

# Eksperimentalne tehnike u istraživanju biomineralizacije

---

**Sabolić, Nikola**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:637404>

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

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

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Nikola Sabolić

**EKSPERIMENTALNE TEHNIKE U ISTRAŽIVANJU  
BIOMINERALIZACIJE**

(Experimental techniques in biomineralization research)

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Đerđ

Neposredni voditelj: Anamarija Stanković, asistent

Osijek, 2018.

## Sadržaj

|                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>                                                                                                        | <b>5</b>  |
| <b>1.1. Biomineralizacija .....</b>                                                                                         | <b>6</b>  |
| <b>1.2. Biominerali .....</b>                                                                                               | <b>7</b>  |
| 1.2.1. Kalcijevi oksalati .....                                                                                             | 8         |
| 1.2.2. Kalcijevi karbonati .....                                                                                            | 9         |
| 1.2.3. Kalcijevi fosfati .....                                                                                              | 10        |
| <b>2. EKSPERIMENTALNE METODE .....</b>                                                                                      | <b>11</b> |
| <b>2.1. Mikroskopija .....</b>                                                                                              | <b>12</b> |
| 2.1.1. Svjetlosna mikroskopija (OM) .....                                                                                   | 12        |
| 2.1.1.1. Primjena svjetlosne mikroskopije (OM) u biomineralizaciji .....                                                    | 13        |
| 2.1.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) .....                                                                       | 15        |
| 2.1.2.1. Primjena pretražne elektronske mikroskopije (SEM) u biomineralizaciji .....                                        | 16        |
| 2.1.3. Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) .....                                                                   | 18        |
| 2.1.3.1. Primjena transmisijske elektronske mikroskopije (TEM) u biomineralizaciji .....                                    | 20        |
| 2.1.4. Mikroskopija atomskih sila (AFM) .....                                                                               | 21        |
| 2.1.4.1. Primjena mikroskopije atomskih sila (AFM) u biomineralizaciji .....                                                | 22        |
| <b>2.2. Molekulska spektroskopija .....</b>                                                                                 | <b>23</b> |
| 2.2.1. Ramanska spektroskopija .....                                                                                        | 24        |
| 2.2.1.1. Primjena Ramanove spektroskopije u biomineralizaciji .....                                                         | 24        |
| 2.2.2. Infracrvena spektroskopija (IR) .....                                                                                | 26        |
| 2.2.2.1. Primjena infracrvene spektroskopije (IR) u biomineralizaciji .....                                                 | 27        |
| 2.2.3. Difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (PXRD) .....                                                   | 29        |
| 2.2.3.1. Primjena difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (PXRD) u svrhu istraživanja biomineralizacije ..... | 30        |
| <b>2.3. Termičke analize .....</b>                                                                                          | <b>31</b> |
| 2.3.1. Termogravimetrijska analiza (TGA) .....                                                                              | 32        |
| 2.3.1.1. Primjena termogravimetrijske analize (TGA) u biomineralizaciji .....                                               | 32        |
| <b>3. ZAKLJUČAK .....</b>                                                                                                   | <b>35</b> |
| <b>4. POPIS LITERATURE .....</b>                                                                                            | <b>36</b> |

## SAŽETAK

Biom mineralizacija je interdisciplinarna znanstvena grana, na granici kemije, biologije i znanosti o materijalima. To je proces koji se zbiva u živim organizmima u svrhu nastajanja biom minerala. Prisutnost biom minerala je raznolika pri čemu oni imaju brojne biološke funkcije poput zaštite, magnetske orijentacije, mehaničke snage, skladištenja iona i drugo. Od 60 trenutno poznatih biom minerala, otprilike 20 % su amorfn i, a 80 % kristalinični minerali. Osim biom minerala procesom patološke biom mineralizacije mogu nastati i biom minerali koji nisu korisni za organizam u kojem nastaju. U svrhu njihova istraživanja koriste se brojne eksperimentalne metode analize taloga poput termogravimetrijske analize (TGA), skenirajuće (SEM) i transmisijske elektronske (TEM) mikroskopije, mikroskopije atomskih sila (AFM), svjetlosne mikroskopije (OM), metoda molekulske spektroskopije Ramanska i infracrvena spektroskopija (IR), metode dinamičkog raspršenja svjetlosti. Uz metode analize taloga postoje i metode analize tekuće faze poput potencijometrije, ionske kromatografije i Uv-Vis spektroskopije.

U ovom završnom radu opisane su eksperimentalne metode i tehnike analize krutih uzoraka te je objašnjen princip djelovanja i njihova primjena u svrhu istraživanja biom mineralizacije. Svaka metoda potkrepljena je primjerom.

**Ključne riječi:** biom mineralizacija, biom minerali, eksperimentalne metode

## **Abstract**

Biom mineralization is an interdisciplinary scientific branch, on the border of chemistry, biology and materials science. This is a process that takes place in living organisms for the purpose of formation of biominerals. The presence of biominerals is diverse, and they have numerous biological functions such as protection, magnetic orientation, mechanical strength, ion storage and the like. Of the 60 currently known biominerals, approximately 20 % are amorphous and 80 % crystalline minerals. The pathological biomineralization process may also produce minerals that are not useful for the organism in which they are formed. For the scientific research of biominerals many experimental methods are used. For example for the precipitate analysis thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM), molecular Raman spectroscopy, infrared spectroscopy (IR) and dynamic light scattering (DLS) are one of the used methods. Except from the methods for the precipitate analysis there are also variety of the methods used for the analysis of the liquid phase and some of them are potentiometry, ionic chromatography and UV-VIS spectroscopy.

In this bachelor thesis experimental methods and techniques of analysis of the precipitate are described and application of each method in biomineralization research is explained. For each described method an example in biomineralization research is given.

**Keywords:** biomineralization, biominerals, experimental methods

## 1. UVOD

Biomineralizacija je proces nastajanja funkcionalnih anorgansko - organskih materijal, tzv. biominerala, koji se zbiva u živim organizmima. Riječ je o izuzetno složenom procesu koji uključuje selektivno izdvajanje anorganskih i organskih konstitucijskih jedinica (iona, molekula) iz organizma te njihovu ugradnju u funkcionalne nadstrukture, pri čemu su svi ti procesi pod striktnom biološkom kontrolom.

Biominerali nastaju kao rezultat procesa koji se događa u živim organizmima. Njihov sastav, baš kao i sama funkcija jest raznolik. Funkcija biominerala može biti: mehanička potpora (endoskelet, egzoskelet), zaštita (oklopi), za mrvljenje hrane (zubi), ali postoje i druge važne funkcije, poput orijentacije u prostoru, skladištenja iona, a mogu omogućavati i plovnost ili pokretanje organizama. Osim navedenih funkcija biominerali posjeduju i negativne funkcije. Stoga je potrebno pobliže istražiti mehanizme i uvjete njihova postanka kako bi se uvidjele negativne strane , ali i one pozitivne koje biomineral posjeduje. Pri istraživanju biominerala koriste se brojne eksperimentalne metode pri čemu se mogu analizirati tekuća faza odnosno matičnica i kruta faza odnosno talog. Eksperimentalne metode koje se najčešće koriste za analizu tekuće faze su UV-Vis spektroskopija, potencijometrija i ionska kromatografija, dok se za analizu taloga na primjer koriste tehnike koje se temelje na određivanju veličine čestica (električno brojilo čestica (Coulter counter,CC) i dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)), tehnike molekulske spektroskopije (FT-IR i Ramanska), termogravimetrija (TGA, DTA), mikroskopija (pretražna elektronska mikroskopija (SEM), transmisijaska elektronska mikroskopija (TEM), optička (OM) i mikroskopija atomskih sila (AFM)) te praškasta difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (PXRD) i elektronska paramagnetska rezonancija (EPR).

Ovaj završni rad temeljit će se na metodama analize taloga biominerala (kalcijeva oksalata, kalcijeva karbonata i kalcijeva fosfata). Detaljno će biti opisane mikroskopske metode (pretražna elektronska mikroskopija, transmisijaska elektronska mikroskopija, svjetlosna mikroskopija i mikroskopija atomskih sila), metode molekulske spektroskopije (Ramanska i FT-IR), metoda difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (PXRD) i termogravimetrijska analiza (TGA).

## 1.1. Biomineralizacija

Biomineralizacija<sup>[1]</sup> je veoma širok pojam, prvi puta spomenut 1924. godine u djelu W. J. Schmidta. To je interdisciplinarno područje znanosti koje se bavi proučavanjem procesa nastajanja funkcionalnih anorgansko - organskih materijal, odnosno istraživanjem interakcija anorganskih tvari i organske komponente (matrice)<sup>[2]</sup>. Biomineralizacija se dijeli na dva osnovna načina: biološki inducirana mineralizacija i biomineralizacija na granici<sup>[3]</sup>. U prvoj navedenoj organizam svojevolumno modificira mikrookolinu oko sebe te na taj način nastaju uvjeti pogodni za kemijsko taloženje izvanstaničnih mineralnih faza. Ovaj proces biomineralizacije prevladava u bakterijama i gljivicama, a često je prisutan i u lišajevima. Dok u slučaju biomineralizacije na granici čestice nastaju u unutrašnjosti ili na kojekakvoj organskoj matrici koju je proizveo organizam. Sam proces biomineralizacije kontroliran je vanjskim čimbenicima o čijim se načinima djelovanja jako malo zna, ali i fizikalno-kemijskim čimbenicima podijeljenih u pet kontrolnih mehanizama: konstitucijski, strukturni, prostorni, kemijski i morfološki.

Iako istraživanje biomineralizacije u zadnjih 20-ak godina rapidno raste poznato je preko 80 biominerala različitog sastava, najčešće prisutnih u obliku soli. Istraživanje biomineralizacije izuzetno je zahtjevno jer zahtijeva znanja iz ostalih područja znanosti poput kemije, geologije, biologije i znanosti o materijalima<sup>[2]</sup>, a rezultati istraživanja imaju veliki utjecaj na medicinu, paleontologiju, oceanologiju, stomatologiju i biomedicinu. Važnost istraživanja biomineralizacije jest u rješavanje medicinskih problema kao što je u današnje vrijeme podosta zastupljen problem patološke biomineralizacije to jest problem nastanka žučnog kamenca, kamenca urinarnog trakta i ovapnjenja žila u čovjeka<sup>[4]</sup>. Navedeni problemi uvelike mogu nanijeti štetu čovjeku, te na posljetku mogu uzrokovati i smrt. Samim time valjalo bi što bolje koristeći se određenim eksperimentalnim tehnikama istraživanja biomineralizacije proučiti mehanizam nastajanja biominerala kako do tih medicinskih problema ne bi dolazilo.

## 1.2. Biominerali

Kao što je već u samom uvodu rečeno biominerali nastaju procesom biomineralizacije. Smatra se da su prije 3500 milijardi godina prvi prokarioti, a zatim i eukarioti posjedovali sposobnost stvaranja minerala tj. biominerala. Sama priroda sposobna je kontrolirati biomineralizacijske procese kako bi stvorila kristalne, polikristalne i amorfne strukture s osobitim morfološkim i mehaničkim svojstvima<sup>[5]</sup>. Biominerali su čvrste strukture nekog organizma koji služe kao osnova i potpora mekom tkivu (npr. kosti riba, ptica i sisavaca) te im služe kao zaštita (npr. ljuštura školjke). Također biominerali su sastavni dio zuba i kostiju čovjeka. U čovjeka može doći i do nastanka patoloških biominerala procesom mineralizacije poput arteroskleroze, bubrežnog te mokraćnog kamenca. Samo nastajanje kristala u patološkim biomineralizacijama u čovjeka slijedi potpuno iste principe kao i normalna kalcifikacija<sup>[6]</sup>. Po svom sastavu biominerali su anorganske soli koje reguliraju kiselo-baznu ravnotežu tijela, vežu toksične tvari te ih fizički izbacuju iz tijela. Do sada je poznato više od 80 minerala, a samo je njih 22 važnih za život. Prema svom sastavu to su kalcijevi oksalati, kalcijevi fosfati, kalcijevi karbonati i drugi. S obzirom na svoju veliku raznolikost, različiti se biominerali nalaze u različitim organizmima te s obzirom na smještaj u organizmu djeluju na različite načine. Veliku važnost u mnogim morskim organizmima, sisavcima i biljkama imaju kalcijevi karbonati koji navedenim organizmima pružaju mehaničku snagu, skladište kalcij te djeluju kao receptor za gravitaciju. Kalcijevi fosfati poput hidroksiapatita i oktakalcijeva fosfata služe za skladištenje iona, pružaju zaštitu te djeluju kao endoskelet kod sisavaca, riba, školjakaša i kralježnjaka. Vevelit i vedelit odnosno jednom riječju kalcijevi oksalati djeluju u biljkama, sisavcima i gljivama. U glavi, zubima i proteinu feritinu nalaze se željezovi oksidi koji su važno spremište željeza, te važan kotačić u mehaničkoj snazi i magnetskoj gravitaciji većine bakterija, tuna, lososa ali i sisavaca. Sulfati djeluju kao receptori gravitacije i služe za gravitaciju tijela dok sulfidi (pirit, sfalerit, galenit, greigit) reduciraju sulfate i uklanjaju ione. Raznolikost biominerala te njihova kemijska formula, njihov položaj u određenom organizmu i njihova biološka funkcija dane su tabličnim prikazom ( Tablica 1.).



