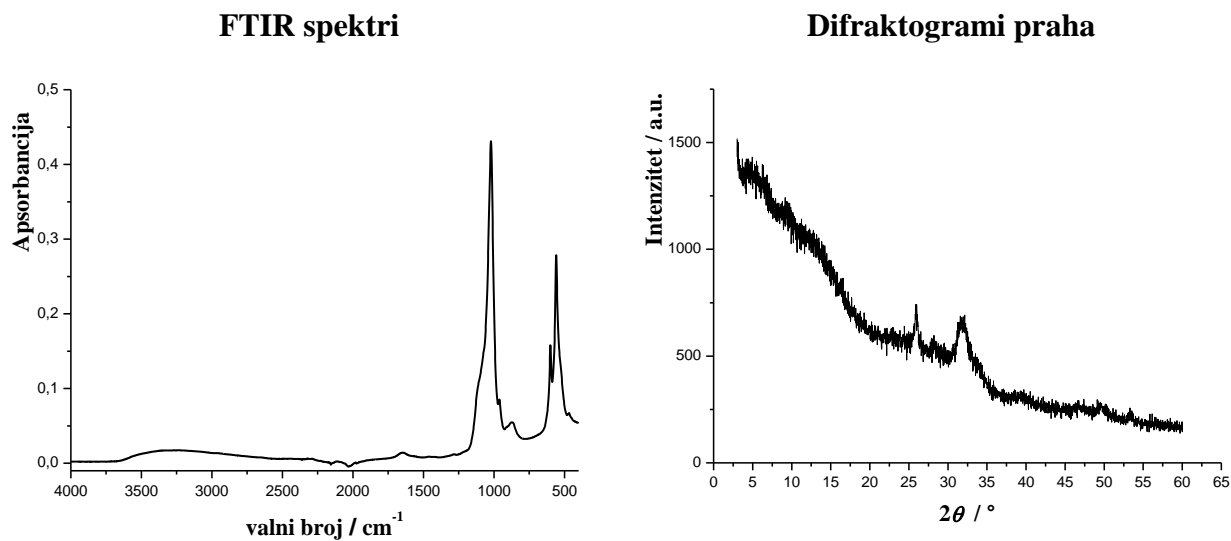
4.2.2. Fenilalanin

FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalih u sustavima s dodatkom 5 mmol dm^{-3} Phe nakon 10, 30 i 60 min prikazani su na Slici 20., a njihova asignacija dana je u Tablicama 6. i 7.

Kao i u kontrolnom sustavu, prva faza koja nastaje je ACP. U FTIR spektru taloga dobivenog nakon 10 min vidljive su vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine pri 1007, 876, 577 i 557 cm^{-1} , hidroksilne skupine u području od 3660 cm^{-1} do 2634 cm^{-1} i deformacije vode pri 1646 cm^{-1} .^[43] U difraktogramu praha vidljiva je samo fluktuacija intenziteta pri $2\theta \sim 22^\circ - 37^\circ$ karakteristična za amorfnu fazu.^[4]



Slika 20. FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalog nakon: a) 10 min, b) 30 min i c) 60 min u sustavu u kojem je dodan fenilalanin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Phe}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.



c)

Slika 20. Nastavak.

Cijepanje fosfatnih vrpci pri 1115, 1016 i 953 cm⁻¹ te 592 i 556 cm⁻¹ u FTIR spektru kao i pojava difrakcijskih maksimuma pri $2\theta \sim 26^\circ$ i 32° u difraktogramu praha taloga nastalog nakon 30 min (Slika 20. b) ukazuje na početak transformacije ACP-a u CaDHA kao i u kontrolnom sustavu.

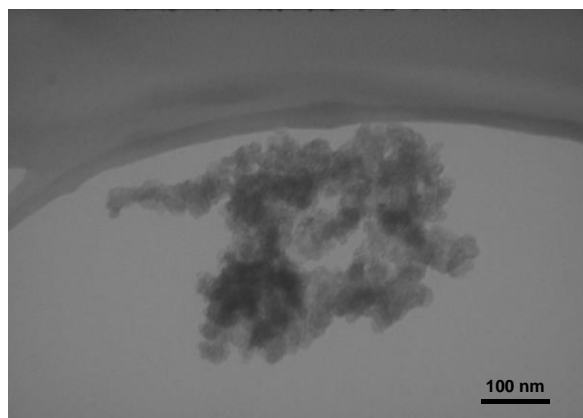
Izražajnije cijepanje vrpci pri 1117, 1023 i 965 cm⁻¹ te 603 i 556 cm⁻¹ u FTIR spektru taloga nastalog nakon 60 min kao i pojava difrakcijskih maksimuma pri višim 2θ vrijedostima karakterističnim za CaDHA, ukazuju da je transformacija ACP nakon 60 minuta završila (Slika 20. c).

Tablica 6. Asignacija vrpce FTIR spektra taloga nastalog nakon 10, 30 i 60 min u sustavu u kojem je dodan fenilalanin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Phe}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

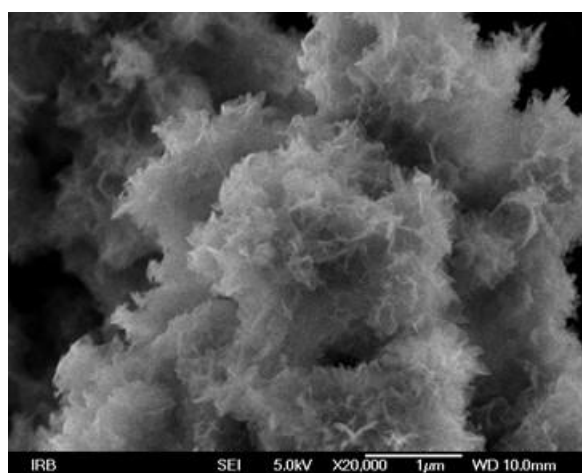
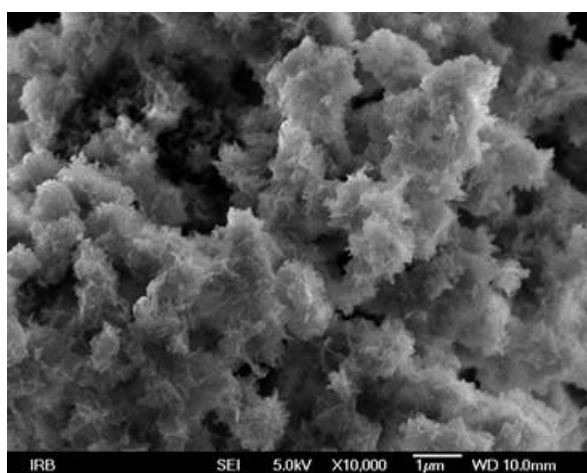
ν / cm^{-1}			Asignacija	Ref.
10 min	30 min	60 min		
3660 – 2634	3641 – 2644	3656 – 2615	O–H istezanje (H_2O)	[141]
1646	1653	1644	H–O–H deformacija (H_2O)	[141]
1287			HPO_3^{2-}	[141]
	1115	1117	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
1007	1016	1023	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
	953	965	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
876	868	867	HPO_4^{2-}	[143]
577	592	603	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
557	556	556	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]

Tablica 7. Asignacija difrakcijskih maksimuma difraktograma praha taloga nastalog nakon 30 i 60 min u sustavu u kojem je dodan fenilalanin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Phe}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje, pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

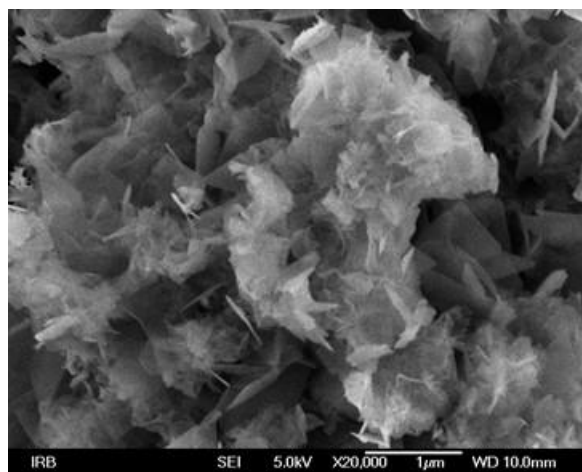
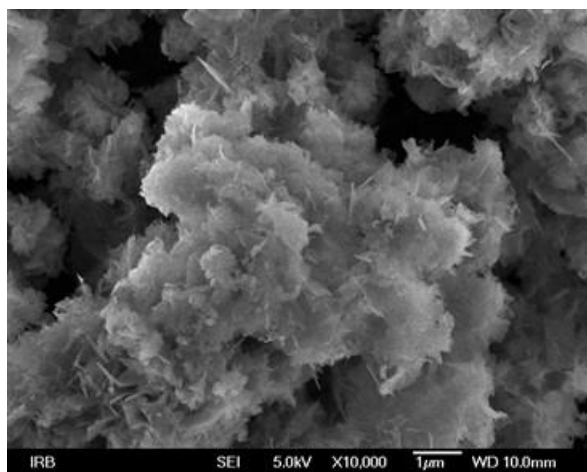
$2\theta / ^\circ$		Faza	Ref.
30 min	60 min		
25,9	25,9	CaDHA	[43,142]
27,9	28,3	CaDHA	[142]
31,9	31,8	CaDHA	[142]
41,7	39,6	CaDHA	[142]
46,4	46,6	CaDHA	[142]
49,2	49,7	CaDHA	[142]
53,5	53,4	CaDHA	[142]



a)



b)



c)

Slika 21. a) TEM mikrografija taloga nastalog nakon 10 min te SEM mikrografije taloga nastalog nakon b) 30 min i c) 60 min u sustavu u kojem je dodan fenilalanin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Phe}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

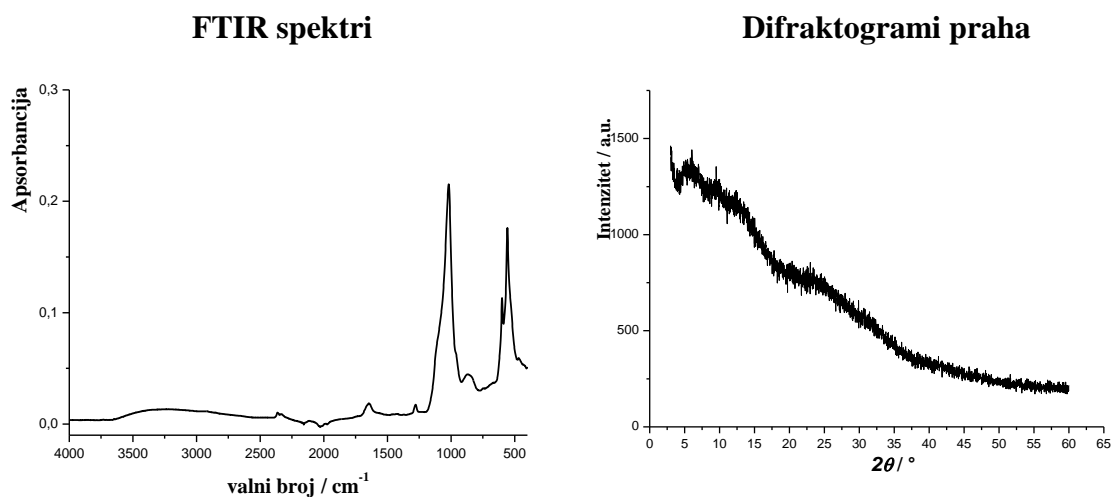
TEM i SEM mikrografije potvrđuju rezultate FTIR i PXRD analize. Lančasti agregati sferičnih kuglica ACP-a dobivenih nakon 10 min (Slika 21. a) transformiraju se u sferične agregate lističavih kristala CaDHA nakon 30 min (Slika 21. b). Nakon 60 min nastaju veći kristali, a u sustavu su osim sferičnih agregata CaDHA prisutni i pojedinačni kristali. Nastali kristali su manji u odnosu na one dobivene u kontrolnom sustavu.

