



Πανεπιστήμιο Κύπρου  
Τμήμα Χημείας

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΑΝΘΡΑΚΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΩΣ ΜΗΤΡΑ ΓΙΑ ΤΟ  
ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p32 /  
gC1qR**

**ΡΑΦΑΕΛΛΑ ΛΟΗ**

**Μάιος 2024**

## Περίληψη

Τα πεπτίδια έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιολογική ανάλυση και στην κατασκευή νέων βιοαισθητήρων, επειδή προσφέρουν μια σειρά από πλεονεκτήματα, όπως ευκολία στη σύνθεση, ποικιλία δομών (επομένως μεγάλο εύρος εφαρμογών) και υψηλή εκλεκτικότητα για ένζυμα. Τα πεπτίδια έχουν χρησιμοποιηθεί σε βιοαισθητήρες ως στοιχεία βιο-αναγνώρισης για τη σύνδεση διαφόρων αναλυτών, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, βακτηρίων, ιόντων μετάλλων, ενζύμων και αντισωμάτων. Η πρόοδος στις τεχνικές ακινητοποίησης και μικροσυστοιχιών των πεπτιδίων έχει διευκολύνει την πρόοδο και την εμπορική εφαρμογή πεπτιδικών βιοαισθητήρων που βασίζονται σε τσιπ στην κλινική διάγνωση.

Εμπνευσμένοι από μια πρόσφατη μελέτη, δημιουργήσαμε έναν βιοαισθητήρα χρησιμοποιώντας μικροσωματίδια  $\text{CaCO}_3$  (2-3 $\mu\text{m}$ ) ως πρότυπα. Επιλέχθηκε το πολύμορφο βατερίτη του  $\text{CaCO}_3$ , καθώς οδηγεί σε πιο ομοιόμορφα σφαιρικά σωματίδια, κατάλληλα για τη λειτουργικότητα της επιφάνειας. Τα σωματίδια συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Στη συνέχεια επικαλύφθηκαν με πολυηλεκτρολύτες για τη δημιουργία επιφανειών με καρβοξυλικές ομάδες.

Συντέθηκε το πεπτίδιο (Ac-C-bAla-bAla-AKRGARSTA), το οποίο στοχεύει τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη p32 που υπερεκφράζεται στη μεμβράνη των αγγειογενετικών ενδοθηλιακών κυττάρων και σε πολλά καρκινικά κύτταρα. Το πεπτίδιο συνδέθηκε με τα μικροσωματίδια  $\text{CaCO}_3$  μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ των ομάδων  $-\text{NH}_2$  του πεπτιδίου και  $-\text{COOH}$  στις επιφάνειες των μικροσωματιδίων.



Σχήμα 1.1 : Σχηματική περίληψη.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της Μεταπτυχιακής μου Εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους βοήθησαν τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο για την ολοκλήρωσή της μελέτης αυτής.

Αρχικά οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρα Επαμεινώνδα Λεοντίδη για τη συνεχή στήριξη και βοήθειά του κατά τη διάρκεια της παρουσίας μου στο ερευνητικό του εργαστήριο. Η καθοδήγηση του και το συνεχές ενδιαφέρον του είχαν καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον συνεργάτη Δρα Ιωάννη Σαρηγιάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Λευκωσίας για τη πολύτιμη συνεργασία μαζί του στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Θεοδώρα Κρασιά και την Διδακτορική φοιτήτρια της Γεωργία Παπαπαρασκευά (Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών Πανεπιστημίου Κύπρου) για τη βοήθεια τους, ώστε να εκπαιδευτώ στη χρήση του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM). Ευχαριστώ τους καθηγητές του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κύπρου Δρα Σάββα Ν. Γεωργιάδη και Δρα Αναστάσιο Κεραμιδά για τη συμμετοχή τους στην επιτροπή αξιολόγησης της ερευνητικής μου εργασίας.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένεια και τους φίλους μου για τη συνεχή στήριξη τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Κεφάλαιο 1 : Εισαγωγή</b> .....	8-9
<b>Κεφάλαιο 2: Σωματίδια Ανθρακικού Ασβεστίου</b> .....	10
2.1 Το CaCO <sub>3</sub> και τα πολύμορφα του.....	10-11
2.2 Τα Σωματίδια CaCO <sub>3</sub> .....	12
2.3 Συσσωμάτωση Κολλοειδών .....	12-13
<b>Κεφάλαιο 3: Βασικές Τεχνικές Φυσικού Χαρακτηρισμού Σωματιδίων CaCO<sub>3</sub></b> .....	14
3.1 Μέθοδος Περίθλασης Ακτίνων X (XRD).....	14
3.1.1 Παραγωγή Ακτίνων X .....	14-15
3.1.2 Νόμος του Bragg .....	15-16
3.2 Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων (Scanning Electron Microscopy).....	16
3.2.1 Αρχή Λειτουργίας .....	16-18
3.3 Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA).....	18
3.4 Μέτρηση ζ-δυναμικού .....	19-20
<b>Κεφάλαιο 4: Μεθόδοι σύνθεσης σωματιδίων CaCO<sub>3</sub></b> .....	21
4.1 Βιομημητική Μέθοδος .....	21
4.1.1 Μέθοδος καταβύθισης .....	21
4.1.1.1 Αυθόρμητη αντίδραση καταβύθισης .....	21-25
4.1.1.2 Αντίδραση Ενανθράκωσης .....	26-27
4.2 Μέθοδος Γαλακτωμάτων .....	28
4.3 Μέθοδος Προσθήκης CO <sub>2</sub> .....	28-29

<b>Κεφάλαιο 5: Συνθήκες που επηρεάζουν τους κρυστάλλους CaCO<sub>3</sub></b> .....	30
5.1 Επίδραση pH.....	30-31
5.2 Επίδραση Θερμοκρασίας.....	31-32
5.4 Επίδραση διαλύτη .....	33
<b>Κεφάλαιο 6: Βιοαισθητήρες</b> .....	34
6.1 Ορισμός και αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων .....	35
6.2 Τμήματα ενός βιοαισθητήρα .....	36
<b>6.3 Αισθητήρες πρωτεϊνών βασισμένοι σε πεπτίδια</b> .....	36
6.3.1 Οπτικοί αισθητήρες .....	37-38
6.3.2 Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες.....	38-39
6.3.3 Αισθητήρες Μάζας- Μικροζυγός Κρυστάλλου Χαλαζία (QCM).....	39-41
<b>Κεφάλαιο 7: Πρωτεΐνη p32/gC1Qr</b> .....	42
7.1 Δομή και Λειτουργία της πρωτεΐνης p32/gC1Qr.....	42
7.2 Ο ρόλος της πρωτεΐνης p32/gC1Qr στη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου .....	42-43
<b>Κεφάλαιο 8: Πειραματικό μέρος</b> .....	44
<b>Μέρος 1: Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με τη χρήση πολυμερικών σταθεροποιητών</b> .....	44
Μέθοδος 8.1.1 : Σύνθεση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> με τη χρήση πολυακρυλικού οξέος ως σταθεροποιητή σε διαφορετικές θερμοκρασίες και ροές αντιδραστηρίων.....	44
Μέθοδος 8.1.2 : Σύνθεση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> με τη χρήση πολυμεθακρυλικού οξέος ως σταθεροποιητή .....	44-45
Μέθοδος 8.1.3 : Σύνθεση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> με τη χρήση χιτοζάνης ως σταθεροποιητή ...	45
Μέθοδος 8.1.4 : Σύνθεση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> με τη χρήση ντοπαμίνης ως σταθεροποιητή .....	46

Μέθοδος 8.1.5: Σύνθεση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> με τη χρήση πολυ (4-στυρενοσουλφονικού νατρίου) ως σταθεροποιητή .....	47
Μέθοδος 8.1.6: Σύνθεση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> με τη χρήση αργινίνης ως σταθεροποιητή .....	47
Μέθοδος 8.1.7: Σύνθεση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> με τη χρήση καρβοξυμελθοκυτταρίνης ως σταθεροποιητή .....	49
Μέθοδος 8.1.8: Σύνθεση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> με τη χρήση πολύ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) ως σταθεροποιητή.....	49
<b>Μέρος 2: Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> χωρίς τη χρήση πολυμερικών σταθεροποιητών.....</b>	<b>50</b>
Μέθοδος 8.2.1: Σύνθεση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> .....	50
Μέθοδος 8.2.2: Σύνθεση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> .....	51
<b>Μέρος 3: Επικάλυψη σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με τη μέθοδο layer by layer.....</b>	<b>51</b>
Μέθοδος 8.3.1 : Επικάλυψη σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> πολυακρυλικού οξέος από πολυαιθυλενιμίνη.....	51
Μέθοδος 8.3.2 : Επικάλυψη σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> πολυστερενοσουλφονικού νατρίου από πολυαιθυλενιμίνη .....	52
Μέθοδος 8.3.3:Επικάλυψη σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> _ πολυστερενοσουλφονικού νατρίου από πολυυδροχλωρική αλλυλαμίνη.....	52
Μέθοδος 8.3.4: Επικάλυψη σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> καρβοξυμελθοκυτταρίνης από χιτοζάνη.....	53
Μέθοδος 8.3.5: Επικάλυψη σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> πολυ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) από πολυ (4-στυρενοσουλφονικό νάτριο).....	53
Μέθοδος 8.3.6: Επικάλυψη σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> πολυστερενοσουλφονικού νατρίου,πολύ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) από πολύ (4-στυρενοσουλφονικό νάτριο).....	54
Μέθοδος 8.3.7: Επίστρωση σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> ,πολύ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) από πολυακρυλικό οξύ .....	54
<b>Μέρος 4 : Χαρακτηρισμός σωματιδίων .....</b>	<b>54</b>

8.4.1 Μέτρηση ζ-δυναμικού.....	55
8.4.2 Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων (Scanning Electron Microscopy, SEM).....	55
8.4.3 Περίθλαση Ακτίνων Χ (X-ray Diffraction) .....	55

**Μέρος 5: Σύνθεση πεπτιδίου Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A**

<b>και χαρακτηρισμός .....</b>	<b>56</b>
8.5.1 Σύνθεση πεπτιδίου.....	56-57
8.5.2 Χαρακτηρισμός πεπτιδίου .....	57

**Μέρος 6: Αντίδραση μεταξύ του πεπτιδίου: Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A και του spacer :Mal-PEG-NH<sub>2</sub>.....**

8.6.1 Αντίδραση μεταξύ του πεπτιδίου: Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A και του spacer :Mal-PEG-NH <sub>2</sub> .....	58
8.6.2: Έλεγχος προόδου αντίδρασης.....	58

**Μέρος 7: Αντίδραση μεταξύ του πεπτιδίου: Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A και των σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>\_PAH\_PAA.....**

8.7.1 Αντίδραση μεταξύ του πεπτιδίου: Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A και των σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> _PAH_PAA.....	58-59
8.7.2 Χαρακτηρισμός υλικού: CaCO <sub>3</sub> _PAH_PAA @ Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A	
8.7.2.1 Φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR).....	59
8.7.2.2 Θερμοβαρυσμική Ανάλυση (TGA) .....	59

**Κεφάλαιο 9: Αποτελέσματα/Ανάλυση αποτελεσμάτων.....**

9.1 Συνθετικές διαδικασίες για επιλογή του κατάλληλου σταθεροποιητή.....	60-78
9.2: Επικάλυψη σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> με τη μέθοδο layer by layer.....	78-86
9.3 Χαρακτηρισμός πεπτιδίου.....	87-89

9.4 Αντίδραση μεταξύ πεπτιδίου και spacer Mal-PEG-NH <sub>2</sub> .....	89-92
9.5 Αντίδραση μεταξύ πεπτιδίου και σωματιδίων CaCO <sub>3</sub> _PAH_PAA και του πεπτιδίου.....	92-96
<b>Κεφάλαιο 10 :</b> Συμπεράσματα-Μελλοντική Εργασία .....	97-98
<b>Κεφάλαιο 11:</b> Βιβλιογραφία .....	99-110



## Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Το  $\text{CaCO}_3$  είναι ένα ορυκτό που εμφανίζεται σε τρεις άνυδρες κρυσταλλικές μορφές (πολύμορφα) : αραγωνίτης, βατερίτης και ασβεστίτης. Τα σωματίδια ανθρακικού ασβεστίου έχουν μεγάλο αριθμό εφαρμογών, λόγω των ιδιοτήτων τους, όπως το υψηλό πορώδες, η μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, και η βιοσυμβατότητά τους με τα βιολογικά υγρά. Αν και υπάρχει σε αφθονία στη φύση, στις περισσότερες εφαρμογές χρησιμοποιούνται μικροσωματίδια  $\text{CaCO}_3$ , τα οποία παράγονται με συνθετικές μεθόδους. Η πλειοψηφία των προσεγγίσεων σύνθεσης βασίζεται είτε στη βιομηχανική μέθοδο, είτε στη μέθοδο προσθήκης  $\text{CO}_2$  σε διαλύματα αλάτων ασβεστίου<sup>{1}</sup>. Οι μέθοδοι αυτές δίνουν σωματίδια με διάφορες τελικές μορφολογίες, μέγεθος, αλλά και διαφορετικά πολύμορφα, που καθορίζονται από παράμετρους, όπως ο τύπος και η συγκέντρωση των προσθέτων, το pH, η θερμοκρασία, ο διαλύτης και ο τρόπος προσθήκης των αντιδρώντων<sup>{2-3}</sup>.

Τα σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  χρησιμοποιούνται σε διάφορους τομείς όπως σε υλικά για ενίσχυση και βελτίωση των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων πλαστικών, χαρτιού και χρωμάτων, σε βιοϊατρικές εφαρμογές, σε περιβαλλοντικές εφαρμογές, και σε εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Από πλευράς εφαρμογών, η χρησιμότερη μορφολογία είναι τα σφαιρικά σωματίδια (συνήθως βατερίτη)<sup>{3}</sup>. Ο βατερίτης είναι ένα μετασταθές πολύμορφο, που πήρε το όνομά του από τον Γερμανό ορυκτολόγο Heinrich Vater το 1911, ο οποίος φαίνεται ότι πραγματοποίησε τη σύνθεσή του ήδη από το 1894<sup>{4}</sup>. Σωματίδια βατερίτη έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε αρκετές βιοεφαρμογές, συγκεκριμένα ως οχήματα μεταφοράς φαρμάκων<sup>{2}</sup>, στη φωτοακουστική τομογραφία<sup>{4}</sup>, στη βιοαπεικόνιση, στη μηχανική ιστών, καθώς και στην δημιουργία βιοαισθητήρων<sup>{5-10}</sup>.

Μια ιδιαίτερη κατηγορία εφαρμογών των σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  οφείλεται στη δυνατότητά τους να δημιουργούν μικροκάψουλες, αφού επικαλυφθούν με στρώματα πολυμερών με τη μέθοδο layer -by-layer (LbL)<sup>{2}</sup>. Για τέτοιες εφαρμογές το  $\text{CaCO}_3$  πλεονεκτεί σε σύγκριση με άλλα σωματίδια εξαιτίας των ήπιων συνθηκών αποσύνθεσής του (ελαφρά όξινο pH ή παρουσία EDTA). Αντίθετα, σωματίδια με πυρήνα από πυρίτιο<sup>{11-13}</sup>, πολυστυρένιο ή πολυγαλακτικό οξύ<sup>{14}</sup> είναι ακατάλληλα για βιοεφαρμογές, λόγω των σχετικά σκληρών συνθηκών που απαιτούνται για την διάλυση του πυρήνα αυτών των σωματιδίων (HF, οργανικοί διαλύτες και  $\text{HClO}_4$ , αντίστοιχα). Εκτός από τις ήπιες συνθήκες διάλυσης, τα σωματίδια  $\text{CaCO}_3$

παρουσιάζουν ένα άλλο αξιοσημείωτο πλεονέκτημα, αυτό της σχετικά εύκολης σύνθεσης στο εργαστήριο από φθηνές και ευρέως προσβάσιμες πρώτες ύλες, κυρίως από τα άλατα  $\text{CaCl}_2$  και  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ <sup>{15}</sup>.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιούνται μικροσωματίδια  $\text{CaCO}_3$  με απώτερο στόχο την κατασκευή ενός βιοαισθητήρα με πρόσδεση ενός ολιγοπεπτιδίου στην κατάλληλα τροποποιημένη επιφάνεια των σωματιδίων. Η επιλογή του  $\text{CaCO}_3$  έγινε για να μπορεί να σχεδιαστεί ο βιοαισθητήρας τόσο χωρίς, όσο και μετά από τη διάλυση του πυρήνα  $\text{CaCO}_3$  για διαφορετικές εφαρμογές. Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών προσθέτων και συνθετικών μεθοδολογιών στη μορφολογία των μικροσωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ , με στόχο να παραχθούν σφαιρικά σωματίδια βατερίτη με όσο γίνεται στενότερη κατανομή μεγεθών, καθώς τέτοια σωματίδια είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε πολλές εφαρμογές. Σε δεύτερο στάδιο ακολούθησε η επίστρωση των σωματιδίων με επιπλέον στρώματα πολυηλεκτρολυτών, ακολουθώντας τη μεθοδολογία layer-by-layer, όπου επιστρώνονται διαδοχικά πολυηλεκτρολύτες διαφορετικού φορτίου. Τα σωματίδια χαρακτηρίστηκαν με μετρήσεις ζ-δυναμικού, Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων (Scanning Electron Microscopy, SEM) και με Περίθλαση Ακτίνων Χ (X-ray Diffraction).

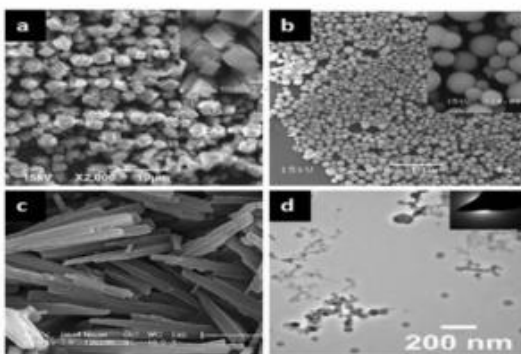
Τα σωματίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως πλατφόρμα για τη δημιουργία ενός βιοαισθητήρα με επικόλληση ενός ολιγοπεπτιδίου. Έμπνευση για την εργασία έδωσε ένα πρόσφατο άρθρο των Ramirez, et.al, οι οποίοι όμως χρησιμοποίησαν ως πλατφόρμα του βιοαισθητήρα τους νανοσωματίδια  $\text{SiO}_2$ <sup>{16}</sup>. Συντέθηκε το πεπτίδιο (Ac-C-bAla-bAla-AKRGARSTA), το οποίο στοχεύει τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη p32 που υπερεκφράζεται στη μεμβράνη των αγγειογενετικών ενδοθηλιακών κυττάρων και σε πολλά καρκινικά κύτταρα. Το πεπτίδιο συνδέθηκε με τα μικροσωματίδια  $\text{CaCO}_3$  μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ των ομάδων  $-\text{NH}_2$  του πεπτιδίου και  $-\text{COOH}$  στις επιφάνειες των μικροσωματιδίων. Το υλικό χαρακτηρίστηκε με Φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR) καθώς και με Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA). Η εργασία καινοτομεί, καθώς για πρώτη φορά γίνεται συνδυασμός κατάλληλα τροποποιημένων σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  με το πεπτίδιο αυτό και προκύπτουν υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χρωματογραφική ανίχνευση, σε αισθητήρες μάζας (QCM), αλλά τελικά και σε εφαρμογές ανίχνευσης μέσα σε βιολογικά υγρά σε αυτούσια μορφή ή με τη μορφή μικροκάψουλων.

Όσον αφορά το περιεχόμενο της παρούσας διατριβής, στα θεωρητικά κεφάλαια 2-5 γίνεται συζήτηση των πολυμόρφων του  $\text{CaCO}_3$  και των μεθόδων χαρακτηρισμού και σύνθεσής του. Στη συνέχεια στο κεφάλαιο 6 περιγράφονται οι κύριοι τύποι βιοαισθητήρων. Στο κεφάλαιο 7 περιγράφεται η δομή και η λειτουργία της πρωτεΐνης p32. Ακολουθεί η περιγραφή όλων των πειραματικών διαδικασιών στο Κεφάλαιο 8. Τα αποτελέσματα της εργασίας περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 9 και η διατριβή ολοκληρώνεται με τα Συμπεράσματα και τη Μελλοντική Εργασία.

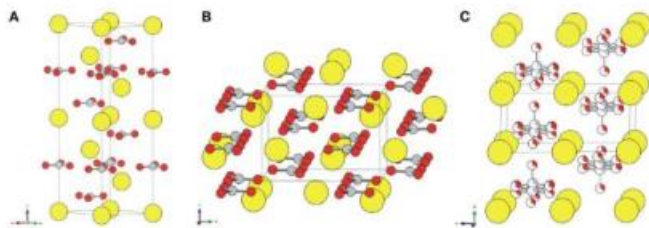
## Κεφάλαιο 2: Σωματίδια Ανθρακικού Ασβεστίου

### 2.1 Το CaCO<sub>3</sub> και τα πολύμορφα του

Το CaCO<sub>3</sub> είναι ένα ορυκτό που εμφανίζεται σε τρεις άνυδρες κρυσταλλικές μορφές (πολύμορφα) : αραγωνίτης, βατερίτης και ασβεστίτης. Το CaCO<sub>3</sub> μπορεί επίσης να εμφανιστεί ως άμορφο CaCO<sub>3</sub>, το οποίο είναι εξαιρετικά ασταθές και γρήγορα μετασχηματίζεται σε μετασταθείς ή σταθερές κρυσταλλικές μορφές. Ο ασβεστίτης είναι το πιο σταθερό θερμοδυναμικά πολύμορφο σε συνθήκες περιβάλλοντος. Κάθε άνυδρο πολύμορφο CaCO<sub>3</sub> έχει τη δική του τυπική μορφολογία. Οι κρύσταλλοι αραγωνίτη έχουν σχήμα βελόνας, ενώ αυτοί του βατερίτη και του ασβεστίτη έχουν σφαιρική και ρομβοεδρική μορφολογία, αντίστοιχα (**Σχήμα 2.1**). Ο αραγωνίτης είναι η μετασταθής μορφή με ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα και αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του μαργαριταριού που εκκρίνεται από τα μαλάκια και άλλα συγγενικά ασπόνδυλα {2,17-18}. Ο βατερίτης είναι επίσης μια μετασταθής φάση CaCO<sub>3</sub> με εξαγωνικό κρυσταλλικό σύστημα και παρουσιάζει καλύτερη διαλυτότητα στο νερό από τα άλλα πολύμορφα. Οι «γυμνοί» κρύσταλλοι βατερίτη είναι ασταθείς σε υδατικά διαλύματα και επανακρυσταλλώνονται σε ασβεστίτη μέσα σε μερικές ώρες ή ημέρες, αυτό ωστόσο μπορεί να αλλάξει με την παρουσία πρόσθετων ουσιών. Επομένως, όταν ο βατερίτης εκτίθεται σε νερό σε χαμηλή ή υψηλή θερμοκρασία (60 °C), μετατρέπεται στους σταθερότερους ασβεστίτη και αραγωνίτη, αντίστοιχα . Ο ασβεστίτης είναι το πιο κοινό πολύμορφο του CaCO<sub>3</sub>, το οποίο βρίσκεται παντού στο φλοιό της γης σε ιζηματογενείς και πυρογενείς βράχους<sup>{18}</sup>.



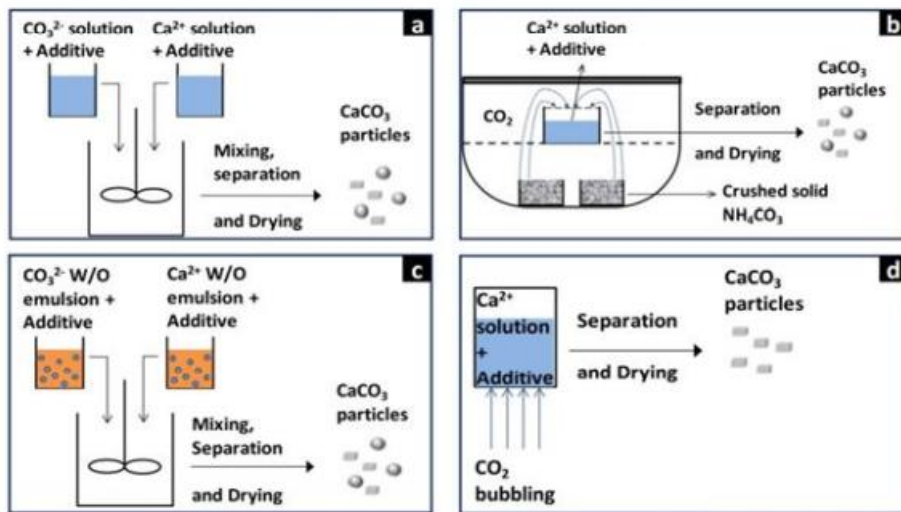
**Σχήμα 2.1:** Τυπικές μορφολογίες των διαφόρων πολυμόρφων CaCO<sub>3</sub>: a) ρομβοεδρικός ασβεστίτης, b) σφαιρικός βατερίτης, c) ραβδοειδής αραγωνίτης και d) άμορφο ανθρακικό ασβέστιο<sup>{17-18}</sup>.



**Σχήμα 2.2:** Κρυσταλλικές δομές (A) ασβεστίτη, (B) αραγωνίτη και (C) βατερίτη. Τα άτομα Ca εμφανίζονται ως μεγάλες κίτρινες σφαίρες και οι ανθρακικές ομάδες απεικονίζονται με γκριζες (άνθρακας) και κόκκινες (οξυγόνο) σφαίρες<sup>{19}</sup>.

## 2.2 Τα σωματίδια CaCO<sub>3</sub>

Τα σωματίδια ανθρακικού ασβεστίου (Calcium Carbonate Particles-CCPs) έχουν προσελκύσει την προσοχή των ερευνητών λόγω των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους και αποτελούν εξαιρετικά υπονήφια οχήματα για φόρτιση και ελεγχόμενη απελευθέρωση διαφόρων φαρμάκων<sup>{20-22}</sup>. Η χρήση ανθρακικού ασβεστίου ως πρόσθετο τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων έχει εγκριθεί από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA). Πρόσφατα, η επιτροπή του Ευρωπαϊκού Οργανισμού για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority-EFSA) αξιολόγησε εκ νέου τη χρήση τους λαμβάνοντας υπόψη τα πιο πρόσφατα διαθέσιμα τοξικολογικά δεδομένα και επιβεβαίωσε ότι δεν υπάρχουν τοξικολογικές ανησυχίες για τη χρήση του CaCO<sub>3</sub> ως πρόσθετο στα τρόφιμα<sup>{23}</sup>. Πολυάριθμα ερευνητικά άρθρα αναφέρουν τη χρήση CaCO<sub>3</sub>, κυρίως του πολύμορφου βατερίτη, για βιοϊατρικές εφαρμογές, π.χ. για ενθυλάκωση ενζύμων, ορμονών, DNA, αυξητικών παραγόντων και φαρμάκων<sup>{23-24}</sup>. Μικροσωματίδια CaCO<sub>3</sub> (Calcium Carbonate Microparticles-CCMPs) χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία ή πρόσθετα στην παρασκευή πλαστικών, ενώ τα CCNPs χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση σιλικονών, ουρεθανών, πολυπροπυλενίου, χλωριούχου πολυβινυλίου (PVC) κ.λ.π. Το CaCO<sub>3</sub> λειτουργεί επίσης ως βασικό υλικό για συγκολλητικές ύλες, τσιμέντο και στεγανωτικά<sup>{25}</sup>. Ανάλογα με την εφαρμογή, αναπτύσσονται διάφορες τεχνικές για τη σύνθεση μικρο- και νανοσωματιδίων CaCO<sub>3</sub>. Οι κύριες μέθοδοι ελεγχόμενης σύνθεσης σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> είναι η βιομιμητική σύνθεση και η μέθοδος σταδιακής προσθήκης CO<sub>2</sub>. Η βιομιμητική μέθοδος προσπαθεί να μιμηθεί την ικανότητα της φύσης για τον έλεγχο του μεγέθους, του σχήματος και της φάσης του CaCO<sub>3</sub> χρησιμοποιώντας οργανικές ενώσεις που δρουν ως εκμαγεία ή τροποποιητές μεγέθους. Η βιομιμητική σύνθεση χωρίζεται σε δύο προσεγγίσεις: (1) τη μέθοδο καταβύθισης και (2) τη μέθοδο του αντίστροφου γαλακτώματος. Η μέθοδος καταβύθισης υποδιαιρείται περαιτέρω στην αυθόρμητη αντίδραση καταβύθισης και την αντίδραση αργής ενανθράκωσης. Οι κύριες μέθοδοι σύνθεσης CaCO<sub>3</sub> φαίνονται στο **Σχήμα 2.3**.



**Σχήμα 2.3:** Κύριες μέθοδοι σύνθεσης  $\text{CaCO}_3$ : a) μέθοδος αυθόρμητης καταβύθισης, b) μέθοδος αργής ενανθράκωσης, c) μέθοδος αντίστροφων γαλακτωμάτων (W/O) και d) μέθοδος προσθήκης  $\text{CO}_2$ . Η βιομημική μέθοδος αντιπροσωπεύεται από τα a), b) και c) <sup>{2}</sup>.

### 2.3 Συσσωμάτωση Κολλοειδών

Ο ρυθμός συσσωμάτωσης κολλοειδών διασπορών αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητά τους, με ιδιαίτερη πρακτική σημασία, καθώς καθορίζει το χρόνο χρήσης των διασπορών. Ο λόγος σταθερότητας (stability ratio) κολλοειδούς διασποράς ορίζεται ως εξής:

$$W = \frac{\text{αριθμός συγκρούσεων μεταξύ σωματιδίων}}{\text{αριθμός συγκρούσεων που οδηγούν σε συσσωμάτωση}}$$

Για την αποφυγή συσσωμάτωσης απαιτείται φράγμα δυναμικού, επειδή μεταξύ των σωματιδίων υπάρχουν πάντα οι ελκτικές δυνάμεις διασποράς. Βραδεία συσσωμάτωση επιτυγχάνεται όταν υπάρχει σημαντικό φράγμα δυναμικού (ρυθμός  $R_s$ ).

$$R_s = R_f / W$$

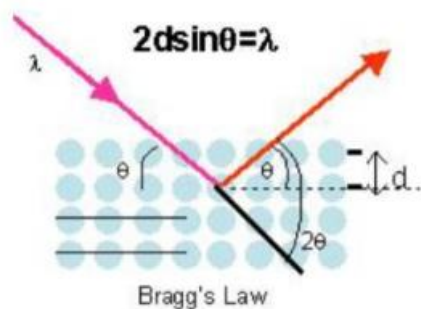
Η ελάττωση του φράγματος δυναμικού, συνήθως με προσθήκη ηλεκτρολύτη με αντισταθμιστικά ιόντα υψηλού σθένους, ή χρήση πολυμερών που δημιουργούν γέφυρες μεταξύ των σωματιδίων (bridging flocculation), ή ετεροσυσσωμάτωση (Hetero-coagulation) με διαφορετικού μεγέθους ή επιφανειακού δυναμικού σωματίδια και η συσσωμάτωση με ωσμωτικά φαινόμενα, π.χ. θρόμβωση εκκένωσης (depletion

flocculation), αποτελούν μερικούς από τους μηχανισμούς προώθησης συσσωμάτωσης. Αντίθετα, η αύξηση του φράγματος με ελάττωση της ιοντικής ισχύος (π.χ. με διαπίδυση – μέθοδος όχι πρακτική), η αύξηση του επιφανειακού ηλεκτρικού φορτίου με ρόφηση ιοντικών ειδών, η μείωση της έλξης Van der Waals με ελάττωση της σταθεράς Hamaker μέσω προσρόφησης επιφανειακού στρώματος οργανικών μορίων και η στερική παρεμπόδιση με χρήση προσροφημένων τασιενεργών, πολυμερών και άλλων σταθεροποιητών, παρεμποδίζουν σημαντικά τη συσσωμάτωση<sup>{26}</sup>.

## Κεφάλαιο 3: Βασικές τεχνικές φυσικού χαρακτηρισμού σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>

### 3.1. Μέθοδος Περίθλασης ακτίνων X ( X-ray diffraction -XRD)

Η ανάλυση δειγμάτων CaCO<sub>3</sub> με περιθλασομετρία ακτίνων-X από σκόνες (powder X-Ray Diffraction, PXRD) είναι μια κλασική μέθοδος ανάλυσης, που επιτρέπει τον προσδιορισμό των διαφορετικών πολυμόρφων που παράγονται σε μια διεργασία κρυστάλλωσης. Η μέθοδος στηρίζεται στην περίθλαση μονοχρωματικής ακτινοβολίας ακτίνων X γνωστού μήκους κύματος ( $\lambda$ ) πάνω στα πλεγματικά επίπεδα των εξεταζόμενων δειγμάτων και στην συνέχεια στον προσδιορισμό των εσωτερικών διαστημάτων  $d$  των επιπέδων του κρυσταλλικού πλέγματος.



**Σχήμα 3.1:** Απεικόνιση περίθλασης μονοχρωματικής ακτινοβολίας ακτίνων X<sup>{29}</sup>.

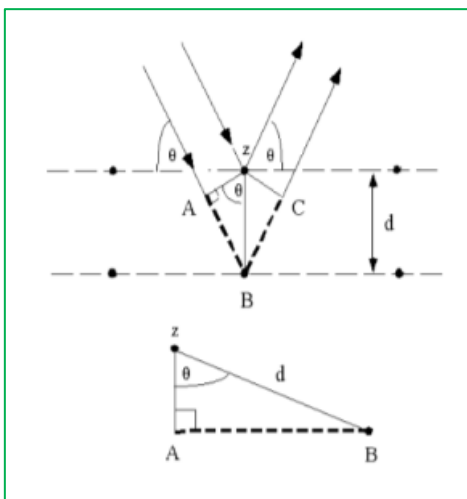
#### 3.1.1. Παραγωγή Ακτίνων X

Για την παραγωγή ακτίνων X, απαιτούνται τα εξής: i) μια πηγή ηλεκτρονίων, ii) ένας τρόπος επιτάχυνσης των ηλεκτρονίων και iii) ένας υλικός στόχος, ο οποίος θα παράγει τις ακτίνες X. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος παραγωγής ακτίνων X είναι εντός κενού, ανάμεσα σε μια άνοδο και μια κάθοδο, με ανάπτυξη τάσης ηλεκτρικού ρεύματος 35-50 kV. Η κάθοδος (filament cathode) είναι ένα μεταλλικό νήμα (συνήθως βολφραμίου), το οποίο όταν θερμανθεί απελευθερώνει ηλεκτρόνια, τα οποία επιταχύνονται εξαιτίας της διαφοράς τάσης και προσπίπτουν στην άνοδο (μέταλλο-στόχος, συνήθως υλικό με μεγάλο ατομικό αριθμό, όπως Mo, Cu, Co, Fe), η οποία με την σειρά της εκπέμπει ακτίνες X. Επειδή το μεγαλύτερο μέρος της κινητικής ενέργειας (98%) των ηλεκτρονίων μετατρέπεται σε θερμότητα, το μέταλλο-στόχος (άνοδος) πρέπει να ψύχεται. Το συνηθέστερο μέταλλο-στόχος (άνοδος) είναι ο Cu, καθώς μπορεί εύκολα να ψυχθεί, λόγω της υψηλής θερμικής του αγωγιμότητας. Πιο αναλυτικά, τα ηλεκτρόνια χάνουν σταδιακά την ενέργειά τους, λόγω επιβράδυνσης από τα άτομα του υλικού-στόχου (άνοδος). Η ενέργεια που αποδίδουν στα άτομα του στόχου είναι αρκετή για να διεγείρει και να αποσπάσει ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων

των ατόμων. Το κενό αυτό στην εσωτερική στοιβάδα του ατόμου καλύπτεται από ηλεκτρόνια εξωτερικών υψηλότερων ενεργειακά στοιβάδων. Η επιπρόσθετη ενέργεια, δηλαδή η ενεργειακή διαφορά των δυο στοιβάδων, ελευθερώνεται με την εκπομπή ακτίνων X . Οι ακτίνες X συνήθως φιλτράρονται έτσι ώστε να έχουν ένα μόνο μήκος κύματος (μονοχρωματική ακτινοβολία) και ευθυγραμμίζονται πριν φτάσουν στο υπό μελέτη υλικό<sup>{27-29}</sup> .

### 3.1.2. Νόμος του Bragg

Ο φυσικός Sir William Henry Bragg και ο γιος του Sir William Lawrence Bragg, διατύπωσαν τον νόμο Bragg που αποτελεί το θεμελιώδη νόμο, πάνω στον οποίο στηρίχθηκε η μέθοδος της περιθλασομετρίας ακτίνων X. Για την εργασία αυτή τους απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ το 1915. Ο Bragg παρατήρησε ότι ο συνδυασμός μήκους κύματος ( $\lambda$ ) και διεύθυνσης πρόσπτωσης των ακτίνων X οδηγεί σε έντονες κορυφές στην παρατηρούμενη σκεδαζόμενη ακτινοβολία. Κάθε κρυσταλλικό υλικό αποτελείται από παράλληλα πλεγματικά επίπεδα που ισαπέχουν μεταξύ τους κατά απόσταση  $d$ . Οι ακτίνες X ανακλώνται από τα πλεγματικά επίπεδα και συμβάλλουν ενισχυτικά για συγκεκριμένη γωνία πρόσπτωσης  $\theta$ . Η ενισχυτική συμβολή προκύπτει υπό την προϋπόθεση ότι η διαφορά οπτικής διαδρομής δυο ή περισσότερων ακτίνων X ανάμεσα σε δυο παράλληλα πλεγματικά επίπεδα είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος<sup>{27-29}</sup>(**Σχήμα 3.2**).



**Σχήμα 3.2:** Απεικόνιση των παραμέτρων του νόμου Bragg<sup>{29}</sup>.



$$n\lambda = 2 d \sin\theta \text{ (Νόμος του Bragg)}$$

όπου  $\lambda$  = το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

$n$  = ακέραιος αριθμός που αποδίδει την τάξη της ανάκλασης

$d$  = η απόσταση μεταξύ δυο παράλληλων διαδοχικών πλεγματικών επιπέδων του κρυσταλλικού πλέγματος

$\theta$  = η γωνία μεταξύ της προσπίπτουσας δέσμης και των πλεγματικών επιπέδων.

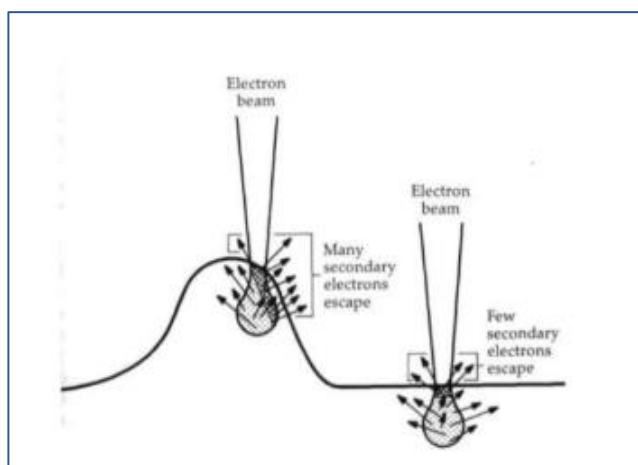
### 3.2 Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Η Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων (Scanning Electron Microscopy, SEM) αποτελεί μία σύγχρονη και ευέλικτη μέθοδο ανάλυσης, σχεδιασμένη για απευθείας παρατήρηση επιφανειών στερεών δειγμάτων. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, ή SEM (Scanning Electron Microscope), είναι ένα μικροσκόπιο που χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων για να σχηματίσει μια μεγεθυμένη εικόνα ενός στερεού. Επιτρέπει την απεικόνιση δειγμάτων σε μεγεθύνσεις που δεν μπορούν να επιτευχθούν χρησιμοποιώντας παραδοσιακά οπτικά μικροσκόπια (OM). Τα σύγχρονα οπτικά μικροσκόπια μπορούν να επιτύχουν μεγέθυνση ~1,000x, ενώ ένα SEM μπορεί να φτάσει σε μεγεθύνσεις άνω των 30,000x. Η τεχνική είναι κατάλληλη για μελέτη μορφολογίας και μικροδομής δειγμάτων. Η λειτουργία του οργάνου βασίζεται στην αλληλεπίδραση του δείγματος με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (στο οπτικό μικροσκόπιο το δείγμα αλληλεπιδρά με φωτόνια)<sup>{30-32}</sup>.

