

# Eksperimentalno određivanje odnosa naboja i veličine agregata samonakupljenih amfifilnih boja

---

**Matulja, Dario**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:203803>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-03**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Medicinska kemija

Dario Matulja

**Eksperimentalno određivanje odnosa naboja i  
veličine agregata samonakupljenih amfifilnih boja**

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Medicinska kemija

Dario Matulja

**Eksperimentalno određivanje odnosa naboja i  
veličine agregata samonakupljenih amfifilnih boja**

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Duško Čakara  
Komentor rada: doc. dr. sc. Nela Malatesti

Diplomski rad je obranjen dana 21. rujna 2018. pred povjerenstvom:

1. Prof. dr. sc. Jasminka Giacometti
2. doc. dr. sc. Damir Klepac
3. doc. dr. sc. Duško Čakara
4. doc. dr. sc. Nela Malatesti

Rad ima 72 stranice, 30 slika, 2 tablice i 73 literaturnih navoda.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za fizikalnu kemiju i Laboratoriju za organsku kemiju i kemiju čvrstog stanja Odjela za biotehnologiju (Sveučilište u Rijeci), te u laboratoriju za koloide, polielektrolite i međupovršine Centra za mikro i nano znanosti i tehnologije Sveučilišta u Rijeci.

U izradi rada korištena je oprema projekta Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci“ uz potporu Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) i Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske (RC.2.2.06-0001).

## **ZAHVALA**

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, doc. dr. sc. Dušku Čakari na vremenu, strpljenju, mnogobrojnim savjetima i odgovorima tijekom eksperimentalnog rada i znanstvenog pisanja.*

*Također bih se zahvalio svojoj komentorici doc. dr. sc. Neli Malatesti kao i njenoj doktorandici Martini Mušković na svoj pruženoj pomoći i savjetima za vrijeme sintetskog dijela eksperimentalnog rada. Zahvaljujem se i kolegi Nini Požaru na ustupljenoj pomoći oko kemometrijskih analizi apsorpcijskih spektara.*

*Veliko hvala i mojim roditeljima, braći i prijateljima na svom razumijevanju i pruženoj podršci tijekom svih godina studija i izrade diplomskog rada.*

## SAŽETAK

Samonakupljanje (asocijacija) individualnih molekula u supramolekularne strukture spontan je proces koji se odvija kao posljedica slabih, nekovalentnih međumolekulskih interakcija. Udruživanje amfifilnih organskih boja u posljednje je vrijeme privuklo značajnu pažnju kako u biološkim tako i u znanostima o funkcionalnim materijalima zahvaljujući njihovim jedinstvenim fotofizikalnim svojstvima. Takvi spojevi najviše se koriste u industrijskim procesima (proizvodnja solarnih ćelija, pročišćavanje otpadnih voda), farmaceutici (razvoj formulacije) te biomedicinskim istraživanjima (prijenos lijekova, oslikavanje). Stjecanje informacija i znanja o procesu samonakupljanja molekula pruža jedinstvene mogućnosti u dizajnu novih materijala za naprednu primjenu u nanotehnologiji.

U ovome radu sintetizirani su jednostavnim supstitucijskim reakcijama amfifilni derivati dviju organskih boja, rodamina B i orange-II. Sintetiziranim spojevima po prvi put je ispitano koloidno ponašanje u vodenom mediju u strogo definiranom koncentracijskom rasponu pri variranim vrijednostima pH i ionske jakosti disperzija. Promjena fotofizikalnih svojstava istražena je spektrofotometrijskim eksperimentom, a karakteristika asocijacije ispitivanih spojeva tehnikama raspršenja svjetla i analizom viseće kapi.

Promjena apsorpcijskih spektara ukazala je na gubitak protonirajućih skupina kod derivata boja te neovisnost veličine samonakupina o pH u blago kiselim ili baznim uvjetima. Mjerenjem hidrodinamičkog promjera i elektroforetske pokretljivosti utvrđeno je da amfifilni derivati boja formiraju vezikule čija veličina varira s koncentracijom i ionskom jakosti. Rezultati mjerenja površinske napetosti na granici faza voda/zrak ukazuju na izrazitu površinsku aktivnost boja uz jasno definiranu vrijednost kritične koncentracije samonakupljanja. Ponavljanjem eksperimenta nakon određenog vremenskog razdoblja ustanovljeno je da se vezikule sačinjene

od sintetiziranih spojeva razlikuju u stabilnosti, odnosno da rodaminskom derivatu treba duže vrijeme da se prilagodi veličinom i oblikom u stabilne strukture.

Ključne riječi: samonakupljanje (asocijacija), amfifilne organske boje, dinamičko raspršenje svjetla, elektroforetska mobilnost, vezikule, stabilnost

## SUMMARY

Self-assembly (association) of individual molecules into supramolecular structures is a spontaneous process that takes place as a result of weak, non-covalent intermolecular interactions. The association of amphiphilic organic dyes has attracted considerable attention both in biological and functional materials sciences thanks to their unique photophysical properties. Such compounds are widely used in industrial processes (solar cell production, waste water purification), pharmaceuticals (development of formulations) and biomedical research (drug delivery, imaging). Acquiring information and knowledge about the self-assembly process provides unique opportunities in designing new materials for advanced application in nanotechnology.

In this work, amphiphilic derivatives of two organic dyes, rhodamine B and orange-II are synthesized by simple substitution reactions. For the first time colloid behaviour of synthesized compounds in aqueous media was examined in a strictly defined concentration range at varied pH and ionic strength values of dispersion. The change of photophysical properties was investigated in a spectrophotometric experiment, while the association of the tested compounds by means of light scattering techniques and pendant drop analysis.

The change of the absorption spectra indicated loss of free ionizable groups for the amphiphilic dye derivatives and independence of their self-assembly on pH in mildly acidic and basic conditions. By measuring the hydrodynamic diameter and the electrophoretic mobility, the derivatives were found to form vesicles whose size varies with concentration and ionic strength. The results of the surface tension measurement indicate a pronounced surface activity as well as clearly defined critical concentration of self-assembly. By repeating the experiment over a time period, it was shown that the studied compounds differ in stability, in particular the rhodamine derivative takes longer to adapt a stable structure with a well defined size and shape.



Keywords: self-assembly (association), amphiphilic organic dyes, dynamic light scattering, electrophoretic mobility, vesicles, stability

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. AMFIFILNE MOLEKULE I PROCES SAMONAKUPLJANJA .....	1
1.2. PAKIRANJE AMFIFILA I STRUKTURE AGREGATA.....	4
1.2.1. MICELE I KRITIČNA KONCENTRACIJA MICELIZACIJE.....	5
1.2.2. DVOSLOJI.....	7
1.3. INTERAKCIJE U SAMONAKUPINAMA AMFIFILA .....	9
1.4. DLVO TEORIJA STABILNOSTI KOLOIDA.....	11
1.5. ELEKTRIČKA SVOJSTVA SAMONAKUPINA .....	14
1.5.1. ZETA POTENCIJAL .....	14
1.5.2. NABOJ POVRŠINA KOLOIDA I ELEKTROFOREZA.....	15
1.6. EKSPERIMENTALNE TEHNIKE KARAKTERIZACIJE KOLOIDNIH SUSTAVA .....	17
1.6.1. DLS.....	17
1.6.2. PALS .....	20
1.6.3. VISEĆA KAPLJICA.....	21
1.7. ORGANSKE BOJE I NJIHOVA TEHNOLOŠKA PRIMJENA .....	22
1.7.1. RODAMIN B.....	23
1.7.2. ORANGE II.....	24
<b>2. TEMA, CILJ TE ZADACI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>27</b>
3.1. KEMIKALIJE I REAGENSI .....	27
3.2. SINTEZA SPOJEVA .....	28
3.2.1. Dodecil-2-[(3E)-(6-dietilamino)-3-(dietilimino)-3H-ksanten-9- il]benzoat (boja 1).....	28
3.2.2. Natrijev 4-(E)-2-[2-(dodekanoiloksi)naftalen-1-il]diazon-1- il]benzen-1-sulfonat (boja 2) .....	29
3.3. METODE .....	30
3.3.1. Kromatografske metode .....	30

3.3.2. Spektroskopske metode.....	31
3.3.3. Određivanje veličine, elektroforetske pokretljivosti i površinske aktivnosti ispitivanih uzoraka.....	31
3.3.4. Priprema uzoraka.....	32
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>50</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>59</b>
<b>7. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>61</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>69</b>

# 1. UVOD

**Samonakupljanje** (asocijacija) je fizikalno-kemijski proces karakterističan za amfifilne molekule koje se u otapalu spontano nakupljaju i organiziraju u strukture različitih oblika i veličina [1–3]. Pojam amfifilan izveden je iz grčkih riječi *amphis* (oboje) i *philia* (ljubav, prijateljstvo) sugerirajući da se takve molekule sastoje od dva dijela, kovalentno vezanih liofobnih (netopljivi u otapalu) i liofilnih (topljivi u otapalu) kemijskih skupina. Najčešće se sastoje od polarne glave i nepolarnog repa [4].

## 1.1. AMFIFILNE MOLEKULE I PROCES SAMONAKUPLJANJA

Amfifilna je svaka ona molekula koja se sastoji od kovalentno vezanih hidrofilnih i hidrofobnih dijelova. Primjeri amfifilnih molekula su surfaktanti, blok-kopolimeri, lipidi, kolesterol i mnogi drugi. Surfaktante općenito dijelimo na ionske, kod kojih je hidrofilna glava molekule neka ionska skupina te neionske, kod kojih je glavna neutralna, ali polarna skupina. U vodi kao izuzetno polarnom mediju, amfifili formiraju različite strukture (nakupine). Pri tome se minimizira kontakt između nepolarnih dijelova (repa) i molekula vode što se može opisati kao privlačna „hidrofobna“ pseudo-sila. U slučaju ionskih surfaktanata se istovremeno minimizira i elektrostatsko odbijanje ionskih skupina glave. Na međupovršini voda-zrak se surfaktanti nakupljaju tako da se nepolarni (hidrofobni) lanac orijentira prema zraku, pri čemu se smanjuje energija površine na granici faza. S druge strane, u unutrašnjosti otopine (*bulk-u*), surfaktanti se spontano nakupljaju (samoankupljaju) tako da se hidrofobni lanci izoliraju od molekula vode u unutrašnjost samonakupina. Ova pojava se prema Tanfordu naziva hidrofobnim efektom [3,5], te je glavna pokretačka sila samonakupljanja amfifilnih molekula. Od velike je važnosti u prirodi, posebice u formiranju lipidnih dvosloja (membrana), biološkim procesima

poput smatanja proteina (eng. *protein folding*) te ciljane isporuke lijekova u biomembrane [2,6].

Potpuno fizikalno razumijevanje procesa samonakupljanja te hidrofobnog efekta još uvijek je nedostatno zbog kompleksnosti međumolekulskih interakcija kojima je taj proces vođen. Većina teoretskih modela razmatraju ravnotežu samonakupljanja kao posljedicu djelovanja dviju suprotstavljenih sila: privlačnih pseudo-interakcija između liofobnih dijelova koje dovode do asocijacije molekula te odbojnih elektrostatskih ili steričkih interakcija između liofilnih dijelova. Svakako, glavne značajke procesa samonakupljanja su njegova termodinamička spontanost, dobro definirana ravnotežna svojstva agregata te činjenica da se radi o *start-stop* procesu [3]. Za ionske surfaktante u vodenom mediju, potonje znači da je u početku proces potaknut hidrofobnim efektom, a u kasnijoj fazi elektrostatskim odbijanjem nabijenih glava amfifila [7].