Tablica 1. Raznolikost biominerala.<sup>[7]</sup>

| BIOMINERALI                                                   | KEMIJSKA FORMULA                                                                                                                   | ORGANIZAM                               | MJESTO NALAŽENJA                                        | BIOLOŠKA FUNKCIJA                                                        |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Kalcijevi karbonati<br>(kalcit, vaterit, aragonit, Mg-kalcit) | $\text{CaCO}_3$ ,<br>$(\text{Mg}, \text{Ca})\text{CO}_3$<br>$\text{CaCO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$                              | mnogi morski organizmi, sisavci, biljke | ljuska, leća oka, jaja, ljuštura raka                   | egzoskelet, mehanička snaga, zaštita, receptor gravitacije, skladište Ca |
| Kalcijevi fosfati<br>(hidroskiapatit, oktakalcijev fosfat)    | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ,<br>$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$                 | kralježnjaci, sisavci, ribe, školjkaši  | zubi, kosti, škrge, mitohondrij                         | endoskelet, skladište iona, rezanje/mljevenje, zaštita                   |
| Kalcijevi oksalati (vevelit, vedelit)                         | $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,<br>$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                          | biljke, gljive, sisavci                 | bubrežni kamenci, hife gljiva                           | zaštita, spremište/otpuštanje Ca, patološka                              |
| Željezovi oksidi (magnetit, getit, lepidokrokot, ferihidrit)  | $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\alpha\text{-FeOOH}$ ,<br>$\gamma\text{-FeOOH}$ ,<br>$\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | bakterije, tuna/losos, sisavci          | unutar stanica, zubi, glava, niti, protein feritin      | spremište željeza, magnetska orijentacija, mehanička snaga               |
| Sulfati (gips, celestit, barit)                               | $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,<br>$\text{SrSO}_4$ , $\text{BaSO}_4$                                                   | meduze, acantharia, mekušci,            | statoconia, stanični, unutarstanični organ za ravnotežu | receptor gravitacije, gravitacija tijela                                 |
| Sulfidi (pirit, sfalerit, galenit, greigit)                   | $\text{FeS}_2$ , $\text{ZnS}$ , $\text{PbS}$ ,<br>$\text{Fe}_3\text{S}_4$                                                          | neke vrste bakterija                    | stanični zid                                            | redukcija sulfata/ uklanjanje iona                                       |
| Silicijevi oksidi (silika)                                    | $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$                                                                                           | biljke, zraakaši, alge                  | stanični zid, stanične puči                             | egzoskeletna zaštita                                                     |
| Halidi (fluoridi)                                             | $\text{CaF}_2$                                                                                                                     | mekušci, klještari                      | statocist, dio želuca                                   | velika gravitacijska percepcija                                          |

### 1.2.1. Kalcijevi oksalati

Kalcijevi oksalati su kalcijeve soli oksalne kiseline. Većinom su prisutni u orašastim plodovima i listovima biljaka (špinata, blitve, peršina,...) pri čemu biljkama pružaju zaštitu od raznoraznih insekata te održavaju homeostazu kalcija. Kod čovjeka nastaju skupljajući se (ako su prisutni u velikoj razini) u kristale u bubrezima ili urinarnom traktu čineći jedan od glavnih sastojaka kamenca <sup>[8]</sup> te su zbog toga primjer patološke

biomineralizacije. Oko 70% bubrežnih kamenaca sadrži kalcijeve oksalate<sup>[9]</sup>. Sami kalcijevi oksalati pojavljuju se u 3 hidratna oblika: kalcijev oksalat monohidrat (vevelit, COM), kalcijev oksalat dihidrat (vedelit, COM) te trihidrat (kaoksit, COT) koji je najmanje zastupljen.

COM, vevelit ili kalcijev oksalat monohidrat, molekulske formule  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  stabilni je termodinamički spoj koji kristalizira u dvije monoklinske strukture<sup>[2]</sup>. Osnovna struktura sastoji se od planarnih slojeva oksalata i iona kalcija u omjeru 1:2 a stabilnost pokazuje iznad 45 °C . Druga monoklinska stuktura pokazuje stabilnost na temperaturi manjoj od 45 °C. Kalcijev oksalat monohidrat također ulazi u sastav kristala bubrežnih kamenaca.

COD, vedelit ili kalcijev oksalat dihidrat, kemijske formule  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  metastabilni je dihidrat te za razliku od vevelita, kristalizira u tetragonskom sustavu pri čemu je 8 molekula vode koordinirano sa četiri atoma kalcija dihidratnog oblika. Kalcijev oksalat dihidrat najčešća je komponenta bubrežnih kamenaca, sve češće bolesti čovjeka u novije doba.

Kalcijev oksalat trihidrat ili COT kristalizira u triklinskom sustavu. Kalcijev oksalat trihidrat se može pronaći u sastavu urina, ali njegovo postojanje nije pronađeno u sastavu bubrežnih kamenaca za razliku od prethodna dva oblika kalcijeva oksalata. Sam trihidrat može direktno proći u monohidrat izostavivši dihidrat kao međuprodukt.

### **1.2.2. Kalcijevi karbonati**

Kalcijevi karbonati jedni su zasigurno od najzastupljenijih biogenih minerala, i po količini i po rasprostranjenosti, ujedno su i najpoznatijih minerali karbonata zemnoalkalijskih metala. Sastavni su dio Zemljine kore, upotrebljavaju se kao punila, koriste se u izradi pločica, ali i u hrani (prevencija osteoporoze) te kozmetici<sup>[10]</sup>. Kod morskih životinja poput školjkaša i ježinaca kalcijevi karbonati nastaju procesom biomineralizacije. Sami kalcijevi karbonati su soli teško topljive ugljične kiseline i zbog toga mogu taložiti u obliku hidratiziranih soli te u obliku polimorfa. Najstabilnija modifikacija svakako je kalcit u čiji se sastav lako mogu ugraditi i drugi kationi na mjestu kalcija kao što su ioni magnezija i ioni željeza. Aragonit i vaterit dvije su modifikacije podložne promjenama. Sama zastupljenost aragonita u prirodi u odnosu na kalcit je mala. Zbog svoje nestabilnosti aragonit prekrystalizira u kalcit pri čemu je za to potreban veliki

vremenski period. Vaterit je rijedak u prirodi zbog svoje brze prekrystalizacije u kalcit, ali i u aragonit.

### 1.2.3. Kalcijevi fosfati

Kalcijevi fosfati teško su topljive soli fosforne kiseline, također to je skupina materijala i minerala koji sadrže kalcijeve ione zajedno sa fosfatnim anionima. Kao biominerali mogu se pronaći u mnogim živim organizmima, kalcijevi fosfati sastavni su dio zubiju i kostiju svih kralježnjaka, nalaze se u vezivnom tkivu te krvi i limfi. U sjemenu muškarca postotak kalcijevog fosfata u anorganskim solima je čak 67 %. Osim svoje biominerološke uloge, kalcijevi fosfati su prisutni u umjetnim gnojivima, sudjeluju kao sredstvo za podizanje tijesta, nastaju procesima taloženja u prirodnim vodama. Njihova prisutnost očituje se i u mlijeku gdje postoje u koloidnom obliku.

Kalcijevi fosfati kristaliziraju u više čvrstih faza. Najzastupljenije faze su hidroksiapatit (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), zatim kalcijev hidrogenfosfat dihidrat (DCPD,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); oktakalcijev fosfat (OCP,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) kao alternativa hidroksiapatita nastala pri određenim reakcijskim uvjetima i kalcijev fosfat (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) prisutan u dvije modifikacije:  $\alpha$ -TCP (monoklinski) i  $\beta$ -TCP (romboedarski) prisutan u proizvodnji bioimplantanata. Hidroksiapatit ili HA, biomineral heksagonske strukture<sup>[11]</sup>, najstabilnija je termodinamička faza kalcijevih fosfata pri fiziološkim uvjetima kao što su temperatura, pH i sastav tjelesnih tekućina, glavni je mineral zubne cakline i dentina. Razvojem nanotehnologije, nano-hidroksiapatit se sve više koristi kao biomaterijal zbog svoje sličnosti u veličini i kemijskom sastavu s ljudskim tvrdim tkivom. Kalcijev hidrogenfosfat dihidrat važan perkusor u nastanku kamenca, također se koristi u medicini za imobilizaciju lomova, te u arhitekturi i kiparstvu.

## 2. EKSPERIMENTALNE METODE

Za dodatno razumijevanje biomineralizacije, u svrhu određivanja mehanizma nastajanja, kristalnog rasta i transformacije, koriste se brojne eksperimentalne tehnike tj. metode. Eksperimentalne metode koje se koriste poradi istraživanja biomineralizacije temelje se na istraživanju tekuće i krute faze pri čemu se dobiva bolji uvid u veličinu, oblik, način djelovanja i kemijski sastav pojedinog biominerala.

Kao što je već spomenuto u samom uvodu, kada se govori o analizi taloga u većini slučajeva koriste se metode raspodjele čestica u suspenziji, metode termičke analize, molekulska spektroskopija, elektronska paramagnetska rezonancija, mikroskopija i difrakcija rentgenskih zraka na prahu. Velik broj uobičajenih i modernih eksperimentalnih metoda pružit će nam jasniju sliku o biomineralima, ali i o samoj biomineralizaciji. Detaljnije će biti objašnjene metode analize taloge, te će one biti dodatno potkrijepljene primjerima.

Tablica 2. Eksperimentalne metode istraživanja biomineralizacije s obzirom na tekuću i krutu fazu.<sup>[4]</sup>

| Tekuća faza           | Kruta faza                              |
|-----------------------|-----------------------------------------|
| potenciometrija       | Termička analiza (TGA, DTA)             |
| Ionska kromatografija | Elektorska paramagnetska rezonancija    |
| Uv-vis spektroskopija | Mikroskopija (SEM, TEM, AFM)            |
|                       | Određivanje veličine čestica (CC, DLS)  |
|                       | Difrakcija rentgenskih zraka na prahu   |
|                       | Molekulska spektroskopija (FTIR, Raman) |

## 2.1. Mikroskopija

Završni rad temelji se na metodama analize taloga. Jedna od metoda analize taloga je i mikroskopija. Sama riječ mikroskopija sastoji se riječi mikro, što bi u prijevodu značilo proučavanje sitnih objekata tj. predmeta mikroskopom, na čemu se ova tehnika i sama zasniva. To je izuzetno cijenjena metoda jer pruža uvid u strukturu, veličinu, oblik i broj čestica. Mikroskopija koristi se u mnogim znanstvenim disciplinama i granama znanosti od kristalografije, citologije, botanike, genetike, pa sve do mineralogije. Sama mikroskopija dijeli se na SEM ili pretražnu elektronsku mikroskopiju, TEM ili transmisijsku elektronsku mikroskopiju i naposljetku na AFM ili mikroskopiju atomskih sila.

### 2.1.1. Svjetlosna mikroskopija (OM)

Mnogi sićušni uzorci ne mogu se proučavati golim okom, stoga je razvoj svjetlosnog mikroskopa uvelike olakšao njihovo proučavanje. Svjetlosni mikroskopi<sup>[12]</sup>, češće zvani optički mikroskopi, koriste snop svjetlosti i sustav leća za povećanje slike predmeta to jest uzorka kojeg promatramo (Slika 1.). Osnovni svjetlosni mikroskopi veoma su jednostavni pri čemu se njihov optički sustav dijeli na dva dijela: objektiv odnosno optičke naprave koja prikuplja svjetlost i okular to jest sustav leća kroz koji se gleda slika predmeta<sup>[12]</sup>. Sam objektiv povećava osvijetljenu sliku te ju prenosi do leće okulara, a okular dodatno povećava sliku i prenosi je do mrežnice oka osobe koja promatra uzorak. Princip rada temelji se na prolasku svjetlost kroz kondenzator koji pohranjuje zrake svjetlosti na uzorak, pri čemu dolazi do boljeg osvijetljenja uzorka. Zrake svjetlosti nakon prolaska kroz uzorak ulaze u objektiv pri čemu nastaje prva, povećana i realna slika. Nastalu realnu sliku okular dodatno povećava i pretvara u virtualnu sliku<sup>[13]</sup> na temelju koje oko stvara realnu sliku. Kao izvor svjetlosti osim dnevnog svjetla, većina mikroskopa koristi svoj vlastiti prilagodljivi i kontrolirani izvor svjetlosti kao što je halogena lampa. U današnje vrijeme sve je češća uporaba LED-a i lasera kao izvora svjetlosti. Moć povećanja izuzetno je velika pri čemu moderniji svjetlosni mikroskopi mogu dosegnuti povećanje čak do 3000 puta. Sam svjetlosni mikroskop može se unaprijediti kompjuterima i videokamerama koje služe za poboljšanje kvalitete i analizu slike.