4.2.3. Asparaginska kiselina

Na Slici 22. su prikazani FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalih u sustavima s dodatkom 5 mmol dm^{-3} Asp, dok je asignacija dana u Tablicama 8. i 9.

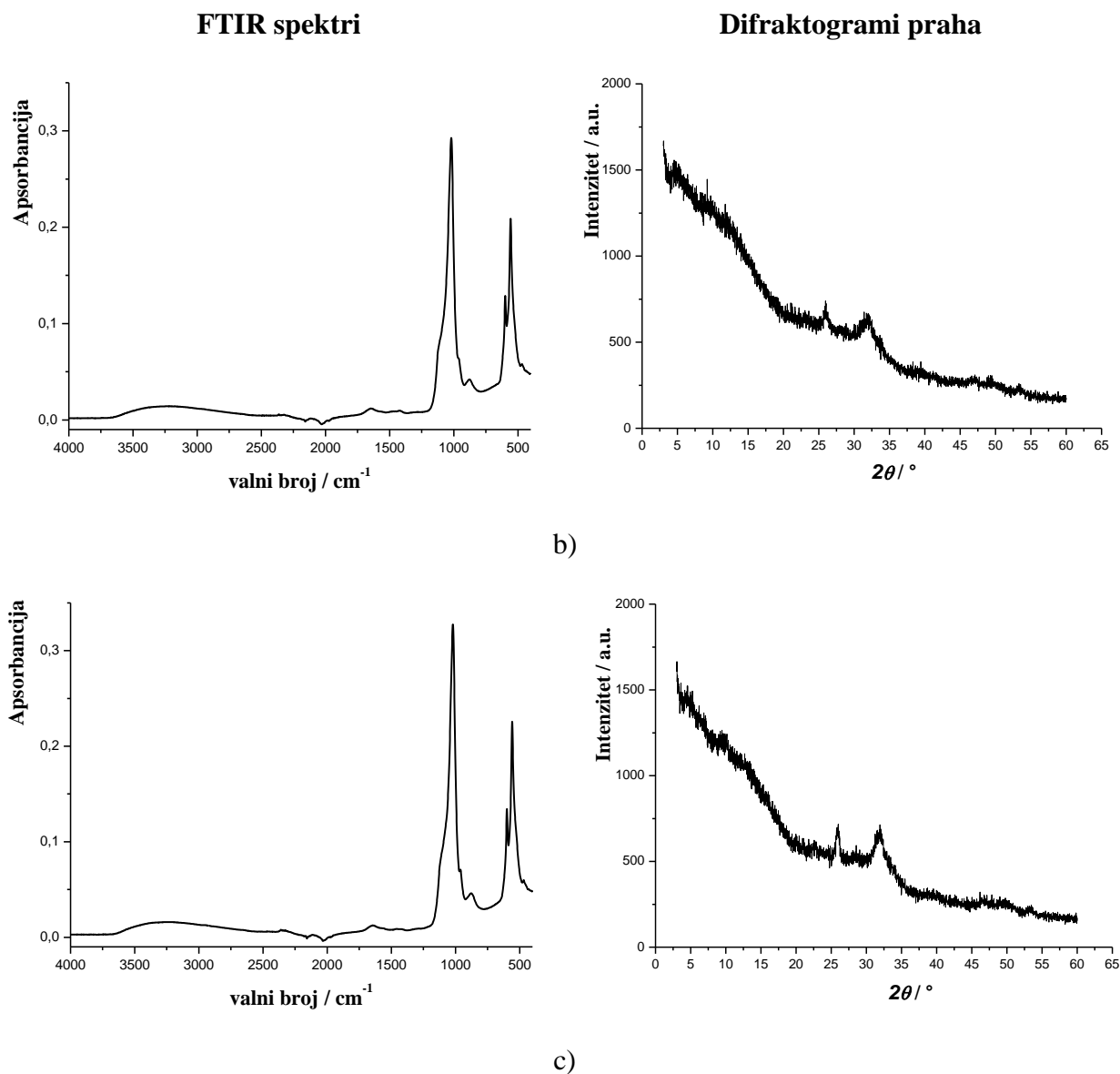
FTIR spektar i difraktogram praha taloga nastalog nakon 10 minuta ukazuju da je i u prisutnosti Asp prva nastala faza ACP. U FTIR spektru opažene su vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine ($1110, 1023, 866, 599, 556 \text{ cm}^{-1}$), hidroksilne skupine ($3626 - 2567 \text{ cm}^{-1}$) i vode (1643 cm^{-1}).^[43] U difraktogramu praha vidljiva je fluktuacija intenziteta između $2\theta \sim 21^\circ - 36^\circ$ što također ukazuje na nastanak ACP-a (Slika 22. a).^[43]

Nakon 30 min u FTIR spektrima se opaža cijepanje vrpce na 1110 i 1020 cm^{-1} te 560 i 556 cm^{-1} , a u difraktogramu praha difrakcijski maksimumi pri $2\theta \sim 26^\circ$ i 32° karakterističnih za CaDHA što ukazuje na početak transformacije ACP-a (Slika 22. b).^[4]



a)

Slika 22. FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalog nakon: a) 10 min, b) 30 min i c) 60 min u sustavu u kojem je dodana asparaginska kiselina. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Asp}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.



Slika 22. Nastavak.

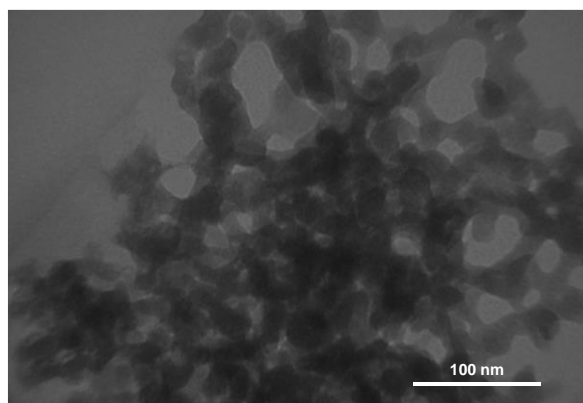
Izražajnije cijepanje vrpce na 1106, 1018 i 961 cm⁻¹ te 590 i 551 cm⁻¹ u FTIR spektru taloga nakon 60 min kao i pojava difrakcijskih maksimuma pri višim 2θ kutovima u difraktogramu praha dokaz je da je transformacija ACP-a završila i da je u sustavu prisutan samo CaDHA. Kristaliničnost CaDHA povećava se s vremenom (Slika 22. c).

Tablica 8. Asignacija vrpce FTIR spektara taloga nastalog nakon 10, 30 i 60 min u sustavu u kojem je dodana asparaginska kiselina. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Asp}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

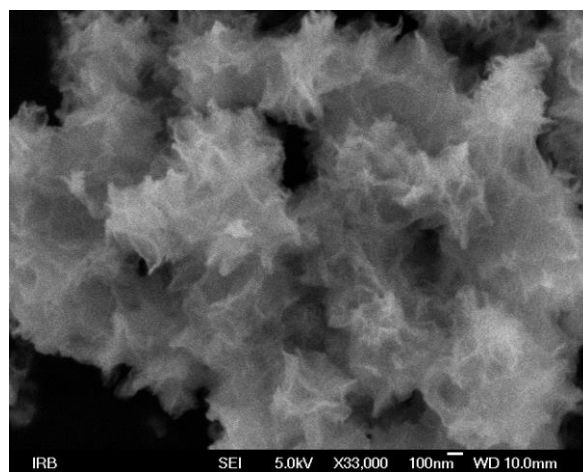
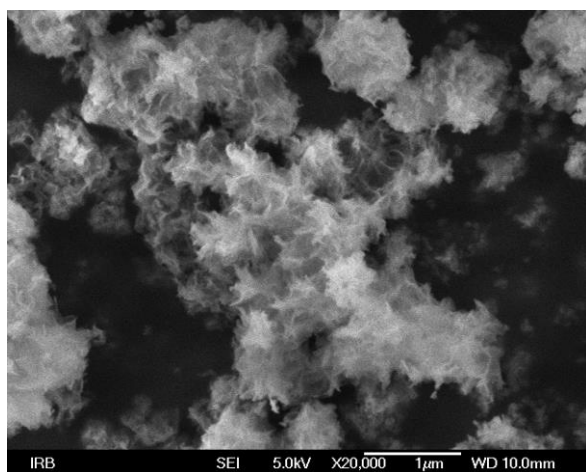
ν / cm^{-1}			Asignacija	Ref.
10 min	30 min	60 min		
3626 – 2567	3626 – 2600	3679 – 2522	O–H istezanje (H_2O)	[141]
1643	1642	1634	H–O–H deformacija (H_2O)	[141]
1285			HPO_3^{2-}	[141]
1110	1110	1106	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
1023	1020	1018	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
		961	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
866	885	879	HPO_4^{2-}	[143]
599	560	590	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
556	556	551	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]

Tablica 9. Asignacija difrakcijskih maksimuma difraktograma praha taloga nastalog nakon 30 i 60 min u sustavu u kojem je dodana asparaginska kiselina. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Asp}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