Termodinamika procesa samonakupljanja se može proučavati na razini formiranja micela uz određenu kritičnu koncentraciju micelizacije (eng. *critical micellar concentration*, CMC). Iznad te koncentracije sav dodani surfaktant prelazi u agregate zbog zasićenja adsorpcijom na međupovršinu voda-zrak. Jačina istovremenog privlačenja liofobnih te odbijanja liofilnih dijelova molekula, određuju CMC [3,6]. Iz termodinamičkog modela micelizacije u vidu odvajanja faza proizlazi da je CMC povezan sa slobodnom Gibbsovom energijom preko jednadžbe (1):

$$\Delta G^{\circ}_{mic} = RT \ln (CMC) \quad (1)$$

Gdje je:

$\Delta G^{\circ}_{mic}$  = standardna slobodna energija micelizacije, [J],  $R$  = molarna plinska konstanta,  $8,314 \cdot 10^3$  [Jmol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>],  $T$  = temperatura, [K],  $CMC$  = kritična koncentracija micelizacije, [mol dm<sup>-3</sup>]<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> U ovom radu biti će korišten skraćeni simbol [M] za jedinicu [mol dm<sup>-3</sup>]

Standardnoj slobodnoj energiji micelizacije ( $\Delta G^{\circ}_{mic}$ ) doprinose hidrofobna energija zbog prijenosa alkilnih lanaca iz medija u unutrašnjost micela, kontakt otapala koji se smanjuje kako se povećava veličina micela što je izvor kooperativnosti u procesu micelizacije, pakiranje koje dovodi do fiksacije glave na površini te interakcija grupa glave. Posljednje dvije komponente predstavljaju najznačajniji pozitivan doprinos energiji micelizacije [3]. Također, uzimajući u obzir izraz za slobodnu Gibbsovu energiju,  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ , vrlo važan doprinos micelizaciji čini promjena entropije. Naime, prilikom otapanja molekule amfifila, molekule vode koje ju okružuju moraju stvoriti šupljinu u kojoj će se smjestiti nepolarni dio (rep). Međutim, u tom slučaju, molekule vode postaju uređenije u sustavu što uzrokuje smanjenje entropije, a posljedično tome povećanje Gibbsove energije i CMC čime se dodatno smanjuje topljivost amfifila [3,5]. Stoga, taj proces se može spontano odvijati samo ukoliko istovremeno, negdje drugdje u sustavu, entropija raste da nadoknadi taj gubitak [2,3,8,9]. U konačnici, dolazi do stvaranja agregiranih struktura koje predstavljaju zasebnu fazu, što je za molekule vode entropijski povoljnije [6].

Jedna od karakteristika ponašanja amfifilnih molekula u mediju je njihova temperaturna ovisnost. Točka pri kojoj je topljivost jednaka CMC-u naziva se Krafft-ova temperatura ( $T_K$ ). Iznad te temperature, topljivost se naglo povećava te otopina postaje jedna homogena faza dok pri nižoj temperaturi dolazi do precipitacije.  $T_K$  i topljivost lanca ovise o njegovoj strukturi budući da nezasićenost lanca uzrokuje poremećaj pakiranja monomera u samonakupine i time snižavanje  $T_K$  i topljivosti lanca. S druge strane, jake interakcije među grupama polarne glave stabiliziraju precipitat povećavajući  $T_K$ . Također, otapanjem, ugljikovodični lanci mogu zauzeti različite konformacije (biti ravni ili savinuti) što ovisi o ravnoteži entropijskih i energetske faktora dodatno utječući na kinetiku micelizacije [3].

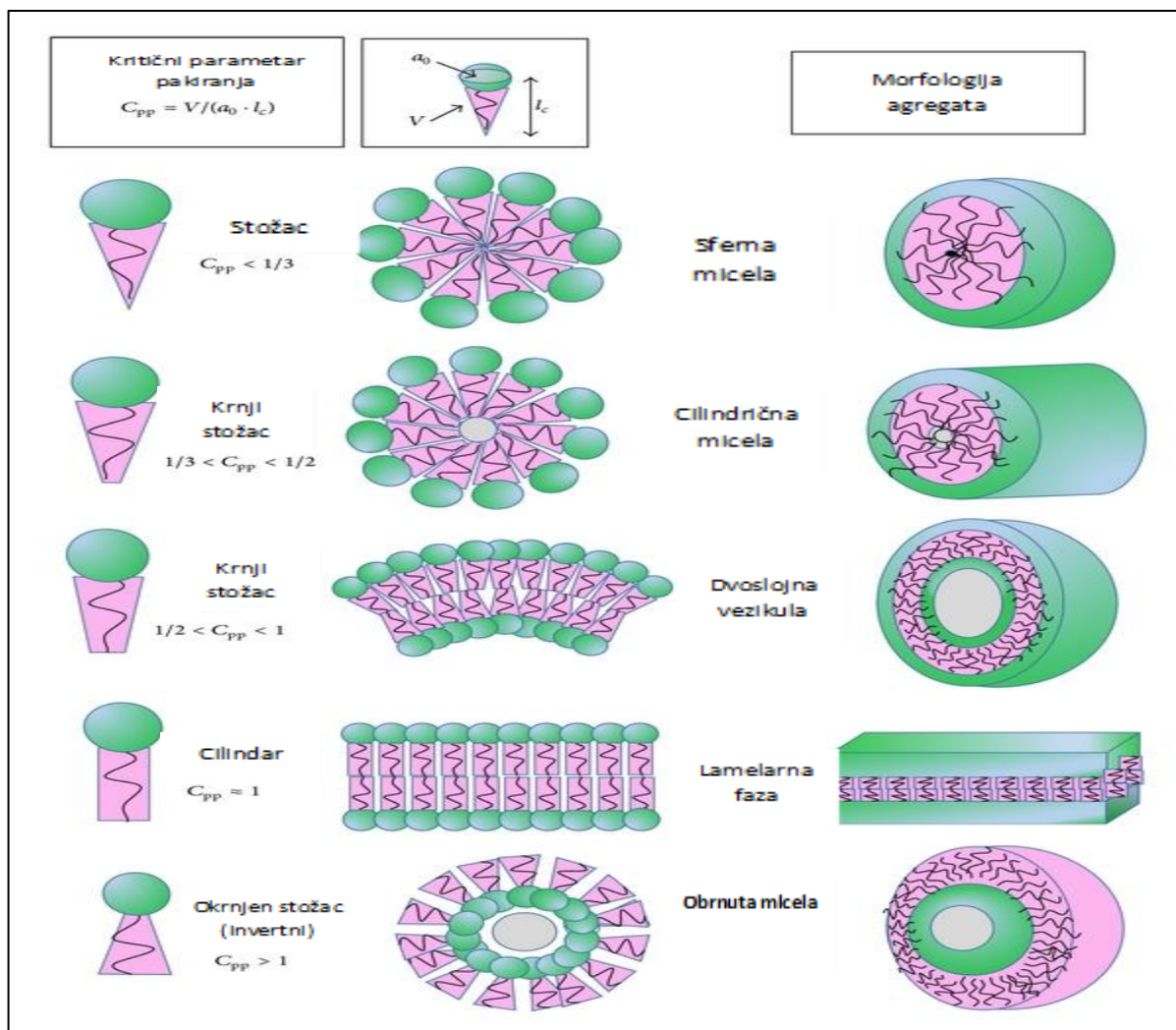
## 1.2. PAKIRANJE AMFIFILA I STRUKTURE AGREGATA

Nastanak mogućih struktura ograničen je potrebom da amfifilna molekula zadrži svoje nepolarne i polarne dijelove okružene na povoljan način. Vrsta samonakupina ovisi o kemijskoj strukturi amfifilne molekule, njenoj koncentraciji, temperaturi i tlaku. *A priori*, veličina i oblik samonakupina može se predvidjeti koristeći konceptualni okvir koji uzima u obzir molekularne parametre (volumen, duljinu lanca i površinu glave) te varijable poput temperature i ionske jakosti. Forma (oblik) koji daje minimalnu slobodnu energiju asocijacije definira optimalni oblik/veličinu samonakupine [3,6,10].

Preliminarne procjene veličine i oblika mogu se izvršiti analizom kritičnog parametra pakiranja (eng. *critical packing factor*,  $C_{pp}$ ). U slici 1, prikazan je sažetak struktura agregata (samonakupina) koje se mogu predvidjeti iz jednadžbe (2) za izračun  $C_{pp}$ , gdje je  $V$  volumen kojeg zauzima cijela molekula,  $l_c$  je duljina lanca te  $a_0$  površina polarne glave.

$$C_{pp} = \frac{V}{a_0 \cdot l_c} \quad (2)$$

U većini slučajeva, amfifili s jednim hidrofobnim lancem imaju parametar pakiranja manji od 0,5 formirajući sferne micelle. Dodavanje lanaca povećava volumen pa surfaktanti s dvostrukim lancem imaju tendenciju formiranja dvoslojnih struktura poput vezikula (liposoma) i membrana [3]. Iako se strukture prikazuju grafički, važno je napomenuti da su u stvarnosti one puno manje uređene, to jest fluidnije uz brzu izmjenu unimera [2,6].



**Slika 1.** Prikaz oblika monomera amfifilne molekule i struktura agregata (samonakupina) predviđenih iz kritičnog parametra pakiranja ( $C_{pp}$ ). Slika preuzeta i modificirana iz literature [6].

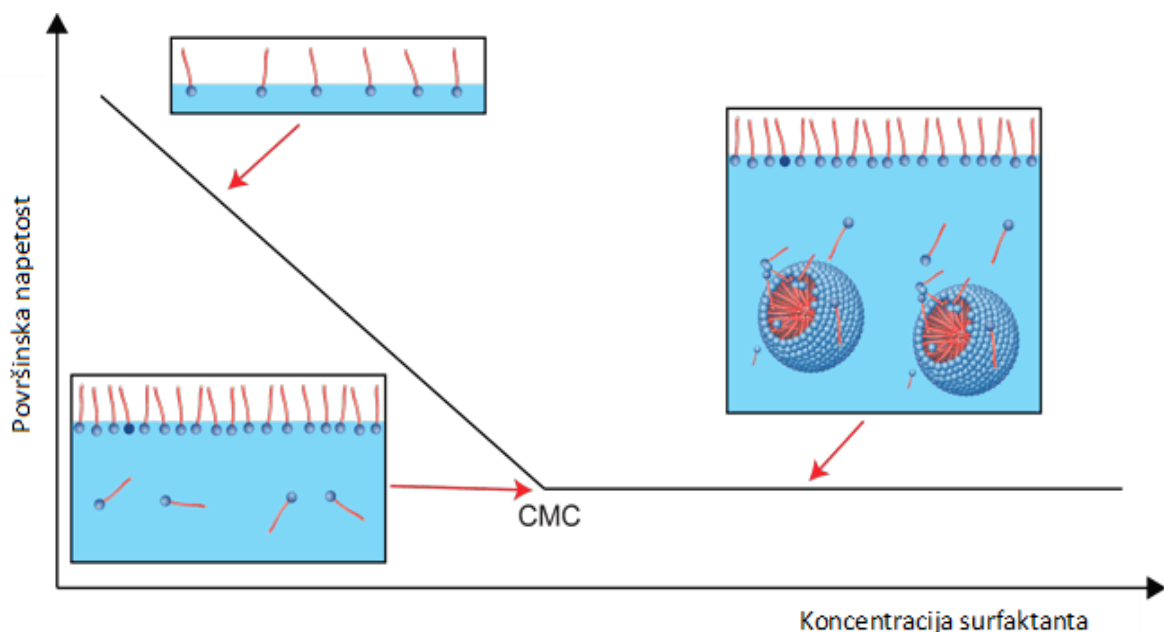
### 1.2.1. MICELE I KRITIČNA KONCENTRACIJA MICELIZACIJE

Micelle se smatraju najjednostavnijim asociiranim strukturama koje pokazuju usku raspodjelu veličina. Zbog toga se koriste kao model proučavanja, za dobivanje informacija koje pružaju temelj općenitom razumijevanju samonakupina [2,3]. Veličina micela je određena radijusom micelle i brojem unimera u miceli (micelarni agregacijski broj). Uobičajena vrijednost tog broja iznosi 10 do 100 pri čemu amfifili s dugim ugljikovodičnim lancem formiraju veće micelle. Kemijska struktura surfaktanta i vanjski faktor (pH, temperatura, tlak) utječu na CMC i na