Slika 1. Svjetlosni mikroskop.<sup>[14]</sup>

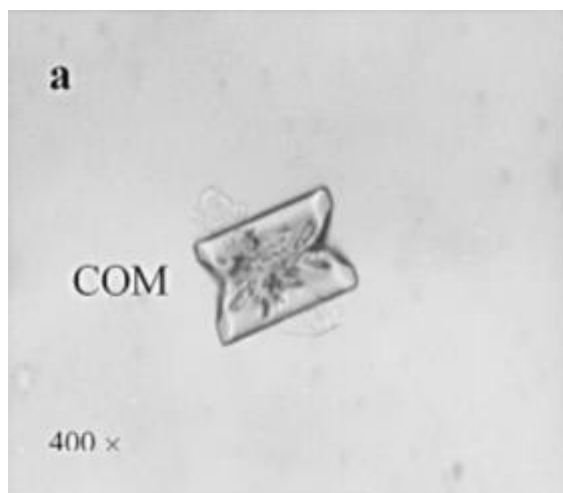
Kako bi se izbjegla oštećenja lako ranjivih bioloških uzoraka koristi se digitalna mikroskopija s vrlo niskim razinama svjetlosti. U 20. stoljeću sve više se razvija fluorescentna mikroskopija kao osjetljiva metoda istraživanja unutar stanične molekulske raspodjele. Kako bi se zaobišla ograničenja koja nameće difrakcija vidljive svjetlosti, napravljeni su brojni drugi mikroskopi koji koriste druge valove kao što su: mikroskop atomskih sila (AFM), skenirajući elektronski mikroskop (SEM), transmisijski elektronski mikroskop (TEM) i tako dalje. Navedeni mikroskopi će biti pobliže objašnjeni u idućim poglavljima.

Što se pak tiče primjene svjetlosne mikroskopije, ona se uvelike koristi u mikroelektronici, farmaciji, minerologiji, mikrobiologiji te u nanofizici. Svoju primjenu svjetlosna mikroskopija nalazi i u medicini odnosno grani histopatologije koja se bavi tkivima.

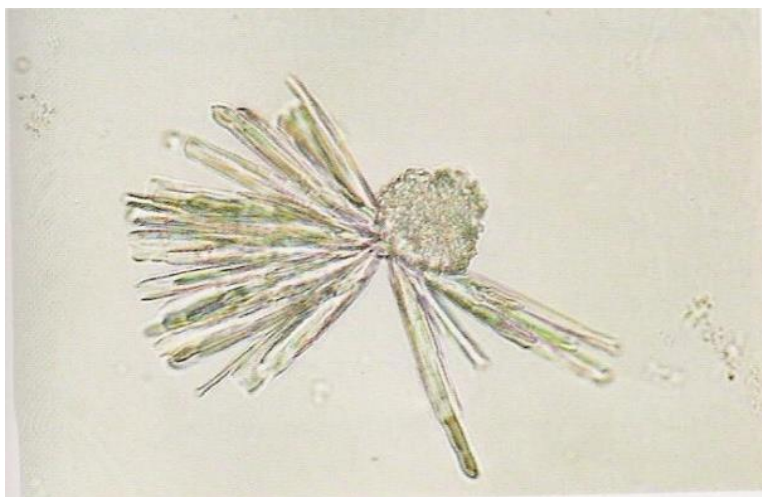
#### **2.1.1.1. Primjena svjetlosne mikroskopije (OM) u biomineralizaciji**

Svjetlosna mikroskopija uvelike se koristi za proučavanje pojave kristala u mokraći odnosno kristalizacije. Pojava kristala u mokraći upućuju na inicijalnu fazu nastanka

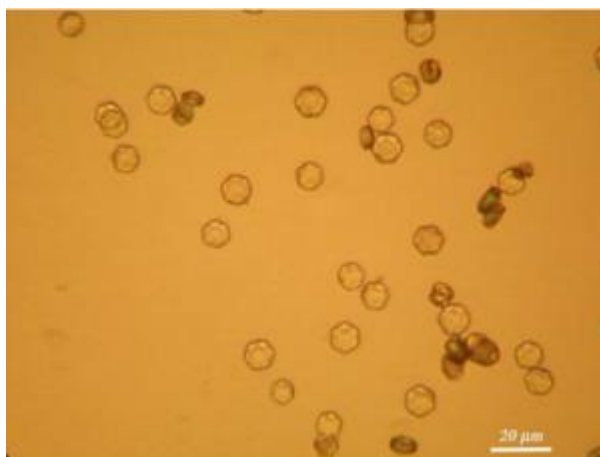
mokraćnih kamenaca koji dovode do urolitijaze, bolesti zastupljene širom svijeta. Stoga primjena svjetlosne mikroskopije uvelike olakšava rješavanje ove bolesti. Morfologija kristala u urinu čovjeka može se detektirati pomoću svjetlosne mikroskopije (Slika 2. i 3.), ali isto tako može i poslužiti za promatranje morfologije biominerala sintetiziranih u laboratoriju (Slika 4.).



Slika 2. Kristali čistog kalcijevog oksalata monohidrata (COM) detektiranog svjetlosnom mikroskopijom u urinu čovjeka.<sup>[15]</sup>



Slika 3. Bezbojni kristali kalcijeva fosfata prisutni u urinu čovjeka prikazani svjetlosnim mikroskopom.<sup>[16]</sup>



Slika 4. Detekcija čestica taloga kalcijeva karbonata svjetlosnom mikroskopijom pri čemu čestice pod utjecajem ultrazvučnog zračenja mijenjaju svoju veličinu.<sup>[17]</sup>

### 2.1.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Pretražna ili skenirajuća elektronska mikroskopija<sup>[18]</sup> vrsta je elektronske mikroskopije koja se temelji na skeniranju površine ispitivanog uzorka (prethodno se mora pripremiti) pomoću precizno fokusiranog snopa elektrona. Uzorak je smješten na komori mikroskopa, a izvor elektrona je katoda koja se nalazi u emisijskoj komori. Metoda se zasniva na ubrzavanju elektrona između visokonaponske katode odnosno anode, fokusirani elektroni usmjeruju se pomoću magnetskih leća na površinu ispitivanog uzorka. Za dobivanje slike i provođenje analize koriste se razni efekti koji se događaju prilikom udarca elektrona o površinu ispitivanog uzorka. Skenirajući elektronski mikroskop koristi tri tipa detektora. BSE detektor koji detektira povratne elektrone nastale odbijanjem elektrona (unazad) iz elektronskog snopa mikroskopa, EDS detektor čija je zadaća da detektira zračenje karakteristično za svaki kemijski element koje je nastalo prilikom skoka elektrona iz ljuske višeg energetskog stanja u prazno mjesto nastalo izbijanjem elektrona iz elektronskog omotača i SE detektor koji ima veliku moć razlučivosti te na taj način pokazuje površinu uzorka<sup>[19]</sup>. SEM metoda je u većini slučajeva nedestruktivna. Ona omogućuje jako dobru rezoluciju koja omogućuje da se vide i sićušni objekti, jednostavna je za korištenje i pruža podatke u digitalnom obliku, no uz velik broj prednosti ima i popriličan broj nedostataka. Izrazito je skupa metoda, prilikom njezina korištenja dolazi do izlaganja manjoj količini radijacije. Prilikom pripreme uzorka važno je uzorak očistiti od prašine, otisaka prstiju, masnih dijelova, to se postiže uranjanjem u etanol te sušenjem običnom lampom. Metoda



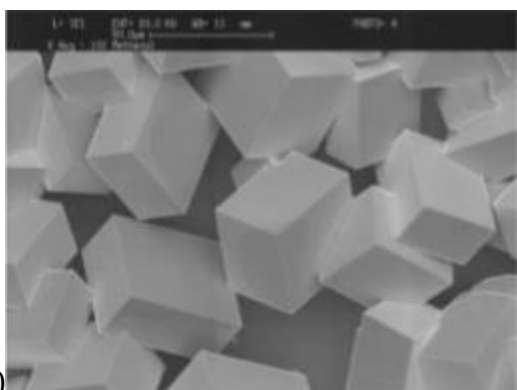
onemogućuje skeniranje materijala koji nisu vodljivi, te se oni stoga moraju montirati i presvući nekim vodljivim materijalom poput platine, zlata i paladija. Zlato, paladij i platina pružaju bolji kontrast slike, ističu nagibe, pore i druge karakteristike ispitivanog uzorka.



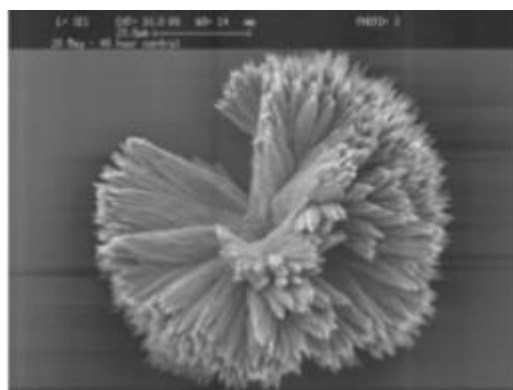
Slika 5. Skenirajući elektronski mikroskop.<sup>[20]</sup>

#### 2.1.2.1. Primjena pretražne elektronske mikroskopije (SEM) u biomineralizaciji

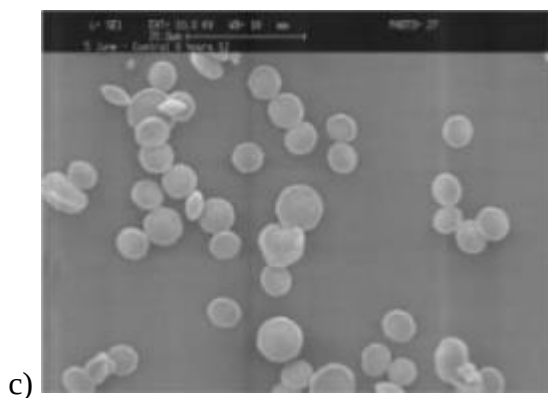
Primjena SEM-a je izrazito rasprostranjena od forenzike, fizike, strojarstva, medicine, industrije stakla, keramike i porculana, prehrambene industrije, stomatologije te geoloških disciplina (mineralogije, kristalografije i paleontologije). Korištenje SEM-a od velike je važnosti u biomineralizaciji za istraživanje strukture kalcijeva karbonata (njegovih različitih polimorfa) i kalcijeva fosfata, ali i kalcijeva oksalata.