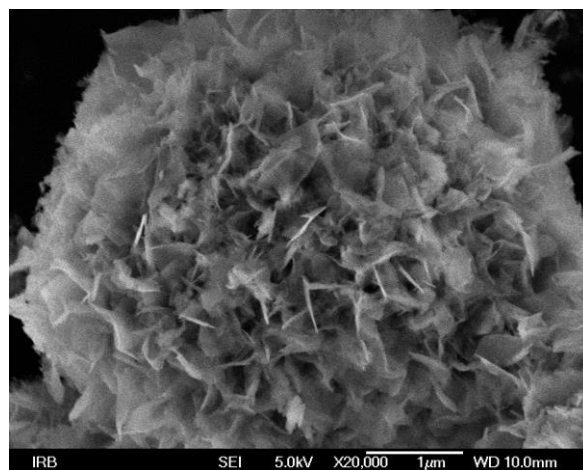
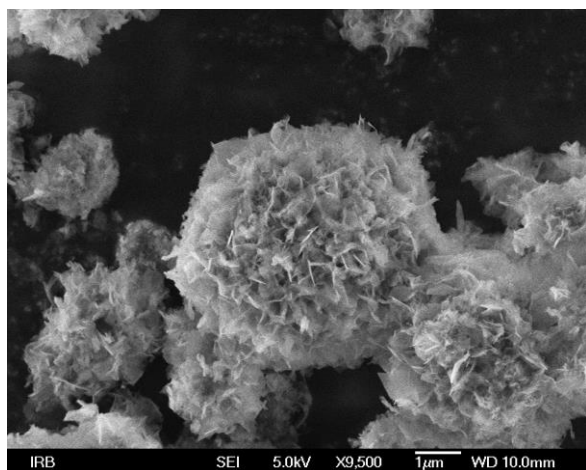
$2\theta / ^\circ$		Faza	Ref.
30 min	60 min		
25,9	25,8	CaDHA	[43,142]
28,0	28,3	CaDHA	[142]
31,9	31,9	CaDHA	[142]
39,3	40,3	CaDHA	[142]
47,3	46,4	CaDHA	[142]
49,4	49,9	CaDHA	[142]
53,3	53,2	CaDHA	[142]



a)



b)



c)

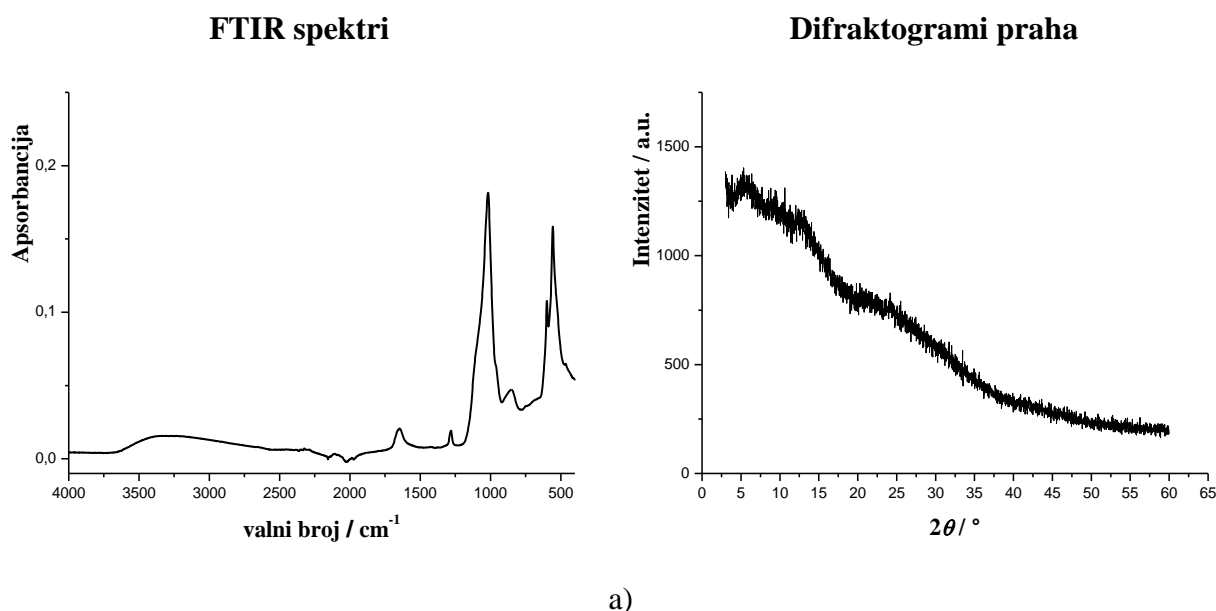
Slika 23. a) TEM mikrografija taloga nastalog nakon 10 min i SEM mikrografije taloga nastalog nakon b) 30 min i c) 60 min u sustavu u kojem je dodana asparaginska kiselina. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Asp}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

TEM mikrografija taloga nastalog nakon 10 min prikazuje lančaste agregate sferičnih čestica karakterističnih za ACP, što je i u ovome slučaju u skladu s FTIR i PXRD analizom (Slika 23. a).^[43] SEM mikrografija snimljena nakon 30 min ukazuje na nastanak agregata lističastih kristala CaDHA (Slika 23. b). U ovome se slučaju nakon 60 min ne uočavaju pojedinačni kristali, već samo veći agregati lističavih kristala CaDHA u odnosu na 30 min (Slika 23. c). U slučaju dodatka Asp nastaju manji kristali u odnosu na kontrolni sustav.

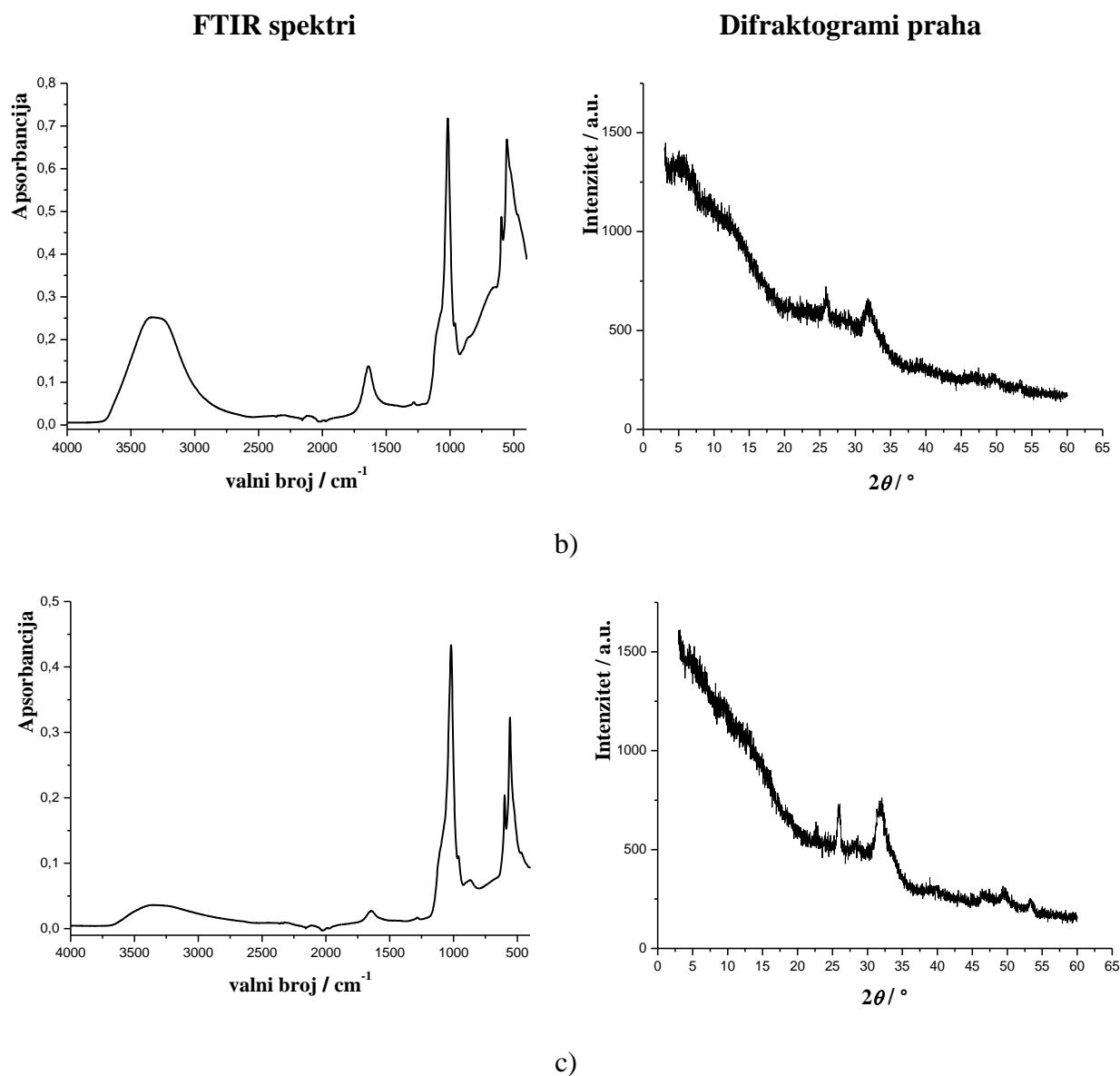
4.2.4. Asparagin

FTIR spektri i difraktogrami praha taloga sustava s dodatkom 5 mmol dm^{-3} Asn prikazani su na Slici 24., a asignirani u Tablicama 10. i 11.

Kao i u prethodnim slučajevima, FTIR spektri i difraktogrami praha ukazuju da je prva nastala faza ACP. U FTIR spektru taloga nastalog nakon 10 min vidljive su vrpce istezanja fosfatne skupine pri $1018, 851, 585, 558 \text{ cm}^{-1}$, hidroksilne skupine od 3651 do 2656 cm^{-1} i vode pri 1631 cm^{-1} , dok je u difraktogramu praha vidljiva fluktuacija intenziteta u području 2θ od 20° do 37° karakteristična za ACP (Slika 23. a).^[43]



Slika 24. FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalog nakon: a) 10 min, b) 30 min i c) 60 min u sustavu u kojem je dodan asparagin. Početne koncentracija reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Asn}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.



Slika 24. Nastavak.

Nakon 30 min započela je transformacija ACP-a u CaDHA koja je vidljiva prema cijepanju vrpce na 1103, 1013, 945 cm^{-1} te 593 i 558 cm^{-1} u FTIR spektru te pojavi difrakcijskih maksimuma pri $2\theta \sim 26^\circ$ i 32° karakterističnih za CaDHA u difraktogramu praha (Slika 23. b).^[4]

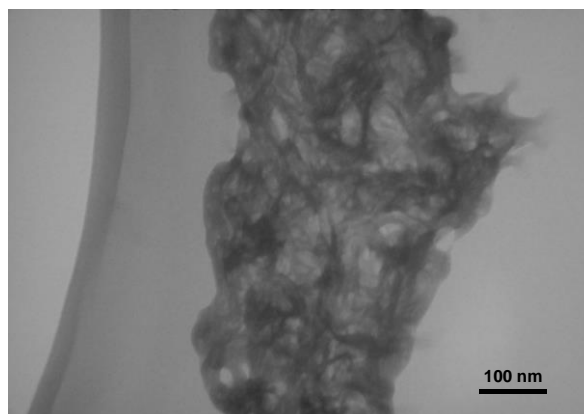
Izraženije vrpce cijepanja fosfatnih skupina pri 1107, 1010 i 958 cm^{-1} te 596 i 557 cm^{-1} ukazuje da je transformacija ACP-a u CaDHA nakon 60 min završena. Na difraktogramu praha vidljivi su difrakcijski maksimumi pri višim vrijednostima 2θ , karakteristični za CaDHA (Slika 23. c).

