

Adsorpcija albumina na β -trikalcijev fosfat

Kovačević, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:126568>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Monika Kovačević

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Monika Kovačević

**ADSORPCIJA ALBUMINA NA β -TRIKALCIJEV
FOSFAT**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Jelena Macan

Neposredni voditelj: dr. sc. Maja Dutour Sikirić, v. zn. sur.

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Jelena Macan

prof. dr. sc. Marica Ivanković

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

Zagreb, rujan 2019.

Ovaj Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biokoloide i površinsku kemiju Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Maje Dutour Sikirić i mentorstvom prof. dr. sc. Jelene Macan akademske godine 2018./2019. Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom "Mehanizmi nastajanja kalcijevih fosfata na anorganskim nanomaterijalima. Biomimetski put pripreve multifunkcionalnih nanokompozita za regeneraciju čvrstih tkiva" IP-2018-01-1493.

ZAHVALE

Najljepša hvala mentorici prof. dr. sc. Jeleni Macan na susretljivosti, razumijevanju, savjetima, prenesenom znanju i ukazanom povjerenju prilikom izrade ovoga rada.

Veliku zahvalu dugujem neposrednoj voditeljici dr. sc. Maji Dutour Sikirić. Jedno veliko hvala na predloženoj temi i mogućnosti da učim pod Vašim mentorstvom. Hvala za podršku, nesebičnu i bezuvjetnu pomoć prilikom izrade eksperimentalnog i pisanog dijela rada. Hvala na pruženom znanju i lijepim riječima kada je bilo najteže.

Hvala dr. sc. Vidi Strasser na ogromnoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada. Najljepša hvala na strpljenju, nesebičnoj pomoći, razgovorima i svom slobodnom vremenu utrošenom oko svih faza izrade ovoga rada.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za biokoloide i površinsku kemiju na podršci, hvala dr. sc. Dariji Domazet Jurašin na opuštenoj atmosferi i što sam joj se uvijek mogla obratiti za pomoć. Hvala mag. chem. Ini Erceg na sintetiziranim uzorcima β -trikalcijeva fosfata. Također se zahvaljujem prof. Anne Leriche, Département de l'Ingénierie de la Chimie et des Matériaux, Université Polytechnique Hauts-de-France, Valenciennes, Francuska, u čijem je laboratoriju sintetiziran β -trikalcijev fosfat.

Hvala mojim roditeljima, Ljubici i Miroslavu, što ste bili podrška i oslonac u svakom trenutku moga školovanja i života. David i Gabrijel, hvala što ste vjerovali u mene i davali mi snage da uvijek idem naprijed.

Na kraju, hvala mojim prijateljima za nezaboravne trenutke tijekom studiranja. Ivona, Petra i Filip, hvala što ste uvijek bili uz mene, prolazili svaki stres i postali dio najljepših uspomena mojih studentskih dana.

SAŽETAK

Bolesti mišićno-koštanog sustava (lomovi, tumori i sl.) su među najučestalijim oboljenjima i pogađaju godišnje milijune ljudi širom svijeta. U njihovom liječenju se često koriste različiti implant-materijali, među kojima su, zbog sastava sličnog mineralnoj komponenti kostiju i zuba te izvrsne bioaktivnosti, najčešći kalcijevi fosfati. Kalcijevi fosfati koji se najviše koriste kao materijali za regeneraciju čvrstih tkiva su hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA), β -trikalcijev fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP) i bifazni kalcijevi fosfati (HA/ β -TCP). Prilikom ugradnje implant-materijala, na njihovu površinu se adsorbiraju proteini iz plazme, zbog čega se može promijeniti njihovo ponašanje *in vivo*. Ljudski serumski albumin (eng. *Human Serum Albumin*, HSA), najzastupljeniji protein u ljudskom tijelu, jedan je od tri proteina koji se gotovo odmah adsorbiraju na implant-materijal i time utječe na njegova svojstva. Ljudski serumski albumin i goveđi serumski albumin (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA) su homologni proteini sa strukturnom sličnošću od 76 %. BSA je najistraživaniji protein za proučavanje fizikalno-kemijskih svojstava i biološke funkcije proteina zbog lake dostupnosti i veterinarske prigodnosti.

Cilj ovoga rada bio je istražiti adsorpciju BSA na β -trikalcijev fosfat pri $\text{pH} = 7,4$ i $\theta = 25$ °C. Radi određivanja mehanizma adsorpcije, primijenjene su Langmuirova, Freundlichova i Temkinova izoterma. Eksperimentalni podaci pokazali su najbolje slaganje s Langmuirovim modelom, a kinetički model pseudo-drugog reda najbolje opisuje brzinu adsorpcije. Nastali talog analiziran je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom, pretražnom elektronskom mikroskopijom i difrakcijom rendgenskih zraka na praškastom uzorku. Dobiveni rezultati ukazali su da albumin ne utječe na sastav i morfologiju čvrste faze.

Ključne riječi: adsorpcija, proteini, kalcijevi fosfati

ABSTRACT

Albumin adsorption on β -tricalcium phosphate

Musculoskeletal diseases (bone fracture, bone tumors and others) are among the most common diseases and affect millions of people across the world every year. In their treatment, various implant-materials are often used, mostly calcium phosphates (CaP) due to their compositional similarities to the mineral component of bone and teeth and excellent bioactivity. The most frequently used calcium phosphates in bone repair are hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA), β -tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP) and biphasic calcium phosphates (HA/ β -TCP). When bioceramics are implanted, plasma proteins adsorb onto the implant surface and determine how they can be used *in vivo*. Human serum albumin (HSA), the most abundant protein in the human body, is one of three proteins that adsorb almost immediately onto the implant-material and affect its properties. Human serum albumin and bovine serum albumin (BSA) are homologous proteins with 76 % structural similarity. BSA is the most explored protein to study the physico-chemical properties and biological function of proteins, due to the veterinary conveniences and easier availability.

The aim of this study was to investigate the adsorption of BSA onto β -tricalcium phosphate at $\text{pH} = 7.4$ and $\theta = 25$ °C. Adsorption isotherms have been modelled using Langmuir, Freundlich and Temkin isotherms and adsorption followed Langmuir isotherm model. From the results of various kinetic models, the adsorption kinetics were found to follow pseudo-second-order rate kinetic model. Fourier transform infrared spectroscopy, powder X-ray diffraction and scanning electron microscopy were used for characterization of the precipitates. Obtained results show that albumin did not influence the composition and solid phase morphology.

Keywords: adsorption, proteins, calcium phosphates

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. Kalcijevi fosfati	3
2.1.1. β -trikalcijev fosfat	4
2.2. Proteini	5
2.2.1. Goveđi serumski albumin.....	6
2.3. Adsorpcija	7
2.3.1. Kinetički modeli adsorpcije.....	8
2.3.2. Adsorpcijske izoterme	11
2.3.3. Adsorpcija proteina	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	23
3.1. Materijali	23
3.1.1. Priprema izvorne i radnih otopina BSA	23
3.1.2. Ispitivanje kinetike adsorpcije BSA na β -TCP.....	23
3.1.3. Određivanje adsorpcijske izoterme	24
3.2. Instrumentalne metode	26
3.2.1. UV/Vis spektrofotometrija	26
3.2.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom.....	27
3.2.3. Rendgenska difrakcijska analiza	27
3.2.4. Pretražna elektronska mikroskopija	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Kinetika adsorpcije.....	28
4.2. Adsorpcijske izoterme.....	31
4.3. Utjecaj albumina na sastav i morfologiju taloga	36
5. ZAKLJUČAK	47
6. POPIS SIMBOLA I KRATICA	48
7. LITERATURA.....	50
8. ŽIVOTOPIS	55

1. UVOD

Kalcijevi fosfati (CaP), kalcijeve soli fosfatne kiseline, imaju važnu ulogu u svakodnevnom životu. Sudjeluju u procesima biološke i patološke mineralizacije, glavne su anorganske komponente kosti i zuba u kralježnjaka te se javljaju u procesima taloženja u prirodnim i otpadnim vodama. CaP materijali zbog sličnosti s glavnim mineralom kostiju i zuba, ionski supstituiranim kalcij deficitarnim apatitom ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, $0 < x < 1$, DA), te zato i dobrom bioaktivnošću, među najčešće su primjenjivanim implant-materijalima u liječenju kostiju i zuba. No, zbog slabijih mehaničkih svojstava u usporedbi s drugim keramikama kao što su titanijske ili cirkonijske njihova primjena je ograničena. CaP materijali mogu se koristiti u obliku keramike, cementa, prevlaka, itd. Danas je poznato 13 faza CaP od kojih se čak 7 pojavljuje u biološkim okruženjima. Najproučavanija CaP biokeramika je hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA), oktakalcijev fosfat ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, OCP), kalcijev hidrogenfosfat dihidrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCPD) i β -trikalcijev fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP).^[1-3]

Ponašanje bioimplantata u biološkom okruženju je ključno za njihovu uspješnu primjenu. Površina implant-materijala je u direktnom kontaktu sa okolnim tkivom pa je njegova biokompatibilnost određena površinskim svojstvima materijala.^[3,4] Pri bilo kojoj implantaciji, na površinu materijala prvo se adsorbiraju proteini iz krvne plazme koji mogu modificirati ponašanje implantata. Albumin, imunoglobulin G i fibrinogen su tri najvažnija proteina koja reagiraju s implant-materijalom. Među njima, albumin je najčešći i olakšava kolonizaciju implant-materijala mezenhimskim matičnim stanicama^[5] (nekrvotvorne stanice najzastupljenije u koštanoj srži koje u *in vitro* sustavu izražavaju imunomodulatorne značajke). Osim toga, najzastupljeniji je globularni protein krvne plazme čija je najvažnija funkcija reverzibilno vezanje i transport endogenih i egzogenih molekula (masnih kiselina, bilirubina, metala, lijekova), a adsorbira se na površinu implant-materijala odmah po njegovoj ugradnji i time utječe na njegovo ponašanje *in vivo*. Goveđi serumski albumin (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA) može poslužiti kao zamjena za ljudski albumin (eng. *Human Serum Albumin*, HSA) zbog lake dostupnosti, stabilnosti i strukturne sličnosti te je često korišten proteinski model u istraživanjima lijekova zbog svoje dobre topljivosti, fiziološkog značaja i biomedicinske primjene. No, najviše se koristi za proučavanje fizikalnih i bioloških aspekata adsorpcije proteina na čvrstim površinama uključene u mnoge biološke procese.^[6,7]

Kada je otopina proteina u kontaktu s čvrstom fazom, u većini slučajeva dolazi do adsorpcije proteina na međupovršinu. Pod pojmom *adsorpcija proteina* najčešće se misli na spontani proces koji se događa kada je čvrsta površina izložena otopini proteina. Količina adsorbirane tvari i stabilnost nastalog proteinskog sloja ovise o fizikalno-kemijskim karakteristikama proteina (veličina, fleksibilnost, naboj), površini izabranog adsorbensa (površinska energija, naboj, morfologija) i interakcijama između čvrste površine i proteina. Složeni proces vezanja molekula proteina na čvrste površine odvija se u nekoliko koraka. Na početku, dolazi do transporta molekula proteina iz volumena otopine na međupovršinu gdje se odvija adsorpcija proteina na površinu adsorbensa posredstvom različitih interakcija (Coulombove, elektrostatske, van der Waalove, hidrofobne i vodikova veza). Zatim, ovisno o strukturi, molekule proteina zauzimaju slobodna adsorpcijska mjesta na površini adsorbensa kako bi povećale broj kontakata s površinom, odnosno kako bi se optimirale interakcije između proteina i površine. Rjeđe, proteini se mogu desorbirati s površine i vratiti u volumen otopine u izvornom ili strukturno promijenjenom stanju. Proces adsorpcije proteina na granici čvrsto/tekuće i dalje je predmet brojnih istraživanja zbog svoje važnosti za razvoj biokompatibilnih materijala.^[8,9]

Cilj ovoga rada bio je istražiti adsorpciju goveđeg serumskog albumina (BSA) na adsorbens β -TCP, često korišten materijal za regeneraciju čvrstih tkiva, pri $\text{pH} = 7,4$ i $\theta = 25$ °C. Iako je adsorpcija albumina na drugoj CaP biokeramici detaljno istražena, podataka o adsorpciji albumina na β -TCP je znatno manje.^[10-15] Mehanizam adsorpcije albumina određen je pomoću Langmuirove, Freundlichove i Temkinove izoterme, a brzina adsorpcije modelirana je kinetičkim modelima pseudo-prvog i pseudo-drugog reda te modelom unutarčestične difuzije. Nastali talog analiziran je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR), difrakcijom rendgenskih zraka na praškastom uzorku (PXRD) i pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM).

2. OPĆI DIO

2.1. Kalcijevi fosfati

Kalcijevi fosfati su materijali od posebnog interesa u mnogim područjima znanosti, uključujući kemiju, biologiju, medicinu i geologiju. Prema definiciji, kalcijevi fosfati sadrže tri glavna elementa: kalcij (u oksidacijskom stanju +2), fosfor (u oksidacijskom stanju +5) i kisik (u oksidacijskom stanju -2). Kemijski sastav mnogih kalcijevih fosfata uključuje vodik iz kiselih fosfatnih aniona (HPO_4^{2-} ili H_2PO_4^-), hidroksid ili vodu. Većina kalcijevih fosfata je slabo topljiva u vodi, dobro topljiva u kiselinama i netopljiva u lužinama.^[1] CaP imaju važnu ulogu u biološkoj (kosti, zubi) i patološkoj (karijes, mokraćni kamenci) mineralizaciji, glavni su konstituenti kosti i zuba i stoga imaju ključnu ulogu u svakodnevnom životu. To su najčešće korišteni koštani nadomjesci u inženjerstvu čvrstih tkiva zbog njihove sličnosti s mineralima kostiju i izvrsne biokompatibilnosti.^[2,3]

Tablica 1. Biološki važni kalcijevi fosfati, njihove skraćenice, kemijske formule, kristalni sustavi i pojavljivanje u biološkim sustavima.^[1,2]

Naziv	Skraćenica	Formula	Kristalni sustav	Pojavljivanje
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	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Triklinski	Zubni i mokraćni kamenac
Hidroksiapatit	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Heksagonski	Kosti, dentin, zubni i mokraćni kamenac
Kalcij deficijentni apatit	DA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ $0 < x < 1$		
β -trikalcijev fosfat	β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Romboedarski	Zubni i mokraćni kamenac, kalcifikacija mekog tkiva

Procesi nastajanja CaP u organizmu mogu se smatrati procesima taloženja u prisutnosti organske matrice. *In vitro*, ovisno o eksperimentalnim uvjetima, CaP mogu nastati

ili direktnom kristalizacijom ili preko amorfnih faza. U neutralnim i baznim otopinama proces se obično odvija u dva koraka. Prvi korak uključuje nastajanje metastabilnog amornog prekursora ($\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $3 < n < 4,5$, ACP) koji se u dodiru s matičnicom, procesima starenja i hidrolize, može transformirati u OCP, kalcij deficijentni apatit (DA) ili HA.^[1,2] U tablici 1. dan je pregled bioloških najvažnijih kalcijevih fosfata.

2.1.1. β -trikalcijev fosfat

β -trikalcijev fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP), točnog kemijskog naziva β -trikalcijev bis(ortofosfat), je visokotemperaturna faza koja nastaje pri temperaturama višim od 800 °C termalnim raspadom kalcij deficijentnog apatita, DA, ili međudjelovanjem u krutom stanju kiselih kalcijevih fosfata, kao što je dikalcijev fosfat anhidrid (CaHPO_4 , DCPA) s bazom, npr. CaO. Za tu fazu CaP karakteristično je da ne može taložiti iz vodenih otopina. Osim već spomenutog načina pripreme, ion-supstituirani β -TCP se može prirediti i kalciniranjem kostiju pa se ponekad naziva *koštanim pepelom*. β -TCP kristalizira u romboedarskom sustavu, jedinična ćelija sadrži 21 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ formulsku jedinicu. Struktura sadrži tri tipa kristalografski neekvivalentnih PO_4^{3-} grupa različitih dužina i kutova veza unutar tetraedra. Pri temperaturama iznad 1125 °C, β -TCP transformira u α -TCP koja se smatra njegovom visokotemperaturnom fazom i ne pojavljuje se u prirodnoj kalcifikaciji. α - i β -TCP imaju isti kemijski sastav, ali različitu kristalnu strukturu i topljivost. Budući da je stabilna faza na sobnoj temperaturi, β -TCP je manje topljiv u vodi od α -TCP, ali zato je α -TCP reaktivniji u vodenim sustavima i može hidrolizirati u DA. Idealna struktura β -TCP sadrži slobodna mjesta koja su premala za smještanje kalcijevih iona, ali u koje se mogu smjestiti magnezijevi ioni koji stabiliziraju strukturu pa nastaje magnezij-supstituirani β -TCP. Čisti β -TCP se ne pojavljuje u biološkim kalcifikatima osim ako se ne radi o Mg-supstituiranom obliku.^[1]

Što se tiče biomedicinske primjene, β -TCP je važna biokeramika u koštanim nadomjescima, dodaje se u neke zubne paste kao blago sredstvo za poliranje. Nadalje, koristi se u multivitaminskim kompleksima, u pekarstvu kao sredstvo za sprječavanje stvaranja grudica u suhoj hrani u prahu, kao prehrambeni i mineralni dodatak hrani i hrani za životinje.^[1,2]

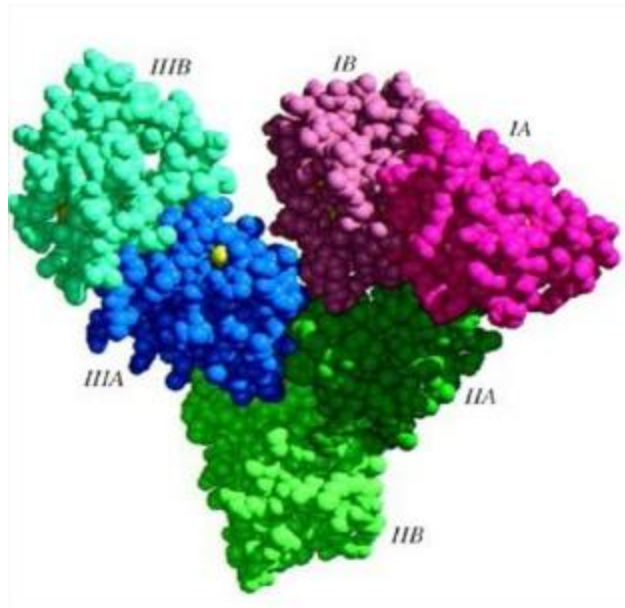
za adsorpciju na međupovršine čvrsto/tekuće, tekuće/tekuće i plinovito/tekuće.^[18] Pri proučavanju adsorpcije proteina, najvažnija pitanja na koja treba dati odgovor su:^[19]

- ❖ zašto se proteini adsorbiraju na određenim površinama,
- ❖ koji je opći mehanizam adsorpcije proteina,
- ❖ utječe li proces adsorpcije na biološke funkcije proteina?