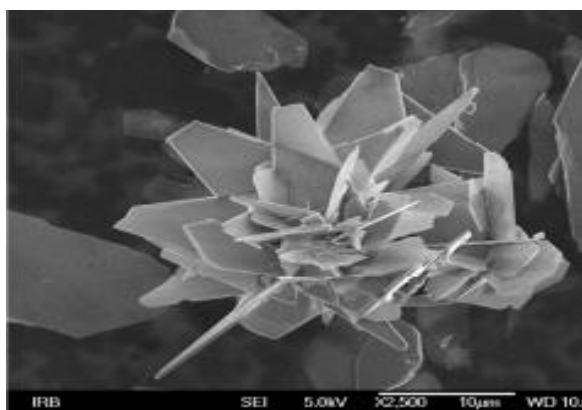
a)



b)

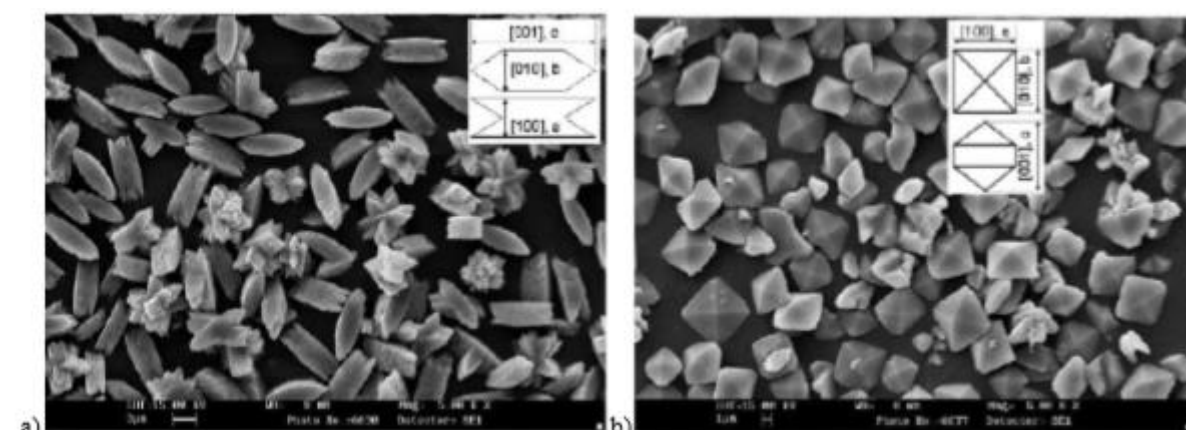


Slika 6. SEM mikrografije polimorfa kalcijeva karbonata: a) kalcit, b) aragonit c) valerit.<sup>[21]</sup>



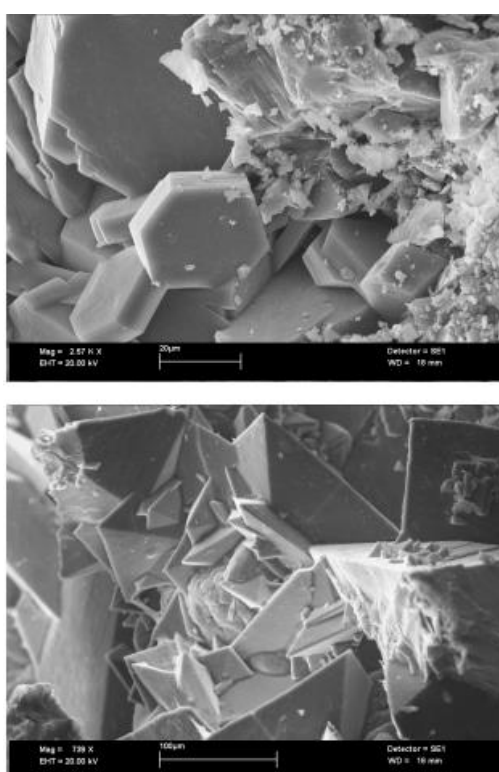
Slika 7. SEM mikrografija taloga kalcijeva fosfata nastalog u jednostavnom  $\text{Ca(OH)}_2$ - $\text{H}_3\text{PO}_4$  taložnom sustavu nakon jednosatnog starenja.<sup>[22]</sup>

Skenirajuća elektronska mikroskopija se također koristi i za proučavanje faza kalcijeva fosfata, te za uspoređivanje različitih hidratnih oblika kalcijevog oksalata (Slika 8.) (kalcijeva oksalata monohidrata-COM koji kristalizira u monoklinskom sustavu, a kalcijeva oksalata dihidrata-COD koji kristalizira u tetragonskom sustavu).



Slika 8. SEM mikrografije duguljastih šesterokutih COM-a (a) i bipiramidnog COD-a (b).

[23]

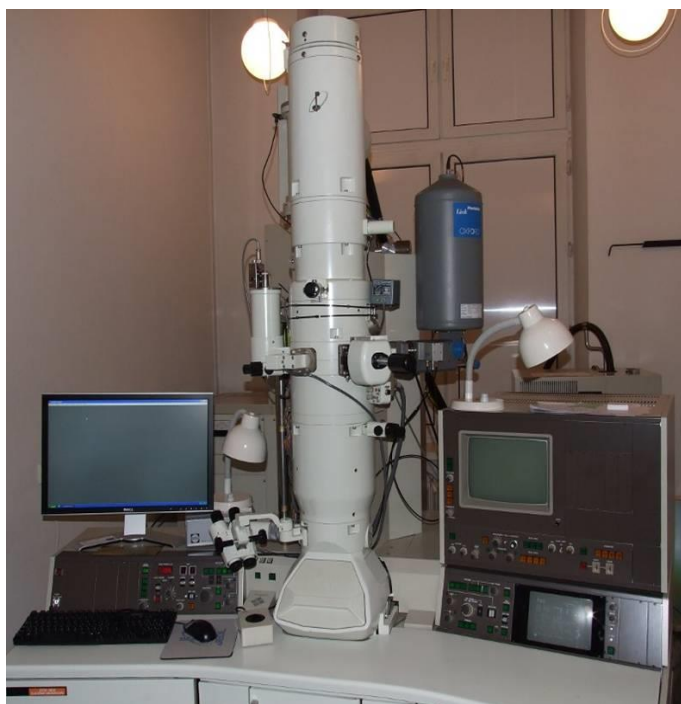


Slika 9. SEM mikrografije kalcijeva oksalata monohidrata (gore) i kalcijeva oksalata dihidrata (dolje).<sup>[6]</sup>

### 2.1.3. Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)

Transmisijska elektronska mikroskopija<sup>[24]</sup> je metoda zasnovana na propuštanju elektronskog snopa kroz vrlo tanak uzorak čija debljina ne rijetko može biti veća od 1  $\mu\text{m}$ . Sama metoda dovodi do najjačeg mogućeg povećanje ispitivanog uzorka, pruža uvid u molekularnu strukturu i jednostavna je za korištenje. Izvor elektrona u ovoj metodi je

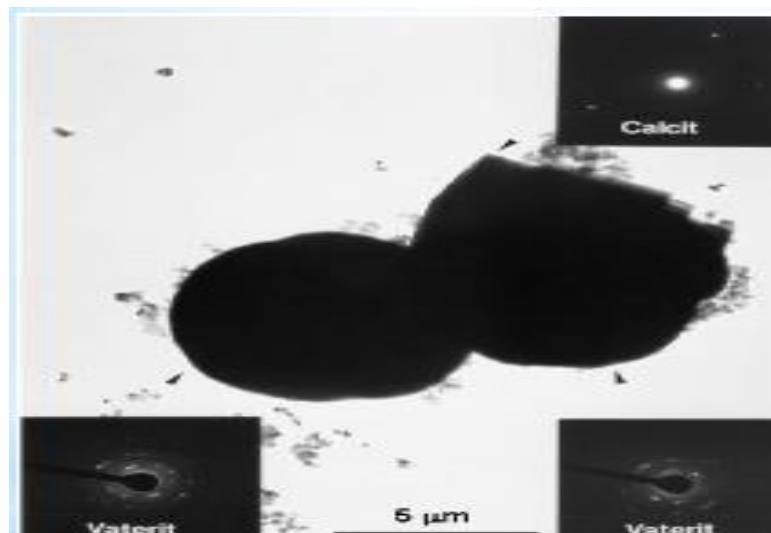
elektronski top, pri čemu zbog razlike u potencijalima između anode i katode dolazi do velikog ubrzanja elektrona. Ubrzani elektroni elektronskom lećom usmjeravaju se na uzorak pri čemu se dio elektrona rasprši u susretu s atomima, a dio ne rasprši. Neraspršeni elektroni stvaraju elektronsku sliku. Krajnja slika crno-bijele boje nastaje na fluorescentnom zaslonu. Kada se govori o kvaliteti slike ona uvelike ovisi o kontrastu, koji može biti fazni ili ogibni<sup>[19]</sup>. Iz ogibne se slike može proučiti simetrija ispitivanog uzorka, pri čemu se smjerovi prenose na elektronsku sliku ili u sliku temeljenu na faznom kontrastu. Također iz ogibne slike se može odrediti i kristalna struktura. Ona omogućava znanstvenicima uvid u molekularnu strukturu, površinu tvari i kemijski sastav. Transmisijski mikroskopi (Slika 10.) izuzetno su skupi i veliki. Što se tiče pripreme uzorka ona je izuzetno zahtjevna te postoji velika mogućnost pojave artefakata, uzorci moraju biti dovoljno mali da stanu u vakuumsku komoru te moraju podnositi vakuum. Metoda zahtjeva ispravnu pripravu uzorka kako bi se postigli što bolji rezultati. Uzorak mora biti što tanji pri čemu se krajnje stanjivanje uzorka postiže bombardiranjem ionima. Transmisijska elektronska mikroskopija osim svoje primjene u biomineralizaciji, djelovanje pronalazi i u nanotehnologiji, forenzici, metalurgiji i medicini.



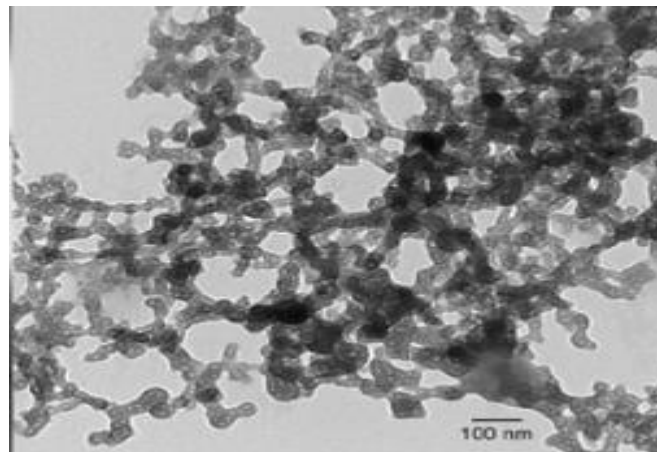
Slika 10. Transmisijski elektronski mikroskop.<sup>[25]</sup>

### 2.1.3.1. Primjena transmisije elektronske mikroskopije (TEM) u biomineralizaciji

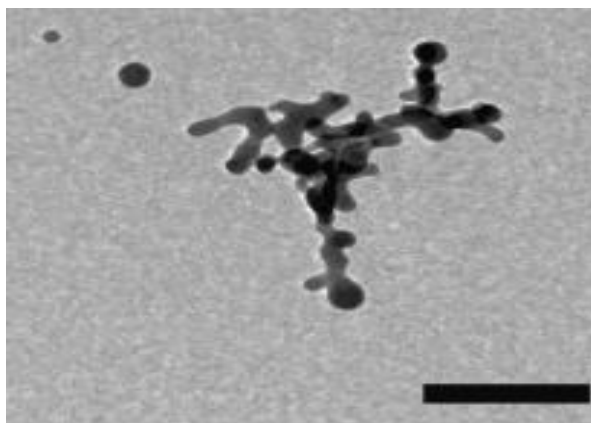
Primjena TEM tehnike u području istraživanja biomineralizacije očituje se u mikrografiji smjese polimorfa kalcita i valerita (Slika 11.). Također transmisijska elektronska mikroskopija koristi se i za istraživanje kalcijeva fosfata i kalcijevog oksalata (Slika 12. i 13.).



