



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεση & Ανάπτυξη Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών

Εγκλεισμός μορίων με αντιβιοεπιστρωτική δράση (antifouling) σε νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος)

Αριστοτέλης Α. Καμτσικάκης

Επιβλέπουσα: Σταματίνα Ν. Βουγιούκα (Επίκουρος Καθ. Ε.Μ.Π.)

Επεξήγηση του Τίτλου της Διπλωματικής

«Εγκλεισμός μορίων με αντιβιοεπιστρωτική δράση (antifouling)»

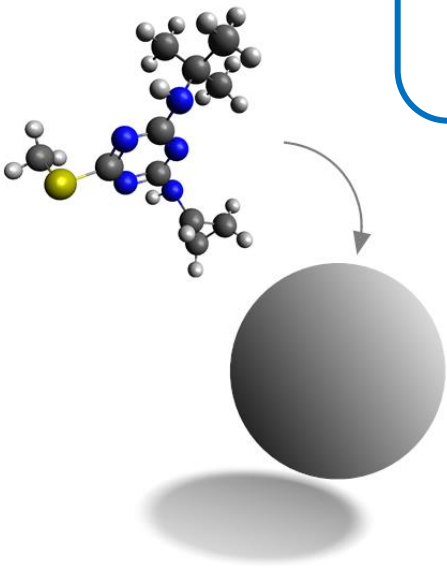
σε νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος)»



$\geq 10^{-4}$ m



$\sim 10^{-7} - 10^{-9}$ m



Περιεχόμενα Παρουσίασης - Ερωτήσεις προς Απάντηση

Εισαγωγικές έννοιες

- Τι είναι η βιοεπίστρωση;
- Τι συνέπειες έχει;
- Πώς αντιμετωπίζεται;
- Τι είναι τα ενισχυτικά βιοκτόνα;
- Γιατί να εγκλειστούν;
- Τι είναι «βιοδιασπώμενο πολυμερές»;
- Γιατί το PLA ως πολυμερικός φορέας;

Οριοθέτηση θέματος & Πειραματική διαδικασία

- Έχουν πραγματοποιηθεί άλλες συγγενείς εργασίες;
- Τι καινοτόμο παρουσιάζει η παρούσα διπλωματική;
- Πώς επιτυγχάνει τον εγκλεισμό των ενώσεων;
- Ποια χαρακτηριστικά των σωματιδίων εξετάζονται;

Αποτελέσματα & Συζήτηση αποτελεσμάτων

- Τι μεγέθη σωματιδίων παρήχθησαν;
- Ήταν σταθερές οι διασπορές τους;
- Επηρέασε η διαδικασία της λυοφιλοποίησης τα σωματίδια;
- Εγκλείστηκε ένωση; Αν ναι, πόση;
- Πώς ήταν τα σωματίδια οπτικά;
- Ποια ήταν η θερμική τους συμπεριφορά;

Συμπεράσματα & Προτάσεις

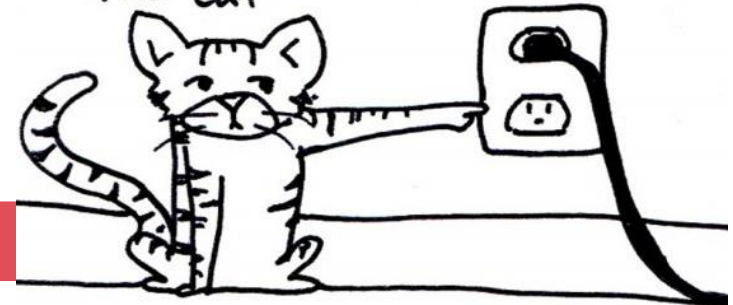


"Sorry, it's curiosity"

Curiosity

KILLED

the cat



Βιοεπίστρωση Υποθαλάσσιων Επιφανειών



Ορισμός
Fouling

Προσκόλληση
οργανισμών

Συσώρευση
οργανισμών

Ανάπτυξη
οργανισμών

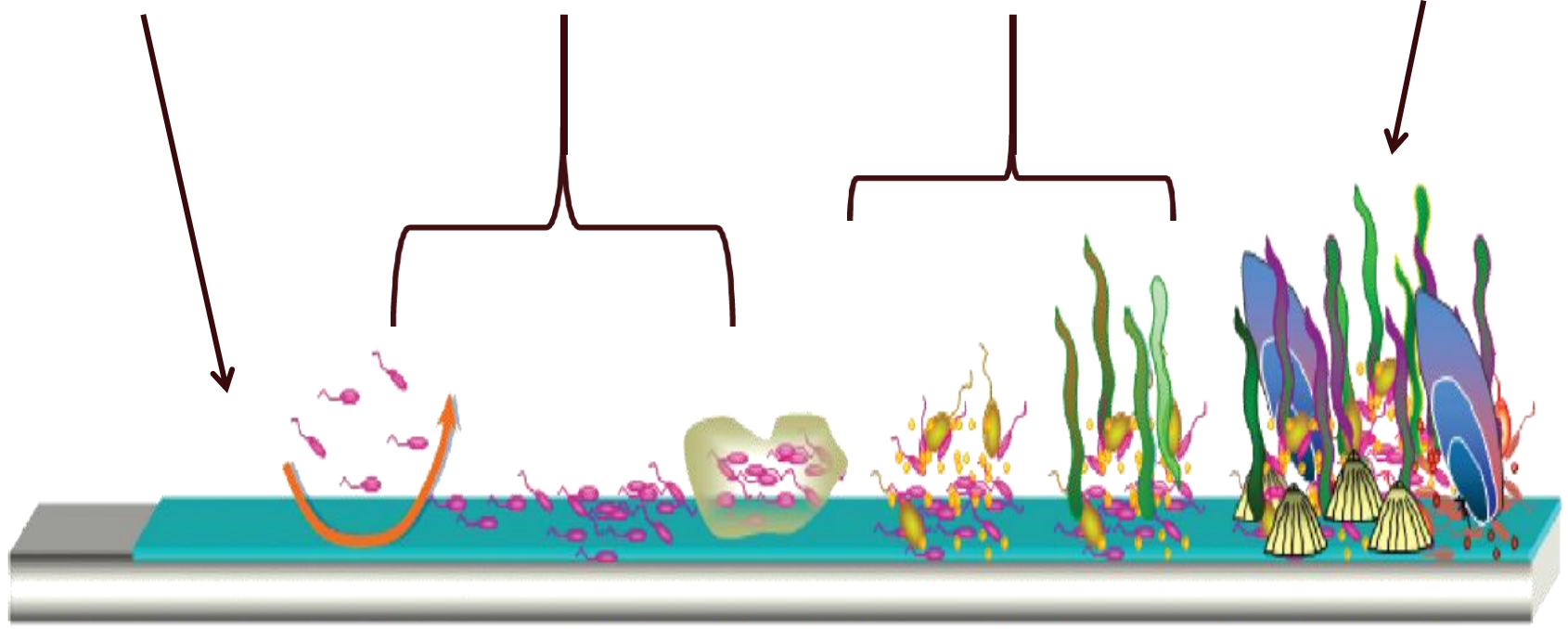
Μηχανισμός Βιοεπίστρωσης Επιφανειών

1^ο Στάδιο

2^ο Στάδιο

3^ο Στάδιο

4^ο Στάδιο



Substrate Conditioning film Non-adherent bacteria Adherent bacteria Bacterial biofilm Bacteria, diatoms, microalgae spores Macroalgae, larva of invertebrates and invertebrates

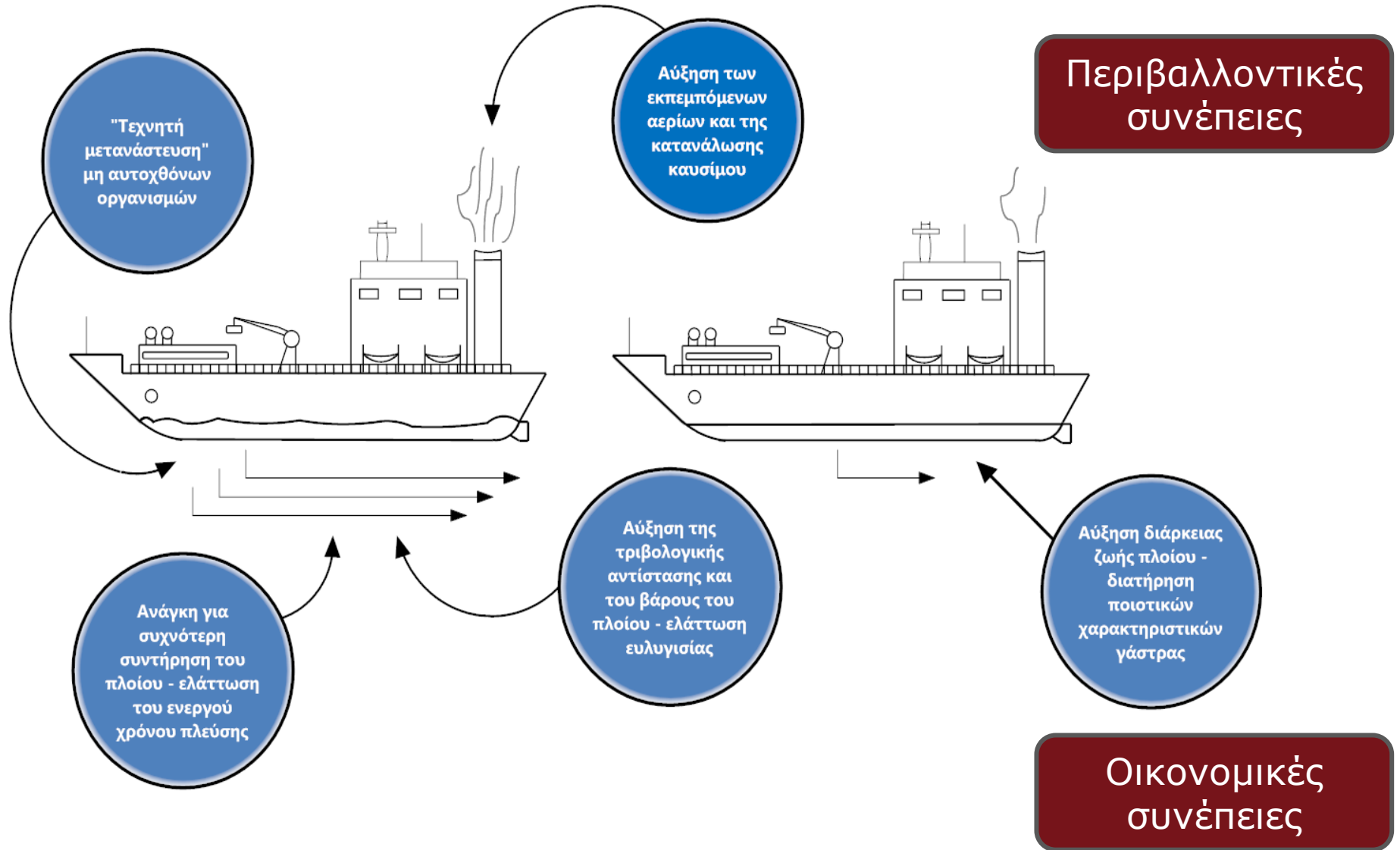
(sec) (sec-min) (hours-days) (days-months)