veličinu micela. Primjerice, dodatak elektrolita u vodu dovodi do formiranja većih micela ionskih surfaktanata [2,3,11]. Povećanje duljine lanca dovodi do smanjenja CMC jer smanjuje topljivost surfaktanta, a hidrofobni efekt postaje izraženiji dodatkom metilnih ( $-CH_2$ ) grupa. U slučaju razgranatosti alkilnog lanca, monomeri se pakiraju (smještaju) u unutrašnjost micela smanjenom učinkovitošću čime se povećava CMC. Kod micela ionskih surfaktanta, zbog elektrostatskog odbijanja nabijenih skupina glave, nepolarni dijelovi su u nepovoljnom kontaktu s molekulama vode. Stoga su topljivost i CMC za ionske amfifile u vodenom mediju uvjetovani ionskom jakošću i pH vrijednošću otopine te su viši u odnosu na neionske. Dodatak soli smanjuje njihovu CMC jer se ioni adsorbiraju na površinu micela pri čemu dolazi do efekta elektrostatskog zasjenjenja što smanjuje odbijanje glava [2,3].

Tehnike za eksperimentalno određivanje CMC su mjerenja električne provodnosti provodnosti (za ionske surfaktante), površinske napetosti, koncentracije otopljenih molekula surfaktanta, mutnoće uzorka i dr., no najčešće se koriste prve dvije. Prilikom određivanja CMC iz ovisnosti površinske napetosti uzorka o ukupnoj koncentraciji dodanog surfaktanta,



**Slika 2.** Prikaz određivanja CMC iz mjerenja površinske napetosti kao funkcije koncentracije surfaktanta. Slika preuzeta i prilagođena iz [12].

kao što je prikazano u slici 2, CMC predstavlja točku sjecišta dviju linija koje opisuju eksperimentalne podatke za niske i visoke koncentracije [12].

Prilikom razvoja tehnološke primjene micela potrebno je uzeti u obzir: brzu dinamiku micelarnih procesa, veliku površinu na granici faza micela-voda i posjedovanje ugljikovodične unutrašnjosti nalik tekućini (eng. *liquidlike*) koja može otopiti nepolarne grupe. Osim u koloidnoj znanosti, micelle se također koriste u kemiji kao katalizatori i agensi za disperziju reaktanta u reakcijama. U industriji se upotrebljavaju kao sredstva za pročišćavanje otpadnih voda, a u medicini omogućuju način dostave lijekova koji slabo prolaze kroz staničnu membranu ili kojima je zbog agregacije smanjena učinkovitost poput nekih protutumorskih lijekova [2,13,14].

### **1.2.2. DVOSLOJI**

Amfifili kojima se parametar pakiranja približava jedinici (slika 1, jednačina 2), stvaraju dvoslojne strukture te uobičajeno imaju manju polarnu glavu i veći nepolarni dio ili obratno (najznačajniji primjeri su biološki lipidi u staničnim dvoslojnim membranama). Sintetski, to se postiže smanjenjem veličine skupine polarne glave ili uvođenjem dodatnog lanca esterskom ili eterskom kovalentnom vezom.

Osim po veličini i kritičnom parametru pakiranja, micelle i dvosloji se razlikuju u difuziji te po topljivosti unimera. U slučaju dvosloja je topljivost unimera manja za faktor  $10^6$  u usporedbi sa surfaktantima koji tvore micelle. Unutar micelle, unimeri surfaktanta mogu brzo difundirati dok za dvosloj razlikujemo dva načina difuzije. Prvotni označava brzu lateralnu difuziju lanaca unutar hidrofobnog dijela sloja, a potonji sporu *flip-flop* difuziju s jedne strane dvosloja na drugu rotacijom polarnih glava kroz unutrašnji hidrofobni dio. Također, micelle relativno brzo odgovaraju na promjene termodinamičkih uvjeta u mediju, dok dvoslojnim strukturama nekad trebaju sati i dani da postignu ravnotežno stanje.

Povećanjem koncentracije surfaktanta, dvosloji se orijentiraju u lamele, tvoreći tako tekuće kristale sastavljene od nekoliko dvosloja. U tekućem stanju, molekule surfaktanta slobodno difundiraju unutar lamela, ali ukoliko je lamelarna faza ohlađena može doći do stvaranja kristala ili gela. Iako su tada lanci kristalizirani, između slojeva se i dalje nalazi tekuće otapalo. Prema tome, fluidnost ovisi o temperaturi te kemijskoj prirodi lanaca pri čemu su u tekućoj fazi lanci *trans* konfiguracije. [2,3].

U analizi pakiranja surfaktanta u uređene strukture treba uzeti u obzir efekte zakrivljenosti međupovršine koji također određuju vrstu agregata te srednju vrijednost odn. raspodjelu dimenzije (npr. promjera). Ti efekti su posljedica interakcija između glava ili susjednih amfifila, a javljaju se čim se monosloj ili dvosloj počne savijati. Pritom je veličina koja određuje zakrivljenost površine tzv. modul zakrivljenosti,  $k_b$ , povezan s energijom zakrivljenosti:

$$\Delta E = \frac{\frac{1}{2}k_b}{R^2} \quad (3)$$

Gdje je:

$\Delta E$  - energija zakrivljenosti, [ $\text{Jm}^{-2}$ ],  $k_b$  - modul zakrivljenosti, [J],  $R$  - promjer dvosloja, [m].

Pozitivna ili negativna vrijednost modula određuje kako će se dvosloj pakirati. Negativni modul zakrivljenosti dovodi do stvaranja manjih micela ili vezikula u odnosu na veličine očekivane prema parametru pakiranja. Pozitivni modul zakrivljenosti uzrokuje pojavu obrnutih struktura ili većih vezikula veće polidisperznosti [1].

Dvosloji se također mogu pojaviti u obliku sfernih vezikula zvanih liposomi gdje se razlikuju 3 vrste ovisno o veličini:

- 1) Male unilamelarne vezikule (eng. *small unilamellar vesicles*, SUV) veličine radijusa do 100 nm
- 2) Velike unilamelarne vezikule (eng. *large unilamellar vesicles*, LUV) veličine radijusa od 100 nm do 1  $\mu\text{m}$

### 3) Multilamelarni liposomi veličine nekoliko mikrona

Karakteristika ovih struktura je da često mijenjaju oblike kao posljedica malih promjena u temperaturi i sastavu sustava [3,15]. Liposomi su u početku bili korišteni za proučavanje svojstava membrana. U posljednje vrijeme, kontrolom lipidnog sastava i modifikacijom površine razvijaju se kao transportni sustavi za isporuku lijekova [16,17]. Primjer za to su i nove supramolekularne strukture porfisomi, agregati porfirina konjugiranih s fosfolipidima, koji se koriste u fototermalnoj i fotodinamičkoj terapiji te za fluorescentno oslikavanje [18]. Glavni nedostatak formulacija baziranih na liposomima je njihova kemijska nestabilnost zbog oksidacije nezasićenih lanaca i hidrolize esterske veze. Također, termodinamička ravnoteža odnosno stabilnost su lako narušive promjenom uvjeta u mediju (npr. ionskog sastava) što vodi k širokoj raspodjeli veličina kao posljedice agregacije i fuzije vezikula u veće čestice. Zbog toga je za uporabu i skladištenje nužna kontrola uvjeta koji određuju njihovu veličinu kao i model koji omogućuje predviđanje stabilnosti liposoma [16].

### **1.3. INTERAKCIJE U SAMONAKUPINAMA AMFIFILA**

Primjena koloidne kemije u praksi povezana je s problemom kontroliranja sila (interakcija) između koloidnih čestica, čestica i površina ili između dviju površina. Sile proizlaze iz složenog uzajamnog djelovanja između molekula i atoma čestica te medija koje ih razdvaja [3]. Vodikove veze, van der Waals-ove sile, te hidrofobne i elektrostatske interakcije su glavne ne-kovalentne sile koje su uključene u proces samoudruživanja amfifilnih molekula (prikazane u tablici 1) [6]. Iako slabe, ukupan broj takvih interakcija proizvodi efekt dovoljno jak da drži amfifile na okupu i osigura njihovu stabilnost u otopini [1,11]. Zahvaljujući navedenim interakcijama, strukture samonakupina su fleksibilne zbog čega sustav može podnositi manje perturbacije, a istovremeno očuvati reverzibilnost asociiranih struktura [6]. U slučaju ionskih surfaktanata, van der Waals-ove

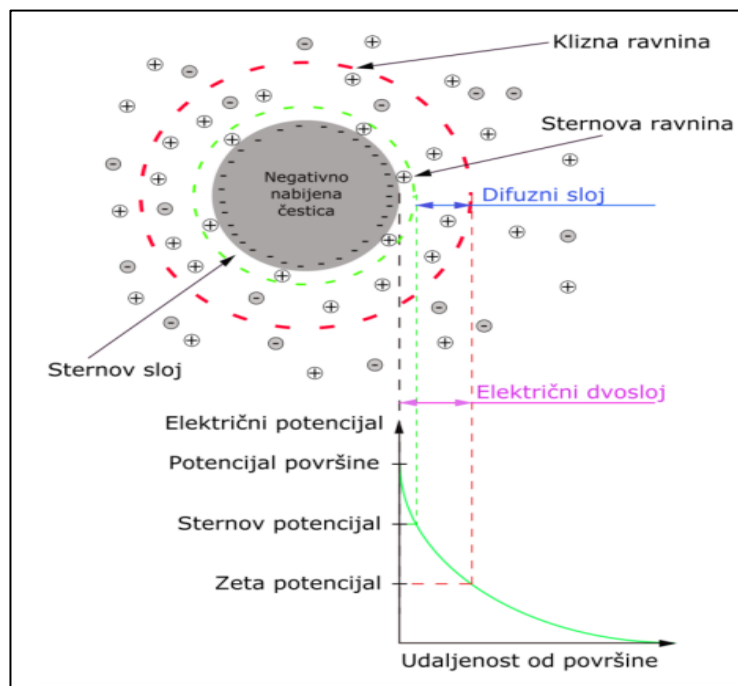
i elektrostatske interakcije diktiraju ukupnu interakciju između površina nanočestica kao što su micelle i vezikule, što je sažeto u DLVO teoriji stabilnosti električki nabijenih koloida (detaljnije u idućem poglavlju) [3,6,19].