U usporedbi s malim molekulama koje se ponašaju poput krutih čestica, većina proteina se ne adsorbira ili desorbira s površine jednostavno s određenom vjerojatnošću adsorpcije ili desorpcije. Umjesto toga, složeni sastav i struktura proteina uzrokuje mnogo zanimljivije događaje kao što su strukturne promjene, promjena afiniteta površine tijekom adsorpcije, promjena kinetike adsorpcije, itd.^[19]

2.2.1. Goveđi serumski albumin

Serumski albumini su najzastupljeniji proteini krvne plazme čija koncentracija iznosi oko 40 g L^{-1} . To su visoko topljivi proteini, eliptičnog oblika, s molekulskom masom od oko 66 kDa i niskom intrinzičnom viskoznosti. Kao glavni topljivi protein krvožilnog sustava, ima mnoge fiziološke uloge: vezanje i transport masnih kiselina, porfirina, bilirubina, steroida, kationa, aniona, aminokiselina, hormona, farmaceutika. Goveđi serumski albumin (BSA) i ljudski serumski albumin (HSA) su homologni proteini sa strukturnom sličnošću od 76 %, a BSA se najčešće koristi kao model za proučavanje fizikalno-kemijskih svojstava i bioloških funkcija proteina. BSA ima molekulsku masu od 66 kDa, sastoji se od 582 aminokiseline, ima dva triptofanska ostatka Trp-134 i Trp-212 (triptofan je esencijalna aminokiselina koja se u organizam unosi hranom, a služi za izgradnju proteina)^[20] koja posjeduju intrinzičnu fluorescenciju što omogućuje praćenje interakcija BSA s različitim tvarima. BSA se sastoji od tri homologne domene (I, II, III) povezane disulfidnim mostovima koje čine sroliku strukturu. Značajna razlika između BSA i HSA je u položaju i sastavu triptofanskih ostataka: HSA sadrži jedan triptofan u subdomeni IIA dok BSA sadrži dva.^[6,7,21]



Slika 2. Struktura goveđeg serumskog albumina (BSA). Preuzeto iz reference [21].

2.3. Adsorpcija

Adsorpcija je proces površinskog nakupljanja tvari na granici između dvije faze, a odvija se kontaktom tekuće ili plinovite faze s čvrstom fazom. Tvar na čijoj se površini odvija adsorpcija naziva se adsorbens, obično kruta faza, a tvar koja adsorbira na površinu adsorbensa, adsorbat, u tekućem je ili plinovitom stanju. Adsorpciju treba razlikovati od apsorpcije koja je proces u kojem se čestice jedne faze jednolično miješaju s česticama druge faze. Usporedno s procesom adsorpcije, odvija se i proces desorpcije koji uključuje vraćanje adsorbata s površine adsorbensa u otopinu. Adsorpcija na čvrstim površinama je često korišten proces u odvajanju i pročišćavanju tvari.^[22,23]

Ovisno o tipu veze koja se uspostavlja između površine adsorbensa i molekula adsorbata, razlikuje se fizikalna, kemijska i elektrostatska adsorpcija.^[16] Fizikalna adsorpcija (fizisorpcija) posljedica je djelovanja van der Waalsovih sila između površine adsorbensa i adsorbiranih molekula. Takve sile su slabe, ali dugog dometa čime je omogućeno vezanje udaljenijih molekula na adsorbens pa je moguća višeslojna adsorpcija. Fizisorpcija je vremenski brz proces (10^{-8} s), događa se čim molekula dođe u dodir s čvrstom fazom, a entalpije reakcije obično iznose oko -20 kJ mol^{-1} . Za razliku od fizisorpcije, kemijsku adsorpciju (kemisorpciju) karakterizira nastanak kemijskih veza između adsorbiranih molekula i površine adsorbensa što za posljedicu ima visoke vrijednosti entalpija reakcije.

Ostvarene veze su najčešće kovalentne, ali mogu biti i vodikove, a ovise i o prirodi adsorbensa i adsorbata. Osim u nekim specifičnim slučajevima, kao što je adsorpcija vodika na staklu, kemisorpcija je egzoterman proces. Kemijska adsorpcija je ireverzibilan proces jer je nastalu kovalentnu vezu teško raskinuti pa se desorpcija odvija relativno teško. Za nju je karakteristično da se odvija i pri visokim temperaturama te je adsorpcija monoslojna. Kao i kod kemijskih reakcija, taj proces ima aktivacijsku energiju pa se naziva i aktivacijska adsorpcija.^[24] Kod ionske adsorpcije, molekule se vežu elektrostatskim silama. Za ionske izmjenjivače može se reći da se ponašaju kao adsorbensi, a veličina iona presudno utječe na brzinu adsorpcije.^[23]

2.3.1. Kinetički modeli adsorpcije

Proučavajući kinetičke aspekte procesa adsorpcije, moguće je dobiti uvid u brzinu akumulacije adsorbata na površinu adsorbensa s ciljem razumijevanja mehanizama reakcije kojima se proces adsorpcije odvija. Adsorpcija na površini čvrstih materijala uobičajeno se odvija u nekoliko koraka.^[25]

- 1) prijenos adsorbata iz promatranog sustava na površinu adsorbensa,
- 2) prolazak adsorbata kroz sloj koji je vezan za vanjsku površinu adsorbensa,
- 3) interakcije između adsorbata i atoma na površini adsorbensa pri čemu su moguća dva slučaja: kemisorpcija (jake interakcije između adsorbensa i adsorbata zbog stvaranja kemijskih veza) i fizisorpcija (slabe interakcije između adsorbensa i adsorbata).

Budući da je adsorpcija složeni proces, ukupnu brzinu adsorpcije određuje brzina najsporijeg koraka. Za razumijevanje mehanizama adsorpcije potrebno je pozvati kinetiku adsorpcijskog procesa. U tu svrhu koriste se različiti matematički modeli, a najčešće korišteni su modeli pseudo-prvog i pseudo-drugog reda te model unutarčestične difuzije.^[25,26]

2.3.1.1. Model pseudo-prvog reda

Model pseudo-prvog reda je najčešće korišteni model za opisivanje adsorpcije u sustavima čvrsto/tekuće koji je još 1898. g. razvio Lagergren za opisivanje kinetičkog procesa adsorpcije oksalne i malonske kiseline na drveni ugljen, a opisuje brzinu adsorpcije koja je proporcionalna broju slobodnih mjesta za vezanje adsorbata na površinu adsorbensa.^[14,26-28]

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (1)$$

gdje je q_e – ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),

q_t – adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mg g^{-1}),

k_1 – koeficijent brzine adsorpcije pseudo-prvog reda (min^{-1}),

t – vrijeme (min).

Integriranjem navedene jednadžbe pri graničnim uvjetima $q_t = 0$ pri $t = 0$ i $q_t = q_t$ pri $t = t$ dobije se jednadžba:

$$\ln\left(\frac{q_e}{q_e - q_t}\right) = k_1 t \quad (2)$$

koja pojednostavljenjem izraza prelazi u linearni oblik:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (3)$$

Iz grafičkog prikaza ovisnosti $\ln(q_e - q_t)$ o vremenu t moguće je odrediti koeficijent brzine adsorpcije i ravnotežni adsorpcijski kapacitet.

2.3.1.2. Model pseudo-drugog reda

Jednadžbu za opisivanje kinetike pseudo-drugog reda predložili su Ho i McKay prema kojima je kemijska reakcija korak koji ograničava ukupnu brzinu reakcije, a dana je izrazom:^[14,26-28]

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (4)$$

Preuređenjem jednadžbe (4), dobije se sljedeći izraz:

$$\frac{dq_t}{(q_e - q_t)^2} = k_2 dt \quad (5)$$

gdje je k_2 koeficijent brzine adsorpcije pseudo-drugog reda ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Integriranjem navedene jednadžbe pri graničnim uvjetima $t = 0$, $t = t$, $q_t = 0$ i $q_t = q_t$ dobije se sljedeći oblik jednadžbe:

$$q_t = \frac{k_2 t q_e^2}{1 + k_2 t q_e} \quad (6)$$

čijim se preuređenjem dobije linearni izraz:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{q_e} t + \frac{1}{k_2 q_e^2} \quad (7)$$

Iz grafičkog prikaza ovisnosti t/q_t o vremenu t moguće je odrediti kinetičke parametre, ravnotežni adsorpcijski kapacitet i koeficijent brzine adsorpcije pseudo-drugog reda. Pokretačka sila adsorpcije je razlika između ravnotežnog adsorpcijskog kapaciteta i adsorpcijskog kapaciteta u vremenu t .

2.3.1.3. Model unutarčestične difuzije

Budući da modeli pseudo-prvog i pseudo-drugog reda ne pružaju učinkovita rješenja za objašnjenje mehanizama difuzije, Weber i Morris predložili su model unutarčestične difuzije prema kojemu adsorbat prelazi iz otopine na površinu adsorbensa u jednom ili nekoliko koraka koji uključuju difuziju kroz film ili vanjsku difuziju, difuziju unutar pora adsorbensa i adsorpciju na površini pora adsorbensa. Prema tome modelu, adsorpcija je proces kontroliran difuzijom i ovisi o brzini kojom adsorbat difundira prema adsorbensu, a prikazuje se sljedećim izrazom.^[14,26,27,29]

$$q_t = k_{id} t^{1/2} + C \quad (8)$$

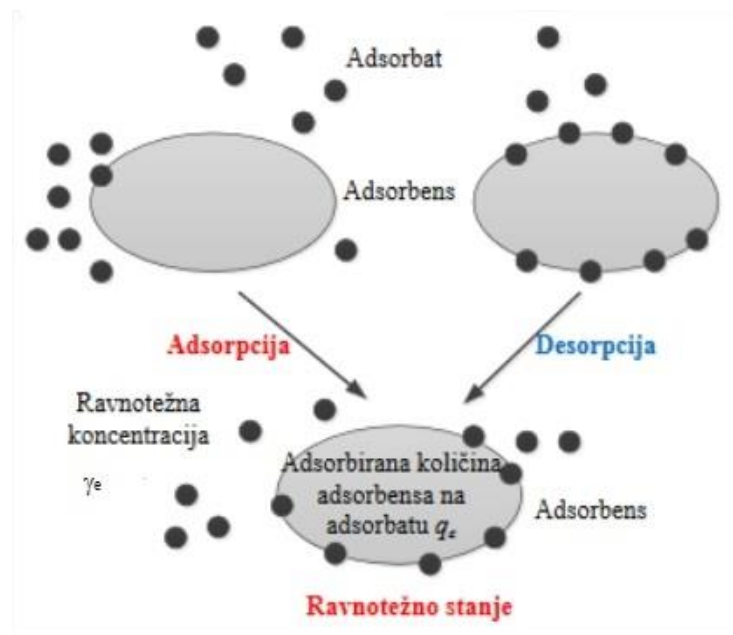
gdje je k_{id} – koeficijent brzine unutarčestične difuzije ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0.5}$),

C – konstanta povezana s difuzijskom otpornošću, tj. odsječak koji daje uvid u debljinu graničnog sloja.

Veća vrijednost C ukazuje na veći utjecaj graničnog sloja i veći adsorpcijski kapacitet adsorbensa.^[30,31]

2.3.2. Adsorpcijske izoterme

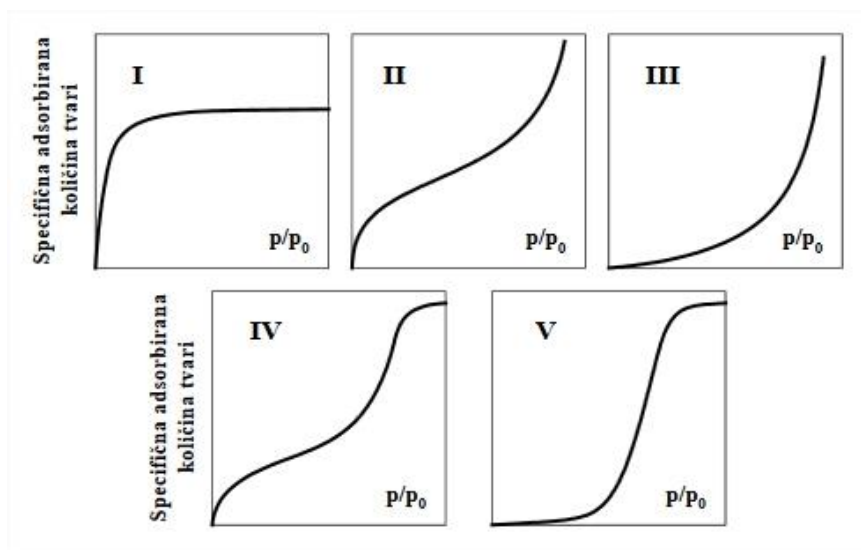
Adsorpcijska mjerenja provode se pri konstantnoj temperaturi, a ravnotežno ponašanje opisuje se adsorpcijskim izotermama koje predstavljaju matematičke modele pomoću kojih je moguće odrediti količinu adsorbirane tvari po jedinici mase adsorbensa u ovisnosti o ravnotežnoj (neadsorbiranoj) koncentraciji adsorbata. Na kojem području adsorbensa će doći do kontakta s adsorbatom ovisi o interakcijama između adsorbensa, adsorbata i otopine.^[28]



Slika 3. Grafički prikaz adsorpcijskog sustava. Preuzeto iz reference [32].

Oblik adsorpcijske izoterme pruža nam informacije o adsorpcijskom procesu i stupnju zasićenosti površine adsorbensa adsorbatom. Najpoznatije adsorpcijske izoterme nazvane su po njihovim autorima, a to su Langmuirova, Freundlichova i BET (Brunauer, Emmet i Teller) izoterma.^[22,33] Brunauer je adsorpcijske izoterme podijelio na 5 tipova (slika 4.) koje se razlikuju ovisno o stupnju adsorpcije (monoslojna ili višeslojna), mehanizmu adsorpcije, svojstvima površine adsorbensa i jačini interakcija adsorbens-adsorbat.

Izotermu tipa I karakterizira velika brzina adsorpcije pri malim tlakovima uz postizanje ravnoteže (platoa) pri dovoljno visokom tlaku. Plato predstavlja ravnotežu kada je zauzeta sva površina adsorbensa. Taj tip izoterme naziva se i izotermom Langmuirovog tipa za koji je karakterističan nastanak monosloja stoga se očekuje u slučaju kemisorpcije. Početni dio izoterme tipa II odgovara izotermi Langmuirovog tipa i karakterizana je nastankom monosloja, a ostatak krivulje opisuje nastanak višelojeva. Takvo ponašanje očekuje se u slučaju fizisorpcije, a obično ga pokazuju makroporozni adsorbensi. Za izotermu tipa III karakteristična je konveksna krivulja za cijelo područje tlaka. Opisuje se modificiranom BET jednadžbom i javlja se u sustavima u kojima su interakcije između molekula adsorbata jače nego između adsorbensa i adsorbata. Izoterma tipa IV smatra se kombinacijom izoterme tipa I i II. Brzina adsorpcije povećava se pri nižim vrijednostima tlaka nakon čega slijedi monoslojna-višeslojna adsorpcija. Izoterma tipa V prikazana je krivuljom S oblika. Mahle je razvio model za opisivanje adsorpcijskih i desorpcijskih karakteristika ovog tipa izoterme iz integrirane funkcije raspodjele veličine pora.^[33]



Slika 4. Podjela adsorpcijskih izotermi prema Brunaueru. p – parcijalni tlak komponente koja se adsorbira, p^0 – tlak pri kojem dolazi do zasićenja. Preuzeto iz reference [22].

2.3.2.1. Langmuirova izoterma

Langmuirov adsorpcijski model jedan je od najčešće primjenjivanih, a temelji se na nekoliko pretpostavki. Prvo, površina adsorbensa sadrži određeni broj aktivnih mjesta pri čemu svaka molekula adsorbata zauzima jedno mjesto. Zatim, ukoliko je pokrivenost površine

potpuna, stvara se monosloj i ne postoje interakcije između adsorbiranih molekula kao ni steričke smetnje. Procesi adsorpcije i desorpcije su u ravnoteži pa se na određeno mjesto može adsorbirati neka molekula ukoliko je to mjesto prazno ili kada se neka molekula desorbira. Brzina adsorpcije, odnosno broj molekula koje se u određenom vremenu adsorbiraju na površinu adsorbensa, proporcionalna je parcijalnom tlaku komponente koja se adsorbira i broju slobodnih mjesta na kojima nije došlo do adsorpcije, a brzina desorpcije, odnosno broj molekula oslobođenih u vremenu, proporcionalna je broju zaposjednutih mjesta.^[14,22,23,34,35] Langmuirov adsorpcijski model izveden je iz kinetičkog pristupa uz pretpostavku da su brzine adsorpcije i desorpcije u ravnoteži jednake, a dane su izrazima:^[24,36]

$$v_{\text{ads}} = k_{\text{ads}}cS(1 - aLT) \quad (9)$$

$$v_{\text{des}} = k_{\text{des}}aLST \quad (10)$$

gdje je k_{ads} - koeficijent brzine adsorpcije,
 k_{des} - koeficijent brzine desorpcije,
 c - koncentracija molekula u otopini,
 S - površina adsorbensa,
 a - površina koju zauzima jedna adsorbirana molekula,
 L - Avogadrova konstanta,
 T – termodinamička temperatura.

Linearizirani oblik Langmuirove izoterme može se prikazati na sljedeći način:^[28]

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m K_L} \cdot \frac{1}{\gamma_e} + \frac{1}{q_m} \quad (11)$$

gdje je q_m – maksimalni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),
 K_L – Langmuirova konstanta (L mg^{-1}),
 γ_e – ravnotežna koncentracija adsorbirane tvari (mg L^{-1}).

Iz grafičkog prikaza ovisnosti recipročnog ravnotežnog adsorpcijskog kapaciteta o recipročnoj ravnotežnoj koncentraciji, moguće je odrediti Langmuirovu konstantu adsorpcijske ravnoteže i maksimalni adsorpcijski kapacitet. K_L se odredi iz nagiba takvoga pravca, a q_m iz odsjeka.