Reversible adhesion

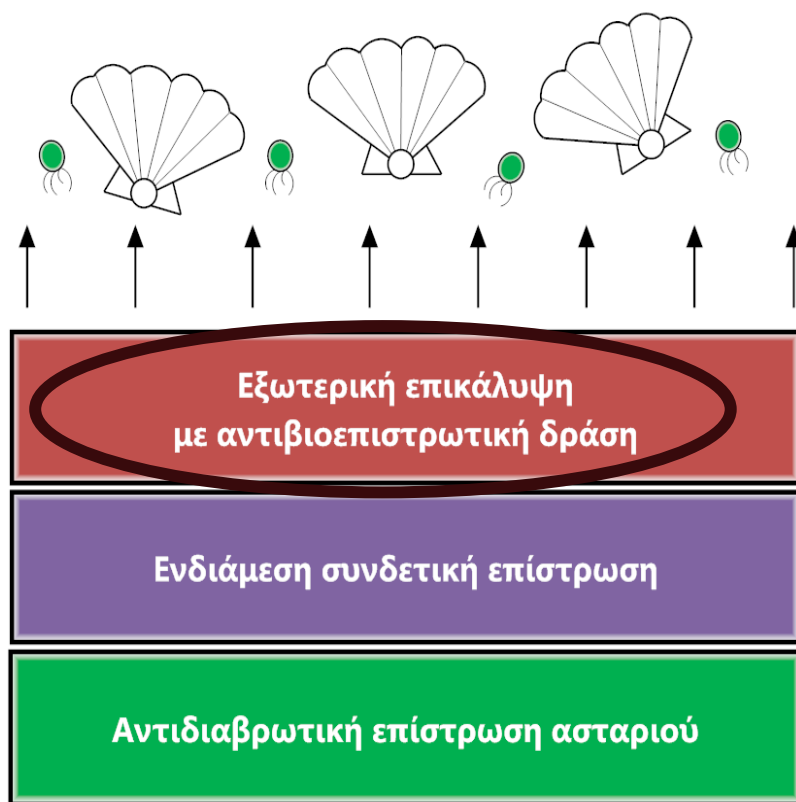
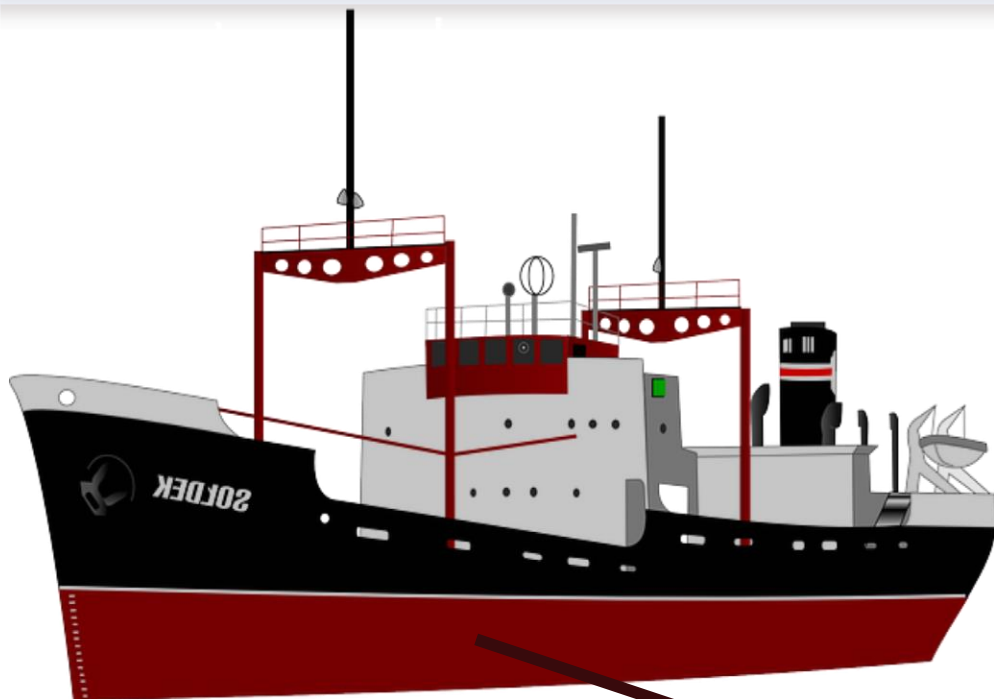
Irreversible adhesion

(2012 Lejars et al.)

Συνέπειες Βιοεπίστρωσης Πλοίων

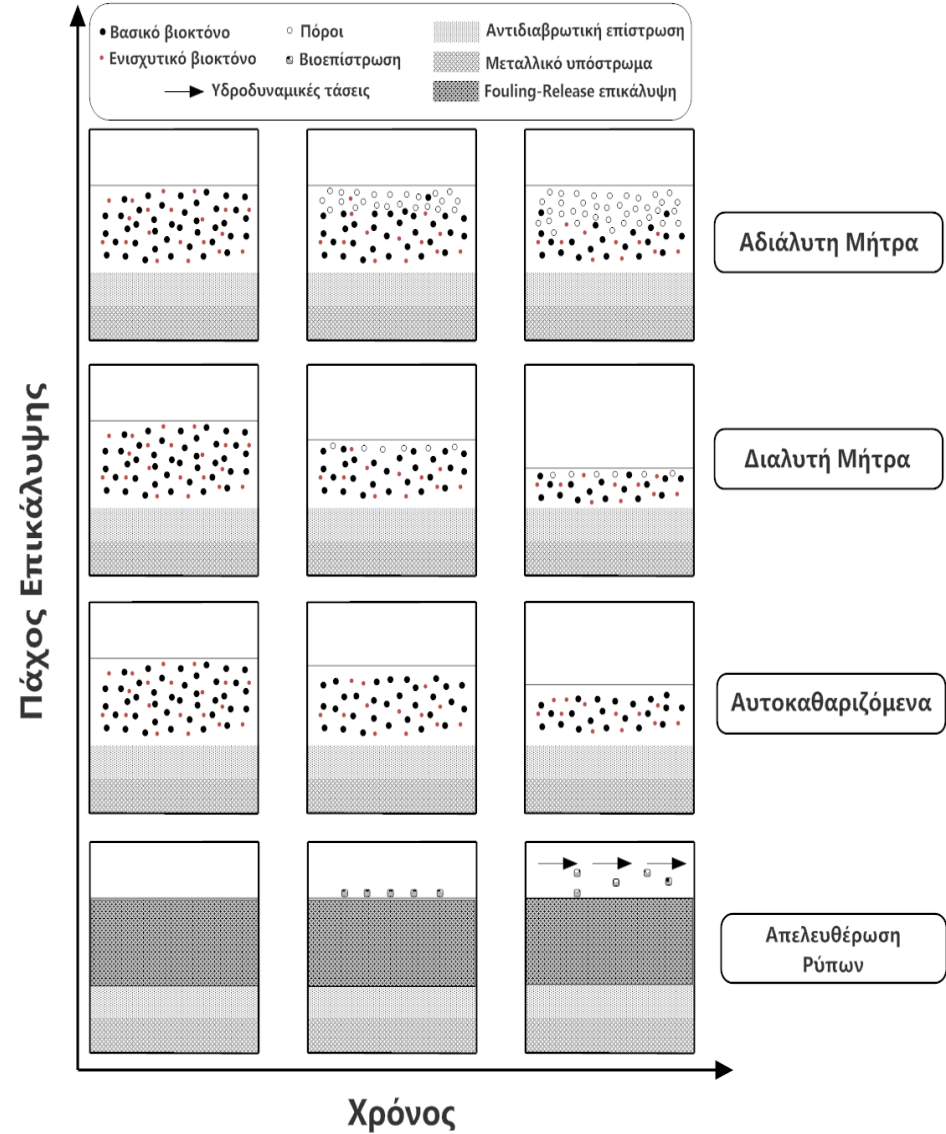


Είδη Επιστρώσεων Πλοίων - Antifouling Επικαλύψεις

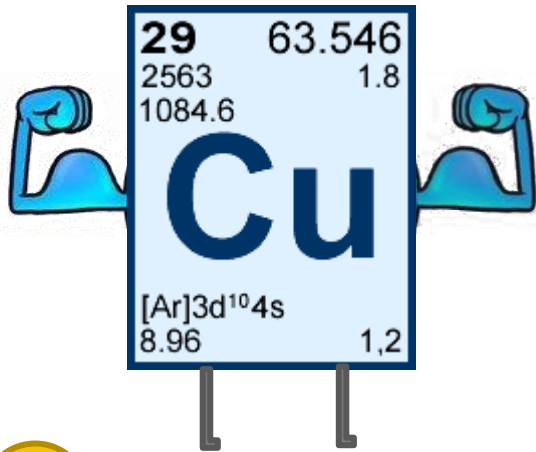


Τεχνολογίες με Αντιβιοεπιστρωτική Δράση (2/2)

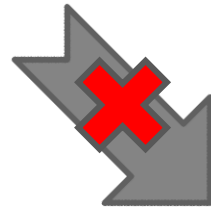
Κατηγοριοποίηση Antifouling Επικαλύψεων



Οργανικές Ενώσεις με Αντιβιοεπιστρωτική Δράση (1/2)



1
Ευρεία
Antifouling
δράση

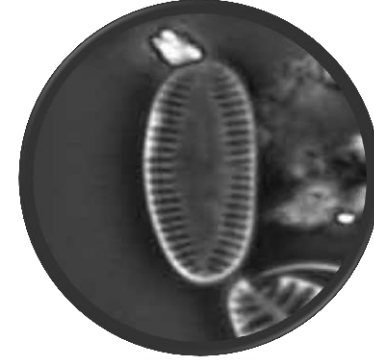


2
ΩΣΤΟΣΟ
Ανεπαρκής
δράση Cu ως
προς ορισμένα
είδη οργανισμών

Enteromorpha spp.

Ectocarpus spp.

Achnanthes spp.