Tablica 10. Asignacija vrpca u FTIR spektru taloga nastalog nakon 10, 30 i 60 minuta u sustavu u kojem je dodan asparagin. Početne koncentracija reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Asn}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

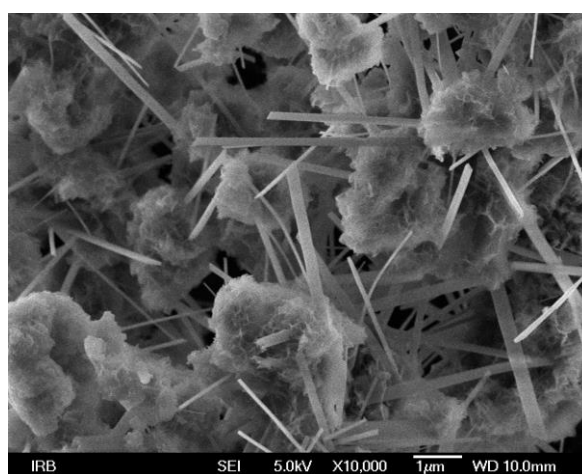
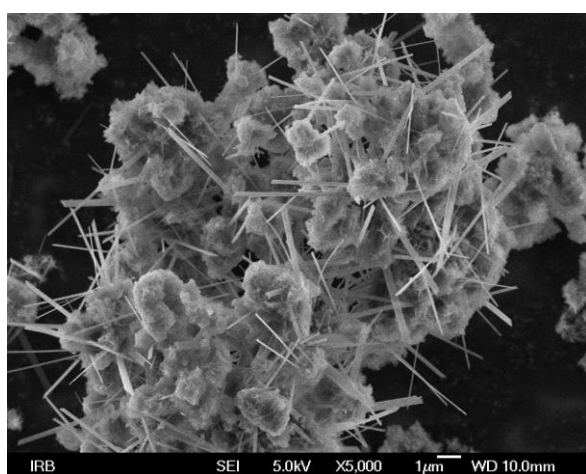
ν / cm^{-1}			Asignacija	Ref.
10 min	30 min	60 min		
3651 – 2565	3693 – 2593	3676 – 2647	O–H istezanje (H_2O)	[141]
1631	1642	1645	H–O–H deformacija (H_2O)	[141]
1285	1282		HPO_3^{2-}	[141]
1018	1103	1107	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
	1013	1010	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
	945	958	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
851		868	HPO_4^{2-}	[143]
585	593	596	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
558	558	557	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]

Tablica 11. Asignacija difrakcijskih maksimuma difraktograma praha taloga nastalog nakon 30 i 60 minuta u sustavu u kojem je dodan asparagin. Početne koncentracija reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Asn}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

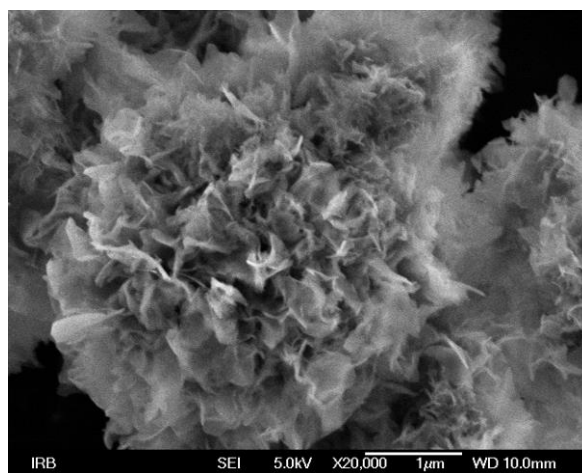
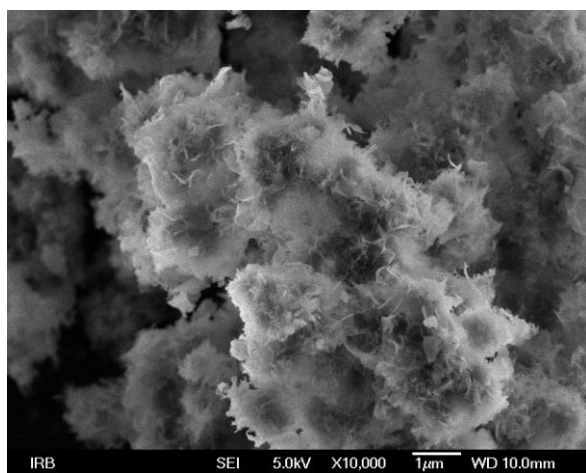
$2\theta / ^\circ$		Faza	Ref.
30 min	60 min		
25,9	25,9	CaDHA	[43,142]
28,4	28,6	CaDHA	[142]
32,0	32,0	CaDHA	[142]
39,2	39,8	CaDHA	[142]
47,2	46,8	CaDHA	[142]
49,7	49,4	CaDHA	[142]
53,1	53,2	CaDHA	[142]



a)



b)



c)

Slika 25. a) TEM mikrografije taloga nastalog nakon 10 min i SEM mikrografije taloga nastalog nakon b) 30 min i c) 60 min u sustavu u kojem je dodan asparagin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Asn}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

Za razliku od kontrolnog sustava i sustava u kojima su dodane Asp ili Phe, u sustavu kojem je dodan Asn nakon 10 min nisu nastali lančasti agregati sferičnih čestica ACP-a (Slika 25. a).

Na TEM mikrografiji vidljiva je gelasta faza karakteristična za tzv. ACP 2 koji se od ACP 1, osim prema morfologiji, razlikuje i prema topljivosti.^[43]

SEM mikrografija taloga nastalog u ovom sustavu nakon 30 min pokazuje da je, za razliku od prethodno opisanih sustava, nastala smjesa dviju faza koja nije vidljiva u FTIR spektrima i difraktogramima praha (Slika 25. b). Uz karakteristične sferične agregate lističavih kristala karakterističnih za CaDHA, vidljivi su i tanki pločasti kristali. Takva morfologija je karakteristična za kristale OCP-a dobivene kontroliranom sintezom.^[145] OCP je često prva metastabilna faza pri transformaciji ACP-a u stabilnije kristalne faze.

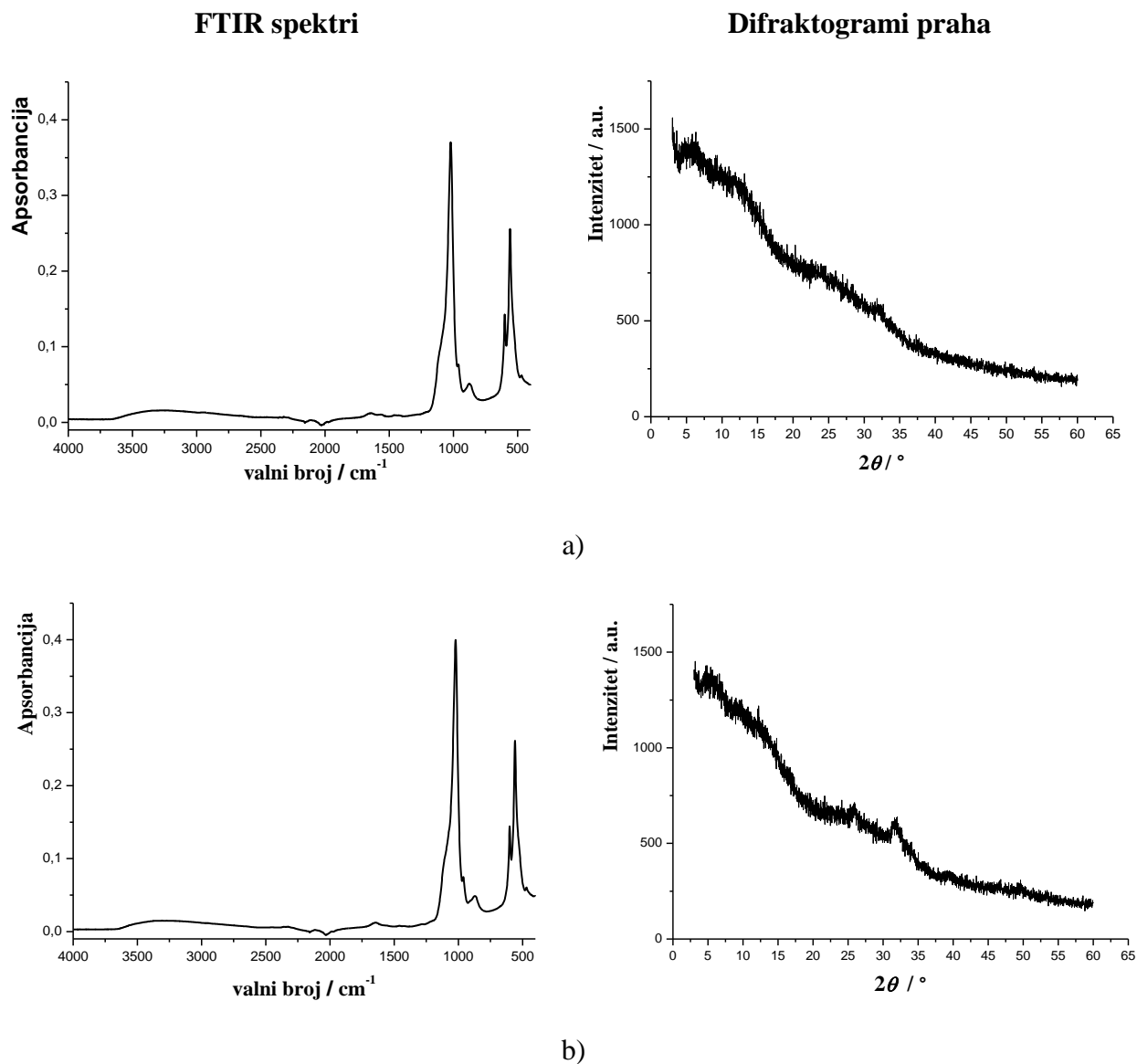
Nakon 60 min primijećeni su samo sferični agregati lističavih kristala CaDHA (Slika 25. c). Za razliku od kontrolnog sustava, nisu vidljivi pojedinačni kristali CaDHA.

4.2.5. Serin

FTIR spektri i difraktogrami praha nastali u sustavima s dodatkom 5 mmol dm^{-3} Ser prikazani su na Slici 26. te asignirani u Tablicama 12. i 13.

Kao što je i očekivano s obzirom na t_{ind} koje je znatno veće u odnosu na KS, u prisutnosti Ser nakon 60 min nastaje ACP (Slika 26. a). U FTIR spektru mogu se opaziti vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine ($1013, 965, 880, 609, 553 \text{ cm}^{-1}$), hidroksilne skupine ($3666 - 2632 \text{ cm}^{-1}$) i vode (1640 cm^{-1}). U difraktogramu praha vidljiva je fluktuacija intenziteta u području $2\theta \sim 22^\circ - 36^\circ$.^[43]

Nakon 150 minuta cijepanje fosfatnih vrpca na $1110, 1021$ i 958 cm^{-1} te 595 i 560 cm^{-1} i pojava difrakcijskih makimuma pri $2\theta \sim 26^\circ$ i 32° ukazuju na transformaciju ACP-a u CaDHA (Slika 26. b).



Slika 26. FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalog nakon: a) 60 min i b) 150 min u sustavu u kojemu je dodan serin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Ser}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$.