Ograničenja Langmuirove izoterme su to što nije prikladna za objašnjavanje adsorpcije u složenim višekomponentnim sustavima i to što ne uzima u obzir da se u realnim sustavima adsorpcija često nastavlja nakon nastanka monosloja, pri čemu se nastali monosloj ne ponaša idealno.

2.3.2.2. Freundlichova izoterma

1906. Freundlich je predstavio empirijski model za opisivanje neidealne i reverzibilne adsorpcije na heterogenim površinama koja nije ograničena na nastanak monosloja adsorbata na adsorbensu. Freundlichova izoterma često se koristi u heterogenim sustavima za opisivanje višeslojne adsorpcije u kojima potencijalna mjesta adsorpcije različitih energija nemaju jednaki afinitet za vezanje molekula adsorbata. Najveći afinitet prema vezanju molekule pokazivat će mjesta najveće energije na površini adsorbensa jer nastaju najjače veze adsorbens-adsorbat. Među adsorbiranim molekulama postoje interakcije, a entalpija adsorpcije eksponencijalno opada sa stupnjem pokrivenosti površine adsorbensa adsorbatom. Freundlichova izoterma se često koristi za objašnjavanje adsorpcije organskih vrsta na aktivnom ugljenu ili molekularnim sitima.^[14,24,25,34,35]

Freundlichova izoterma prikazuje se jednadžbom:^[37]

$$q_e = K_F \cdot \gamma_e^{\frac{1}{n}} \quad (12)$$

gdje su K_F i n konstante karakteristične za adsorpcijski sustav adsorbens-adsorbat pri danoj temperaturi. n je mjera intenziteta adsorpcije i može imati vrijednosti veće ili manje od 1. Vrijednosti veće od 1 ukazuju na zadovoljavajuću adsorpciju dok vrijednosti manje od 1 ukazuju na manju jačinu adsorpcije, tj. ostvaruju se slabije veze između adsorbensa i adsorbata što upućuje na veću heterogenost površine adsorbensa. Logaritmiranjem se dobije linearni oblik Freundlichove jednadžbe:^[28]

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln \gamma_e \quad (13)$$

gdje je: K_F – Freundlichova konstanta $((\text{mg g}^{-1})(\text{mg L}^{-1})^{1/n})$,

n – koeficijent koji ukazuje na intenzitet adsorpcije.

Iz grafičkog prikaza ovisnosti $\ln q_e$ o $\ln \gamma_e$ moguće je odrediti konstante K_F i $1/n$ iz odsjeka i nagiba pravca.

2.3.2.3. Temkinova izoterma

Temkinov adsorpcijski model temelji se na pretpostavci da toplina adsorpcije svih adsorbiranih molekula u sloju linearno opada s povećanjem stupnja pokrivenosti površine adsorbensa, odnosno postoji linearni odnos između interakcija adsorbens-adsorbat čime se, posljedično, smanjuje toplina adsorpcije za sve molekule prisutne u sloju. Za ovaj model karakteristična je jednolika raspodjela energije vezanja sve do neke maksimalne vrijednosti.^[14,38]

Temkinova izoterma prikazuje se jednadžbom:^[35,38]

$$q_e = B_T \ln(K_T \gamma_e) \quad (14)$$

čiji linearni oblik izgleda:

$$q_e = B_T \ln K_T + B_T \ln \gamma_e \quad (15)$$

B_T je konstanta povezana s toplinom adsorpcije i može se definirati kao:

$$B_T = \frac{RT}{b} \quad (16)$$

gdje je R – opća plinska konstanta ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$),

T – termodinamička temperatura (K),

b – konstanta Temkinove izoterme (J mol^{-1}),

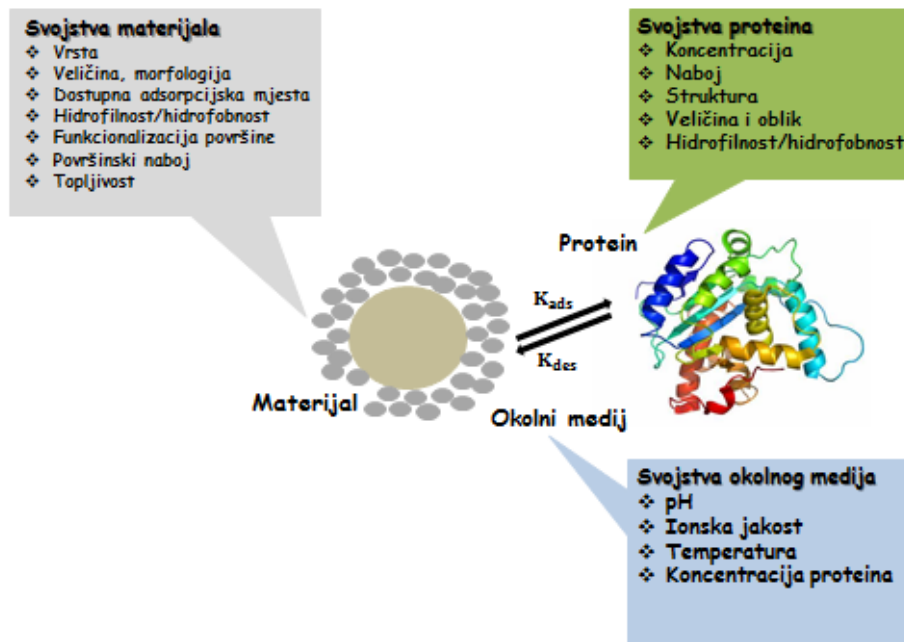
K_T – konstanta ravnotežnog vezanja (L g^{-1}).

Iz grafičkog prikaza ovisnosti ravnotežnog adsorpcijskog kapaciteta o ravnotežnoj koncentraciji moguće je odrediti konstante Temkinove jednadžbe, B_T i K_T , iz nagiba i odsječka jednadžbe pravca.

2.3.3. Adsorpcija proteina

Kao što je ranije rečeno, proteini su složeni biopolimeri građeni od aminokiselina uz koje se mogu pojaviti i fosfati, oligosaharidi i lipidi. Ta jedinstvena raznolikost osnovnih elemenata za izgradnju molekula proteina rezultira izvanrednom strukturalnom i funkcionalnom složenosti što otežava objašnjenje adsorpcijskog ponašanja proteina.^[19] Andrade i suradnici nazvali su to *jedinstvenom molekularnom osobnošću* svakog proteina.^[39] Kako bi se osigurala učinkovita i sigurna upotreba proteina u novim područjima primjene, potrebno je istražiti njihovo ponašanje u procesima adsorpcije u sustavima čvrsto/tekuće, tekuće/tekuće i plinovito/tekuće.

Adsorpcija proteina na čvrstim površinama ima veliki značaj u mnogim biološkim procesima stoga ne čudi zainteresiranost velikog broja istraživača upravo za ovo područje istraživanja. Unatoč znatnom napretku, još uvijek postoje neslaganja u objašnjavanju strukturalnih promjena, kinetike adsorpcije ili agregacije proteina. No, ta neslaganja mogu se pripisati različitim eksperimentalnim uvjetima i nepotpunoj analizi površine materijala.^[19] Među različitim biopolimerima, proteini su površinski najaktivniji. Kada je površina izložena otopini koja sadrži proteine, proteini se spontano akumuliraju na međupovršinu čvrsto/tekuće pri čemu se mogu odvijati različiti procesi koji ovise o složenom djelovanju vodikovih veza te elektrostatskih, hidrofobnih i van der Waalsovih interakcija, kao i različitih faktora poput sastava i naboja površine, solvatacije, interakcija donor-akceptor, hidrofobnosti, odnosno hidrofilitnosti površine i proteina, strukture proteina i svojstava medija (slika 5.).^[9,40] Akumuliranje proteina na međupovršini čvrsto/tekuće posljedica je površinskih svojstava materijala, prirode otapala, pH, ionske jakosti otopine i temperature.^[18] Adsorpcija proteina praćena je promjenom Gibbsove energije sustava. Ako se Gibbsova energija adsorpcije (ΔG_{ads}) smanji, dolazi do adsorpcije proteina pri čemu velike negativne vrijednosti ΔG_{ads} ukazuju na visoki adsorpcijski afinitet.



Slika 5. Parametri koji utječu na adsorpciju proteina. Preuzeto iz reference [18].

Uspješnost adsorpcije proteina na čvrstim površinama ovisi i o svojstvima proteina i površine. Najvažnija svojstva proteina su veličina, naboj i strukturalna stabilnost: veće molekule mogu imati više mjesta na kojima može doći do kontakta s površinom, molekule čiji je naboj u blizini izoelektrične točke adsorbiraju brže, a manje stabilni proteini mogu se uviti u većoj mjeri u odnosu na stabilne i oblikovati više dodirnih točaka s površinom.^[4] Svojstva površine koja utječu na adsorpciju proteina su topografija, sastav, hidrofobnost, heterogenost i energija površine. Pod pojmom topografija površine podrazumijava se hrapavost, poroznost, veličina pora i čestica površine. Ti parametri određuju koji će dio površine ostvariti interakcije s molekulama proteina. Izloženiya površina može više reagirati s proteinima i vezati ih na različite načine, preko elektrostatskih sila, uslijed hidrofobnosti, itd. Veća hrapavost trebala bi osigurati da je veća površina izložena molekulama proteina koje se adsorbiraju, no ne i u slučaju nano dimenzija. Dos Santos i suradnici zabilježili su da je adsorpcija albumina na HA s manjom hrapavošću bila bolja nego na β -TCP.^[41] Veća poroznost značajno poboljšava adsorpciju proteina jer osigurava da je veća površina izložena otopini proteina. Kemijski sastav površine određuje učinkovitost adsorpcije proteina i količinu adsorbiranih proteina pomoću interakcija koje se ostvaruju između funkcionalnih grupa prisutnih na supstratu i proteinu. Kemijska priroda površine uzrokuje jača međudjelovanja protein-površina pomoću elektrostatskih i hidrofobnih interakcija. Eksperimenti i računalne simulacije pokazale su da su upravo elektrostatske sile dominantne u procesu adsorpcije

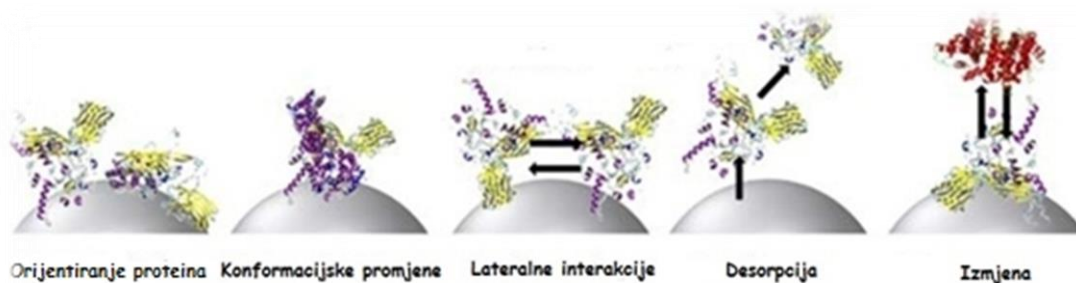
proteina.^[42,43] Ioni ili skupine na površini supstrata mogu vezati funkcionalne grupe (amino, karbonilne, karboksilne i aromatske skupine) molekule proteina. Zhu i suradnici ustanovili su da HA, TCP i BCP imaju negativan površinski naboj pa će preferirano adsorbirati bazne proteine (npr. lizozim, LSZ) u odnosu na kisele (npr. BSA) u otopini fosfatnog pufera pri pH = 7,4.^[42] Također, hidrofobne površine imaju veću tendenciju vezanja proteina nego hidrofilne. Heterogenost površine ukazuje na nejednolika područja koja mogu različito reagirati s proteinom.^[4]

Adsorpcija proteina na čvrstim površinama važnu ulogu ima pri ugradnji implant-materijala gdje se smatra da je odgovorna za njihovu integraciju, biokompatibilnost i funkcionalnost. Nastanak biominerala, uključujući i kosti, određen je površinskom adsorpcijom i inkorporiranjem proteina u kristalnu strukturu. Stoga, razumijevanje kako makromolekule stupaju u interakcije s anorganskim materijalima od ključne je važnosti za razvoj biomimetičkih sintetskih materijala poboljšanih svojstava.^[40] Kada je biokeramika implantirana u živo tijelo, proteini iz tjelesnih tekućina će se spontano adsorbirati na njezinu površinu nakon čega slijedi vezanje stanica, stanična proliferacija i diferencijacija te migracija. Prema tome, za razumijevanje ponašanja implant-materijala u živom organizmu, neophodno je poznavati adsorpciju proteina.^[4] Nadalje, adsorpcija proteina utječe i na adheziju bakterija i stvaranje biofilmova koji se smatraju velikim problemom za javno zdravlje budući da mogu uzrokovati epidemije i infekcije. Nastajanje biofilmova predstavlja veliki izazov i u pročišćavanju voda jer može doprinijeti nastanku korozije.^[44] Stoga je jasno da je razumijevanje interakcija biomolekula, kao što su proteini, s umjetnim materijalima, bilo da se radi o nano, mikro ili makro dimenzijama, ključno za razvoj novih materijala i sustava za različite primjene.

Da bi se utjecalo na adsorpciju, površina materijala može se modificirati promjenom naboja uvođenjem funkcionalnih skupina kao što su karboksilne (-COOH), sulfonatne (-SO₃H), fosfonatne (-PO₃H₂) i amino (-NH₂). Upotrebom takvih pozitivno i negativno nabijenih skupina može se utjecati na interakcije s različitim skupinama prisutnim u proteinima. Kemijski sastav površine materijala, određena vrstom, koncentracijom i raspodjelom površinskih funkcionalnih grupa, određuje adsorpcijsko ponašanje proteina, njihove konformacije i aktivnost. Prema tome, prikladnim odabirom i kontrolom kemijskog sastava površine pravilnim odabirom funkcionalnih skupina može se utjecati na adsorpcijsko ponašanje proteina kao i na svojstva adsorbiranog sloja.^[18]

Amino funkcionalne grupe koriste se ponajviše za funkcionaliziranje površina materijala namijenjenih za medicinske svrhe kao što su biosenzori, materijali za označavanje stanica i organa, dostavu lijekova i implantate.^[45] Pozitivni naboj poboljšava učinkovitost čestica, no zabilježena je veća citotoksičnost takvih materijala. Karboksilne grupe su najzastupljenije funkcionalne skupine za funkcionaliziranje materijala namijenjenih za primjenu u kromatografiji i biomaterijalima za dijagnostiku. Sulfonatne grupe i sulfonske kiseline mogu se vezati za proteine pa su važne u mnogim biokemijskim reakcijama.^[18]

Kada protein dođe u dodir s površinom, može doći do raznih događaja (slika 6.). Između ostaloga, to su orijentiranje proteina, konformacijske promjene, interakcije protein-protein, desorpcija i izmjena. Proteini se ne ponašaju kao krute čestice nego prilagođavaju specifičnu orijentaciju koja odgovara minimumu slobodne energije, a proizlazi iz Coulombovih i van der Waalsovih interakcija, vodikovih veza, entropije otapala i protuiona.^[19] Orijentacija proteina na površini određuje koji je dio proteina izložen otopini i, posljedično, njegovu aktivnost. Primjerice, asimetrični proteini, kao što su albumini, mogu se orijentirati s kraćom ili dužom stranom na površini čestice. Orijentacija proteina određuje i površinu koju će protein zauzeti na površini čestice te konačnu debljinu proteinskog sloja. Ovisno o svojoj orijentaciji, obliku i količini, već adsorbirane biomolekule, kao što su proteini, peptidi, aminokiseline, lipidi i šećeri, sterički mogu ometati daljnju adsorpciju. Kada se molekula proteina veže za površinu, nastoji postići svoju ravnotežnu strukturu te može doći do konformacijskih promjena. Tijekom adsorpcije, konformacija proteina može se razlikovati od njegove izvorne konformacije u otopini te se time može promijeniti funkcija proteina ili enzimska aktivnost.^[46] Takve promjene mogu biti uzrokovane i lateralnim interakcijama između adsorbiranih molekula proteina koje mogu stabilizirati ili destabilizirati adsorbirani proteinski sloj.



Slika 6. Događaji na površini materijala tijekom adsorpcije proteina. Preuzeto iz reference [18].

Adsorpcija proteina i svojstva adsorbiranog proteinskog sloja ovise o koncentraciji proteina u otopini. Pri malim koncentracijama, pokrivenost površine je mala dok se kod visokih koncentracija, površina brzo prekriva proteinom pa su i konformacijske promjene spriječene. Proteinski sloj može biti gušće ili slabije pakiran pri čemu mogu nastati monoslojevi ili višeslojevi proteina. Ako je prisutno više vrsta proteina, na površinu će se u početnoj fazi adsorbirati najprije količinski najzastupljeniji, no tijekom vremena mogu biti zamijenjeni drugim proteinima većeg afiniteta. Ta vremenski ovisna izmjena već adsorbiranih proteina na površini novima iz otopine proteinske smjese, poznata je i kao Vromanov efekt.^[47] Do ovoga otkrića zajedno sa suradnikom Adamsom, Vroman je došao 1960-ih godina analizirajući razrijeđenu proteinsku smjesu krvne plazme. Sadržaj proteina u monosloju na površini može se izračunati pod pretpostavkom pravilne adsorpcije (gustoća pakiranja je 78,5 %) ili slučajne adsorpcije (gustoća pakiranja je 54,7 %).^[19] Adsorpcija proteina je reverzibilni proces i ovisi o promjeni uvjeta u mediju ili adsorpciji i zamjeni drugog proteina s većim afinitetom za površinu.