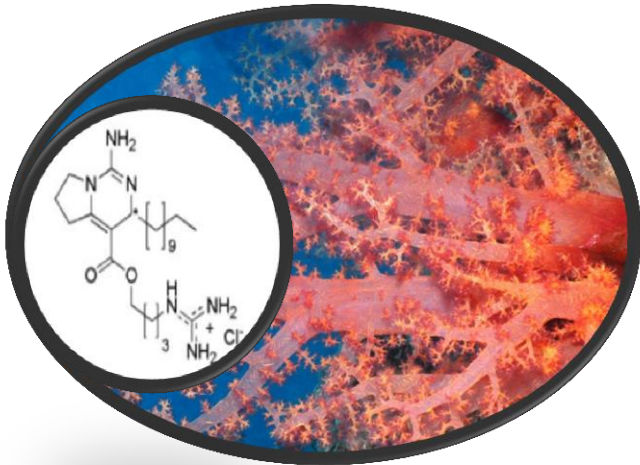
3
Χρήση Ενισχυτικών
Οργανικών Βιοκτόνων

Οργανικές Ενώσεις με Αντιβιοεπιστρωτική Δράση (2/2)

Εμπορικά Βιοκτόνα

ή

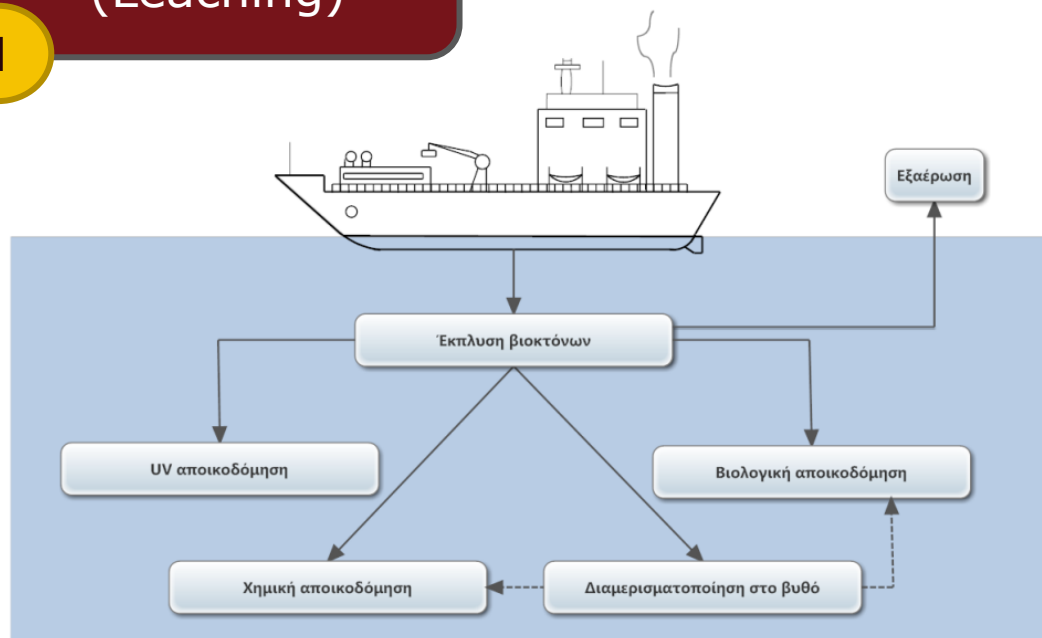
Φυσικά Προϊόντα με
Αντιβιοεπιστρωτική
δράση (NPA's)



Εμπορική Ονομασία	Irgarol 1051 TM	Econea TM	Zinc Pyrithione (ZPT)
Χημική Κλάση	<i>s</i> -Τριαζίνη	Αρωματικό αλογονίδιο	Οργανομεταλλικό άλας
Κατηγορία Βιοκτόνου	Ζιζανιοκτόνο	Παρασιτοκτόνο	Μικροβιοκτόνο
Τεχνική Δράσης	Αναστολέας μεταφοράς e ⁻ στο Φωτοσύστημα II	Αναστολέας μεταφοράς e ⁻ στα μιτοχόνδρια	Αναστολέας πολλαπλών σημείων - μεταβολικές διεργασίες
Δομή			

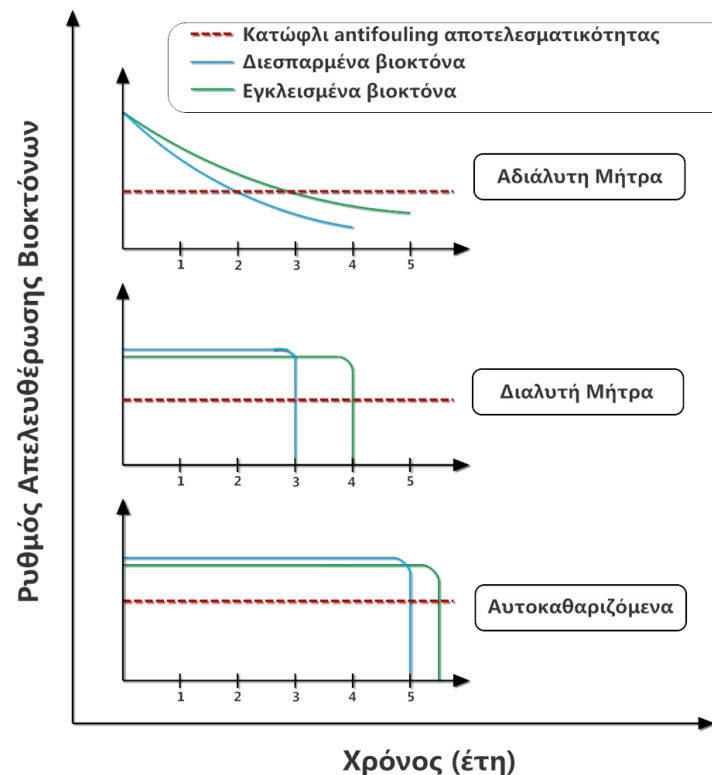
Λόγοι Εγκλεισμού Antifouling Οργανικών Ενώσεων

1
Πρόωρη Έκπλυση
(Leaching)

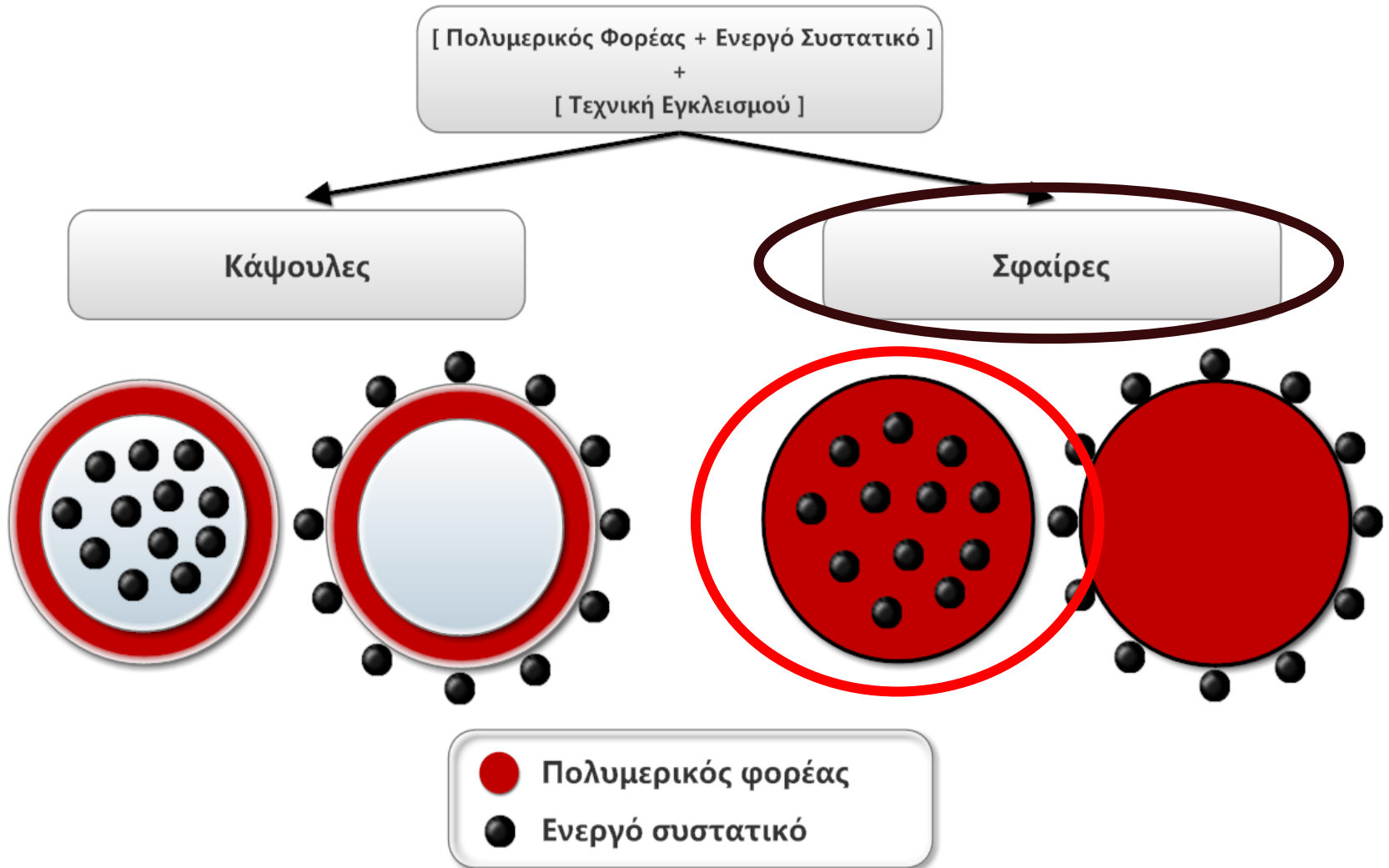


2
Πρόωρη υποβάθμιση ενεργής δομής ενώσεων πριν τη δράση τους (απώλεια antifouling χαρακτήρα)

3
(Επικουρική) Αύξηση
διάρκειας ζωής
υφαλοχρώματος

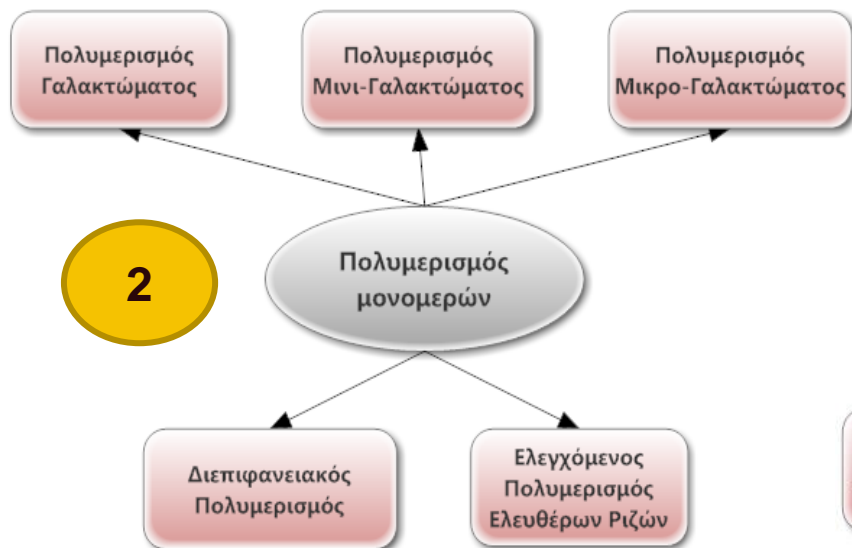


Εγκλεισμός Ενεργών Συστατικών σε Πολυμερή (1/2)



Εγκλεισμός Ενεργών Συστατικών σε Πολυμερή (2/2)