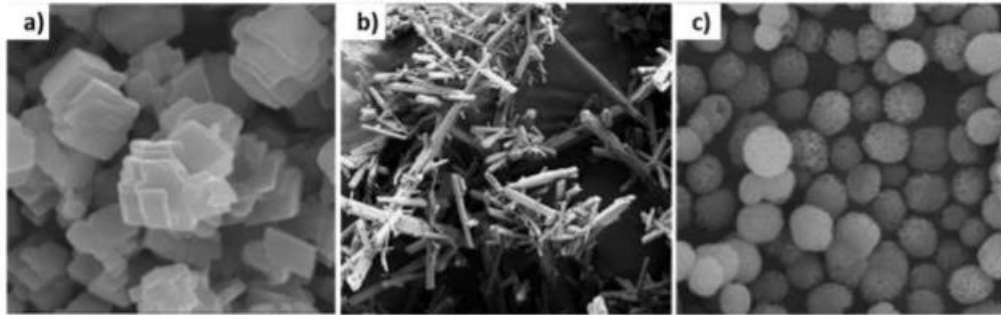
#### 3.2.1 Αρχή Λειτουργίας

Ηλεκτρόνια παράγονται από την θέρμανση ενός μεταλλικού νήματος (συνήθως από βολφράμιο, W) και επιταχύνονται υπό την επίδραση μιας διαφοράς δυναμικού. Η παραγόμενη με αυτόν τον τρόπο επιταχυνόμενη δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται πρώτα από διαφράγματα, τα οποία της προσδίδουν ομοιομορφία και στη συνέχεια από διάφορους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς, οι οποίοι είναι σε θέση να εστιάσουν την δέσμη στο δείγμα. Η διάμετρος της δέσμης μπορεί να ρυθμιστεί μέσω των ηλεκτρομαγνητικών φακών, σε μέγεθος μερικών νανομέτρων (5-20 nm). Το όλο σύστημα βρίσκεται σε θάλαμο υπερ-υψηλού κενού, προς αποφυγή αλληλεπίδρασης της δέσμης με μόρια αέρα, το οποίο επιτυγχάνεται με το συνδυασμό περιστροφικής αντλίας και αντλίας διαχύσεως ή τουρμπο-μοριακής. Η παραγόμενη δέσμη δεν εστιάζει σε συγκεκριμένη περιοχή του δείγματος, αλλά συνεχώς σαρώνει την επιφάνειά του με την βοήθεια κατάλληλων

μαγνητών. Η σάρωση της επιφάνειας του δείγματος είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό της εικόνας μέσω του φαινομένου της παραγωγής δευτερογενών ηλεκτρονίων. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, τα οποία βρίσκονται πολύ κοντά στην επιφάνεια του δείγματος, συλλέγονται από κατάλληλο ανιχνευτή και μετατρέπονται σε φωτόνια, τα οποία μετά από ενίσχυση προβάλλονται στην οθόνη. Η ασπρόμαυρη εικόνα που βλέπουμε είναι η αντίθεση που παράγεται από περιοχές με λιγότερα ή περισσότερα δευτερογενή ηλεκτρόνια. Μια περιοχή στην επιφάνεια του δείγματος η οποία παράγει περισσότερα δευτερογενή ηλεκτρόνια θα φαίνεται πιο φωτεινή σε σχέση με μια άλλη η οποία παράγει λιγότερα. Με τον τρόπο αυτό χαρτογραφείται η μορφολογία της επιφάνειας του στερεού και δημιουργείται η τρισδιάστατη εικόνα του. Το πόσα δευτερογενή ηλεκτρόνια παράγονται σε κάποιο σημείο εξαρτάται κυρίως από την μορφολογία και τη χημική σύσταση στο συγκεκριμένο σημείο. Για τα σωματίδια μιας ενιαίας ουσίας (ομοιομορφία στη χημική σύσταση), τα σημεία που είναι κάθετα ως προς την προσπίπτουσα δέσμη (επίπεδο μέρος της επιφάνειας) παράγουν λιγότερα δευτερογενή ηλεκτρόνια και φαίνονται λιγότερο φωτεινά. Αντίθετα, τα σημεία της επιφάνειας που διαθέτουν κλίση, φαίνονται πιο φωτεινά<sup>{30-32}</sup>.



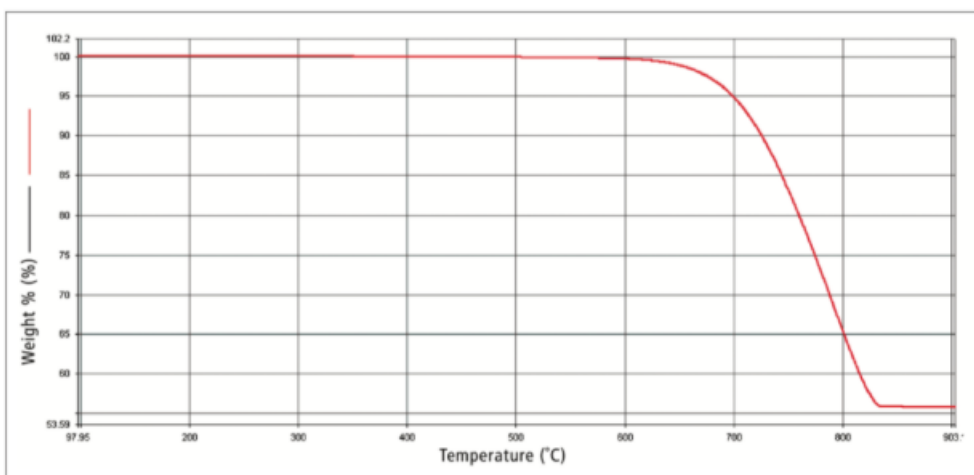
**Σχήμα 3.3:** Βασική αρχή απεικόνισης στο SEM. Οι ακμές παράγουν περισσότερα δευτερογενή ηλεκτρόνια σε αντίθεση με τις πιο επίπεδες περιοχές του δείγματος. Η διαφορά αυτή στον αριθμό των δευτερογενών ηλεκτρονίων «μεταφράζεται» σε ασπρόμαυρη αντίθεση στην εικόνα SEM.<sup>{32}</sup>



**Σχήμα 3.4:** Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) πολυμόρφων CaCO<sub>3</sub>: a) ρομβοεδρικός ασβεστίτης, b) ραβδοειδής αραγωνίτης και c) σφαιρικός βατερίτης<sup>{33}</sup>.

### 3.3 Θερμοβαρουμετρική Ανάλυση (TGA)

Η θερμοβαρουμετρική ανάλυση (TGA) είναι μια αναλυτική τεχνική κατά την οποία η μάζα ενός δείγματος μετράται με την πάροδο του χρόνου, καθώς αλλάζει η θερμοκρασία. Αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους ερευνητές ως μέσο ανάλυσης της θερμικής σταθερότητας ενός δείγματος, καθώς και της σύστασης/καθαρότητας ενός δείγματος.



**Σχήμα 3.5:** Θερμική καμπύλη TGA για CaCO<sub>3</sub><sup>{34}</sup>.

Πιο πάνω φαίνεται μια θερμική καμπύλη TGA άνυδρου ανθρακικού ασβεστίου. Με θέρμανση μετά τους 600 °C αρχίζει η θερμική αποσύνθεση του CaCO<sub>3</sub> σύμφωνα με τη αντίδραση CaCO<sub>3</sub> → CaO + CO<sub>2</sub>. Η στερεή φάση CaO παραμένει στο ζυγό ζύγισης δίνοντας έτσι μια τελική ένδειξη 56% της αρχικής μάζας, όταν όλο το δείγμα υποστεί την αντίδραση αποσύνθεσης (δηλαδή όταν η θερμοκρασία φτάσει περίπου τους 850 °C)<sup>{34}</sup>. Η TGA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να δώσει μια ένδειξη της ποσότητας οργανικών σταθεροποιητών στην επιφάνεια σωματιδίων ανθρακικού ασβεστίου.

### 3.4 Μέτρηση ζ δυναμικού

Εκτός από το μέγεθος των μικροσωματιδίων, το επιφανειακό φορτίο είναι επίσης σημαντική ιδιότητα που καθορίζει τη συμπεριφορά τους. Η εμφάνιση φορτίου επιφάνειας στα περισσότερα αιωρήματα σωματιδίων σε υδατική φάση οφείλεται στην ύπαρξη φορτισμένων ομάδων ή και στην προσρόφηση ιόντων από το μέσο διασποράς. Σε διαλύματα αλάτων, τα σωματίδια μπορούν να προσροφήσουν μία στοιβάδα ιόντων, η οποία αποτελείται από μη ενυδατωμένα ιόντα, συνήθως ανιόντα. Η στοιβάδα αυτή ονομάζεται στοιβάδα Nernst και δημιουργεί τη διαφορά δυναμικού μεταξύ της επιφάνειας των σωματιδίων και της ουδέτερης περιοχής του διαλύματος (Nernst potential). Τα ανιόντα στην επιφάνεια των σωματιδίων έλκουν τα κατιόντα του διαλύματος δημιουργώντας το ζ-δυναμικό, που αποτελεί τη διαφορά δυναμικού ανάμεσα στη σταθερά δεσμευμένη στοιβάδα ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων και την ηλεκτροουδέτερη περιοχή του διαλύματος. Κατά την κίνηση των σωματιδίων το δυναμικό μηδενίζεται στη διάχυτη στοιβάδα. Αποδεικνύεται ότι κατά την κίνηση σωματιδίων σε ηλεκτρικό πεδίο, η ταχύτητα κίνησης που μπορεί να μετρηθεί είναι ανάλογη με το ζ-δυναμικό των σωματιδίων.

$$\zeta = U^* \eta / \epsilon^* \epsilon_0$$

Όπου

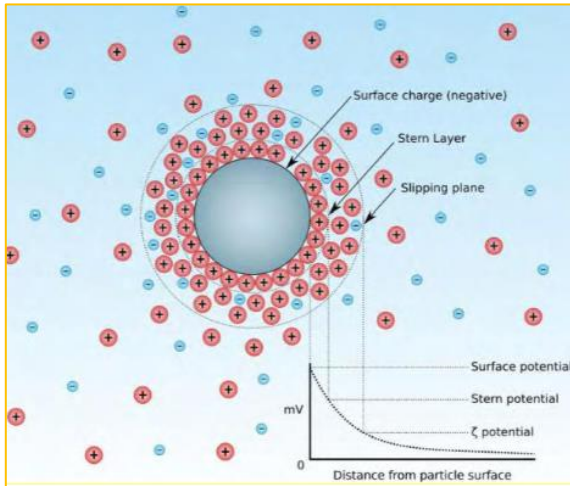
ζ: το ζ-δυναμικό

η: το ιξώδες του διαλύματος, μέσα στο οποίο κινούνται τα σωματίδια

ε: διηλεκτρική σταθερά

U: ηλεκτροφορητική κινητικότητα, η οποία ορίζεται ως ο λόγος της ταχύτητας S και του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου E,  $U = S/E$ .

Το ζ-δυναμικό αποτελεί βασικό δείκτη της σταθερότητας των κολλοειδών. Μεγάλη τιμή, θετική ή αρνητική, δηλώνει σωματίδια πολύ σταθερά, λόγω ισχυρών ηλεκτροστατικών απώσεων. Αντίθετα, όταν το ζ-δυναμικό είναι μικρό οι ελκτικές δυνάμεις διασποράς υπερβαίνουν τις απωστικές και μπορεί να δημιουργηθούν συσσωματώματα στο διάλυμα <sup>{35-37}</sup>.



**Σχήμα 3.6:** Διάγραμμα της συγκέντρωσης ιόντων (στην επιφάνεια και το διάλυμα) και της διαφοράς δυναμικού μέσα στο μέσο διασποράς ως συνάρτηση της απόστασης από τη φορτισμένη επιφάνεια ενός κολλοειδούς σωματιδίου <sup>{37}</sup>.

## Κεφάλαιο 4 :Μέθοδοι Σύνθεσης CaCO<sub>3</sub>

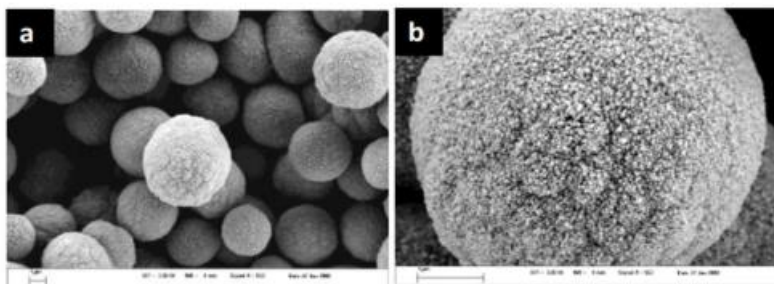
### 4.1 Βιομηχανική Μέθοδος

#### 4.1.1 Μέθοδος Καταβύθισης

Η μέθοδος καταβύθισης θεωρείται μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τη σύνθεση μικρο- και νανο σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> και περιλαμβάνει την αργή ενανθράκωση και την αυθόρμητη αντίδραση καθίζησης. Η μέθοδος ενανθράκωσης περιλαμβάνει την παραγωγή ιόντων CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> κατά τη διάλυση του CO<sub>2</sub> στο νερό ή την αργή υδρόλυση ενώσεων, όπως το ανθρακικό αμμώνιο ή το ανθρακικό διμεθύλιο υπό αλκαλικές συνθήκες<sup>{38}</sup>. Η μέθοδος καθίζησης είναι μία από τις προσεγγίσεις που έχουν μελετηθεί για τη σύνθεση «γυμνών» μικροσωματιδίων CaCO<sub>3</sub> (CCMPs).

##### 4.1.1.1 Αυθόρμητη αντίδραση καταβύθισης

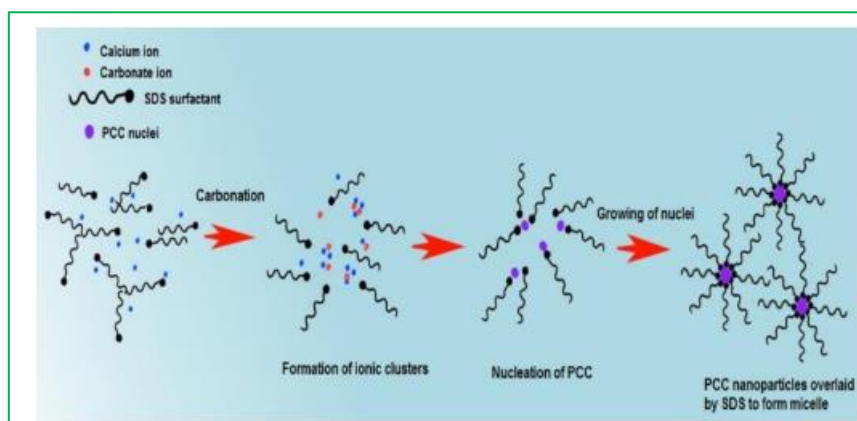
Η αυθόρμητη αντίδραση καταβύθισης είναι ο κύριος και ευκολότερος τρόπος για την παρασκευή σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> καθώς βασικά περιλαμβάνει την ανάμειξη διαλυμάτων ανθρακικού νατρίου (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) και χλωριούχου ασβεστίου (CaCl<sub>2</sub>) που περιέχουν πρόσθετα (**Σχήμα 4.1**), ώστε να προκύψει υπέρκορο διάλυμα CaCO<sub>3</sub>. Σε μια τυπική σύνθεση, χωρίς τη χρήση προσθέτων παράγονται πολύ πορώδη, ομοιογενή σφαιρικά μικροσωματίδια ασβεστίτη (αντί για τυπικούς ρομβοεδρικούς κρυστάλλους) από την γρήγορη ανάμιξη των διαλυμάτων . Η έντονη ανάδευση π.χ. διαλυμάτων 0,33 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 0,33 M CaCl<sub>2</sub> για 30 δευτερόλεπτα οδήγησε σε μικροσφαιρίδια με μέση διάμετρο που κυμαίνεται από 4 -6 μm . Η διάμετρος των σωματιδίων θα μπορούσε να αυξηθεί στα 15-20 μm με την αύξηση του χρόνου αντίδρασης . Η μορφολογία και το πορώδες των μικροσφαιρών που παράγονται μέσω της ταχείας ανάμειξης χωρίς πρόσθετα φαίνονται στο **Σχήμα 4.1**<sup>{5,39}</sup> .



**Σχήμα 4.1:** α) SEM μικροσφαιρών που συντίθενται χωρίς πρόσθετα, β) SEM μιας μικροσφαίρας που δείχνει την πορώδη φύση του σωματιδίου<sup>{39}</sup> .

## 1.Επίδραση Προσθέτων

Πολλά άρθρα έχουν αναφέρει την επίδραση των προσθέτων στις ιδιότητες των κρυστάλλων  $\text{CaCO}_3$ . Ωστόσο, η χρήση προσθέτων είναι κυρίως εμπειρική, λόγω των πολλαπλών ρόλων τους, που μπορεί να είναι δύσκολο να καθοριστούν. Επιπλέον, η επίδραση των προσθέτων στις ιδιότητες των κρυστάλλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πρόσθετου και άλλες πειραματικές συνθήκες <sup>{40}</sup>. Τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση  $\text{CaCO}_3$  περιλαμβάνουν τασιενεργά, συνθετικά πολυμερή, βιομόρια, βιοπολυμερή και ανόργανες ενώσεις. Αυτές οι ενώσεις επηρεάζουν τη διαδικασία της κρυστάλλωσης (σχηματισμός, προπυρήνωση, πυρήνωση και ανάπτυξη), καθώς και την κινητική της ανακρυστάλλωσης προάγοντας το σχηματισμό ενός πολυμόρφου έναντι ενός άλλου. Επιπλέον, η χρήση προσθέτων μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό κρυστάλλων με διαφορετικά μεγέθη και σχήματα <sup>{40-43}</sup>. Τα συνθετικά πολυμερή στη σωστή συγκέντρωση συνήθως προκαλούν το σχηματισμό σφαιρών βατερίτη με ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους. Το πολυακρυλικό οξύ (PAA) και το σουλφονικό πολυστυρένιο (PSS) αναφέρονται ως τα πιο αποτελεσματικά πολυμερή στο σχηματισμό βατερίτη με σφαιρικό σχήμα <sup>{5}</sup>. Βιοπολυμερή και βιομόρια, όπως το διαλυτό άμυλο, η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) και η ντοπαμίνη είναι επίσης γνωστό ότι προάγουν τον σχηματισμό και/ή τη σταθεροποίηση του βατερίτη με προσρόφηση στην επιφάνεια των κρυστάλλων, επιβραδύνοντας τη διάλυση και την ανακρυστάλλωση προς ασβεστίτη <sup>{42,43}</sup>.



**Σχήμα 4.2:** Σχηματικό διάγραμμα σταθεροποίησης νανοσωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  παρουσία ανιοντικού επιφανειοδραστικού SDS <sup>{44}</sup>.

**Πίνακας 4.1:** Επίδραση προσθέτων στον πολυμορφισμό των σωματιδίωνCaCO<sub>3</sub>. C=calcite (ασβεστίτη), V=vaterite (βατερίτης).

Πρόσθετα	Είδος πρόσθετου	Παράμετροι	Πολύμορφο	Μέγεθος (μm)	Βιβλιογραφία
Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)	Επιφανειοδραστικό	5mM 10 h pH=7 T=26°C	C	3-4	45
Glycine	Αμινοξύ	5 min pH=10 T=25°C	V	3.6-4.6	46
dodecyltrimethylamoniium bromide (DDTAB)	Τασιενεργό	2h pH=7 T=22°C	V	5	47
poly (sodium 4-styrene-sulfonate) (PSSS)	Πολυμερές	1g/L 12 h pH=10 T=25°C	V	1-2	48
Dopamine	Βιολογικό Πολυμερές	2 mg/ml 64 h pH=8.5 T=25°C	V	5	49

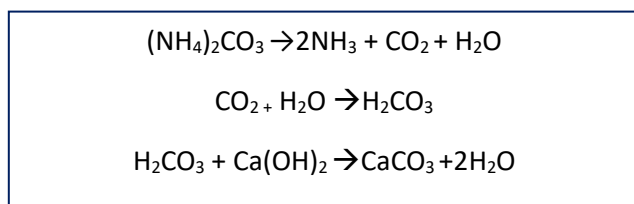


Polyacrylic acid (PAA)	Πολυμερές	2h pH=8.5 T= 30°C	V	1-2	50
L-asp L-lys	Αμινοξέα	30 min T=25°C	V	0.5-1	51
Tannic acid	Βιομόριο	24 h pH=7	-	3-5	52
Ammonium citrate		0.3 mol/l T=10°C	C	0.4-0.6	53
Sodium dodecyl benzenes ulfonate (SDBS)	τασιενεργό	5Mm 10 h pH=7	V	2-3	54

		T=26°C			
DNA	Βιομόριο	1g/l 24h pH=10.5 T=25°C	C	14	55
Didodecyldimethylammonium bromide(DDAB).	Επιφανιοδραστικό	10mmol/L 48 h T=25°C	V	400 nm	56
1-Dodecyl-3-methylimidazolium bromide	Επιφανιοδραστικό	30mmol/L 48h T=25°C	C	400 nm	57
Poly(ethylene glycol)-block-poly(methacrylic acid) (PEG-b-PMAA)	Πολυμερές	0.2 g/L 24 h pH=10 T=22°C	C	6	58
Poly(styrene-block-acrylic acid-block ethylene glycol (PS-b-PAA-b-PEG)	Πολυμερές	0.5 g/L 24h pH=10 T=25°C	C	0.03	59
Poly(styrenesulfonate )(PSS)	Πολυμερές	50g/L 15min T=25°C	V	500 nm	60

#### 4.1.1.2 Αντίδραση Ενανθράκωσης (slow carbonation)

Η αργή αντίδραση ενανθράκωσης είναι μια συνθετική μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί σε περιορισμένο βαθμό στην παρασκευή  $\text{CaCO}_3$ . Αποτελείται από την παραγωγή ανθρακικών ιόντων μέσω της διάλυσης του  $\text{CO}_2$  που προκύπτει από την αργή υδρόλυση του διμεθυλικού ανθρακικού άλατος, του ανθρακικού αμμωνίου ή άλλων ενώσεων σε αλκαλικές συνθήκες<sup>{61-63}</sup>.



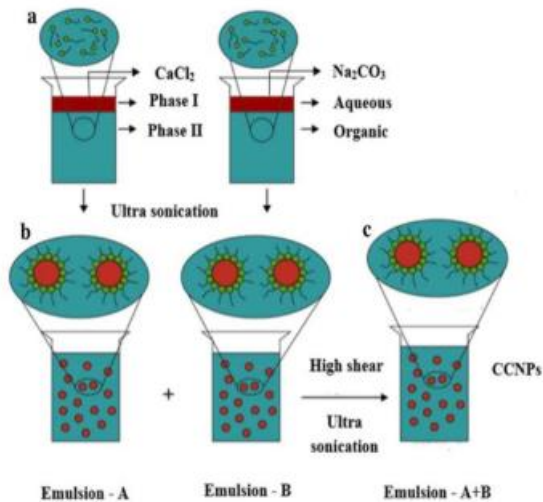
**Πίνακας 4.2:** Επίδραση προσθέτων στον πολυμορφισμό και το μέγεθος των σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  μέσω αντίδρασης ενανθράκωσης, C=calcite(ασβεστίτης), V=vaterite(βατερίτης), ACC=άμορφο  $\text{CaCO}_3$ .

Πρόσθετο	Πηγή $\text{CO}_2$	Συνθήκες	Πολύμορφο	Μέγεθος(μm)	Βιβλιογραφία
p-Aminobenzene sulfonic acid + L-Ly	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	1.1 g /L pH=9 48h T=25°C	V	18	64

Polyacrylic acid(PAA)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 ppm T=23°C pH=9 4h	ACC	1	65
Poly(styrene-alt-maleic acid)(PSMA)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.1g/L T=22°C	C	15	66

#### 4.2 Μέθοδος γαλακτωμάτων

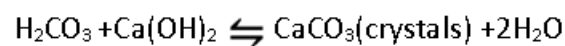
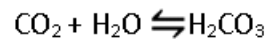
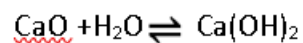
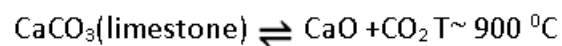
Η μέθοδος των γαλακτωμάτων είναι ένας τύπος αντίδρασης ελεγχόμενης καταβύθισης που χρησιμοποιείται συχνά για τη σύνθεση σωματιδίων μικρο- και νανομέτρων. Η μέθοδος μικρογαλακτωμάτων έχει πρωτοαναφερθεί από τους T.P Hoar και J.H. Shulman το 1943. Τα μικρογαλακτώματα είναι μείγματα που αποτελούνται από λάδι, νερό, επιφανειοδραστικές ουσίες και συν-επιφανειοδραστικές ουσίες, συνήθως μέσου μήκους αλκοόλες π.χ. πεντανόλη ή εξανόλη. Ολόκληρο το σύστημα σταθεροποιείται από επιφανειοδραστικές ουσίες, που σταθεροποιούν διαφορετικούς τύπους μικροδομών παρόμοιων με τα μικύλλια με ισχυρή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση. Τα νανομικρογαλακτώματα μπορούν να είναι πολλών διαφορετικών τύπων, O/W, λάδι σε νερό, όπου το νερό είναι σε περίσσεια), W/O (νερό σε λάδι όπου το λάδι είναι σε περίσσεια), και O/W/O (γνωστό και ως διπλό γαλάκτωμα, όπου υπάρχει λάδι διασκορπισμένο σε νερό, το οποίο πάλι διασκορπίζεται σε λάδι)<sup>{67}</sup>. Τα μικρο- και νανοσωματίδια CaCO<sub>3</sub> συντίθενται κυρίως με τη μέθοδο του αντίστροφου γαλακτώματος (W/O), δηλαδή γαλάκτωμα νερό σε λάδι. Αυτό το μικρογαλάκτωμα αναφέρεται ως μικρο/νανοαντιδραστήρας. Σε αυτή τη μέθοδο τα αντιδρώντα (Ca<sup>2+</sup> και CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ιόντα) είναι εγκλεισμένα σε σταγονίδια νερού που σχηματίζονται από τα τασιενεργά και διαχωρίζονται από την οργανική φάση. Όταν τα μικρογαλακτώματα αναμιγνύονται, τα σταγονίδια συγκρούονται και προκύπτει η ανάμειξη των αντιδρώντων. Αυτή η ελεγχόμενη ανάμειξη των αντιδρώντων οδηγεί στη σύνθεση μικρο- και νανοσωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με ελεγχόμενα σχήματα, μεγέθη και μορφολογία <sup>{68}</sup>.



**Σχήμα 4.3:** Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης CCNPs. Παρασκευή δύο μικρογαλακτωμάτων που περιέχουν ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{CO}_3^{2-}$  {69}.

### 4.3 Μέθοδος προσθήκης $\text{CO}_2$

Η μέθοδος προσθήκης  $\text{CO}_2$  είναι η πιο χρησιμοποιούμενη βιομηχανική διαδικασία για την παραγωγή σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ . Περιλαμβάνει τη χρήση ασβεστόλιθου (πετρώματα  $\text{CaCO}_3$ ), που είναι άφθονη φυσική πρώτη ύλη για την παράγωγή  $\text{Ca(OH)}_2$ . Στο παραγόμενο  $\text{Ca(OH)}_2$  διοχετεύεται  $\text{CO}_2$  για να παραχθούν τα σωματίδια. Πρόκειται για μια ενδιαφέρουσα μέθοδο, στην οποία χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη η ίδια η ουσία που τελικά θα παραχθεί με τη μορφή νανο- ή μικροσωματιδίων. Η όλη διεργασία περιγράφεται από τις ακόλουθες αντιδράσεις:



Μια εναλλακτική μέθοδος είναι η άμεση προσθήκη CO<sub>2</sub> σε υδατικό διάλυμα CaCl<sub>2</sub>. Οι κρύσταλλοι που παράγονται είναι στη μορφή του ρομβοεδρικού και κυβικού ασβεστίτη. Παράγεται ασβεστίτης ανεξάρτητα από υψηλή πίεση, εναλλαγές στη θερμοκρασία, ή προσθήκη πολυμερών και επιφανειοδραστικών ουσιών<sup>{70}</sup>.

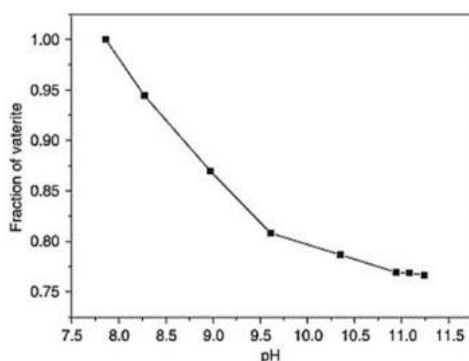
Με τη μέθοδο αυτή το κύριο πολύμορφο που σχηματίζεται είναι ο ασβεστίτης. Μπορούν να παραχθούν διάφορες μορφολογίες, κυρίως κυβική και η ρομβοεδρική και τα σωματίδια είναι κυρίως σε μέγεθος nm. Η συσσώματωση των σωματιδίων είναι συνηθισμένη, εκτός αν χρησιμοποιούνται πρόσθετα. Η θερμοκρασία σύνθεσης πρέπει να είναι σχετικά χαμηλή για να υπάρχει υψηλή διαλυτότητα του αερίου CO<sub>2</sub> στα υδατικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται.

## Κεφάλαιο 5: Συνθήκες σύνθεσης που επηρεάζουν τους κρυστάλλους CaCO<sub>3</sub>

Διάφορες πειραματικές συνθήκες, όπως η παρουσία προσθέτων, ο τύπος του διαλύτη, το pH, ο ρυθμός και ο τρόπος ανάμειξης των συστατικών, η θερμοκρασία και οι συγκεντρώσεις των πρόδρομων ουσιών, ο λόγος [Ca<sup>2+</sup>]:[CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>] επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες των παραγόμενων σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>. Στις παρακάτω ενότητες θα συζητηθεί η επίδραση αυτών των μεταβλητών.

### 5.1 Επίδραση του pH

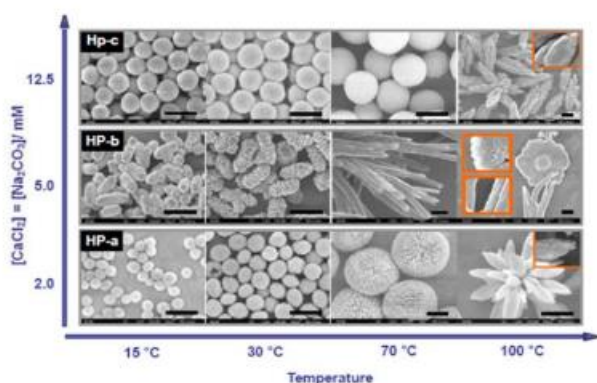
Το pH του διαλύματος μπορεί να επηρεάσει δραστικά τη μορφολογία και το μέγεθος των σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> που σχηματίζονται και σε μικρότερο βαθμό τον πολυμορφισμό. Η κύρια επίδραση του pH είναι στη διαθεσιμότητα ανθρακικών ιόντων. Σε pH ≤ 8, τα ανθρακικά ιόντα πρωτονιώνονται κυρίως σε διττανθρακικά, μειώνοντας τη συγκέντρωση CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, και κατά συνέπεια δημιουργείται παρεμβολή στην καθίζηση του CaCO<sub>3</sub>. Επομένως, τιμές pH πάνω από 8 είναι απαραίτητες για τη σύνθεση των σωματιδίων. Ωστόσο, πολύ υψηλές τιμές pH εντός του βασικού εύρους pH δημιουργούν υψηλούς ρυθμούς πυρήνωσης, προάγοντας έτσι τη μη ελεγχόμενη κρυσταλλική ανάπτυξη και το σχηματισμό μεγάλων και ακανόνιστων κρυστάλλων<sup>{104}</sup>. Η τιμή του pH επηρεάζει και την επίδραση ορισμένων προσθέτων, κυρίως όταν διαθέτουν ιονιζόμενες ομάδες, όπως π.χ. η καρβοξυλική ομάδα, η οποία ιονίζεται σε βασικό pH και παρέχει θέσεις αλληλεπίδρασης με τα ιόντα Ca<sup>2+</sup> ελέγχοντας με αυτό το τρόπο το σχηματισμό των κρυστάλλων, με αποτέλεσμα τα σωματίδια να έχουν ομοιόμορφο μέγεθος. Όσο περισσότερο ιονίζονται οι καρβοξυλικές ομάδες, τόσο περισσότερες είναι οι θέσεις που διατίθενται για σύνδεση των ιόντων Ca<sup>2+</sup> και επομένως εμποδίζεται η ανάπτυξη των κρυστάλλων σε όλες τις κατευθύνσεις. Το pH του διαλύματος επηρεάζει τόσο τον βαθμό πρωτονίωσης των καρβοξυλικών ομάδων, όσο και τον υπερκορεσμό του CaCO<sub>3</sub> στο διάλυμα. Ο βαθμός ιονισμού των καρβοξυλικών ομάδων αυξάνεται με την αύξηση του pH αλλά το ίδιο και ο υπερκορεσμός. Με αυτά τα δεδομένα απαιτείται ρύθμιση στο pH, έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η πρωτονίωση των καρβοξυλικών ομάδων, ενώ ταυτόχρονα να μειωθεί ο ρυθμός πυρήνωσης των κρυστάλλων λόγω του υπερκορεσμού του διαλύματος. Από τον Πίνακα 5 φαίνεται ότι το καλύτερο εύρος pH για ελεγχόμενη ανάπτυξη κρυστάλλων CaCO<sub>3</sub> είναι στην περιοχή 9-11<sup>{71-73}</sup>.



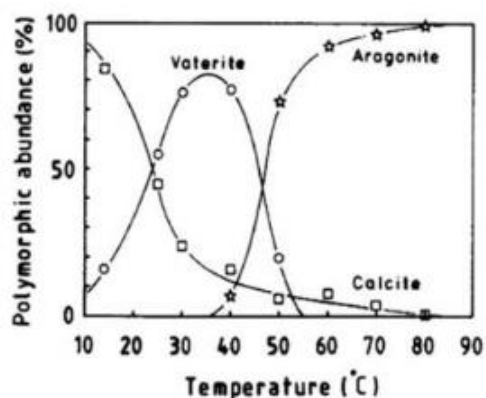
**Σχήμα 5.1:** Κλάσμα βατερίτη σε διαφορετικές τιμές pH. Σύνθεση με βάση τη προσθήκη αέριου μείγματος CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> σε διάλυμα CaCl<sub>2</sub> στους 20 °C<sup>{74}</sup>.

## 5.2 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία της αντίδρασης επηρεάζει τη μορφολογία, τον πολυμορφισμό και το μέγεθος των σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ . Πολλοί ερευνητές επαλήθευσαν ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες ( $\leq 20^\circ\text{C}$ ) το κύριο πολύμορφο που σχηματίζεται είναι ο ασβεστίτης, ενώ μεταξύ 30 και 40  $^\circ\text{C}$  παράγεται βατερίτης σε υψηλότερη περιεκτικότητα και σε θερμοκρασίες γύρω στους 70  $^\circ\text{C}$  το κυρίαρχο πολύμορφο είναι ο αραγωνίτης. Ωστόσο, σχηματισμός βατερίτη παρατηρήθηκε επίσης στους 60  $^\circ\text{C}$ . Η αρχική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων μπορεί να ρυθμίσει την επίδραση της θερμοκρασίας στον τύπο του σχηματιζόμενου πολυμόρφου, όπως είχε αναφερθεί<sup>{75}</sup> (Σχήμα 5.2). Είναι ενδιαφέρον ότι η θερμοκρασία κατά τη σύνθεση του πολυμορφικού βατερίτη επηρεάζει τη μεσοπορώδη εσωτερική δομή του. Οι Feoktistova et al. <sup>{76}</sup>επαλήθευσαν ότι οι κρύσταλλοι βατερίτη που συντέθηκαν χωρίς πρόσθετα σε υψηλές θερμοκρασίες (45  $^\circ\text{C}$ ) παρουσιάζουν μεγαλύτερο μέγεθος πόρων, μια ιδιότητα που μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για πολλές εφαρμογές.



Σχήμα 5.2: Επίδραση της θερμοκρασίας στη σύνθεση  $\text{CaCO}_3$  με το άμυλο ως πρόσθετο και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιδρώντων<sup>{77}</sup>.

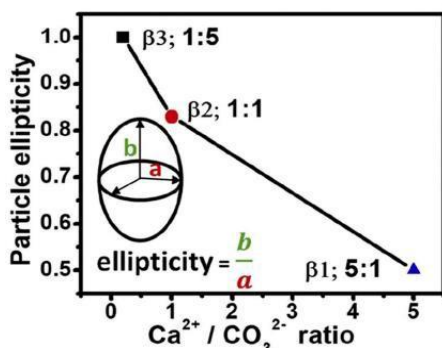


Σχήμα 5.3: Αφθονία (%) κρυσταλλικών πολυμόρφων ανθρακικών αλάτων στα πρώιμα στάδια καταβύθισης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας<sup>{78}</sup>.