**Tablica 1.** Jačina glavnih nekovalentnih interakcija (izražena u kJ/mol) uključenih u proces samoudruživanja amfifila. (tablica preuzeta i modificirana iz [6])

VRSTE INTERAKCIJA I VEZA	kJ/mol
<b>Kovalentna veza</b>	100-400
<b>Ion-ion/ion-dipol/dipol-dipol</b>	200-300/50-200/5-50
<b>Vodikova veza</b>	4-120
<b>Kation-<math>\pi</math> interakcija</b>	5-80
<b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> interakcija</b>	0-50
<b>van der Waals interakcija</b>	<5
<b>Hidrofobni efekt</b>	Entropija
<b>Metal-ligand</b>	0-400

Na molekularnoj razini, Van der Waals-ove interakcije sastoje se od kratkodometnih odbojnih sila (odbijanje elektronskih oblaka), privlačnih elektrostatskih interakcija između permanentnih naboja (Keesom-ove interakcije), induciranih naboja (Debye-ove interakcije) te London-ovih disperznih sila. Ukoliko su molekule slične tada su ove sile uvijek privlačne pa između ugljikovodika, koji ne nose permanentni ionski naboj niti trajni dipol, dominiraju van der Waals-ove interakcije [3,6]. Elektrostatske interakcije proizlaze iz disocijacije površinskih grupa na polarnoj glavi amfifila ili adsorpcijom nabijenih molekula (npr. polielektroliti) na površinu samonakupina iz otopine. Kao što je prikazano u slici 3, dolazi do stvaranja električnog dvosloja (ED).

ED se sastoji od sloja imobiliziranih iona vezanih na nabijenu površinu (Stern-ov sloj) te susjednog sloja pokretljivih iona (difuzni sloj). U difuzijskom sloju postoji zamišljena granica (smična ploha) koja odvaja ione koji se gibaju zajedno s nabijenom česticom prema elektrodi suprotnog naboja od preostalih iona izvan te granice. Potencijal koji je prisutan na toj granici naziva se zeta-potencijal (više o zeta potencijalu u poglavlju 1.5.) [3,20].

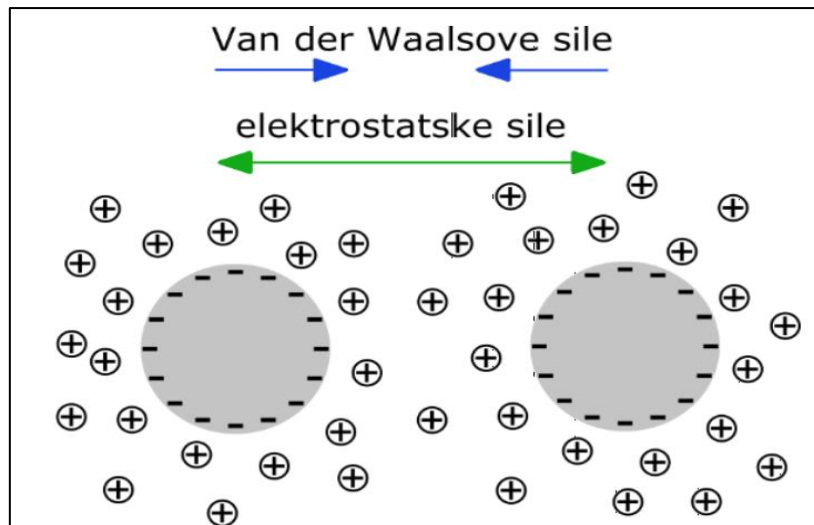


**Slika 3.** Shematski prikaz električnog dvosloja na površini čestice nastale samonakupljanjem negativno nabijenih amfifilnih molekula. Slika izrađena prema [21].

## 1.4. DLVO TEORIJA STABILNOSTI KOLOIDA

1940-ih godina znanstvenici Boris Derjaguin i Lev Landau te Evert Verwey i Theo Overbeek neovisno su razvili i predstavili teoretsku analizu koloidne stabilnosti poznatu kao DLVO teorija. Teorija pretpostavlja da se interakcije između nabijenih čestica u otopini (slika 4) javljaju prilikom njihovog nasumičnog (Brown-ovog) gibanja te se aproksimiraju dvjema glavnim doprinosima – privlačnim i odbojnim. U prvotne se ubrajaju van der Waalsove, vodikove veze, privlačenje suprotno nabijenih iona i  $\pi$ -

interakcije, a u potonje elektrostatske interakcije (interakcije električnog dvosloja) [6,21].



**Slika 4.** Prikaz djelovanja odbojnih (elektrostatske sile) i privlačnih (van der Waalsove sile) između dviju negativno nabijenih čestica u mediju sa suprotno nabijenim ionima. Slika preuzeta i modificirana iz [21].

DLVO teorija izražava se jednadžbom:

$$V_T = V_A + V_R + V_S \quad (4)$$

Pri čemu je:

$V_T$  – ukupna potencijalna energija koloidne čestice, [J] (eng. *total*),

$V_A$  – energija privlačnih interakcija, [J] (eng. *attractive*),

$V_R$  – energija odbojnih interakcija, [J] (eng. *repulsive*),

$V_S$  – potencijalna energija otapala, [J] (eng. *solvent*).

Potonja, treća komponenta koja se odnosi na otapalo uglavnom čini zanemariv doprinos ukupnoj potencijalnoj energiji na udaljenosti od nekoliko nanometara. Doprinosi odbijanja i privlačenja su dominantni i djeluju na znatno većim udaljenostima, a o njima ovisi sveukupna stabilnost nekog koloidnog sustava, što je prikazano u slici 5 [22]. Energetske

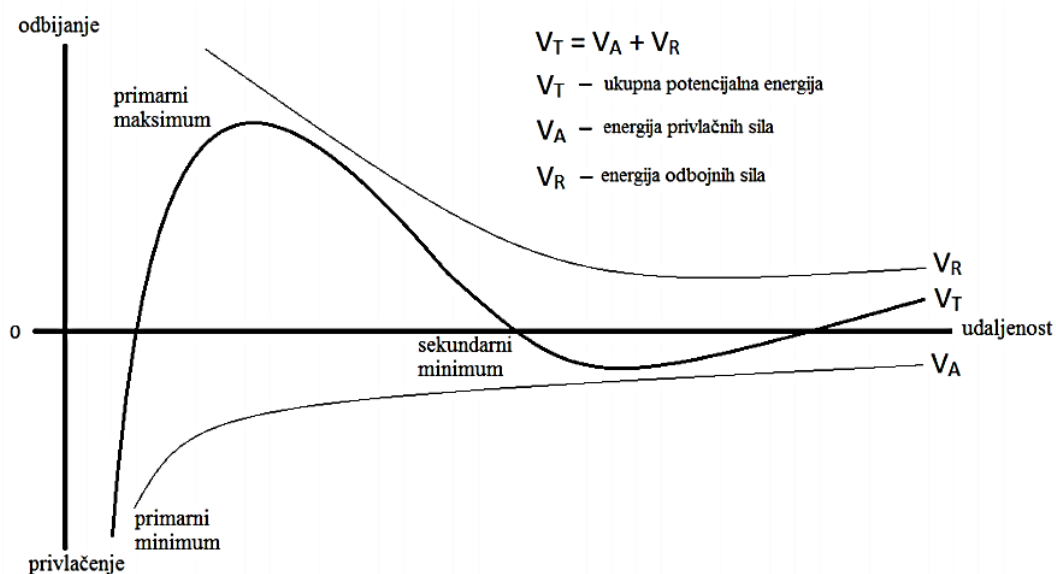
komponente glavnog doprinosa,  $V_A$  i  $V_R$  određuju se prema jednadžbama (4) i (5) redom:

$$V_A = -\frac{A}{12\pi D^2} \quad (5)$$

$$V_R = 2\pi\epsilon\alpha\zeta^2 e^{-\kappa D} \quad (6)$$

Gdje je:

$A$  – Hamakerova konstanta reda veličine  $10^{-20}$  [J] (ovisi o vrsti materijala odnosno njegovoj dielektričnoj polarizabilnosti),  $D$  – razmak između čestica u [mm],  $\epsilon$  – dielektrična permitivnost, [ $F \cdot m^{-1}$ ],  $a$  – radijus čestice, [mm],  $\zeta$ -zeta potencijal, [V],  $\kappa$  – funkcija ionskog sastava (Napomena:  $\kappa^{-1}$  naziva se Debye-va udaljenost i karakterizira debljinu električnog dvosloja [3,22])



**Slika 5.** Prikaz ukupnog potencijala interakcije dviju koloidnih čestica ( $V_T$ ) kao funkcija njihove međusobne udaljenosti. Slika modificirana prema [22].

Dok na većim međusobnim udaljenostima dviju čestica prevladava privlačna interakcija, na manjim udaljenostima energetska barijera, koja proizlazi iz odbojne elektrostatske sile, sprječava njihovo međusobno



približavanje. Međutim, kada se čestice sudaraju s dostatnom kinetičkom energijom za svladavanje odbojne barijere, tada privlačne sile koje prevladavaju na najmanjim udaljenostima uzrokuju njihov međusobni kontakt odnosno adherenciju. Prema tome, ukoliko postoji odbijanje među česticama veće od njihove prosječne kinetičke energije, koloidna disperzija je stabilna te se odupire flokulaciji ili sedimentaciji. U protivnom, dolazi do ireverzibilnog procesa flokulacije (što može biti znatno pospješeno primjenom polimernih flokulanata) ili koagulacije (npr. izazvane dodatkom soli u medij) koloidnih čestica [2,14,20,21,23]. Općenito, stabilnost koloidnih sustava postiže se pomoću dva temeljna mehanizma: steričkog odbijanja i stabilizacije nabojem. Prvotni podrazumijeva dodavanje polimera u otopinu koji se adsorbiraju na površinu čestica sprječavajući njihov bliski kontakt. Potonji mehanizam označava reverzibilno vezanje odnosno adsorpciju nabijenih vrsta iz otopine koja može biti jednostavno posljedica promjene njenog ionskog sastava (npr. pH) [3,19,21].

## **1.5. ELEKTRIČKA SVOJSTVA SAMONAKUPINA**

### **1.5.1. ZETA POTENCIJAL**

Zeta potencijal je električki potencijal u smičnoj plohi uz površinu čestice (slika 3) koji nastaje kao posljedica vezanja iona iz medija na površinu unutar tzv. električkog međupovršinskog sloja (ili "električkog dvosloja"). Uvjeti u mediju koji utječu na zeta potencijal su pH i ionska jakost. Dodavanjem baze u suspenziju, površina čestice poprima negativniji naboj, a dodatkom kiseline pozitivniji. Debljina električkog dvosloja karakterizirana je tzv. Debye-evom udaljenošću ( $\kappa^{-1}$ ), koja ovisi o koncentraciji iona i permitivnosti medija u otopini te se može izračunati kao:

$$\frac{1}{\kappa} = \left( \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r k T}{\sum_i (z_i e)^2 c_{i0}^*} \right)^{1/2} \quad (7)$$

Gdje je:

$\kappa^{-1}$  – Debye-eva udaljenost, [m<sup>-1</sup>],  $\varepsilon_0$  – permitivnost vakuumu, [Fm<sup>-1</sup>],  $\varepsilon_r$  – relativna dielektrična permitivnost,  $k$  – Boltzmann-ova konstanta, [JK<sup>-1</sup>],  $T$  – termodinamička temperatura, [K],  $z_i$  – valencija iona,  $c_{i0}^*$  – koncentracija ionske vrste (i), [mol dm<sup>-3</sup>],  $e$  – naboj elektrona, [C] [3].