Γενικές Τεχνικές
Παρασκευής
νανο- και μικρο-
σωματιδίων



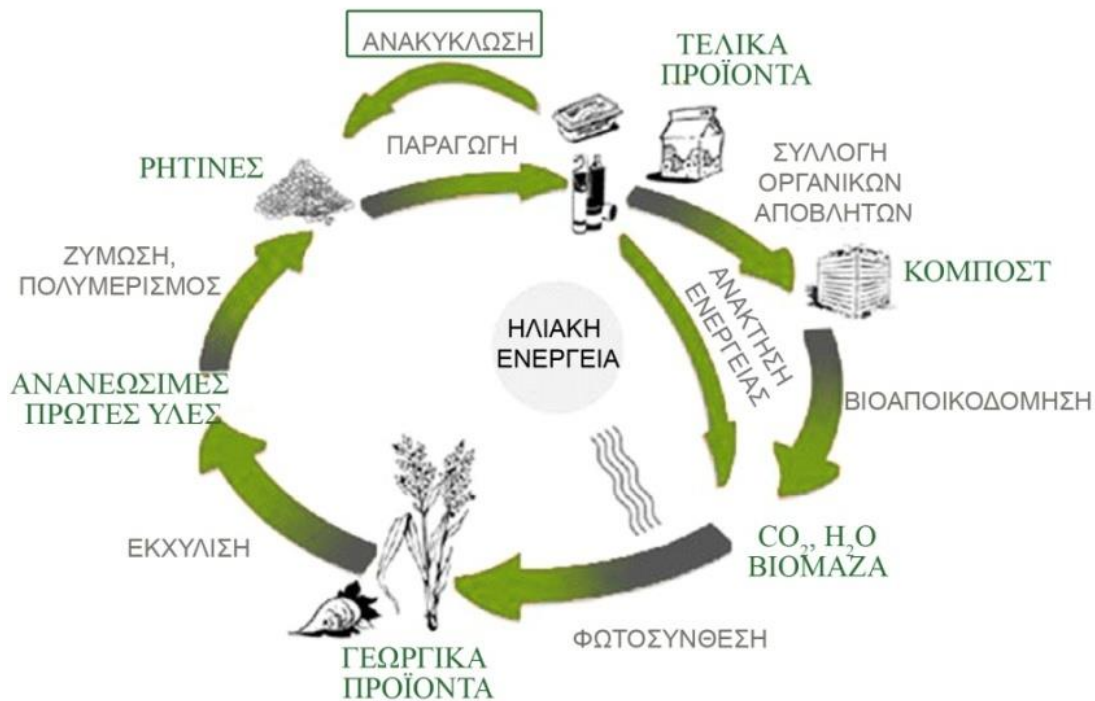
Βιοδιασπώμενοι Πολυμερικοί Φορείς (1/2)

Φυσικά
Πολυμερή

ή

Συνθετικά
Προπαρασκευασμένα
Πολυμερή

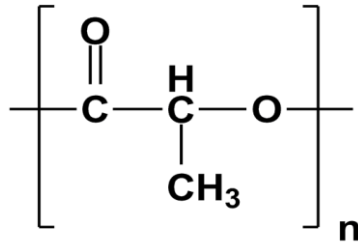
Κύκλος
Βιοδιασπώμενων
Πολυμερών



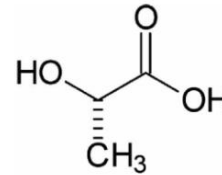
Πολυμερές	Δομική Μονάδα
πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA)	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{C} - \text{O} \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$
πολυ(γλυκολικό οξύ) (PGA)	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{C} - \text{O} \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} \right]_n$
πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) (PLGA)	$\left(\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ \parallel \quad \\ \text{C} - \text{C} - \text{O} \\ \\ \text{H} \end{array} \right)_x \left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{C} - \text{O} \\ \\ \text{H} \end{array} \right)_y$
πολυ(καπρολακτόνη) (PCL)	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - (\text{CH}_2)_5 - \text{O} \end{array} \right]_n$
πολυ(β-υδροξυ-βουτυρικό) (PHB)	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ \parallel \quad \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{O} \\ \\ \text{H} \end{array} \right]_n$
πολυανυδρίτες	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ \text{C} - \text{R} - \text{C} - \text{O} \end{array} \right]_n$
πολυ(ακυλ κυανοακρυλικό) (PACA)	$\left[\begin{array}{c} \text{CN} \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{C} \\ \\ \text{O} = \text{C} \\ \\ \text{O} - \text{R} \end{array} \right]_n$

Βιοδιασπώμενοι Πολυμερικοί Φορείς (2/2)

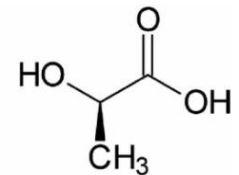
Δομική μονάδα
PLA



Οπτικά Ισομερείς Δομές
Γαλακτικού οξέος



(S)-Lactic acid
L-(+)-Lactic acid



(R)-Lactic acid
D-(-)-Lactic acid



Οικολογικός
χαρακτήρας



Βιοσυμβατό
(μη τοξικό) υλικό



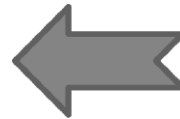
Καλές ιδιότητες φράγματος
λόγω υψηλού T_g → Αργός
ρυθμός αποδέσμευσης



Μη ενεργοβόρα
παραγωγή

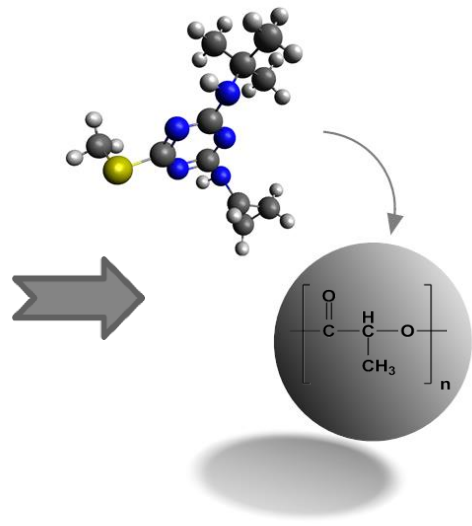
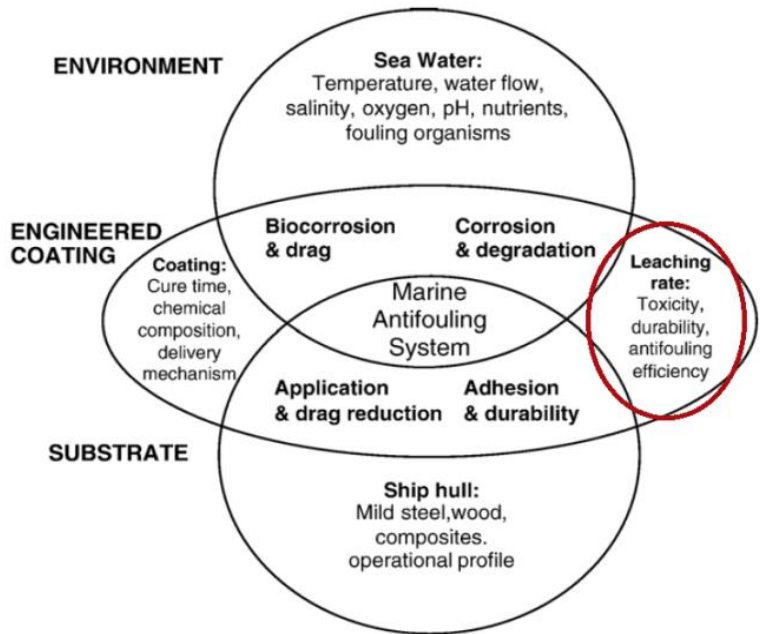
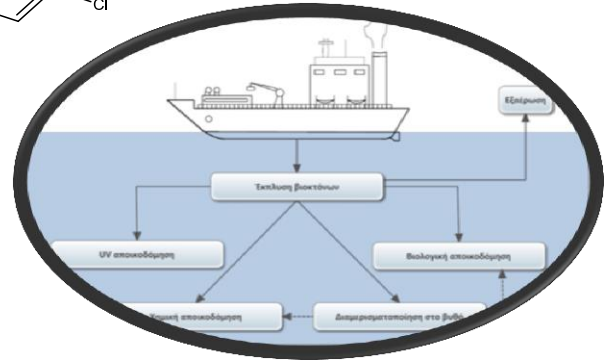
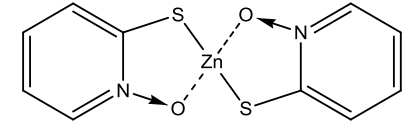
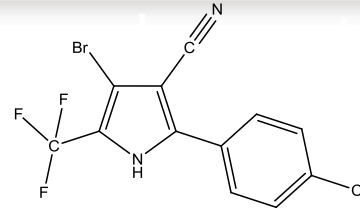
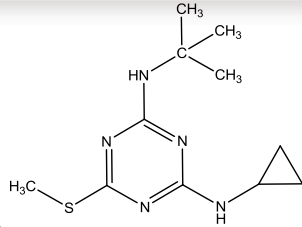


Σχετικά υδρόφοβο



Ιδιαίτερα
Χαρακτηριστικά PLA
ως πολυμερικού
φορέα εγκλεισμών

Σκοπός της Διπλωματικής



- Χρήση PLA
- Εγκλεισμός τριών ιδιαίτερα διαδεδομένων βιοκτόνων (Irgarol, Ecomea, Zinc Pyrithione)

Ανασκόπηση Εργασιών Εγκλεισμού Antifoulants

Έτος δημοσίευσης	Ερευνητική Ομάδα	Μήτρα-φορέας εγκλεισμένης ουσίας	Εγκλεισμένη ουσία	Τεχνική εγκλεισμού
1992	Price et al.	Μεταλλικοί (χάλκινοι) μικροκύλινδροι	Φυσικό εκχύλισμα <i>Renilla</i>	Εμβάπτιση ξηρής σκόνης μικροκύλινδρων σε κορεσμένο διάλυμα της ενεργής ουσίας
2001	Edge et al.	Σίλικα, ζεόλιθοι	Ισοθειαζολινόνες (π.χ. OIT)	Προσρόφηση των διαλυμένων σε κατάλληλο διαλύτη (κυκλοεξάνιο) βιοκτόνων στις εσωτερικές επιφάνειες του φορέα
2004	Geiger et al.	Πολυ(στυρένιο) (PS)	Zosteric acid (ZA, θειικό <i>p</i> -κουμαρικό οξύ)	Παραλλαγή της τεχνικής γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη ("In-liquid-drying" διεργασία)
2005	Iconomopoulou et al.	"Χάντρες" (beads) πολυ(στυρενίου)-διβινυλοβενζολίου (PS-DVB)	Triclosan, άλας του φωσφονίου (phosphonium salt)	Πολυμερισμός διασποράς
2007	Zhang et al.	Ακρυλικά συμπολυμερή PMMA-PBA	Sea-Nine 211 (DCOIT)	Πολυμερισμός μινιγαλακτώματος (miniemulsion polymerization)
2008	Faÿ et al.	Πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA)	Χλωρεξιδίνη	Γαλακτωματοποίηση-εξάτμιση διαλύτη
2010	Kristensen et al.	Σίλικα	Οξειδάση της εξόζης (HOX, E.C. 1.1.3.5)	Συν-καταβύθιση (co-precipitation)
2010	Mok	Πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA)	Μεδετομίδίνη, Irgarol 1051, Sea-Nine 211, τολουολουανίδιο	Γαλακτωματοποίηση-εξάτμιση διαλύτη
2010	Nordstierna et al.	Πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA)	Μεδετομίδίνη	Γαλακτωματοποίηση-εξάτμιση διαλύτη
2010	Nordstierna et al.	Πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA)	4-νιτροανισόλη	Γαλακτωματοποίηση-εξάτμιση διαλύτη
2010	Sørensen et al.	Σίλικα	IPBC	Τροποποιημένη τεχνική γαλακτωματοποίησης
2011	Hart et al.	Μία ή περισσότερες πολυμερικές στρώσεις (π.χ. PVA, φαινολική ρητίνη)	Kathon 287T (DCOIT)	Τροποποιημένη τεχνική γαλακτωματοποίησης για παραγωγή μικροκαψουλών πολλών τοιχωμάτων
2011	Nordstierna et al.	Πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA)	IPBC	Γαλακτωματοποίηση-εξάτμιση διαλύτη
2011	Szabó et al.	Φυσικό πολυμερές-ουρία	Άργυρος (Ag)	Πολυμερισμός γαλακτώματος
2011	Wallström et al.	Σίλικα	Zinc pyrithione	Τεχνολογία sol-gel - Σχηματισμός αερογέλης
2014	Bergek et al.	Πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA)	OIT	Παραλλαγή της τεχνικής γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη (Μέθοδος διαχωρισμού εσωτερικής φάσης)
2014	Pelto et al.	Μίγματα πολυ(στυρενίου) – πολυ(καπρολακτόνης) (PS/PCL)	IPBC	Γαλακτωματοποίηση-εξάτμιση διαλύτη
2014	Szabó et al.	Ζελατίνη-ουρία	Άργυρος (Ag)	Πολυμερισμός διασποράς