U otopini, proteini slobodno mijenjaju orijentaciju dok na površini zauzimaju određenu orijentaciju koja određuje koji dio molekule stupa u interakcije s površinom, a koji dio će biti izložen otopini. To je posebno važno kada su adsorbirani proteini ujedno i enzimi ili receptori sa specifičnom bioaktivnom ulogom povezanom s određenim aktivnim mjestom u molekuli. Zbog složene strukture, proteini pokazuju različiti afinitet prema površini ovisno o lokalnom sastavu aminokiselinskih ostataka. Često korišteni pristup je da se površina proteina podijeli u područja koja su hidrofobna, hidrofilna, pozitivnog ili negativnog naboja. Na hidrofilnim površinama, proteini izlože svoje dijelove koji su bogati hidrofilnim ostacima dok je na hidrofobnim površinama obrnuto. Proteini koji se adsorbiraju na pozitivno ili negativno nabijenim površinama izlažu suprotno nabijena područja prema površini.^[19] Ako je protein strukturno stabilan, njegova orijentacija na površini može se okarakterizirati kao bočna ili orijentacija prema krajevima. Lu i suradnici ustanovili su da je konačna debljina adsorbiranog monosloja veća u slučaju orijentacije proteina na krajevima nego u slučaju bočne orijentacije.^[48] Pomoću neutronske difrakcije određivana je orijentacija adsorbiranog BSA u sustavima zrak-voda i SiO_2 -voda. Općenito, rotacija adsorbiranih proteina je otežana, no i dalje mogu mijenjati svoju orijentaciju promjenom okolnih uvjeta što se posebno uočava kada su prisutne elektrostatske interakcije, odnosno kada su i adsorbat i površina adsorbensa nabijeni.^[48] Zbog povećane gustoće proteina na površini tijekom adsorpcije, interakcije protein-protein postaju sve dominantnije što rezultira različitim energetske stanjima.

Pretpostavlja se da protein u početku prilagođava svoju orijentaciju tako da povećava favorizirane interakcije s površinom. Interakcije između susjednih adsorbiranih proteina mogu biti nepovoljne ako su područja istog naboja okrenuta jedan prema drugom. Ta odbijanja su zanemariva kada su udaljenosti među proteinima relativno velike. Međutim, povećanjem gustoće proteina na površini, udaljenosti među proteinima postaju manje pa početna orijentacija proteina postaje nepovoljna u odnosu na specifičnu drugu orijentaciju koja omogućuje manje odbijanje. Posljedično, dolazi do orijentacijskih promjena promjenom rotacije površinski vezanih proteina kada se dosegne kritična gustoća pakiranja, odnosno adsorbirani proteini mijenjaju svoju orijentaciju iz početnog u novo stanje u kojem protein gubi dio slobodne energije smanjenjem privlačnih sila prema površini i dobivanjem slobodne energije zbog manje odbojnih sila između susjednih proteina.^[19,49]

Vanjski uvjeti kao temperatura, pH, ionska jakost otopine, koncentracija proteina i aditiva, kao što su soli ili organske komponente, te sastav pufera imaju odlučujući utjecaj na adsorpcijsko ponašanje proteina.^[19]

Temperatura utječe na stvaranje veze između proteina i supstrata. Termodinamički nestabilni proteini adsorbiraju jače na međupovršinu nego termodinamički stabilni. Povećanje temperature smanjuje termičku stabilnost proteina, a ima utjecaj na ravnotežno stanje i kinetiku adsorpcije proteina. Pokretačka sila adsorpcije proteina je povećanje entropije koje je rezultat oslobađanja površinski adsorbiranih molekula vode i iona soli kao i strukturnih pregrađivanja unutar proteina. Općenito, povećanjem temperature povećava se i količina površinski adsorbiranih proteina. Vrlo je važan i odabir prikladnog pH, jer naboj proteina ovisi o pH vrijednosti. Kada je pH jednak izoelektričnoj točki proteina (pH otopine pri kojem je ukupni naboj molekule jednak nuli)^[50], pozitivni i negativni naboj je izjednačen što rezultira neutralnom molekulom. Protein je pozitivno nabijen pri pH nižim od izoelektrične točke i negativno nabijen pri pH višim od izoelektrične točke. Elektrostatska odbijanja između proteina su smanjena pri izoelektričnoj točki što omogućuje veću gustoću pakiranja na površini. Naboj proteina je važan pri interakcijama s nabijenim površinama. Ako su supstrat i protein suprotno nabijeni, difuzija do međupovršine zbog elektrostatskih privlačenja, ali i adsorpcija, su mnogo brže nego kada su supstrat i protein istoimenog naboja. Na adsorpciju proteina utječe i ionska jakost otopine, odnosno koncentracija otopljenih iona. Što je veća ionska jakost, slabije su elektrostatske interakcije između nabijenih vrsta pa je otežana adsorpcija nabijenih proteina na suprotno nabijene supstrate dok je adsorpcija na supstrate istoimenog naboja olakšana. Niska ionska jakost otopine povećava elektrostatske interakcije

između proteina i supstrata u slučaju da su supstrat i protein suprotno nabijeni. Visoka ionska jakost može uzokovati agregaciju proteina. Što je veća količina proteina, više će se adsorbirati na prikladnom supstratu. Utjecaj aditiva na adsorpciju proteina ovisi o njihovim međusobnim interakcijama i hidrofobnosti, odnosno hidrofilnosti međupovršine. Soli imaju veliki utjecaj na adsorpciju proteina pri čemu se razlikuju dva slučaja: nespecifični i specifični učinci. Nespecifični učinci ne ovise o vrsti soli, a proizlaze iz njihovih ionskih svojstava dok specifični učinci ovise o vrsti soli i pojavljuju se pri većim koncentracijama. Općenito, soli utječu na stvaranje električnog dvosloja oko nabijenog proteina što doprinosi interakcijama između proteina i hidrofobne površine, dok su elektrostatske interakcije između proteina i hidrofilne faze smanjene.^[19] Ovisno o tome kako utječu na stabilnost proteina, aditivi se mogu podijeliti na kozmotrope i kaotrope.^[19,51] Ioni koji potiču taloženje proteina nazivaju se kozmotropi i to su SO_4^{2-} , F^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , a ioni koji usporavaju taloženje proteina nazivaju se kaotropi. Takvi su ClO_4^- , SCN^- i NH_4^+ . Kozmotropski efekt stabilizira izvornu strukturu proteina dok kaotropni destabilizira. Suprotno tome, organska otapala utječu na stabilnost proteina na način da su interakcije između proteina i hidrofobne faze smanjene, a favorizirane su reakcije između proteina i hidrofilne faze.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U eksperimentalnom dijelu ovoga rada korištene su sljedeće kemikalije:

- ❖ goveđi serumski albumin, BSA, pH 5,2, konc. > 96 % (Sigma - Aldrich, Njemačka),
- ❖ β -trikalcijev fosfat, $S_m = 6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (Département de l'Ingénierie de la Chimie et des Matériaux, Université Polytechnique Hauts-de-France, Valenciennes, Francuska),
- ❖ PBS (Phosphate buffered saline), pH = 7,4 (1 tableta otopljena u 200 mL deionizirane vode sadrži 0,01 M fosfatnog pufera, 0,0027 M KCl i 0,137 M NaCl) (Sigma - Aldrich, Njemačka),
- ❖ MiliQ voda (voda filtrirana i deionizirana u posebnom pročišćivaču),
- ❖ Whatman filterski papir 11 μm

3.1.1. Priprema izvorne i radnih otopina BSA

Izvorna otopina BSA masene koncentracije 40 mg mL^{-1} pripremljena je otapanjem 2 g goveđeg serumskog albumina u 50 mL fosfatnog pufera. Budući da tijekom pripreme dolazi do intenzivnog pjenjenja, otopina je pripremljena 24 h prije pokusa. Razrijeđenjem izvorne otopine BSA pripremljene su radne otopine masenih koncentracija 3, 5, 6, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 24, 25, 27, 35 i 40 mg mL^{-1} s ciljem ispitivanja adsorpcijskih svojstava adsorbensa pri različitim početnim masenim koncentracijama BSA.

3.1.2. Ispitivanje kinetike adsorpcije BSA na β -TCP

Za ispitivanje kinetike adsorpcije BSA na β -TCP korištene su otopine početne masene koncentracije 1 i 10 mg mL^{-1} . U plastične bočice odvagano je 300 mg adsorbensa β -TCP i dodano 2 mL radne otopine BSA izabranih masenih koncentracija. Dobivene suspenzije su se najprije homogenizirale vorteksiranjem (Homogenizator Vortex IKA), a zatim se miješale na vrtilici (IKA-LOOPSTER digital) tijekom 24 h uz brzinu od 80 okretaja po minuti. Uzorci su uzimani u različitim vremenskim intervalima: 30 min, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 i 24 h. Supernatanti su odijeljeni od β -TCP centrifugiranjem uz brzinu od 12 000 okretaja po minuti (Eppendorf centrifuge 5415 R). Supernatanti u kojima je početna koncentracija BSA iznosila 10 mg mL^{-1} razrijeđeni su u omjeru 1:10 prije UV/Vis mjerenja

(Lambda 35 PerkinElmer) kako bi se osiguralo da izmjerena apsorbancija bude u linearnom području. Adsorpcijski kapacitet u vremenu t odredi se iz razlike početne i masene koncentracije u vremenu t prema jednadžbi:^[14]

$$q_t = \frac{(\gamma_0 - \gamma_t) \cdot V}{m_{\text{ads}}} \quad (17)$$

pri čemu je q_t – adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mg g⁻¹),

γ_0 – početna masena koncentracija BSA (mg L⁻¹),

γ_t – masena koncentracija BSA u vremenu t (mg L⁻¹),

V – volumen radne otopine BSA (L),

m_{ads} – masa adsorbensa β -TCP (g).

Budući da je poznato da BSA adsorbira na plastično posuđe, izračun svih kinetičkih mjerenja bilo je potrebno korigirati za iznos koji se odnosi na adsorpciju BSA na plastici koja se odredila na jednak način bez dodatka β -TCP. Svi eksperimenti provedeni su na 25 °C.

3.1.3. Određivanje adsorpcijske izoterme

Uzorci za određivanje adsorpcijske izoterme pri 25 °C pripremljeni su vaganjem 300 mg adsorbensa u plastične bočice kojem se doda 2 mL radnih otopina BSA koncentracija 3, 5, 6, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 24, 25, 27, 35 i 40 mg mL⁻¹. Uzorci su najprije homogenizirani vorteksiranjem, a zatim miješani na vrtilici pri 25 °C tijekom tri sata, što je određeno iz kinetičkih eksperimenata, uz brzinu od 80 okretaja po minuti. Nakon tri sata, uzorci su centrifugirani na jednak način kao za kinetička mjerenja te su isprani malim volumenima supernatanta. Talozi su čuvani radi daljnje analize, a supernatanti su prema potrebi razrijeđeni i spremljeni u staklene bočice kako ne bi došlo do adsorpcije BSA. Koncentracija BSA nakon adsorpcije određena je spektrofotometrijski. Adsorpcijski kapacitet primijenjenog adsorbensa izračuna se iz razlike početne i ravnotežne masene koncentracije BSA prema sljedećoj jednadžbi:^[26]

$$q_e = \frac{(\gamma_0 - \gamma_e) \cdot V}{m_{\text{ads}}} \quad (18)$$

pri čemu je q_e – ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),
 γ_0 – početna masena koncentracija BSA (mg L^{-1}),
 γ_e – ravnotežna masena koncentracija BSA (mg L^{-1}),
 V – volumen radne otopine BSA (L),
 m_{ads} – masa adsorbensa β -TCP (g).

Slaganje eksperimentalno dobivenih parametara adsorpcije uspoređeno je s kinetičkim i matematičkim modelima adsorpcijskih izoterma opisanih u poglavlju 2.3.1. i 2.3.2.

Kao i u slučaju kinetičkih mjerenja, izvršena je korekcija koja se odnosi na adsorpciju BSA na plastično posuđe.



Slika 7. Aparatura za provođenje kinetičkih i adsorpcijskih mjerenja. Konstruirano prema referenci [52].

Na temelju provedenih adsorpcijskih mjerenja, određeni su vremenski intervali u kojima se analizirao adsorbens pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR), difrakcijom rendgenskih zraka na praškastom uzorku (PXRD) i pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM).

3.2. Instrumentalne metode

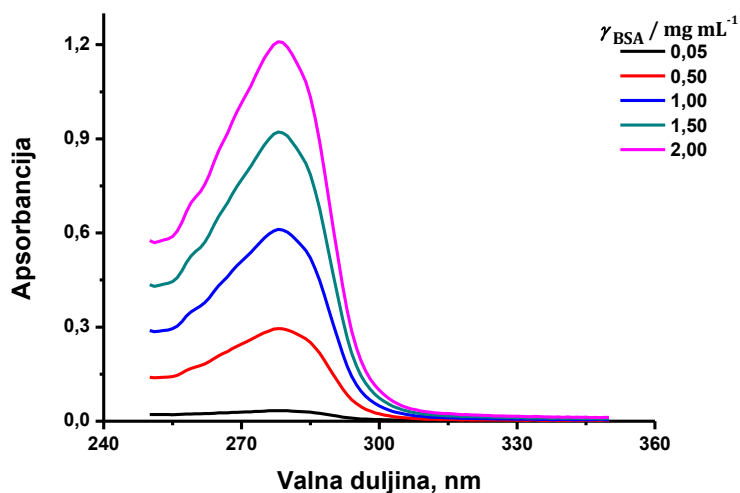
3.2.1. UV/Vis spektrofotometrija

Koncentracija otopine BSA nakon adsorpcije određena je spektrofotometrijski pomoću UV/Vis spektrofotometra Lambda 35 PerkinElmer.

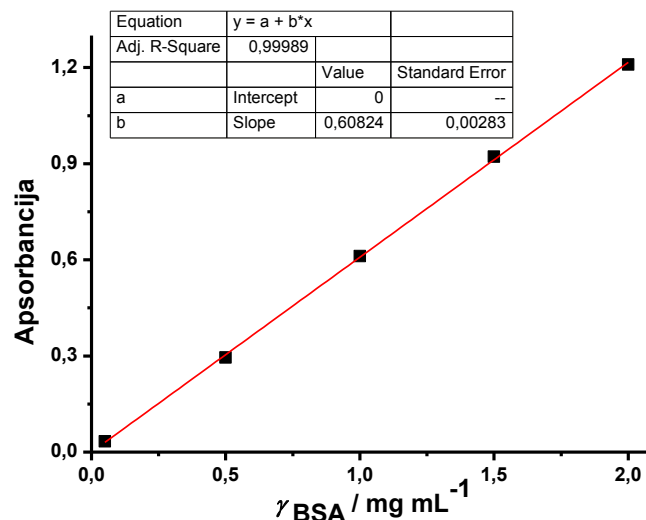
Apsorbancija radnih otopina određivana je pri 278 nm, valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma BSA (slika 8.). Koncentracija BSA u uzorcima nakon adsorpcije određena je pomoću baždarnog pravca izrađenog u području koncentracija 0,05 – 2,00 mg mL⁻¹ u kojem je odziv linearan (slika 9.) prema jednadžbi:

$$\gamma_{\text{BSA}} (\text{mg mL}^{-1}) = \frac{1}{\text{nagib pravca}} \cdot A_{278 \text{ nm}} \quad (19)$$

pri čemu $A_{278 \text{ nm}}$ predstavlja izmjerenu vrijednost apsorbcije otopine BSA na valnoj duljini maksimuma apsorpcije zračenja. Baždarni pravac određen je prije svakog mjerenja uzoraka. Supernatanti dobiveni nakon adsorpcijskih pokusa razrjeđivani su PBS-om, prije UV/Vis mjerenja, kako bi se osiguralo da je koncentracija BSA unutar područja koncentracija standardnih otopina.



Slika 8. Adsorpcijski spektar otopina BSA.



Slika 9. Primjer baždarnog pravca BSA.

3.2.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

FTIR spektri snimljeni su na Tensor II Bruker FTIR spektrofotometru s dijamantnim kristalom. Spektri su snimani 16 puta u apsorpcijskom režimu i rasponu mjerenja od 4000 do 400 cm^{-1} s rezolucijom od 4 cm^{-1} pri 25 °C.

3.2.3. Rendgenska difrakcijska analiza

Difraktogrami praškastih uzoraka dobiveni su na Rigaku Ultima IV Multipurpose difraktometru koristeći $\text{CuK}\alpha$ zračenje pri 30 kV i 30 mA u području 3 do 70° 2θ s korakom od 0,02° i vremenom zadržavanja od 0,6 s.

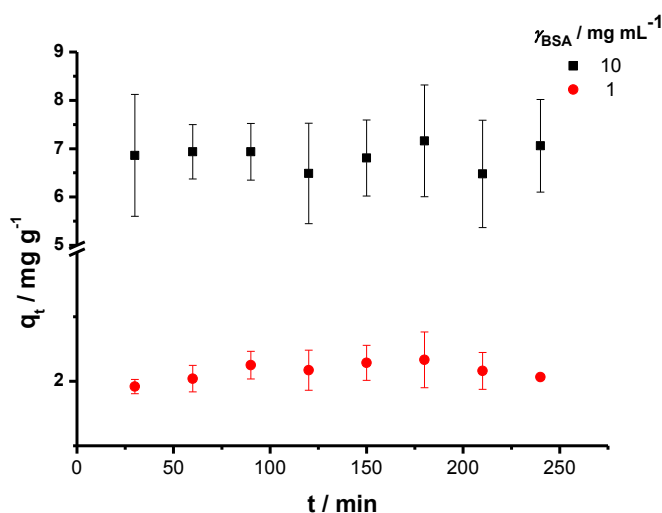
3.2.4. Pretražna elektronska mikroskopija

SEM mikrografije snimljene su na mikroskopu JEOL JSM-7000F pri energiji elektronskog snopa od 10 kV. Uzorci su napareni slojem zlata.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Kinetika adsorpcije