Valencija iona također utječe na debljinu dvosloja pa tako trivalentni ioni (Al<sup>3+</sup>) više komprimiraju dvosloj u odnosu na monovalentne (Na<sup>+</sup>) [20–22].

Zeta potencijal je važan parametar u karakterizaciji nanočestica suspenzije jer određuje njihove elektrostatske interakcije te time i stabilnost suspenzija (vidi gore, DLVO teorija). Stoga je njegovo mjerenje korisno i prilikom optimizacije formulacije suspenzija i emulzija. Ukoliko sve čestice u suspenziji pokazuju veliki zeta potencijal negativnog ili pozitivnog predznaka, među njima će dominirati odbojna elektrostatska interakcija. S druge strane, ukoliko su vrijednosti zeta potencijala niske, tada neće biti prisutna interakcija koja bi spriječila kontakt čestica, što rezultira nakupljanjem (tj. flokulacijom). Čestice za koje je zeta potencijal izvan raspona +30 mV <  $\zeta$  < -30 mV uobičajeno se smatraju stabilnima [3,21,24].

### **1.5.2. NABOJ POVRŠINA KOLOIDA I ELEKTROFOREZA**

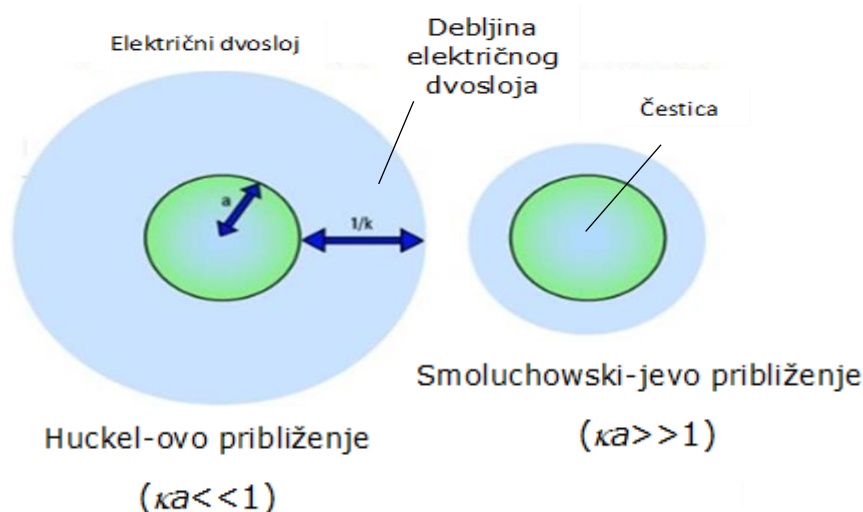
Električni naboj na površini određuje fizikalno-kemijske karakteristike koloidnih čestica kao što je njihova interakcija s izvana narinutim električnim poljem [21]. Na površinama samonakupljenih ionskih struktura surfaktanata (micela, dvosloja, vezikula), gustoća naboja određena je gustoćom pakiranja ionskih glava, a uvođenjem titrirajućih skupina naboj ovisi i o pH medija. Dakle površinski naboj proizlazi iz ravnoteža vezanja nabijenih vrsta iz *bulk*-a na površinu. Energiji vezanja (odnosno kemijskom potencijalu) tih vrsta doprinose i kemijske interakcije kratkog dometa u kojem slučaju govorimo o specifičnom vezanju te dalekosežne elektrostatske interakcije. Vezanje iona na površinu je kooperativni proces opisan Poisson-Boltzmann-ovom jednadžbom. Stoga povećanje broja nabijenih površinskih skupina postaje teže povećanjem gustoće

površinskog naboja [3]. Energija specifičnog vezanja protuiona, odnosno njihov afinitet za površine prati Hofmeister-ov (liotropni) niz [24]. Specifično vezanje iona otežava kontrolu površinskog potencijala (također i zeta-potencijala) kojeg određujemo iz mjerenja elektroforetske pokretljivosti [3].

Elektroforeza je efekt gibanja nabijenih čestica suspenzije u električnom polju. Uspostavom ravnoteže sile elektrostatskog privlačenja čestice k elektrodi suprotnog naboja i njoj suprotstavljene sile trenja na račun viskoznosti, čestice se gibaju konstantnom brzinom. Elektroforetska pokretljivost kao svojstvo čestice, definirana je kao brzina čestice po jedinici električnog polja, a ovisi o zeta potencijalu, dielektričnoj konstanti, viskozitetu medija i ionskoj jakosti prema Henry-jevoj jednadžbi:

$$\mu_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad (8)$$

gdje je  $\mu_E$  = elektroforetska pokretljivost, [ $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ],  $\varepsilon$  = dielektrična konstanta medija,  $\zeta$  = zeta potencial, [mV],  $\eta$  = viskozitet medija, [ $\text{Nm}^{-2}\text{s}$ ],  $f(\kappa a)$  = Henry-jeva funkcija ( $a$  = radijus čestice,  $\kappa$  = Debye-eva udaljenost).



**Slika 6.** Shematski prikaz Hückel-ovog i Smoluchowski-jevog približenja pri određivanju zeta potencijala iz mjerenja elektroforetske pokretljivosti. Slika preuzeta i modificirana prema [25].

Pri tom, Henry-eva funkcija u tzv. Smoluchowski-jevom približenju ( $\kappa a \gg 1$ ) iznosi  $2/3$ , a slučaj kad ( $\kappa a \ll 1$ ) naziva se Hückel-ovim približenjem [21,25–27]. Usporedba tih aproksimacija prikazana je u slici 6.

## **1.6. EKSPERIMENTALNE TEHNIKE KARAKTERIZACIJE KOLOIDNIH SUSTAVA**

Instrumentalne tehnike upotrijebljene za karakterizaciju disperzija u ovom radu su: dinamičko raspršenje svjetlosti (mjerjenje raspodjele čestica po veličini), elektroforeza uz analizu faze raspršenja svjetla (mjerjenje elektroforetske pokretljivosti odnosno zeta-potencijala) te tehnika viseće kapljice (mjerjenje površinske napetosti na granici voda/zrak).

### **1.6.1. DLS**

Dinamičko raspršenje svjetlosti (eng. *dynamic light scattering*, DLS) je tehnika koja omogućuje određivanje difuzijskog koeficijenta čestica-raspršivača laserskog zračenja, iz direktno izmjerene autokorelacijske funkcije intenziteta raspršene zrake. Shema instrumenta je prikazana u slici 7 [28,29], a veza između fluktuacije intenziteta raspršene zrake, pripadajuće autokorelacijske funkcije te difuzijskog koeficijenta, u slici 8 [30]. Osnovni princip je da se čestice u uzorku osvjetljavaju laserom kao izvorom koherentnog monokromatskim boje te se analiziraju fluktuacije u intenzitetu raspršenog svjetla pri određenom kutu raspršenja (najčešće  $90^\circ$ ). Pri tom, intenzitet raspršene zrake ovisi o kutu raspršenja, veličini i obliku čestica (veće čestice više raspršuju "unaprijed"). Važno svojstvo čestica je da se one u mediju nalaze u stanju nasumičnog Brown-ovog gibanja te da se manje čestice gibaju brže od većih. Brzina čestice, izražena kao omjer srednjeg kvadratnog pomaka čestice  $\langle R^2 \rangle$  iz početnog položaja

u vremenu  $t$ , u odnosu je s difuzijskim koeficijentom  $D$  [ $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ] preko Einstein-ovog odnosa:

$$\frac{\langle R^2 \rangle}{t} = 6D .$$

Difuzijski koeficijent je pak povezan s polumjerom čestice preko Stokes – Einstein-ove jednadžbe (vrijedi samo za sferične čestice):

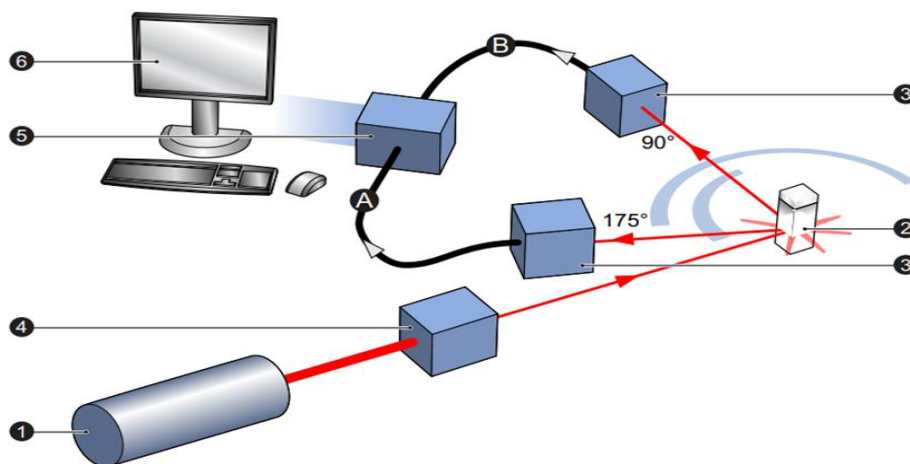
$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta R} \quad (9)$$

gdje je  $k_B$  = Boltzmann-ova konstanta [ $\text{JK}^{-1}$ ],  $T$  = temperatura, [K],  $\eta$  = viskozitet medija, [ $\text{Nm}^{-2}\text{s}$ ],  $R$  – hidrodinamički promjer, [m].

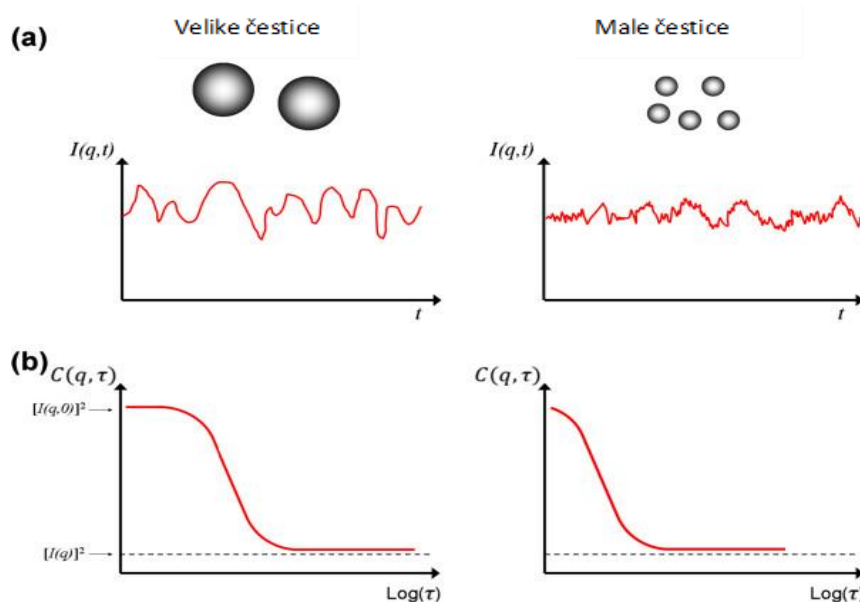
Pomoću elektroničke komponente uređaja zvane korelator, mjeri se "stupanj sličnosti" između dva signala odvojena određenim vremenskim periodom ("vremenom uzorkovanja") pri čemu ta "sličnost" tj. korelacija vremenski opada zbog nasumičnog gibanja. Relaksacijsko vrijeme gubitka korelacije u signalu ( $\tau_c$ ) u direktnoj je vezi s difuzijskim koeficijentom:

$$D = \frac{\tau_c}{q}; q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (10)$$

gdje  $q$  označava valni vektor raspršene zrake ovisan o kutu raspršenja  $\theta$ ,  $n$  je indeks loma medija a  $\lambda$  valna duljina zračenja. U slučaju velikih čestica koje se gibaju sporo, intenzitet raspršenja također fluktuirira s duljim karakterističnim vremenom; obratno vrijedi za male čestice. Iz izmjerene autokorelacijske funkcije, softver regresijski pronalazi („fita“) najbolju raspodjelu čestica po veličini dobivenu pomoću odgovarajućeg algoritma (npr. CONTIN analiza). Pri tom, raspodjela može biti utegnuta s obzirom na broj, volumen ili intenzitet. Utegnutost s obzirom na intenzitet korištena u ovom radu, temelji se na Rayleigh-ovoj aproksimaciji da je intenzitet raspršenja proporcionalan šestoj potenciji promjera čestice-raspršivača. Princip rada uređaja i njegove glavne komponente prikazane su u slici 7, a primjer detektiranog signala i razlike u korelacijskim funkcijama za velike i male čestice u slici 8 [28–30].