Διαδεδομένοι οι μη βιοδιασπώμενοι πολυμερικοί φορείς και η σίλικα

Σχεδόν σε όλες τις εργασίες παραγωγή μικρο-σωματιδίων

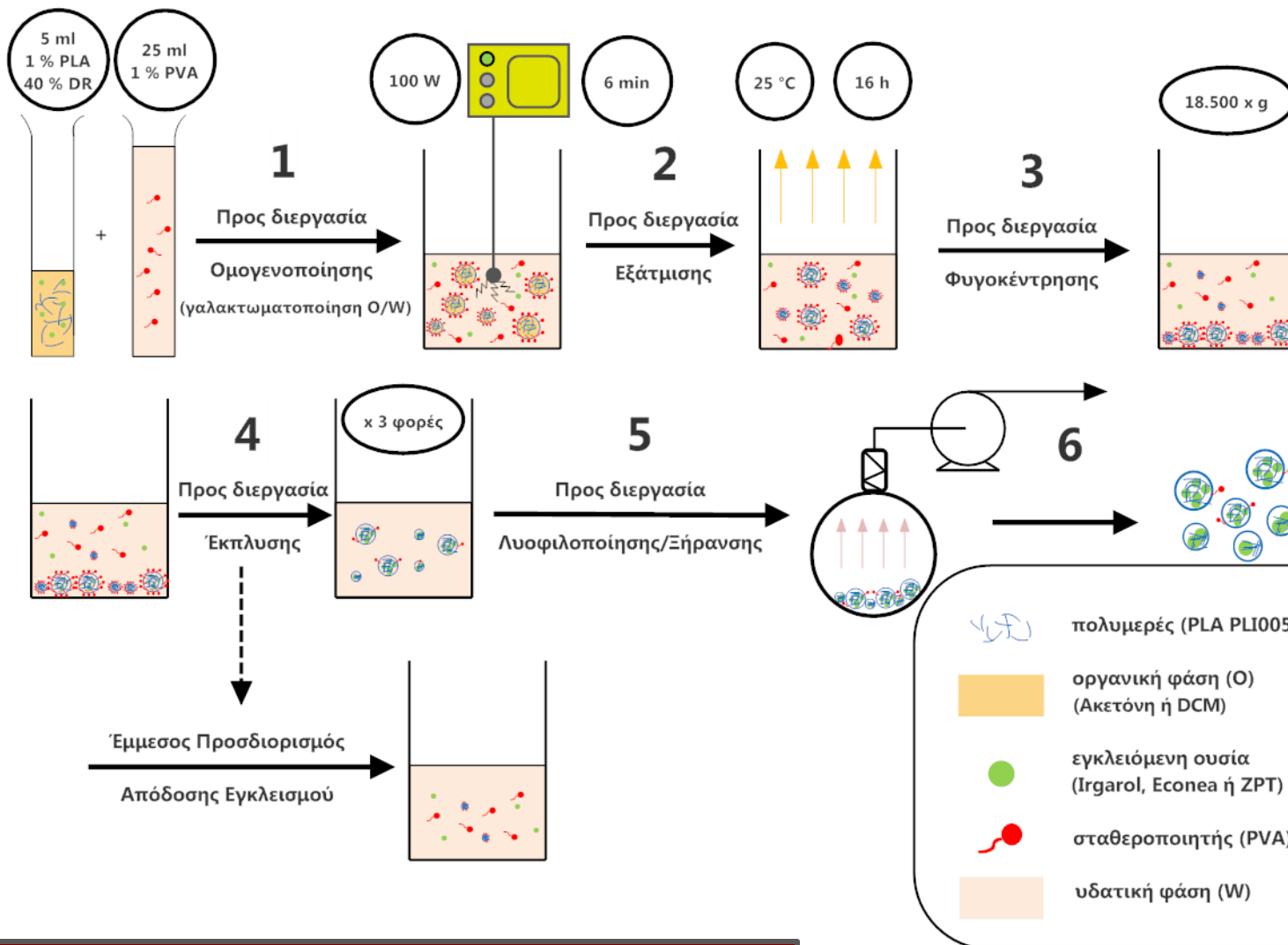
Χρήση της τεχνικής γαλακτωματοποίησης εξάτμισης του διαλύτη

Σύνοψη Πειραματικής Διαδικασίας (1/2)

1 Χαρακτηρισμός
Πρώτων Υλών

2 Παρασκευή και Απομόνωση
Νανοδομημάτων

3 Χαρακτηρισμός
Νανοδομημάτων



Σύνοψη Πειραματικής Διαδικασίας (2/2)

1

Χαρακτηρισμός
Πρώτων Υλών



Ιξωδομετρία Διαλύματος
(PLI005 135.000 M_v)

DSC & TGA σε PLA, PVA,
ενώσεις προς εγκλεισμό

3

Χαρακτηρισμός
Νανοσωματιδίων



Δυναμική Σκέδαση Φωτός (**DLS**) (μέγεθος
και κατανομή μεγέθους σωματιδίων)

Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός
(**ELS**) (ζ-δυναμικό διασπορών)

Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού
(**UV-Vis**) (προσδιορισμός απόδοσης
εγκλεισμού άμεσα και έμμεσα)

DSC & TGA (προσδιορισμός θερμικών
χαρακτηριστικών σωματιδίων)

SEM (μορφολογικός χαρακτηρισμός
σωματιδίων)

Απόδοση Εγκλεισμού (E.E)

$$E.E = \frac{[\text{μάζα εγκλεισμένης ένωσης}]}{[\text{αρχική μάζα ένωσης προς εγκλεισμό}]}$$

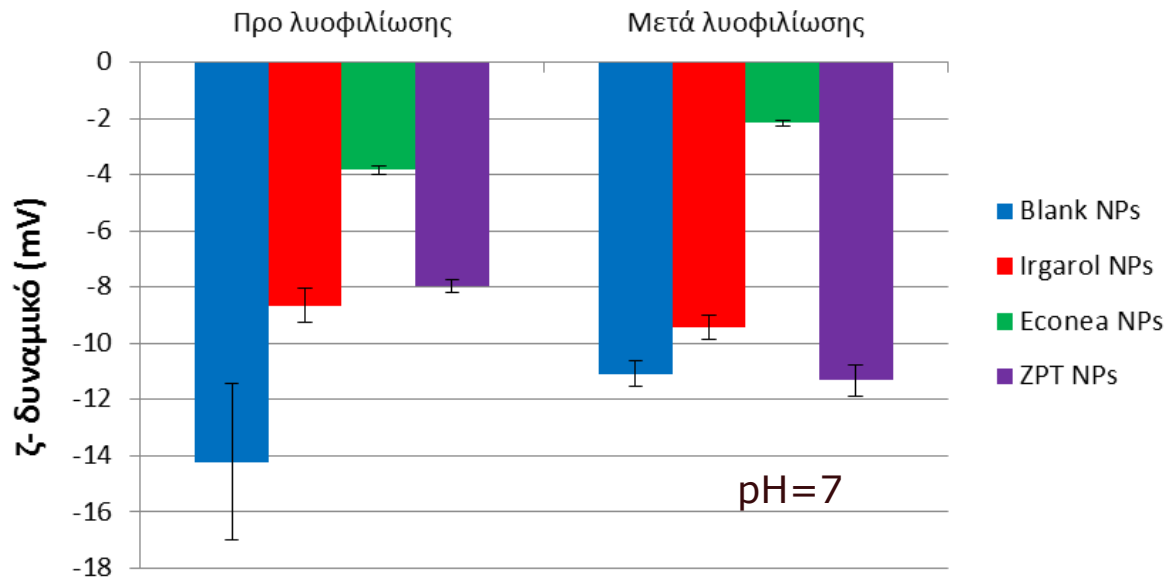
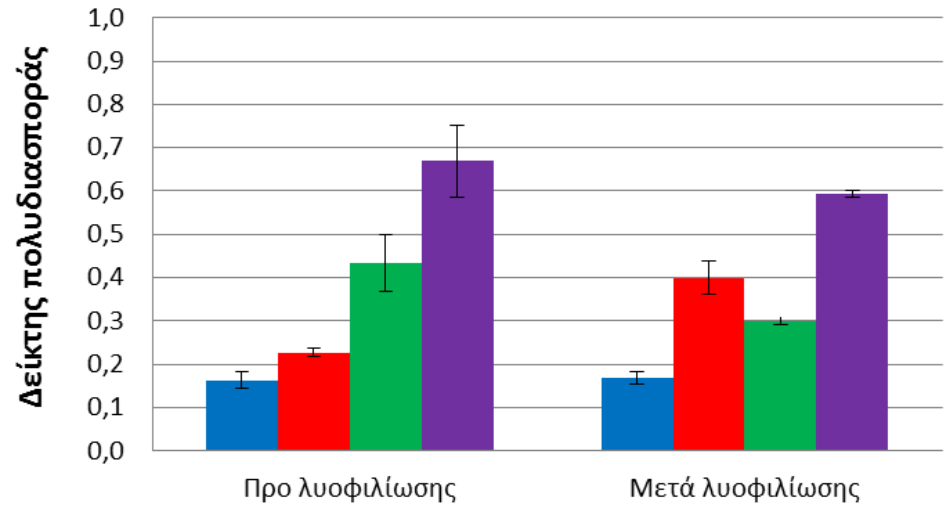
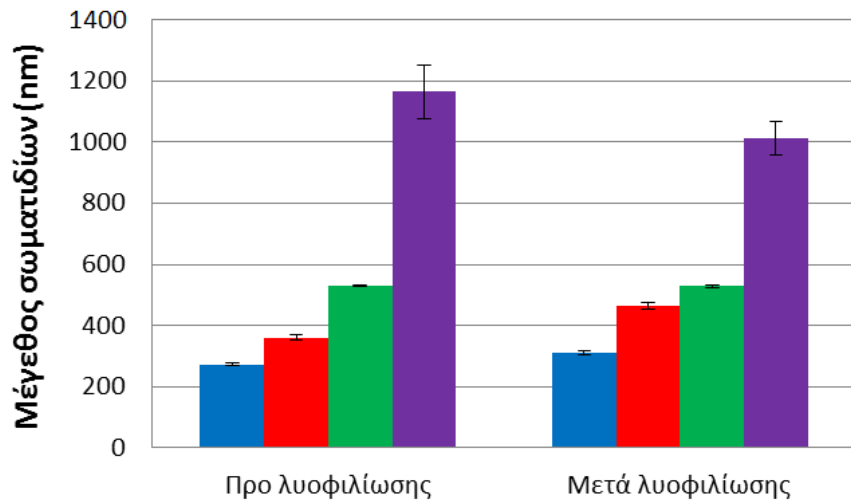
Απόδοση Διεργασίας (YD)

$$YD = \frac{[\text{τελική μάζα νανοσωματιδίων}]}{[\text{αρχική μάζα ένωσης + πολυμερικού φορέα}]}$$