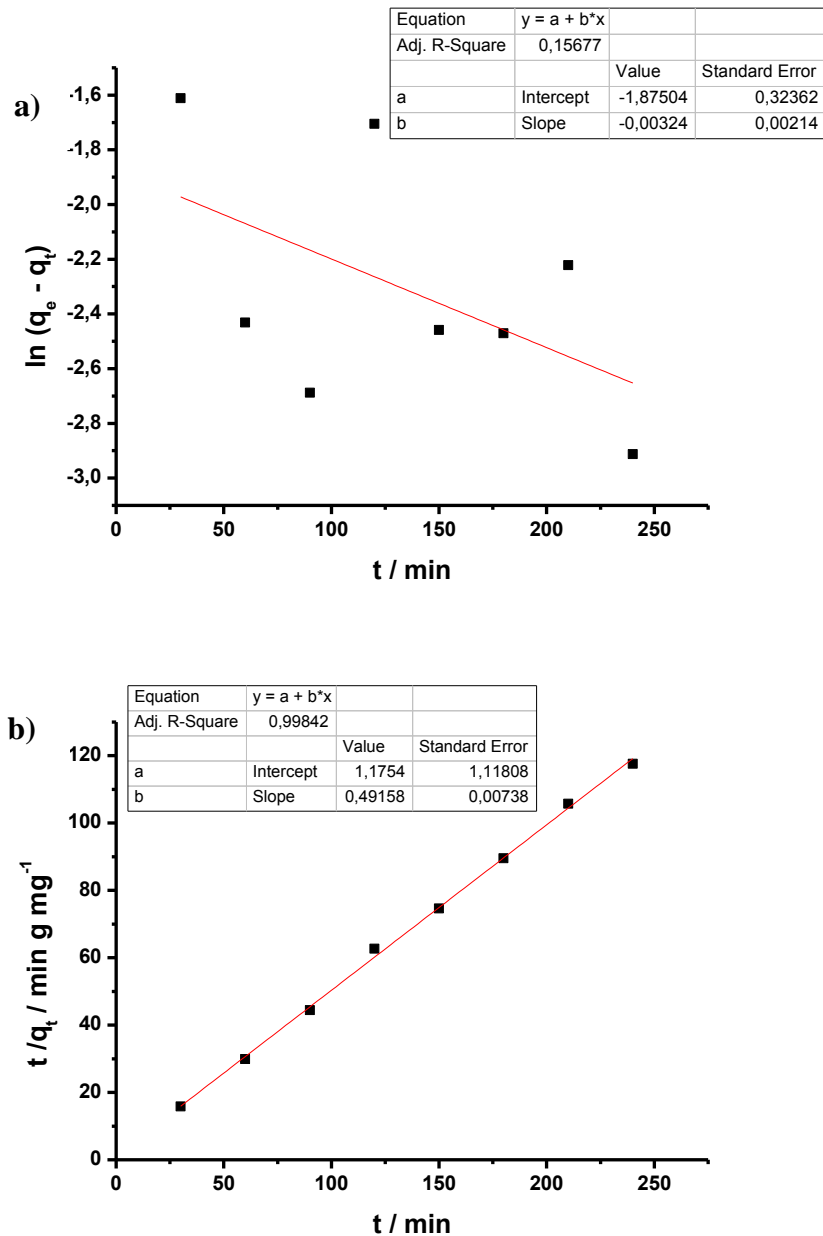
Kako bi se odredilo vrijeme potrebno za uspostavljanje adsorpcijske ravnoteže, brzina adsorpcije je praćena tijekom 4 h. Na slici 10. prikazana je ovisnost adsorpcijskog kapaciteta o vremenu adsorpcije za otopine BSA dvije različite početne koncentracije, γ_0 (BSA) = 1 i 10 mg mL⁻¹. Prema dobivenim podacima, može se uočiti da je početna adsorpcija BSA na β -TCP u oba slučaja relativno brza zbog velikog broja slobodnih adsorpcijskih mjesta. Ta faza traje između 30 min i 1 h nakon čega se uspostavlja adsorpcijska ravnoteža. Budući da je na početku procesa maksimalan broj dostupnih adsorpcijskih mjesta kao i koncentracija BSA, shodno tome, pokretačka sila adsorpcije je također najveća tijekom početne adsorpcije. Nadalje, neprestano miješanje suspenzija na vrtilici pospješuje transport molekula BSA do slobodnih mjesta na adsorbensu. Uspostavom adsorpcijske ravnoteže (plato na slici 10.), ne postoji više slobodnih mjesta na koje bi se mogle adsorbirati molekule adsorbata i stoga je adsorpcija završena. Vrijeme koje je potrebno za uspostavljanje ravnoteže naziva se ravnotežno vrijeme (t_e , min), a eksperimentalni ravnotežni adsorpcijski kapacitet u vremenu t_e ($q_{e,exp}$, mg g⁻¹) odredi se iz grafičkog prikaza ovisnosti q_t (mg g⁻¹) o vremenu t (min). $q_{e,exp}$ je određen iz grafa nakon 4 h i za γ_0 (BSA) = 1 mg mL⁻¹ uz $m_{ads} = 300$ mg iznosi 2,095 mg g⁻¹. Zbog velikog rasapa vrijednosti, nije bilo moguće točno odrediti $q_{e,exp}$ za γ_0 (BSA) = 10 mg mL⁻¹, a može se procijeniti da iznosi oko 7 mg g⁻¹.



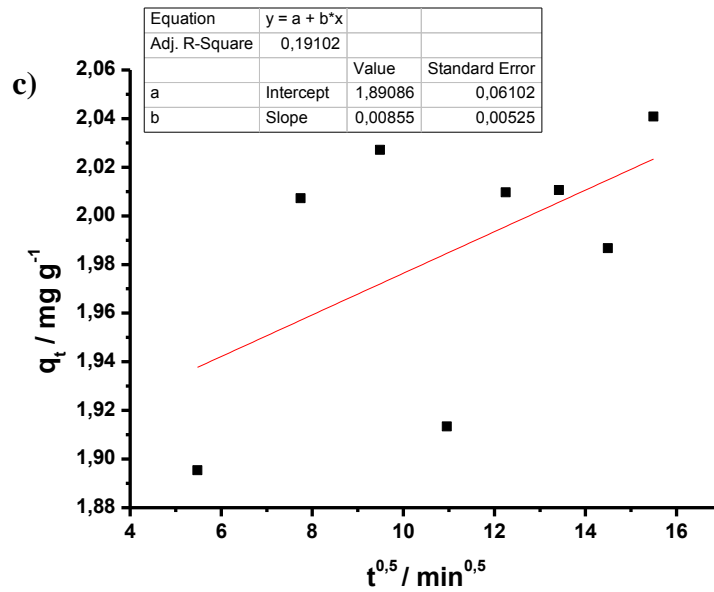
Slika 10. Kinetika adsorpcije otopina BSA na β -TCP. Eksperimentalni uvjeti: $\theta = 25$ °C,

pH = 7,4, γ_0 (BSA) = 1 i 10 mg mL⁻¹, $m_{ads} = 300$ mg, $V = 2$ mL, rpm = 80/min.

Pomoću kinetičkih modela moguće je odrediti kojim se mehanizmom odvija adsorpcijski proces. Za identificiranje mehanizma odvijanja adsorpcije, upotrijebljena su tri kinetička modela: Lagergrenov model pseudo-prvog reda, Ho i McKayev model pseudo-drugog reda i model unutarčestične difuzije.



Slika 11. Kinetički modeli (a) pseudo-prvog, (b) pseudo-drugog reda i (c) unutarčestične difuzije adsorpcije BSA na β -TCP. Eksperimentalni uvjeti: $\theta = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $\gamma_0(\text{BSA}) = 1\text{ mg mL}^{-1}$, $m_{\text{ads}} = 300\text{ mg}$, $V = 2\text{ mL}$, $\text{rpm} = 80/\text{min}$.



Slika 11. Nastavak.

Na slici 11. prikazani su različiti kinetički modeli (pseudo-prvog i pseudo-drugog reda te unutarčestične difuzije) i vrijednosti njihovih koeficijenta determinacije (R^2) koji predstavlja slaganje eksperimentalnih rezultata s pojedinim matematičkim modelom. Što je njegova vrijednost bliža jedinici, slaganje je bolje, tj. adsorpcija se ponaša prema modelu s najvećim koeficijentom determinacije. Prema tome, može se zaključiti da model pseudo-drugog reda najbolje opisuje adsorpciju BSA na β -TCP ($R^2 = 0,9984$) prema kojemu se vezanje molekula adsorbata na površinu adsorbensa odvija uz stvaranje kemijskih veza. U tablici 2. prikazane su izračunate vrijednosti parametara adsorpcije za model pseudo-drugog reda. Kinetički model pseudo-drugog reda omogućuje i određivanje vrijednosti q_e (mg g^{-1}) koja predstavlja teorijski ravnotežni adsorpcijski kapacitet izračunat iz matematičkih modela. Eksperimentalna vrijednost $q_{e,\text{exp}}$ iznosi $2,095 \text{ mg g}^{-1}$, a teorijski ravnotežni adsorpcijski kapacitet, q_e , $2,034 \text{ mg g}^{-1}$. Prema tome, može se zaključiti da se adsorpcija BSA na β -TCP odvija prema reakcijama pseudo-drugog reda. Prema vrijednostima koeficijenta determinacije za ostala dva modela, može se vidjeti da modeli pseudo-prvog reda i unutarčestične difuzije nisu prikladni za opisivanje adsorpcije BSA na β -TCP. Pretraživanjem literature, nije bilo moguće naći kinetičke parametre adsorpcije BSA na CaP. Umjesto toga, proučavana je adsorpcija morfogenetskog proteina kosti, BMP-2, na HA pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ u otopini PBS-a ($\text{pH} = 7,4$). Ustanovljeno je da se ravnoteža uspostavlja nakon 240 min, a mehanizam adsorpcije opisuje se reakcijama pseudo-prvog reda.^[14]

Tablica 2. Kinetički parametri adsorpcije BSA na β -TCP.

Kinetički model	Parametar	
	$q_{e,exp} / \text{mg g}^{-1}$	2,095
Pseudo-drugi red	$k_2 / \text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$	0,206
	$q_e / \text{mg g}^{-1}$	2,034
	R^2	0,9984

4.2. Adsorpcijske izoterme

Adsorpcijske izoterme opisuju raspodjelu adsorbata između tekuće i čvrste faze pri konstantnoj temperaturi u stanju adsorpcijske ravnoteže. To su matematički modeli, empirijski ili teorijski, koji opisuju ovisnost između adsorpcijskog kapaciteta primijenjenog adsorbensa i ravnotežne koncentracije adsorbata (slika 12. b):^[25]

$$q_e = f(\gamma_e) \quad (20)$$

Podaci dobiveni adsorpcijskim eksperimentima obrađeni su matematičkim modelima kojima se opisuju ravnotežna stanja adsorpcijskih procesa pri konstantnoj temperaturi ($\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Kako bi se odredili parametri adsorpcije, korištene su sljedeće adsorpcijske izoterme: Langmuirova, Freundlichova i Temkinova. Na slici 13. prikazane su adsorpcijske izoterme, a njihovi ravnotežni parametri dani su u tablici 3. Prema dobivenim rezultatima, može se vidjeti da Langmuirova izoterma najbolje opisuje slaganje s eksperimentalnim podacima i predstavlja najbolji model za opisivanje ravnotežnog stanja adsorpcijskog procesa u danom rasponu istraživanih masenih koncentracija albumina ($R^2 = 0,973$). Kako je već spomenuto, Langmuirova izoterma temelji se na pretpostavci da nastaje monosloj adsorbata na površini adsorbensa. Molekule adsorbata ravnomjerno se adsorbiraju na adsorpcijska mjesta, između adsorbiranih molekula nema interakcija, a površina adsorbensa je ravna i homogena.^[14] U određenom trenutku dolazi do zasićenja monomolekularnog sloja na površini adsorbensa kada više ne postoje dostupna mjesta na kojima bi došlo do adsorpcije. O zasićenosti adsorbensa adsorbatom govori maksimalni adsorpcijski kapacitet, q_m , čija vrijednost iznosi $14,045 \text{ mg g}^{-1}$. Langmuirova konstanta, K_L , govori o energiji adsorpcije i iznosi $0,00013 \text{ L mg}^{-1}$. Vrlo važna veličina Langmuirove izoterme je ravnotežni separacijski faktor,

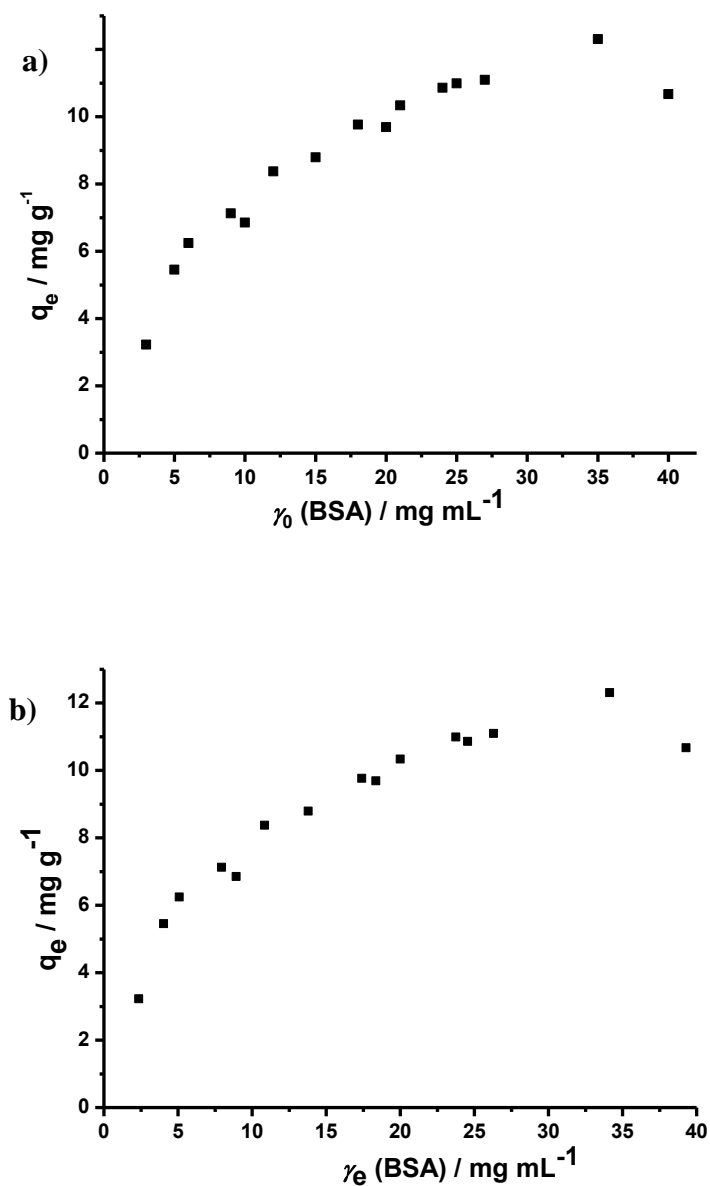
R_L , koji govori je li adsorpcija povoljna ($0 < R_L < 1$), linearna ($R_L = 1$) ili nepovoljna ($R_L > 1$), a izračunava se prema sljedećoj jednadžbi:^[14,26,27,35]

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L \gamma_0} \quad (21)$$

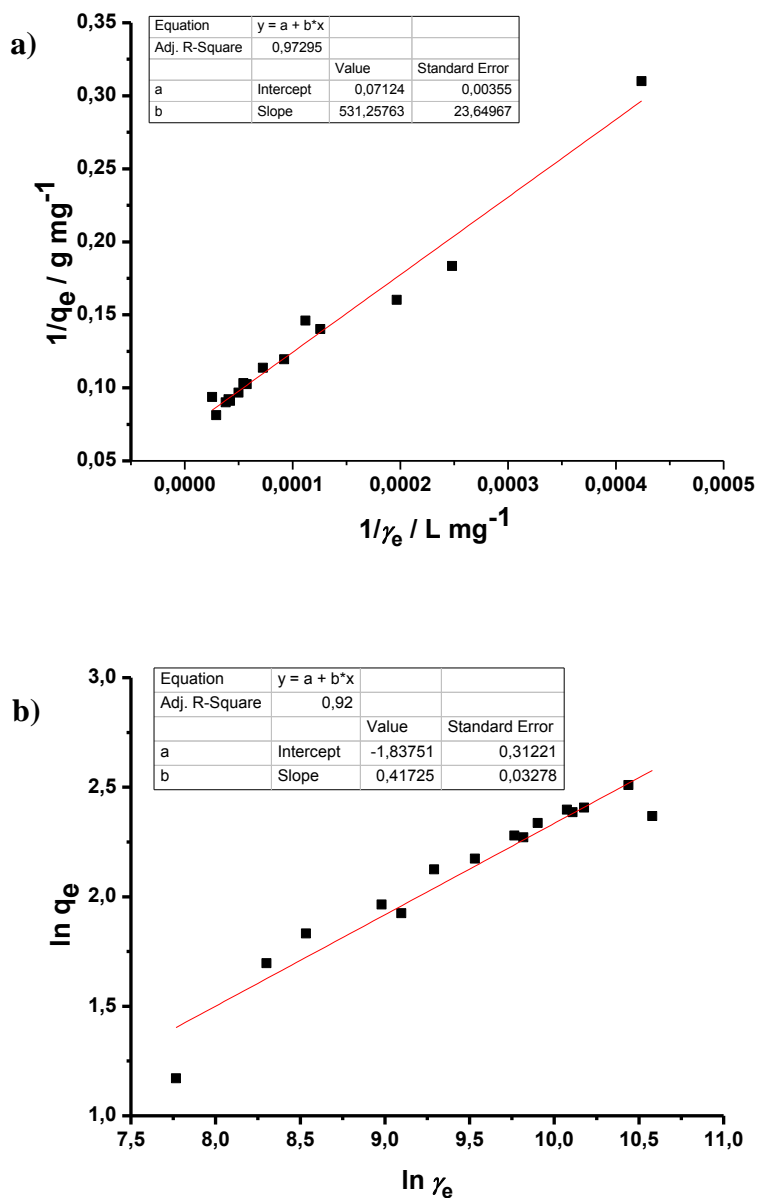
gdje je K_L Langmuirova konstanta ($L \text{ mg}^{-1}$), a γ_0 početna masena koncentracija BSA (mg L^{-1}). Dobivene vrijednosti parametra R_L su između 0 i 1 što znači da je adsorpcija BSA na β -TCP povoljna. Vrlo blisko slaganje s eksperimentalnim podacima pokazuju i Freundlichov i Temkinov model izoterme s vrijednošću koeficijenta determinacije od 0,925 i 0,955. Freundlichova izoterma služi za opisivanje višeslojne adsorpcije na energetski heterogenim površinama na koje se može vezati adsorbat, a između adsorbiranih molekula postoje interakcije. Da bi adsorpcija bila uspješna, vrijednost konstante n , koja se odnosi na intenzitet adsorpcije, treba biti iznad 1. Manje vrijednosti ukazuju na stvaranje slabijih veza između adsorbensa i adsorbata što ukazuje na veću heterogenost adsorpcijskih mjesta.^[14,35] Za adsorpciju BSA na β -TCP, vrijednost n je iznad jedan što ukazuje na uspješnost adsorpcije koja se odvija fizikalnim silama. Temkinov adsorpcijski model služi za određivanje adsorpcijskog potencijala β -TCP prema adsorpciji albumina koji iznosi $K_T = 0,00138 \text{ L g}^{-1}$. Taj model predviđa jednoliku raspodjelu energija vezanja koje ovise o gustoći i raspodjeli funkcionalnih grupa na površini adsorbensa i adsorbata.^[14]

Tablica 3. Ravnotežni parametri Langmuirove, Freundlichove i Temkinove izoterme adsorpcije BSA na β -TCP pri 25 °C.