### 5.3 Επίδραση του λόγου $[Ca^{2+}] : [CO_3^{2-}]$

Η αναλογία  $[Ca^{2+}] : [CO_3^{2-}]$  είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη σύνθεση των σωματιδίων  $CaCO_3$ . Η συγκέντρωση των πρόδρομων αλάτων και η αναλογία  $[Ca^{2+}] : [CO_3^{2-}]$  επηρεάζει τη διάρκεια σύνθεσης, τον τύπο και το μέγεθος του πολυμόρφου που σχηματίζεται. Η κρυστάλλωση αρχίζει ακριβώς όταν επιτευχθεί ο υπερκορεσμός στο διάλυμα. Ο υψηλός υπερκορεσμός έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερες αναλογίες πυρήνων και χαμηλότερους χρόνους επώασης<sup>{119}</sup>. Σύμφωνα με τον «κανόνα βημάτων του Ostwald» σε χαμηλό υπερκορεσμό μπορεί κατά προτίμηση να σχηματιστεί το σταθερό πολύμορφο (ασβεστίτης), ενώ σε υψηλό υπερκορεσμό τείνουν να σχηματιστούν τα μετασταθή πολύμορφα (βατερίτης και αραγωνίτης)<sup>{120-121}</sup>. Ο Kitamura<sup>{79}</sup> επαλήθευσε αυτή την τάση κατά τη σύνθεση  $CaCO_3$  με την ανάμειξη διαλυμάτων  $CaCl_2$  και  $Na_2CO_3$  σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στους 25 °C. Έδειξε ότι ο βατερίτης τείνει να σχηματιστεί σε υψηλό υπερκορεσμό (200 mM), ενώ ο ασβεστίτης σχηματίζεται κυρίως σε χαμηλότερη συγκέντρωση (50 mM). Η ίδια τάση επαληθεύτηκε από τους Ogino et al<sup>{78}</sup>, οι οποίοι ανέφεραν ότι η σχετική αφθονία του βατερίτη αυξήθηκε αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις ασβεστίου και ανθρακικών ιόντων στους 25 °C. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι όταν ο υπερκορεσμός του  $CaCO_3$  είναι χαμηλότερος από 1, σχηματίζονται μόνο κρύσταλλοι βατερίτη που παρουσιάζουν περίεργη, επίπεδη εξαγωνική μορφολογία<sup>{78}</sup>. Επιπλέον, η σύνθεση αυτών των κρυστάλλων βατερίτη έχει μεγαλύτερο χρόνο επώασης (χρόνος που απαιτείται για την ανίχνευση των πρώτων σωματιδίων), λόγω των χαμηλών αρχικών συγκεντρώσεων των διαλυμάτων αλάτων:  $[Ca^{2+}] = [CO_3^{2-}] < 1,8 \text{ mM}$ . Ο βαθμός υπερκορεσμού επηρεάζει επίσης το μέγεθος των κρυστάλλων  $CaCO_3$ . Ο υψηλότερος υπερκορεσμός προάγει το σχηματισμό μικρότερων κρυστάλλων λόγω υψηλότερου ρυθμού πυρήνωσης στην ίδια συνολική μάζα του ιζήματος<sup>{81-88}</sup>.



**Σχήμα 5.4:** Εξάρτηση της ελλειπτικότητας των σωματιδίων από την αναλογία  $[Ca^{2+}] / [CO_3^{2-}]$ <sup>{84}</sup>.

Τέλος, η αναλογία του πρόδρομου άλατος επηρεάζει κυρίως το μέγεθος και το σχήμα των κρυστάλλων. Ωστόσο, σε πολύ υψηλή τιμή pH μπορεί επίσης να επηρεάσει και τον τύπο του σχηματιζόμενου πολύμορφου. Έχει αποδειχθεί ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις  $\text{CO}_3^{2-}$ , σε σύγκριση με  $\text{Ca}^{2+}$ , έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κρυστάλλων με περισσότερο ελλειψοειδείς μορφολογίες (**Σχήμα 5.4**), ενώ χαμηλότερες συγκεντρώσεις προάγουν το σχηματισμό ισοτροπικών σφαιρικών σωματιδίων <sup>{83-84}</sup>.

#### 5.4 Επίδραση διαλύτη

Το νερό είναι ο πιο χρησιμοποιούμενος και καλά μελετημένος διαλύτης για τη σύνθεση  $\text{CaCO}_3$ . Ωστόσο, μείγματα νερού με άλλους διαλύτες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό κρυστάλλων  $\text{CaCO}_3$ . Μερικοί από αυτούς τους διαλύτες είναι η αιθανόλη, η προπανάλη, η μεθανόλη, η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), η γλυκερίνη, το N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο και η αιθυλενογλυκόλη (EG) <sup>{85-86}</sup>. Οι διαλύτες αυτοί μειώνουν την διαλυτότητα του  $\text{CaCO}_3$ , με αποτέλεσμα υψηλότερες αναλογίες υπερκορεσμού και σχηματισμό μικρότερων σωματιδίων. Μερικοί από αυτούς τους διαλύτες όπως η PEG, η γλυκερίνη και η EG αυξάνουν επίσης τη πυκνότητα του μέσου αντίδρασης μειώνοντας τη μοριακή διάχυση, τον ρυθμό ανάπτυξης των κρυστάλλων και την πιθανότητα πυρήνωσης <sup>{87}</sup>. Επιπλέον, η χαμηλή ή καθόλου περιεκτικότητα σε νερό έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  που σχηματίστηκαν στα αρχικά στάδια της σύνθεσης <sup>{88-89}</sup>. Οι διαλύτες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τον τύπο του σχηματιζόμενου πολυμόρφου. Οι Sand et al. έδειξαν ότι ο συνδυασμός νερού (50%) με αιθανόλη (50%) προάγει τον σχηματισμό αραγωνίτη στους 24 °C, ενώ αυτό το πολύμορφο συνήθως εμφανίζεται σε υψηλές θερμοκρασίες σε υδατικά διαλύματα <sup>{90}</sup>.

## Κεφάλαιο 6:Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές διατάξεις οι οποίες αξιοποιούν είτε ένα βιολογικό υλικό είτε ένα υλικό ‘βιομιμητή’ ως μόριο αναγνώρισης, το οποίο είτε συνδέεται είτε ενσωματώνεται σε ένα φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος. Ο συνήθης στόχος είναι η παραγωγή ενός ψηφιακού ηλεκτρονικού σήματος, το οποίο είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του συγκεκριμένου προς ανάλυση στοιχείου<sup>{91}</sup>.

Το σήμα μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταβολής της συγκέντρωσης πρωτονίων, της πρόσληψης ή απελευθέρωσης αερίων, όπως το οξυγόνο και η αμμωνία, της εκπομπής φωτός, ανάκλασης ή απορρόφησης, θερμικής εκπομπής ή άλλων μηχανισμών που απορρέουν από τη δράση των μορίων-αισθητήρων. Αυτό το σήμα μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί από ένα μεταλλάκτη σήματος σε ένα μετρήσιμο φυσικοχημικό μέγεθος. Και το βιολογικό και το ηλεκτρικό σήμα μπορούν στη συνέχεια να αξιοποιηθούν περαιτέρω με ενίσχυση ή προώθηση<sup>{92-93}</sup>.

Η ικανότητα ανάλυσης που παρέχουν οι βιοαισθητήρες αυξάνεται συνεχώς μέσω της ελάττωσης του μεγέθους τους και της βελτίωσης των δυνατοτήτων της μικροηλεκτρονικής. Διαφορετικά είδη βιοαισθητήρων έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση ενός στόχου, αλλά και για την καταγραφή μετρήσεων σε ευρύ φάσμα.

Τα συνθετικά πεπτίδια δίνουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν επιθυμητοί βιοαισθητήρες, καθώς αποτελούν εξαιρετικά ευέλικτες πλατφόρμες, κάτι το οποίο αποδίδεται στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Συγκεκριμένα πεπτίδια είναι σε θέση να διαμορφωθούν σε διαφορετικά δομικά μοτίβα σχηματίζοντας ποικίλες δομές όπως μονοστοιβάδες, διπλές στοιβάδες, μικύλλια και ίνες. Τα πεπτίδια είναι φυσικά ή συνθετικά πολυμερή αμινοξέων που συνδέονται μέσω πεπτιδικών δεσμών, έχουν μικρότερα μήκη από αυτά των πρωτεϊνών και είναι δυνατό με μια κατάλληλη αλληλουχία να υποκαταστήσουν τις πρωτεΐνες στη βιολογική ανάλυση<sup>{92,95}</sup>.

Τα πεπτίδια υιοθετούν ειδικές διαμορφώσεις, με βάση ποιες πλευρικές αλυσίδες βρίσκονται η μια κοντά στην άλλη σε μια συγκεκριμένη πεπτιδική αλυσίδα. Οι φορτισμένες ομάδες καρβοξυλίου ( $-COO^-$ ) και οι πρωτονιωμένες αμινομάδες ( $-NH_3^+$ ) οδηγούν στο σχηματισμό στρώματος ενυδάτωσης στην επιφάνεια μέσω δεσμών υδρογόνου με αποτέλεσμα τα πεπτίδια να παρουσιάζουν υδρόφιλο χαρακτήρα. Όταν το συνολικό φορτίο συγκεκριμένων πεπτιδικών αλληλουχιών είναι κοντά στο μηδέν, αυτές μπορούν να εμποδίζουν την προσρόφηση θετικά και αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών. Σήμερα, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε συγκεκριμένα πεπτίδια λόγω της απλής διαδικασίας για τη σύνθεσή τους<sup>{96}</sup>.

Τα πεπτίδια έχουν χρησιμοποιηθεί ως στοιχεία αναγνώρισης σε βιοαισθητήρες, λόγω της σταθερότητάς τους έναντι της μετουσίωσης, του τυποποιημένου συνθετικού πρωτοκόλλου, της εύκολης τροποποίησης, και της χημικής τους ευελιξίας. Πεπτίδια με μικρές αλυσίδες αμινοξέων έχουν γενικά καλύτερη χημική και διαμορφωτική σταθερότητα από τις πρωτεΐνες. Επιπλέον, κατάλληλα τροποποιημένα πεπτίδια μπορούν να επιδείξουν υψηλή συγγένεια προς την αναλυόμενη ουσία-στόχο. Για αυτές τις συγκεκριμένες ιδιότητες, τα πεπτίδια είναι εξαιρετικοί υποψήφιοι για ανάπτυξη ευαίσθητων βιοαισθητήρων <sup>{94-95}</sup>.

Βιοαισθητήρες με βάση πεπτίδια έχουν κατασκευαστεί για την ανίχνευση αρκετών αναλυτών, συμπεριλαμβανομένων ιόντων μετάλλων, πρωτεασών, κινασών, διαφόρων ειδών βακίλλων, νουκλεϊνικών οξέων και αντισωμάτων. Οι βιοαισθητήρες που βασίζονται σε πεπτίδια παρουσιάζουν εξαιρετικές ιδιότητες και προσφέρουν την ευκαιρία να κατασκευάζονται σε ποσότητα και να είναι σταθεροί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα πεπτίδια έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην χρήση βιοαισθητήρων σε διάφορους τομείς, όπως στην κλινική διάγνωση, στη χημική και βιολογική ανάλυση, στον περιβαλλοντικό έλεγχο και στην υγειονομική περίθαλψη.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του πεπτιδίου και της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να ανιχνευθεί με τις συνήθεις μεθόδους απόκρισης, συμπεριλαμβανομένων της βολταμετρίας, της αμπερομετρίας και της χρήσης επιφανειακών ακουστικών κυμάτων. Πιο κάτω θα γίνει αναφορά σε βιοαισθητήρες στους οποίους τα πεπτίδια λειτουργούν ως στοιχεία αναγνώρισης, αλλά και ως ενζυμικό υπόστρωμα <sup>{92,96}</sup>.

## **6.1 Ορισμός και αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων**

Βιοαισθητήρας είναι ένα μικροσύστημα προσδιορισμού ενώσεων περιβαλλοντικού, βιοχημικού ή ιατρικού ενδιαφέροντος. Αποτελείται από ένα βιολογικό τμήμα που βρίσκεται σε επαφή με έναν χημικό μεταλλάκτη.

Το τμήμα του μεταλλάκτη σήματος ενός βιοαισθητήρα μετατρέπει τη βιολογική απάντηση σε ένα ποσοτικό σήμα. Στο βιολογικό τμήμα υπάρχει ακινητοποιημένο βιομόριο και εκεί πραγματοποιείται η χημική αντίδραση. Συνέπεια της αντίδρασης είναι η μεταβολή κάποιας χημικής ή φυσικής μετρήσιμης παραμέτρου του συστήματος. Η μεταβολή αυτή μετατρέπεται από τον μεταλλάκτη σε μετρήσιμο σήμα. Στην περίπτωση ενός οπτικού βιοαισθητήρα, το αποτέλεσμα της ενζυμικής αντίδρασης μεταβάλλει το σήμα σε συγκεκριμένη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, συνήθως στην ορατή περιοχή, οπότε από αυτή την μεταβολή είναι εφικτή η παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης, χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές <sup>{96}</sup>.



Σχήμα 6.1: Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας ενός βιοαισθητήρα<sup>{97}</sup>.

## 6.2 Τμήματα ενός βιοαισθητήρα

Τα τμήματα από τα οποία αποτελείται ένας βιοαισθητήρας είναι:

(α) Ο αποδέκτης ή υποδοχέας που είναι το στοιχείο μοριακής αναγνώρισης (molecular recognition element), το οποίο αποτελείται από κάποιο βιολογικό μόριο (ιστός, ένζυμο, αντίσωμα, νουκλεϊκό οξύ, μικροοργανισμός, κυτταρικός υποδοχέας), ή κάποιο στοιχείο βιολογικής προέλευσης ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του μεταλλάκτη. Η χρήση βιολογικών μορίων ή βιολογικών παραγόντων ως στοιχείο αναγνώρισης παρέχει τη δυνατότητα εκλεκτικής αλληλεπίδρασης του βιοαισθητήρα με τον αναλύτη-στόχο παρουσία άλλων ενώσεων με παρόμοια δομή. Το ακινητοποιημένο βιολογικό μόριο επιλεκτικά αλληλεπιδρά με τον αναλύτη και είτε τον αποικοδομεί, είτε το ίδιο το μόριο υφίσταται μεταβολή στη δομή του ή στις βιολογικές ή φυσικοχημικές του ιδιότητες, οι οποίες μπορεί να μετατραπούν σε αναλυτικά σήματα.

(β) Ο μεταλλάκτης σήματος ή μεταγωγέας, δηλαδή ο φυσικός ανιχνευτής είναι απαραίτητος για τη μετατροπή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής μεταβολής, που προκύπτει από τη διαδικασία της μοριακής αναγνώρισης της ουσίας-στόχου από το βιολογικό υλικό, σε ένα ηλεκτρικό σήμα που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του αναλύτη<sup>{96-97}</sup>.

## 6.3 Αισθητήρες πρωτεϊνών βασισμένοι σε πεπτίδια

Δεδομένου ότι τα πεπτίδια έχουν την ίδια χημική δομή με τις πρωτεΐνες, είναι ιδανικοί υποψήφιοι για την αντικατάσταση των πρωτεϊνών ως στοιχεία βιοαναγνώρισης στους βιοαισθητήρες. Μοριακοί βιοαισθητήρες με βάση πεπτίδια έχουν αναπτυχθεί για την εύκολη και γρήγορη ανίχνευση διαφόρων αναλυτών, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, αντισωμάτων, DNA και μεταλλικών ιόντων<sup>{98}</sup>.

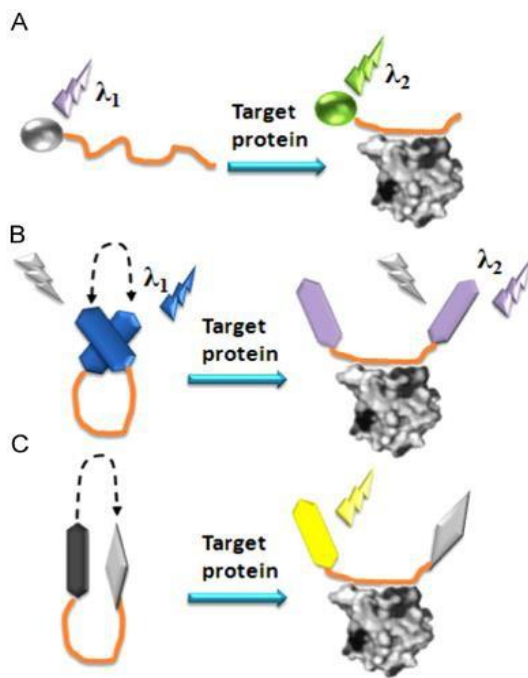
### 6.3.1 Οπτικοί αισθητήρες

Φθοροφόρα συζευγμένα σε πεπτίδια έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων αισθητήρων για στόχευση και αναγνώριση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Οι φασματικές ιδιότητες των φθοροφόρων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον περιβάλλοντα χώρο. Στρατηγικές σχεδίασης που βασίζονται στην δημιουργία εξιμερών, στη μεταφορά ενέργειας με συντονισμό φθορισμού (FRET) ή στον σχηματισμό ζεύγους ανιχνευτή-αποσβέστη, έχουν χρησιμοποιηθεί σε μοριακούς βιοαισθητήρες πρωτεΐνης<sup>{99-100}</sup>. Στο **Σχήμα 6.2** απεικονίζονται διάφοροι μηχανισμοί λειτουργίας ενός βιοαισθητήρα ανίχνευσης πρωτεΐνης, ο οποίος βασίζεται σε πεπτίδια που περιέχουν ευαίσθητα φθοροφόρα μόρια.

Το εξιμερές είναι ένα βραχύβιο διμερές ή ετεροδιμερές μόριο που σχηματίζεται από φθοροφόρα. Το μήκος κύματος της εκπομπής ενός εξιμερούς είναι μεγαλύτερο από αυτό της εκπομπής του μονομερούς. Επομένως, η μετατόπιση του μήκους κύματος εκπομπής λόγω σχηματισμού εξιμερών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παροχή σήματος στους βιοαισθητήρες.

Το FRET αναφέρεται στο φαινόμενο της μη-ακτινοβόλας μεταφοράς ενέργειας μεταξύ δύο χρωμοφόρων που βρίσκονται σε μικρή απόσταση (συνήθως στην περιοχή 1–10 nm) μέσω σύζευξης διπόλου-διπόλου. Η φασματική επικάλυψη του φάσματος εκπομπής του δότη και του φάσματος απορρόφησης του δέκτη, αποτελεί προϋπόθεση για να παρατηρηθεί φαινόμενο FRET. Ο φθορισμός αποσβένεται ή ενισχύεται λόγω του FRET, γεγονός το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο σχεδιασμό μετατροπέων σήματος σε βιοαισθητήρες. Οι μοριακοί βιοαισθητήρες πρωτεΐνης με χρήση εξιμερούς αποτελούνται από πεπτίδιο που περιλαμβάνει δύο πανομοιότυπα φθοροφόρα, συνδεδεμένα στα απέναντι άκρα του πεπτιδίου (**Σχήμα 6.2B**). Παρουσία του αναλύτη στόχου, η αλληλεπίδραση μεταξύ της αναλυόμενης ουσίας και του πεπτιδίου αναγκάζει τα φθοροφόρα να διαχωριστούν, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση της κορυφής εκπομπής των φθοροφόρων προς αυτή του μονομερούς. Στους μοριακούς βιοαισθητήρες ζεύγους ανιχνευτή-αποσβέστη, η εκπομπή φθορισμού μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από τη θέση, τον τύπο και τις ιδιότητες των φθοροφόρων.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται στον αισθητήρα ένα συμβατό ζεύγος δότη-δέκτη. Κατά τη δέσμευση στην αναλυόμενη ουσία, η απόσταση μεταξύ του δότη και του δέκτη μειώνεται, με αποτέλεσμα τη μεταφορά ενέργειας από τον δότη στον δέκτη, που οδηγεί σε σημαντική ενίσχυση της εκπομπής φθορισμού του δέκτη<sup>[101]</sup> (Σχήμα 6.2 Γ).



**Σχήμα 6.2:**

(Α) πεπτιδικός ανιχνευτής με ευαισθησία στο περιβάλλον- φθοροφόρα ως σήμα για την δέσμευση της πρωτεΐνης στόχου.

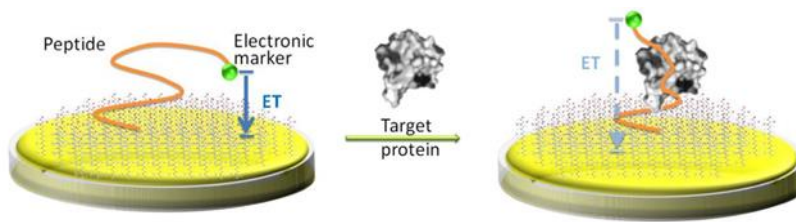
(Β) αισθητήρας πεπτιδίου ζεύγους εξιμερούς, το πεπτίδιο συνδέεται με την πρωτεΐνη στόχο, αλλάζοντας τη φασματική ιδιότητα του φθοροφόρου.

(Γ) Αισθητήρας πεπτιδίου ζεύγους FRET όπου η απόσταση μεταξύ του δότη-δέκτη άλλαξε με δέσμευση του πεπτιδίου στην πρωτεΐνη.

### 6.3.2 Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες

Αισθητήρες πρωτεϊνών που βασίζονται σε πεπτίδια έχουν επίσης κατασκευαστεί με χρήση ηλεκτροχημικής πλατφόρμας. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένων της γρήγορης μέτρησης, της δυνατότητας μέτρησης σε φορητή συσκευή και του χαμηλού κόστους στην κλινική διάγνωση. Ένας τυπικός ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας πρωτεΐνης που βασίζεται σε πεπτίδια μπορεί να βασιστεί στην στρατηγική βιοσύζευξης. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.3**, πραγματοποιείται στην περίπτωση αυτή σύζευξη ενός ηλεκτροχημικού δείκτη με μια πεπτιδική αλληλουχία που έχει υψηλή συγγένεια για την πρωτεΐνη-στόχο. Το πεπτίδιο ακινητοποιείται στο ηλεκτρόδιο του αισθητήρα. Η δέσμευση του αναλύτη με την πεπτιδική αλληλουχία μπορεί να αλλάξει σημαντικά την μεταφορά ηλεκτρονίων (ET) από τον ηλεκτροχημικό δείκτη στο ηλεκτρόδιο. Για παράδειγμα, η ερευνητική ομάδα του Lin ανέφερε έναν αισθητήρα για τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), στον οποίο ομάδα σιδηροκενίου προσαρτήθηκε σε πεπτιδική αλληλουχία με υψηλή ειδική συγγένεια με EGFR. Το πεπτίδιο στη συνέχεια ακινητοποιήθηκε σε ηλεκτρόδιο χρυσού μέσω του ομοιοπολικού δεσμού Au-S κατά την αναγνώριση του EGFR από το πεπτίδιο προκαλείται

μια αλλαγή στη διαμόρφωση του πεπτιδίου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρεύματος<sup>{102}</sup>. Η ίδια στρατηγική εφαρμόστηκε και σε άλλους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες που βασίζονται σε πεπτίδια. Ηλεκτροχημικός αισθητήρας που βασίζεται σε πεπτίδια κατασκευάστηκε με επιτυχία πρόσφατα για την ανίχνευση του HIV<sup>{103}</sup> και αμυλοειδών β<sup>{104}</sup>.

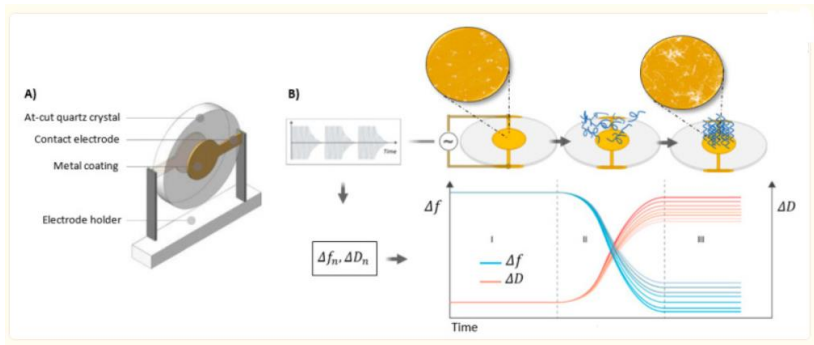


**Σχήμα 6.3 :** Σχηματικό διάγραμμα ενός ηλεκτροχημικού αισθητήρα πρωτεϊνών με βάση πεπτίδια. Η μεταφορά ηλεκτρονίων (ET) από τον ηλεκτρονικό δείκτη στο ηλεκτρόδιο επηρεάζεται από τη δέσμευση/συγγένεια μεταξύ του πεπτιδίου και της πρωτεΐνης-στόχου<sup>{104}</sup>.

### 6.3.3 Αισθητήρες Μάζας-Μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance-QCM)

Τις τελευταίες δεκαετίες ο μικροζυγός χαλαζία (QCM) έχει καταστεί ένα ισχυρό και μη επεμβατικό εργαλείο για τη διερεύνηση βιομοριακών αλληλεπιδράσεων λόγω της υψηλής ευαισθησίας του και του χαμηλού του κόστους, καθώς και της δυνατότητας μελέτης αλληλεπιδράσεων σε πραγματικό χρόνο. Συνήθως, ο QCM έχει τη μορφή μιας λεπτής πλάκας χαλαζία (μm), που καλύπτεται και από τις δύο πλευρές από μεταλλικά ηλεκτρόδια, συνήθως χρυσό, πάχους περίπου 0.1 μm (Σχήμα 6.4). Μετά τη σύνδεση των ηλεκτροδίων σε έναν ταλαντωτή και την εφαρμογή εναλλασσόμενης τάσης, ο κρύσταλλος χαλαζία ταλαντώνεται με μια πολύ σταθερή συχνότητα συντονισμού, σύμφωνα με το λεγόμενο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο<sup>{105}</sup>.





**Σχήμα 6.4 :** (A) Βασικό σχήμα αισθητήρα QCM που αποτελείται από πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο χαλαζία επικαλυμμένο με δύο ηλεκτρόδια χρυσού, ένα σε κάθε πλευρά. (B) Η σχηματική αρχή λειτουργίας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις αλλαγές των  $\Delta f$  και  $\Delta D$  που απεικονίζονται καθώς τα μόρια απορροφώνται στην επιφάνεια του αισθητήρα χρυσού. Στον σχηματικό μηχανισμό προσρόφησης, το τμήμα I δείχνει μια γυμνή επιφάνεια και σταθερές γραμμές βάσης. κατά την προσρόφηση παρατηρούνται μοριακές αλλαγές στα  $\Delta f$  και  $\Delta D$ . Μετά την πλήρη προσρόφηση στην επιφάνεια, οι βασικές γραμμές σταθεροποιούνται. Τα δεδομένα παρακολούθησης διασποράς ενέργειας (QCM-D) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ιξωδοελαστική μοντελοποίηση και ποσοτικοποίηση της μάζας, καθώς και για τον υπολογισμό της ιξωδοελαστικότητας και του πάχους του προσροφημένου στρώματος<sup>{105}</sup>.

Η μεταβολή της συχνότητας δόνησης ( $\Delta f$ ) του κρυστάλλου είναι γραμμικά ανάλογη με τη μεταβολή της επιφανειακής μάζας ( $\Delta m$ ) στον κρύσταλλο<sup>{106}</sup>.

$$\Delta f = \left( -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\mu_q\rho_q}} \right) \Delta m$$

Όπου  $\Delta f$  (Hz) είναι η μετρούμενη μεταβολή συχνότητας,  $f_0$  είναι η βασική συχνότητα συντονισμού του χαλαζία (9 MHz στο όργανο του εργαστηρίου),  $\Delta m$  (g) είναι η μεταβολή της μάζας στην επιφάνεια του χαλαζία,  $A$  (εδώ  $0.196 \text{ cm}^2$ ) είναι η επιφάνεια του ηλεκτροδίου,  $\rho_q$  η πυκνότητα του χαλαζία ( $2.648 \text{ g/cm}^3$ ) και  $\mu_q$  η σταθερά του κρυστάλλου χαλαζία ( $2.947 \times 10^{11} \text{ g/cm}\cdot\text{s}^2$ ). Το αρνητικό πρόσημο δείχνει ότι η συχνότητα ταλάντωσης μειώνεται με αύξηση της μάζας. Η παραπάνω εξίσωση Sauerbrey εφαρμόζεται με μεγάλη ακρίβεια για ρόφηση μορίων από φάση ατμών. Αν και η τεχνική QCM έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε υγρά, η ποσοτικοποίηση της ρόφησης από την υγρή φάση είναι περίπλοκη. Η συμπεριφορά ταλάντωσης του αισθητήρα QCM στα υγρά εξαρτάται όχι μόνο από τις ιδιότητες του ηλεκτροδίου του χαλαζία του υγρού,

αλλά και από την ποσότητα και τις ιδιότητες του προσροφημένου υλικού. Σε πολλές περιπτώσεις στην υγρή φάση, ο QCM δεν συμπεριφέρεται όπως προβλέπει η εξίσωση Sauerbrey. Η συχνότητα ταλάντωσης εξαρτάται από την πυκνότητα και το ιξώδες του υγρού σε επαφή με τον κρύσταλλο. Η παρακάτω εξίσωση εκφράζει τη μεταβολή της συχνότητας συντονισμού ως συνάρτηση των παραμέτρων του χαλαζία και της πυκνότητας και του ιξώδους του υγρού.

$$\Delta f = \left( -\frac{f_0^{3/2}}{\sqrt{\pi \mu_q \rho_q}} \right) \sqrt{\rho_L \eta_L}$$

Όπου  $\rho_L$  και  $\eta_L$  είναι η πυκνότητα και το ιξώδες του υγρού, αντίστοιχα. Οι μεταβολές συχνότητας που προβλέπονται από την εξίσωση αυτή συμφωνούν αρκετά καλά με τα πειραματικά δεδομένα, αν και έχει παρατηρηθεί κάποια απόκλιση για πολύ ιξώδη μέσα και για σημαντική τραχύτητα επιφάνειας (0,1  $\mu\text{m}$ )<sup>{107}</sup>.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει χρήση της τεχνολογίας QCM για τη διερεύνηση φαινομένων προσρόφησης σε βιολογικά συστήματα. Η κινητική της προσρόφησης πρωτεϊνών και πεπτιδίων καθώς και οι αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένους συνδέτες έχουν μελετηθεί μέσω του QCM. Η τεχνολογία QCM επιτρέπει επίσης την παρακολούθηση των αλλαγών των ιδιοτήτων των εναποτιθέμενων στρωμάτων και των υποδοχέων που συνδέονται με μικρούς ή και μεγάλους υποκαταστάτες.

## Κεφάλαιο 7: Πρωτεΐνη p32 / gC1qR

### 7.1 Δομή και λειτουργία της Πρωτεΐνης p32

Η πρωτεΐνη gC1qR έχει πολλά ονόματα επειδή ανακαλύφθηκε από τρεις ξεχωριστές ερευνητικές ομάδες ανεξάρτητα <sup>{108}</sup>. Βρέθηκε ότι οι αλληλουχίες αμινοξέων των HABP1, P32 και gC1qR ήταν πανομοιότυπες και κωδικοποιήθηκαν όλες από το ίδιο γονίδιο. Το γονίδιο gC1qR βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17p13.3 σε ανθρώπους και στο χρωμόσωμα 11 σε ποντίκια. Η αλληλουχία cDNA μεταξύ του ανθρώπου και των γονιδίων των τρωκτικών είναι σχεδόν πανομοιότυπη (~89,9%)<sup>{109}</sup>.

Το μοριακό βάρος της gC1qR στο SDS-PAGE είναι περίπου 33 kDa. Υπό μη μετουσιωτικές συνθήκες, η gC1qR είναι τριμερής πρωτεΐνη σε σχήμα ντόνατ με 3 όμοιες αλυσίδες και μοριακό βάρος 97,2 kDa<sup>{110}</sup>.

Ο σχηματισμός πολυμερών μπορεί να είναι κρίσιμος για την ενίσχυση της συγγένειας της p32 για πολυσθενείς προσδέτες, όπως C1q και υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (HK). Η τεταρτοταγής δομή σε σχήμα ντόνατ έχει δύο πλευρές. Η πλευρά του διαλύματος έχει υψηλή συγκέντρωση αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων, ενώ η όψη της μεμβράνης είναι ουδέτερη. Η πρωτεΐνη συντίθεται ως προπρωτεΐνη 282 καταλοίπων αμινοξέων. Έχει μια Cys στο κατάλοιπο 186 και επομένως δεν έχει ενδοαλυσιδιακό δισουλφιδικό δεσμό<sup>{111-112}</sup>. Η πρωτεΐνη gC1qR εμφανίζεται όχι μόνο στη μιτοχονδριακή μήτρα αλλά και σε άλλα διαμερίσματα του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένης της εξωκυτταρικής επιφάνειας και του πυρήνα. Η gC1qR εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών αποκρίσεων. Εκτός από το C1q, η gC1qR μπορεί να δεσμεύσει πολλαπλούς προσδέτες συμπεριλαμβανομένων της θρομβίνης, της βιτρονεκτίνης, του HK και του παράγοντα XII (HF). Οι πρωτεΐνες του συστήματος επαφής HF, προκαλλικρεΐνη (PK), και HK αποτελούν τους εκκινητές του λεγόμενου ενδογενούς συστήματος πήξης του αίματος<sup>{113-115}</sup>.

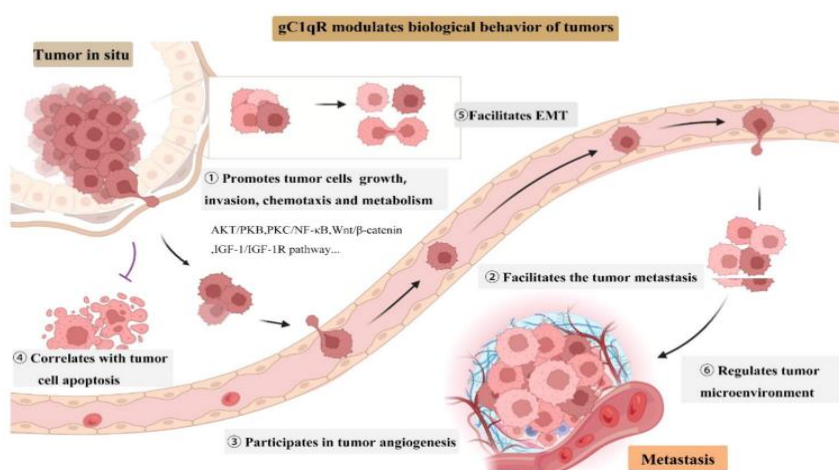
Η gC1qR παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, η gC1qR συσχετίζεται με την κυτταρική απόπτωση. Η υπερέκφραση της gC1qR σε κύτταρα ινοβλαστών προκαλεί αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, που τελικά οδηγεί σε κυτταρική απόπτωση<sup>{116-117}</sup>.

### 7.2 Ο ρόλος της gC1qR στη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η gC1qR συμβάλλει στην εξέλιξη του καρκίνου, στην εισβολή και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων και συσχετίζεται με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά όγκων (**Σχήμα 7.1**). Η gC1qR βρέθηκε σε πολλαπλά καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, των ωοθηκών, του προστάτη, του μελανώματος, του πνεύμονα, του παγκρέατος και του παχέος εντέρου. Έχει αναφερθεί πως το επίπεδο έκφρασης της gC1qR συσχετίζεται με το στάδιο του όγκου, το

μέγεθος του όγκου και την κλινική έκβαση. Επιπλέον, εμπλέκεται στη χημειοταξία των καρκινικών κυττάρων και στον μεταβολισμό<sup>{118-121}</sup>. Η gC1qR ρυθμίζει τη χημειοταξία των καρκινικών κυττάρων μέσω της σύνδεσης με πρωτεϊνική κινάση C ζ. Η ενεργή κασπάση-1 διασπά τη gC1qR και στη συνέχεια προάγει την αερόβια γλυκόλυση στα καρκινικά κύτταρα και ενισχύει την καρκινογένεση<sup>{122-123}</sup>.

Η gC1qR εμπλέκεται σε πολλαπλές οδούς σηματοδότησης για τη διαμόρφωση της βιολογικής συμπεριφοράς των όγκων. Σε κύτταρα HepG2, η υπερέκφραση της gC1qR ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της κυκλίνης D1<sup>{124}</sup>. Η ερευνητική ομάδα του Sinha S αποκάλυψε πως η gC1qR ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση και την εισβολή στο μελάνωμα μέσω της ρύθμισης της σηματοδότησης AKT/PKB σε ανθρώπινο μελάνωμα<sup>{125}</sup>. Μείωση της gC1qR σε triple-negative breast cancer (TNBC) αναστέλλει την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης PKC/NF-KB/VCAM-1, με αποτέλεσμα τον αποκλεισμό της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων<sup>{126}</sup>. Η οδός Wnt/b-κατενίνης συσχετίστηκε επίσης με το gC1qR. Επιπλέον, η gC1qR μεσολαβεί στη μετάσταση καρκίνου του παγκρέατος μέσω σηματοδότησης IGF-1/IGF-1R<sup>{127}</sup>. Συνοψίζοντας, η gC1qR παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη, την επιβίωση και τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων. Χρησιμεύει επίσης ως νέος δείκτης για πρόγνωση και διάγνωση του καρκίνου, και παρέχει νέες ευκαιρίες για τη θεραπεία του καρκίνου, αν και οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί του gC1qR σε διάφορους καρκίνους δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί.