Σύνοψη Παραμέτρων Ολοκληρωμένων Εγκλεισμών

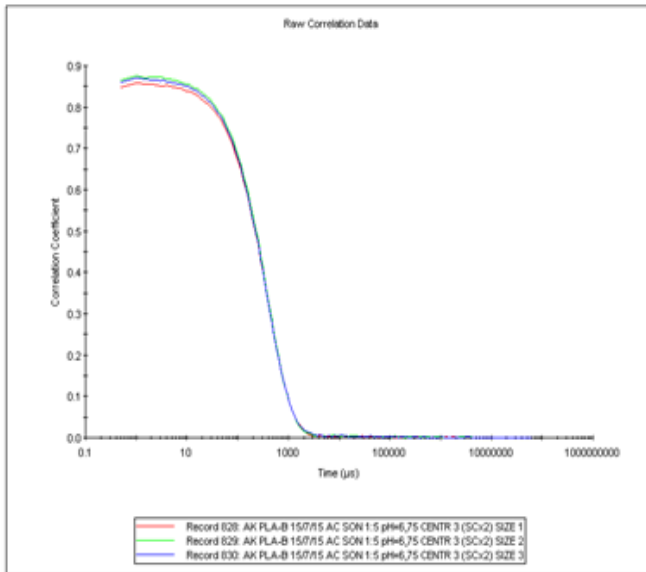
Παράμετρος	Κενά σωματίδια	Σωματίδια με Irgarol	Σωματίδια με Econea	Σωματίδια με ZPT
Μάζα PLA PLI005 (mg)	52,6	51,9	50,0	48,3
Όγκος οργανικού διαλύτη (ml)	ΑΚΕΤΟΝΗ 5	ΑΚΕΤΟΝΗ 5	ΑΚΕΤΟΝΗ 5	Διχλωρομεθάνιο 5
Συγκέντρωση PLA στην οργανική φάση (mg ml ⁻¹)	10,5	10,4	10,0	9,7
Όγκος υδατικής φάσης (ml)	25	25	25	25
Συγκέντρωση PVA (%)	1	1	1	1
Λόγος οργανικής προς υδατική φάση	1:5	1:5	1:5	1:5
Μάζα ένωσης προς εγκλεισμό (mg)	-	21,6	21,9	19,0
Λόγος μάζας ένωσης προς μάζα πολυμερούς (%)	-	41,6 %	43,8 %	39,3%
Συνολική θεωρητική μάζα σωματιδίων (mg)	52,6	73,5	71,9	67,3

Αποτελέσματα DLS και ELS

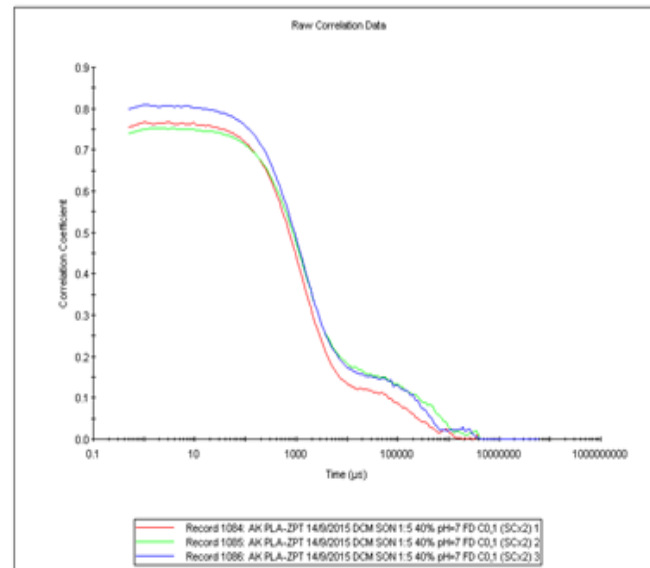
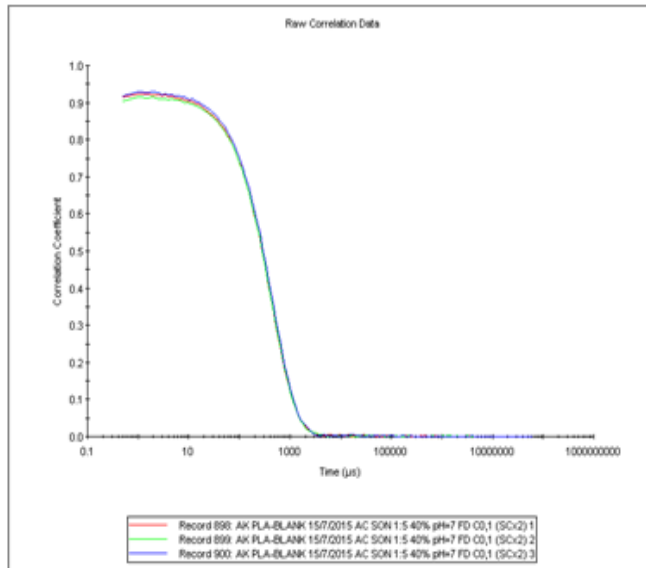
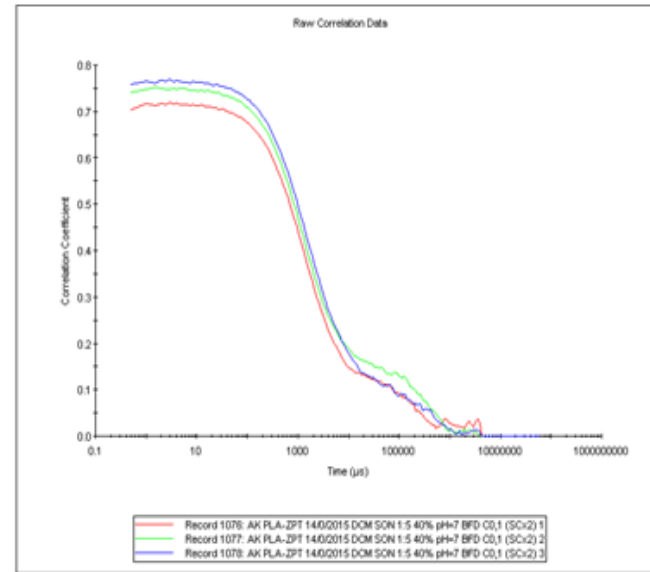


Γραφήματα συντελεστή συσχέτισης - χρόνου

Κενά NPs



ZPT NPs



Αποτελέσματα Αποδόσεων Διεργασίας και Εγκλεισμού

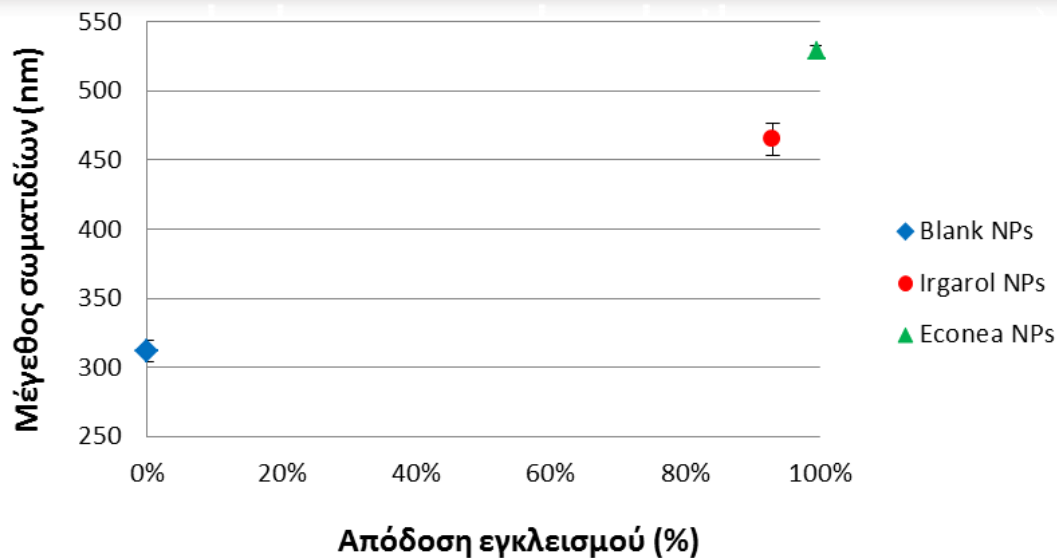
Μέγεθος	Κενά σωματίδια	Σωματίδια με Irgarol	Σωματίδια με Econea	Σωματίδια με ZPT
Μάζα PLA PLI005 (mg)	52,6	51,9	50,0	48,3
Μάζα ένωσης προς εγκλεισμό (mg)	-	21,6	21,9	19,0
Συνολική θεωρητική μάζα σωματιδίων (mg)	52,6	73,5	71,9	67,3
Συνολική μάζα σωματιδίων μετά τη λυοφιλοποίηση (mg)	15,6	41,0	59,6	48,3
Απόδοση διεργασίας [Yield] (%)	29,7%	55,8%	82,9%	71,8%
Μάζα μη εγκλεισμένης ένωσης (mg)	-	2,9	1,4	1,6
Απόδοση εγκλεισμού [E.E] (%) (έμμεση)	-	86,6%	93,5%	91,8%
Μάζα εγκλεισμένης ένωσης (mg)	-	20,1	21,8	17,6
Απόδοση εγκλεισμού [E.E] (%) (άμεση)	-	93,0%	99,7%	92,5%