**Slika 7.** Prikaz komponenti i principa rada uređaja za mjerenje veličine čestica tehnikom dinamičkog rasapa svjetla. Laserska zraka (1) se raspršuje na česticama uzorka u kiveti (2). Detektor (3) mjeri intenzitet raspršene zrake te se smješta pod kutom od 90° (za poluprozirne uzorke) ili 175° (za vrlo zamućene uzorke). Prigušnik (4) se koristi za smanjenje intenziteta laserske zrake kako bi se optimiziralo raspršenje. Signal kojeg detektira detektor ulazi u korelator (5) koji uspoređuje intenzitet i izvodi brzinu variranja intenziteta. Konačno, informaciju o korelaciji koristi računalo sa softverom (6) prilikom analize podataka i dobivanje informacije o veličini. Slika preuzeta iz [29].



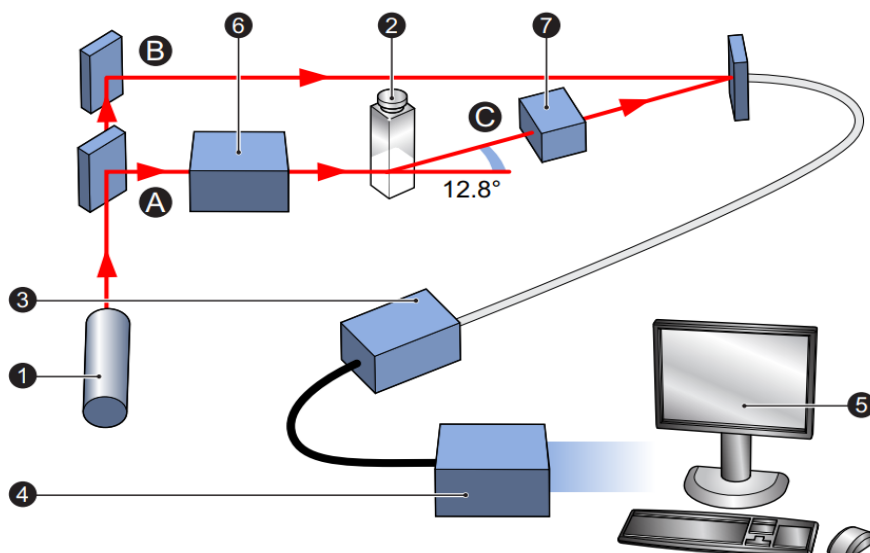
**Slika 8.** Shematski prikaz vremenske fluktuacije raspršene svjetlosti (a) i ovisnosti autokorelacijske funkcije o logaritmu perioda uzorkovanja signala (b) za velike čestice (lijevo) i male čestice (desno) prilikom mjerenja DLS. Slika preuzeta i prilagođena iz [30].

### 1.6.2. PALS

Tehnika elektroforeze uz analizu faze raspršenog svjetla (eng. *phase analysis light scattering*, PALS) temelji se na mjerenju pomaka faze raspršene svjetlosti i Doppler-ovog efekta, koji ovise o brzini čestica. Određivanje brzine čestica se dakle vrši usporedbom valne funkcije raspršene zrake u odnosu na referentnu zraku koja ne prolazi kroz uzorak. Primjenom električnog polja u kiveti s uzorkom, za što služe dvije platinske elektrode, elektrostatski nabijene čestice se počinju gibati što uzrokuje Doppler-ov efekt i pomak u fazi raspršene zrake [28,29]. Izmjerena brzina čestica se preračunava u elektroforetsku pokretljivost preko njene definicije:

$$\mu_e = v/E \quad (11)$$

gdje je  $v$  brzina čestice, a  $E$  jačina električnog polja. Dalje je moguće, primjenom nekog od teoretskih modela kao npr. gore navedene Smoluchowski-jeve jednadžbe, iz pokretljivosti izračunati zeta-potencijal. Važno je naglasiti da je za mjerenje PALS, nužno da uzorak barem minimalno provodi el. struju, odnosno da posjeduje određenu el. provodnost. Princip rada uređaja i njegove glavne komponente prikazani su u slici 9.



**Slika 9.** Prikaz komponenti i princip mjerenja elektroforetske pokretljivosti PALS tehnikom. Laser (1) se koristi za osvjetljavanje čestica u uzorku pri čemu se, pomoću razdjelnika, laserska zraka cijepa na onu koja prolazi kroz uzorak (A) i referentnu (B). Prvotna zraka prolazi kroz kivetu s uzorkom (2) te se njena valna duljina i faza mjere pomoću detektora (3) detektira raspršena svjetlost pod kutom od  $12,8^\circ$ . Detektor potom šalje informacije o fluktuaciji intenziteta svjetlosti u procesor signala (4). Konačno, informacija se šalje u računalo (5) gdje se softverom određuje elektroforetska pokretljivost i posljedično zeta potencijal. Prigušnik (6) se koristi za smanjenje intenziteta lasera i raspršenja svjetla ukoliko se detektira prevelika količina svjetla. Komponenta (7) se ugrađuje unutar puta raspršenih zraka kako bi se održalo njihovo poravnanje. Slika preuzeta iz [29].

### 1.6.3. VISEĆA KAPLJICA

Tehnika viseće kapljice (eng. *pendant drop*) koristi se u mjerenju površinske napetosti tekućine na granici faza tekućina/zrak ili međupovršine između dviju tekućina. Tekućina se potiskuje kroz usku kapilaru (iglu) pri čemu dolazi do stvaranja kapi na njenom vrhu. Oblik viseće kapi određen je njenim volumenom (o kojem ovisi i njena težina) te površinskom napetošću. Potonja nastoji smanjiti površinu kapi i oblikovati je u sferu, dok sila teža rasteže kap, što u mehaničkoj ravnoteži rezultira kruškolikim oblikom kapi. Površinska napetost računa se na temelju Young – Laplace-ove jednadžbe kojom se podešava („fita“) profil kapi:



$$\Delta p = \gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (12)$$

Gdje je:

$\Delta p$  = razlika tlakova unutar i izvan kapljice (u mehaničkoj ravnoteži jednaka je težini po jedinici površine), [Nm<sup>-2</sup>],  $\gamma$  = površinska napetost, [Nm<sup>-1</sup>],  $R_1$  i  $R_2$  = mjereni polumjeri zakrivljenosti, [m]. Ukoliko se mjerenje vrši pri dnu kapljice gdje je ona sferoidna,  $R_1=R_2$  [3,31,32].

## 1.7. ORGANSKE BOJE I NJIHOVA TEHNOLOŠKA PRIMJENA

Organski materijali se smatraju obećavajućim kandidatima za optoelektroničku primjenu zbog specifičnih fotofizikalnih svojstava (apsorpcija i emisija). Dva najznačajnija područja u kojima se primjenjuju amfifilne boje su bojanje vlaknastih materijala i laserska tehnologija [33]. Istraživanja su pokazala da samoudruživanje molekula boja ovisi o: koncentraciji i kemijskoj strukturi boje, ionskoj jakosti, temperaturi i prisustvu organskih otapala. Agregacija se povećava s povećanjem koncentracije boje ili ionske jakosti te uvođenjem dugog alkilnog lanca, a smanjuje porastom temperature, uvođenjem ionizirajućeg supstituenta ili dodatkom organskih otapala [34–36]. Potonje se koristi u laserskoj tehnologiji jer agregacija smanjuje laserska svojstva otopina boja. Međutim, pokazalo se da se pri visokim koncentracijama agregati stvaraju i u organskim otapalima te dolazi do pada laserske energije i pomaka emisijskog spektra. Stoga, kontrola molekularnog pakiranja u agregatima predstavlja tematiku mnogobrojnih istraživanja s ciljem njihove primjene [36–38].

Na razini elektronskog stanja, agregacija dovodi do cijepanja energetske razine pobuđenog stanja molekule u agregatima u dvije razine različitih po energiji. Taj efekt objašnjava Kasha-ina ekscitonska teorija. Zbog dva moguća rasporeda prijelaznih dipola kromofora u agregatu, razlikujemo i dvije različite geometrije: J- i H-agregate. Kod prvotnih se

kromofori nalaze u istoj ravnini (linearna struktura), a kod potonjih u paralelnim ravninama („sendvič“ struktura). Geometrija se može odrediti iz apsorpcijskih spektara jer je kod J-agregata prisutan crveni pomak u odnosu na vrpcu monomera, tj. plavi pomak kod H-agregata [35,39–41].

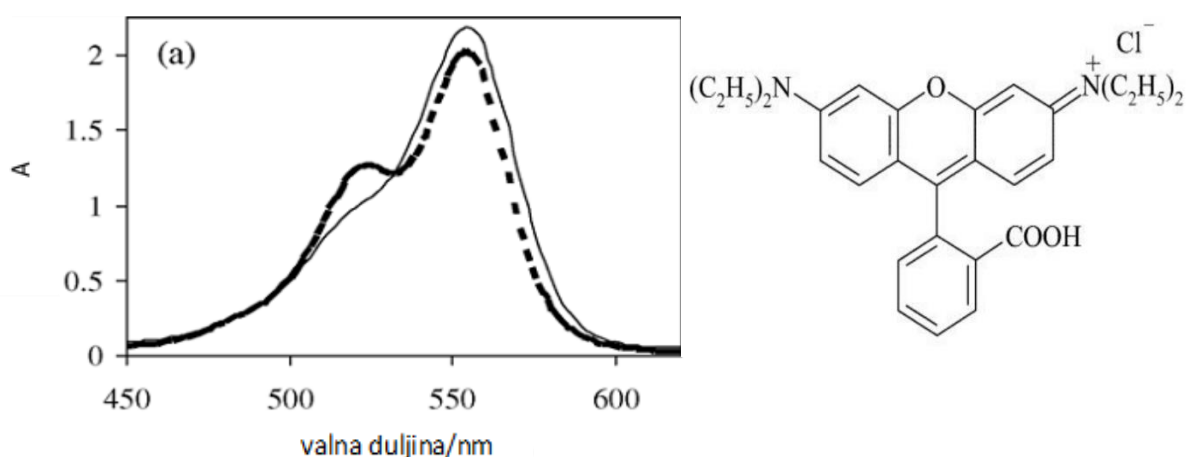
Kada boje nemaju na sebe vezani dugi hidrofobni lanac, uočeno je da se njihovi agregati razlikuju od samonakupina amfifila pokazujući nisku površinsku aktivnost u odnosi na surfaktante. Zbog posjedovanja aromatskih prstena najčešće dolazi do  $\pi$ - $\pi$  interakcija pri čemu se ne stvaraju sferične micelle već štapićasti (eng. *rodlike*) agregati. Posljedično, za razliku od agregacije surfaktanata, agregacija u otopinama boja nije kooperativni proces već se odvija u više koraka: nastanak dimera, trimera, tetramera itd. [36,42].