**Σχήμα 7.1:** Ο ρόλος της gC1qR στην ανάπτυξη, την εισβολή και την εξέλιξη ενός όγκου<sup>{128}</sup>.

## Κεφάλαιο 8: Πειραματικό Μέρος

### Μέρος 1: Σύνθεση σωματιδίων $\text{CaCO}_3$ με τη χρήση πολυμερικών σταθεροποιητών

#### Μέθοδος 8.1.1. : Σύνθεση σωματιδίων $\text{CaCO}_3$ με τη χρήση πολυακρυλικού οξέος ως σταθεροποιητή σε διαφορετικές θερμοκρασίες και ροές αντιδραστηρίων

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich, 98%
- Ανθρακικό νάτριο,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Sigma Aldrich ,99%
- Πολυακρυλικό οξύ MW:5100 g/mol, 35 wt%, Acros

Πειραματική Διαδικασία:

Σε 300 ml απιονισμένου  $\text{H}_2\text{O}$  προστέθηκαν 126 ml πολυακρυλικού οξέος ( $C=0.1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8.5$ ). Ακολούθησε η προσθήκη διαλυμάτων χλωριούχου ασβεστίου ( $C=0.5 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8.5$ ,  $V=10\text{ml}$ ) και ανθρακικού καλίου ( $C=0.5 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8.5$ ,  $V=10\text{ml}$ ) με ροή 60 ml/h και 30ml/h και θερμοκρασία ίση με  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$  και  $40^\circ\text{C}$ . Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 30 λεπτά (1500rpm) και το διάλυμα διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρο 0.2  $\mu\text{m}$ . Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

#### Μέθοδος 8.1.2 : Σύνθεση σωματιδίων $\text{CaCO}_3$ με τη χρήση πολυμεθακρυλικού οξέος ως σταθεροποιητή

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich, 98%
- Ανθρακικό νάτριο,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Sigma Aldrich, 99%
- Πολυμεθακρυλικό οξύ MW:9500 g/mol

Πειραματική Διαδικασία:

Σε 300 ml απιονισμένου H<sub>2</sub>O προστέθηκαν διαφορετικές ποσότητες (100 ,125 και 150μl) διαλύματος πολυμεθακρυλικού οξέος (pH=8.5/pH=9,C=0.1 M). σε νερό σε διαφορετικές θερμοκρασίες: 25°C, T=30°, T= 40°C .Ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων χλωριούχου ασβεστίου (V=10ml,C=0.5 M, pH=8.5) και ανθρακικού καλίου (V=10ml ,C=0.5 M, pH=8.5) με ροή 60 ml/h. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 30 λεπτά (1500 rpm) και το διάλυμα διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρο 0.2 μm. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

### **Μέθοδος 8.1.3 : Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με τη χρήση χιτοζάνης ως σταθεροποιητή**

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο,CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O,Sigma Aldrich ,98%
- Ανθρακικό νάτριο,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,Sigma Aldrich,99%
- Χιτοζάνη,Μικρού Μοριακού Βάρους,Aldrich,>75%

Πειραματική Διαδικασία:

Σε 10 ml διαλύματος χιτοζάνης (10mg/ml,pH=4) έγινε η προσθήκη διαλυμάτων χλωριούχου ασβεστίου (V=20ml,C=0.5 M) και ανθρακικού καλίου (V=20ml ,C=0.5 M) με ροή 60 ml/h. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 30 λεπτά (1500rpm) και το διάλυμα διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρο 0.2 μm. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

### **Μέθοδος 8.1.4 : Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με τη χρήση ντοπαμίνης ως σταθεροποιητή**

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο,CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O,Sigma Aldrich,98%
- Ανθρακικό νάτριο,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich,99%
- Υδροχλωρική ντοπαμίνη,Sigma,98%

#### Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου ( $V=10\text{ml}$ ,  $C=0.5\text{ M}$ ,  $\text{pH}=8.5$ ) προστέθηκαν 20mg ντοπαμίνης. Ακολούθησε η προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου ( $V=10\text{ml}$ ,  $C=0.5\text{ M}$ ) με ροή 60 ml/h. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 30 λεπτά (1500rpm) και το διάλυμα διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρο 0.2  $\mu\text{m}$ . Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

#### Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich, 98%
- Ανθρακικό νάτριο,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Sigma Aldrich, 99%
- Υδροχλωρική ντοπαμίνη, Sigma, 98%

#### Πειραματική Διαδικασία:

Σε 20 ml διαλύματος ντοπαμίνης (3mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris προστέθηκαν 20ml χλωριούχου ασβεστίου ( $C=0.5\text{M}$ ) και 20ml ανθρακικού νατρίου ( $C=0.5\text{M}$ ) σε ροή 10ml/h. Το τελικό διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 10 000 στροφές για 20 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο  $\text{H}_2\text{O}$  στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

#### Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich, 98%
- Όξινο ανθρακικό αμμώνιο  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , Sigma Aldrich, 99%
- Υδροχλωρική ντοπαμίνη, Sigma, 98%

#### Πειραματική Διαδικασία:

Σε ένα ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 300mg χλωριούχου ασβεστίου και 10mg ντοπαμίνης σε 100 ml αιθανόλης. Σε 4 διαφορετικά ποτήρια ζέσεως προστέθηκαν 0.5g όξινου ανθρακικού αμμωνίου και τοποθετήθηκαν περιμετρικά του διαλύματος της ντοπαμίνης. Αφέθηκαν στον ξηραντήρα κενού για 24 h. Το τελικό διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 10 000 στροφές για 20 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με αιθανόλη στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

### **Μέθοδος 8.1.5: Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με τη χρήση πολυ(4-στυρενοσουλφονικού νατρίου) ως σταθεροποιητή**

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich, 98%
- Ανθρακικό νάτριο, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich, 99%
- Πολύ (4-στυρενοσουλφονικό νάτριο), PSS, MW: 70 000 g/mol, Aldrich, 98%

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα πολύ (4-στυρενοσουλφονικού νατρίου) (1mg/ml, pH=10, V=20 ml) έγινε η προσθήκη 2.50 ml ανθρακικού νατρίου (C=0.5 M) και 2.50 ml χλωριούχου ασβεστίου (C=0.5 M). Έγινε ανάδευση για 3 ώρες. Το τελικό διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 10 000 στροφές για 20 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο H<sub>2</sub>O στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

### **Μέθοδος 8.1.6: Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με τη χρήση αργινίνης ως σταθεροποιητή**

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich, 98%
- Ανθρακικό νάτριο, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich, 99%
- Αργινίνη, Aldrich, 98%

Πειραματική Διαδικασία:

Σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O (pH=8.8, V=250 ml) έγινε η προσθήκη 150 μl διαλύματος αργινίνης (500mg/ml) . Ακολούθησε η προσθήκη 10ml ανθρακικού νατρίου (C=0.2 M) και 10ml χλωριούχου ασβεστίου (C=0.2M). Έγινε ανάδευση για 1 ώρα. Το τελικό διάλυμα φυγο-κεντρήθηκε στις 10 000 στροφές για 20 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο H<sub>2</sub>O στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.



### Μέθοδος 8.1.7: Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με τη χρήση καρβοξυμέθυλο-κυτταρίνης

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich, 98%
- Ανθρακικό νάτριο, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich, 99%
- Καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης , MW:250 000 g/mol

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης 0.5% σε απιονισμένο νερό προστέθηκαν 0.032 M χλωριούχου ασβεστίου με το τελικό όγκο του διαλύματος να είναι στα 250 ml . Το διάλυμα αναδεύτηκε για 24 ώρες. Ακολούθησε η προσθήκη 20 ml ανθρακικού νατρίου(C=0.4 M) σε ροή 10 ml/h. Το τελικό διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 10 000 στροφές για 20 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο H<sub>2</sub>O στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich, 98%
- Ανθρακικό νάτριο, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich, 99%
- Καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης , MW:90 000

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης 0.5% προστέθηκαν 0.032 M χλωριούχου ασβεστίου με το τελικό όγκο του διαλύματος να είναι στα 250 ml. Το διάλυμα αναδεύτηκε για 24 ώρες. Ακολούθησε η προσθήκη 20ml ανθρακικού νατρίου(C=0.4 M) σε ροή 10ml/h. Το τελικό διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 10 000 στροφές για 20 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο H<sub>2</sub>O στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich, 98%
- Ανθρακικό νάτριο, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich, 99%

- Καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης ,MW:90 000 g/mol

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου/ Καρβοξυμέλυθοκυτταρίνης 5% (C=0.025M,V=100ml) έγινε η προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου (C=0.025M,V=100ml). Ακολούθησε η τοποθέτηση του τελικού διαλύματος σε υπέρηχους για 10 λεπτά. Τα σωματίδια διηθήθηκαν υπό κενό με φίλτρο 0.2μm.

**Μέθοδος 8.1.8: Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με τη χρήση πολύ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) ως σταθεροποιητή**

Χημικά :

- Χλωριούχο νάτριο,Sigma Aldrich,99%
- Πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη),MW: 56 000 g/mol ,Aldrich,98%

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα πολυ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) (2mg/ml,V=5 ml,pH=7) σε NaCl 0.5M διασπάρθηκαν 0.05 g σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>. Ακολούθησε η τοποθέτηση του διαλύματος σε υπέρηχους για 10 λεπτά. Το στερεό καταβυθίστηκε με φυγοκέντρηση στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 2 φορές με διάλυμα NaCl 0.05 M και απιονισμένο νερό στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

Χημικά :

- Χλωριούχο νάτριο ,Sigma Aldrich,99%
- Πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη),MW: 8 000 g/mol ,Aldrich,98%

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα πολυ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) (2mg/ml,V=5 ml,pH=7) σε NaCl 0.5M διασπάρθηκαν 0.05 g σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>. Ακολούθησε η τοποθέτηση του διαλύματος σε υπέρηχους για 10 λεπτά. Το στερεό καταβυθίστηκε με φυγοκέντρηση στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 2 φορές με διάλυμα NaCl 0.05 M και απιονισμένο νερό στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

Χημικά :

- Χλωριούχο νάτριο, Sigma Aldrich, 99%
- Πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη), MW: 17 500 g/mol , Aldrich, 98%

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα Πολυ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) (2mg/ml, V=5 ml, pH=7) σε NaCl 0.5M διαπύρθηκαν 0.05 g σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>. Ακολούθησε η τοποθέτηση του διαλύματος σε υπέρηχους για 10 λεπτά. Το στερεό καταβυθίστηκε με φυγοκέντρηση στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 2 φορές με διάλυμα NaCl 0.05 M και απιονισμένο νερό στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

## Μέρος 2: Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> χωρίς τη χρήση οργανικών σταθεροποιητών

### Μέθοδος 8.2.1: Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich
- Ανθρακικό νάτριο, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich
- Αιθυλενογλυκόλη, Sigma Aldrich, 97%

Πειραματική Διαδικασία:

Σε μίγμα αιθυλενογλυκόλης/H<sub>2</sub>O (84 %, V=100 ml) έγινε η προσθήκη 10 ml (0.1M) ανθρακικού νατρίου και 10ml χλωριούχου ασβεστίου(0.1M). Έγινε ανάδευση για 2 ώρες. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 10 000 στροφές για 20 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο H<sub>2</sub>O στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

## Μέθοδος 8.2.2: Σύνθεση σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>

Χημικά :

- Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich
- Ανθρακικό νάτριο, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (C=0.025M, V=100ml) έγινε η προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου (C=0.025M, V=100ml). Ακολούθησε η τοποθέτηση του διαλύματος σε υπέρηχους για 5 λεπτά. Τα σωματίδια διηθήθηκαν υπό κενό με φίλτρο 0.2μm.

## Μέρος 3: Επικάλυψη σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με τη μέθοδο layer by layer

### Μέθοδος 8.3.1 : Επικάλυψη σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> πολυακρυλικού οξέος από πολυαιθυλενιμίνη

Χημικά :

- Πολυαιθυλενιμίνη, Sigma Aldrich, MW:2000 (50% H<sub>2</sub>O)

Πειραματική Διαδικασία:

Σωματίδια CaCO<sub>3</sub>\_PAA(0.05g) (Μέθοδος 8.1.1) διασπάρθηκαν σε H<sub>2</sub>O (1mg/ml, V=20 ml). Το προκύπτον διάλυμα μεταφέρθηκε στάγδην σε διάλυμα πολυαιθυλενιμίνης (5mg/ml, pH=8.5). Ακολούθησε ανάδευση για 2 ώρες. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο H<sub>2</sub>O στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

### Μέθοδος 8.3.2 : Επικάλυψη σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> πολυ(στυρενοσουλφονικού νατρίου) από πολυαιθυλενιμίνη

Χημικά :

- Πολυαιθυλενιμίνη, Aldrich ,MW:2000 (50% H<sub>2</sub>O)

Πειραματική Διαδικασία:

Σωματίδια CaCO<sub>3</sub>-PSS (0.02g) (Μέθοδος 8.1.5) διασπάρθηκαν σε H<sub>2</sub>O (1mg/ml, V=20 ml). Το προκύπτον διάλυμα μεταφέρθηκε υπό στάγδην σε διάλυμα πολυαιθυλενιμίνης (5mg/ml, pH=8.5). Ακολούθησε ανάδευση για 2 ώρες. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο H<sub>2</sub>O στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

Χημικά :

- Πολυαιθυλενιμίνη, MW:60000(50% H<sub>2</sub>O), Aldrich

Πειραματική Διαδικασία:

Σωματίδια CaCO<sub>3</sub>-PSS (0.02g) (**Μέθοδος 8.1.5**) διασπάρθηκαν σε H<sub>2</sub>O (1mg/ml, V=20 ml). Το προκύπτον διάλυμα μεταφέρθηκε υπό στάγδην σε διάλυμα πολυαιθυλενιμίνης (5mg/ml, pH=8.5). Ακολούθησε ανάδευση για 2 ώρες. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο H<sub>2</sub>O στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

**Μέθοδος 8.3.3: Επικάλυψη σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> πολυ(στυρενοσουλφονικού νατρίου) από πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη)**

Χημικά :

- Πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη), MW: 56000 g/mol, Sigma Aldrich

Πειραματική Διαδικασία:

Σωματίδια CaCO<sub>3</sub>-PSS(0.02g) (**Μέθοδος 8.1.5**) διασπάρθηκαν σε H<sub>2</sub>O (1mg/ml, V=20 ml). Το προκύπτον διάλυμα μεταφέρθηκε στάγδην σε διάλυμα πολυ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) (5mg/ml, pH=7.0). Ακολούθησε ανάδευση για 2 ώρες. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο H<sub>2</sub>O στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

**Μέθοδος 8.3.4: Επικάλυψη σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> καρβοξυμέθυλοκυτταρίνης από χιτοζάνη**

Χημικά :

- Χιτοζάνη (low MW): 50,000-190,000 Da, Aldrich

Πειραματική Διαδικασία:

Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$ -CMC (0.04g) (**Μέθοδος 8.1.7**) διασπάρθηκαν σε διάλυμα χιτοζάνης (1mg/ml, V=40ml, pH=4.8). Ακολούθησε ανάδευση για 2 ώρες. Το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο  $\text{H}_2\text{O}$  σε φυγόκεντρο στις 10000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

**Μέθοδος 8.3.5: Επικάλυση σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  πολυ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) από πολυ(4-στυρενοσουλφονικό νάτριο)**

Χημικά :

- Πολυ (4-στυρενοσουλφονικό νάτριο), PSS, MW:70 000 g/mol,Aldrich,98%
- Χλωριούχο νάτριο ,Sigma Aldrich,99%

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα πολυ(στυρενοσουλφονικού νατρίου) (2mg/ml,V=5 ml,pH=7) σε NaCl 0.5M διαπάρθηκαν 0.05 g σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ -PAH (**Μέθοδος 8.1.8**). Ακολούθησε τοποθέτηση του διαλύματος σε υπέρηχους για 10 λεπτά. Το στερεό καταβυθίστηκε με φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 2 φορές με διάλυμα NaCl 0.05 M και απιονισμένο νερό στις 10 000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

**Μέθοδος 8.3.6: Επικάλυση σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  πολυ(στυρενοσουλφονικού νατρίου) - πολυ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) από πολύ (στυρενοσουλφονικό νάτριο)**

Χημικά :

- Πολυ (4-στυρενοσουλφονικό νάτριο),PSS,MW:70 000 g/mol, Aldrich,98%
- Χλωριούχο νάτριο ,Sigma Aldrich,99%

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα πολυ(στυρενοσουλφονικού νατρίου) (2mg/ml,V=5 ml,pH=7) σε NaCl 0.5M διασπάρθηκαν 0.05 g σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ -PSS-PAH (**Μέθοδος 8.3.4**). Ακολούθησε τοποθέτηση του διαλύματος σε υπέρηχους για 10 λεπτά. Το στερεό καταβυθίστηκε με φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές.

### Μέθοδος 8.3.7: Επίστρωση σωματιδίων $\text{CaCO}_3$ -πολυ(υδροχλωρικής αλλυλαμίνης) με πολυακρυλικό οξύ

Χημικά :

- Πολυακρυλικό οξύ MW:5100 g/mol,35 wt% ,Acros
- Χλωριούχο νάτριο ,Sigma Aldrich,99%

Πειραματική Διαδικασία:

Σε διάλυμα πολυακρυλικού οξέος (2mg/ml,V=3ml,pH=7) σε νερό διασπάρθηκαν 0.02g σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ -PAH (Μέθοδος 8.1.8). Ακολούθησε τοποθέτηση του διαλύματος σε υπέρηχους για 10 λεπτά. Το στερεό καταβυθίστηκε με φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά. Το στερεό ξεπλύθηκε 2 φορές με απιονισμένο νερό στις 10000 στροφές για 5 λεπτά. Το στερεό αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

## Μέρος 4: Χαρακτηρισμός σωματιδίων

### 8.4.1 Μέτρηση ζ-δυναμικού

Το ζ-δυναμικό των σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  καθώς και των επιστρωμένων σωματιδίων με πολυμερικά στρώματα μετρήθηκε με το όργανο Nano ZS(Malvern) (Σχήμα 8.1). Τα σωματίδια (1mg/ml) διασπάρθηκαν σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου  $C=0.01$  M. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες πολυστυρενίου και η κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε 3 φορές για χρονική περίοδο 2000 s. Το ζ-δυναμικό των σωματιδίων προκύπτει από τον μέσο όρο των μετρήσεων αυτών.



**Σχήμα 8.1 :** Όργανο Nano ZS(Malvern), Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Λευκωσίας.

#### **8.4.2 Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων(Scanning Electron Microscopy,SEM)**

Αφού τα δείγματα επικαλύφθηκαν με χρυσό (sputtering) 80 mA για 3 λεπτά, τα δείγματα μετρήθηκαν με τη βοήθεια οργάνου TESCAN(SDT007-1038,Princeton Gamma-Tech), με δυναμικό 30 KV.

#### **8.4.3 Περίθλαση Ακτίνων X (X-ray Diffraction)**

Τα στερεά χαρακτηρίστηκαν με μέθοδο σκόνης (powder XRD). Τα δείγματα μετρήθηκαν στα 40 kV και 30 mA με ταχύτητα σάρωσης  $0.02^{\circ} \text{ s}^{-1}$  σε εύρος σάρωσης  $2\theta$  10-70 $^{\circ}$ . Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο όργανο MiniFlex 600 (Rigaku) (**Σχήμα 8.2**).



**Σχήμα 8.2 :** Όργανο MiniFlex 600 (Rigaku),Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου



## Μέρος 5: Σύνθεση πεπτιδίου Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A

### 8.5.1 Σύνθεση πεπτιδίου Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A

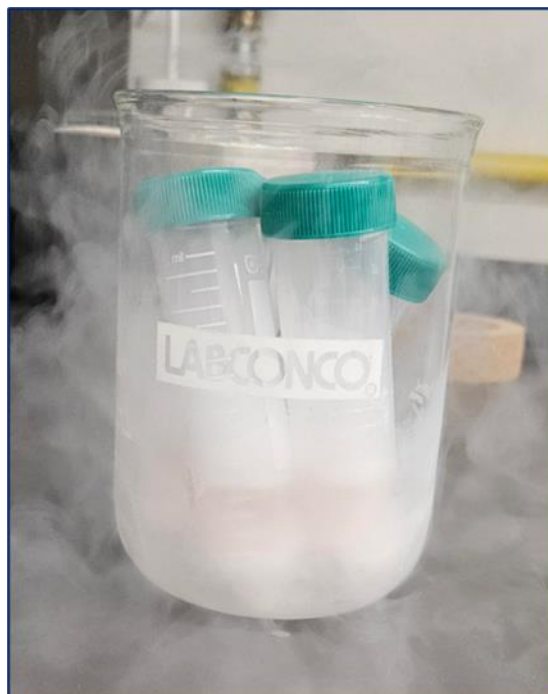
Χημικά :

- H-Rink Amide (0.41mmol/g), Chem Matrix
- N,N'δισοπροπυλοκαρβοδιμίδιο (DIC), Chem Matrix
- Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), Chem Matrix
- Πιπεραζίνη, Chem Matrix
- 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), Chem Matrix,
- Διαιθλαιθέρας, Chem Matrix
- Oxyma, Chem Matrix
- Τριφθοραιθανικό Οξύ(TFA), Chem Matrix
- N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA),Sigma Aldrich
- N-Methylpyrrolidone (NMP), Sigma Aldrich
- Οξικός Ανυδρίτης, Sigma Aldrich
- Fmoc-Ala, CBL Patras
- Fmoc-Thr-tBut-OH, CBL Patras
- Fmoc-Ser-tBut, CBL Patras
- Fmoc-Arg-Pbf-OH, CBL Patras
- Fmoc-Gly, CBL Patras
- Fmoc-Lys-Boc, CBL Patras
- Fmoc-Cys-Trt, CBL Patras
- b-Ala, CBL Patras

Πειραματική Διαδικασία:

Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε με τη χρήση του Biotage Initiator+SP Wave, Biotage,Sweden. 250 mg Rink Amide (0.41 mmol/g) χρησιμοποιήθηκε για να συντεθεί πεπτίδιο με N αμινοτελικό άκρο μετά τη τελική αποκοπή από τη στερεή φάση. Η ρητίνη διογκώθηκε με DMF σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Η προστατευτική ομάδα fmoc απομακρύνθηκε με 2% DBU 5% piperazine σε DMF για 2 λεπτά στους 90°C. Η

προσθήκη των αμινοξέων (x5 περίσσεια) έγινε στους 90°C για 1 λεπτό με 90 μl DIC και 73 mg Oxyma σε DMF. Μετά από κάθε βήμα αποπροστασίας και προσθήκης αμινοξέος πραγματοποιούνταν Kaiser test. Πριν την αποκοπή του πεπτιδίου έγινε η ακετυλίωση της Cys με 242 μl οξικού ανυδρίτη 446 μl DIPEA σε 1 ml NMP. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, η ρητίνη κατεργάστηκε με μείγμα TFA/TIS /H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5.v/v) (10 ml διαλύματος/g ρητίνης) σε θερμοκρασία δωματίου για 2.5 ώρες ώστε να πραγματοποιηθεί η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη, καθώς και να απομακρυνθούν οι προστατευτικές ομάδες. Έγινε διήθηση του διαλύματος και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε η προσθήκη παγωμένου διαιθυλαιθέρα, το πεπτίδιο φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησε η διαδικασία ξήρανσης υπό ψύξη ( freeze-drying) για 24 ώρες (Σχήμα 8.3).



**Σχήμα 8.3 :** Διαδικασία ξήρανσης υπό ψύξη ( freeze-drying) του πεπτιδίου.

### **8.5.2: Χαρακτηρισμός πεπτιδίου**

Το πεπτίδιο χαρακτηρίστηκε με Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (Alliance HPLC e2695,PDA 2998,Waters,Milford,MA,USA). Χρησιμοποιήθηκε στήλη 5 μm C<sub>18</sub> , 250- 2mm, Phenomenex. Ακολούθησε ισοκρατική μέθοδος με ροή στα 0.15 ml/min και διαλύτες 98%-2%( H<sub>2</sub>O/ACN).

Μέρος 6 : Αντίδραση μεταξύ του πεπτιδίου: Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A και του spacer :Mal-PEG-NH<sub>2</sub>

### 8.6.1 Αντίδραση μεταξύ του πεπτιδίου: Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A και του spacer :Mal-PEG-NH<sub>2</sub>

Χημικά :

- Mal-PEG-NH<sub>2</sub>, MW: 2K, Biochempeg
- Διάλυμα PBS, pH=7.4,C=0.1M
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο(DMSO),Acros

Πειραματική Διαδικασία:

Παρασκευάστηκε διάλυμα πεπτιδίου (2mg/ml,m=0.02 g) σε PBS V=10ml. Το τελικό pH του διαλύματος βρέθηκε στα 7.12. Ο spacer (m=0.66g) σε περίσσεια 20 φορές από το πεπτίδιο διαλύθηκε σε DMSO V=5ml. Ακολούθησε η προσθήκη του διαλύματος του spacer στο διάλυμα του πεπτιδίου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

### 8.6.2: Έλεγχος προόδου αντίδρασης

Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με Υγρή Χρωματογραφία (Alliance HPLC e2695, PDA 2998, Waters, Milford, MA, USA).Χρησιμοποιήθηκε στήλη 5 μm C<sub>18</sub> ,250- 2mm, Phenomenex. Ακολουθήθηκε ισοκρατική μέθοδος με ροή στα 0.15 ml/min και διαλύτες 98%-2% ( H<sub>2</sub>O/ACN).

Μέρος 7: Αντίδραση μεταξύ του πεπτιδίου: Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A και των σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>\_PAH\_PAA

### 8.7.1 Αντίδραση μεταξύ του πεπτιδίου: Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A και των σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>\_PAH\_PAA

Χημικά :

- N-(morpholino)ethanesulfonic acid (MES), Sigma Aldrich
- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC), Chem Matrix

- N-Hydroxysuccinimide (NHS), Sigma Aldrich
- Διάλυμα PBS, pH=7.4, C=0.1M

Πειραματική Διαδικασία:

Σωματίδια CaCO<sub>3</sub>\_PAH\_PAA (Μέθοδος 8.3.7, m=0.02 g) διασπάρθηκαν σε 5 ml διαλύματος MES (C=0.1 M, pH=6) . Ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος για 20 λεπτά. Έγινε η προσθήκη των διαλυμάτων EDC ( $3.3 \times 10^{-5}$  mol) σε 100 μl MES και NHS ( $3.3 \times 10^{-5}$  mol) σε 100 μl MES στο διάλυμα των σωματιδίων. Ακολούθησε ανάδευση για 40 λεπτά. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του διαλύματος του πεπτιδίου (2mg) σε 100 μl PBS. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το προϊόν καταβυθίστηκε με φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 20 λεπτά. Το προϊόν ξεπλύθηκε 3 φορές με διάλυμα PBS στις 6000 στροφές για 5 λεπτά. Το προϊόν αφέθηκε στο ξηραντήρα για 48 h.

## 8.7.2 Χαρακτηρισμός υλικού: CaCO<sub>3</sub>\_PAH\_PAA @ Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A

**8.7.2.1 Φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR):** 10 mg υλικού μετρήθηκαν με Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier για ανάλυση της επιφάνειας. Έγινε σύγκριση του φάσματος με αυτό των σωματιδίων καθώς και του πεπτιδίου .

**8.7.2.2 Θερμοβαρουμετρική Ανάλυση (TGA) :** 10 mg υλικού μετρήθηκαν με το όργανο TA-60 WS (SHIMADZU) με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 10<sup>0</sup>C/min σε εύρος θερμοκρασιών 25<sup>0</sup>C -800 <sup>0</sup>C.

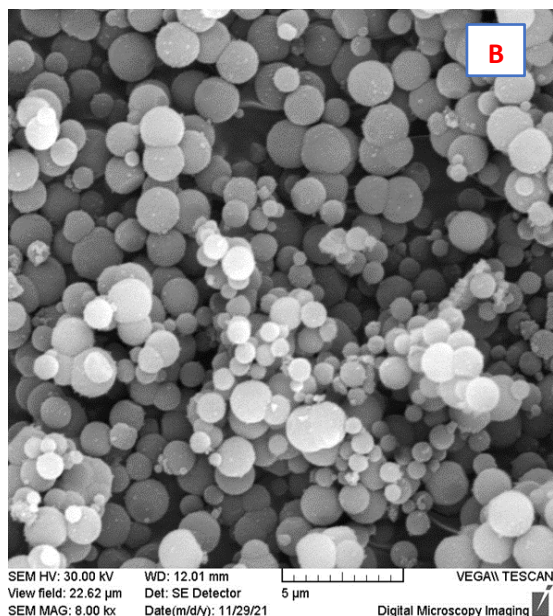
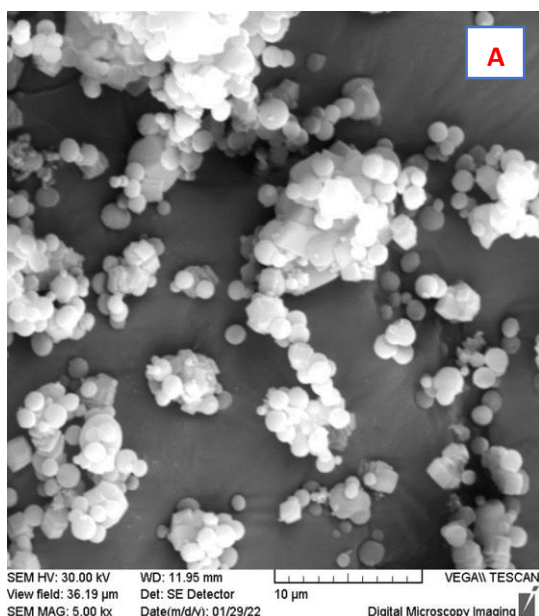
## Κεφάλαιο 9: Αποτελέσματα/Ανάλυση Αποτελεσμάτων

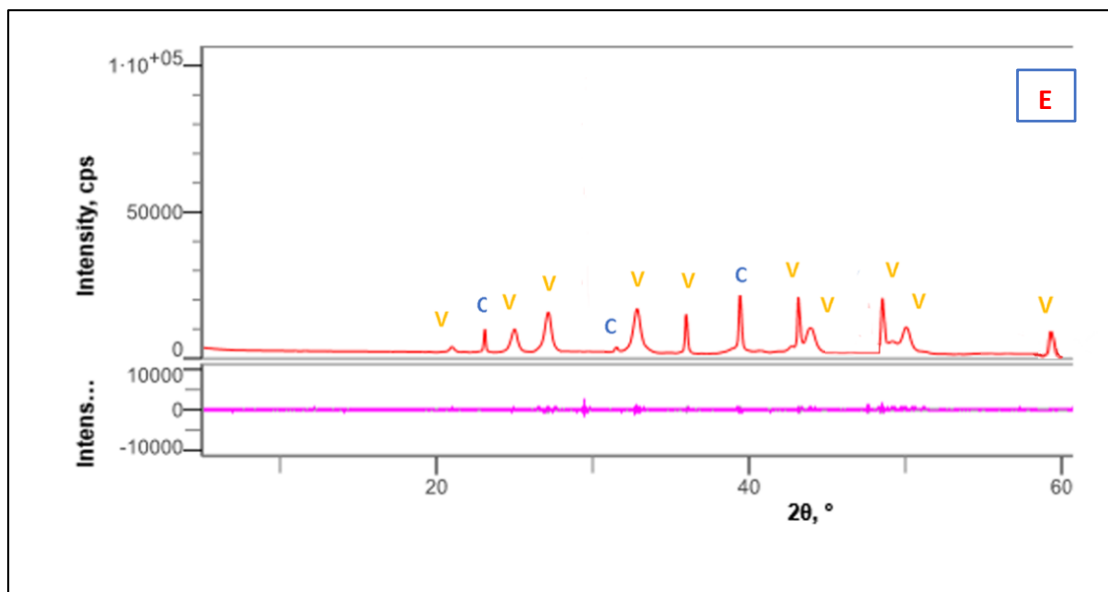
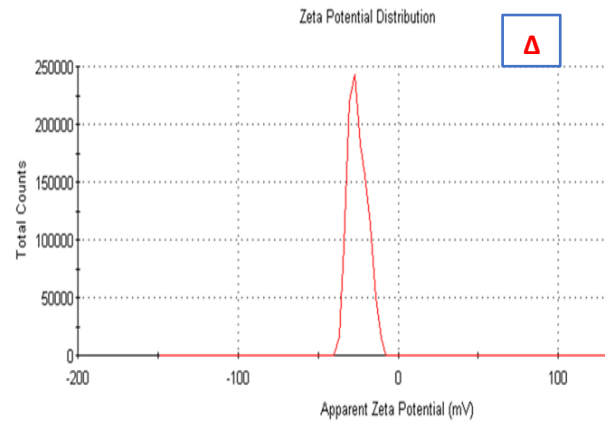
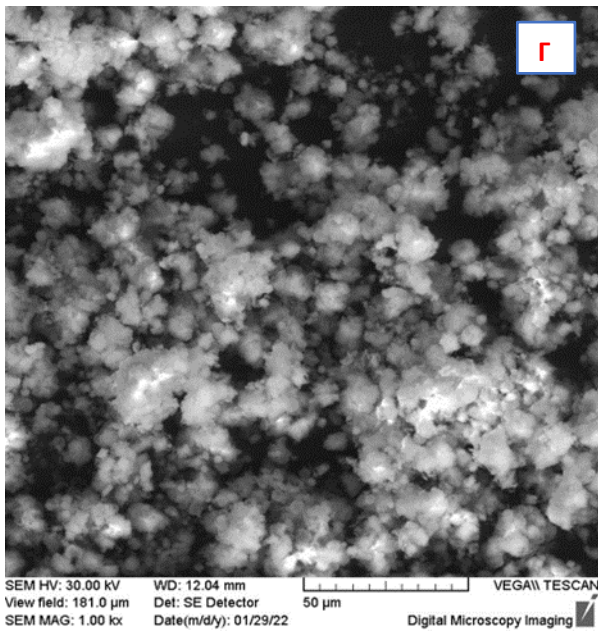
### 9.1 Συνθετικές διαδικασίες για επιλογή του κατάλληλου σταθεροποιητή

Η βιομηχανική μέθοδος με τη χρήση οργανικών προσθέτων θεωρείται μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τη σύνθεση σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ . Η χρήση προσθέτων επηρεάζει σημαντικά τη διαδικασία κρυστάλλωσης καθώς και την κινητική της ανακρυστάλλωσης προάγοντας το σχηματισμό ενός πολυμόρφου έναντι ενός άλλου. Στο Σχήμα 9.1 φαίνεται η επιδράση του πολυακρυλικού οξέος ( $C=0.1$  M,  $pH=8.5$ ) ως σταθεροποιητή σε διαφορετικές ροές αντιδραστηρίων και θερμοκρασίες.

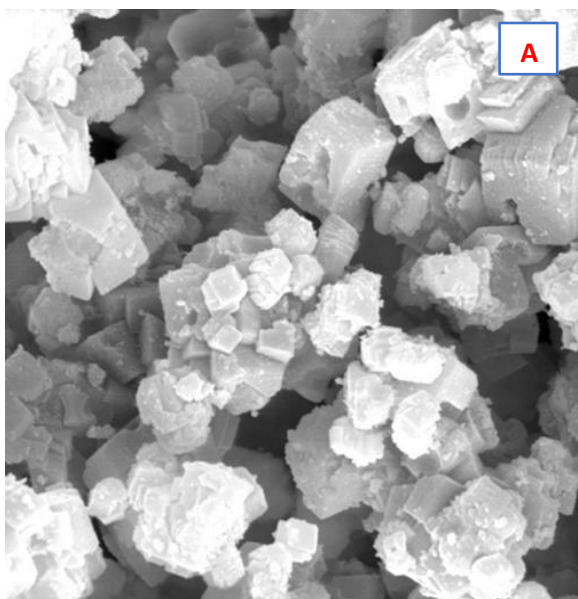
Σε θερμοκρασία  $30^\circ\text{C}$  και ροή  $60\text{ml/h}$  επιτυγχάνεται η σύνθεση σφαιρικών σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  με μέση διάμετρο  $1\mu\text{m}$  (Σχήμα 9.1B). Πιο κάτω απεικονίζεται το περιθλασόγραμμα για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία όπου οι περισσότερες κορυφές αντιστοιχούν σε αυτές του βατερίτη (Σχήμα 9.1E).

Αφού η σύνθεση των σωματιδίων έγινε σε διάλυμα πολυακρυλικού οξέος, η φόρτιση της επιφάνειας είναι αρνητική, όπως αναμενόταν και επιβεβαιώνεται από τη μέτρηση ζ δυναμικού ( $-17\text{mV}\pm 3$ , Σχήμα 9.1Δ). Η ομοιομορφία των σωματιδίων τα καθιστά κατάλληλα ώστε να γίνει η προσθήκη επιπλέον στρωμάτων από άλλους πολυηλεκτρολύτες.

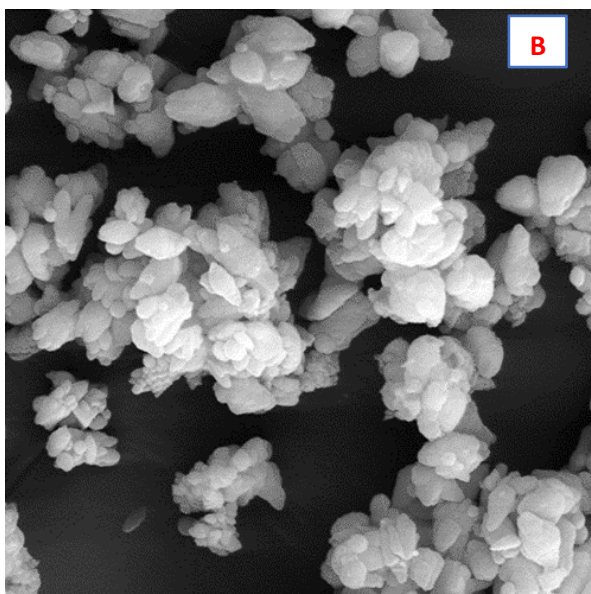




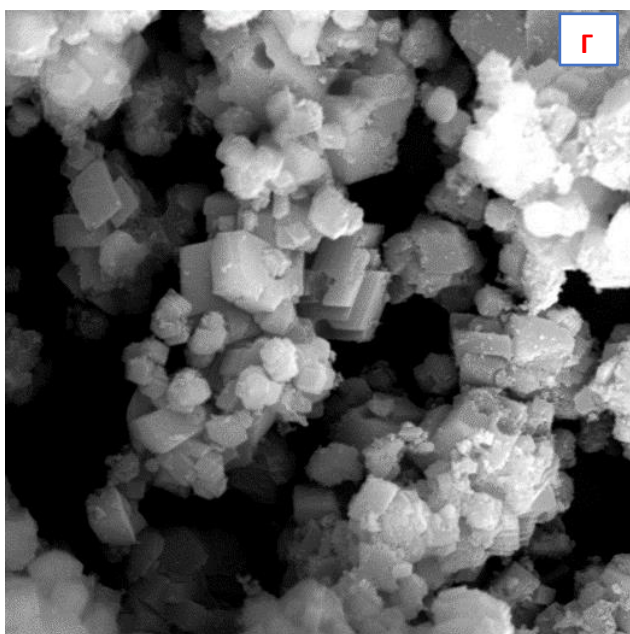
**Σχήμα 9.1:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  που έχουν παραχθεί με χρήση πολυακρυλικού οξέος ( $C=0.1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8.5$ ) ως σταθεροποιητή με ροή αντιδραστηρίων  $60 \text{ ml/h}$  σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Α:  $T=25^\circ\text{C}$ , Β:  $T=30^\circ$ , Γ:  $T= 40^\circ\text{C}$ , Δ: Μέτρηση ζ - δυναμικού για συνθετική πορεία 1Β, Ε:Περιθλασόγραμμα  $V=\text{vaterite}$ (βατερίτης),



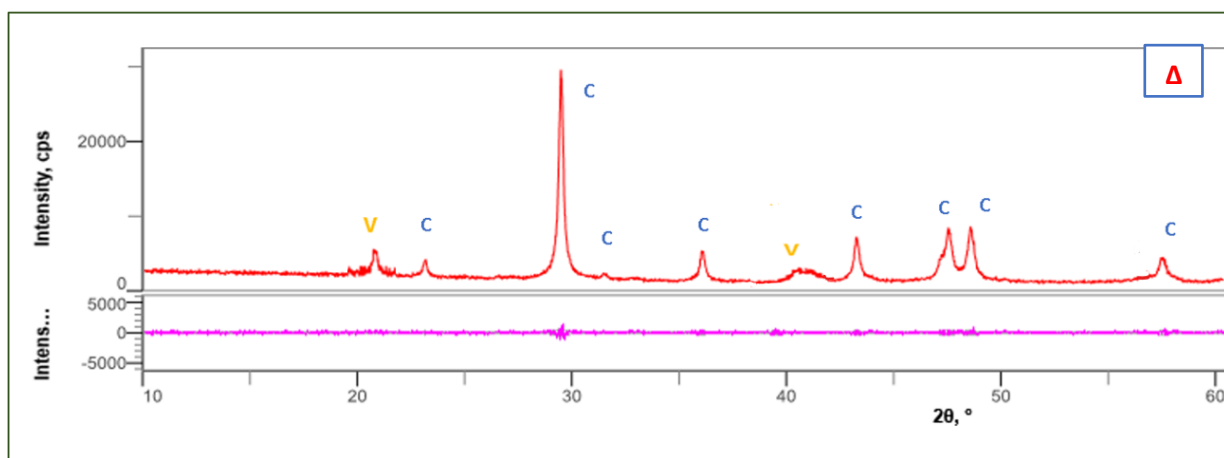
SEM HV: 30.00 kV WD: 11.76 mm VEGA\\ TESCAN  
View field: 36.28  $\mu$ m Det: SE Detector  
SEM MAG: 4.99 kx Date(m/d/y): 01/29/22  
10  $\mu$ m Digital Microscopy Imaging



SEM HV: 30.00 kV WD: 12.02 mm VEGA\\ TESCAN  
View field: 60.32  $\mu$ m Det: SE Detector  
SEM MAG: 3.00 kx Date(m/d/y): 11/29/21  
10  $\mu$ m Digital Microscopy Imaging



SEM HV: 30.00 kV WD: 11.87 mm VEGA\\ TESCAN  
View field: 36.25  $\mu$ m Det: SE Detector  
SEM MAG: 4.99 kx Date(m/d/y): 01/29/22  
10  $\mu$ m Digital Microscopy Imaging

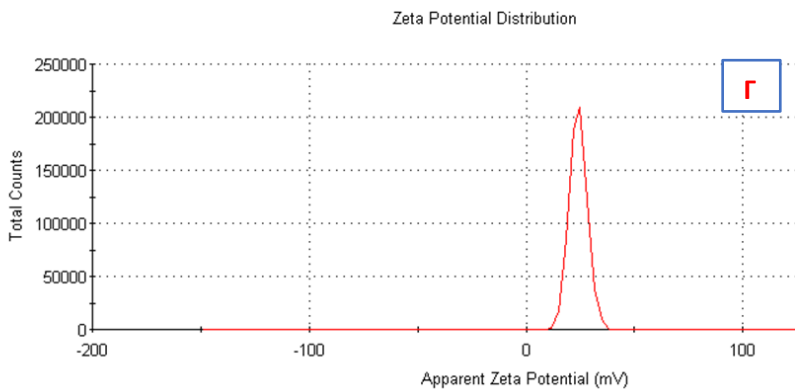
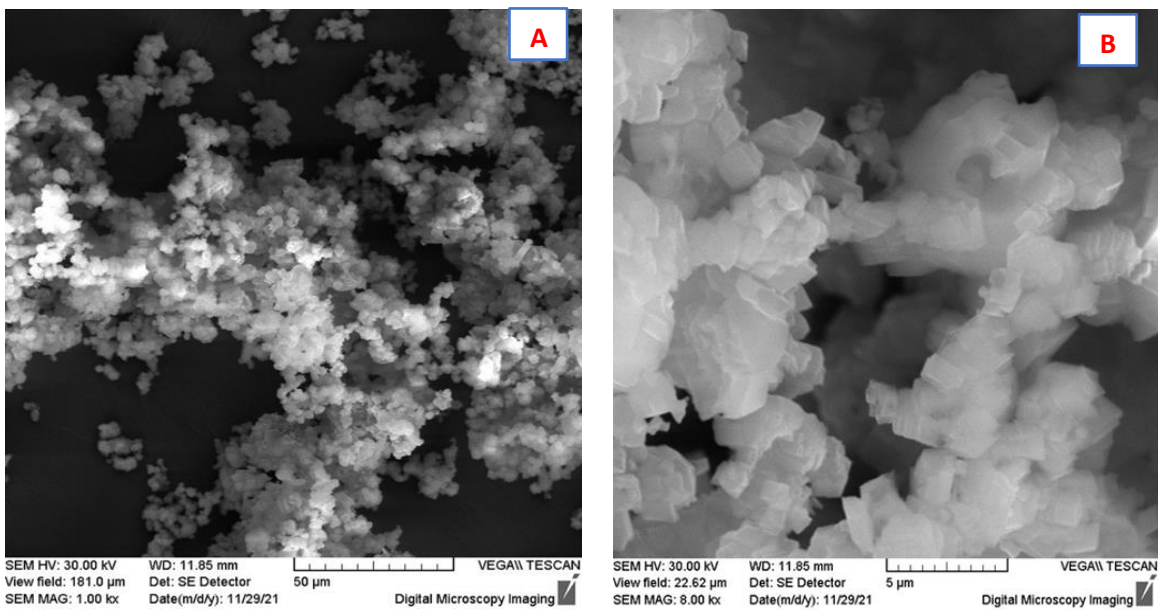


**Σχήμα 9.2:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  που έχουν παραχθεί με χρήση πολυακρυλικού οξέος ( $C=0.1$  M,  $\text{pH}=8.5$ ) ως σταθεροποιητή με ροή αντιδραστηρίων 30 ml/h σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Α:  $T=25^\circ\text{C}$ , Β:  $T=30^\circ$ , Γ:  $T= 40^\circ\text{C}$ , Δ: Περιθλασόγραμμα V=vaterite(βατερίτης), C=calcite(ασβεστίτης).