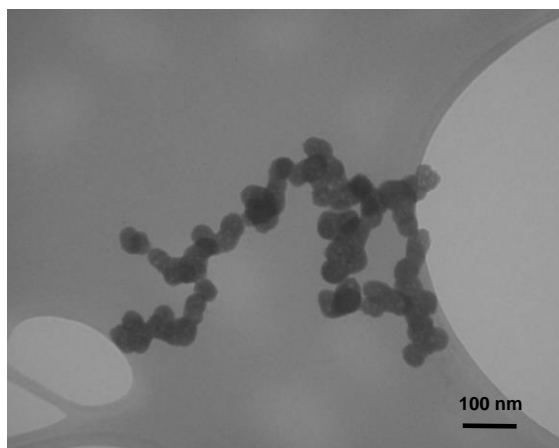
Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

Tablica 12. Asignacija vrpce FTIR spektara taloga nastalog nakon 60 i 150 min u sustavu u kojemu je dodan serin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Ser}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

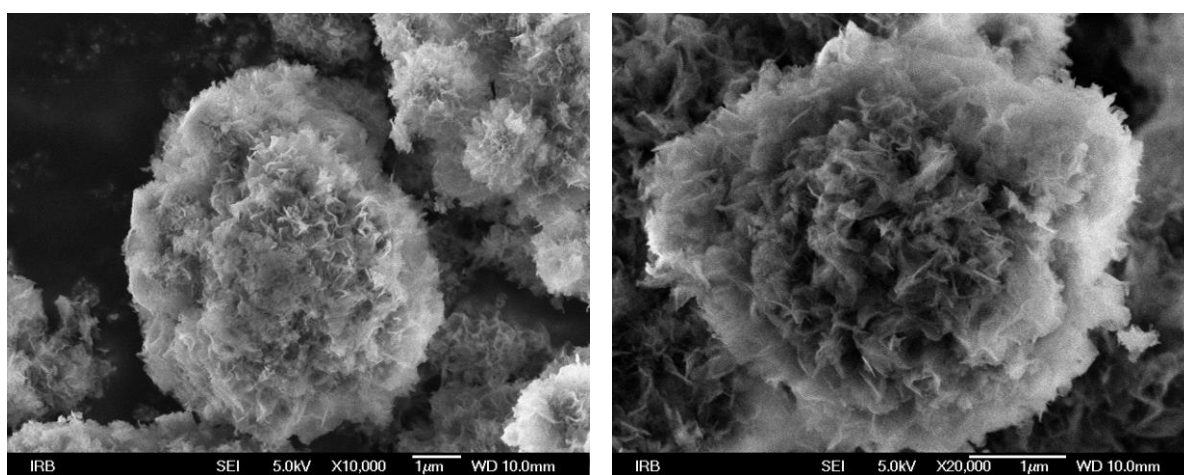
ν / cm^{-1}		Asignacija	Ref.
60 min	150 min		
3666 – 2632	3645 – 2635	O–H istezanje (H_2O)	[141]
1640	1639	H–O–H deformacija (H_2O)	[141]
	1110	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
1013	1021	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
965	958	ν_1 nedegenerirano simetrično istezanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
880	870	HPO_4^{2-}	[143]
609	595	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
553	560	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]

Tablica 13. Asignacija difrakcijskih maksimuma difraktograma praha taloga nastalog nakon 150 min u sustavu u kojemu je dodan serin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Ser}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

$2\theta / ^\circ$	Faza	Ref.
25,8	CaDHA	[43,142]
28,6	CaDHA	[142]
31,8	CaDHA	[142]
39,6	CaDHA	[142]
46,7	CaDHA	[142]
49,8	CaDHA	[142]



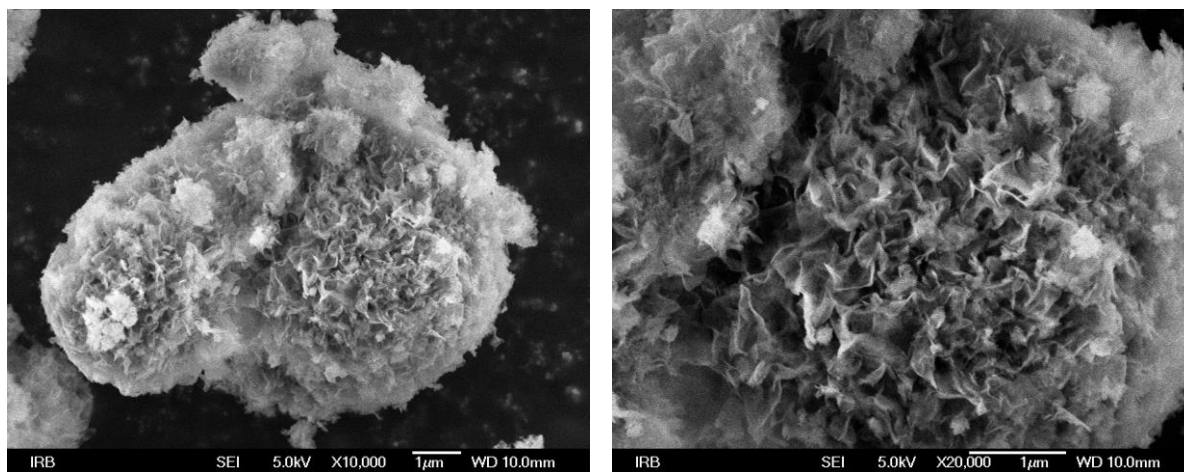
a)



b)

Slika 27. a) TEM mikrografija taloga nastalog nakon 10 min i SEM mikrografije taloga nastalog nakon b) 60 min i c) 150 min u sustavu u kojem je dodan serin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Ser}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

Zbog malo potrebne količine uzoraka za TEM analizu, bilo je moguće analizirati talog nastao već nakon 10 min (Slika 27. a). Na TEM mikrografiji vidljivi su tipični lančasti agregati sferičnih čestica ACP-a.



c)

Slika 27. Nastavak.

SEM mikrografije taloga nastalog nakon 60 min ukazuju da je transformacija ACP-a već započela (Slika 27. b). Nakon 150 min vidljivi su karakteristični sferični agregati lističavih kristala CaDHA. Za razliku od kontrolnog sustava ne nastaju pojedinačni kristali CaDHA koji su manji (Slika 27. c).

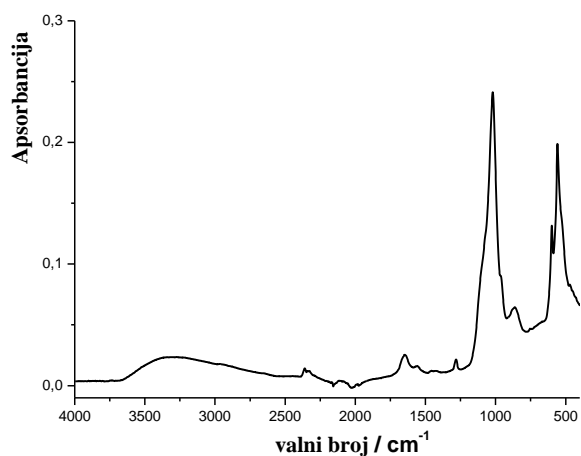
4.2.6. Lizin

Na Slici 28. prikazani su FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalog u sustavu s dodatkom 5 mmol dm⁻³ Lys nakon 10, 30 i 60 minuta. Njihova asignacija je dana u Tablicama 14. i 15.

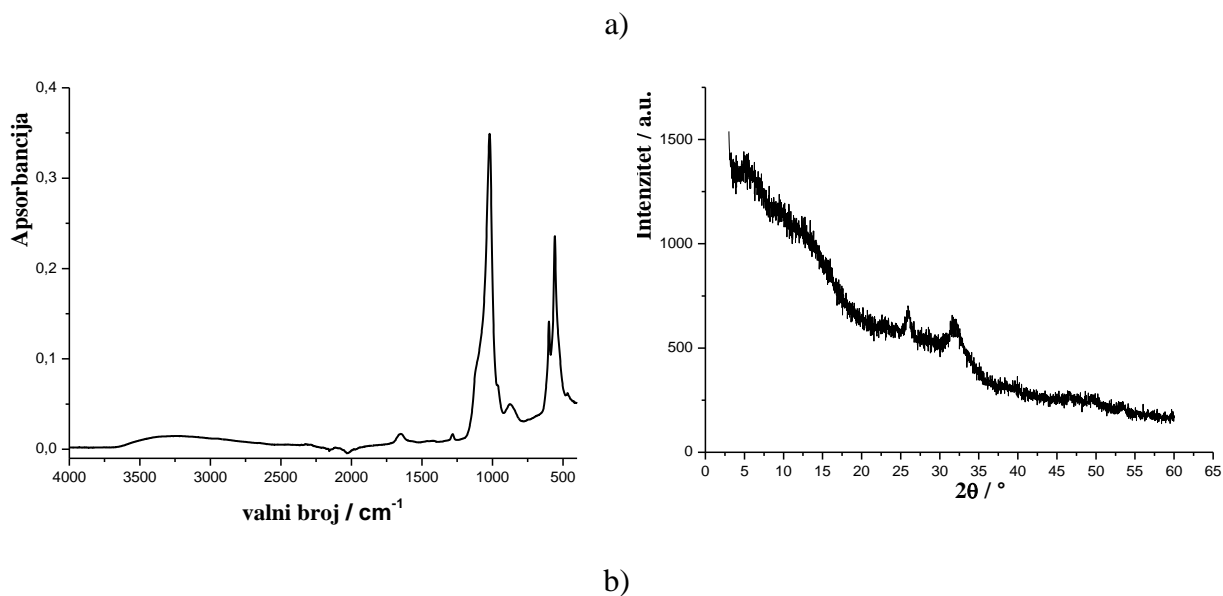
FTIR spektar i difraktogram praha taloga nastalog nakon 10 min ukazuju da je prva nastala faza ACP kao i u prethodno opisanim sustavima (Slika 28. a).^[43] U FTIR spektru opažene su vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine pri 1023, 863, 556 i 543 cm⁻¹, hidroksilne skupine između 3660 – 2579 cm⁻¹ i vode pri 1649 cm⁻¹. Zbog male količine taloga nije bilo moguće snimiti difraktogram praha taloga dobivenog nakon 10 min.

Nakon 30 min, FTIR spektri i difraktogrami praha ukazuju da započinje transformacija ACP-a u CaDHA, što je vidljivo iz cijepanja vrpce na 1110 i 1013 cm⁻¹ te 601 i 556 cm⁻¹ kao i pojava pikova na 26° i 32° u difraktogramu praha taloga nastalog nakon 30 min (Slika 28. b). Izraženije cijepanje vrpce pri 1117, 1020, 966 cm⁻¹ te 601 i 556 cm⁻¹ u FTIR spektru taloga nastalog nakon 60 min i pojava difrakcijskih maksimuma pri višim vrijednostima 2θ , karakterističnih za CaDHA, ukazuje da je transformacija ACP-a nakon 60 min završila (Slika 28. b).