### **1.7.1. RODAMIN B**

Rodamin B pripada skupini ksantenskih boja kojeg karakterizira kovalentno vezana pobočna skupina na planarnu ksantensku grupu i pozitivan naboj u molekuli [40]. Derivati rodamina primjenjuju se u biološkom oslikavanju, fluorescentnoj mikroskopiji, DNA sekvenciranju, uređajima za emitiranje svjetla na organskoj bazi (eng. *organic light emitting devices*) te laserskim bojama. Štoviše, mnoga postignuća u laserskoj tehnologiji ostvarena su korištenjem upravo rodamina kao aktivnog medija. U fluorescentnoj mikroskopiji, rodaminske boje se koriste zahvaljujući velikom kvantnom prinosu fluorescencije te izrazite fotokemijske stabilnosti prilikom intenzivnog osvjetljavanja. Amfifilni derivati rodamina služe kao fluorescentne probe za detekciju i karakterizaciju samoudruživanja lipida i proteina u različitim domenama stanične membrane [39,40,43–45].

Većina pripadnika rodaminske klase boja su skloni agregaciji u vodi uzrokujući perturbacije u elektroničkom ponašanju čime se objašnjava njihovo odstupanje od Lambert – Beerova zakona uočenog

spektrofotometrijskim studijama i kod ostalih boja [36,37,44]. U slici 10., prikazani su kemijska struktura i karakterističan apsorpcijski spektar za monomer i dimer rodamina B u vodi [34]. Valna duljina maksimalne apsorbanace iznosi oko 560 nm. Agregacijom (dimerizacijom) monomera dolazi do smanjenja intenziteta apsorpcije i pojave novog maksimuma karakterističnog za dimere [40].

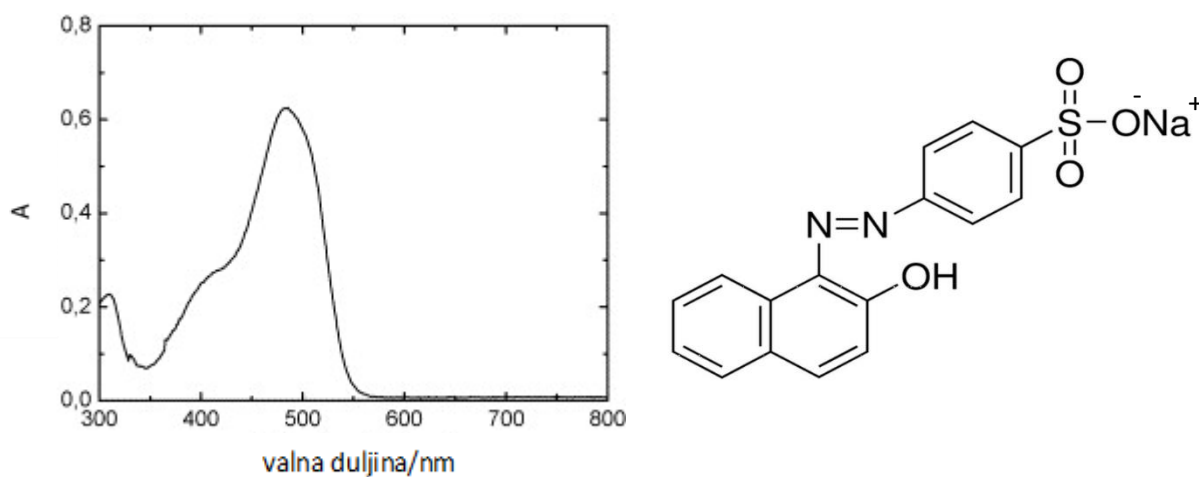


**Slika 10.** Prikaz apsorpcijskog spektra dimera (isprekidana crta) i monomera (puna crta) rodamina B u vodi (lijevo) te kemijske strukture (desno). Slika preuzeta i izmijenjena prema [34].

### 1.7.2. ORANGE II

Azo boje su najveća klasa organskih boja. Sadrže jednu ili više azo veza (-N=N-) kao kromofornu grupu vezanu za aromatske strukture koje mogu sadržavati funkcionalne skupine poput hidroksilne ili sulfonske [46]. Orange II (Acid Orange 7) je anionska azo boja koja se najčešće upotrebljava u tekstilnoj, prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Ionske azo boje, smatraju se amfifilnima jer su ne-ionske skupine kovalentno vezane za nabijenu skupinu glave [42,47,48]. Struktura orange II uključuje hidroksilnu grupu o *orto*-položaju u odnosu na azo grupu zbog čega dolazi do azo-hidrazonske tautomerizacije i nastajanja dva tautomera.

Svaki tautomer pokazuje kiselobaznu ravnotežu, a literaturno su zabilježene različite  $pK_a$  vrijednosti u rasponu od 10,6 – 11,4.  $pK_a$  vrijednosti su više u odnosu na naftol bez obzira na poziciju -OH skupine zbog stvaranja unutarmolekulskih vodikovih veza. U slici 11, prikazani su kemijska struktura i karakterističan apsorpcijski spektar za orange II. Spektar pokazuje sličnosti s rodaminom B pri čemu je maksimalna valna duljina apsorpcije „plavo“ pomaknuta i iznosi oko 480 nm s pojavom „ramena“ vrpce u području između 350 i 450 nm [49].



**Slika 11.** Prikaz apsorpcijskog spektra orange II boje u vodi (lijevo) te kemijske strukture (desno). Slika preuzeta i prilagođena prema [49].

## 2. TEMA, CILJ TE ZADACI ISTRAŽIVANJA

Tema diplomskog rada je istraživanje primjenjivosti i dosega pojedinih fizikalno-kemijskih mjernih tehnika, u prvom redu spektrofotometrije u UV/VIS području, dinamičkog rasapa svjetla (DLS), mjerenja elektroforetske pokretljivosti nanočestica te površinske napetosti na granici faza voda/zrak, za dobivanje što preciznije slike o ravnotežnom faznom dijagramu kao i dinamici samonakupljanja amfifilnih organskih boja. Cilj je razviti metodologiju za određivanje odnosa naboj-struktura samonakupljenih amfifila na temelju fizikalnih veličina izmjerenih navedenim tehnikama, te primjenjujući interpretaciju koja ujedinjuje eksperimentalne rezultate u svjetlu dostupnih fizikalno-kemijskih modela.

### ZADACI:

- 1) Sinteza amfifilnih organskih boja reakcijama supstitucije, njihovo pročišćavanje te analiza kemijske strukture novosintetiziranih spojeva
- 2) Priprema disperzija sintetiziranih amfifila u precizno kontroliranom rasponu koncentracije te ionske jakosti vodenog medija
- 3) Provedba mjerenja pri precizno kontroliranim uvjetima koncentracije amfifila i ionske jakosti medija:
  - Spektrofotometrijske kiselinsko-bazne titracije
  - Mjerenje raspodjele veličine čestica (dinamički rasap svjetla)
  - Mjerenje elektroforetske pokretljivosti čestica (analiza faze raspršenog svjetla)
  - Mjerenje površinske napetosti na granici faza voda/zrak (analiza oblika kapljice)
- 4) Statistička analiza i obrada izmjerenih podataka
- 5) Interpretacija eksperimentalnih rezultata objedinjenim pristupom, u svjetlu uvriježenih teoretskih modela

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kemikalije i reagensi

- Rodamin B (SIGMA-ALDRICH Co, SAD)
  - Orange-II, natrijeva sol (SIGMA-ALDRICH Co, SAD)
  - Cezijev karbonat (SIGMA-ALDRICH Co, SAD)
  - 1-jodododekan (SIGMA-ALDRICH Co, SAD)
  - Dodekanoil-klorid (SIGMA-ALDRICH Co, SAD)
  - *N,N* - dimetilformamid (Acros Organics, Belgija)
  - Metanol (CARLO ERBA Reagents, Francuska)
  - Diklormetan (BDH Prolabo Chemicals, UK)
  - Piridin, bezvodni (Acros Organics, Belgija)
  - Amberlite IRA-400 klorid (SIGMA-ALDRICH Co, SAD)
- 
- Silika gel (Silica 60 Å, 0,04-0,06 mm)  
(Macherey-Nagel, Njemačka)
  - Puferi za kalibraciju (2.00, 4.01, 7.00 i 10.01)  
(Hamilton Bonaduz AG, Švicarska)
  - Vodena otopina klorovodične kiseline  
(Avantor Performance Materials, Poljska)
  - Vodena otopina kalijeva hidroksida  
(Avantor Performance Materials, Poljska)
  - Vodena otopina kalijeva klorida  
(BDH Prolabo Chemicals, UK)

## 3.2. Sinteza spojeva

### 3.2.1. Dodecil-2-[(3E)-(6-dietilamino)-3-(diethylimino)-3H-ksanten-9-il]benzoat (boja 1)

Boja **1** sintetizirana je metodom koju su razvili Tatyana I. Rokitskaya i suradnici [50] uz određene izmjene. Otopini rodamina B (550 mg, 1,15 mmol) u 2,5 ml metanola dodaje se vodena otopina cezijevog-karbonata (0,3 ml, 1M). Reakcijska smjesa je grijana (100°C) i miješana u vodenoj kupelji do ključanja, ohlađena na sobnu temperaturu te je otapalo uklonjeno *in vacuo*. Zaostaje kruti produkt koji se suši u eksikatoru preko noći i koristi bez daljnjeg pročišćavanja.