Παρατηρούμε ότι σε μικρότερες ροές αντιδραστηρίων (30 ml/h) τα σωματίδια έχουν μορφολογία πλακιδίων που υποδεικνύει την παρουσία ασβεστίτη (Σχήμα 9.2 Α-Γ). Πιο πάνω απεικονίζεται Τα περιθλασογράμματα για τις πειραματικές διαδικασίες με ροή αντιδραστηρίων στα 30 ml/h σε διαφορετικές θερμοκρασίες συμπίπτουν μεταξύ τους. Στο πιο πάνω περιθλασόγραμμα φαίνεται πως το κυρίαρχο πολύμορφο είναι αυτό του ασβεστίτη (Σχήμα 9.2Δ).

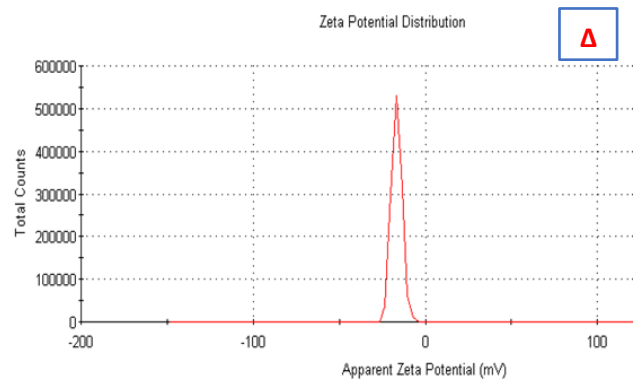
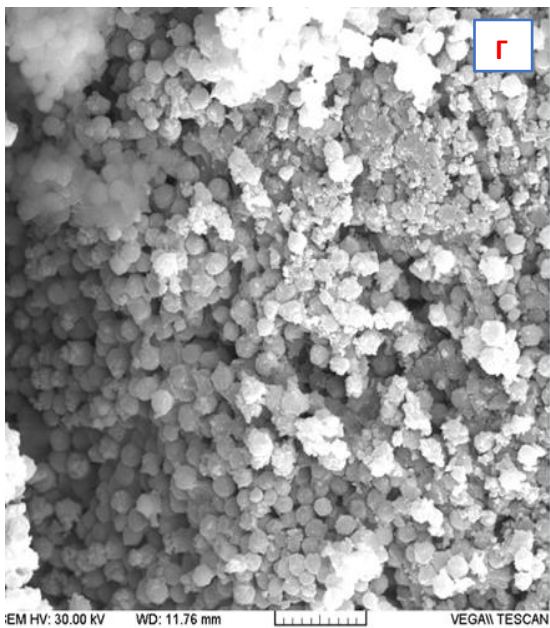
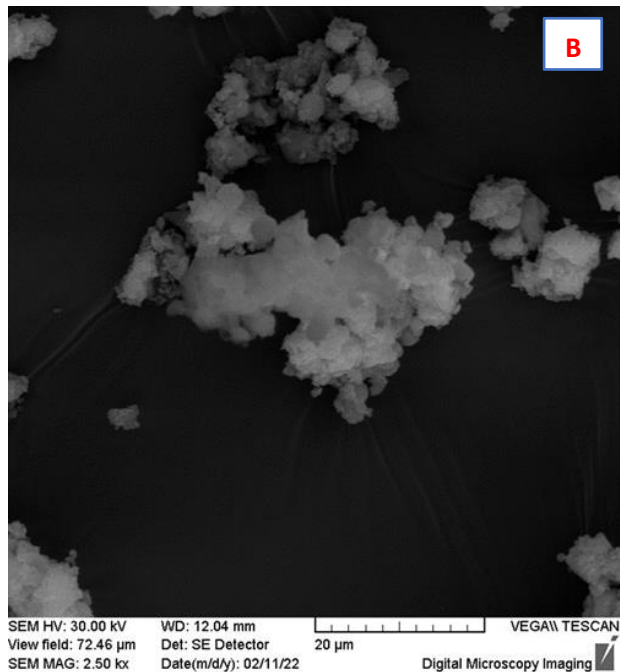
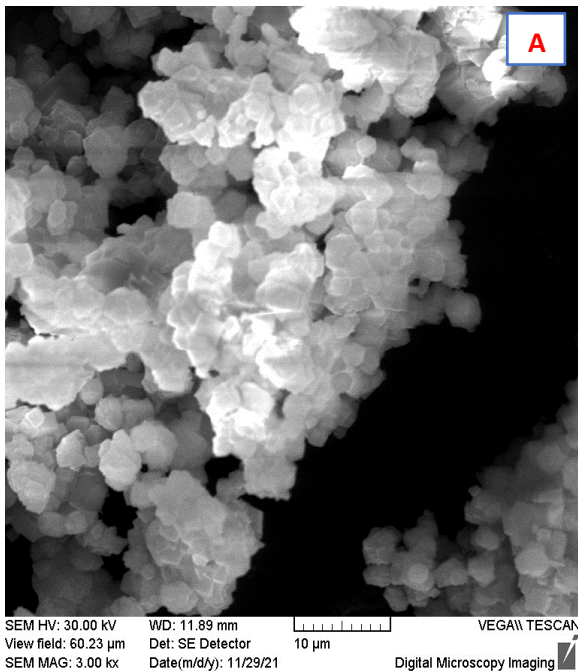
Έγινε επίσης η προσπάθεια για σύνθεση σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  με την προσθήκη χιτοζάνης ως σταθεροποιητή. Η φόρτιση της επιφάνειας είναι θετική όπως αναμενόταν και επιβεβαιώνεται από τη μέτρηση ζ δυναμικού ( $+24 \pm 4.01\text{mV}$ , Σχήμα 9.3Γ). Παρατηρείται όμως εκτεταμένη συσσωμάτωση των σωματιδίων, γεγονός που τα καθιστά ακατάλληλα για χρήση σε χρωματογραφικές εφαρμογές (Σχήμα 9.3Α-Β).





**Σχήμα 9.3:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  με χρήση χιτοζάνης (10mg/ml,pH=4) με ροή αντιδραστηρίων 60 ml/h pH=4 A: Μεγέθυνση x1000 ,B: Μεγέθυνση x8000,Γ: Μέτρηση ζ -δυναμικού.

Έγινε προσπάθεια για σύνθεση σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  με την προσθήκη ντοπαμίνης ως σταθεροποιητή με τρεις διαφορετικές συνθετικές πορείες: (α) Με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου-ντοπαμίνης με ροή 60 ml/h. (β) Με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου και χλωριούχου ασβεστίου σε διάλυμα ντοπαμίνης (3mg/ml) με ροή 10 ml/h. (γ) Με τη μέθοδο της ενανθράκωσης και χρήση  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Το ζ-δυναμικό βρέθηκε στα  $-17 \pm 4 \text{ mV}$  (Σχήμα 9.4 Δ). Τα σωματίδια στις δύο πρώτες περιπτώσεις (Σχήμα 9.4 A-B) παρουσιάζουν εκτεταμένη συσσωμάτωση και είναι ακατάλληλα για περαιτέρω επικαλύψεις. Η διεργασία ενανθράκωσης παρέχει καλύτερο υλικό, ωστόσο η επιφάνεια των σωματιδίων είναι αρκετά ανώμαλη σε σύγκριση με άλλες συνθετικές οδούς που έχουν περισσότερα πλεονεκτήματα.

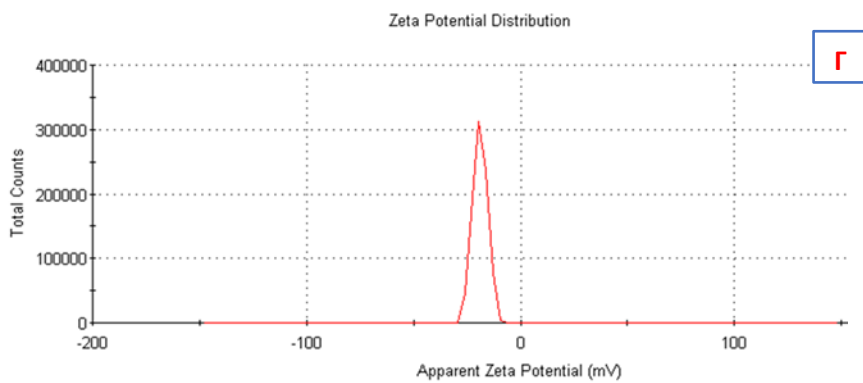
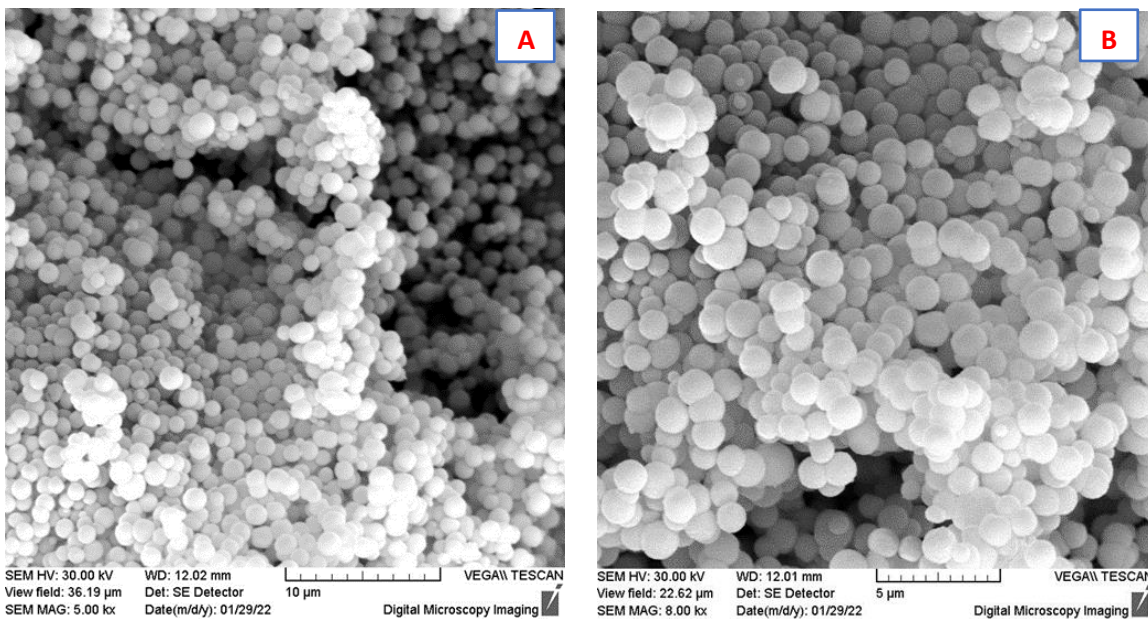


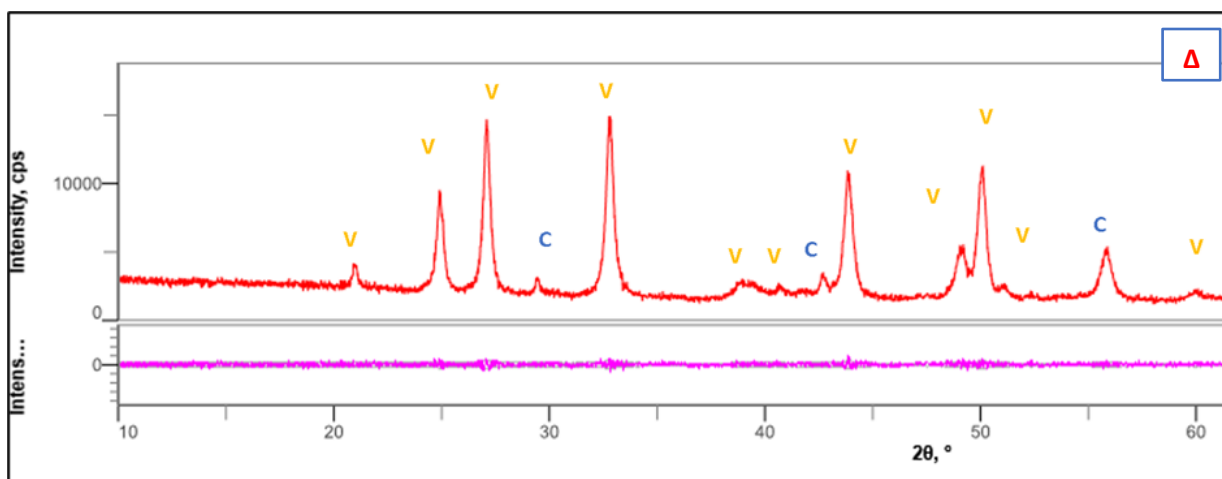
**Σχήμα 9.4:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  με χρήση ντοπαμίνης A: Με ροή αντιδραστηρίων 60 ml/h pH=8.5 , B: Με ροή αντιδραστηρίων 10 ml/h, pH=8.5, Γ: Σύνθεση μέσω αντίδρασης εναναθράκωσης και χρήση  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , Δ: Μέτρηση ζ-δυναμικού.

Το πολυ(4-στυρενοσουλφονικό νάτριο) αποδείχθηκε από προηγούμενες μελέτες<sup>{48}</sup> πως προάγει το σχηματισμό μονοδιάσπαρτων σφαιρών βατερίτη. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας πειραματικά δεδομένα. Σε συγκέντρωση πολυμερούς 1mg/ml και pH=10 επιτυγχάνεται η σύνθεση σφαιρικών σωματιδίων

CaCO<sub>3</sub> με μέση διάμετρο 1μm (Σχήμα 9.5 A-B). Η ομοιομορφία των σωματιδίων τα καθιστά κατάλληλα για περαιτέρω επιφανειακή τροποποίηση.

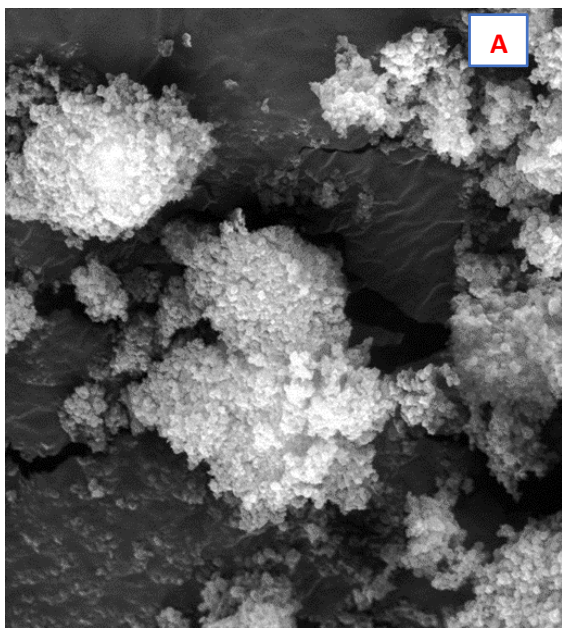
Η φόρτιση της επιφάνειας είναι αρνητική όπως αναμενόταν και επιβεβαιώνεται από τη μέτρηση ζ δυναμικού (-19 mV±4 mV, Σχήμα 9.5Γ). Στο περιθλασόγραμμα επιβεβαιώνεται πως το κυρίαρχο πολύμορφο είναι αυτό του βατερίτη (Σχήμα 9.5Δ).



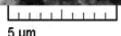


**Σχήμα 9.5:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  με χρήση πολυ(4-στυρενοσουλφονικού νατρίου)  $C=1\text{mg/ml}$ ,  $\text{pH}=10$  A: Μεγέθυνση  $\times 5000$ , B: Μεγέθυνση  $\times 8000$ , Γ: Μέτρηση ζ-δυναμικού, Δ: Περιθλασόγραμμα V=vaterite(βατερίτης), C=calcite(ασβεστίτης).

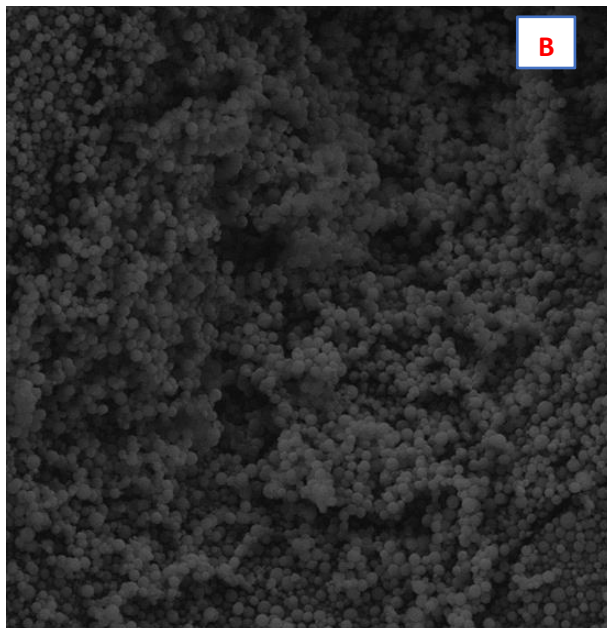
Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  χωρίς τη χρήση προσθέτων σε διάλυμα αιθυλενογλυκόλης/νερού (84%) με την προσθήκη 10 ml ( $C=0.1\text{M}$ ) ανθρακικού νατρίου και 10 ml χλωριούχου ασβεστίου ( $C=0.1\text{M}$ ). Τα σωματίδια δεν είχαν την επιθυμητή μορφολογία ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πλατφόρμες για την προσθήκη στρωμάτων πολυμερών (**Σχήμα 9.6A**). Πραγματοποιήθηκε επίσης η σύνθεση σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  με την προσθήκη 100 ml ( $C=0.025\text{M}$ ) ανθρακικού νατρίου και 10 ml χλωριούχου ασβεστίου ( $C=0.025\text{M}$ ) (**Σχήμα 9.6 B-Γ**). Τα σωματίδια είχαν την επιθυμητή μορφολογία ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πλατφόρμα για την προσθήκη στρωμάτων πολυμερών. Το ζ-δυναμικό βρέθηκε στα  $-25\text{ mV} \pm 4\text{ mV}$  (**Σχήμα 9.6 Δ**). Από το περιθλασόγραμμα επιβεβαιώνεται πως το κυρίαρχο πολύμορφο είναι αυτό του βατερίτη (**Σχήμα 9.6 E**). Από το περιθλασόγραμμα επιβεβαιώνεται πως το κυρίαρχο πολύμορφο είναι αυτό του βατερίτη (**Σχήμα 9.6 E**).



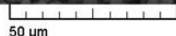
SEM HV: 30.00 kV WD: 11.96 mm  
 View field: 25.85  $\mu$ m Det: SE Detector  
 SEM MAG: 7.00 kx Date(m/d/y): 02/04/22



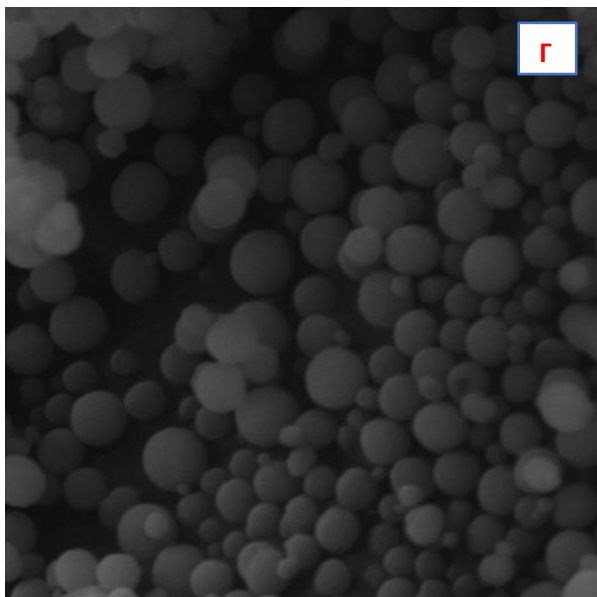
**A**



SEM HV: 30.00 kV WD: 12.00 mm  
 View field: 182.0  $\mu$ m Det: SE Detector  
 SEM MAG: 995 x Date(m/d/y): 11/02/22



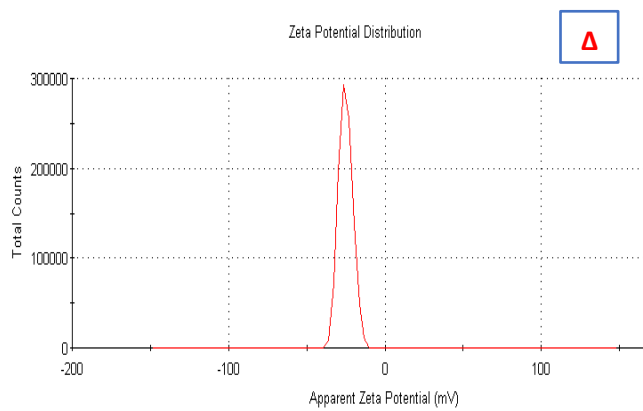
**B**



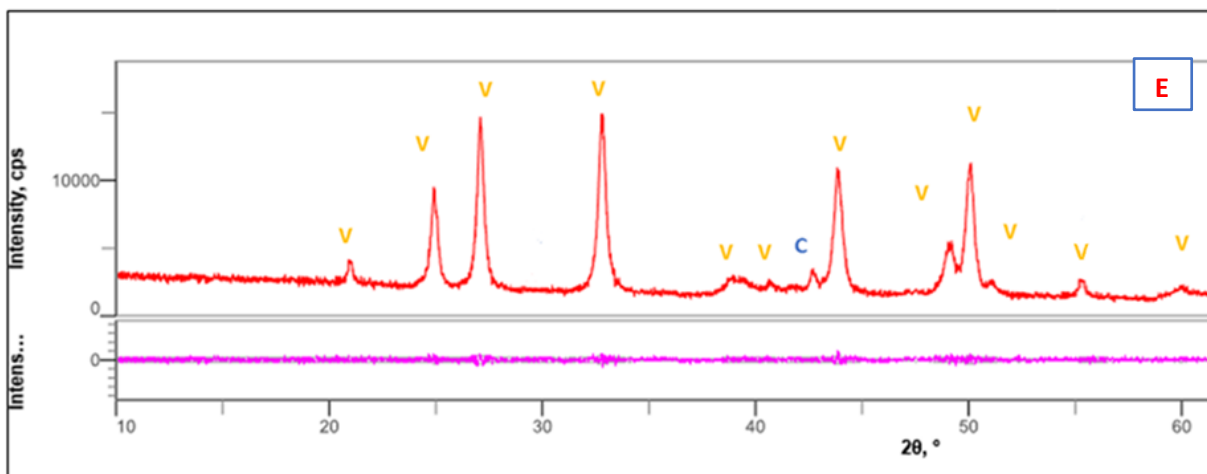
SEM HV: 30.00 kV WD: 12.04 mm  
 View field: 36.23  $\mu$ m Det: SE Detector  
 SEM MAG: 5.00 kx Date(m/d/y): 11/02/22



**C**

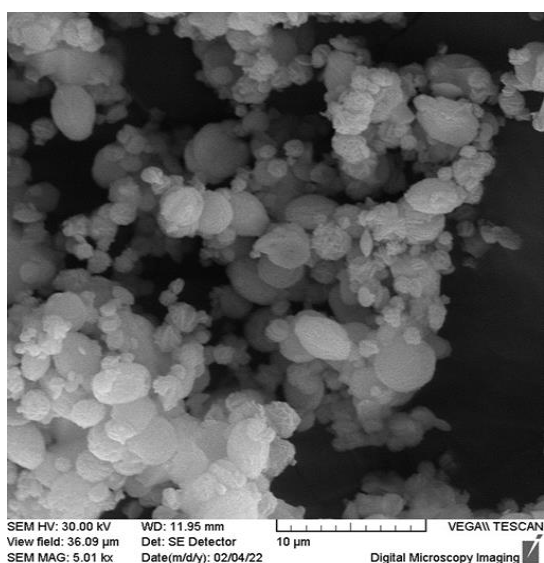


**D**



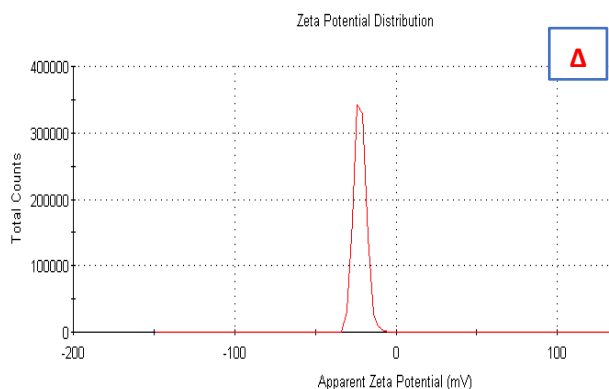
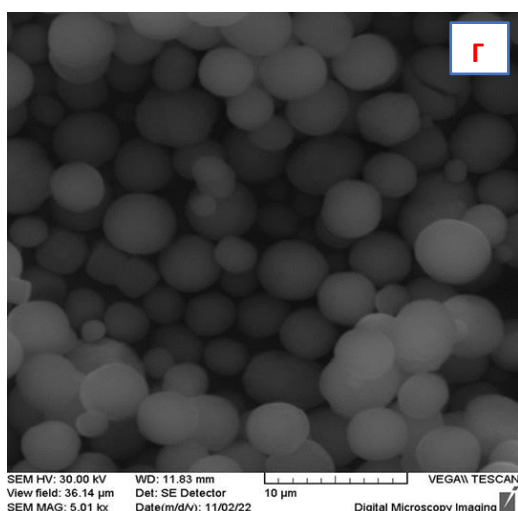
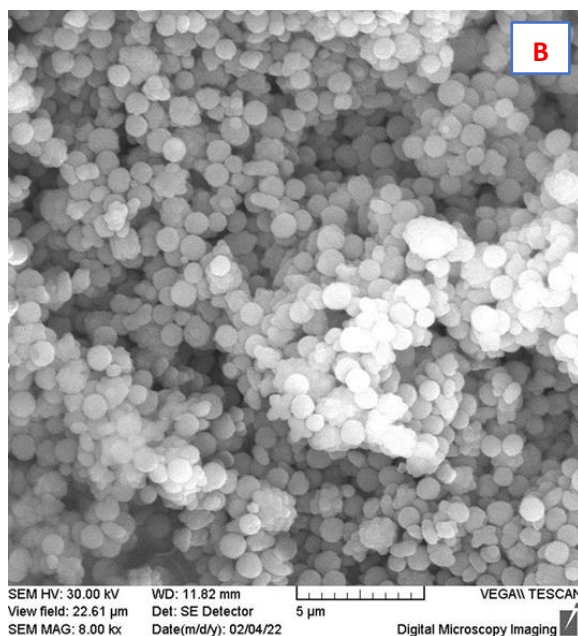
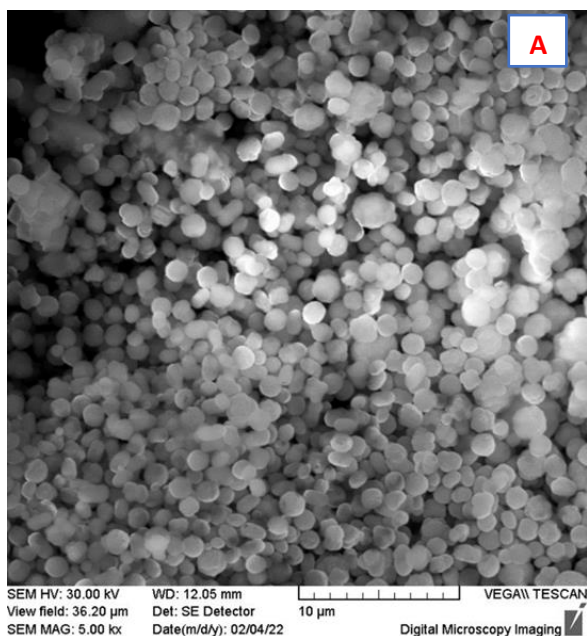
**Σχήμα 9.6:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  A: σε δ/μα διάλυμα αιθυλενογλυκόλης/νερού (84%) και συγκέντρωση αλάτων 0.1 M B: δ/μα αλάτων σε συγκέντρωση 0.025 M, σε μεγέθυνση x995, Γ: δ/μα αλάτων σε συγκέντρωση 0.025 M, σε μεγέθυνση x5000 ,Δ: Μέτρηση ζ -δυναμικού για συνθετική διαδικασία B, E: Περιθλασόγραμμα V=vaterite(βατερίτης), C=calcite(ασβεστίτης).

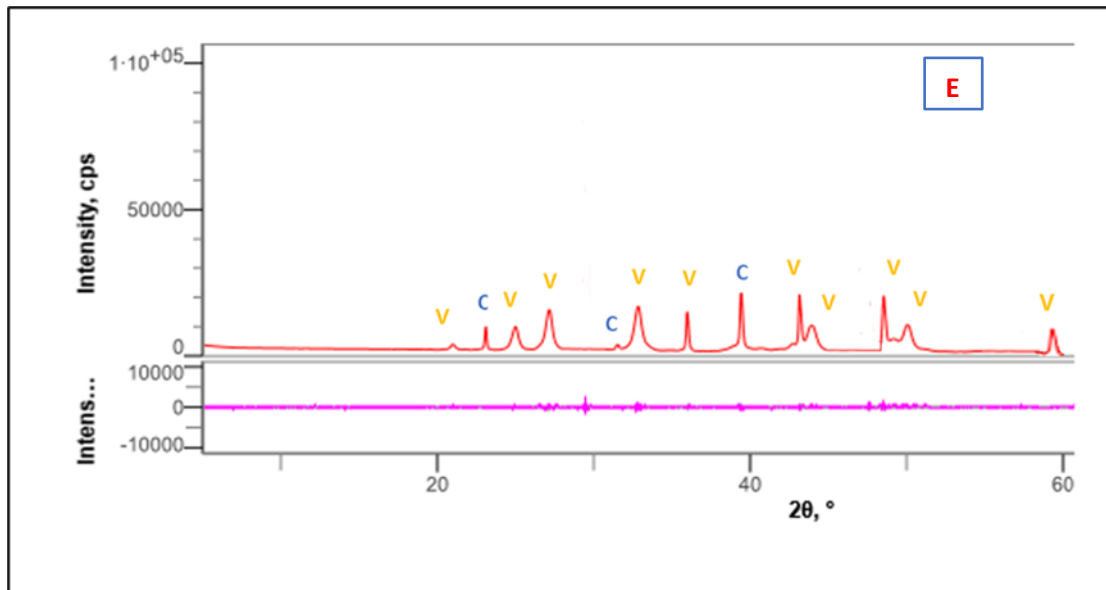
Έγινε ακόμη η σύνθεση σωματιδίων με πρόσθετο την αργινίνη. Στο **Σχήμα 9.7** φαίνεται ότι το πρόσθετο αυτό, υπό τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν, οδηγεί σε αρκετά ευρεία κατανομή μεγεθών και σχημάτων και δεν προτιμήθηκε για περαιτέρω μελέτες.



**Σχήμα 9.7:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  με τη προσθήκη αργινίνης .

Έγινε σύνθεση σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  με την προσθήκη καρβοξυμέθυλοκυτταρίνης 0.5% με μοριακά βάρη 250 000 και 90 000 g/mol σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου 0.032 M. Ακολουθούσε η προσθήκη (χωρίς συγκεκριμένη ροή) ανθρακικού νατρίου ( $C=0.4$  M) με ροή 10ml/h. Έγινε επίσης προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου  $C=0.025$ M σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου  $C=0.025$ M /Καρβοξυμέθυλοκυτταρίνης 5%. Από αυτές τις πειραματικές πορείες προκύπτουν σωματίδια βατερίτη (Σχήμα 9.8 Ε) με καλή διασπορά ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πλατφόρμες για την επιπλέον προθήκη νέου στρώματος πολυμερούς. Οι πειραματικές διαδικασίες όπου γινόταν η προσθήκη των αντιδραστηρίων με ροή 10ml/h έδωσαν πιο μικρά σωματίδια(Σχήμα 9.8 Α-Β) σε σύγκριση με τη σύνθεση χωρίς συγκεκριμένη ροή (Σχήμα 9.8 Γ). Το ζ-δυναμικό βρέθηκε στα  $-22 \text{ mV} \pm 4 \text{ mV}$  (Σχήμα 9.8Δ) .