Slika 11. TEM mikrografija čestica  $\text{CaCO}_3$  (kalcita i valerita), na područja označena strelicom unutar slike dodani su elektornski difraktogrami.<sup>[26]</sup>



Slika 12. TEM mikrografija sferične čestice amornog kalcijevog fosfata nastalog u prisutnosti proteina amelogenina P148 nakon jednog dana.<sup>[27]</sup>



Slika 13. TEM mikrografija kalcijevog oksalata tamnog kontrasta i definirane sferične morfologije nastalog prilikom titracije sa 10mM citratom pri pH 6,2.<sup>[28]</sup>

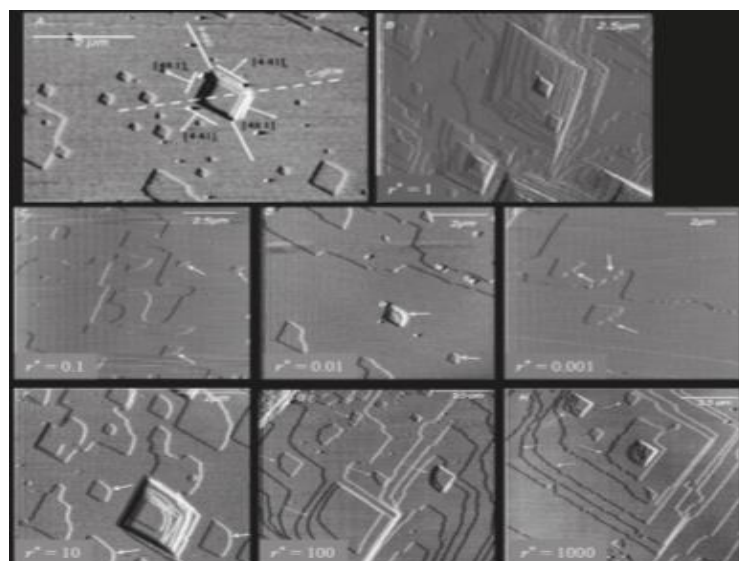
#### 2.1.4. Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Mikroskopija atomskih sila ili AFM (eng. Atomic force microscopy) je vrsta mikroskopske tehnika koja služi za određivanje topografije uzorka<sup>[24]</sup>. Riječ je od poprilično nedestruktivnoj metodi koja predložuje realnu sliku u tri dimenzije. Njezine 3 glavne sposobnosti su: mjerenje sile, snimanje i manipulacije. Sama metoda zasniva se na mjerenju sile pomoću senzora<sup>[29]</sup>, a ne na mjerenju struje. AFM-ovi se mogu koristiti za mjerenje sile između sonde mikroskopa i uzorka. Kao rezultat mjerenja sile javlja se odbojna sila na malim udaljenostima zbog utjecaja Van der Waalsovih sila. Sama metoda ima vrlo visoku rezoluciju te se u današnje vrijeme sve više primjenjuje na nano-razini. Također kod ove metode nije potrebna prethodna priprema uzorka, te se ispitivanja mogu provoditi u tekućem okruženju što je veoma važan čimbenik kod proučavanja razno raznih bioloških makromolekula. Metoda mikroskopije atomskih sila pogodna je za mjerenje sila adhezije, tvrdoće površine, ali i se također mogu mjeriti i –intra i inter molekularne sile. Također tehnika mikroskopije atomskih sila je pogodna za proučavanje polimera, koloida i stanica. Sama konstrukcija AFM uređaja sastoji se od izrazito fleksibilne sonde, koja posjeduje oštri šiljak, (obično silicij ili silicijev nitrit) te se koristi za skeniranje površine uzorka. Micanjem šiljka po površini uzorka dolazi do promjene sile čije se promjene snimaju te takve informacije služe za stvaranje slike površine uzorka. Primjena AFM-a je raznolika<sup>[30]</sup>. Mikroskopija atomskih sila primjenjuje se u industriji poluvodiča, farmaceutskoj industriji, prehrambenoj industriji, biologiji, proizvodnji lakova i boja,

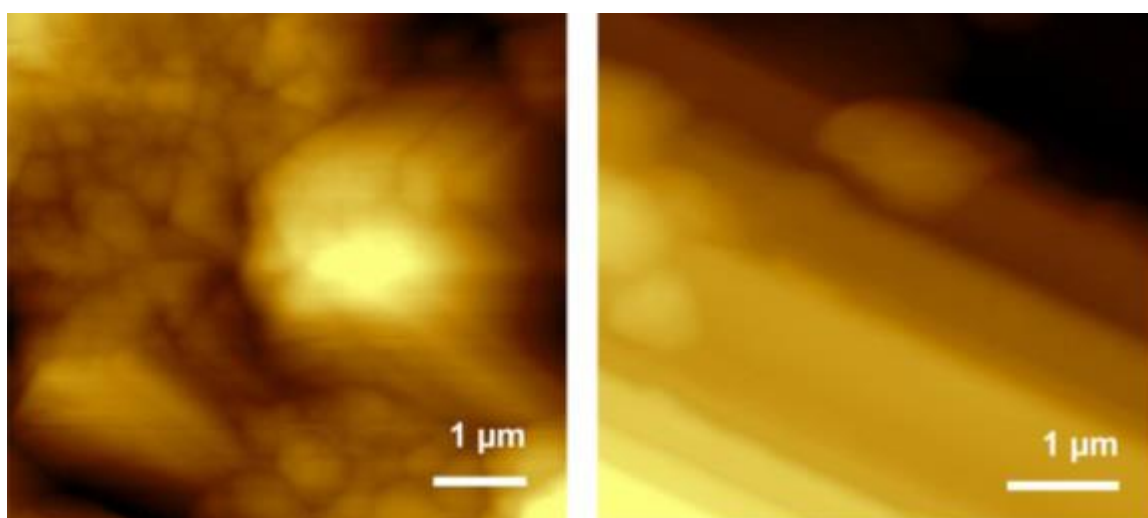
koristi se u stomatologiji, elektrotehnici i služi za ispitivanje termičkih i mehaničkih svojstava polimera.

#### 2.1.4.1. Primjena mikroskopije atomskih sila (AFM) u biomineralizaciji

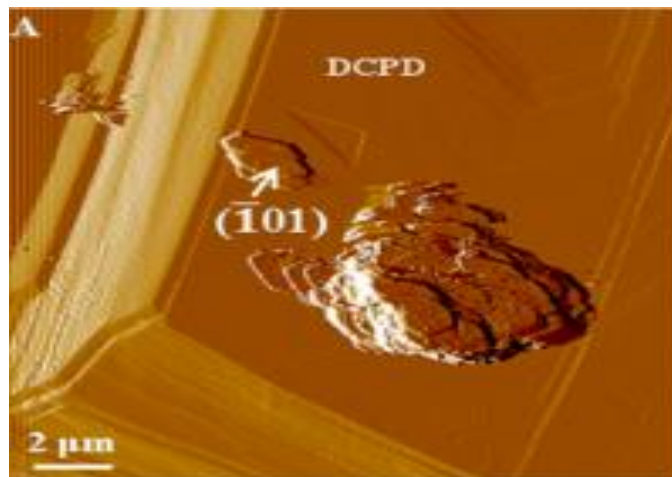
Praćenje rasta kristala kao funkcije omjera ukupnih koncentracija karbonatnih i kalcijevih iona u otopini konstantne prezasićenosti<sup>[31]</sup> primjer je korištenja mikroskopije atomskih sila u istraživanju biomineralizacije (Slika 14.).



Slika 14. A) AFM mikrografija površine kalcita nakon postupka otapanja, B-H) romboedarske udubine nakon propuštanja otopina različitih omjera ukupnih koncentracija kalcijevih i karbonatnih iona ( $r^*$ ) po površini kalcita te rasta kalcita. U slučaju B)  $r^* = 1$ , C – E)  $r^* < 1$ , a F – H)  $r^* > 1$ . Omjeri  $r^*$  su prikazani na slikama.<sup>[31]</sup>



Slika 15. AFM prikazi koralita gdje se mogu uočiti gusto pakirani prizmatični aragonitni kristali.<sup>[32]</sup>



Slika 16. AFM slika taloženja kalcijeva oksalata na površini kalcijeva hidrogenfosfata dihidrata u čistoj oksalnoj kiselini.<sup>[33]</sup>

## 2.2. Molekulska spektroskopija

Spektroskopija<sup>[34]</sup> je znanost koja se bavi proučavanjem spektara koji su nastali kao posljedica strukturnih ili energijskih promjena u atomima i molekulama uslijed njihova međudjelovanja s elektromagnetskim zračenjem i drugim česticama. Ona je izuzetno primjenjiva u mnogima granama znanosti jer pruža uvid, proučavanjem spektra, o građi, temperaturi, tlaku i sastavu tvari, dipolnom momentu, distorziji kristalne rešetke i kutu te duljini veza pojedinih molekula. Spektroskopija se s obzirom na pojavu koja izaziva sprezanje elektromagnetskog zračenja dijeli na 3 vrste: rotacijsku, vibracijsku i elektronsku spektroskopiju. Emisijom i apsorpcijom fotona dolazi do nastanka spektralnih linija u vibracijskoj odnosno molekularnoj spektroskopiji. Ramanovom spektroskopijom i infracrvenom spektroskopijom (IR) opažaju se promjene odnosno vibracije u molekulama u infracrvenom području spektra. Da bi te vibracije bile uočljive u infracrvenoj spektroskopiji moraju uzrokovati promjenu dipolnog momenta, dok u slučaju Ramanske spektroskopije moraju uzrokovati promjenu svojstva koje odođuje koliko neki anion



dozvoljava da se elektronska gustoća “odvuče” s njega, to jest moraju uzrokovati promjenu polarizabilnosti<sup>[4]</sup>.

### **2.2.1. Ramanska spektroskopija**

Ramanska spektroskopija<sup>[35]</sup> je vrsta molekulske spektroskopije koja je nedestruktivna odnosno neinvazivna. Sama je neovisna o temperaturi i tlaku, te kao metoda zahtjeva jednostavnu pripremu uzorka pri čemu voda služi kao idealno otapalo za tu metodu jer se ne raspršuje na plastici ili staklu. U mjerenjima Ramanovih spektara laserska zraka se uvodi u uzorak i raspršena svjetlost se obično promatra pod kutem od 90 stupnjeva<sup>[36]</sup> prema laserskoj zraki. Budući da je laserska zraka polarizirana, intenzitet snimljenih Ramanovih spektara može se razlikovati ovisno o tome da li je analizator koji je smješten između uzorka i monokromatora orijentiran paralelno ili okomito na smjer polarizacije zrake lasera. Kao što je rečeno Ramanovo raspršenje povezano je s polarizabilnošću tvari. Ramanovo raspršenje je vrsta neelastičnog raspršenja elektromagnetskog zračenja pri kojem se frekvencija raspršenog zračenja razlikuje od frekvencije pobudnog zračenja te je takav proces u manjem slučaju moguć za razliku od elastičnog Rayleighovog raspršenja to jest koherentnog raspršenja.

Ramanska spektroskopija ima veoma široku primjenu: za određivanje strukture te svojstava spojeva, njezina primjena očituje se i u analitici i farmaceutskoj industriji gdje služi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu, u biologiji i medicini služi za otkrivanje niskofrekventnih fotona<sup>[37]</sup> u proteinima i DNA molekulima. U kemiji se mnoge molekule mogu identificirati pomoću svojih karakterističnih vrpca koje potječu od raznoraznih vibracija. Metoda je izrazito primjenjiva u analizi smjese plinova, ali i u otkrivanju eksploziva.

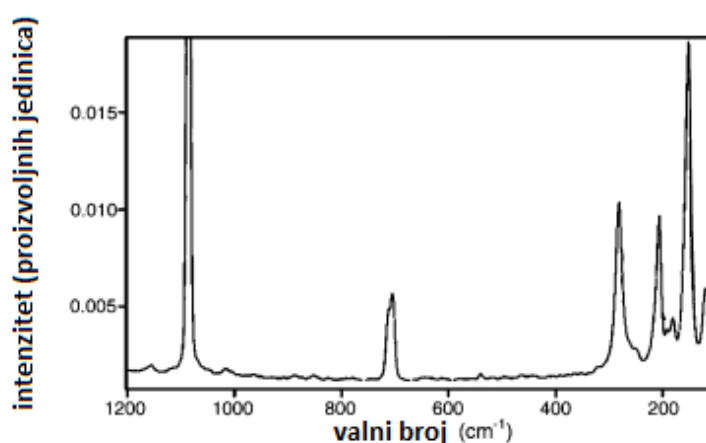
#### **2.2.1.1. Primjena Ramanske spektroskopije u biomineralizaciji**

U biomineralizaciji to je važna metoda za određivanje veličine kristala, te karbonata i hidroksida koji se nalaze unutar minerala. Također Ramanova spektroskopija se primjenjuje u određivanju stupnja mineralizacije kolagena, tvari koji čini strukturnu uređenost kostiju to jest prirodnih kompozita. Karakteristične Ramanove vrpce zajedno sa

njihovom podjelom dane su u Tablici 3. U biomineralizaciji vrpce dobivene Ramanovom spektroskopijom mogu ukazati na promjene koje se dešavaju kostima kao što je starenje kostiju. Ramanova spektroskopija koristi se i za analizu smjese polimorfa kalcijeva karbonata (aragonita i kalcita).