FTIR spektri



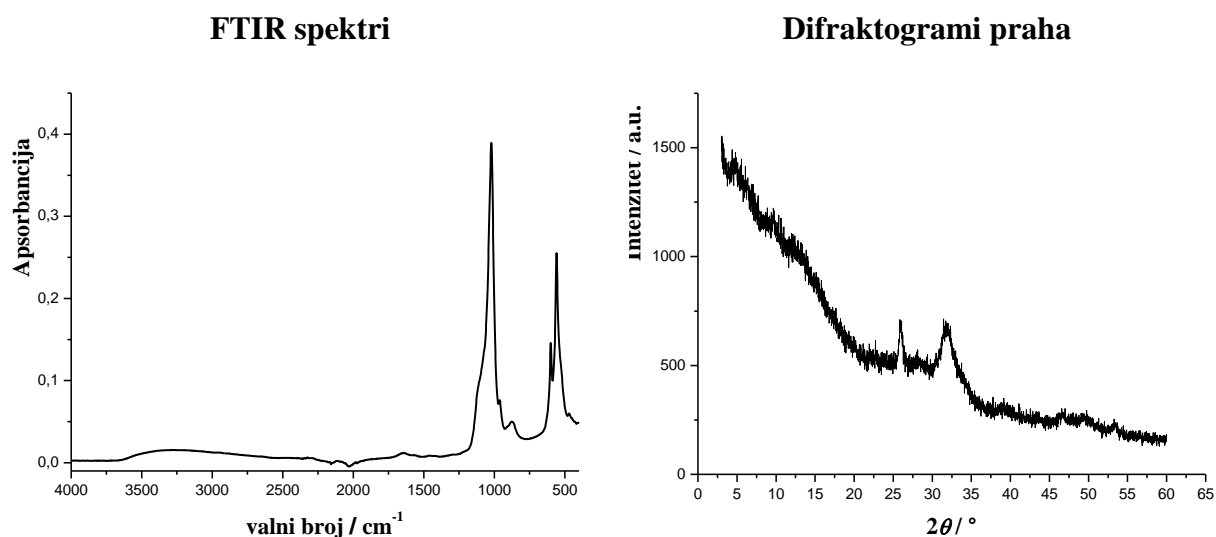
Difraktogrami praha



b)

Slika 28. FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalog nakon: a) 10 min, b) 30 min i c) 60 min u sustavu u kojemu je dodan lizin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Lys}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$



c)

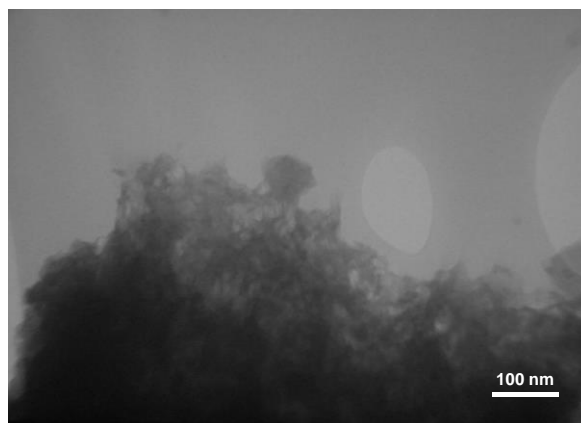
Slika 28. Nastavak.

Tablica 14. Asignacija vrpci FTIR spektra taloga nastalog nakon 10, 30 i 60 min u sustavu u kojemu je dodan lizin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Lys}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje, pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

ν / cm^{-1}			Asignacija	Ref.
10 min	30 min	60 min		
3660 – 2579	3649 – 2623	3641 – 2615	O–H istežanje (H_2O)	[141]
1649	1656	1649	H–O–H deformacija (H_2O)	[141]
1276	1282		HPO_3^{2-}	[141]
	1110	1117	ν_{3a} trostruko degenerirano asimetrično istežanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
1023	1013	1020	ν_{3c} trostruko degenerirano asimetrično istežanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
		960	ν_1 nedegenerirano simetrično istežanje P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
863	877	875	HPO_4^{2-}	[143]
560	601	601	ν_{4a} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]
543	556	556	ν_{4b} trostruko degenerirano savijanje O–P–O veze (PO_4^{3-})	[141]

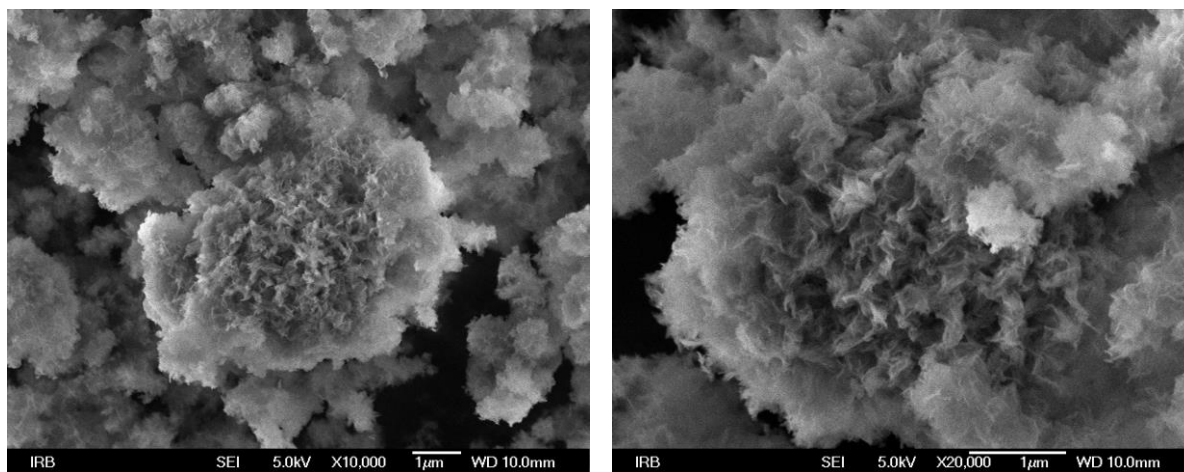
Tablica 15. Assignacija difrakcijskih maksimuma difraktograma praha taloga nastalog nakon 30 i 60 min u sustavu u kojemu je dodan lizin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Lys}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.

$2\theta / ^\circ$		Faza	Ref.
30 min	60 min		
25,9	25,9	CaDHA	[43,142]
28,0	28,1	CaDHA	[142]
32,0	31,9	CaDHA	[142]
39,8	39,2	CaDHA	[142]
46,4	46,9	CaDHA	[142]
49,6	49,6	CaDHA	[142]
53,2	53,5	CaDHA	[142]

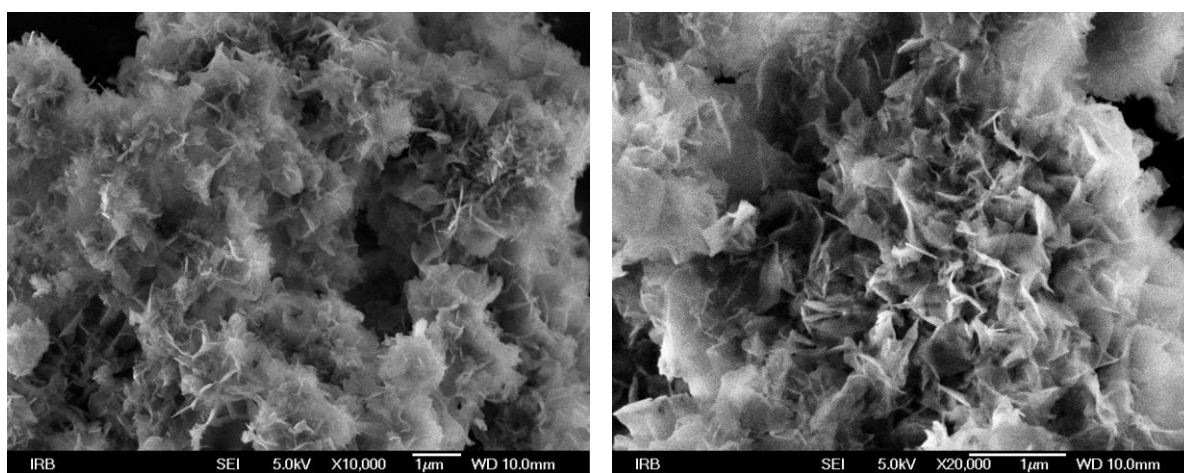


a)

Slika 29. a) TEM mikrografija taloga nastalog nakon 10 min i SEM mikrografije taloga nastalog nakon b) 30 min i c) 60 min u sustavu u kojemu je dodan lizin. Početne koncentracije reaktanata iznose $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{NaCl}) = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{Lys}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Eksperimentalni uvjeti: magnetsko miješanje pri 25 °C i $\text{pH}_{\text{poč}} 7,4$.



b)



c)

Slika 29. Nastavak.

Slično kao i u sustavu u kojem je dodan Asn, TEM mikrografija taloga nastalog nakon 10 min ukazuje na nastanak ACP 2, a vidljiva je gelasta faza (Slika 29. a). Dobiveni rezultati su u skladu s prethodno provedenim FTIR i PXRD analizama taloga nakon 10 min.

Nakon 30 min nastaju agregati lističavih kristala CaDHA (Slika 29. b), dok se daljnjim starenjem taloga povećava veličina kristala (Slika 29. c). U odnosu na kontrolni sustav, u ovome slučaju ne nastaju pojedinačne kristali, a nastali agregati su manji.

§ 5. ZAKLJUČAK

Istražen je utjecaj 5 aminokiselina, fenilalanina, asparaginske kiseline, asparagina, serina i lizina, koje se međusobno razlikuju prema naboju bočnog ogranka, na nastajanje i transformaciju kalcijevih fosfata. Aminokiseline međudjelovanjem s nastajućom fazom kontroliraju brzinu i mehanizme pojedinih koraka taložnog procesa te tako utječu na sastav, veličinu i morfologiju nastale čvrste faze.