Yield

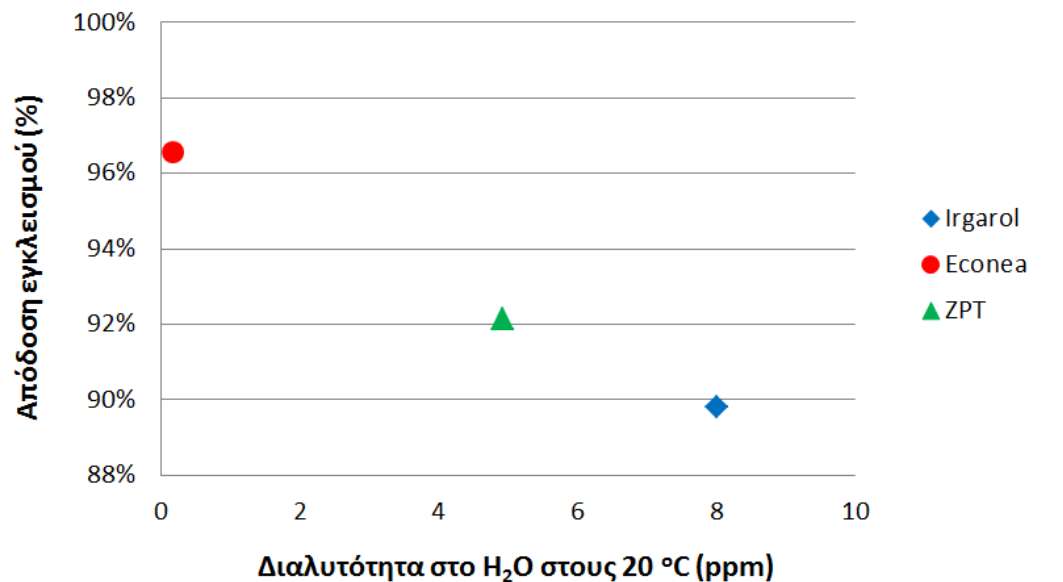
Indirect E.E

Direct E.E

Συγκριτικά Γραφήματα Size, Ε.Ε, Διαλυτότητας



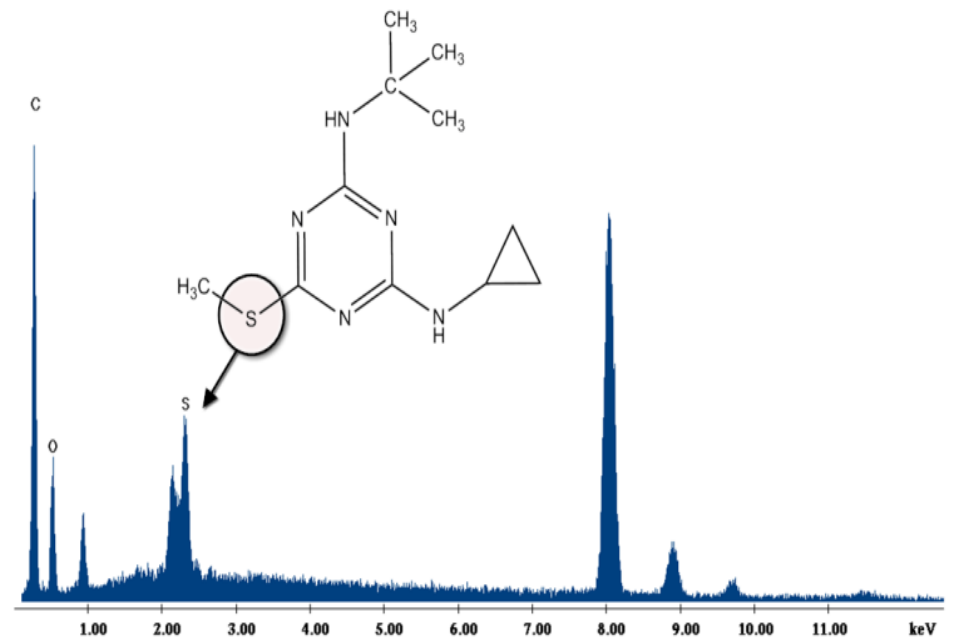
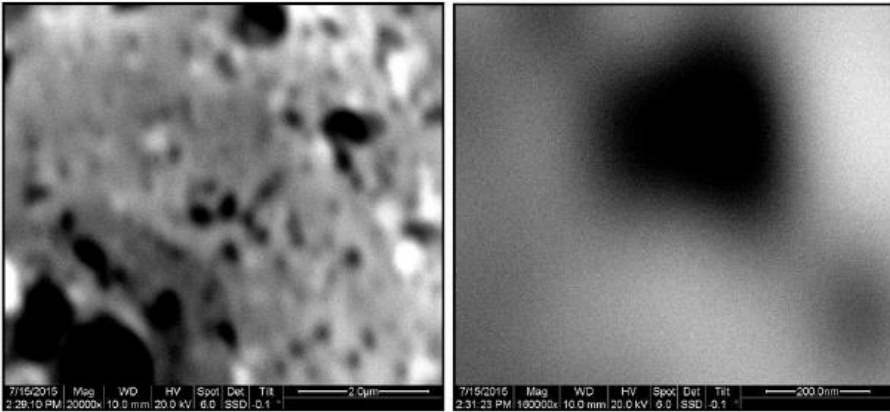
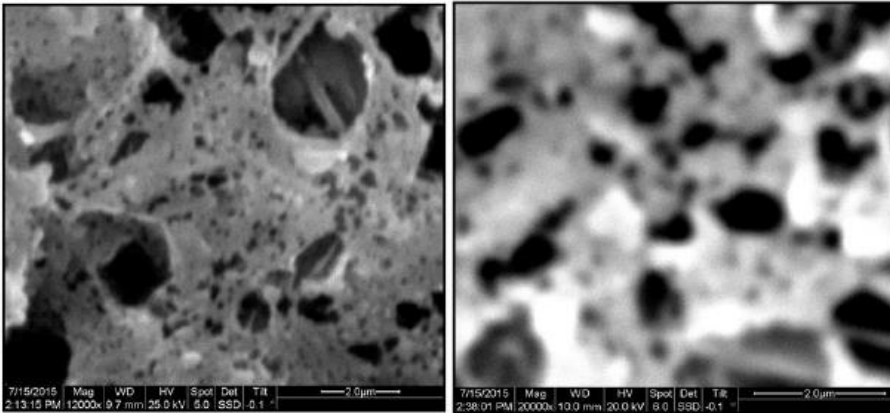
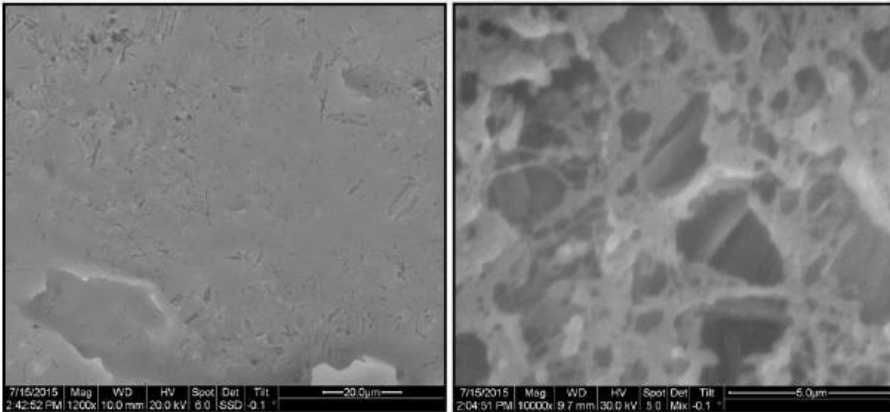
Μέγεθος Σωματιδίων
VS
Απόδοση Εγκλεισμού