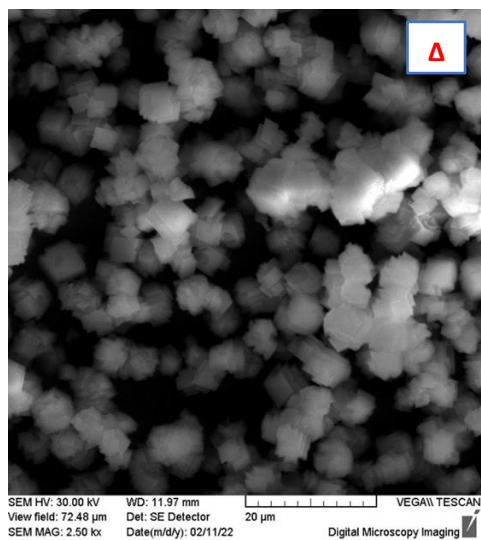
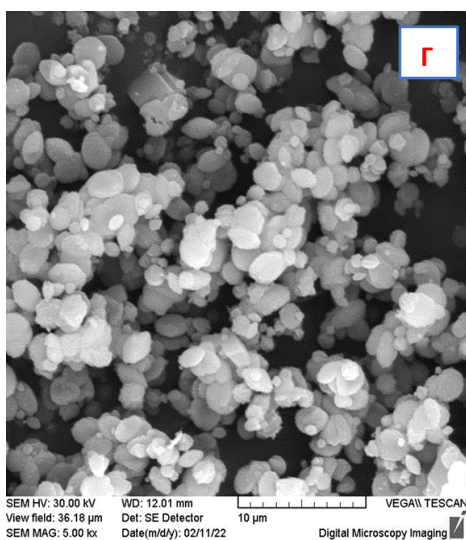
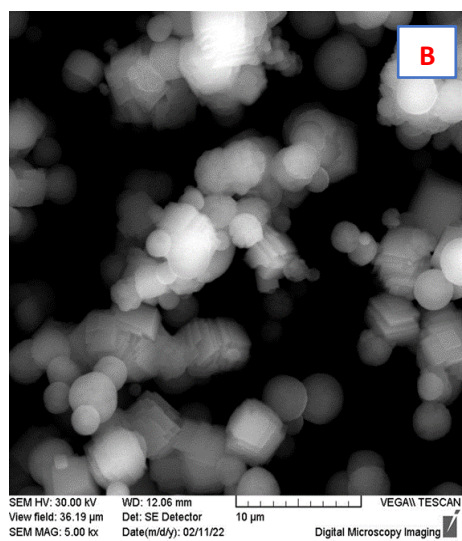
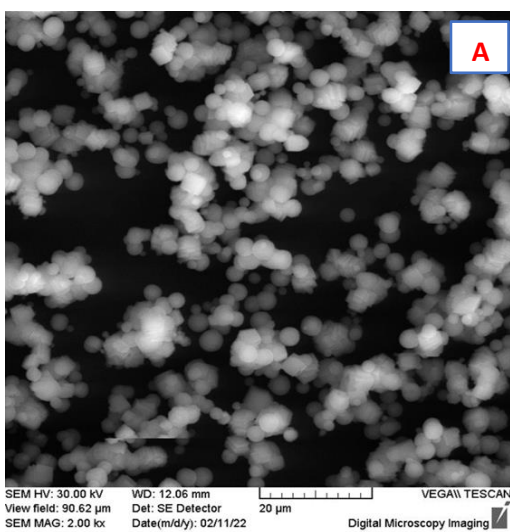




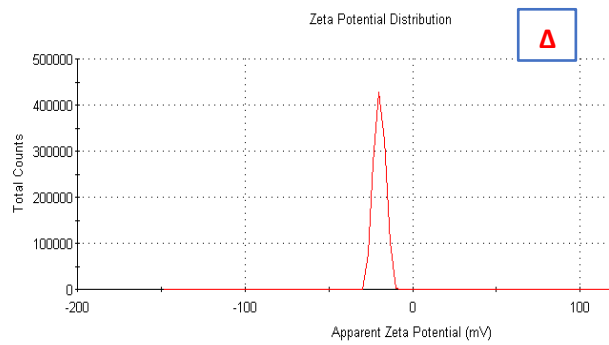
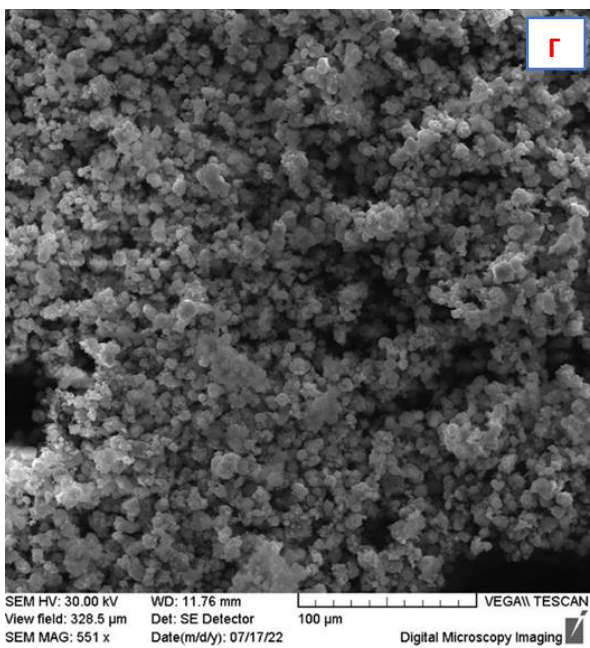
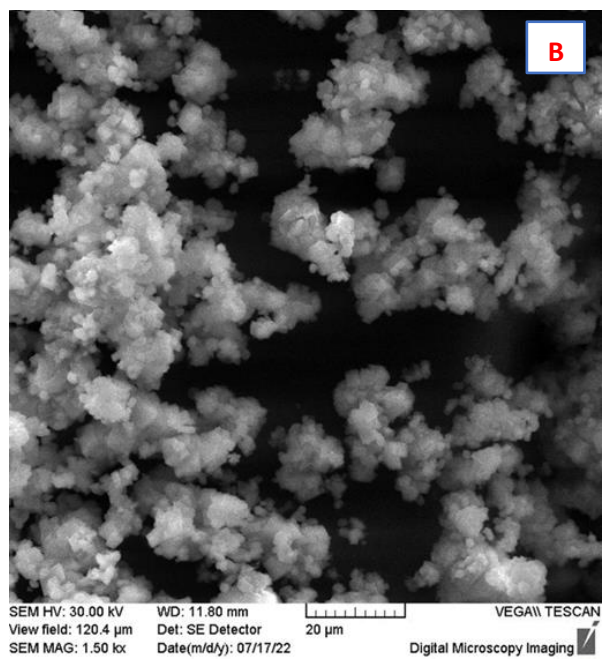
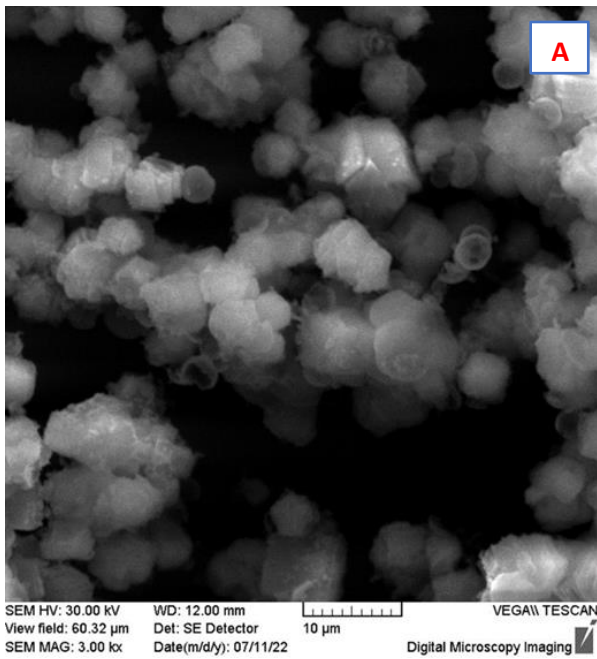
**Σχήμα 9.8:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  με πρόσθετο την καρβοξυμέθυλο κυτταρίνη A:MB:90 000g/mol,  $C_{\text{CaCl}_2}=0.025\text{M}$ ,  $C_{\text{Na}_2\text{CO}_3}=0.4\text{M}$  10ml/h. ,B:MB:250 000 g/mol  $C_{\text{CaCl}_2}=0.025\text{M}$ ,  $C_{\text{Na}_2\text{CO}_3}=0.4\text{M}$  10ml/h,Γ: MB:250 000 g/mol ,  $C_{\text{CaCl}_2}=0.025\text{M}$ ,  $C_{\text{Na}_2\text{CO}_3}=0.025\text{M}$  σε μεγέθυνση ,Δ:Μέτρηση ζ - δυναμικού, Ε: Περιθλασόγραμμα V=vaterite(βατερίτης), C=calcite(ασβεστίτης) για πειραματική πορεία A-B).

Δοκιμάστηκε ακόμη η σύνθεση σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  με πρόσθετο το πολυμεθακρυλικό οξύ. Έγινε η σύνθεση των σωματιδίων με προσθήκη των αλάτων χλωριούχου ασβεστίου ( $C=0.5\text{ M}$ ,  $\text{pH}=8.5$  και  $\text{pH}=9$ ) και ανθρακικού καλίου ( $C=0.5\text{ M}$ ,  $\text{pH}=8.5$  και  $\text{pH}=9$ ) με ροή 60 ml/h σε 300 ml νερού όπου υπήρχαν διαφορετικές ποσότητες πολυμεθακρυλικού οξέος: 100, 125 και 150  $\mu\text{l}$  συγκέντρωσης  $C=0.1\text{ M}$ . Παρατηρούμε ότι σε  $\text{pH}=9$  (**Σχήμα 9.9**) τα σωματίδια έχουν καλύτερη μορφολογία, ενώ και η συσσωμάτωση περιορίζεται σημαντικά. Με την αύξηση της ποσότητας του μεθακρυλικού οξέος παρατηρείται ως κυρίαρχο πολύμορφο αυτό του ασβεστίτη, όπως φαίνεται από τη φυλλώδη μορφολογία των σωματιδίων.



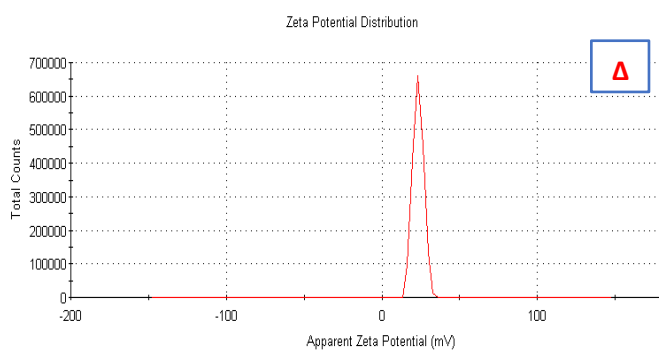
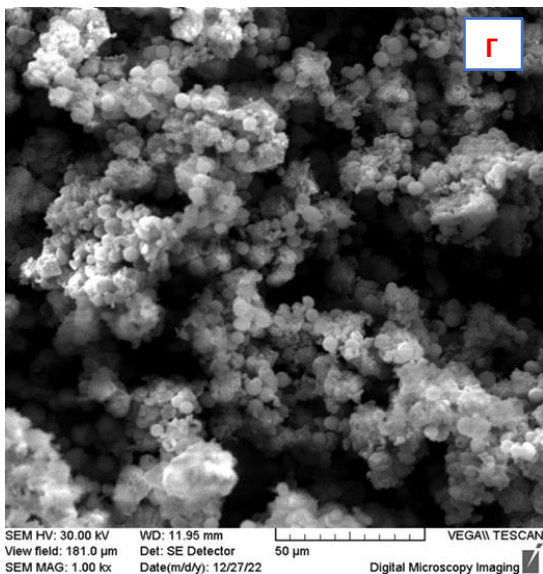
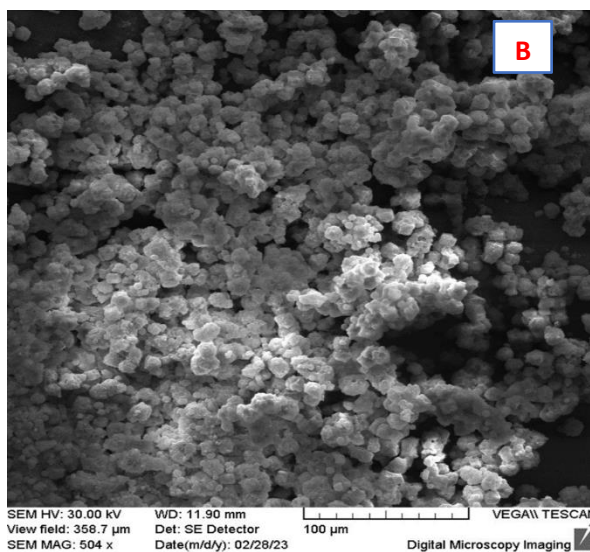
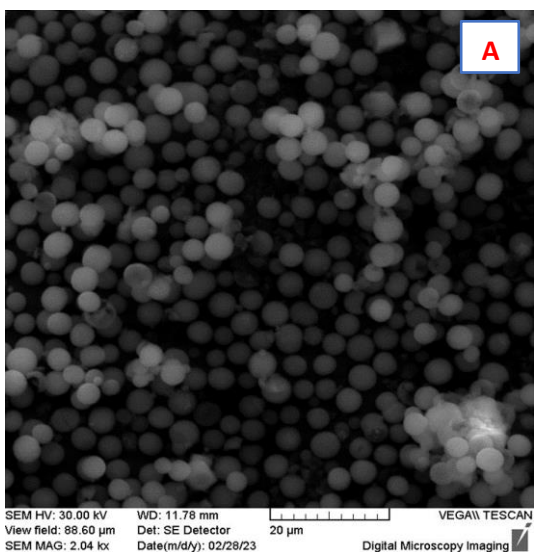


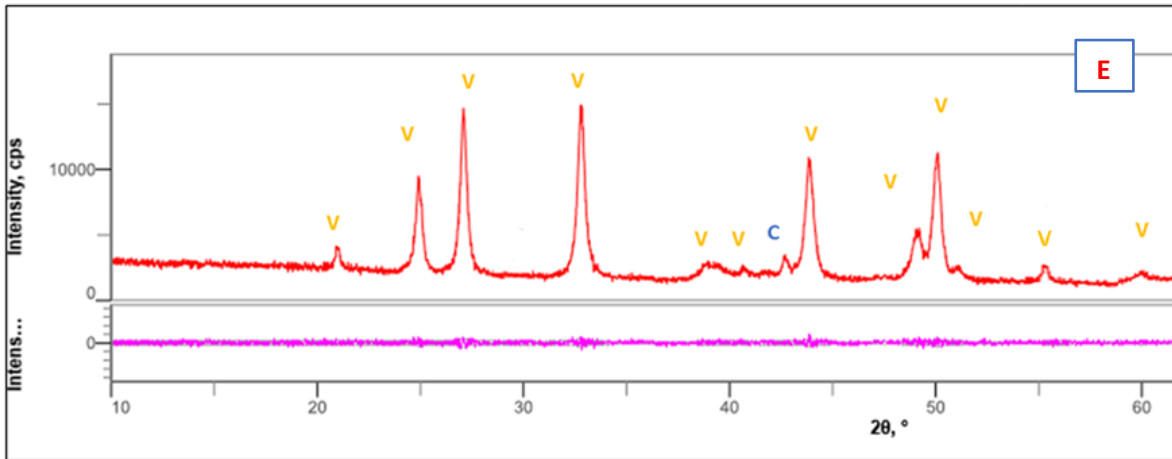
**Σχήμα 9.9:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  με πρόσθετο το πολυμεθακρυλικό οξύ  $\text{pH}=9, C=0.1$  Α: 100 μl μεγέθυνση x 2000, Β: 100 μl μεγέθυνση x 5000, Γ: 125 μl, Δ: 150 μl.



**Σχήμα 9.10:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  με πρόσθετο το πολυμεθακρυλικό οξύ  $\text{pH}=8.5, C=0.1 \text{ M}$  A: 100  $\mu\text{l}$ , B: 100  $\mu\text{l}$ , Γ: 125  $\mu\text{l}$ , Δ: Μέτρηση ζ-δυναμικού για πειραματική πορεία A .

Ως σταθεροποιητής μελετήθηκε επίσης η πολυ(υδροχλωρική αλλουλαμίνη) σε δύο διαφορετικά μοριακά βάρη. Σε διάλυμα πολυ(υδροχλωρικής αλλουλαμίνης) (2mg/ml, V=5 ml, pH=7) σε NaCl 0.5M διασπάρθηκαν σωματίδια CaCO<sub>3</sub>. Το μοριακό βάρος του πολυμερούς έχει καθοριστικό ρόλο στη μορφολογία των σωματιδίων. Όπως φαίνεται και στις πιο κάτω εικόνες SEM (Σχήμα 9.11 A) καθώς και από το περιθλασόγραμμα (Σχήμα 9.11 E) το πολυμερές με το μεγαλύτερο MB δίνει πολύ καλύτερα αποτελέσματα με κυρίαρχο πολύμορφο αυτό του βατερίτη. Η επιτυχής επίστρωση επιβεβαιώνεται και από τη θετική τιμή φόρτισης της επιφάνειας (+23.4 ± 3.38mV) (Σχήμα 9.11 Δ).





**Σχήμα 9.11:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  με πρόσθετο την πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη)  $\text{pH}=7$ ,  $\text{C}=2\text{mg/ml}$   
 A:MB=56 000 g/mol,B: 8000 g/mol,Γ: 17 500 g/mol, Δ:Μέτρηση ζ-δυναμικού για πειραματική πορεία A,  
 E: Περιθλασόγραμμα V=vaterite(βατερίτης), C=calcite(ασβεστίτης).

Στον πιο κάτω πίνακα συνοψίζονται οι πειραματικές μέθοδοι που μελετήθηκαν για την επίδραση του προσθέτου στη μορφολογία των σωματιδίων (**Πίνακας 9.1**).

**Πίνακας 9.1:** Επίδραση Προσθέτων στη μορφολογία των σωματιδίων .

Πρόσθετο	Συνθήκες	Κυρίαρχο Πολύμορφο
Πολυακρυλικό οξύ (PAA) MW:5100 g/mol,35 wt%	$C_{Na_2CO_3}=0.5M, C_{CaCl_2}=0.5M,$ 60 ml/h $C_{PAA}=0.5 M, pH=8.5$ $T=25^{\circ}C$	C
	$C_{Na_2CO_3}=0.5M, C_{CaCl_2}=0.5M$ 60 ml/h $C_{PAA}=0.5 M, pH=8.5$ $T=30^{\circ}C$	V
	$C_{Na_2CO_3}=0.5M, C_{CaCl_2}=0.5M$ 60 ml/h $C_{PAA}=0.5M, pH=8.5$ $T=40^{\circ}C$	C
	$C_{Na_2CO_3}= 0.5M, C_{CaCl_2}=0.5M$ 30 ml/h $C_{PAA}=0.5 M, pH=8.5$ $T=25^{\circ}C$	C
	$C_{Na_2CO_3}=0.5M,$ $C_{CaCl_2}=0.5M, 30 ml/h$ $C_{PAA}=0.5 M$ $pH=8.5, T=30^{\circ}C$	C
	$C_{Na_2CO_3}=0.5M,$ $C_{CaCl_2}=0.5M,$ 30 ml/h $C_{PAA}=0.5 M,$	C

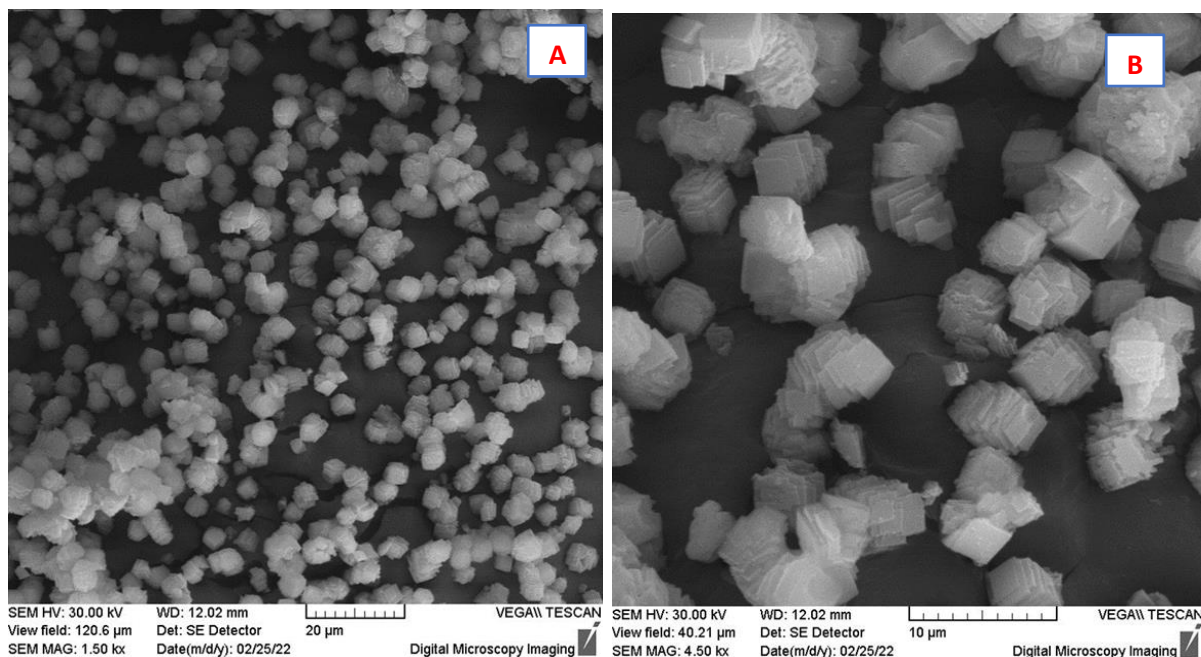
	<p>pH=8.5 T=40°C</p>	
<p>Πολυμεθακρυλικό Οξύ MB=9500 g/mol</p>	<p><math>C_{Na_2CO_3}=0.5M, C_{CaCl_2}=0.5M</math> 60 ml/h <math>C_{PAA}=0.5 M, pH=8.5</math> T=25°C</p>	C
	<p><math>C_{Na_2CO_3}= 0.5M</math> <math>C_{CaCl_2}=0.5M,</math> 60 ml/h <math>C_{PMA}=0.5 M,</math> pH=8.5 T=30°C</p>	C
	<p><math>C_{Na_2CO_3}= 0.5M,</math> <math>C_{CaCl_2}=0.5M,</math> 60 ml/h <math>C_{PAA}=0.5 M, pH=8.5</math> T=40°C</p>	C
<p>Χιτοζάνη (CHI)</p>	<p><math>C_{Na_2CO_3}=0.5M,</math> <math>C_{CaCl_2}=0.5M, 60 ml/h</math> <math>C_{CHI} =10 mg/ml M, pH=4</math> T=25°C</p>	C
<p>Υδροχλωρική Ντοπαμίνη</p>	<p><math>C_{Na_2CO_3}=0.5M,</math> <math>C_{CaCl_2}=0.5M, 10 ml/h</math> <math>C_{dop} =2mg/ml , 60 ml/h</math></p>	C
	<p><math>C_{Na_2CO_3}=0.5M,</math> <math>C_{CaCl_2}=0.5M, 10 ml/h</math> <math>C_{dop} =3mg/ml , 10 ml/h</math></p>	C

	$C_{dop} = 0.1 \text{ mg/ml}$ , $C_{CaCl_2} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml}$ , $C_{NH_4HCO_3} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml}$	C
Πολυ (4- στυρενοσουλφονικού νατρίου) (PSS) MB=70 000 g/mol	$C_{PSS} = 1 \text{ mg/ml}$ , pH=10, $C_{Na_2CO_3} = 0.5 \text{ M}$ , $C_{CaCl_2} = 0.5 \text{ M}$	V
Αργινίνη	$C_{PSS} = 500 \text{ mg/ml}$ , pH=9, $C_{Na_2CO_3} = 0.2 \text{ M}$ , $C_{CaCl_2} = 0.2 \text{ M}$	V
Καρβοξυμέθυλο-κυτταρίνη (CMC) MB=250 000 g/mol	$C_{CMC} = 0.5\%$ , $C_{Na_2CO_3} = 0.4 \text{ M}$ , $C_{CaCl_2} = 0.032 \text{ M}$ , 10 ml/h	V
Καρβοξυμέθυλο- κυτταρίνη(CMC) MB=90 000 g/mol	$C_{CMC} = 0.5\%$ , $C_{Na_2CO_3} = 0.4 \text{ M}$ , $C_{CaCl_2} = 0.032 \text{ M}$ , 10 ml/h  $C_{CMC} = 0.5\%$ , $C_{Na_2CO_3} =$ $0.025 \text{ M}$ , $C_{CaCl_2} = 0.025 \text{ M}$	V  V
Πολυ(υδροχλωρική Αλλυλαμίνη) (PAH) MB=56 000 g/mol	$C_{PAH} = 2 \text{ mg/ml}$ , pH=7, $C_{NaCl} = 0.5 \text{ M}$	V
Πολυ(υδροχλωρική Αλλυλαμίνη) (PAH) MB=8 000 g/mol	$C_{PAH} = 2 \text{ mg/ml}$ , pH=7, $C_{NaCl} = 0.5 \text{ M}$	C
Πολυ(υδροχλωρική Αλλυλαμίνη) (PAH) MB=17 500 g/mol	$C_{PAH} = 2 \text{ mg/ml}$ , pH=7, $C_{NaCl} = 0.5 \text{ M}$	C

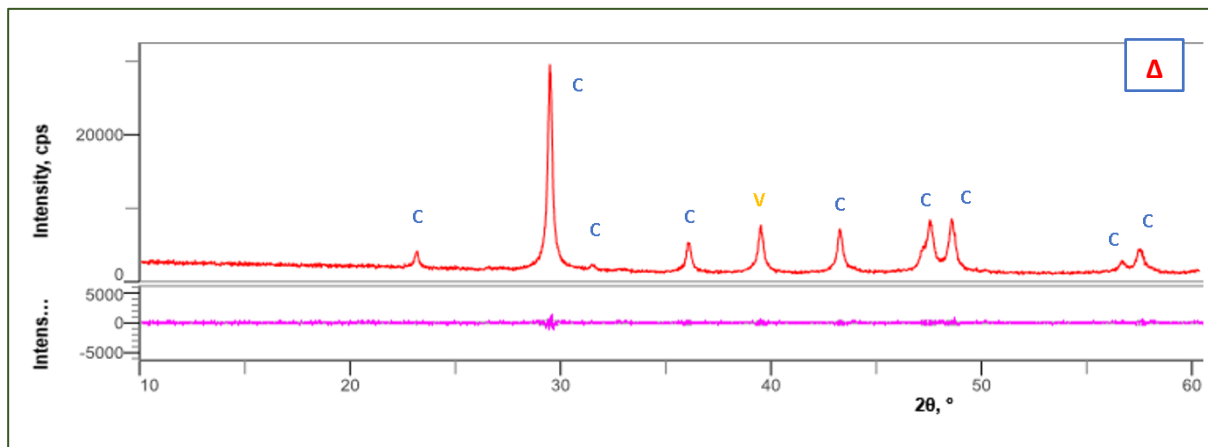
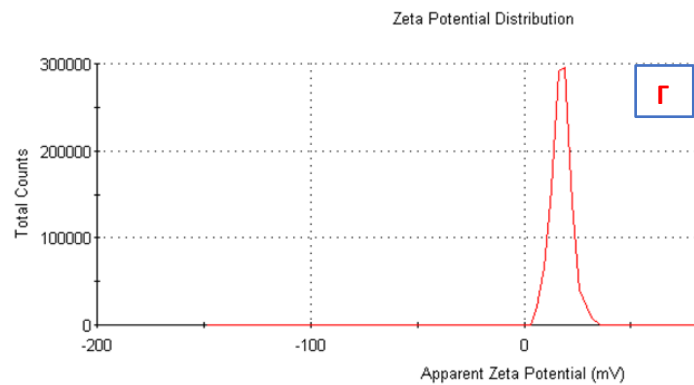
## 9.2: Επικάλυψη σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> με τη μέθοδο layer by layer

Για όσα σωματίδια είχαν την απαραίτητη σφαιρική μορφολογία με στενή κατανομή μεγεθών και παρουσία βατερίτη σε μεγάλο ποσοστό ακολούθησε επίστρωση με επιπλέον στρώματα πολυμερών, με τη τεχνική layer-by layer, όπου εναποτίθενται διαδοχικά στρώματα πολυηλεκτρολυτών με αντίθετα φορτία κάθε φορά.

Σωματίδια, τα οποία συντέθηκαν με σταθεροποιητή το πολυακρυλικό οξύ (CaCO<sub>3</sub>\_PAA) επιστρώθηκαν με πολυαιθυλενιμίνη (PEI) (Σχήμα 9.12 Α-Β). Η επιτυχής επίστρωση επιβεβαιώνεται και από τη τιμή του ζ-δυναμικού (+18 mV±5) (Σχήμα 9.12 Γ). Τα σωματίδια βρίσκονταν στο πολύμορφο του ασβεστίτη και παρατηρήθηκε έντονη συσσωμάτωση (Σχήμα 9.12 Α-Β), κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από το περιθλασσόγραμμα (Σχήμα 9.12 Δ).



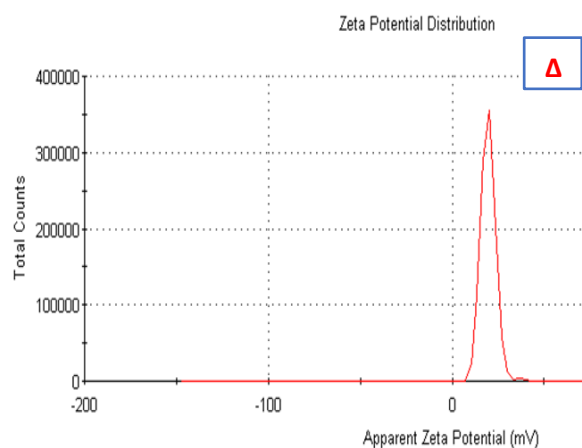
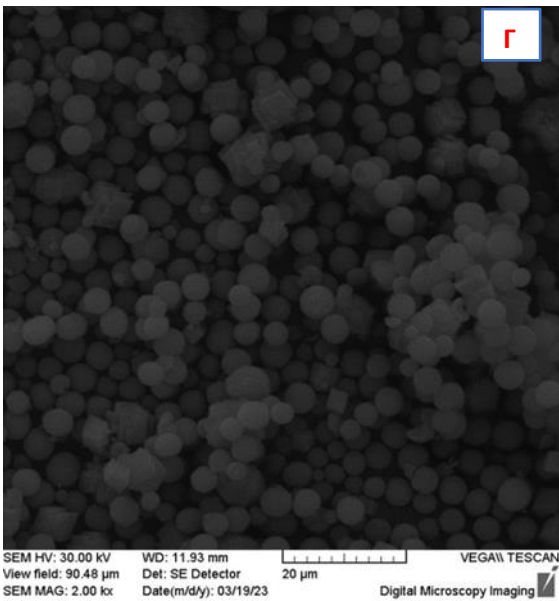
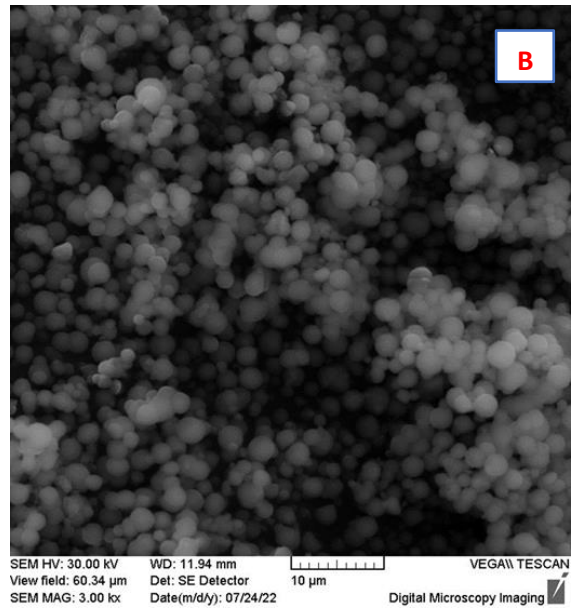
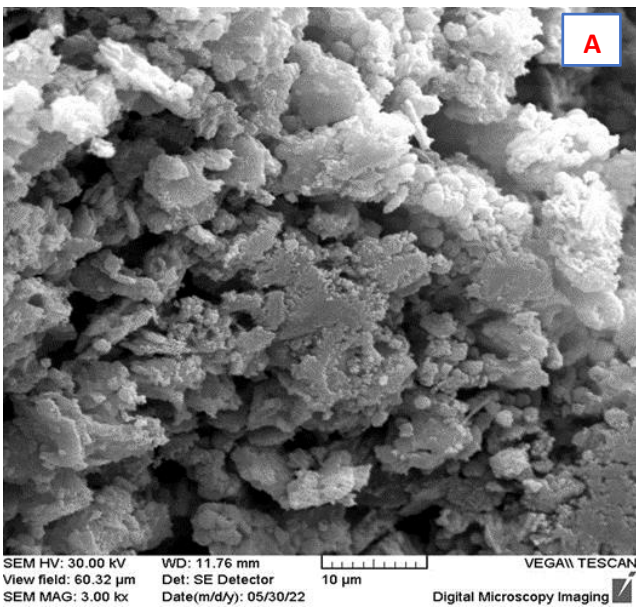


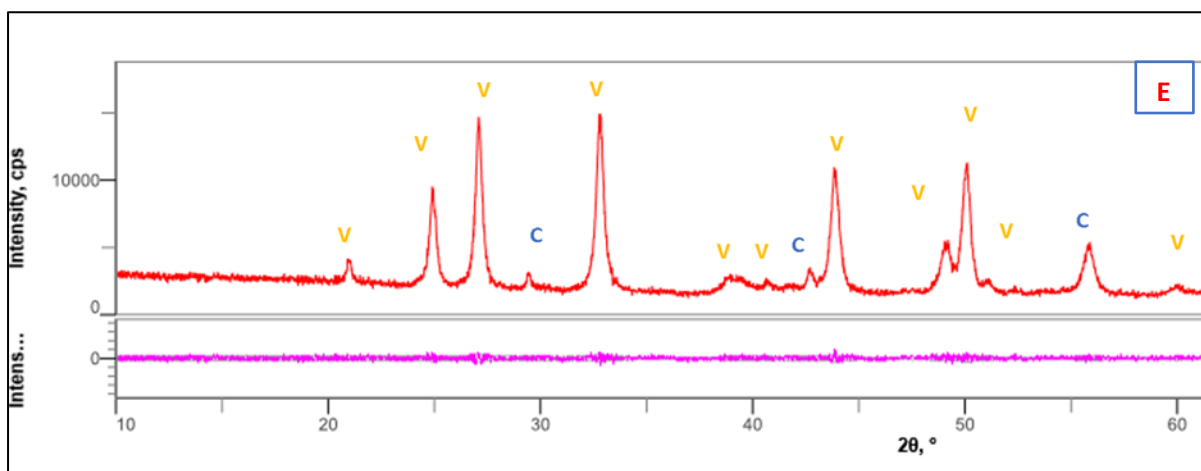


**Σχήμα 9.12:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$ \_PAA επιστρωμένα με πολυαιθυλενιμίνη pH=8.5,C=5mg/ml  
 A: Μεγένθυση x 1500,B: Μεγένθυση x 4500,Γ: Μέτρηση ζ- δυναμικού,  
 Δ:Περιθλασόγραμμα V=vaterite(βατερίτης), C=calcite(ασβεστίτης).

Σωματίδια τα οποία συντέθηκαν με πολυ(στυρενοσουλφονικό νάτριο) ως πρόσθετο επιστρώθηκαν με πολυαιθυλενιμίνη διαφορετικού MB, καθώς και με πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη). Τα σωματίδια με επίστρωση πολυαιθυλενιμίνη μικρού MB (2000 g/mol) ήταν πολύ συσσωματωμένα και δε φάνηκε να διατηρούν το αρχικό σφαιρικό τους σχήμα (**Σχήμα 9.13A**).

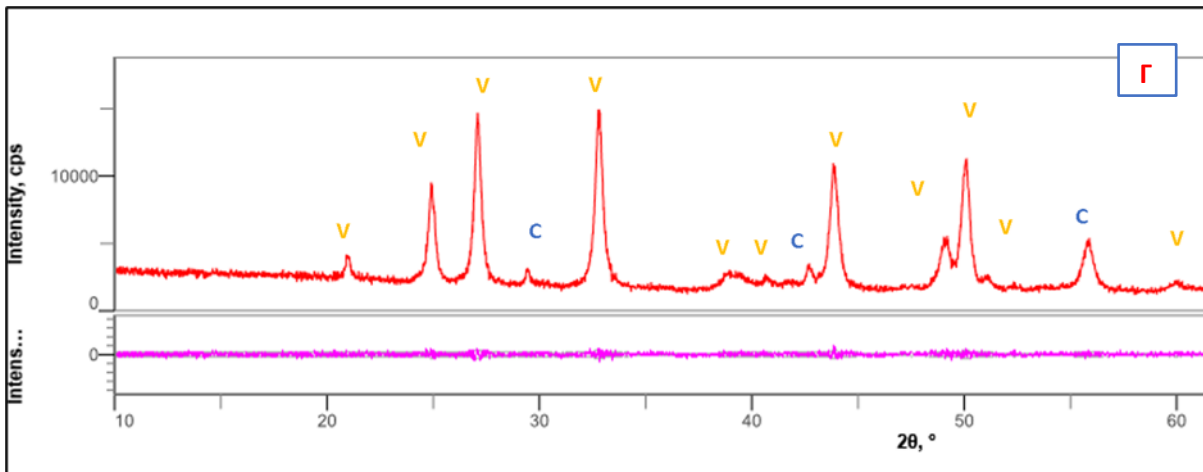
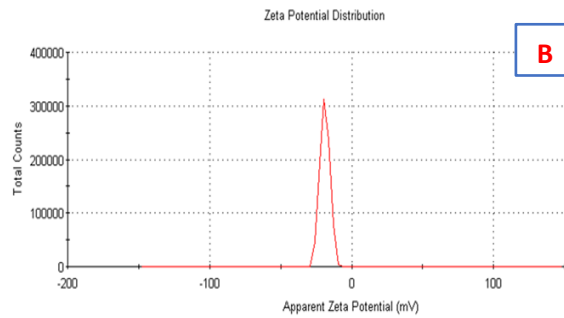
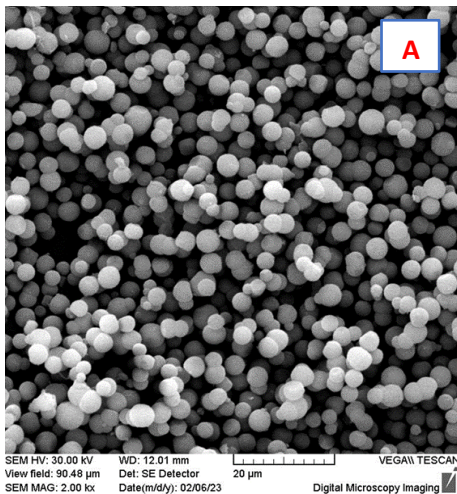
Σε αντίθεση, όταν ως δεύτερο στρώμα χρησιμοποιούταν πολυαιθυλενιμίνη μεγάλου MB (60000 g/mol) προέκυψαν καλής μορφολογίας σωματίδια (Σχήμα 9.13B). Σωματίδια επιστρωμένα με πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη) είχαν την επιθυμητή μορφολογία (Σχήμα 9.13Γ) χωρίς να παρατηρείται συσσωμάτωση με ζ-δυναμικό στα  $+20 \pm 4\text{mV}$ (Σχήμα 9.13Δ). Το περιθλασόγραμμα δείχνει μείγμα βατερίτη και ασβεσίτη με κυρίαρχο πολύμορφο αυτό του βατερίτη (Σχήμα 9.13Ε).





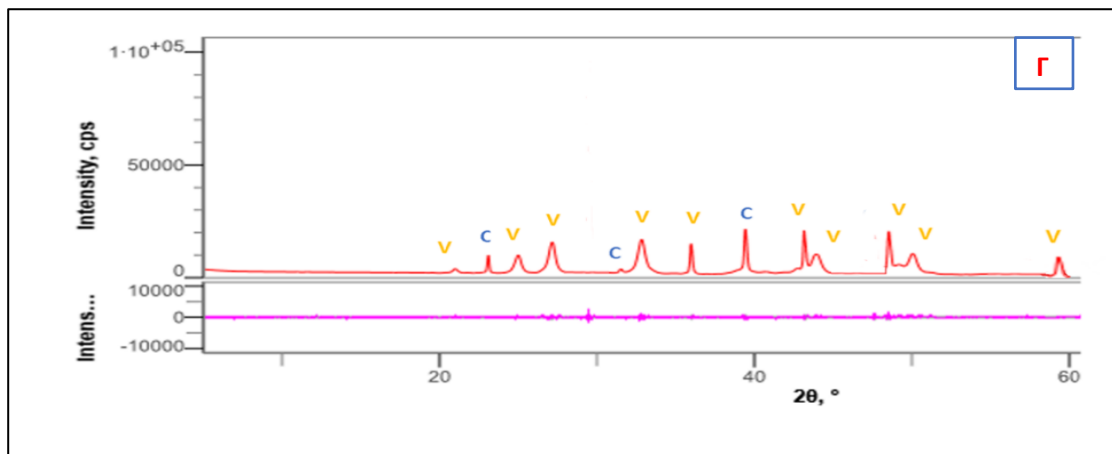
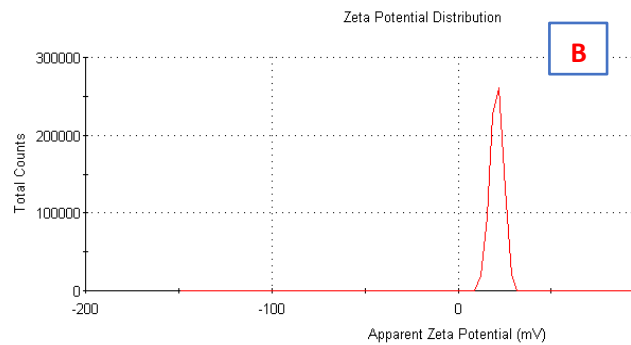
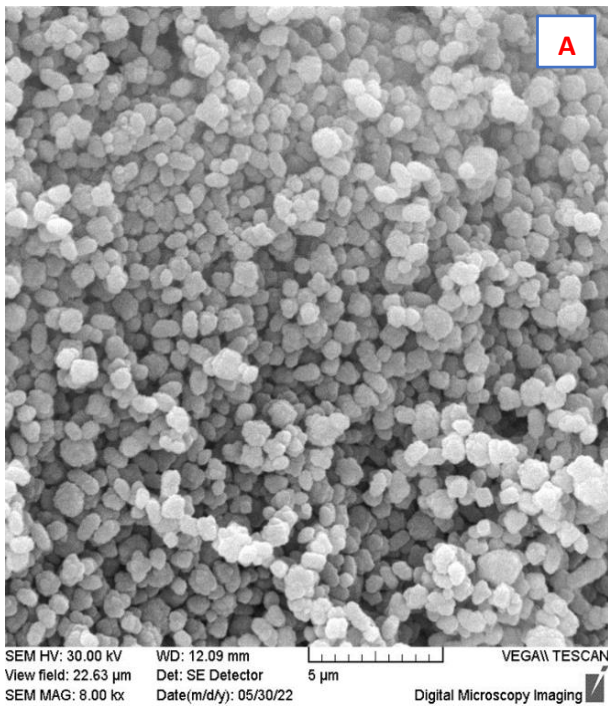
**Σχήμα 9.13:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$ -PSS επιστρωμένα με Α: πολυαιθυλενιμίνη MB :2000, pH=8.5, C=5mg/ml ,B: πολυαιθυλενιμίνη MB :60000, pH=8.5, C=5mg/ml, Γ: πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη), MB: 56000, pH=7, C=5mg/ml, Δ: Μέτρηση ζ- δυναμικού για πειραματική πορεία Γ, Περιθλασόγραμμα V=vaterite(βατερίτης), C=calcite(ασβεστίτης) για πειραματική πορεία Γ.