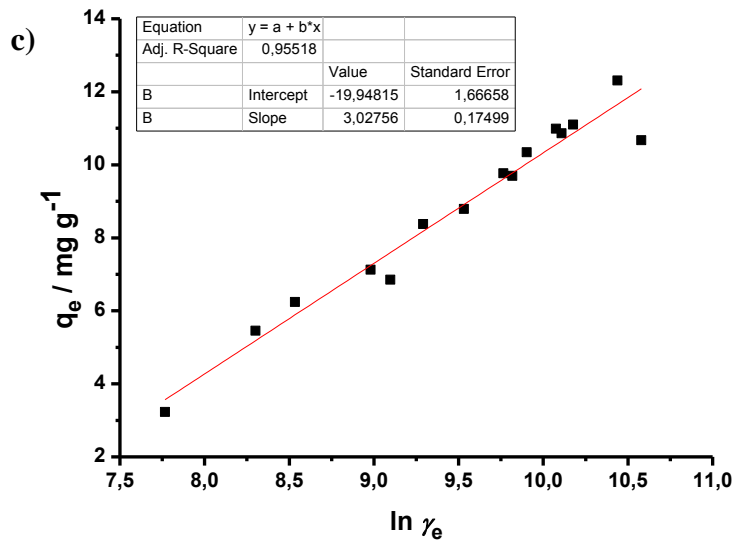
Izoterma	Parametar	
Langmuir	$q_m / \text{mg g}^{-1}$	14,045
	$K_L / \text{L mg}^{-1}$	0,00013
	R^2	0,973
Freundlich	n	2,396
	$K_F / (\text{mg g}^{-1})(\text{L mg}^{-1})^{1/n}$	0,15921
	R^2	0,925
Temkin	$K_T / \text{L g}^{-1}$	0,00138
	B_T	3,0276
	R^2	0,955



Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti ravnotežnog adsorpcijskog kapaciteta o (a) početnoj i (b) ravnotežnoj koncentraciji BSA. Eksperimentalni uvjeti: $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $\gamma_0(\text{BSA}) = 3 - 40 \text{ mg mL}^{-1}$, $m_{\text{ads}} = 300 \text{ mg}$, $V = 2 \text{ mL}$, $\text{rpm} = 80/\text{min}$, $t = 3 \text{ h}$.



Slika 13. (a) Langmuirov, (b) Freundlichov i (c) Temkinov model adsorpcije BSA na β -TCP. Eksperimentalni uvjeti: $\theta = 25$ °C, pH = 7,4, $\gamma_0(\text{BSA}) = 3 - 40$ mg mL⁻¹, $m_{\text{ads}} = 300$ mg, $V = 2$ mL, rpm = 80/min, $t = 3$ h.



Slika 13. Nastavak.

Zahvaljujući izvrsnoj bioaktivnosti, CaP biomaterijali upotrebljavaju se u različitim biomedicinskim aplikacijama i stoga ne čudi kako su to najčešće korišteni materijali u regeneraciji čvrstih tkiva. Iako postoji velik broj istraživanja adsorpcije proteina na drugoj CaP keramici, to nije slučaj za β -TCP. HA, najvažnija faza CaP odgovorna za čvrstoću kostiju i dentina, pokazuje dobru biokompatibilnost, osteoinduktivnost i veliki afinitet prema vezanju biopolimera bez izazivanja upala ili odgovara stranog tijela. Nadalje, HA ima nižu topljivost i teže se razgrađuje u uvjetima *in vivo* za razliku od TCP keramika koje se lakše degradiraju, ali imaju lošija mehanička svojstva. Ti nedostaci ograničavali bi njihovu uporabu u području implant-materijala, ali bifazni kalcijev fosfati (BCP), koji sadrže i HA i TCP fazu, pokazuju prikladnu topljivost i čvrstoću kao i jači osteoinduktivni potencijal u usporedbi s čistim HA i TCP.^[14,53,54] U tablici 4. prikazani su literaturni podaci adsorpcije BSA na hidroksiapatit (HA), karbonatni hidroksiapatit (CHA) i β -trikalcijev fosfat (β -TCP) pri različitim temperaturama i pH vrijednostima.^[13,15,55] Usporedbom izračunatih parametara s literaturnim vrijednostima adsorpcije BSA na β -TCP, jasno se uočava da ne postoji slaganje između ta dva slučaja jer su eksperimenti provedeni pri različitim uvjetima. Prema literaturnim podacima, adsorpcijska mjerenja provedena su pri pH = 6,9 uz koncentracijsko područje BSA od 0 – 10 mg mL⁻¹. Ukupni volumen iznosio je 4 mL, a vrijeme od 2 h pokazalo se optimalnim za kontakt adsorbensa sa adsorbatom. Ustanovljeno je da se adsorpcijska ravnoteža uspostavlja pri koncentracijama većim od 5 mg mL⁻¹, a adsorpcijsko ponašanje najbolje opisuje Freundlichova izoterma što se objašnjava činjenicom

da je adsorbens mljeven velikom brzinom (300 rpm) tijekom 3 h što dovodi do mikrostrukturnih promjena površine i veće heterogenosti.^[15]

Također, iz literaturnih podataka nije bilo moguće naći parametre adsorpcije BSA na BCP. Umjesto toga, provodila se adsorpcija morfogenetskog proteina kosti, BMP, što je pokazalo da ovaj protein ima veću tendenciju prema adsorpciji na BCP nego na čisti HA zbog većeg broja adsorpcijskih mjesta i mogućnosti ostvarivanja jačih interakcija između površine CaP i molekula proteina.^[14]

Tablica 4. Literaturne vrijednosti parametara adsorpcije BSA prema različitim CaP fazama: hidroksiapatitu (HA), karbonatnom hidroksiapatitu (CHA) i β -trikalcijevom fosfatu (β -TCP).^[13,15,55]

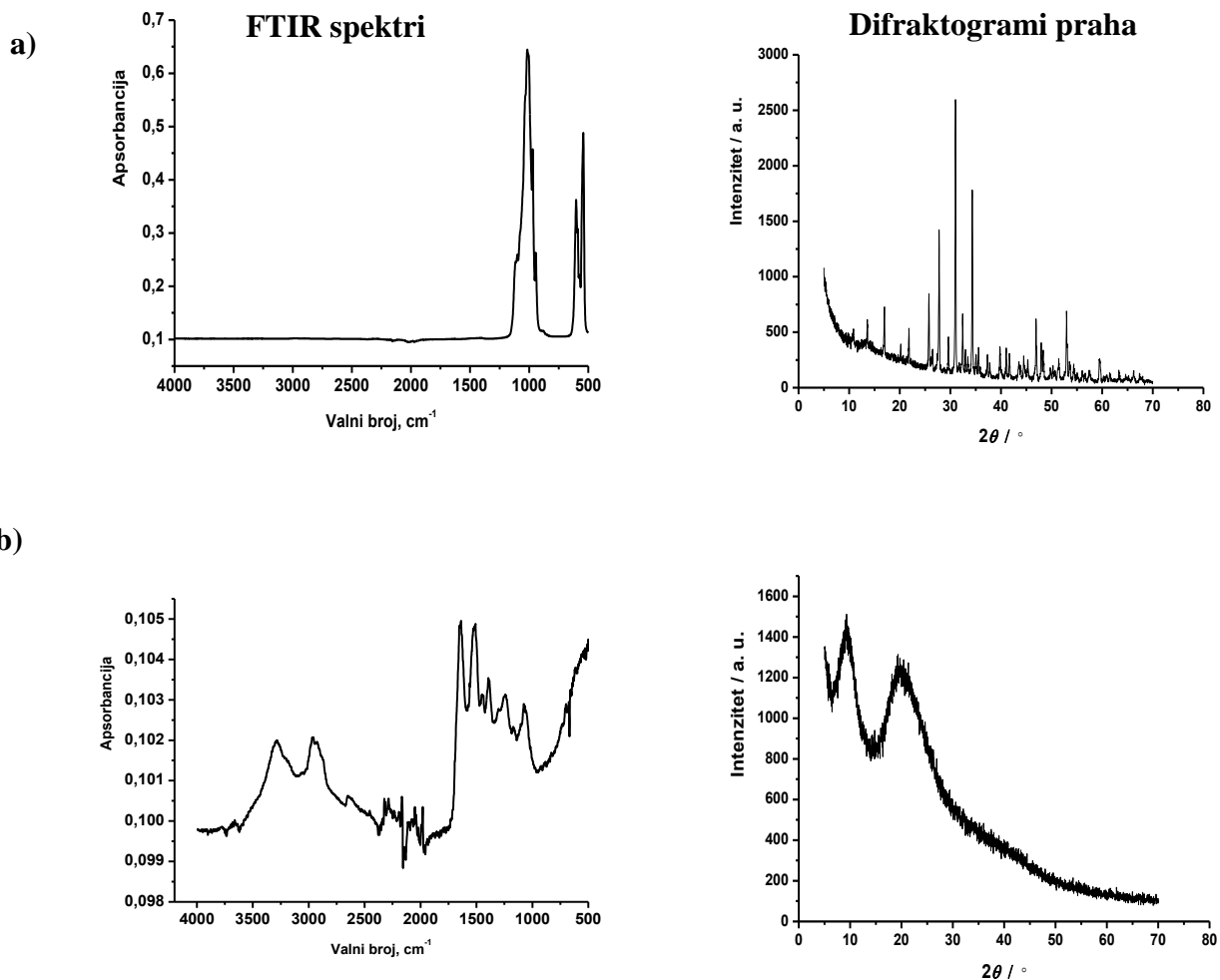
CaP faza	$\theta / ^\circ\text{C}$	pH	Langmuirov model			Freundlichov model		
			q_m (mg g^{-1})	K_L (L mg^{-1})	R^2	n	K_F ((mg g^{-1}) (L mg^{-1}) ^{1/n})	R^2
HA	18,6	7,2	7,72	0,88	-	1,96	3,46	0,990
CHA	37,0	7,4	79,85	2,09	0,993	2,86	48,00	0,987
β -TCP	-	6,9	59,56	0,24	0,891	1,40	10,09	0,914

4.3. Utjecaj albumina na sastav i morfologiju taloga

Na temelju adsorpcijskih eksperimenata, odabrani su vremenski intervali (3 i 24 h) u kojima je izoliran talog te je karakteriziran FTIR spektroskopijom, rendgenskom difrakcijskom analizom na praškastom uzorku (PXRD) i pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM). Karakterizacija se vršila na ispranim i neispranim uzorcima. Isprani uzorci prani su s malim volumenima MiliQ vode i posušeni u struji dušika dok su neisprani uzorci samo posušeni u struji dušika.

FTIR spektri i difraktogrami praha β -TCP i BSA prikazani su na slici 14., a njihove asignacije i difrakcijski maksimumi dani su u tablicama 5. – 7. U FTIR spektru β -TCP opažene su vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine, a u difraktogramu praha vidljivi su difrakcijski maksimumi karakteristični za β -TCP.^[56-58]

U FTIR spektru BSA mogu se vidjeti vrpce karakteristične za vibracije hidroksilne skupine ($3284\text{-}2956\text{ cm}^{-1}$). Javljaju se i C=O istežanje i N-H savijanje amida (1642 cm^{-1} i 1513 cm^{-1}) te C-N istežanje pri 1396 cm^{-1} .^[58-60] U difraktogramu praha pojavljuju se dva široka difrakcijska maksimuma na vrijednostima 2θ od $9,16^\circ$ i $19,4^\circ$.



Slika 14. FTIR spektar i difraktogram praha: a) β -TCP i b) BSA.

Tablica 5. Asignacija vrpce FTIR spektra praha β -TCP.^[57,58]

ν / cm^{-1}	Asignacija
1099	ν_1 nedegenerirano simetrično istežanje P-O veze (PO_4^{3-})
1014	ν_1 nedegenerirano simetrično istežanje P-O veze (PO_4^{3-})
969	ν_3 trostruko degenerirano asimetrično istežanje P-O veze (PO_4^{3-})
944	ν_3 trostruko degenerirano asimetrično istežanje P-O veze (PO_4^{3-})
604	ν_4 trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO_4^{3-})
590	ν_4 trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO_4^{3-})
542	ν_4 trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO_4^{3-})

Tablica 6. Asignacija difrakcijskih maksimuma difraktograma praha β -TCP.^[56]

$2\theta / ^\circ$	(h k l)
10,90	(0 1 2)
13,75	(1 0 4)
17,05	(1 1 0)
21,80	(0 2 4)
25,84	(1 0 10)
27,74	(2 1 4)
31,06	(2 1 7)
32,48	(1 2 8)
34,63	(2 2 0)
46,97	(4 0 10)
52,90	(3 3 0)

Tablica 7. Asignacija vrpce FTIR spektra praha BSA.^[58,60]

ν / cm^{-1}	Asignacija
3284-2956	O-H istezanje (H_2O)
1642	C=O istezanje amida I
1513	N-H savijanje amida II
1396	C-N istezanje

FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalih u kontrolnom sustavu (bez prisustva BSA) nakon 3 h i 24 h prikazani su na slici 15., a njihova asignacija dana je u tablicama 8. i 9.

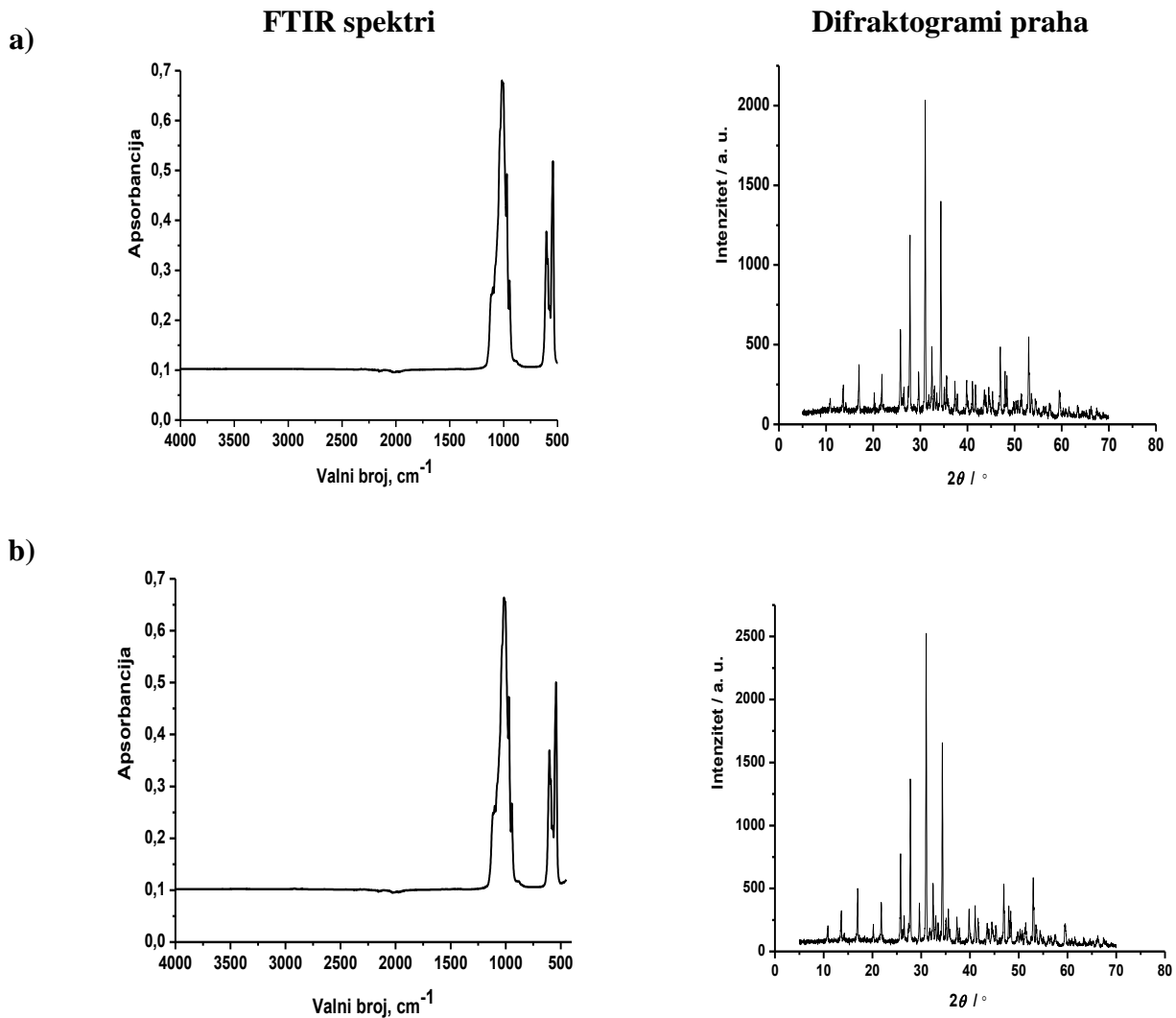
FTIR spektar i difraktogram praha taloga nakon 3 h pokazuje samo vrpce i difrakcijske maksimume karakteristične za β -TCP. U FTIR spektru opažene su vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine pri svim valnim brojevima (slika 15. a). Budući da izostaju vrpce karakteristične za vibracije hidroksilne skupine (3570 i 630 cm^{-1}), a koje se pojavljuju ukoliko je prisutan i HA,^[57] može se zaključiti da se radi o čistom β -TCP. U difraktogramu praha mogu se uočiti difrakcijski maksimumi karakteristični za β -TCP koji su jasno izraženi i velikog intenziteta što ukazuje na dobru kristaliničnost β -TCP. FTIR spektar i difraktogram praha taloga nakon 24 h (slika 15. b) su gotovo identični kao nakon od 3 h. Javljaju se vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine kao i difrakcijski maksimumi karakteristični za β -TCP.^[56-58]

Na slici 16. prikazani su FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalih u sustavima s dodatkom 15 mg mL^{-1} BSA, a njihove asignacije i difrakcijski maksimumi dani su tablicama 8. i 9.