Απόδοση Εγκλεισμού
VS
Διαλυτότητα ενώσεων στο H₂O

SEM σε Σωματίδια με Εγκλεισμένο Irgarol

Χαρακτηρισμός σωματιδίων πριν τη λυοφιλίωση με εξάτμιση του νερού της διασποράς

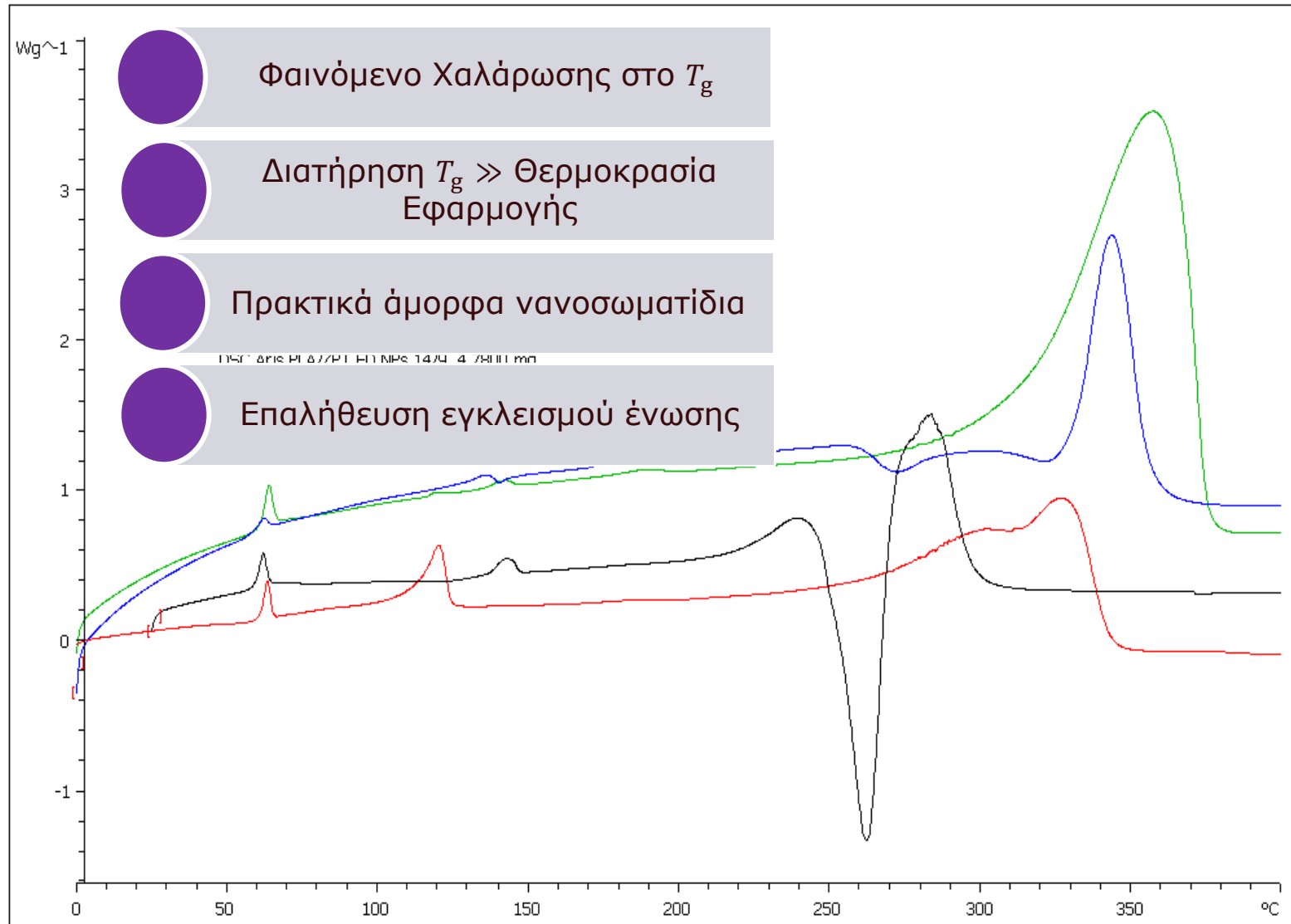


Αποτελέσματα DSC - Ecomea vs Irgarol vs ZPT vs Blank NPs

Λendo

DSC Aris Blank vs Eco vs Irg vs ZPT NPs

18.09.2015 13:12:45



Lab: METTLER

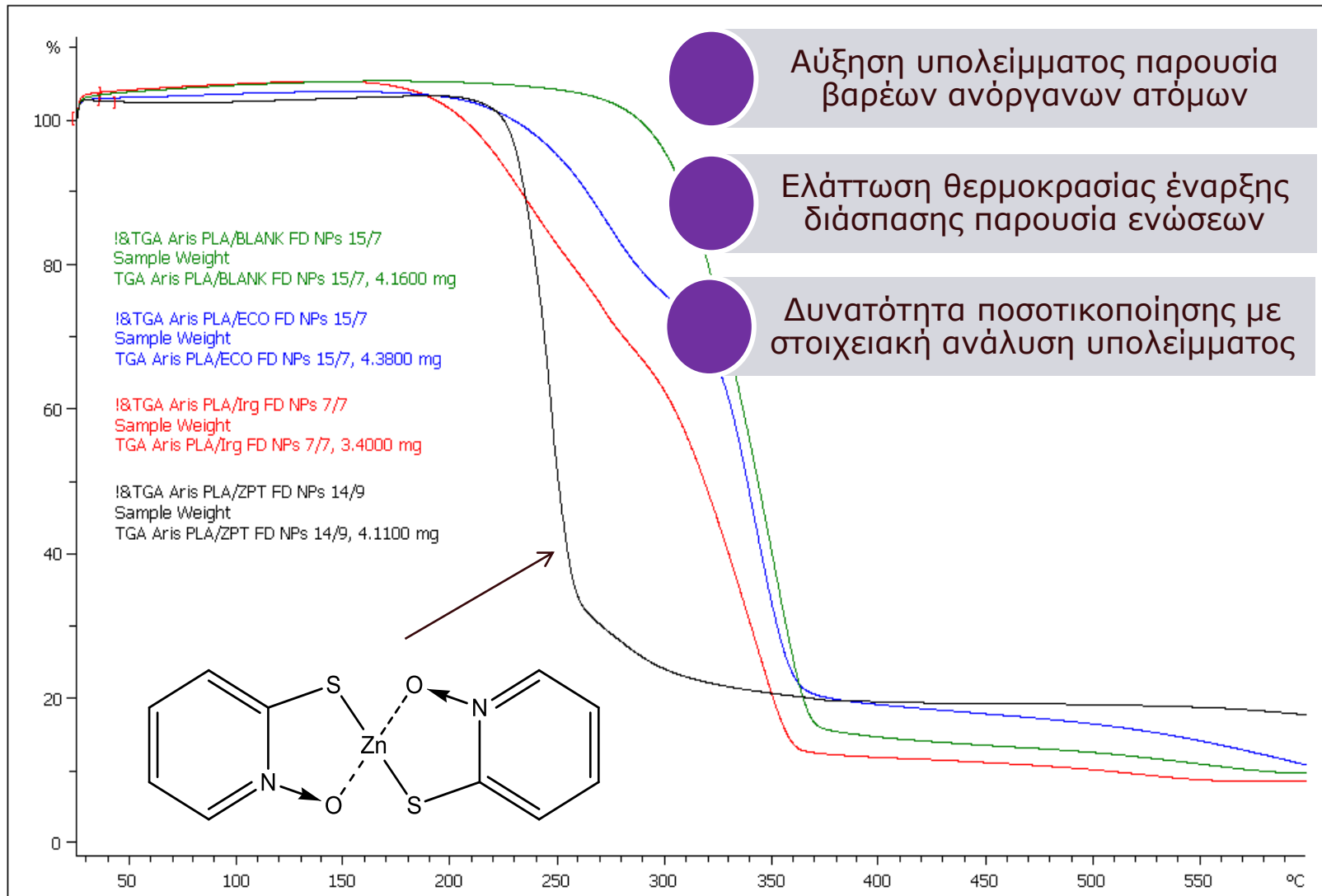
STAR^e SW 9.20

Αποτελέσματα TGA - Econea vs Irgarol vs ZPT vs Blank NPs

Λendo

TGA Aris Blank vs Eco vs Irg vs ZPT NPs

18.09.2015 13:18:25



Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

Συμπεράσματα επί της Διπλωματικής

Επιτυχής εγκλεισμός στον πολυμερικό φορέα PLI005 με MB 135.000 και αποδόσεις εγκλεισμού > 86 %

Αποδόσεις Διεργασιών (Yield) > 55 % για όλα τα σωματίδια με εγκλεισμένες ενώσεις

Παραγόμενα σωματίδια με μέγεθος στην νανοκλίμακα 1 – 1000 nm και διατήρηση μεγέθους στην ίδια κλίμακα μετά τη λυοφιλίωση

Το διχλωρομεθάνιο δημιούργησε σωματίδια με ZPT στα όρια μικρο- και νανο- κλίμακας → προτιμότερη η χρήση της λιγότερο τοξικής ακετόνης

Παραγόμενες διασπορές με ζ-δυναμικό από –2 mV έως – 14 mV \ll |30| mV σε ουδέτερο pH

Αδυναμία εξακρίβωσης μορφολογίας σωματιδίων με τη διάταξη SEM που χρησιμοποιήθηκε

Διατήρηση T_g σε θερμοκρασίες > από τη θερμοκρασία εφαρμογής, ωστόσο χαμηλή κρυσταλλικότητα σωματιδίων

Ο πολυπαραμετρικός χαρακτήρας του πειράματος δυσχεραίνει την ανακλιμάκωση

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Μελέτη συμπεριφοράς υφαλοχρώματος μετά την προσθήκη των σωματιδίων εντός αυτού

Μελέτη ρυθμού αποδέσμευσης ένωσης από τα σωματίδια και το υφαλόχρωμα σε διάφορα pH

Εξέταση μεγέθους σωματιδίων με άλλες τεχνικές (π.χ TEM, FE-SEM)

Μελέτη ζ-δυναμικού σωματιδίων ως συνάρτηση του pH και εξακρίβωση αν επηρεάζονται εντός του υφαλοχρώματος

Μεταφορά από την εργαστηριακή κλίμακα σε πιλοτική κλίμακα με ίδια ή παρόμοια τεχνική εγκλεισμού

Χρήση του Πολυμερισμού Στερεάς Κατάστασης (SSP) για αύξηση του MB των πολυμερικών σωματιδίων

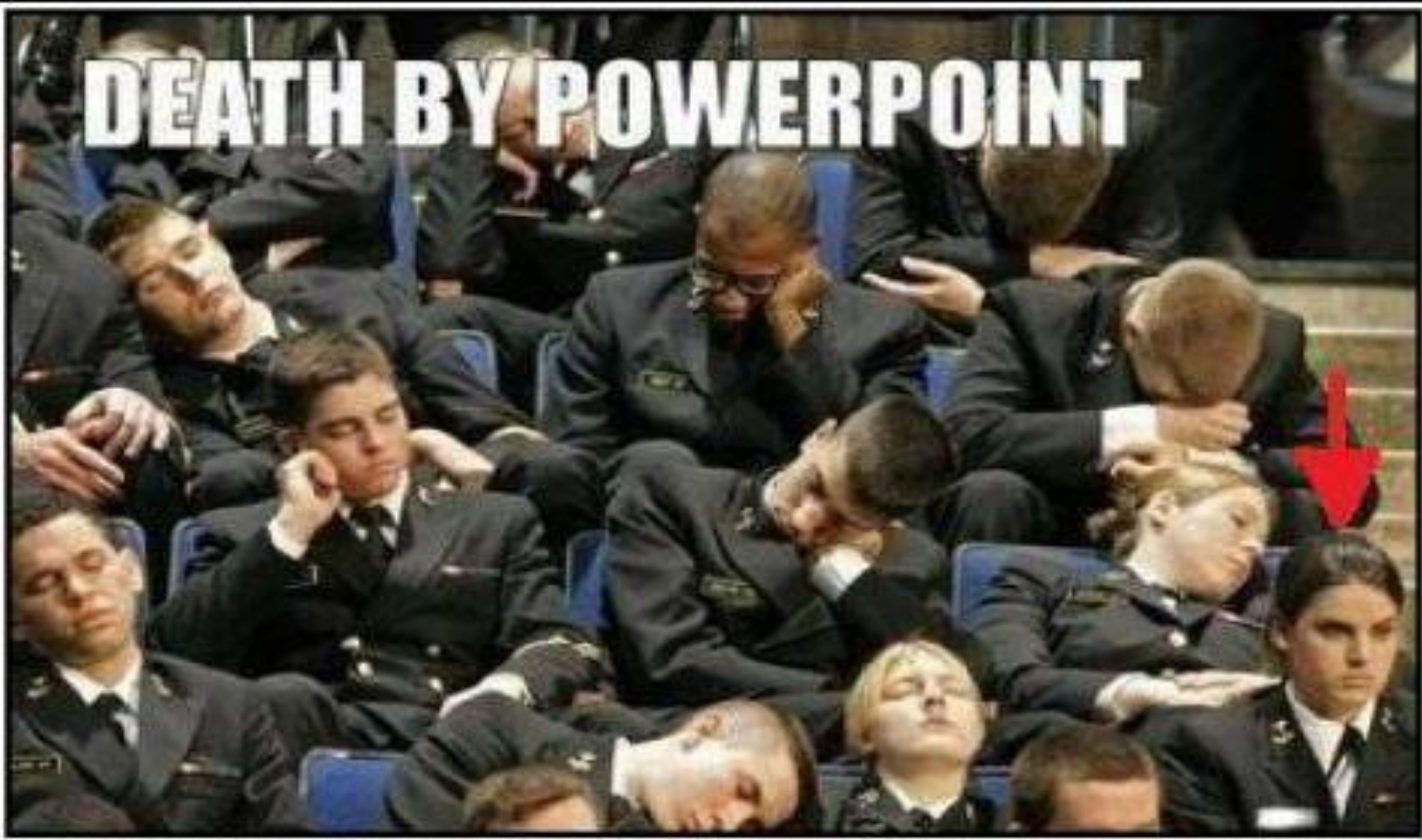
Εγκλεισμός ενζύμων ή φυσικών προϊόντων με antifouling δράση σε πολυμερικούς φορείς

Έρευνα και ανάπτυξη μη τοξικών επικαλύψεων με αντιβιοεπιστρωτικές ιδιότητες

Χρήσιμη Βιβλιογραφία

1. Yebra et al., *Progress in Organic Coatings*, vol. 50, pp. 75-104, 2004.
2. Almeida et al., *Progress in Organic Coatings*, vol. 59, pp. 2-20, 2007.
3. Lejars et al., *Chemical Reviews*, vol. 112, no. 8, pp. 4347-4390, 2012.
4. Konstantinou et al., *Environment International*, vol. 30, no. 2, pp. 235– 248, 2004.
5. Voulvoulis et al., *Applied Organometallic Chemistry*, vol. 13, no. 3, pp. 135-143, 1999.
6. Omae et al., *Chemical Reviews*, vol. 103, no. 9, pp. 3431–3448, 2003.
7. Rao et al., *Progress in Polymer Science*, vol. 36, no. 7, pp. 887–913, 2011.
8. Vauthier et al., *Pharmaceutical Research*, vol. 26, no. 5, pp. 1025-1058, 2009.
9. Li et al., *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 363, no. 1-2, pp. 26–39, 2008.
10. Freitas et al., *Journal of Controlled Release*, vol. 102, no. 2, pp. 313–332, 2005.

DEATH BY POWERPOINT



99%
COMPLETE

Εισαγωγικές έννοιες

- Τι είναι η βιοεπίστρωση;
- Τι συνέπειες έχει;
- Πώς αντιμετωπίζεται;
- Τι είναι τα ενισχυτικά βιοκτόνα;
- Γιατί να εγκλειστούν;
- Τι είναι «βιοδιασπώμενο πολυμερές»;
- Γιατί το PLA ως πολυμερικός φορέας;

Οριοθέτηση θέματος & Πειραματική διαδικασία

- Έχουν πραγματοποιηθεί άλλες συγγενείς εργασίες;
- Τι καινοτόμο παρουσιάζει η παρούσα διπλωματική;
- Πώς επιτυγχάνει τον εγκλεισμό των ενώσεων;
- Ποια χαρακτηριστικά των σωματιδίων εξετάζονται;

Αποτελέσματα & Συζήτηση αποτελεσμάτων

- Τι μεγέθη σωματιδίων παρήχθησαν;
- Ήταν σταθερές οι διασπορές τους;
- Επηρέασε η διαδικασία της λυοφιλοποίησης τα σωματίδια;
- Εγκλείστηκε ένωση; Αν ναι, πόση;
- Πώς ήταν τα σωματίδια οπτικά;
- Ποια ήταν η θερμική τους συμπεριφορά;

Συμπεράσματα & Προτάσεις



"Sorry, it's curiosity"

Curiosity

KILLED

the cat