Σωματίδια τα οποία συντέθηκαν αρχικά με πολυ(στυρενοσουλφονικό νάτριο) ως πρόσθετο και επιστρώθηκαν με πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη), επιστρώθηκαν με ένα επιπρόσθετο στρώμα πολυ(στυρενοσουλφονικού νατρίου) (**Σχήμα 9.14Α**). Το ζ-δυναμικό βρέθηκε στα  $-20 \pm 5\text{mV}$  (**Σχήμα 9.14Β**). Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά καλά, καθώς τα σωματίδια διατηρούν τη σφαιρική τους μορφολογία. Από το περιθλασόγραμμα επιβεβαιώνεται πως το πολύμορφο που επικρατεί είναι ο βατερίτης (**Σχήμα 9.14Γ**).



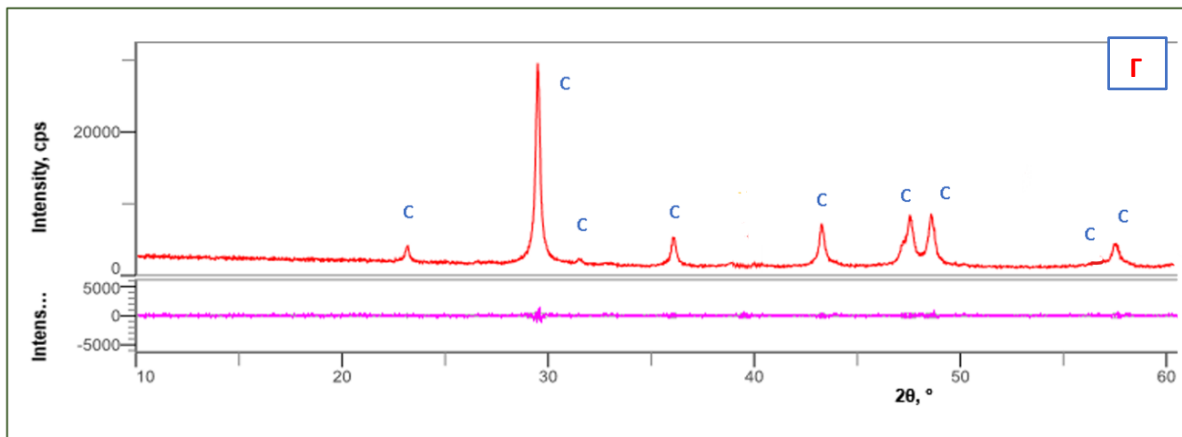
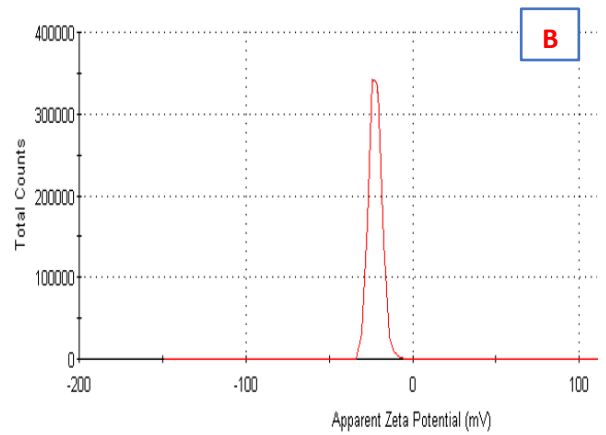
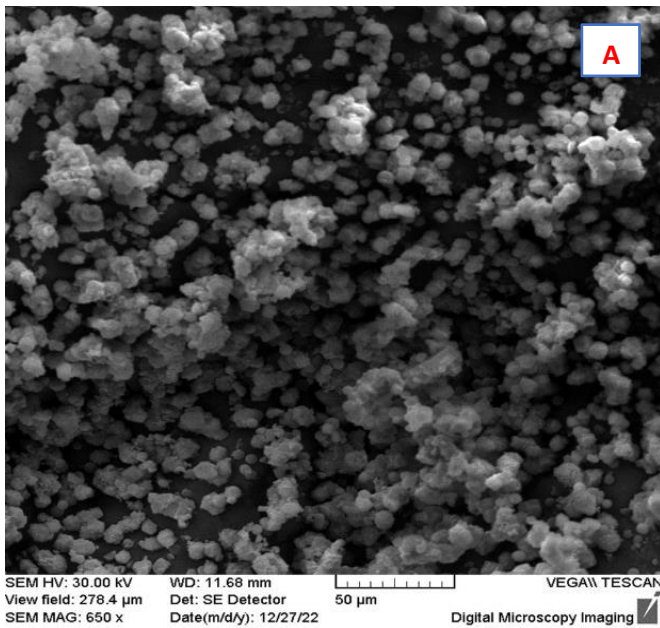
**Σχήμα 9.14:** A:Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$ -PSS-PAH επιστρωμένα με πολυ (4-στυρενοσουλφονικό νάτριο), MB : 70000, pH=7, C=2mg/ml, B: Μέτρηση ζ- δυναμικού, Γ:Περιθλασόγραμμα V=vaterite (βατερίτης), C=calcite (ασβεστίτης) .

Σωματίδια τα οποία συντέθηκαν με καρβοξυμέλυθοκυτταρίνη ως πρόσθετο επιστρώθηκαν με χιτοζάνη. Τα σωματίδια διατηρούν το αρχικό σφαιρικό τους σχήμα (**Σχήμα 9.15A**). Η επιτυχής επίστρωση επιβεβαιώνεται με το ζ- δυναμικό  $21 \pm 4$  mV(**Σχήμα 9.15B**). Το περιθλασόγραμμα αποδεικνύει ότι διατηρείται σε μεγάλο ποσοστό η μορφή του βατερίτη (**Σχήμα 9.15Γ**).



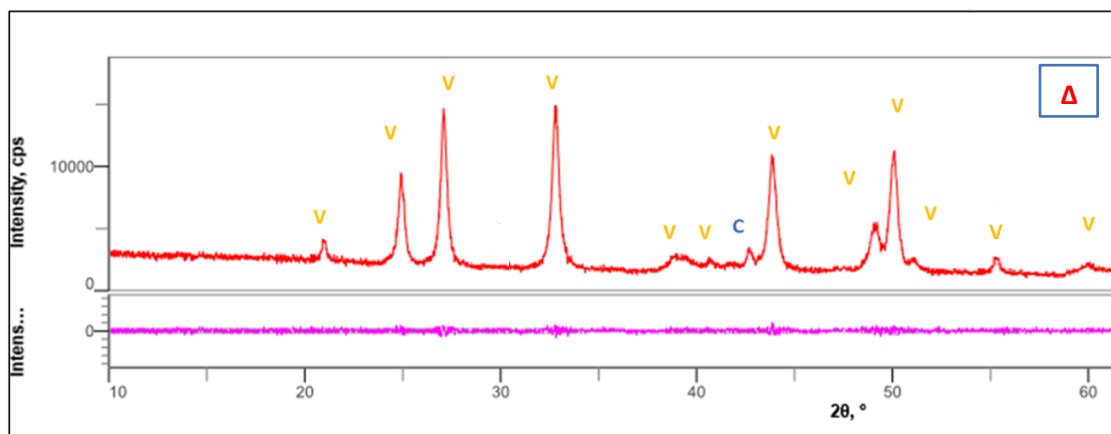
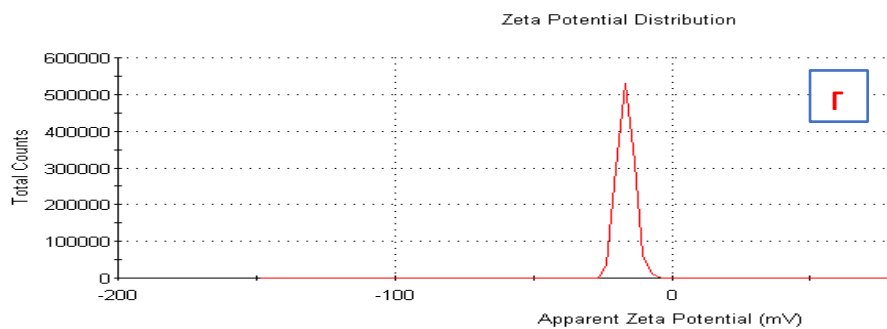
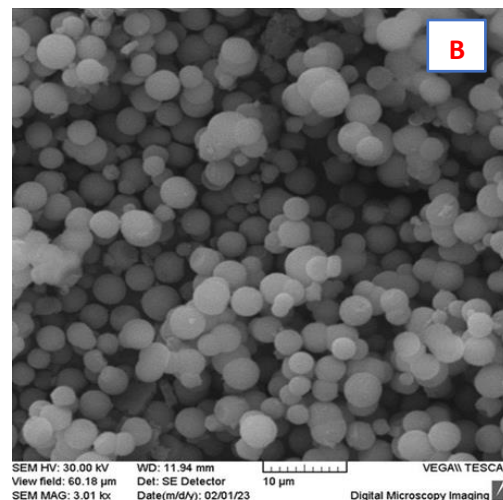
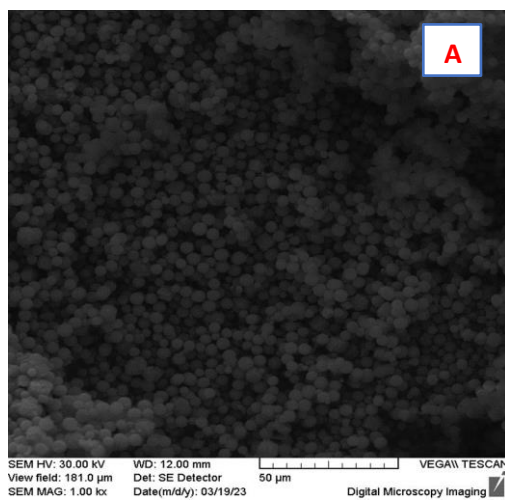
**Σχήμα 9.15:** Σωματίδια CaCO<sub>3</sub>-CMC επιστρωμένα με χιτοζάνη pH=4.8,C=1mg/ml ,B : Μέτρηση ζ- δυναμικού, Γ:Περιθλασόγραμμα V=vaterite(βατερίτης), C=calcite(ασβεστίτης) .

Σωματίδια τα οποία συντέθηκαν με πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη) ως σταθεροποιητή επιστρώθηκαν με πολυ(4-στυρενοσουλφονικό νάτριο). Τα σωματίδια ήταν αρκετά συσσωματωμένα και δεν διατηρούν την αρχική σφαιρική τους μορφολογία (**Σχήμα 9.16A**). Το αρνητικό ζ δυναμικό ( $-24 \pm 4$  mV) αποδεικνύει ότι έχει επιτύχει η επίστρωση με τον ανιοντικό πολυηλεκτρολύτη (**Σχήμα 9.16 B**). Το περιθλασόγραμμα δείχνει πως το κυρίαρχο πολύμορφο είναι αυτό του ασβεστίτη (**Σχήμα 9.16 Γ**).



**Σχήμα 9.16:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$ -PAH επιστρωμένα με πολυ(4-στυρενοσουλφονικό νάτριο)  $\text{pH}=7, \text{C}=2\text{mg/ml}$ , B : Μέτρηση ζ- δυναμικού, Γ:Περιθλασόγραμμα V=vaterite(βατερίτης), C=calcite(ασβεστίτης) .

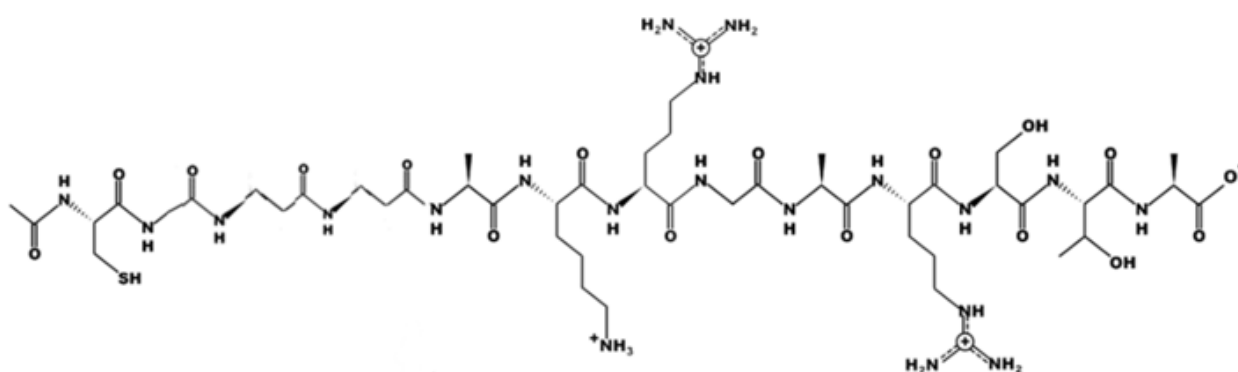
Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  επιστρωμένα με πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη) επιστρώθηκαν επιπλέον με πολυακρυλικό οξύ. Το ζ-δυναμικό βρέθηκε στα  $-17 \pm 3$  (Σχήμα 9.17 Γ). Τα σωματίδια αυτά επιλέχθηκαν και ως πλατφόρμα για τη δημιουργία του βιοαισθητήρα, καθώς έχουν πολύ καλή μορφολογία, ομοιόμορφο σφαιρικό σχήμα και μέγεθος (Σχήμα 9.17A-B). Το περιθλασόγραμμα αποδεικνύει ότι διατηρείται σε μεγάλο ποσοστό η μορφή του βατερίτη (Σχήμα 9.17Δ).



**Σχήμα 9.17:** Σωματίδια  $\text{CaCO}_3$ -PAH επιστρωμένα με πολυακρυλικό οξύ,  $\text{pH}=7, C=2\text{mg/ml}$ , A: Μεγέθυνση X1000, B : Μεγέθυνση X2000, Γ: Μέτρηση ζ- δυναμικού , Δ:Περιθλασόγραμμα V=vaterite(βατερίτης), C=calcite(ασβεστίτης) .

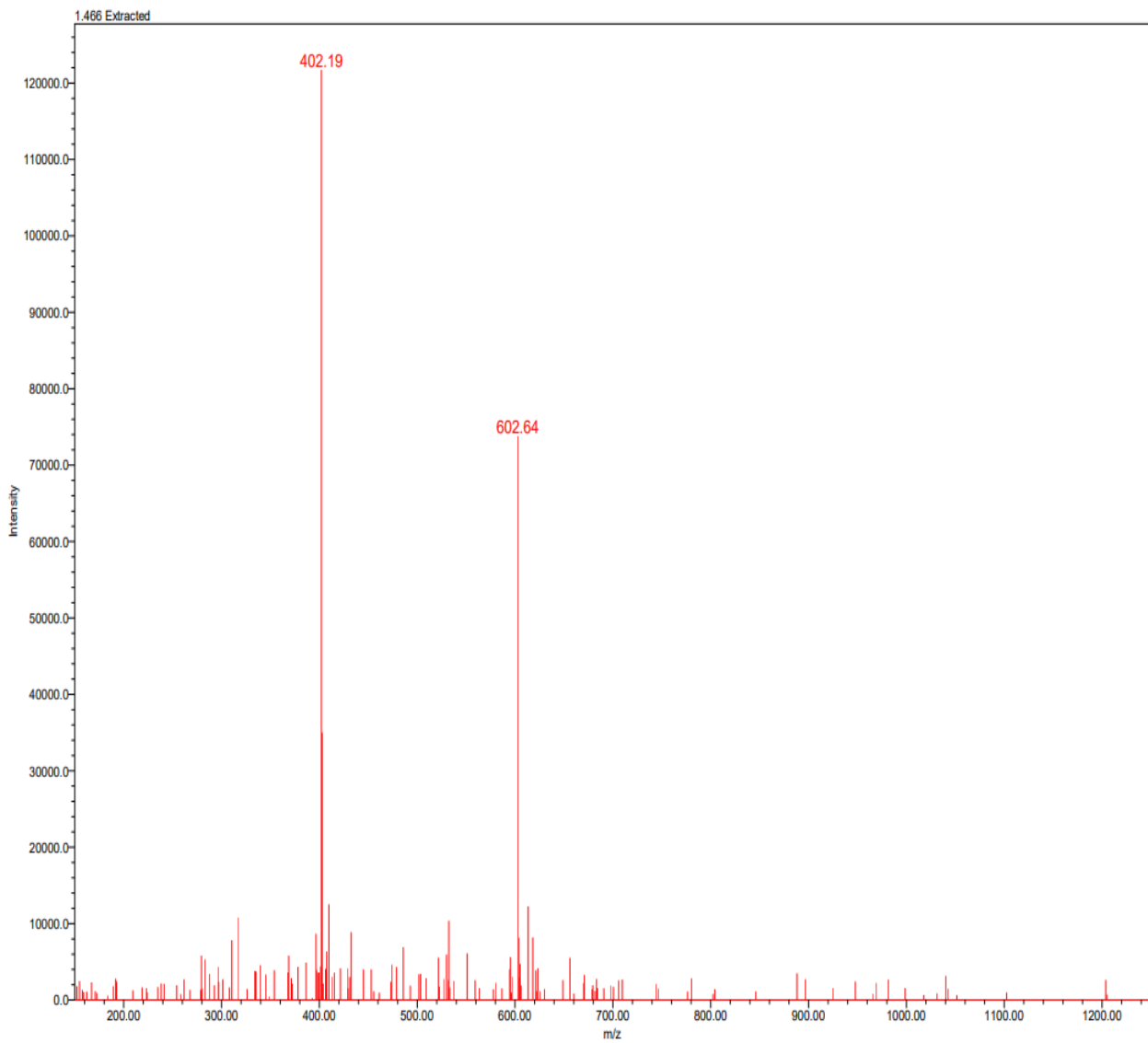
### 9.3 Χαρακτηρισμός πεπτιδίου

Το πεπτίδιο χαρακτηρίστηκε με Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας. Χρησιμοποιήθηκε στήλη 5  $\mu\text{m}$   $\text{C}_{18}$ , 250- 2mm, Phenomenex. Ακολούθηθηκε ισοκρατική μέθοδος με ροή στα 0.15 ml/min και διαλύτες 98%-2% ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ ). Η επιτυχής σύνθεση του πεπτιδίου επιβεβαιώνεται με το φάσμα μάζας του πεπτιδίου, όπου είναι ορατό το θραύσμα  $(\text{M}+3)/3$  με  $m/z = 402$  και το θραύσμα  $(\text{M}+2)/2$  με  $m/z = 602$  (Σχήμα 9.19). Το πεπτίδιο εκλύεται στα 3.5 λεπτά (Σχήμα 9.20).

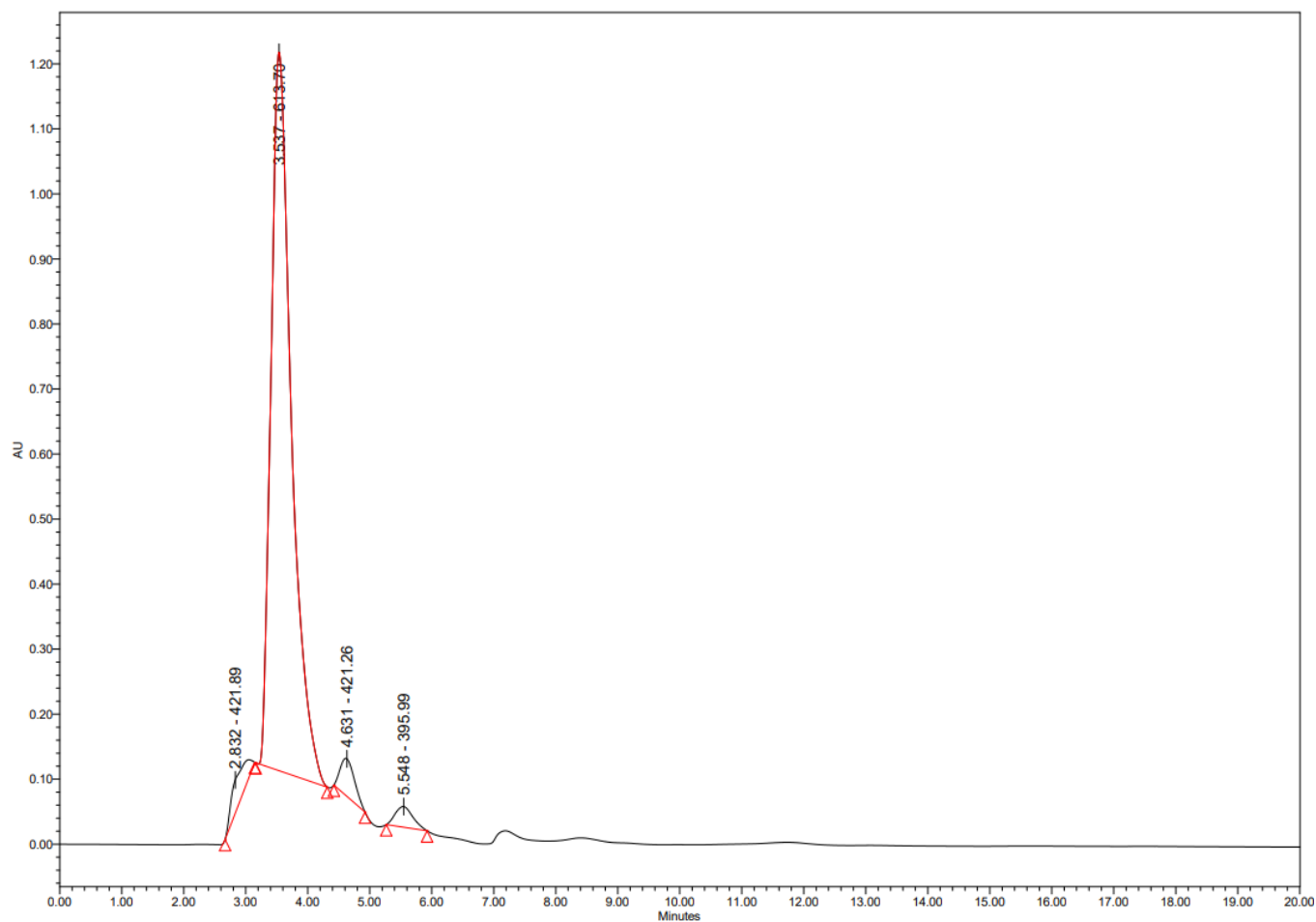


Σχήμα 9.18: Δομή πεπτιδίου, MB:1205.





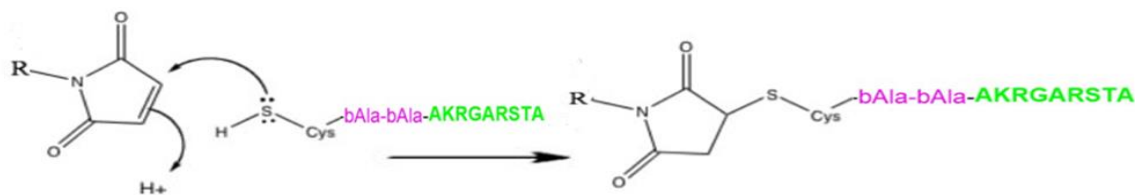
Σχήμα 9.19: Φάσμα μάζας πεπτιδίου, MB:1205.



**Σχήμα 9.20:** HPLC πεπτιδίου, MB:1205.

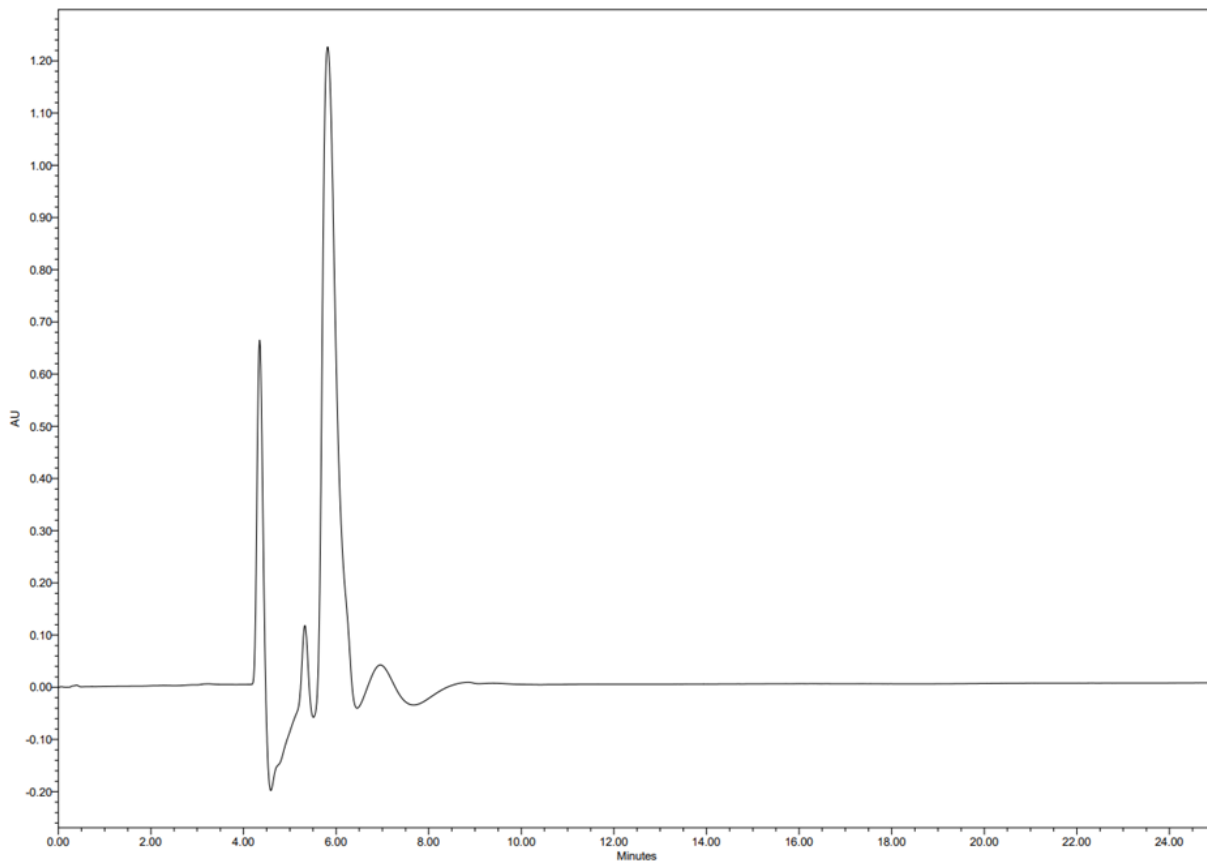
#### 9.4 Αντίδραση μεταξύ του πεπτιδίου: Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A και του spacer: Mal-PEG-NH<sub>2</sub>

Έγινε η προσπάθεια ομοιοπολικής σύνδεσης του πεπτιδίου με spacer που περιέχει μαλεϊμίδιο ως ενεργή ομάδα (**Σχήμα 9.20**).

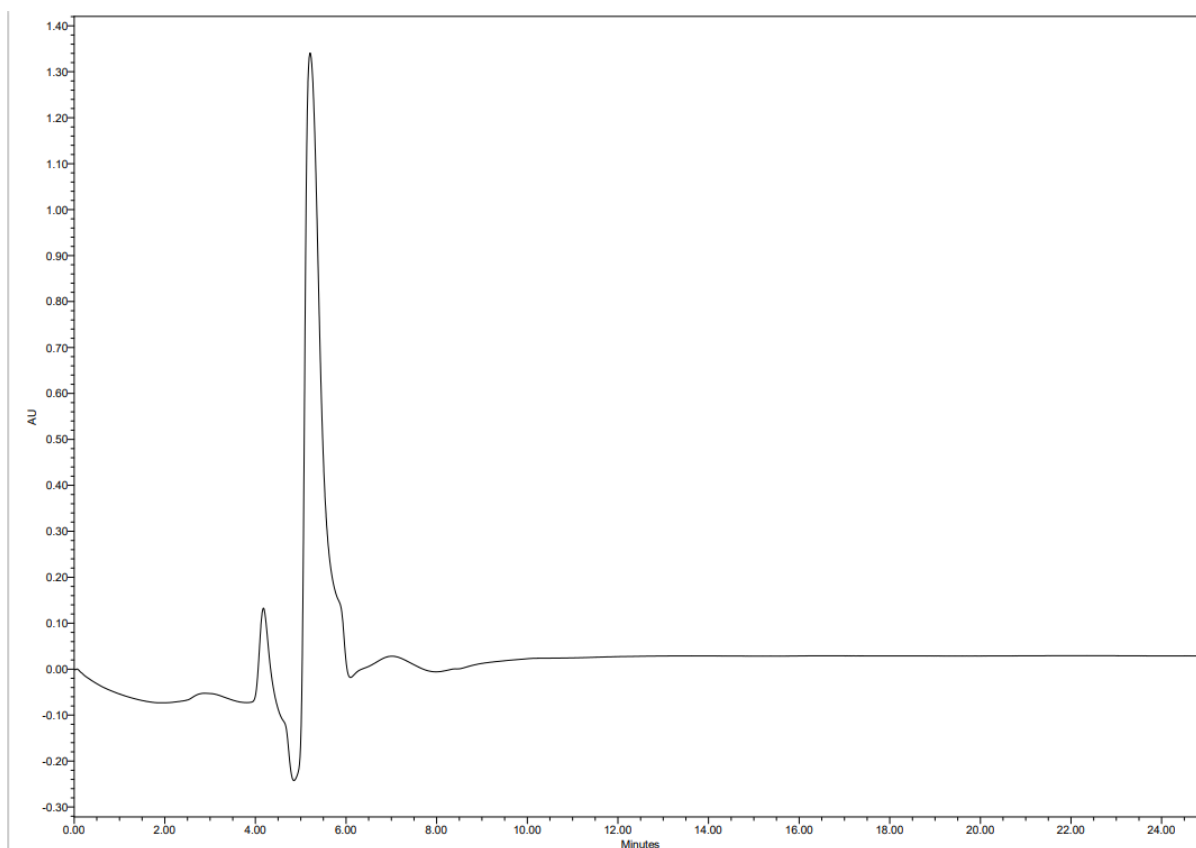


**Σχήμα 9.20:** Αντίδραση μεταξύ του spacer και του πεπτιδίου.

Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία. Χρησιμοποιήθηκε στήλη 5  $\mu\text{m}$   $\text{C}_{18}$ , 250- 2mm, Phenomenex. Ακολουθήθηκε ισοκρατική μέθοδος με ροή στα 0.15 ml/min και διαλύτες 98%-2% ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ ). Με την αύξηση του χρόνου αντίδρασης, η κορυφή του πεπτιδίου μειώνεται αισθητά, γεγονός που υποδεικνύει την πραγματοποίηση της αντίδρασης (Σχήμα 9.21-9.22). Ο spacer, ο οποίος βρισκόταν στο διάλυμα σε περίσσεια κατά 20 φορές σε σχέση με το πεπτίδιο, δεν μπορούσε να διαχωριστεί από το προϊόν της αντίδρασης. Έτσι αποφασίστηκε ότι η ομοιοπολική σύνδεση του πεπτιδίου επάνω στην πλατφόρμα σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  θα γίνει μεσω ενός αμιδικού δεσμού μεταξύ των ομάδων πολυακρυλικού οξέος  $-\text{COOH}$  που βρίσκεται στην επιφάνεια των σωματιδίων και των ελεύθερων  $-\text{NH}_2$  στην επιφάνεια του πεπτιδίου.



**Σχήμα 9.21:** HPLC αντίδρασης πεπτιδίου-spacer σε χρόνο 30 λεπτά από την έναρξη της αντίδρασης.

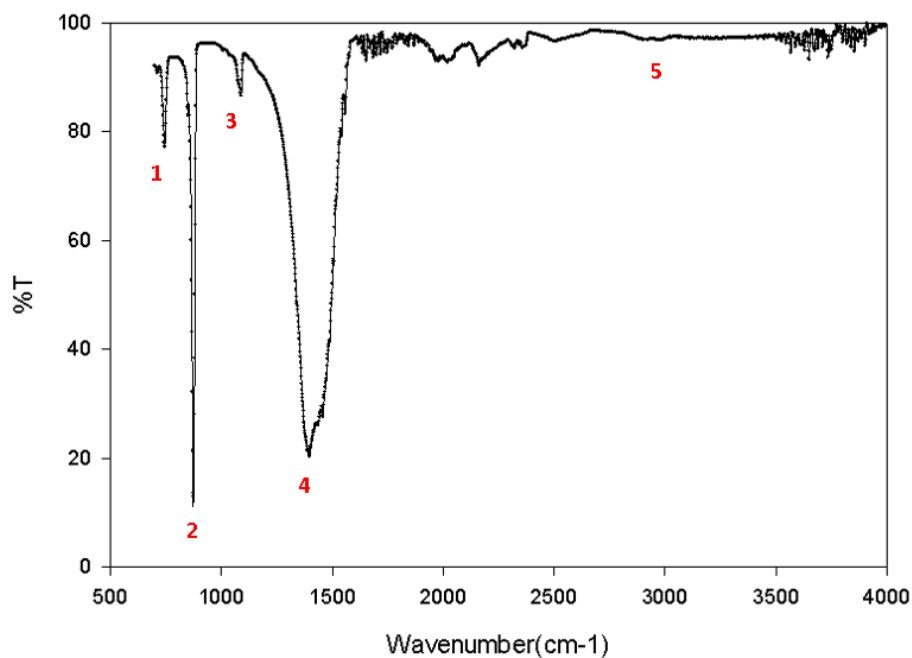


**Σχήμα 9.22:** HPLC αντίδρασης πεπτιδίου-spacer σε χρόνο 12 ώρες από την έναρξη της αντίδρασης.

## 9.5 Αντίδραση μεταξύ του πεπτιδίου: Ac-C-bAla-bAla-A-K-R-G-A-R-S-T-A και των σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>-PAH-PAA

Η ομοιοπολική σύνδεση του πεπτιδίου επάνω στην πλατφόρμα σωματιδίων CaCO<sub>3</sub> έγινε μεσω ενός αμιδικού δεσμού μεταξύ των ομάδων πολυακρυλικού οξέος -COOH που βρίσκεται στην επιφάνεια των σωματιδίων και των ελεύθερων -NH<sub>2</sub> στην επιφάνεια του πεπτιδίου. Το υλικό χαρακτηρίστηκε με FTIR καθώς και με θερμοβαρυστική ανάλυση (TGA). Επιπρόσθετες κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα FTIR του προϊόντος, οι οποίες δεν υπάρχουν στα επιστρωμένα σωματίδια CaCO<sub>3</sub>-PAH-PAA υποδεικνύουν την επιτυχία της αντίδρασης (Σχήμα 9.23-9.25). Στους πιο κάτω πίνακες παρουσιάζονται αναλυτικά οι χαρακτηριστικές

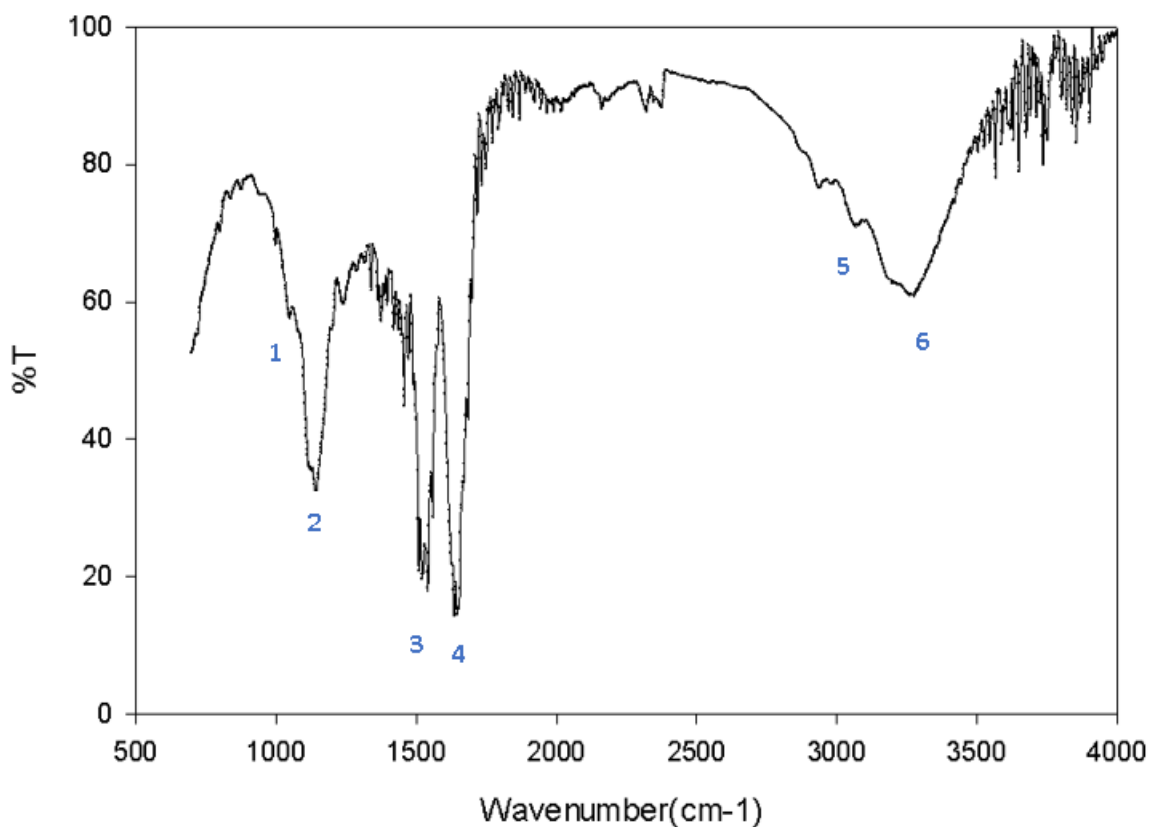
κορυφές που παρουσιάζονται στα φάσματα FTIR των σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>-PAH-PAA, του πεπτιδίου καθώς και του προϊόντος αντίδρασης των σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>-PAH-PAA – πεπτιδίου (Πίνακες 9.1-9.3).