Potenciometrijskim mjerenjima te analizom taloga pomoću FTIR spektroskopije, difrakcije na praškastom uzorku, pretražne elektronske mikroskopije i transmisijske elektronske mikroskopije pokazano je da aminokiseline kontroliraju brzinu nastajanja, sastav i morfologiju nastale čvrste faze:

- fenilalanin, koji pri danim eksperimentalnim uvjetima ima nenabijen nepolaran bočni ogranak, utječe na vrijeme indukcije, ali ne utječe na sastav i morfologiju nastale čvrste faze
- asparaginska kiselina, koja pri danim eksperimentalnim uvjetima ima negativno nabijen bočni ogranak, neznatno utječe na vrijeme indukcije, no ne i na sastav te morfologiju nastalog taloga
- asparagin, koji pri danim eksperimentalnim uvjetima ima nenabijen polaran bočni ogranak, utječe na vrijeme indukcije i na sastav nastalog taloga u ranim fazama taloženja kao i na morfologiju taloga
- serin, koji pri danim eksperimentalnim uvjetima ima nenabijen hidrofilan bočni ogranak, ima najizraženiji utjecaj na vrijeme indukcije, ne utječe na sastav nastalog taloga, no utječe na njegovu morfologiju
- lizin, koji pri danim eksperimentalnim uvjetima ima pozitivno nabijen bočni ogranak, utječe na vrijeme indukcije i na sastav nastale čvrste faze u ranim fazama taloženja te na morfologiju

Dobiveni rezultati ukazuju na složen mehanizam međudjelovanja aditiva malih molekula s nastajućom čvrstom fazom.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

<i>a</i>	aktivitet otopljene tvari u prezasićenoj otopini
<i>a_s</i>	aktivitet otopljene tvari u stabilno zasićenoj otopini
ACP	amorfni kalcijev fosfat
AK	aminokiselina
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kiselina
ATR	totalna prigušena refleksija (<i>eng. Attenuated Total Reflectance</i>)
<i>c</i>	molarna koncentracija [mol dm^{-3}]
CaDHA	kalcij deficijentni hidroksiapatit
CaP	kalcijevi fosfati
DA	kalcij deficijentni hidroksiapatit
DCPD	kalcijev hidrogenfosfat dihidrat
FTIR	<i>Fourier-transform</i> infracrvena spektroskopija
Glu	glutaminska kiselina
Gly	glicin
HA	hidroksiapatit
IR	infracrveno
<i>K_{sp}</i>	konstanta produkta topljivosti
KS	kontrolni sustav
Lys	lizin
NPCs	nekolagenski proteini (<i>eng. Non-collagenous proteins</i>)
OCP	oktakalcijev fosfat
pH _{poč}	početna pH vrijednost
PHA	kalcij deficijentni hidroksiapatit (<i>eng. Precipitated Hydroxyapatite</i>)
Phe	fenilalanin
PSer	fosfoserin
PXRD	difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku
<i>S</i>	prezasićenost
SEM	pretražna elektronska mikroskopija

Ser	serin
TCP	hidratiziran kalcijev fosfat
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
XRD	difrakcija rentgenskih zraka
β -TCP	beta-trikalcijev fosfat
μ	kemijski potencijal
ν	valni broj

§ 7. LITERATURNI IZVORI

- [1] M. D. Sikirić, H. Füredi-Milhofer, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, 128–130, 135–158.
- [2] J. W. Mullin, *Crystallization*, Butterworth-Heinmann, Oxford, **2001**.
- [3] V. Babić-Ivančić, M. Dutour-Sikiric, *Stomatol. Glas. Srb.* **2012**, 59, 7–21.
- [4] L. Brečević, V. Hlady, H. Füredi-Milhofer, *Colloids and Surfaces* **1987**, 28, 301–313.
- [5] K. Bleek, A. Taubert, *Acta Biomater.* **2013**, 9, 6283–6321.
- [6] J. Boyle, *Lehninger principles of biochemistry*, W.H. Freeman And Company, New York, **2005**.
- [7] S. W, M. J.J, *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, John Wiley And Sons, New York, **1981**.
- [8] H. Füredi-Milhofer, A. G. Walton, *Principles of Precipitation of Fine Particles in Dispersion of Powders in Liquids*, Applied Science, London, **1981**.
- [9] A. E. Nielsen, *Croat. chem. acta* **1980**, 53, 255–279.
- [10] A. E. Nielsen, *Croat. chem. acta* **1970**, 42, 319–333.
- [11] B. . Deryaguin, L. . Landau, *Acta Physicochim* **1941**, 14, 633.
- [12] B. Težak, *Discuss. Faraday Soc.* **1966**, 42, 175–186.
- [13] K. Binder, D. Stauffer, *Adv. Phys.* **2006**, 25, 37–41.
- [14] Z. Berkovitch-Yellin, J. Van Mil, L. Addadi, M. Idelson, M. Lahav, L. Leiserowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3111–3122.
- [15] L. A. Bromley, D. Cottier, R. J. Davey, B. Dobbs, S. Smith, B. R. Heywood, *Langmuir* **1993**, 3594–3599.
- [16] L. Addadi, S. Weinstein, E. Gati, I. Weissbuch, M. Lahav, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4610–4617.
- [17] H. Füredi-Milhofer, L. Brečević, B. Purgarić, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1976**, 61, 184–190.
- [18] L. Addadi, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, 82, 4110–4114.
- [19] H. Füredi-Milhofer, M. D. Sikirić, L. Tunik, N. Filipović-Vinceković, N. Garti, *Int. J. Mod. Phys. B* **2002**, 16, 359–366.
- [20] H. Füredi-Milhofer, S. Sarig, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **1996**, 32, 45–74.

- [21] H. Füredi-Milhofer, *Croat. chem. acta* **1983**, 56, 721–740.
- [22] S. Mann, *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford University Press, New York, **2001**.
- [23] B. Wopenka, J. D. Pasteris, *Mater. Sci. Eng. C* **2005**, 25, 131–143.
- [24] J. D. Pasteris, B. Wopenka, E. Valsami-Jones, *Elements* **2008**, 4, 97–104.
- [25] G. Daculsi, R. Z. LeGeros, D. Mitre, *Calcif. Tissue Int.* **1989**, 45, 95–103.
- [26] W. C. O'Neill, *Kidney Int.* **2007**, 72, 792–796.
- [27] R. Z. LeGeros, *Z. Kardiol.* **2001**, 90, 116–124.
- [28] A. Becker, M. Epple, K. M. Müller, I. Schmitz, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 2032–2038.
- [29] P. J. Cook, J. H. Shergold, D. F. Davidson, *Phosphate Deposits of the World: Phosphate Rock Resources*, Cambridge University Press, Cambridge, **2005**.
- [30] D. K. Smith, *Calcium Phosphate apatites in nature*, CRC Press, Boca Raton, **1994**.
- [31] P. Becker, *Phosphate and phosphoric acid: raw materials technology and economics of the wet process*, Fertilizer Science And Tehnology Series, New York, **1989**.
- [32] J. Park, J. S. Lakes, *Biomaterials*, Springer, New York, **2007**.
- [33] S. V. Dorozhkin, *Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics and Biocomposites*, Wiley-VCH, Weinheim, **2016**.
- [34] L. Wang, G. H. Nancollas, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4628–4669.
- [35] P. Koutsoukos, Z. Amjad, M. B. Tomson, G. H. Nancollas, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 1553–1557.
- [36] H. Füredi-Milhofer, B. Purgarić, L. Brečević, N. Pavković, *Calcif. Tissue Res.* **1971**, 8, 142–153.
- [37] E. D. Eanes, I. H. Gillessen, A. S. Posner, *Nature* **1965**, 208, 365–367.
- [38] H. E. Lundager Madsen, G. Thorvardarson, *J. Cryst. Growth* **1984**, 66, 369–376.
- [39] R. Boistelle, I. Lopez-Valero, *J. Cryst. Growth* **1990**, 102, 609–617.
- [40] L. B. Gower, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4551–4627.
- [41] A. S. Posner, F. Betts, *Acc. Chem. Res.* **1975**, 8, 273–281.
- [42] G. Treboux, P. Layrolle, N. Kanzaki, K. Onuma, A. Ito, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 5111–5114.
- [43] S. V. Dorozhkin, *Acta Biomater.* **2010**, 6, 4457–4475.
- [44] J. D. Termine, R. A. Peckauskas, A. S. Posner, *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, 140,

- 318–325.
- [45] S. V. Dorozhkin, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 1335–1363.
- [46] S. V. Dorozhkin, S. V. Dorozhkin, *Int. J. Mater. Chem.* **2012**, *2*, 19–46.
- [47] C. Combes, C. Rey, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3362–3378.
- [48] A. L. Boskey, *J Dent Res* **1997**, *76*, 1433–1436.
- [49] W. E. Beown, *Nature* **1962**, *196*, 1048.
- [50] O. Suzuki, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3379–3387.
- [51] J. C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, **1994**.
- [52] M. J. Arellano-Jiménez, R. García-García, J. Reyes-Gasga, *J. Phys. Chem. Solids* **2009**, *70*, 390–395.
- [53] W. E. Brown, L. W. Schroeder, J. S. Ferris, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 1385–1388.
- [54] A. Nakahira, S. Aoki, K. Sakamoto, S. Yamaguchi, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2001**, *12*, 793–800.
- [55] R. Z. LeGeros, *Calcif. Tissue Int.* **1985**, *37*, 194–197.
- [56] M. Kakei, T. Sakae, M. Yoshikawa, *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. **2009**, *58*, 393–398.
- [57] I. Mayer, O. Jacobsohn, T. Niazov, J. Werckmann, M. Iliescu, M. Richard-Plouet, O. Burghaus, D. Reinen, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, *2003*, 1445–1451.
- [58] A. Sinha, S. Nayar, A. Agrawal, D. Bhattacharyya, *J. Am. Ceram. Soc.* **2003**, *86*, 357–359.
- [59] S. V. Dorozhkin, *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 963–977.
- [60] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, *Solid State Ionics* **2010**, *181*, 268–275.
- [61] W. C. O'Neill, *Kidney Int.* **2007**, *72*, 792–796.
- [62] B. Bourgeois, O. Laboux, L. Obadia, O. Gauthier, E. Betti, E. Aguado, G. Daculsi, J.-M. Bouler, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *65*, 402–408.
- [63] T. Y. Liu, S. Y. Chen, D. M. Liu, S. C. Liou, *J. Control. Release* **2005**, *107*, 112–121.
- [64] T. Tsuchida, T. Yoshioka, S. Sakuma, T. Takeguchi, W. Ueda, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47*, 1443–1452.
- [65] N. Rangavittal, A. R. Landa-Canovas, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51*, 660–668.
- [66] J. Y. Kim, R. R. Fenton, B. A. Hunter, B. J. Kennedy, *Aust. J. Chem.* **2000**, *53*, 679–686.