Prema dobivenim FTIR spektrima taloga nakon 3 h i 24 h, može se vidjeti da se, kao i u slučaju kontrolnog sustavu bez dodatka BSA, javljaju vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine (slika 16. a i b). Izostaju vrpce karakteristične za BSA koje bi se trebale pojaviti na 1650 i 1540 cm^{-1} (C=O istezanje i N-H savijanje amida). Prema tome, može se vidjeti da ova koncentracija BSA ne utječe na transformaciju β -TCP što je potvrđeno i difraktogramima praha.^[56-59]

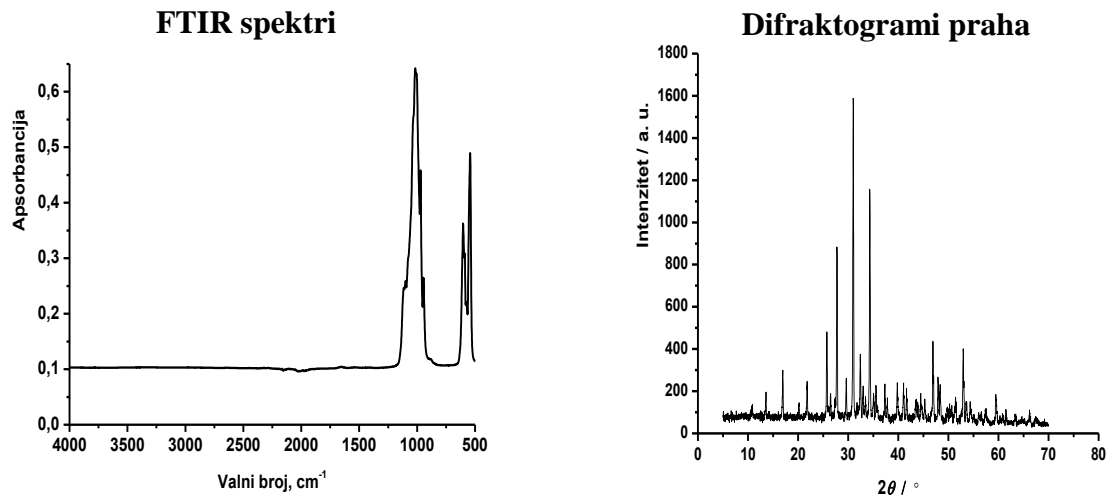
Na slici 17. prikazani su FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalih u sustavima s dodatkom 30 mg mL^{-1} BSA, a njihove asignacije i difrakcijski maksimumi dani

su tablicama 8. i 9. Kao u slučaju dodatka 15 mg mL^{-1} BSA, FTIR spektri i difraktogrami praha pokazuju da u prisutnosti albumina ne dolazi do transformacije β -TCP. Pojavljuju se vrpce karakteristične za vibracije fosfatne skupine, a difrakcijski maksimumi su velikog intenziteta karakteristični za β -TCP. Pretpostavlja se da albumin nije adsorbiran u dovoljnoj količini da bi bio vidljiv u FTIR spektrima.^[56-58]

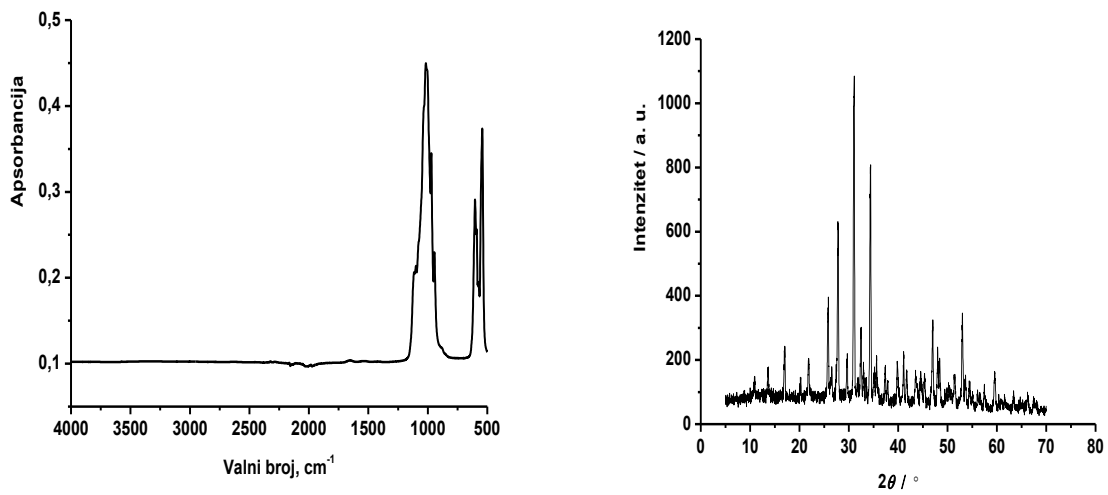


Slika 15. FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalog u kontrolnom sustavu nakon: a) 3 h i b) 24 h. Eksperimentalni uvjeti: $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $m_{\text{ads}} = 300 \text{ mg}$, $V_{\text{PBS}} = 2 \text{ mL}$.

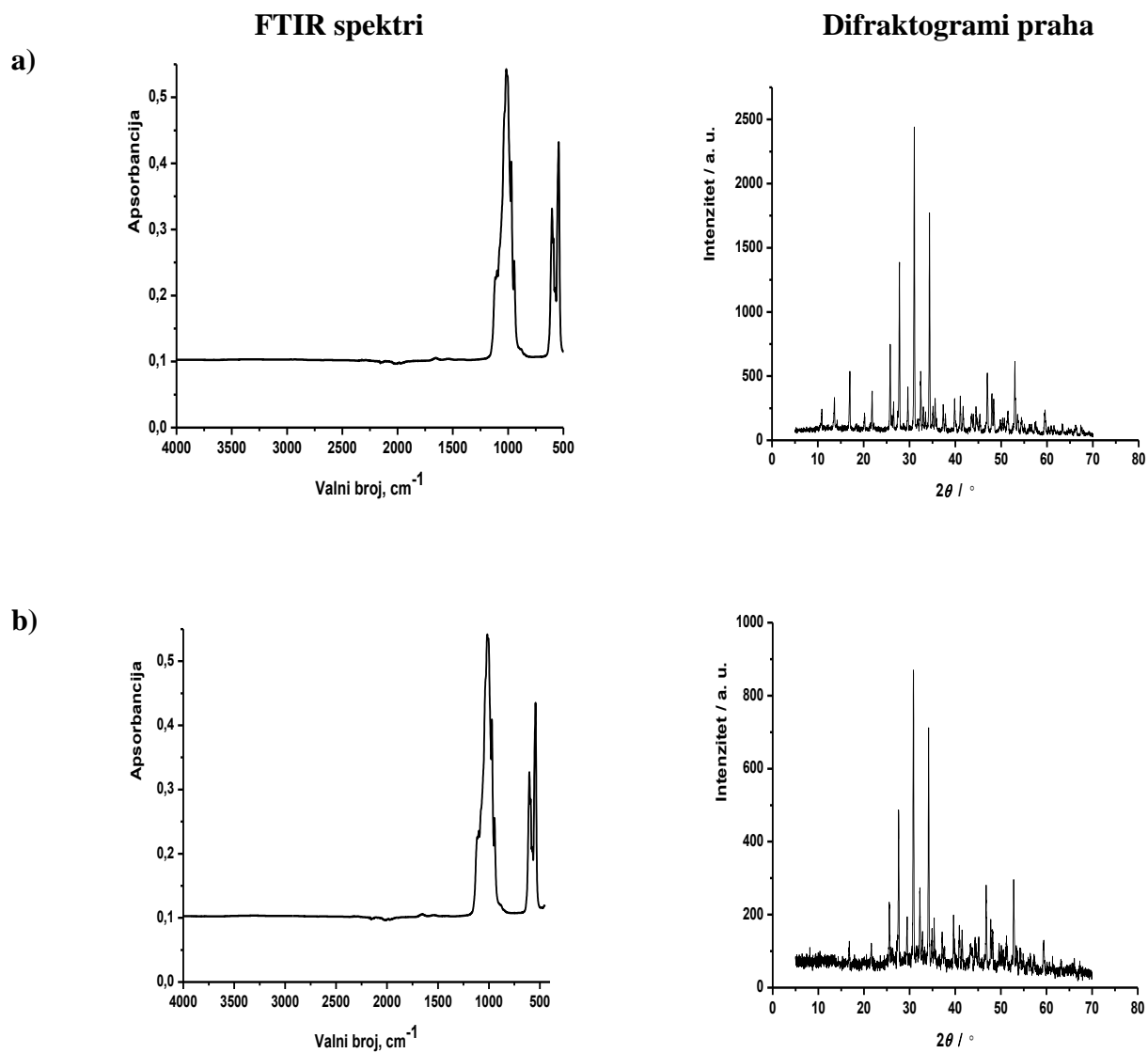
a)



b)



Slika 16. FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalog nakon: a) 3 h i b) 24 h. Eksperimentalni uvjeti: $\theta = 25^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $\gamma_0(\text{BSA}) = 15 \text{ mg mL}^{-1}$, $m_{\text{ads}} = 300 \text{ mg}$.



Slika 17. FTIR spektri i difraktogrami praha taloga nastalog nakon: a) 3 h i b) 24 h.

Eksperimentalni uvjeti: $\theta = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $\gamma_0(\text{BSA}) = 30\text{ mg mL}^{-1}$, $m_{\text{ads}} = 300\text{ mg}$.

Tablica 8. Asignacija vrpce FTIR spektara nakon 3 h i 24 h: kontrolnog sustava, taloga uz $\gamma_0(\text{BSA}) = 15 \text{ mg mL}^{-1}$ i taloga uz $\gamma_0(\text{BSA}) = 30 \text{ mg mL}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $m_{\text{ads}} = 300 \text{ mg}$.^[57,58]

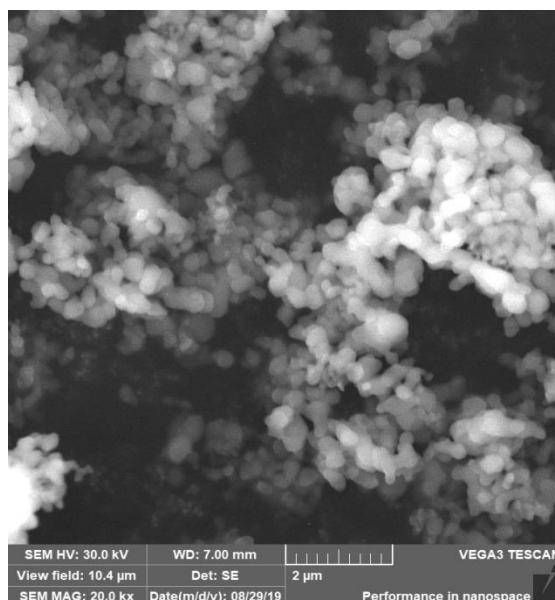
ν / cm^{-1}						Asignacija
Kontrolni sustav		$\gamma_0(\text{BSA}) = 15 \text{ mg mL}^{-1}$		$\gamma_0(\text{BSA}) = 30 \text{ mg mL}^{-1}$		
3 h	24 h	3 h	24 h	3 h	24 h	
1098	1104	1106	1108	1104	1100	ν_1 nedegenerirano simetrično istežanje P-O veze (PO_4^{3-})
1014	1008	1016	1014	1015	1012	ν_1 nedegenerirano simetrično istežanje P-O veze (PO_4^{3-})
962	969	969	970	968	971	ν_3 trostruko degenerirano asimetrično istežanje P-O veze (PO_4^{3-})
950	950	939	940	944	944	ν_3 trostruko degenerirano asimetrično istežanje P-O veze (PO_4^{3-})
604	602	599	602	604	604	ν_4 trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO_4^{3-})
540	544	544	538	543	540	ν_4 trostruko degenerirano savijanje O-P-O veze (PO_4^{3-})

Tablica 9. Asignacija difrakcijskih maksimuma difraktograma praha taloga nakon 3 h i 24 h: kontrolnog sustava, taloga uz $\gamma_0(\text{BSA}) = 15 \text{ mg mL}^{-1}$ i taloga uz $\gamma_0(\text{BSA}) = 30 \text{ mg mL}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $m_{\text{ads}} = 300 \text{ mg}$, $V_{\text{PBS}} = 2 \text{ mL}$.^[56]

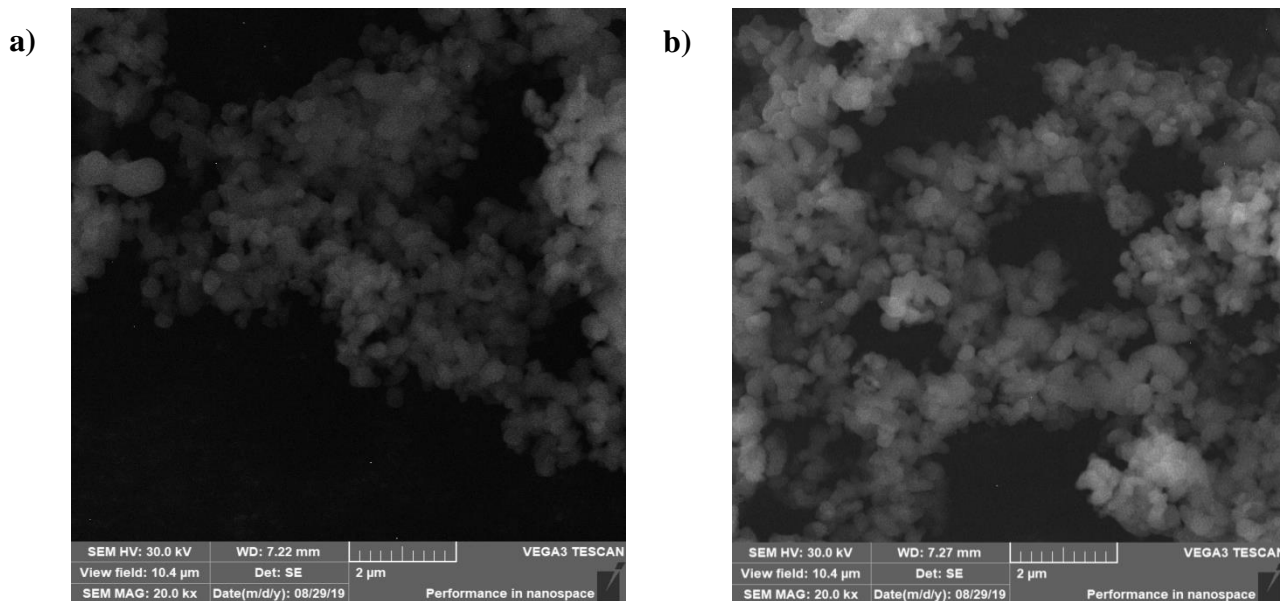
$2\theta / ^\circ$						
Kontrolni sustav		$\gamma_0(\text{BSA}) = 15 \text{ mg mL}^{-1}$		$\gamma_0(\text{BSA}) = 30 \text{ mg mL}^{-1}$		(h k l)
3 h	24 h	3 h	24 h	3 h	24 h	
13,51	13,51	13,61	13,61	13,61	-	(1 0 4)
16,82	16,81	16,82	17,05	16,97	16,97	(1 1 0)
22,04	21,80	22,04	22,04	22,11	-	(0 2 4)
25,61	25,60	25,84	26,08	25,89	25,89	(1 0 10)
27,98	27,98	27,50	27,74	27,91	27,68	(2 1 4)
29,65	29,65	29,70	29,70	29,66	29,55	(3 0 0)

31,07	30,83	31,07	30,83	31,04	31,03	(2 1 7)
32,48	32,26	32,72	32,48	32,61	32,16	(1 2 8)
34,39	34,39	34,63	34,39	34,39	34,39	(2 2 0)
46,97	46,97	46,72	46,97	47,12	46,90	(4 0 10)
52,90	53,14	53,14	52,90	52,92	52,70	(3 3 0)

Na slikama 18. – 21. prikazane su SEM mikrografije čistog β -TCP, kontrolnog sustava i sustava u koje je dodan BSA. Prah β -TCP (slika 18.) pokazuje tipičnu morfologiju, porozni aglomerati sferičnih čestica.^[61] Izlaganje PBS-u tijekom 3 i 24 h ne uzrokuje promjenu morfologije (slika 19. a i b), a do promjene ne dolazi niti u prisustvu BSA (slika 20. i 21.).

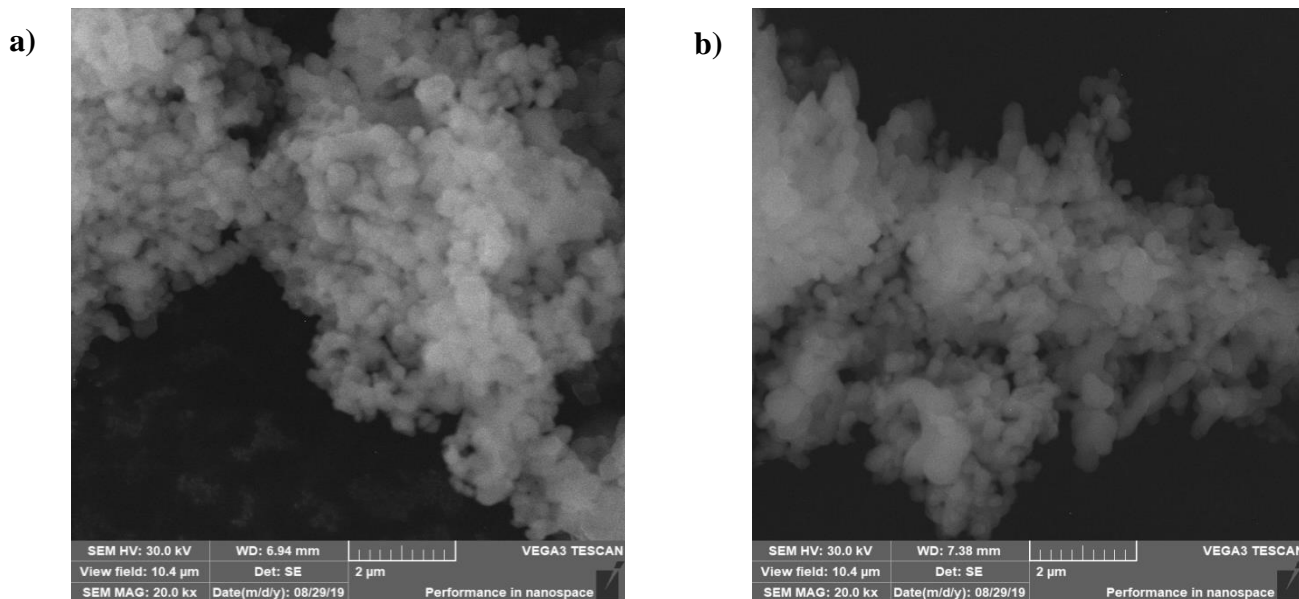


Slika 18. SEM mikrografija praha β -TCP.