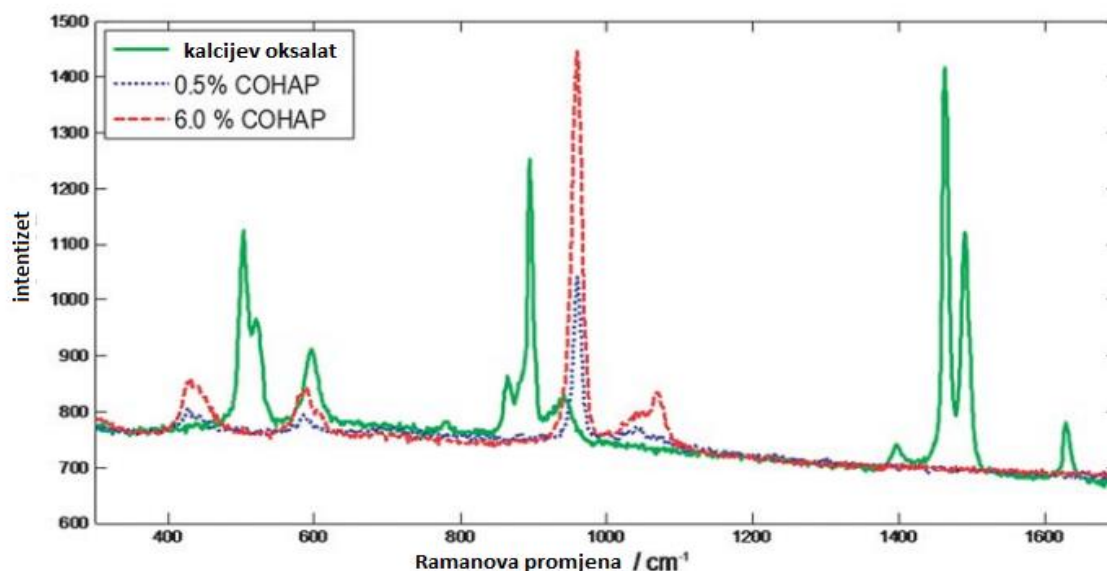
Tablica 3. Karakteristične Ramanove vrpce te njihova podjela.<sup>[38]</sup>

| <b>Maksimum (cm<sup>-1</sup>)</b> | <b>Pridruženje</b>                            |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------|
| 422-454                           | PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> v <sub>2</sub>  |
| 568-617                           | PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> v <sub>4</sub>  |
| 815-921                           | C-C istežanje                                 |
| 957-962                           | PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> v <sub>3</sub>  |
| 1003-1005                         | HPO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> v <sub>3</sub> |
| 1006-1055                         | PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> v <sub>3</sub>  |
| 1065-1071                         | CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>                 |
| 1243-1269                         | Amid III                                      |
| 1447-1452                         | CH <sub>2</sub> njihanje                      |
| 1595-1720                         | Amid I                                        |
| 2840-2986                         | CH <sub>2</sub> istežanje                     |
| 3572-3575                         | OH istežanje                                  |



Slika 17. Ramanov spektar smjese polimorfa kalcijeva karbonata (aragonita i kalcita) u omjeru 1:1 u području valnog broja od 1200 do 100 cm<sup>-1</sup>.<sup>[39]</sup>

Na slici 18. vidljivo je kako nam Ramanova spektroskopija pruža uvid da su karbonatne značajke karbonatno supstituiranog hidroksiapatita (COHAP) relativno slabe (1042 i 1070  $\text{cm}^{-1}$ ) u usporedbi sa intenzitetom fosfatnog maksimuma (960  $\text{cm}^{-1}$ ).

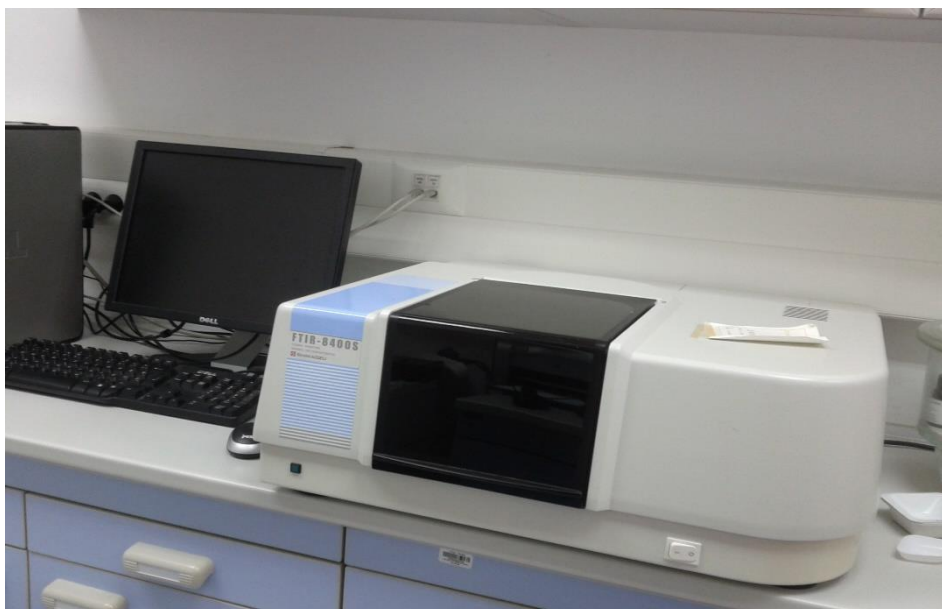


Slika 18. Ramanov spektar kalcijevog oksalata (tip I) i 0,5 % i 6,0 % karbonatno supstituiranog hidroksiapatita (COHAP, kalcifikacije tipa II).<sup>[40]</sup>

### 2.2.2. Infracrvena spektroskopija (IR)

Infracrvena spektroskopija (IR)<sup>[41]</sup> je tehnika koja se koristi za dobivanje infracrvenog spektra emisije ili apsorpcije krutina, plinova ili pak tekućina. Primjenjuje se infracrveno elektromagnetsko zračenje na molekulu koja se želi ispitati, pri čemu dolazi do molekulskih vibracija (rastezanje i deformacije veza) usred apsorpiranja energije. U većini slučajeva promatra se apsorpcija u ovisnosti o valnoj duljini<sup>[42]</sup>. Infracrvena spektroskopija može se temeljiti i na Fourierovoj transformaciji (FT-IR). Fourierova transformacija (matematički proces) koristi se kako bi se neobrađeni podaci pretvorili u stvarni infracrveni spektar<sup>[43]</sup>. FT-IR spektrometri se uglavnom koriste za mjerenja u srednjem i bliskom infracrvenom području. Za srednje područje od 2 do 25  $\mu\text{m}$  najčešći izvor infracrvenog zračenja je silicijev karbid koje se zagrijava na oko 1200 K, dok za valne duljine bliskog IR od 1 do 2,5  $\mu\text{m}$ , koje zahtijevaju podosta veći izvor temperature, kao izvor zračenja se

koristi volfram-halogen lampu. Što se pak tiče detektora u većini slučajeva koriste se oni koji reagiraju na promjenu temperature. Razdjelivači snopova za srednje IR područje većinom su građeni od kalijeva bromida koji je presvučen germanijom, dok se za blisko IR područje upotrebljavaju razdjelivači od kalcijeva fluorida koji je otporniji na vlagu u odnosu na KBr.



Slika 19. FT-IR spektrometar.<sup>[44]</sup>

Ova metoda dolazi do velikog izražaja pri čemu se uvelike koristi u određivanju funkcionalnih skupina<sup>[45]</sup>, strukture te identifikacije i karakterizacije anorganskih i organskih molekula. Svoju funkciju FTIR pronalazi i u geologiji, biologiji, znanosti o materijalima, ali i kemiji.

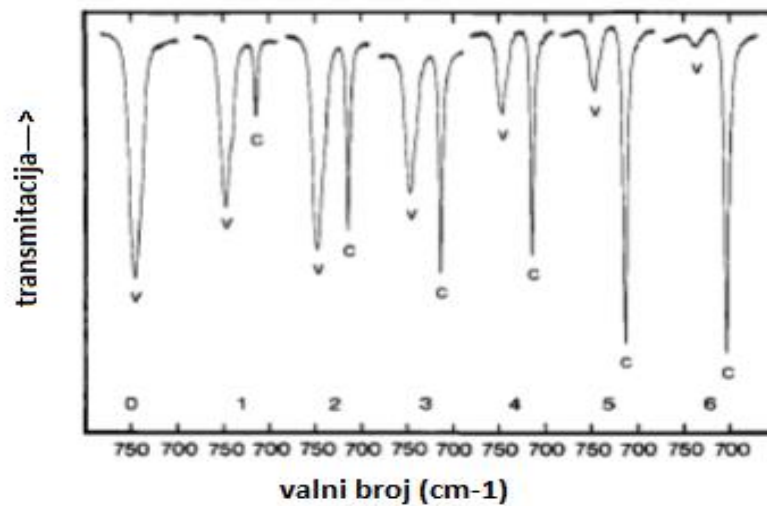
#### **2.2.2.1. Primjena infracrvene spektroskopije (IR) u biomineralizaciji**

U biomineralizaciji IR se jako često koristi u slučaju kvalitativnog i semikvantitativnog određivanja hidratnih oblika biominerala ili polimorfa, na primjeru sastava smjese polimorfa kalcijeva karbonata (vaterita, aragonita i kalcita). Infracrveni spektar dobije se mjerenjem transmitacije, te se može prikazati kao ovisnost transmitacije  $T$  ili apsorbancije  $A$  o valnom broju  $\nu$  izraženom u  $\text{cm}^{-1}$ .

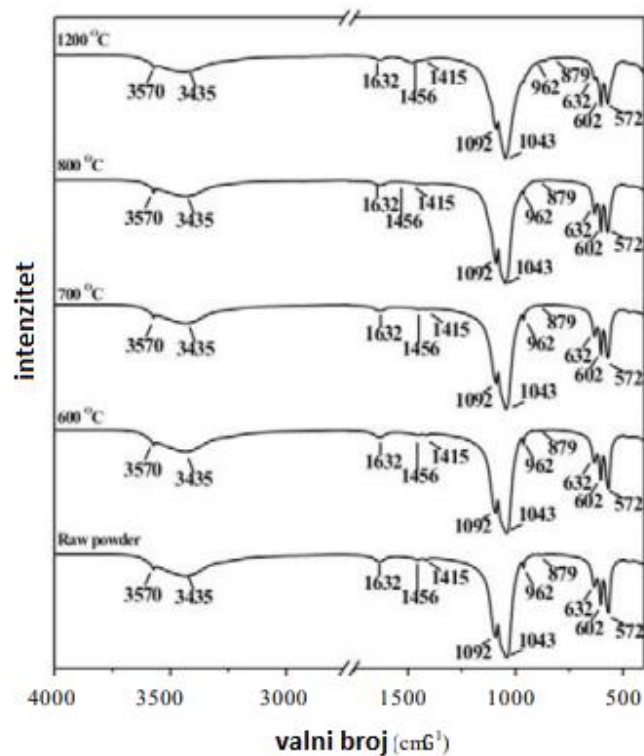
Ako se radi o uzorcima koji su smjesa kalcita i vaterita maseni udio polimorfa moguće je odrediti preko omjera intenziteta pri karakterističnim vrpama prema formuli:

$$w_c = \frac{A_c/A_v}{A_c/A_v + k_c/k_v} \cdot 100\% \quad (1),$$

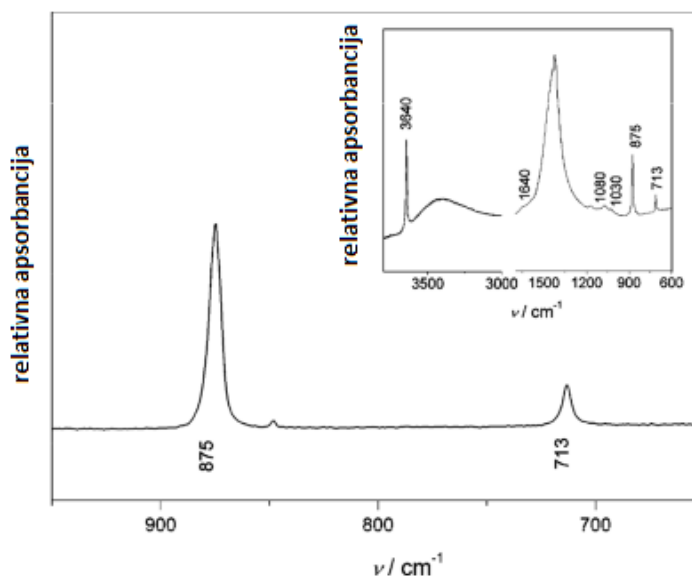
gdje su  $k_c$  i  $k_v$  konstante proporcionalnosti za kalcit odnosno vaterit, a  $A_c$  i  $A_v$  apsorbancije za kalcit i vaterit.