- [67] M. Markovic, B. Fowler, M. Tung, *J. Res. Natl. Stand. Technol.* **2004**, *109*, 553–568.
- [68] C. Mangano, A. Piattelli, V. Perrotti, G. Iezzi, **2008**, 929–933.
- [69] Y. Yuan, P. Huang, Q. Peng, C. Zhang, J. Weng, *Mater. Sci. Forum* **2009**, *610–613*, 1335–1338.
- [70] N. Ozgür Engin, A. C. Tas, *J. Eur. Ceram. Soc.* **1999**, *19*, 2569–2572.
- [71] L. Sun, C. C. Berndt, K. A. Gross, A. Kucuk, **2001**, 570–592.
- [72] W. Suchanek, M. Yoshimura, *J. Mater. Res.* **1998**, *13*, 94–117.
- [73] S. V. Dorozhkin, *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *55*, 272–326.
- [74] A. Dey, A. K. Mukhopadhyay, S. Gangadharan, M. K. Sinha, D. Basu, *J. Therm. Spray Technol.* **2009**, *18*, 578–592.
- [75] D. Feng, J. Shi, X. Wang, L. Zhang, S. Cao, *RSC Adv* **2013**, *3*, 24975–24985.
- [76] V. Uskoković, D. P. Uskoković, *J. Biomed. Mater. Res.* **2011**, *96*, 152–191.
- [77] F. Hilbrig, R. Freitag, *Biotechnol. J.* **2012**, *7*, 90–102.
- [78] Y. Hou, C. J. Morrison, S. M. Cramer, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3709–3716.
- [79] M. Brand, S. Rampalli, C.-P. Chaturvedi, F. J. Dilworth, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 398–409.
- [80] B. I. Kim, S. H. Jeong, S. O. Jang, K. N. Kim, H. K. Kwon, Y. D. Park, *Key Eng. Mater.* **2006**, *309–311 I*, 541–544.
- [81] M. Niwa, T. Sato, W. Li, H. Aoki, H. Aoki, T. Daisaku, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2001**, *12*, 277–281.
- [82] J. Pietrasik, K. Szustakiewicz, M. Zaborski, K. Haberko, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2008**, *483*, 172–178.
- [83] L. Wang, Y. Li, H. Li, X. Liao, B. Wei, B. Ye, F. Zhang, L. Yang, W. Wang, T. Krafft, *Environ. Monit. Assess.* **2014**, *186*, 9041–9050.
- [84] D. Holzmann, D. Holzinger, G. Hesser, T. Schmidt, G. Knör, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 8102.
- [85] M. Tagaya, T. Ikoma, N. Hanagata, D. Chakarov, B. Kasemo, J. Tanaka, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2010**, *11*, 45002.
- [86] G. C. Petrucelli, E. Y. Kawachi, L. T. Kubota, C. A. Bertran, *Anal. Commun.* **1996**, *33*, 227.
- [87] M. Nagai, T. Nishino, *Sens. and Actuators* **1988**, *15*, 145–151.
- [88] A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Söll, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 29–35.

- [89] V. R. Young, *J. Nutr.* **1994**, *124*, 1517S–1523S.
- [90] <https://en.wikipedia.org/wiki/Phenylalanine#/media/File:1PhenylalanineAtPhysiologicalpH.svg> (Datum prisupa 30.8.2017).
- [91] <https://en.wikipedia.org/wiki/File:L-aspartic-acid-skeletal.png>, (Datum prisupa 29.8.2017).
- [92] Nomenclature Joint commission on Biochemical, *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 595–624.
- [93] E. K. Ruzzo, J. M. Capo-Chichi, B. Ben-Zeev, D. Chitayat, H. Mao, A. L. Pappas, Y. Hitomi, Y. F. Lu, X. Yao, F. F. Hamdan, i ostali, *Neuron* **2013**, *80*, 429–441.
- [94] M. C. Patterson, *Semin. Pediatr. Neurol.* **2005**, *12*, 144–151.
- [95] B. Imperiali, S. E. O'Connor, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 643–649.
- [96] P. Burda, M. Aebi, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1999**, *1426*, 239–257.
- [97] can be found under <https://en.wikipedia.org/wiki/File:L-asparagine-skeletal.png>, (Datum prisupa 29.8.2017).
- [98] under <http://www.encyclopedia.com/science-and-technology/biochemistry/biochemistry/serine> (Datum prisupa 29.8.2017).
- [99] <https://en.wikipedia.org/wiki/File:L-serine-skeletal.png>, (Datum prisupa 29.8.2017).
- [100] <https://en.wikipedia.org/wiki/File:L-lysine-skeletal.png>, (Datum prisupa 29.8.2017).
- [101] J. Song, V. Malathong, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3366–3372.
- [102] A. George, A. Veis, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4670–4693.
- [103] A. K. Rosenthal, *Curr. Opin. Orthop.* **2007**, *18*, 449–453.
- [104] F. H. Silver, W. J. Landis, *Connect. Tissue Res.* **2011**, *52*, 242–254.
- [105] W. J. Landis, R. Jacquet, *Calcif. Tissue Int.* **2013**, *93*, 329–337.
- [106] K. S. Jack, T. G. Vizcarra, M. Trau, *Langmuir* **2007**, 12233–12242.
- [107] B. Palazzo, D. Walsh, M. Iafisco, E. Foresti, L. Bertinetti, G. Martra, C. L. Bianchi, G. Cappelletti, N. Roveri, *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 1241–1252.
- [108] D. Rautaray, S. Mandal, M. Sastry, *Langmuir* **2005**, *21*, 5185–5191.
- [109] N. Almora-Barrios, N. H. De Leeuw, *Langmuir* **2010**, *26*, 14535–14542.
- [110] A. Sugino, T. Miyazaki, C. Ohtsuki, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 2269–2274.
- [111] H. Pan, J. Tao, X. Xu, R. Tang, *Langmuir* **2007**, *23*, 8972–8981.
- [112] A. Takeuchi, C. Ohtsuki, T. Miyazaki, M. Kamitakahara, S. Ogata, M. Yamazaki, Y. Furutani, H. Kinoshita, M. Tanihara, *J. R. Soc. Interface* **2005**, *2*, 373–8.

- [113] A. Takeuchi, C. Ohtsuki, M. Kamitakahara, S. I. Ogata, T. Miyazaki, M. Tanihara, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 387–393.
- [114] N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108–4116.
- [115] M. Kresak, E. C. Moreno, R. T. Zahradnik, D. I. Hay, *J. Colloid Interface Sci.* **1977**, *59*, 283–292.
- [116] S. Koutsopoulos, A. Kontogeorgou, J. Petroheilos, E. Dalas, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1998**, 421–424.
- [117] L. Wang, E. Hinoi, A. Takemori, N. Nakamichi, Y. Yoneda, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24553–24565.
- [118] E. Dalas, P. Malkaj, Z. Vasileiou, D. G. Kanellopoulou, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 277–282.
- [119] S. Koutsopoulos, E. Dalas, *Langmuir* **2000**, *16*, 6739–6744.
- [120] S. Koutsopoulos, E. Dalas, *Langmuir* **2001**, *17*, 1074–1079.
- [121] S. Koutsopoulos, E. Dalas, *J. Cryst. Growth* **2000**, *216*, 443–449.
- [122] S. Koutsopoulos, E. Dalas, *J. Cryst. Growth* **2000**, *217*, 410–415.
- [123] T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, Y. Hamada, M. Taira, J. Takahashi, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2241–2247.
- [124] A. Tsortos, G. H. Nancollas, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *250*, 159–167.
- [125] Z. Sen Zhang, H. H. Pan, R. K. Tang, *Front. Mater. Sci. China* **2008**, *2*, 239–245.
- [126] S. P. Huang, K. C. Zhou, Z. Y. Li, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **2007**, *17*, 612–616.
- [127] A. Wong, J. Czernuszka, *Colloids and Surfaces* **1995**, *103*, 23–36.
- [128] R. Gonzales-McQuire, J. Chane-Ching, E. Vignaud, A. Lebugle, S. Mann, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2277–2281.
- [129] M. Tavafoghi, M. Cerruti, *J. R. Soc. Interface* **2016**, *13*, 1–12.
- [130] Y. Cai, R. Tang, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3775.
- [131] X. Chu, W. Jiang, Z. Zhang, Y. Yan, H. Pan, X. Xu, R. Tang, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1151–1157.
- [132] S. Eiden-Aßmann, M. Viertelhaus, A. Heiß, K. A. Hoetzer, J. Felsche, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 481–486.
- [133] H. U. Gremlich, *Infrared and Raman Spectroscopy*, VCH Publishers, New York, **2008**.
- [134] H. U. Grünzler, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska Knjiga, Zagreb, **2006**.

- [135] A. R. West, *Basic Solid State Chemistry*, John Wiley And Sons, New York, **1999**.
- [136] S. Ahuja, N. Jespersen, Ur. , *Comprehensive Analytical Chemistry: Modern Instrumental Analysis*, Elsevier, Oxford, **2006**.
- [137] H. Tanaka, K. Miyajima, M. Nakagaki, S. Sahimabayashi, *Chem. Pharmac. Bull.* **1989**, 59, 2897–2901.
- [138] C. Giacovazzo, H. L. Monaco, D. Viterbo, F. Scordari, G. Gilli, G. Zanotti, G. Catti, *Fundamentals of Crystallography*, Oxford University Press, Oxford, **1992**.
- [139] E. Boanini, M. Fini, M. Gazzano, A. Bigi, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 4821–4826.
- [140] N. Spanos, P. G. Klepetsanis, P. G. Koutsoukos, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, 236, 260–265.
- [141] S. Koutsopoulos, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 62, 600–612.
- [142] S. C. Liou, S. Y. Chen, H. Y. Lee, J. S. Bow, *Biomaterials* **2004**, 25, 189–196.
- [143] C. Mochales, R. M. Wilson, S. E. P. Dowker, M. P. Ginebra, *J. Alloys Compd.* **2011**, 509, 7389–7394.
- [144] A. Selmani, I. Coha, K. Magdić, B. Čolović, V. Jakanović, S. Šegota, S. Gajović, A. Gajović, D. Jurašin, M. Dutour Sikirić, *CrystEngComm* **2015**, 17, 8529–8548.
- [145] A. Bigi, B. Bracci, S. Panzavolta, M. Iliescu, M. Plouet-richard, J. Werckmann, D. Cam, *Growth (Lakeland)* **2004**, 4, 141–146.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ina Erceg

Datum rođenja: 1. 2. 1994

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

Obrazovanje

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

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

2008. – 2012. Gimnazija Matija Mesić

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

2015. – 2017. Diplomski studij kemije, istraživački smjer, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Grane: anorganska i fizikalna kemija

Nagrade i priznanja

2017. Rektorova nagrada za individualni znanstveni i umjetnički rad

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013. – 2016. Članica udruge za popularizaciju znanosti "Znanstvene čarolije"

2013. – 2017. Sudjelovanje u otvorenim danima Kemijskog odsjeka

2013. Sudjelovanje na Festivalu znanosti

2013. – 2014. Voditeljica znanstveno popularnih radionica za djecu Mala Sova

2014. Znanstveni piknik

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. I. Kodrin, V. Barbarić, I. Erceg, A. Višnjevac, M. Đaković, *The influence of oxime group substitution on hydrogen bonding patterns of pyridine-based complexes of Cd(II)*, European Crystallographic Meeting, Rovinj, Hrvatska, 23. – 28. 8. 2015.
2. D. Domazet Jurašin, I. Erceg, V. Čadež, S. Šegota, M. Dutour Sikirić, *Dynamic light scattering study of amorphous calcium phosphate study*, 30th European Colloid and Interface Society Conference, ECIS 2016, Rim, Italija, 5. - 9. 9. 2016.
3. M. Dutour Sikirić, J. Validžić, I. Erceg, T. Dražić, D. M. Lyons, A. Gajović, D. Domazet Jurašin, *Influence of structurally different amino acids on calcium phosphate precipitation*, 30th European Colloid and Interface Society Conference, ECIS 2016, Rim, Italija, 5. – 9. 9. 2016.
4. V. Čadež, I. Erceg, A. Selmani, D. Domazet Jurašin, S. Šegota, M. Dutour Sikirić, *Comparison of dynamic light scattering and laser diffraction study of early formation and transformation of amorphous calcium phosphates*, Treći regionalni okrugli sto, vatrostalstvo, procesna industrija, Nanotehnologije i nanomedicina, Beograd, Srbija, 1. – 2. 6. 2017.