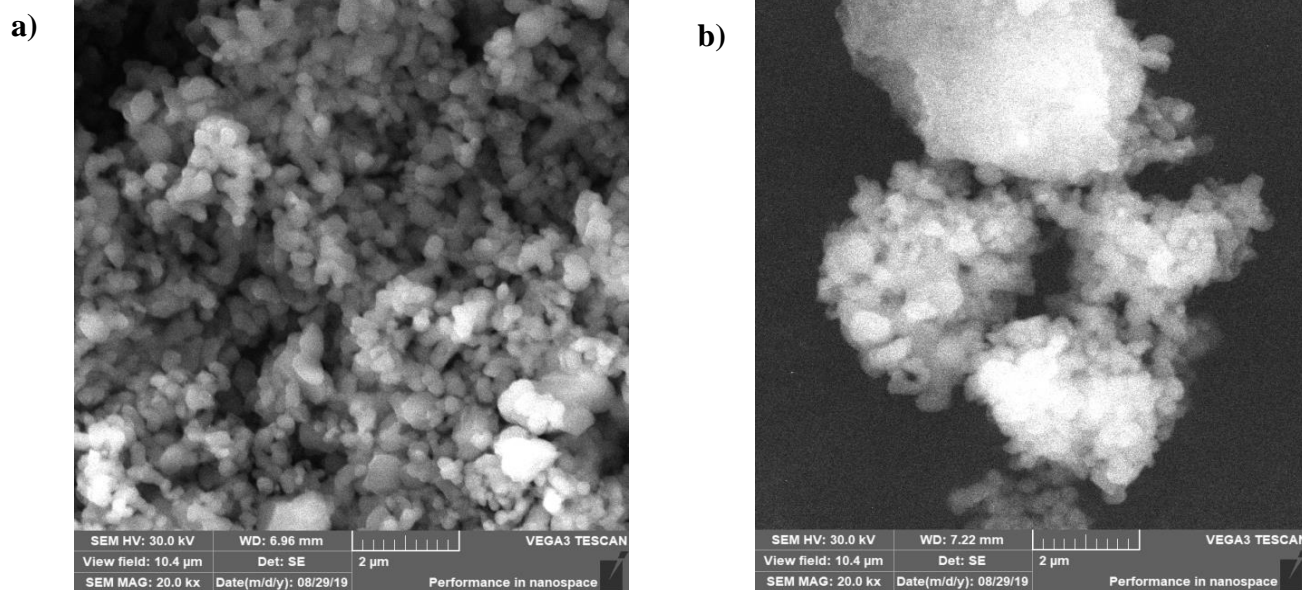
Slika 19. SEM mikrografije taloga nastalog u kontrolnom sustavu nakon:

a) 3 h i b) 24 h. Eksperimentalni uvjeti: $\theta = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $m_{\text{ads}} = 300\text{ mg}$, $V_{\text{PBS}} = 2\text{ mL}$.



Slika 20. SEM mikrografije taloga nastalog nakon: a) 3 h i b) 24 h. Eksperimentalni uvjeti:

$\theta = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $\gamma_0(\text{BSA}) = 15\text{ mg mL}^{-1}$, $m_{\text{ads}} = 300\text{ mg}$.



Slika 21. SEM mikrografije taloga nastalog nakon: a) 3 h i b) 24 h. Eksperimentalni uvjeti:

$$\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}, \text{pH} = 7,4, \gamma_0(\text{BSA}) = 30 \text{ mg mL}^{-1}, m_{\text{ads}} = 300 \text{ mg.}$$

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu istražen je proces adsorpcije govedeg serumskog albumina na β -TCP. Eksperimenti su provedeni pri različitim početnim koncentracijama albumina uz vrijeme kontakta albumin/ β -trikalcijev fosfat od 3 h. Adsorpcijsko ponašanje albumina na adsorbensu istraženo je pomoću kinetičkih modela i adsorpcijskih izoterma, a utjecaj albumina na sastav i morfologiju taloga određen je pomoću FTIR spektroskopije, difrakcije na praškastom uzorku i pretražne elektronske mikroskopije. Dobiveni rezultati pokazali su sljedeće:

- ❖ određivanjem adsorpcijskog kapaciteta adsorbiranih molekula albumina u ovisnosti o vremenu, ustanovljeno je da vrijeme potrebno za uspostavljanje adsorpcijske ravnoteže iznosi između 30 min i 1 h,
- ❖ primjenom kinetičkih modela u svrhu određivanja mehanizma adsorpcije, rezultati istraživanja su pokazali kako je adsorpcija albumina na β -trikalcijev fosfat najbolje opisana kinetičkim modelom pseudo-drugog reda,
- ❖ ispitani mehanizam procesa adsorpcije pomoću adsorpcijskih izoterma ukazuje na najbolje slaganje dobivenih rezultata s Langmuirovim modelom,
- ❖ FTIR spektroskopijom i rendgenskom difrakcijskom analizom utvrđeno je da albumin ne utječe na sastav čvrste faze,
- ❖ SEM mikrografije pokazuju da albumin ne utječe na morfologiju β -TCP.

Dobiveni rezultati mogu doprinijeti boljem razumijevanju interakcija koje se javljaju kada se implant-materijal nađe u živom tijelu.

6. POPIS SIMBOLA I KRATICA

A	Apsorbancija
B_T	Temkinova konstanta
k_1	Konstanta brzine adsorpcije pseudo-prvog reda
k_2	Konstanta brzine adsorpcije pseudo-drugog reda
K_F	Freundlichova konstanta
k_{id}	Konstanta brzine unutarčestične difuzije
K_L	Langmuirova konstanta
K_T	Temkinova konstanta ravnotežnog vezanja
n	Koeficijent povezan s intenzitetom adsorpcije
q_e	Ravnotežni adsorpcijski kapacitet
q_m	Maksimalni adsorpcijski kapacitet
q_t	Adsorpcijski kapacitet u vremenu t
R^2	Koeficijent determinacije
R_L	Ravnotežni separacijski faktor
S_m	Specifična površina
t	Vrijeme
γ_0	Početna masena koncentracija
γ_e	Ravnotežna masena koncentracija
γ_t	Masena koncentracija u vremenu t
θ	Radna temperatura
λ	Valna duljina
BCP	Bifazni kalcijevi fosfati
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BSA	Govedi serumski albumin
CaP	Kalcijevi fosfati
CHA	Karbonatni hidroksiapatit

DA	Deficijentni apatit
DCPD	Kalcijev hidrogenfosfat dihidrat
FTIR	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
HA	Hidroksiapatit
MiliQ	Ultračista voda
OCP	Oktakalcijev fosfat
PBS	Fosfatni pufer
PXRD	Rendgenska difrakcijska analiza na praškastom uzorku
SEM	Pretražna elektronska mikroskopija
UV	Ultraljubičasto zračenje
Vis	Vidljivi dio spektra elektromagnetskog zračenja
β -TCP	β -trikalcijev fosfat

7. LITERATURA

1. S. Dorozhkin, *Calcium orthophosphates, applications in nature, biology, and medicine*, Pan Stanford Publishing, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2012.
2. V. Babić-Ivančić, M. Dutour-Sikirić, *Physico-chemical properties of calcium phosphates*, *Serb. Dent. J.* (2012) **59**:7-16
3. W. Habraken, P. Habibovic, M. Epple, M. Bohner, *Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future?*, *Mater. Today* (2016) **19**:69-87
4. K. Wang, C. Zhou, Y. Hong, X. Zhang, *A review of protein adsorption on bioceramics*, *Interface Focus* (2012) **2**:259-277
5. M. Golemović, M. Škifić, B. Golubić Čepulić, *Mezenhimske matične stanice: imunomodulatorne značajke i klinička primjena*, *Liječ. Vjesn.* (2012) **134**:42-49
6. T. W. Evans, *Review article: albumin as a drug--biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure*, *Aliment. Pharm. and Ther.* (2002) **16**:6-11
7. Y. Yang, N. Zhang, Y. Sun, J. Li, R. Zhao, Z. Zheng, Y. Ding, X. Zhang, D. Geng, Y. Sun, *Multispectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of bile acids with bovine serum albumin (BSA)*, *J. Mol. Struct.* (2019) **1180**:89-99
8. W. Norde, C. E. Giacomelli, *BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states*, *J. Biotechnol.* (2000) **79**:259-268
9. W. Norde, *Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface*, *Adv. Colloid Interface Sci.* (1986) **25**:267-340
10. D. T. Hughes Wassell, R. C. Hall, G. Embery, *Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite*, *Biomaterials* (1995) **16**:697-702
11. O. Suzuki, H. Yagishita, M. Yamazaki, T. Aoba, *Adsorption of bovine serum albumin onto octacalcium phosphate and its hydrolyzates*, *Cells and Materials* (1995) **5**:45-54
12. J. Xie, C. Riley, K. Chittur, *Effect of albumin on brushite transformation to hydroxyapatite*, *J. Biomed. Mater. Res* (2001) **57**:357-365
13. H. Modarress, M. Mohsen-Nia, L. Allafkari, *Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxylapatite: theoretical modeling and measurements*, *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* (2010) **29**:125-133
14. H. Rao, Z. Lu, W. Liu, Y. Wang, H. Ge, P. Zou, H. He, *The adsorption of bone-related proteins on calcium phosphate ceramic particles with different phase composition and its adsorption kinetics*, *Surf. Interface Anal.* (2016) **48**:1048-1055

15. V. Ozhukil Kollath, B. G. De Geest, S. Mullens, S. De Koker, J. Luyten, R. Persoons, K. Traina, J. P. Remon, R. Cloots, *Systematic processing of β -tricalcium phosphate for efficient protein loading and in vitro analysis of Antigen uptake*, Adv. Eng. Mater. (2013) 15:295-301
16. Ž. Krstanac, K. Horvatin, *Kemijska osnova živoga svijeta*, Školska knjiga, Zagreb, 2018.
17. <https://www.krenizdravo.rtl.hr/prehrana/dodaci-prehrani/aminokiseline-sto-su-i-zasto-ih-trebamo> (Pristup: 24.03.2019.)
18. A. Böker, P. van Rijn, *Bio-synthetic hybrid materials and bionanoparticles: A biological chemical approach towards material science*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2015.
19. M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces*, Adv. Colloid Interface Sci. (2011) 162:87–106
20. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Triptofan> (Pristup: 18.08.2019.)
21. K. M. Naik, D. B. Kolli, S. T. Nandibewoor, *Elucidation of binding mechanism of hydroxyurea on serum albumins by different spectroscopic studies*, SpringerPlus (2014) 3:360
22. S. Liu, *Cooperative adsorption on solid surfaces*, J. Colloid Interface Sci. (2015) 450:224-238
23. K. Košutić, *Nastavni tekstovi iz kolegija Fizikalna kemija II*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2016.
24. W. F. Bleam, *Soil and environmental chemistry*, Second Edition, Academic Press, Cambridge, 2016.
25. M. Mandić, *Granulovani aktivni ugalj i chitosan obloženi Fe-Mn binarnim oksidom kao sorbenti nove generacije za uklanjanje As(V) iz vode*, Magisterij, Sveučilište u Novom Sadu, 2015.
26. A. Kezerle, N. Velić, D. Hasenay, D. Kovačević, *Lignocellulosic materials as dye adsorbents: Adsorption of methylene blue and congo red on brewers' spent grain*, Croat. Chem. Acta (2018) 91:53-64
27. Y. S. Ho, G. McKay, *Sorption of dye from aqueous solution by peat*, Chem. Eng. J. (1998) 70:115-124
28. A. A. Ahmad, B. H. Hameed, N. Aziz, *Adsorption of direct dye on palm ash: Kinetic and equilibrium modeling*, J. Hazard. Mater. (2007) 141:70-76

29. V. Sivasankar, T. Ramachandramoorthy, A. Chandramohan, *Fluoride removal from water using activated and MnO₂-coated Tamarind Fruit (Tamarindus indica) shell: Batch and column studies*, J. Hazard. Mater. (2010) 177:719-729
30. N. F. Campos, C. Barbosa, J. Rodríguez-Díaz, M. Duarte, *Removal of naphthenic acids using activated charcoal: Kinetic and equilibrium studies*, Adsorpt. Sci. Technol. (2018) 36:1-17
31. M. Abbas, Z. Harrache, M. Trari, *Removal of gentian violet in aqueous solution by activated carbon equilibrium, kinetics, and thermodynamic study*, Adsorpt. Sci. Technol., in press, doi: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0263617419864504>
32. <http://www.ptfos.unios.hr/bio-polifenol/wp-content/uploads/2018/02/adsorpcija-memento3-1.pdf> (Pristup: 23.07.2019.)
33. M. Muttakin, S. Mitra, K. Thu, K. Ito, B. B. Saha, *Theoretical framework to evaluate minimum desorption temperature for IUPAC classified adsorption isotherms*, Int. J. Heat Mass Tran. (2018) 122:795-805
34. K. Y. Foo, B. H. Hameed, *Insights into the modeling of adsorption isotherm systems*, Chem. Eng. J. (2010) 156:2-10
35. N. Ayawei, A. Newton Ebelegi, D. Wankasi, *Modelling and interpretation of adsorption isotherms*, J. Chem. (2017):3039817 (11 str.)
36. P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry*, W. H. Freeman and Company, Oxford New York, 2010.
37. H.-K. Chung, W.-H. Kim, J. Park, J. Cho, T.-Y. Jeong, P.-K. Park, *Application of Langmuir and Freundlich isotherms to predict adsorbate removal efficiency or required amount of adsorbent*, J. Ind. Eng. Chem. (2015) 28:241-246
38. A. O. Dada, A. P. Olalekan, A. M. Olatunya, O. Dada, *Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of Zn²⁺ unto phosphoric acid modified Rice Husk*, J. Appl. Chem. (2012) 3:38-45
39. J. D. Andrade, V. Hlady, A. P. Wei, *Adsorption of complex proteins at interfaces*, Pure Appl. Chem. (1992) 64:1777-1781
40. E. A. Vogler, *Protein adsorption in three dimensions*, Biomaterials (2012) 33:1201–1237
41. E. Dos Santos, M. Farina, G. Soares, K. Anselme, *Surface energy of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion*, J. Mater. Sci.: Mater. Med. (2008) 19:2307-2316

42. X. D. Zhu, H. S. Fan, C. Y. Zhao, J. Lu, T. Ikoma, J. Tanaka, X. D. Zhang, *Competitive adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on characterized calcium phosphates by polyacrylamide gel electrophoresis method*, J. Mater. Sci.: Mater. Med. (2007) 18:2243-2249
43. B. Feng, J. Chen, X. Zhang, *Interaction of calcium and phosphate in apatite coating on titanium with serum albumin*, Biomaterials (2002) 23:2499-2507
44. R. M. Donlan, *Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process*, Clin. Infect. Dis. (2001) 33:1387–1392
45. L. Treccani, T. Y. Klein, F. Meder, K. Pardun, K. Rezwani, *Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications*, Acta Biomater. (2013) 9:7115–7150
46. Y. F. Yano, *Kinetics of protein unfolding at interfaces*, J. Phys. Condens. Matter (2012) 24:503101
47. S. L. Hirsh, D. R. McKenzie, N. J. Nosworthy, J. A. Denman, O. U. Sezerman, M. M. Bilek, *The Vroman Effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates*, Colloids Surf. B. (2013) 103: 395-404
48. J. R. Lu, T. J. Su, R. K. Thomas, *Structural conformation of bovine serum albumin layers at the air–water interface studied by neutron reflection*, J. Colloid Interface Sci. (1999) 213:426-437
49. C. F. Wertz, M. M. Santore, *Adsorption and reorientation kinetics of Lysozyme on hydrophobic surfaces*, Langmuir (2002) 18:1190-1199
50. https://en.wikipedia.org/wiki/Isoelectric_point (Pristup: 25.03.2019.)
51. S. Moelbert, B. Normand, P. De Los Rios, *Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability*, Biophys. Chem. (2004) 112:45-57
52. <https://www.ika.com/en/Products-Lab-Eq/Shakers-Vortex-mixer,-Lab-shakers-csp-179/Loopster-digital-cpdt-4016000/> (Pristup: 25.08.2019.)
53. X. Zhu, H. Fan, D. Li, Y. Xiao, X. Zhang, *Protein adsorption and Zeta potentials of a biphasic calcium phosphate ceramic under various conditions*, J. Biomed. Mater. Res. B (2006) 82B: 65-73
54. X. Zhang, H. Yuan, K. De Groot, *Calcium phosphate biomaterials with intrinsic osteoinductivity*, The 6th World Biomaterials Congress, Hawaii, USA, May 15–20, 2000.

-
55. M. Iafisco, P. Sabatino, I. G. Lesci, M. Prat, L. Rimondini, N. Roveri, *Conformational modifications of serum albumins adsorbed on different kinds of biomimetic hydroxyapatite nanocrystals*, *Colloids Surf. B.* (2010) 81:274-284
56. B. Dickens, L. W. Schroeder, W. E. Brown, *Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The crystal structure of pure β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$* , *J. Solid State Chem.* (1974) 10:232-248
57. L. Berzina-Cimdina, N. Borodajenko, *Research of calcium phosphates using Fourier transform infrared spectroscopy*, *Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology, InTech*, 2012., str. 126. – 145.
58. M. Boix, S. Eslava, G. C. Machado, E. Gosselin, N. Ni, E. Saiz, J. De Coninck, *ATR-FTIR measurements of albumin and fibrinogen adsorption: Inert versus calcium phosphate ceramics*, *J. Biomed. Mater. Res. A* (2015) 103A:3493-3502
59. X. Yu, H. Qu, D. A. Knecht, M. Wei, *Incorporation of bovine serum albumin into biomimetic coatings on titanium with high loading efficacy and its release behavior*, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* (2009) 20:287-294
60. I.-M. Tang, N. Krishnamra, N. Charoenphandhu, R. Hoonsawat, W. Pon-On, *Biomagnetic of Apatite-Coated Cobalt Ferrite: A Core-Shell Particle for Protein Adsorption and pH-Controlled Release*, *Nanoscale Res Lett.* (2011) 6:1-10
61. C. Ruiz-Aguilar, U. Olivares-Pinto, E. Aguilar-Reyes, R. López-Juárez, I. Alfonso-Lopez, *Characterization of β -tricalcium phosphate powders synthesized by sol-gel and mechanosynthesis*, *Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidr.* (2018) 57:213-220

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Monika Kovačević

████████████████████

████████████████████

Obrazovanje

2002. – 2010. Osnovna škola „August Šenoa“, Gundinci

2010. – 2014. Gimnazija „Matija Mesić“, Slavonski Brod

2014. – 2017. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija i inženjerstvo materijala, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

2017. – 2019. Diplomski sveučilišni studij Kemija i inženjerstvo materijala, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2019. Dekanova nagrada za istaknuti studentski znanstveni rad