Slika 20. Promjena inteziteta vrpci promjenom masenog udjela kalcita u smjesi kalcita i vaterita.<sup>[46]</sup>



Slika 21. IR spektari kalcijeva fosfata zagrijavanih na različitim temperaturama.<sup>[47]</sup>



Slika 22. IR spektri kalcita dobiveni karbonizacijom pri 25 °C i početne masene koncentracije  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\gamma = 28,6 \text{ g dm}^{-3}$ , umetak: FT-IR spektar uzorka izoliranog na početku procesa karbonizacije.<sup>[48]</sup>

### 2.2.3. Difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (PXRD)

Sama riječ difrakcija odnosi se niz fenomena koji se javljaju kada val susreće prepreku na koju nailazi. U smislu klasične fizike, po pojmom difrakcije podrazumijeva se interferencija valova prema Huygens-Fresnel principu<sup>[49]</sup>. Difrakcija vala omogućava da se pojedinom kristalu odredi njegova kristalna struktura<sup>[50]</sup>. Jedno od značajnijih svojstava rentgenskih valova jest interferiranje jednoga vala s drugim. Sama interferencija može biti konstruktivna ili destruktivna. Kada govorimo o konstruktivnoj interferenciji tada dolazi do povećanja vala zbog toga što su dva vala u fazi, dok kod destruktivne interferencije dolazi do smanjenja vala zbog toga što oni titraju u suprotnim fazama<sup>[4]</sup>. S obzirom da do difrakcije dolazi ukoliko se valne duljine zračenja poklapaju sa dimenzijama objekta, do difrakcije će doći i kod rentgenskog zračenja čije su valne duljine zračenja usporedive sa duljinom molekulskih veza i udaljesnotima među atomima u kristalu.

Rentgensko zračenje podrazumijeva onaj dio elektromagnetskog zračenja s valnim duljinama reda veličine  $10^{-10}$  metara<sup>[43]</sup>. Većina rentgenskih zraka ima valnu duljinu u rasponu od 0,01 do 10 nm.



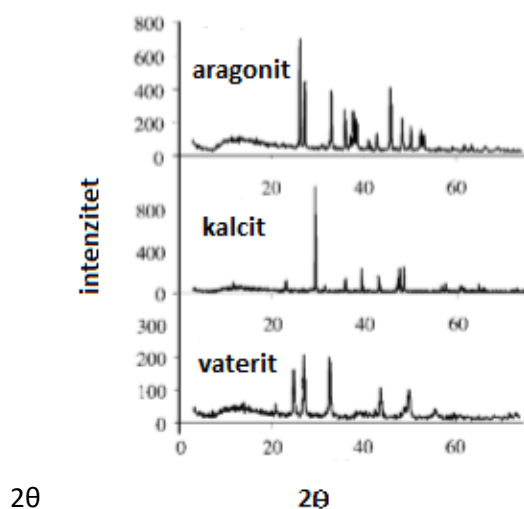
Slika 23. Rentgenski difraktometar za polikristale za rad pri sobnoj temperaturi.<sup>[51]</sup>

Pojam rentgenske difrakcije zasniva se na Braggovom zakonu<sup>[43]</sup>,  $2d \sin\theta = \lambda$ , koji govori da do konstruktivne interferencije, titranja dvaju valova u fazi, dolazi u slučaju proporcionalnosti duljine puta i valne duljine ( $\lambda$ ) ovisne o metalu koji djeluje kao izvor rentgenskog zračenja<sup>[4]</sup>. Za stvaranje difrakcijske slike uzorka koriste se razne vrste detektora ili filma. Te takva slika daje informaciju o kristalnoj strukturi uzorka, te pruža uvid u njegove strukturne karakteristike. Za stvaranje slike kristal se mora staviti u odgovarajuće položaje prema snopu rentgenskih zraka te se tako pojavljuju difrakcijski maksimumi. Smjerove i intenzitet difrakcijskih maksimuma mjeri detektor. Difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku uvelike doprinosi identifikaciji krutina, njezina neizostavna upotreba očituje se u kvantitativnom i kvalitativnom određivanju sastava ispitivanih uzoraka.

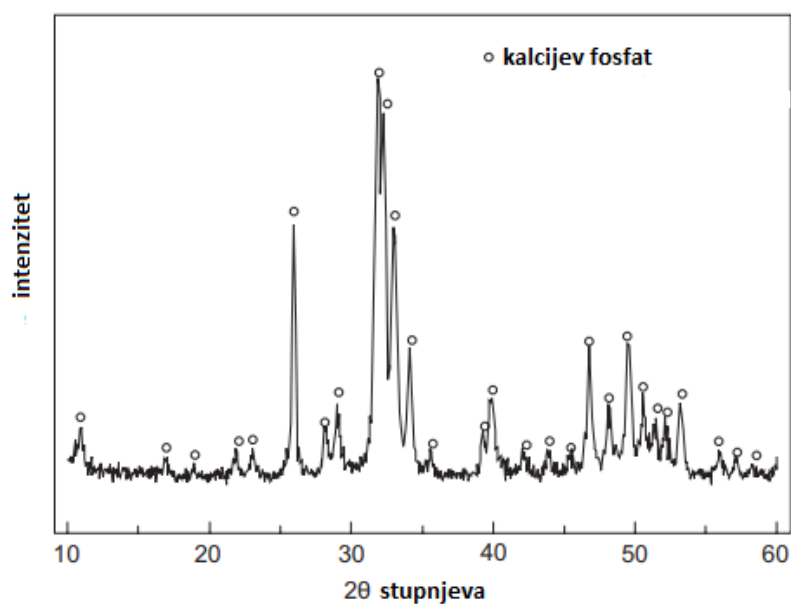
#### **2.2.3.1. Primjena difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (PXRD) u svrhu istraživanja biomineralizacije**

Zbog svoje raznolike primjene u mnogim znanostima, difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku koristi se i u svrhu istraživanja biomineralizacije gdje služi za

kvantitativno određivanje smjese polimorfa kalcijeva karbonata te za analizu praškova kalcijeva fosfata.



Slika 24. Rendgenski difraktogrami uzoraka čistih polimorfa kalcijeva karbonata (aragonita, kalcita, vaterita).<sup>[52]</sup>



Slika 25. Rendgenski difraktogram kalcijeva fosfata.<sup>[53]</sup>

### 2.3. Termičke analize

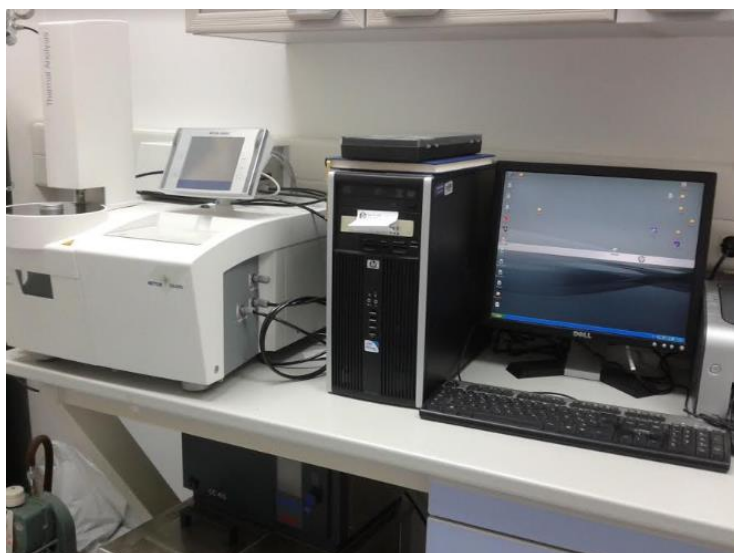
Termičke analize skupina su metoda koje su veoma važne kod proučavanja fizikalnih i kemijskih svojstava uzoraka odnosno ispitivanih tvari. Svojstva se prate u ovisnosti o



vremenu ili temperaturi pri čemu se uzorak izloži nekoj programiranoj promjeni temperature u reguliranoj atmosferi. Danas, opisane su mnoge metode termičke analize koje se koriste ovisno o različitom mjerenom svojstvu. Najčešće korištene metode termičke analize su termogravimetrijska analiza (TGA) o kojoj će pisat nešto detaljnije u nastavku, zatim diferencijalna termička analiza (DTA) i diferencijska skenirajuća kalorimetrija (DSC). DTA se fokusira na razliku u temperaturi uzorka i standarda, a DSC prati razliku toplinskog toka prema uzorku i referentnoj tvari.

### 2.3.1. Termogravimetrijska analiza (TGA)

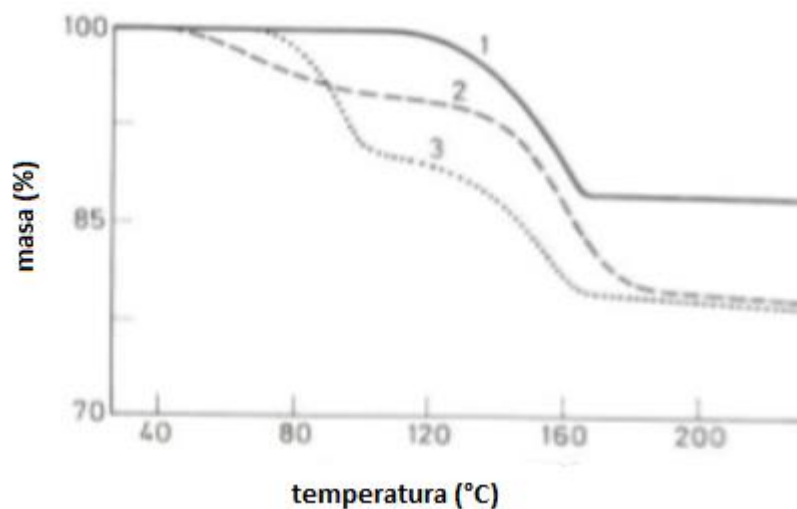
Termogravimetrijska analiza <sup>[54]</sup> zasniva se na praćenju promjene mase uzorka u ovisnosti o promjeni temperature u vremenu.



Slika 26. Instrument za termogravimetrijsku analizu <sup>[44]</sup>

#### 2.3.1.1. Primjena termogravimetrijske analize (TGA) u biomineralizaciji

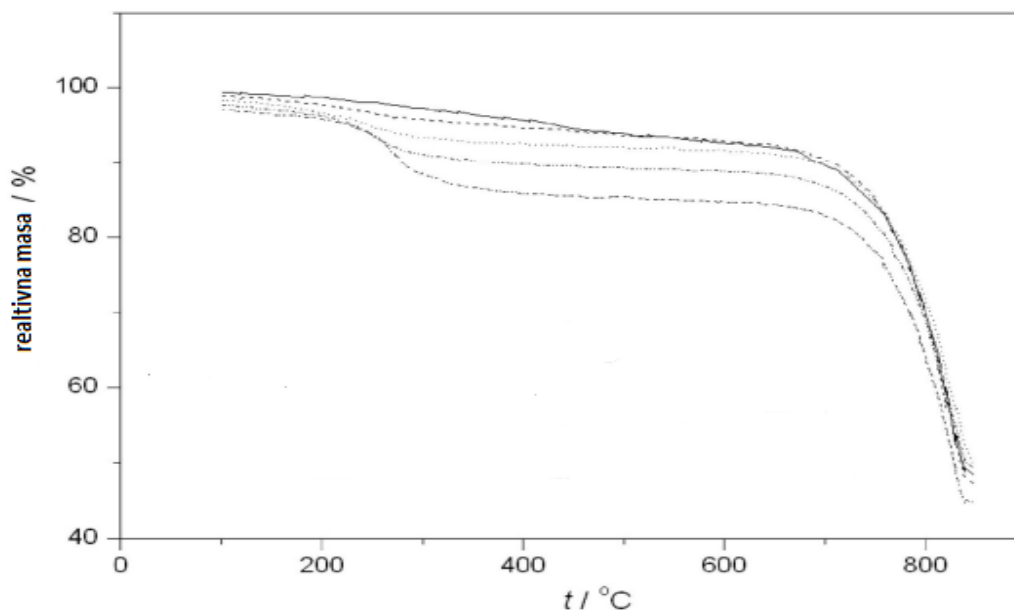
Termogravimetrijska analiza je najkorištenija metoda termičke analize u biomineralizaciji. Njezina primjena očituje se u određivanju temperaturne stabilnosti, određivanju temperature pri kojoj kruta tvar prelazi u tekućinu odnosno pri određivanju tališta, termičkog raspada, analizi sublimacije te analizama sastava spojeva poput kalcijeva oksalata mono, di i tri hidrata (Slika 27.).