**Σχήμα 9.23:** Φάσμα FT-IR σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>-PAH-PAA .

**Πίνακας 9.1 :** Ανάλυση κορυφών φάσματος FTIR σωματιδίων CaCO<sub>3</sub>-PAH-PAA..

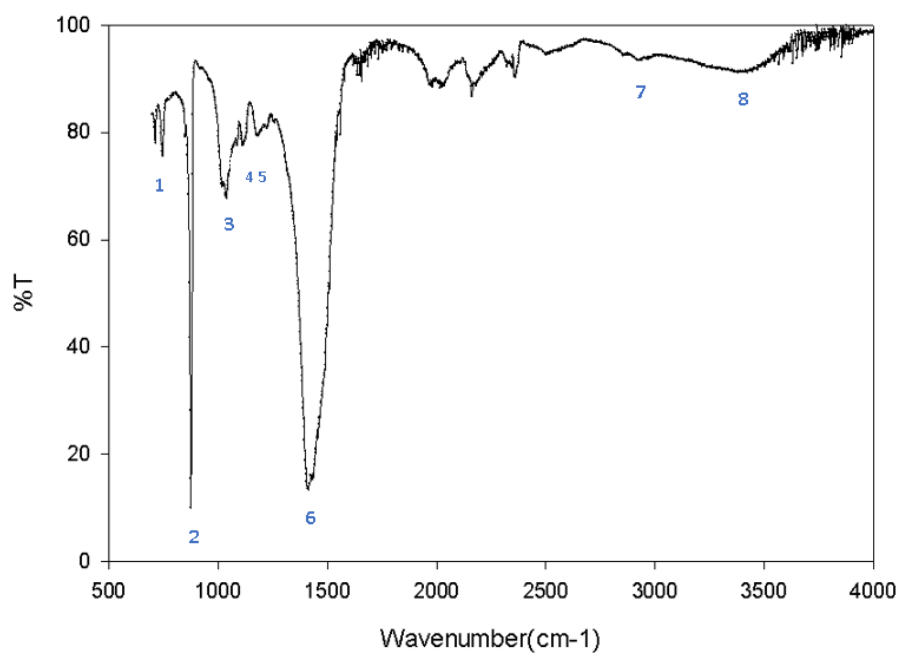
Αριθμός Κορυφής	Κυματάρθμος (cm <sup>-1</sup> )	Χαρακτηριστική Ομάδα
1	730	V <sub>4</sub> sym CO <sub>3</sub>
2	870	V <sub>2</sub> asym CO <sub>3</sub>
3	1093	V <sub>1</sub> sym CO <sub>3</sub>
4	1460	V <sub>3</sub> asym CO <sub>3</sub>
5	2720	O-H δόνηση τάσης



Σχήμα 9.24 : Φάσμα FT-IR πεπτιδίου.

Πίνακας 9.2: Ανάλυση κορυφών φάσματος FTIR πεπτιδίου.

Αριθμός Κορυφής	Κυματάριθος (cm <sup>-1</sup> )	Χαρακτηριστική Ομάδα
1	1050	C-C
2	1210	C-N
3	1550	N-H
4	1690	C=O
5	2710	O-H
6	3310	N-H



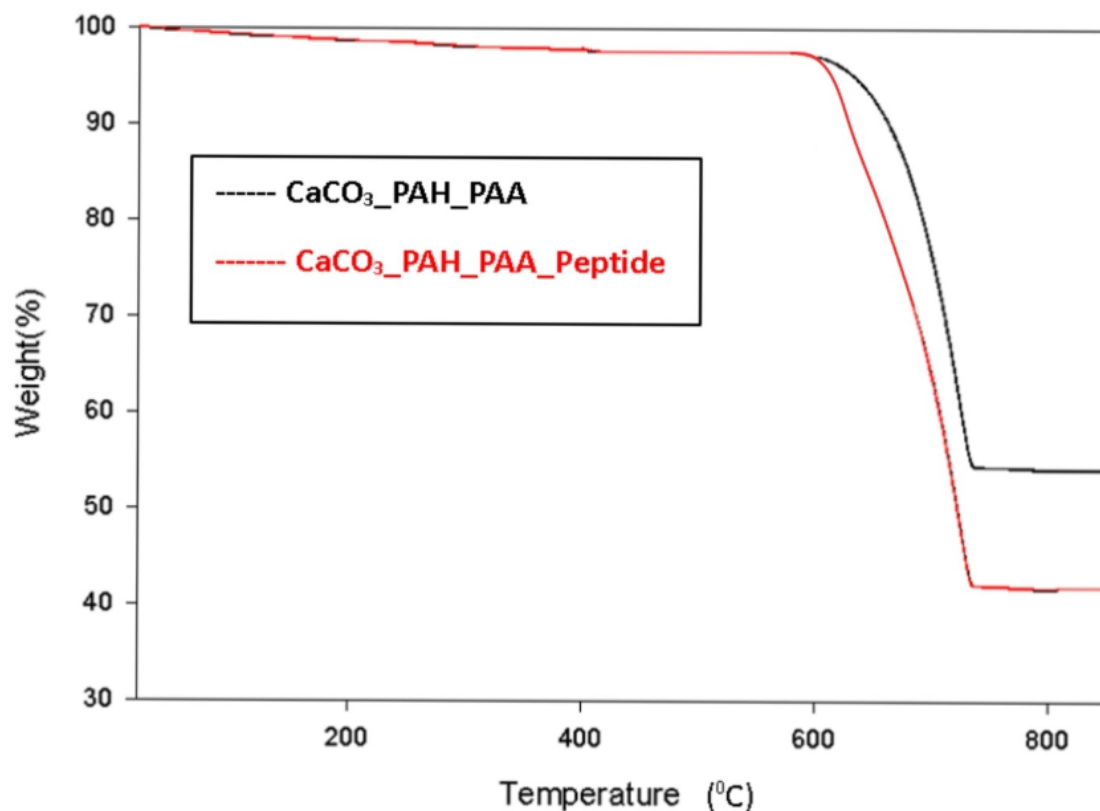
Σχήμα 9.25 : Φάσμα FT-IR υλικού CaCO<sub>3</sub>-PAH-PAA-πεπτιδίου.

Πίνακας 9.3: Ανάλυση κορυφών φάσματος FTIR υλικού CaCO<sub>3</sub>-PAH-PAA-πεπτιδίου.

Αριθμός Κορυφής	Κυματάριθμος (cm <sup>-1</sup> )	Χαρακτηριστική Ομάδα
1	730	V <sub>4</sub> sym CO <sub>3</sub>
2	870	V <sub>2</sub> asym CO <sub>3</sub>
3	1050	C-C
4	1095	V <sub>1</sub> sym CO <sub>3</sub>
5	1210	C-N
6	1460	V <sub>3</sub> asym CO <sub>3</sub>
7	2910	O-H
8	3340	N-H



Από τη TGA παρατηρούμε απώλεια μάζας κατά 15% μεγαλύτερη στο τελικό υλικό σε σχέση με τα σωματίδια  $\text{CaCO}_3$ -PAH-PAA. Η TGA αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη της πρόσδεσης επιπρόσθετου οργανικού τμήματος στα σωματίδια που σηματοδοτεί την επιτυχία της αντίδρασης των σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ -PAH-PAA και του πεπτιδίου (Σχήμα 9.26).



**Σχήμα 9.26 :** Θερμοβαρμετρική Ανάλυση σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ -PAH-PAA και υλικού σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ -PAH-PAA -πεπτιδίου.

## Κεφάλαιο 10: Συμπεράσματα -Μελλοντική Εργασία

Η εργασία αυτή στοχεύει στη δημιουργία ενός ευέλικτου βιοαισθητήρα που θα ανιχνεύει την πρωτεΐνη p32 χρησιμοποιώντας κατάλληλο πεπτιδίο προσαρμοσμένο στην επιφάνεια σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$ . Για τον σκοπό αυτό έγινε η σύνθεση του πεπτιδίου Ac-C-bAla-bAla-AKRGARSTA, σε συνεργασία με τον Αναπληρωτή Καθ. Γιάννη Σαρηγιάννη στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Λευκωσίας.

Παρασκευάστηκαν με επιτυχία σφαιρικά μικροσωματίδια  $\text{CaCO}_3$  κυρίως στο πολύμορφο του βατερίτη, επικαλυμμένα από πολυηλεκτρολύτες, αξιοποιώντας την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση LbL μεταξύ θετικά και αρνητικά φορτισμένων πολυηλεκτρολυτών. Διάφορες πειραματικές συνθήκες, όπως η παρουσία προσθέτων, το μοριακό βάρος των προσθέτων, ο τύπος του διαλύτη, το pH, ο ρυθμός και ο τρόπος ανάμειξης των συστατικών, η θερμοκρασία και οι συγκεντρώσεις των πρόδρομων ουσιών, επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες των παραγόμενων σωματιδίων  $\text{CaCO}_3$  και μελετήθηκαν εκτεταμένα στην παρούσα εργασία για να βρεθούν οι καλύτερες παράμετροι για τη σύνθεση σφαιρικών σωματιδίων βατερίτη ενιαίου μεγέθους.

Η διαδοχική εναπόθεση πολυηλεκτρολυτών παρακολουθήθηκε με μετρήσεις ζ-δυναμικού. Οι μορφολογικές τους ιδιότητες αξιολογήθηκαν με SEM που δείχνει την σύνθεση μη-συσσωματωμένων σφαιρικών σωματιδίων με μέση διάμετρο 2  $\mu\text{m}$ .

Ως τελική πλατφόρμα για την ομοιοπολική σύνδεση του πεπτιδίου επιλέχθηκαν σωματίδια  $\text{CaCO}_3$  (πολύμορφο βατερίτη) επιστρωμένα με πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη) και επιπλέον με πολυακρυλικό οξύ. Τα σωματίδια αυτά έχουν πολύ καλή μορφολογία, ομοιόμορφο σφαιρικό σχήμα και μέγεθος (~2  $\mu\text{m}$ ) και φέρουν ομάδες -COOH στην επιφάνειά τους.

Το πεπτιδίο συνδέθηκε με τα μικροσωματίδια  $\text{CaCO}_3$  μέσω ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ ομάδων  $-\text{NH}_2$  του πεπτιδίου και των ομάδων -COOH στις επιφάνειες των μικροσωματιδίων. Το τελικό υλικό χαρακτηρίστηκε με FTIR καθώς και με θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA). Και οι δύο αυτές μέθοδοι υποδεικνύουν την επιτυχή προσθήκη του πεπτιδίου στα σωματίδια.

Ο στόχος της σύνδεσης του πεπτιδίου με τα σωματίδια επομένως επιτεύχθηκε, ωστόσο θα μπορούσαν να διεξαχθούν επιπλέον πειραματικές μελέτες.

Πρόκειται να πραγματοποιηθούν σύντομα πειράματα σε μικροζυγό χαλαζία (QCM). Ο QCM αποτελεί μη επεμβατικό εργαλείο για τη διερεύνηση βιομοριακών αλληλεπιδράσεων σε πραγματικό χρόνο. Σε μελλοντική εργασία θα σχεδιαστεί ένας βιοαισθητήρας μάζας όπου θα γίνει η επίστρωση των νανοσωματιδίων που

συνθέσαμε στο ηλεκτρόδιο χρυσού του QCM, και θα γίνει ανίχνευση της πρωτεΐνης p32, διάλυμα της οποίας περνά με αναρροή με περισταλτική αντλία από το ηλεκτρόδιο. Τα σωματίδια αυτά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση της p32 σε χρωματογραφική γεωμετρία στήλης. Τέλος, σε μελλοντική εργασία θα μπορούσε να γίνει απόπειρα να διαλυθεί ο πυρήνας  $\text{CaCO}_3$  και να χρησιμοποιηθεί *in vitro* ο αισθητήρας με τη μορφή κάψουλας.

## Κεφάλαιο 11 : Βιβλιογραφία

- {1} Y. Wang, Y. X. Moo, C. Chen, P. Gunawan and R. Xu, “Fast precipitation of uniform CaCO<sub>3</sub> nanospheres and their transformation to hollow hydroxyapatite nanospheres”, *Journal of Colloid Interface Science*, **2010**, 352, 393-400
- {2} Y. Boyjoo, V.K. Pareek, J. Liu, “Synthesis of micro and nano-sized calcium carbonate particles and their applications”, *Journal of Material Chemistry*,**2014**,35,467-469
- {3} Y. W. Wang, Y. Y. Kim, C. J. Stephens, F. C. Meldrum and H. K. Christenson, “Using Confinement to Study the Crystallization Pathway of Calcium Carbonate”, *Crystal Growth & Design*, **2012**, 12, 1212-1217
- {4} D.B. Trushina, T.V. Bukreeva, M.V. Kovalchuk, M.N. Antipina, “CaCO<sub>3</sub> vaterite microparticles for biomedical and personal care applications”, *Material Science and Engineering*: **2014**,45, 644–658
- {5} K. Seidensaal, S.B. Harrabi, J. Debus, “Molecular imaging for particle therapy: current approach and future directions. *Molecular Imaging in Oncology*”, Springer, **2020**,216, 865–879.
- {5} D.V. Volodkin, A.I. Petrov, M. Prevot, G.B. Sukhorukov, “Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation”, *Langmuir*, **2004**,20, 3398–3406
- {6} B.V. Parakhonskiy, et al., “Tailored intracellular delivery via a crystal phase transition in 400 nm vaterite particles”, *Biomaterial Science*, **2013**,12,1273–1281
- {7} Y.I. Svenskaya, A.M. Pavlov, D.A. Gorin, D.J. Gould, B.V. Parakhonskiy, G. B. Sukhorukov, “Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite submicron particles”, *Colloids and Surfaces Biointerfaces*,**2016**,146 ,171–179
- {8} Q. Dong, J. Li, L. Cui, H. Jian, A. Wang, S. Bai, “Using porous CaCO<sub>3</sub>/hyaluronic acid nanocages to accommodate hydrophobic photosensitizer in aqueous media for photodynamic therapy”, *Colloids Surfaces and Physicochemistry Engineering* ,**2017**,516, 190–198
- {9} Y.I. Svenskaya, et al., “A simple non-invasive approach toward efficient transdermal drug delivery based on biodegradable particulate system”, *Applied Materials and Interfaces*,**2019**,11, 17270–17282

{10} Y.I. Svenskaya, et al., “Enhanced topical psoralen–ultraviolet A therapy via targeting to hair follicles”, *British Journal of Dermatology*, **2020**,182,1479–1481

{11} Wang, Y.; Yu, A.; Caruso, F., “Nanoporous Polyelectrolyte Spheres Prepared by Sequentially Coating Sacrificial Mesoporous Silica Spheres”, *Angewandte Chemie International Edition*, **2005**, 44, 2888–2892

{12} Tan, J.; Wang, Y.; Yip, X.; Glynn, F.; Shepherd, R. K.; Caruso, F. “Nanoporous Peptide Particles for Encapsulating and Releasing Neurotrophic Factors in an Animal Model of Neurodegeneration”, *Advanced Materials*, **2012**, 24, 3362–3366.

{13} Wang, Y. J.; Caruso, F., “Nanoporous protein particles through templating mesoporous silica spheres”, *Advanced Materials*, **2006**, 18, 795–800.

{14} Shenoy, D. B.; Antipov, A. A.; Sukhorukov, G. B.; Mohwald, “H. Layer-by-Layer Engineering of Biocompatible, Decomposable Core–Shell”, *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 265–272

{15} Parakhonskiy, B. V.; Yashchenok, A. M.; Donatan, S.; Volodkin, D. V.; Tessarolo, F.; Antolini, R.; Mohwald, H.; Skirtach, A. G., “Macromolecule Loading into Spherical, Elliptical, Star-Like and Cubic Calcium Carbonate Carriers”. *ChemPhysChem*, **2014**, 15, 2817–2822.

{16} M. de los Angeles Ramirez et al., “Core vs. surface labelling of mesoporous silica nanoparticles: advancing the understanding of nanoparticle fate and design of labelling strategies”, *Nanoscale Advances*, **2022**,4, 2098–2106

{17} Demichelis R, Raiteri P, Gale JD, Dovesi R., “The multiple structures of vaterite”, *Crystal Growth*, **2013**, 13,2247–2251.

{18} Ropp R.C, “Group 14 (C, Si, Ge, Sn, and Pb) alkaline earth compounds. In: Ropp RC (ed) *Encyclopedia of the alkaline earth compounds*”, Elsevier,**2013**,351–480.

{19} Chang, R., Choi, D., Kim, M. H., and Park, “Tuning crystal polymorphisms and structural investigation of precipitated calcium carbonates for CO<sub>2</sub> mineralization”, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **2017**,5, 1659–1667.

{20} Mauter MS, “Elimelech M *Environmental applications of carbon-based nanomaterials*”, *Environmental Science Technology*, **2008**,42,5843– 5859

- {21} Avouris P et.al, “Graphene: electronic and photonic properties and devices”, Nano Letters, **2010**, 10, 4285–429
- {22} He X, Deng H, Hwang , “The current application of nanotechnology in food and agriculture”, Journal of Food and Drug Analysis , **2019**, 27, 1– 21.
- {23} EFSA, Scientific opinion on re-evaluation of calcium carbonate (E 170) as a food additive, EFSA J. 9 , **2011**, 1–73
- {24} Stark W.J., Stoessel PR., Wohlleben W., Hafner A., “Industrial applications of nanoparticles”, Chemical Society Reviews , **2015**, 44, 5793– 5805
- {25} Erdoğan N, Eken H, “Precipitated Calcium carbonate production, synthesis and properties”, Physicochemical Problems of Mineral Processing , **2017**, 53, 57–68
- {26} Ε.Λεοντίδης , Σημειώσεις μαθήματος επιστήμης κολλοειδών, Πανεπιστήμιο Κύπρου, 2021
- {27} Cullity, B. D., “Elements of X-ray Diffraction”, Addison-Wesley Publishing Co., **1978**, 2nd edition
- {28} Pecharsky, V., Zavalij, P., “Fundamentals of Powder Diffraction and Structural Characterization of Materials”, Second Edition, **2009**, 744-789
- {29} Σκλαβούνος, Σ., Καντηράνης, Ν., Παπαδόπουλου, Λ., Εργαστηριακές μέθοδοι έρευνας ορυκτών. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, **2011**
- {30} Newbury Dale E, “Advanced Scanning electron microscopes X-ray microanalysis”, **1986**
- {31} John P. Sibilis, “A Guide to materials characterization and chemical analysis; Electron probe microanalysis and scanning electron microscopy”, National Measurement Laboratory (U.S.), Office of Standard Reference Materials, **1981**
- {32} Στέλιος Τερζάκης , Σημειώσεις Εργαστηρίου «Ανόργανη Χημεία ΙΙ» Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης, **2020**
- {33} Al Omari, M.M.H.; Rashid, I.S.; Qinna, N.A.; Jaber, A.M.; Badwan, A.A. , “Calcium Carbonate. Profiles Drug Substances , **2016**, 41, 31–132
- {34} <https://chembam.com/thermogravimetric-analysis-tga/>

{35} Greenwood R, Kendall K, “Electroacoustic studies of moderately concentrated colloidal suspensions” ,Journal of the European Ceramic Society, **1999**, 479–488

{36} Hanaor D.A.H., Michelazzi M., Leonelli C., Sorrell C.C, “The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO<sub>2</sub>”, Journal of the European Ceramic Society, **2012**,235–244

{37} Γρυπάρης Α.Χ.Ε., «Ανάπτυξη Νανοσωματιδιακών Μορφών Χορήγησης Αντικαρκινικών Ουσιών,» Πάτρα, **2006**

{38} Cai W-Y, Xu Q, Zhao X-N, Zhu J-J, Chen H-Y, “Porous goldnanoparticle–CaCO<sub>3</sub> hybrid material: preparation, characterization, and application for horseradish peroxidase assembly and direct electrochemistry”, Chemistry of Materials ,**2006**,18,279–284.

{39} A. Fujii, T. Maruyama, Y. Ohmukai, E. Kamio, T. Sotani and H. Matsuyama, “Cross-linked DNA Capsules Templated on Porous Calcium Carbonate Microparticle”,Colloids and Surfaces, **2010**, 356, 126–133.

{40} D. Gebauer, H. Cölfen, A. Verch, M. Antonietti, “The multiple roles of additives in CaCO<sub>3</sub> crystallization: a quantitative case study”, Advanced Materials,**2009**, 21,435–439

{41} R.-Q. Song, H. Colfen, “Additive controlled crystallization”, Crystengcomm ,**2011**,13 1249–1276

{42} D.B. Trushina, T.V. Bukreeva, M.V. Kovalchuk, M.N. Antipina, “CaCO<sub>3</sub> vaterite microparticles for biomedical and personal care applications”, Materials Science Engineering ,**2014**,45, 644–658

{43} D. Konopacka-Łyskawa, “Synthesis methods and favorable conditions for spherical vaterite precipitation: A review”, Crystals ,**2019**,9,223-233

{44} M.R. Abeywardena et.al, “Surfactant assisted synthesis of precipitated calcium carbonate nanoparticles using dolomite: Effect of pH on morphology and particle size”, Advanced Powder Technology,**2020**,8,330-353

{45} Jun-Hwan Bang et. al, “Effect of Critical Micelle Concentration of Sodium Dodecyl Sulfate Dissolved in Calcium and Carbonate Source Solutions on Characteristics of Calcium Carbonate Crystals”, Materials Transactions, **2010**, 51, 1486- 1489.

{46} G.A. Islan, M.L. Cacicedo, V.E. Bosio, G.R. Castro, “Development and characterization of new enzymatic modified hybrid CaCO<sub>3</sub> microparticles to obtain nano-architected surfaces for enhanced drug ,loading”, Journal of Colloid and Interface Science ,**2014**,5,345-360

{47} Aleksandra Szczes', Emil Chibowski, Lucyna Holysz, "Influence of ionic surfactants on the properties of freshly precipitated calcium carbonate", *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects*, **2007**, 297, 14–18.

{48} M. Leia et.al, "Effects of poly (sodium 4-styrene-sulfonate) on morphology of calcium carbonate particles", *Journal of Crystal Growth*, **2006**, 294, 358–366

{49} Sungjin Kim and Chan Beum Park, "Dopamine-Induced Mineralization of Calcium Carbonate Vaterite Microspheres" , *Korea Advanced Institute of Science and Technology* ,**2010**, 335 305- 701,

{50} Helmut Coven et.al, "Synthesis of a new class of double-hydrophilic block copolymers with calcium binding capacity as builders and for biomimetic structure control of minerals", *Macromolecular Physical Chemistry*, **1998**, 199, 247-254 .

{51} K. Pranay Kumar et.al, "An in situ Strategy to Encapsulate Antibiotics in a Bioinspired CaCO<sub>3</sub> Structure Enabling pH-Sensitive Drug Release Apt for Therapeutic and Imaging Applications" , *ACS Applied Materials & Interface*, **2017**, 8, 22056-63

{52} Sung-Yun Jung et.al, "Tannylated Calcium Carbonate Materials with Antacid, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Effects" , *International Journal of Molecular Sciences* ,**2021**, 22, 4614-4625

{53} B. Cheng, W. Cai and J. Yu, "DNA-mediated morphosynthesis of calcium carbonate particles", *Journal of Colloid and Interface Science*, **2010**, 352, 43–49

{54} S. Li, L. Yu, F. Geng, L. Shi, L. Zheng and S. Yuan, "Formation of Amorphous Calcium Carbonate Thin Films and Their Role in Biomineralization", *Journal of Crystal Growth*, **2010**, 312, 1766–1773

{55} Yingyuan Zhao et.al, "The preparation of calcium carbonate crystals regulated by mixed cationic/cationic surfactants", *Journal of Crystal Growth* ,**2011**, 324, 278–283

{56} H. Colfen and L. Qi, "A Systematic Examination of the Morphogenesis of Calcium Carbonate in the Presence of a Double-Hydrophilic Block Copolymer", *Chemistry European Journal*, **2001**, 7, 106–116

{57} B. P. Bastakoti, S. Guragain, Y. Yokoyama, S.-i. Yusa and K. Nakashima, "Synthesis of Hollow CaCO<sub>3</sub> Nanospheres Templated by Micelles of Poly(styrene-*b*-acrylic acid-*b*-ethylene glycol) in Aqueous Solutions" , *Langmuir*, **2010**, 27, 379– 384

{58} Yongsheng Wang et. Al, "Fast precipitation of uniform CaCO<sub>3</sub> nanospheres and their transformation to hollow hydroxyapatite nanospheres", *Journal of Colloid and Interface Science* ,**2010**, 35



- {59} Wanyou Zhange et.al, “Preparation of Calcium Carbonate Superfine Powder by Calcium Carbide Residue”, *Energy Procedia*, **2012**, 17, 1635 – 1640
- {60} Hao Wei et. al, “Effect of anionic surfactant-polymer complexes on the crystallisation of CaCO<sub>3</sub>”, *Journal of Crystal Growth*, **2004**, 264, 424-429
- {61} L.B. Gower, D.J. Odom, “Deposition of calcium carbonate films by a polymer-induced liquid- precursor ( PILP ) process”, *Journal of Crystals Growth*, **2001**, 210, 719–734
- {62} M. Faatz, F. Gröhn, G. Wegner, “Mineralization of calcium carbonate by controlled release of carbonate in aqueous solution”, *Materials Sciences Engineering*, **2005**, 25, 153-159
- {63} C.K. Ahn, H.W. Lee, M.W. Lee, Y.S. Chang, K. Han, C.H. Rhee, J.Y. Kim, H.D. Chun, J.M. Park, “Determination of ammonium salt/ion speciation in the CO<sub>2</sub> absorption process using ammonia solution: modeling and experimental approaches”, *Energy Procedia* 4, **2011**, 541–547
- {64} Q. Zhang, L. Ren, Y. Sheng, Y. Ji and J. Fu, “Control of morphologies and polymorphs of CaCO<sub>3</sub> via multi-additives system”, *Materials Chemistry and Physics*, **2010**, 122, 156–163
- {65} J. T. Han, X. Xu and K. Cho, “Sequential formation of calcium carbonate superstructure: From solid/hollow spheres to sponge-like/solid films”, *Journal of Crystals Growth*, **2007**, 308, 110– 116
- {66} A.-W. Xu, M. Antonietti, S.-H. Yu and H. Cölfen, “Polymer-Mediated Mineralization and Self-Similar Mesoscale-Organized Calcium Carbonate with Unusual Superstructures”, *Advanced Materials*., **2008**, 20, 1333–1338
- {67} Anton N, Benoit J-P, Saulnier P , “Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review”, *Journal of Control Release*, **2008**, 128, 185–199.
- {68} Shum HC, Lee D, Yoon I, Kodger T, “Double emulsion templated monodisperse phospholipid vesicles”, *Langmuir*, **2008**, 24, 7651–7653
- {69} Chen Z, Nan Z., “Controlling the polymorph and morphology of CaCO<sub>3</sub> crystals using surfactant mixtures”, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2011**, 358, 416–422
- {70} H. Cölfen and L. Qi, *Chem.–Eur. J.*, 2001, 7, 106–116.
- {71} A.-J. Xie, Z.-W. Yuan and Y.-h. Shen, *J. Cryst. Growth*, 2005, 276, 265–274

- {72} Z. Mao and J. Huang, *J. Solid State Chem.*, 2007, 180, 453–460. 55 H. Keller and J. Plank, *Cem. Concr. Res.*, 2013, 54, 1–11.
- {73} B. Cheng, M. Lei, J. Yu and X. Zhao, *Mater. Lett.*, 2004, 58, 1565–1570
- {74} Y. Sheng Han, G. Hadiko, M. Fuji, M. Takahashi, “Crystallization and transformation of vaterite at controlled pH”, *Journal of Crystals Growth*, **2008**
- {75} M. Ma, Y. Wang, X. Cao, W. Lu, Y. Guo, “Temperature and supersaturation as key parameters controlling the spontaneous precipitation of calcium carbonate with distinct physicochemical properties from pure aqueous solutions”, *Journal of Crystals Growth*, **2019**, 6972–6988,
- {76} N. Feoktistova, J. Rose, V.Z. Prokopović, A.S. Vikulina, A. Skirtach, D. Volodkin, “Controlling the vaterite CaCO<sub>3</sub> crystal pores. Design of tailor-made polymer based microcapsules by hard templating”, *Langmuir*, **2016**, 32, 4229–4238
- {77} W. Wei, G.-H. Ma, G. Hu, D. Yu, T. McLeish, Z.-G. Su and Z.-Y. Shen, “Preparation of hierarchical hollow CaCO<sub>3</sub> particles and the application as anticancer drug carrier”, *Journal of American Chemists Society*, **2008**, 130, 15808–15810
- {78} T. Ogino, T. Suzuki, K. Sawada, “The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water”, *Geochim. Cosmochim.*, **1987**, 51, 2757–2767
- {79} M. Kitamura, “Strategy for control of crystallization of polymorphs”, *CrystEngComm.*, **2009**, 11, 949–964
- {80} C.Y. Tai, P. Chen, “Morphology of calcium carbonate”, *AIChE.*, **1995**, 41, 68–77
- {81} D. Volodkin et.al, “CaCO<sub>3</sub> templated micro-beads and -capsules for bioapplications”, *Advanced Colloid Interfaces Science*, **2014**, 207, 306–324
- {82} D.B. Trushina, T.V. Bukreeva, M.N. Antipina, “Size-controlled synthesis of vaterite calcium carbonate by the mixing method”, *Journal of Crystals Growth*, **2018**, 18, 1311–1319
- {83} Ç.M. Oral, B. Ercan, “Influence of pH on morphology, size and polymorph of room temperature synthesized calcium carbonate particles”, *Powder Technology*, **2018**, 339, 781–788

- {84} H. Bahrom, et al, “Controllable synthesis of calcium carbonate with different geometry: comprehensive analysis of particle formation, cellular uptake, and biocompatibility”, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* ,**2019**,7,224-230
- {85} F. Manoli, E. Dalas, “Spontaneous precipitation of calcium carbonate in the presence of ethanol, isopropanol and diethylene glycol”, *Journal of Crystals Growth*,**2000**, 218 , 359–364
- {86} B.V. Parakhonskiy, A. Haase, R. Antolini,” Sub-micrometer vaterite containers: synthesis, substance loading, and release”, *Angewandte Chemie International Edition*,**2012**, 1195–1197
- {87} X.-H. Guo, S.-H. Yu, G.-B. Cai, “Crystallization in a mixture of solvents by using a crystal modifier: morphology control in the synthesis of highly monodisperse CaCO<sub>3</sub> microspheres”, *Angewandte Chemie International Edition* ,**2006**,118,4081–4085
- {88} D. Konopacka-Łyskawa, “Synthesis methods and favorable conditions for spherical vaterite precipitation: A review”, *Crystals*, **2019**,9
- {89} H. Bahrom et al, “Controllable synthesis of calcium carbonate with different geometry: comprehensive analysis of particle formation, cellular uptake, and biocompatibility”, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* ,**2019**,120-132
- {90} K.K. Sand, J.D. Rodriguez-Blanco, E. Makovicky, L.G. Benning, S.L.S. Stipp, “Crystallization of CaCO<sub>3</sub> in water-alcohol mixtures: spherulitic growth, polymorph stabilization, and morphology change”, *Journal of Crystals Growth* ,14, 2014, 842–853
- {91} G.D. Griffin, D.N. Stratis-Cullum, S. Moselio, “Biosensors, *Encyclopedia of Microbiology*”, Academic Press, **2009**,88–103
- {92} L. Choulier, K. Enander, “Environmentally Sensitive Fluorescent Sensors Based on Synthetic Peptides”, *Sensors* ,**2010**,10, 3126–3144.
- {93} E. Pazos, O. Vazquez, J.L. Mascarenas, M.E. Vazquez, “Peptide-based fluorescent biosensors” *Chemical Society Reviews*, **2009**,38, 3348–3359
- {94} G. Wang, R. Han, X. Su, Y. Li, G. Xu, X. Luo, “Zwitterionic peptide anchored to conducting polymer PEDOT for the development of antifouling and ultra sensitive electrochemical DNA sensor”, *Biosens*,**2017**, 92

- {95} S. Chen, Z. Cao, S. Jiang, “Ultra-low fouling peptide surfaces derived from natural amino acids”, *Biomaterials*,**2009**, 30
- {96} Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., and Wilson G. S. , “Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*”,**1999**,2333–2348
- {97} Γ. Θεοδορίδης , Σ. Γηρούση, Γ. Ζαχαριάδης, Α-Σ. Ζώτου και Β. Σαμανίδου ,Γηρούση, Σ, “Βιοαισθητήρες Σύγγραμμα Βιοαναλυτική Χημεία” ,Κεφ. 7. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών,**2015**
- {98} K.Y. Tomizaki, H. Mihara,” A novel fluorescence sensing system using a photochromism-based assay (P-CHROBA) technique for the detection of target proteins”,*Journal of Materials Chemistry*,**2005**,15, 2732–2740
- {99} K.J. Oh, K.J. Cash, K.W. Plaxco, “Hairpin Peptide Beacon: Dual-Labeled PNA-Peptide-Hybrids for Protein Detection”, *Journal of American Chemical Society*,**2007**,128, 14018–14019
- {100} K.J. Oh, K.J. Cash, V. Hugenberg, K.W. Plaxco, “Folding-based electrochemical biosensors: the case for responsive nucleic acid architectures”, *Bioconjugate Chemistry*,**2007**, 18 ,607–60
- {101} K.E. Sapsford, J.B. Blanco-Canosa, P.E. Dawson, I.L, “Self-Assembled Quantum Dot–Peptide Bioconjugates for Selective Intracellular Delivery”. *Medintz, Bioconjugate Chemistry*,**2010**, 393–398
- {102} K.B. Li, H.M. Huang, L.Z. Huang, Z.Y. Lin, L.H. Guo, B. Qiu, G.N. Chen, “Nanostructured Mo-based electrode materials for electrochemical energy storage”, *Chemical Society Reviews* ,**2013**,109, 233–237.
- {103} J.Y. Gerasimov, R.Y. Lai, “An electrochemical peptide-based biosensing platform for HIV detection”,*Chemical Communications*,**2010**, 46 , 395–397.
- {104} H. Li, Y. Cao, X.L. Wu, Z.H. Ye, G.X. Li, “Peptide-based electrochemical biosensor for amyloid  $\beta$  1–42 soluble oligomer assay,*Talanta* ,**2012**,93 , 358–363
- {105} Tsionsky V., “The Quartz Crystal Microbalance W in an Undergraduate Laboratory Experiment”, *Journal of Chemical Education*,**2007**,84,133-34
- {106} Maglio O.,Costanzo S.,Cercola R., “A Quartz Crystal Microbalance Immunosensor for Stem Cell Selection and Extraction”,*Sensors*,**2017**,17,2747

- {107} Caruso F., Rinia H. A., Furlong D.N., “Gravimetric of Nonionic Surfactant Adsorption from Nanoaqueous Media onto Quartz Crystal Microbalance Electrodes and Colloidal Silica”, *Lagmuir*, **1996**, 12, 2145-2152
- {108} D'souza M, Datta K. Evidence for naturally occurring hyaluronic acid binding protein in rat liver. *Biochem Int* (1985) 10(1):43–51.
- {109} Lynch NJ, Reid KB, Van Den Berg RH, Daha MR, Leigh LA, Ghebrehiwet B, et al., “Characterisation of the rat and mouse homologues of gC1qBP, a 33 kDa glycoprotein that binds to the globular 'heads' of C1q”. *FEBS Letters*, 1997, 418, 111–114
- {110} Ghebrehiwet B, Geisbrecht BV, Xu X, Savitt AG, Peerschke EIB., “The C1q receptors: Focus on gC1qR/p33”, *Semin Immunology*, **2019**, 45:101-128
- {111} Ghebrehiwet B, Jesty J, Vinayagasundaram R, Vinayagasundaram U, Ji Y, Valentino A, et al., “Targeting gC1qR domains for therapy against infection and inflammation”, *Springer US*, **2013**, 97–110
- {112} Kitazawa S, Takenaka A, Kondo T, Mizoguchi A, Kitazawa R., “Protruding disordered loop of gC1qR is specifically exposed and related to antiapoptotic property in germ cell lineage”, *Histochem Cell Biology*, **2006**, 126, 665–77
- {113} Ghebrehiwet B, Lim BL, Peerschke EI, Willis AC, Reid KB., “Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q”, *Journal of Experimental Medicine*, **1994**, 179, 1809–21.
- {114} Ghebrehiwet B, Hosszu KK, Valentino A, Ji Y, Peerschke EI., “Monocyte expressed macromolecular C1 and C1q receptors as molecular sensors of danger: Implications in SLE”, *Front Immunology*, **2014**, ,278-84
- {115} Ghebrehiwet B, Lim BL, Kumar R, Feng X, Peerschke EI, “gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection”, *Immunol Reviews*, **2001**, 180, 65-77
- {116} Muta T, Kang D, Kitajima S, Fujiwara T, Hamasaki N., “p32 protein, a splicing factor 2-associated protein, is localized in mitochondrial matrix and is functionally important in maintaining oxidative phosphorylation”, *Journal of Biological Chemistry*, **1997**, 272, 24363–70

- {117} Mcgee AM, Baines CP, “Complement 1q-binding protein inhibits the mitochondrial permeability transition pore and protects against oxidative stress induced death”,*Biochemistry Journals*,**2011** ,433,119–25
- {118} “Kim KB, Yi JS, Nguyen N, Lee JH, Kwon YC, Ahn BY, et al. Cell-surface receptor for complement component C1q (gC1qR) is a key regulator for lamellipodia formation and cancer metastasis”, *Journal of Biological Chemistry*, **2011**, 286,23093–101
- {119} Peerschke EI, Ghebrehiwet B, “cC1qR/CR and gC1qR/p33: observations in cancer”, *Molecular Immunology*, **2014** ,101–9
- {120} Saha SK, Kim KE, Islam SMR, Cho SG, Gil M., “Systematic multiomics analysis of alterations in C1QBP mRNA expression and relevance for clinical outcomes in cancers”,*Journal of Clinical Medicine*,**2019**,8
- {121} Egusquiza-Alvarez CA, Castañeda-Patlán MC, Albarran-Gutierrez S, Gonzalez-Aguilar H, Moreno-Londoño AP, Maldonado V, et al., “Overexpression of multifunctional protein p32 promotes a malignant phenotype in colorectal cancer cells”,*Frontiers in Oncology* ,**2021**, 11,642-649
- {122} Zhang X, Zhang F, Guo L, Wang Y, Zhang P, Wang R, et al., “Interactome analysis reveals that C1QBP (complement component 1, q subcomponent binding protein) is associated with cancer cell chemotaxis and metastasis”., *Molecular Cell Proteomics*, **2013** ,12 ,3199–209.
- {123} Dang CV. Et.al, “p32 (C1QBP) and cancer cell metabolism: is the warburg effect a lot of hot air”,*Molecular Cell Biology*, **2010** ,30,1300–2.
- {124} Kaul R, Saha P, Saradhi M, Prasad RL, Chatterjee S, Ghosh I, et al. , “Overexpression of hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) in HepG2 cells leads to increased hyaluronan synthesis and cell proliferation by up-regulation of cyclin D1 in AKT-dependent pathway”,*Journal of Biological Chemistry*, **2012**, 287
- {125} Sinha S, Singh SK, Jangde N, Ray R, Rai V., “p32 promotes melanoma progression and metastasis by targeting EMT markers, Akt/PKB pathway, and tumor microenvironment”, *Cell Death Disease*, **2021**,12,1012-1019
- {126} Wu H, Chu Y, Sun S, Li G, Xu S, Zhang X, et al., “Hypoxia-mediated complement 1q binding protein regulates metastasis and chemoresistance in triple-negative breast cancer and modulates the PKC-NF-kB-VCAM-1 signaling pathway”, *Frontiers in Cell Biology*, **2021**,9,234-240

{127} Wang Z, Sun A, Yan A, Yao J, Huang H, Gao Z, et al. “Circular RNA MTCL1 promotes advanced laryngeal squamous cell carcinoma progression by inhibiting C1QBP ubiquitin degradation and mediating beta-catenin activation”, *Molecular Cancer*, **2022**, 21

{128} Lei Y, Li X, Qin D, Zhang Y and Wang Y . , “gC1qR: A New Target for Cancer Immunotherapy”, *Frontiers in Immunology*,**2023**, 14,567-58