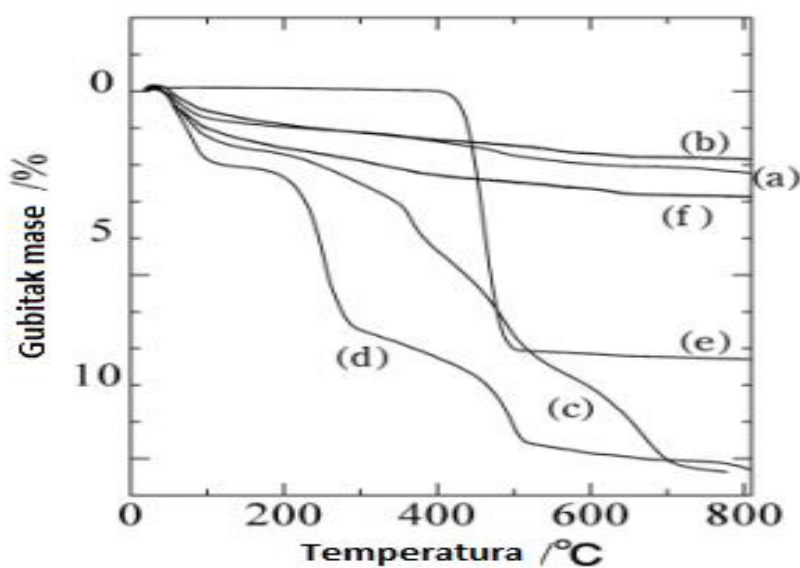
Slika 27. Termogram kalcijeva oksalata: COM (krivulja 1), COD (krivulja 2), COT (krivulja 3).<sup>[54]</sup>

Termogrami prikazuju kako COT odnosno trihidrat ima dvije stepenice baš kao i dihidrat, ali je njegova prva znatno veća u odnosu na dihidrat. Prva odgovara gubitku jedne molekule vode, dok druga odgovara oslobađanju dvije molekule vode. U slučaju monohidrata uočavamo jednu stepenicu koja odgovara gubitku jedne vode. Na temelju početne mase uzorka i mase uzorka nakon izbacivanja vode može se odrediti promjena mase nakon oslobodenja vode.

Termogravimetrijska analiza može poslužiti u analizi taloga kalcijeva karbonata (Slika 28.) i analizi čestica kalcijeva fosfata pripremljenih u različitim uvjetima (Slika 29.).



Slika 28. Termogravimetrijska analiza čistih taloga kalcijeva karbonata (PCC) (-) i PCC uzoraka pripremljenih u prisustvu različitih masenih udjela neionskih dekstrana ( $M_r = 150\,000\text{ g mol}^{-1}$ ): 60 (----), 600 (.....), 2 500 (-.....) i 6 000  $\text{mg dm}^{-3}$  (-.....).<sup>[55]</sup>



Slika 29. Termogravimetrijske krivulje čestica kalcijeva fosfata pripremljenih pri različitim uvjetima (a)  $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ ,  $c = 1\text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 6,5 - 7,5$ , (b)  $\text{CaCl}_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ,  $c = 1\text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 6,5 - 7,5$ , (c)  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\text{-Na}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ,  $c = 1\text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 6,5 - 7,5$ , (d)  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\text{-(NH}_4)_2\text{HPO}_4\text{-NH}_4\text{OH}$ ,  $c = 1\text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 6,5 - 7,5$ , (e)  $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $1\text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 4,5$ , (f)  $\text{CaCl}_2\text{-Na}_3\text{PO}_4$ ,  $c = 1\text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 9,5 - 11,5$ .<sup>[56]</sup>

### 3. ZAKLJUČAK

Biom mineralizacija je u novije vrijeme sve istraživanja i korištenija interdisciplinarna znanstvena grana koja se bavi proćavanjem biološki nastalim mineralnim ćesticama nazvanih biom mineralima. Izazov proućavanja biom mineralizacije proizlazi zbog toga što su potrebna znanja iz drugih područja znanosti poput kemije, biologije i geologije, ali i drugih znanosti.

Biom minerali tvari koje djeluju kao osnova, potpora i zaštita organizmu po kemijskom sastavu su anorganske soli. U svrhu njihova istraživanja koriste se mnoge eksperimentalne metode. Eksperimentalne metode istraživanja biom mineralizacije tj. biom minerala mogu se podijeliti s obzirom na analiziranje krute odnosno tekuće faze. Brojnije su eksperimentalne metode koje analiziraju krutu fazu (talog): metoda temićke analize (TGA, DTA), metoda odrećivanja velićine ćestica (CC, DLS), mikroskopija (SEM, TEM, AFM), molekulska spektroskopija (FTIR, Raman), difrakcija rentgenskih zraka na prahu te elektronska paramagnetska rezonancija. Metode koje analiziraju tekuću fazu (matićnicu) su ionska kromatografija, potencijometrija i UV-VIS spektroskopija.

Navedene metode prućaju informaciju o graći, strukturi, velićini, vremenu nukleacije, rastu kristala, termićkom raspadu i temperaturnoj stabilnosti biom minerala. Takoćer, dobivene informacije uvelike mogu pomoći u rješavanju problema ovapnjenja žila, žućnog kamenca i kamenca urinarnog trakta ćestih i izuzetno neugodnih problema patološke biom mineralizacije.

#### 4. POPIS LITERATURE

- [1] L.A. Estroff, Chem. Rev. 108 (2008), 4329-4331.
- [2] S. Šafranko, Utjecaj mehaničkog miješanja, temperature i koncentracije citrata na taloženje kalcijeva oksalata, završni rad, 2016.
- [3] I. Erceg, Početni stadij biomineralizacije: Istraživanje nastajanja amorfnog kalcijevog fosfata metodama raspršenja svjetlosti i laserske difrakcije, rektorova nagrada, Zagreb, 2017.
- [4] L. Štajner, Eksperimentalne metode za istraživanje biomineralizacije, Kemijski seminar I, Zagreb, 2015.
- [5] Weller, Overton, Rourke, Armstrong, Inorganic Chemistry, 6th edition, Oxford University Press, United Kingdom, 2014.
- [6] M. L. Giannnossi, V. Summa, A Review of Pathological Biomineral Analysis Techniques and Classification Schemes, InTech, Rijeka, 2012.
- [7] L. B. Gower, Chem. Rev. 108 (2008), 4551-4627.
- [8] D. Kralj, Kem. Ind. 45 (1996) 13-26.
- [9] Lj. Brečević, D. Kralj, Medicinski vjesnik, 42 (2010), 127-136.
- [10] R. H. Petrucci, F.G. Herring, J.D. Madura, C. Bissonnette, Genereal chemistry principles and modern applications, Pearson Canada Inc, Toronto, 2011.
- [11] N. Y. Mostafa, P.W. Brown, Journal of Physics and Chemistry of Solids 68 (2007), 431-437.
- [12] M. Trnak, Elektronska mikroskopija, diplomski rad, Osijek, 2010.
- [13] I. M. Watt, The principles and practice of electron microscopy, 2<sup>nd</sup> edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
- [14] Odjel za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- [15] V. Šerić, A. Tucak, V. Babić-Ivančić, Med. Vjesnik 37 (2005), 119-124.
- [16] <https://laboratoryinfo.com/types-of-crystals-in-urine/> (pristupio 4.9.2018.)
- [17] B. Njegić Džakula, J. Kontrec, M. Ukrainczyk, S. Sviben, D. Kralj, Cryst. Res. Technol. 49 (2014), 244–256.
- [18] D. Stokes, Principles and Practice of Variable Pressure/Environmental Scanning Electron Microscopy (VPÂ?-ESEM), John Wiley & Sons, Hoboken, 2008.
- [19] L. Šimeg, Primjena elektronske mikroskopije u karakterizaciji prirodnih materijala, završni rad, Zagreb, 2014.

- [20] <https://www.irb.hr/Istrazivanja/Kapitalna-oprema/Pretrazni-elektronski-mikroskop-JSM-7000F> (pristupio 11.8.2018.)
- [21] S. R. Dickinson, K. M. McGrath, J. Mater. Chem. 13 (2003), 928-933
- [22] I. Buljan Meić, J. Kontrec, D. Domazet Jurašin, B. Njegić Džakula, L. Štajner, D. M. Lyons, M. Dutour Sikirić, D. Kralj, *Crystal Growth & Design* 17 (2017), 1103-1117.
- [23] T. Jung, W.-S. Kim, C. K. Choi, Mater. Sci. Eng. C 24 (2004), 31-33.
- [24] V. Jokanović, Instrumentalne metode, ključ razumevanja nanotehnologije i nanomedicine, Inženjerska akademija Srbije i Institut za nuklearne nauke “Vinča”, Beograd, 2014.
- [25] <http://zasoby.open.agh.edu.pl/~11sashot/strona745a.html?t=mb&h=tem&v=> (pristupio 15.9.2018.)
- [26] J. Rieger, T. Frechen, G. Cox, W. Heckmann, C. Schmidt, J. Thieme, Faraday Discuss 136 (2007), 265-277.
- [27] Kwak, Seo-Young et al., *The Journal of Biological Chemistry* 284 (2009), 18972–18979.
- [28] E. Ruiz-Agudo , A. Burgos-Cara, C. Ruiz-Agudo, A. Ibañez-Velasco, H. Cölfen, C. Rodriguez-Navarro, Nature Communications 8 (2017), 768.
- [29] P. Eaton, P. West, Atomic force microscopy, Oxford University Press, New York, 2010.
- [30] D. Rugar, P. Hansma, Atomic force microscopy, Physics today 43 (1990), 23-30.
- [31] C. Perdokouri, C. V. Putnis, A. Kasiopas, A. Putnis, Cryst. Growth Des. 9 (2009), 4344-4350.
- [32] V. Čadež , Biomineralne strukture aragonita morskih beskralješnjaka: morfološke, strukturne i biokemijske značajke, doktorska disertacija, Zagreb, 2015.
- [33] S. Li, W. Zhang, L. Wang, Cryst. Growth Des. 15 (2015), 3038–3045.
- [34] G. A. Tompsett, G. A. Bowmaker, R. P. Cooney, J. B. Metson, K. A. Rodgers, J. M. Seakins, J. Raman Spectr. 26 (1995) 57-62.
- [35] M. Plodinec, Fizikalna i kemijska svojstva funkcionaliziranih titanatnih nanostruktura, doktorski rad, Zagreb, 2014.
- [36] G. S. Bumrah, R. M. Sharma, Egyptian Journal of Forensic Sciences 6 (2016), 209-215.
- [37] K. C. Chou, N. Y. Chen, Scientia Sinica. 20 (1977), 447–457.

- [38] A. F. Khan, M. Awais, A. S. Khan, S. Tabassum, A. A. Chaudhry, I. U. Rehman, *Appl. Spectrosc. Rev.* 48 (2013), 329-355.
- [39] H.G.M. Edwards et al., *Spectrochimica Acta Part A* 61 (2005), 2273–2280.
- [40] M. M. Kerssens, P. Matousek, K. Rogersb, N. Stone, *Analyst* 135 (2010), 3156–3161.
- [41] P. Griffiths, J.A. de Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry* (2nd ed.), John Wiley & Sons, Hoboken, 2007.
- [42] I. Buljan, *Visoko temperaturne transformacije alumosilikatnih prekursora u sekundarne kristalne produkte ciljanih svojstava*, disertacija, Zagreb, 2012.
- [43] J. Bijelić, *Modificirana vodena sol-gel metoda za sintezu složenih metalnih oksida na bazi volframa*, diplomski rad, Osijek, 2017.
- [44] Odjel za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- [45] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy*, third edition, Brooks/Cole Thomson Learning, Australia, 2001.
- [46] F. A. Andersen, D. Kralj, *Appl. Spectrosc.* 45 (1991), 1748-1751.
- [47] P. Pankaew, E. Hoonnivathana, P. Limsuwan, K. Naemchanthara, *Journal of Applied Sciences* 10 (2010), 3337- 3342.
- [48] J. Kontrec, M. Ukrainczyk, B. Njegić Džakula, D. Kralj, *Cryst. Res. Technol.* 48 (2013), 622–626 .
- [49] T. S. Rappaport, *Wireless communications: Principles and practice* 2<sup>nd</sup> edition, Prentice Hall, New Jersey, 2002.
- [50] P. W. Atkins, *Physical Chemistry*, Fifth edition, Oxford University press, Oxford, 1994.
- [51] <http://baltazar.irb.hr/hr/instrumenti/rentgenski-difraktometar-za-polikristale-za-rad-pri-sobnoj-temperaturi-philips-pw-1730-10-46> (pristupio 4.9.2018.)
- [52] S. R. Dickinson, K. M. McGrath, *Analyst* 126 (2001), 1118-1121.
- [53] F. Granados-Correa, J. Bonifacio-Martinez and J. Serrano-Gomez, *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26 (2010), 129-134.
- [54] F. Grases, A. Millan, A. Conte, *Urol Res* 18 (1990), 17-20.
- [55] J. Kontrec, M. Ukrainczyk, V. Babić-Ivančić, D. Kralj, *Croat. Chem. Acta* 84 (2010) 25.
- [56] H. Kasahara, N. Ogata, T. Ogihara, *Journal of the Ceramic Society of Japan* 112(2004), 650-654.