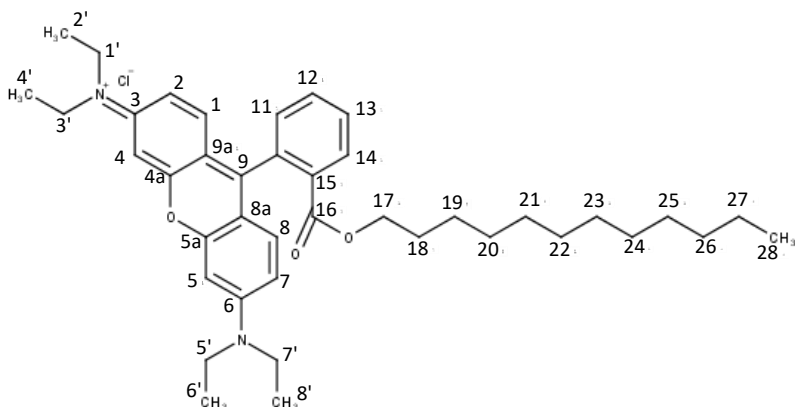
Smjesa cezijeve soli rodamina B (1,15 mmol, 1 ekv.) i 1-jodododekana (560 µl, 679 mg, 2,29 mmol, 2 ekv.) otopljeni su u *N,N*-dimetilformamidu (5 ml). Reakcijska smjesa je grijana (60°C) i miješana u vodenoj kupelji 10 sati te miješana na sobnoj temperaturi tijekom 4 dana. Nakon provjere dobivenog produkta tankoslojnom kromatografijom, otapalo je uklonjeno *in vacuo* te je produkt pročišćen dvjema kolonskim kromatografijama sa silika gelom uz diklormetan/metanol (DCM/MeOH) (30:1) kao eluens. Prva frakcija, izolirana je kao uljasti produkt, ljubičaste boje. Produkt je zatim otopljen u metanolu (5 ml) te je u reakcijsku smjesu dodan Amberlite IRA-400 klorid (1 g), a smjesa se zagrijava (60°C) uz miješanje 2 sata. Reakcijska smjesa je filtrirana, te je otapalo iz filtrata uklonjeno *in vacuo*. Izoliran je uljasti produkt tamnoljubičastog obojenja (boja **1**) (247,7 mg, 33%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>Cl/CD<sub>3</sub>OD): δ/ppm = 0,88 (t, *J* = 6,90 Hz, 3H, C<sup>28</sup>H<sub>2</sub>), 1,14-1,28 (m, 18H, C<sup>19</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>20</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>21</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>22</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>23</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>24</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>25</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>26</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>27</sup>H<sub>2</sub>), 1,35 (t, *J* = 7,14 Hz, 12 H, C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>, C<sup>4</sup>H<sub>3</sub>, C<sup>6</sup>H<sub>3</sub>, C<sup>8</sup>H<sub>3</sub>), 1,44 (q, *J* = 7,06 Hz, 2H, C<sup>16</sup>H<sub>2</sub>), 3,64 (q, *J* = 7,23 Hz, 8H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>5</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>), 4,02 (t, *J* = 6,60 Hz, 2H, C<sup>15</sup>H<sub>2</sub>), 6,82 (d, *J* = 2,41 Hz, 2H, C<sup>4</sup>H, C<sup>5</sup>H), 6,84 (d, *J* = 9,54 Hz, 2H, C<sup>1</sup>H, C<sup>8</sup>H), 7,11 (d, *J* = 9,47 Hz, 2H, C<sup>2</sup>H, C<sup>7</sup>H), 7,32 (dd, *J* = 7,34,

1,38 Hz, 1H,  $C^{11}H$ ), 7,78 (td,  $J=7,68, 1,52$  Hz, 1H,  $C^{13}H$ ), 7,83 (td,  $J=7,50, 1,53$  Hz, 1H,  $C^{12}H$ ), 8,31 (dd,  $J= 7,80, 1,48$  Hz, 1H,  $C^{14}H$ )

UV-Vis ( $CH_2Cl_2$ ):  $\lambda_{max}/nm= 352, 556$ ,  $\log \epsilon= 4,55$ ;

Fluorescencija ( $CH_2Cl_2$ ,  $\lambda_{ex}/nm= 550$ ):  $\lambda_{em}/nm= 561$ .



Molekulska formula:

$C_{40}H_{55}ClN_2O_3$

Molekulska masa:

$649,36 \text{ g mol}^{-1}$

### 3.2.2. Natrijev 4-[(E)-2-[2-(dodekanoiloksi)naftalen-1-il]diazon-1-il]benzen-1-sulfonat (boja 2)

Orange-II (1g, 2,87 mmol, 1 ekv.) otopljen je u bezvodnom piridinu (13 ml) te je otopina ohlađena u ledenoj vodenoj kupelji na  $0^\circ C$ . U reakcijsku smjesu je dokapavan dodekanoil-klorid (2,2 ml, 9,37 mmol, 3,3 ekv.) kroz 15 minuta. Reakcijska smjesa se 24 sata miješa na sobnoj temperaturi te se blago zagrijava ( $40^\circ C$ ) tijekom 4 sata. Nakon provjere dobivenog produkta tankoslojnom kromatografijom, otapalo je uklonjeno *in vacuo* te je produkt pročišćen dvjema kolonskim kromatografijama sa silika gelom uz diklormetan/metanol (DCM/MeOH) (prvo 40:1, poslije 15:1) kao eluens. Produkt, boja **2**, izolirana je kao krutina tamnonarančastog obojenja (703,8 mg, 46%).

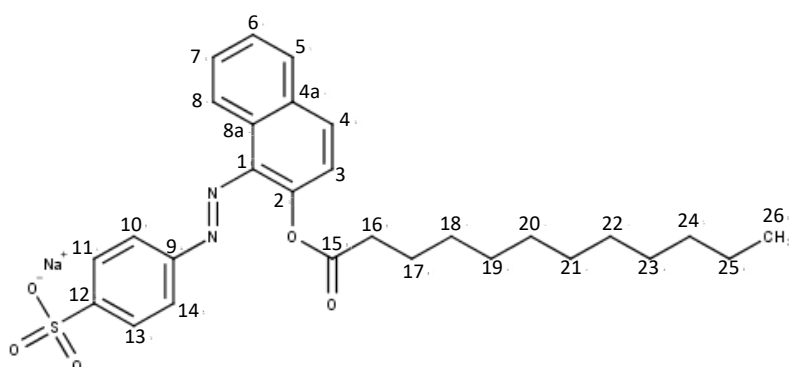
$^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3Cl/CD_3OD$ ):  $\delta/ppm= 0,89$  (t,  $J= 7,01$  Hz, 3H,  $C^{26}H_2$ ), 1,29-1,41 (m, 16H,  $C^{18}H_2, C^{19}H_2, C^{20}H_2, C^{21}H_2, C^{22}H_2, C^{23}H_2, C^{24}H_2, C^{25}H_2$ ),



1,73 (q,  $J = 7,33$  Hz, 2H,  $C^{17}H_2$ ), 2,57 (t,  $J = 7,14$  Hz, 2H,  $C^{16}H_2$ ), 7,29 (d,  $J = 9,52$  Hz, 1H,  $C^3H$ ), 7,59 (dd,  $J = 9,46, 2,43$  Hz, 2H,  $C^6H, C^7H$ ), 7,96-8,08 (m, 6H,  $C^4H, C^5H, C^{10}H, C^{11}H, C^{13}H, C^{14}H$ ), 8,31 (dd,  $J = 7,67, 1,42$  Hz, 1H,  $C^8H$ )

UV-Vis ( $CH_2Cl_2$ ):  $\lambda_{max}/nm = 361, 402, 485$ ,  $\log \epsilon = 3,95$ ;

Fluorescencija ( $CH_2Cl_2$ ,  $\lambda_{ex}/nm = 480$ ): ne fluorescira



Molekulska formula:

$C_{28}H_{33}N_2NaO_5S$

Molekulska masa:

$532,63 \text{ g mol}^{-1}$

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Kromatografske metode

**Tankoslojna kromatografija:** Za praćenje i provjeru tijeka reakcije koristila se tankoslojna kromatografija na TLC pločicama presvučenima slojem silika-gela (Macherey-Nagel (Njemačka) 0,20 mm silica gel 60 Å sa fluorescentnim indikatorom UV<sub>254</sub>), uz UV-lampu valnih duljina 254 i 365 nm. Kao mobilna faza koristio se sustav otapala diklormetan/metanol (DCM/MeOH) u omjeru 9:1.

**Kromatografija na stupcu:** S ciljem izolacije i pročišćavanja željenih produkata koristila se kromatografija na stupcu sa silika gelom (Macherey-Nagel (Njemačka), Silica 60 Å, 0,04-0,06 mm) te sustavom otapala

diklormetan/metanol (DCM/MeOH) u različitim omjerima kao mobilnom fazom.

### **3.3.2. Spektroskopske metode**

**NMR spektroskopija:**  $^1\text{H}$  NMR spektri snimljeni su u Laboratoriju za spektroskopiju NMR, Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pomoću spektrometra *Brüker Avance III HD 400 MHz*. Za pripremu uzoraka za snimanje koristila su se deuterirana otapala (diklormetan i metanol).

**UV/VIS spektrofotometrija:** UV/VIS spektri snimljeni su u kivetama pomoću spektrofotometra *Agilent Cary 60 UV-Vis* (SAD) u valnom području apsorpcije od 350 do 650 nm za suspenzije uzoraka određene pH vrijednosti, ionske jakosti i koncentracije.

### **3.3.3. Određivanje veličine, elektroforetske pokretljivosti i površinske aktivnosti ispitivanih uzoraka**

Za analizu veličine i zeta potencijala (elektroforetske pokretljivosti) suspenzija koloidnih čestica uzoraka koristio se *Brookhaven NanoBrook OMNI zetasizer*. Raspodjela po veličinama nanočestica određena je tehnikom dinamičkog rasapa svjetla (eng. *Dynamic Light Scattering*, DLS) tako da su se podesili parametri temperature (25°C), broj ciklusa mjerenja (15), kuta raspršenja (90°C) te algoritma za distribuciju veličina (Contin). Koristi se 35 mW laser s crvenom diodom te nominalne valne duljine od 640 nm.

Analiza faze raspršenog svjetla (eng. *Phase Analysis Light Scattering*, PALS) koristila se za mjerenje elektroforetske pokretljivosti koloidnih

čestica uz podešene parametre kao i za DLS (izuzev Contin algoritma) te odabirom Smoluchowski modela za analizu podataka.

Površinska aktivnost određena je tehnika viseće kapljice (eng. *Pendant drop method*) primjenom uređaja za mjerenje kontaktnog kuta, *Drop Shape Analyzer*, Krüss. Površinska napetost izračunata je iz oblika kapi koristeći Young-Laplace – ovu jednadžbu. Prije početka mjerenja potrebno je podesiti visinu stabilizacije slike s obzirom na kut gledanja. U eksperimentima viseće kapljice, kut gledanja iznosi  $0^\circ$ , a visina 5.0 mm. Dodatno, potrebno je unijeti parametar promjera iglice radi kalibracije koji je potreban za izračunavanje površinske napetosti.

#### **3.3.4. Priprema uzoraka**

Uzorci amfifilnih boja, boja **1** i **2**, otopljeni su u dekarboniziranoj vodi tvoreći matičnu otopinu najveće koncentracije koja se koristila za daljnja razrjeđenja i pripremu određenog koncentracijskog raspona. Pripremljena su po dva seta uzoraka različitih ionskih jakosti ( $I = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$  i  $I = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ). Boja **1** analizirana je u pH rasponu 2-7,50 (viša ionska jakost) i 3-7,50 (niža ionska jakost) za koncentracijski raspon  $c = 2 \times 10^{-2} \text{ M} - 5 \times 10^{-6} \text{ M}$  dok je boja **2** analizirana u pH rasponu 5,5-11 (viša ionska jakost) i 5,5-10 (niža ionska jakost) za koncentracijski raspon  $c = 2 \times 10^{-2} \text{ M} - 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Za mjerenje pH korišten je pH metar (Metrohm 799 GPT Titrino) pri čemu se jednom tjedno vršila kalibracija uređaja koristeći 4 standardne puferske otopine (pH: 2, 4, 7 i 10) koje su prethodno termostatirane na  $25^\circ\text{C}$  pomoću termostata (IKA IC Control Thermostat). Za titraciju uzoraka korištene su vodena otopina kalijeva hidroksida i klorovodične kiseline (obje 0,25 M) kako se njihovim dodavanjem ne bi pretjerano mijenjala koncentracija uzorka.

## 4. REZULTATI

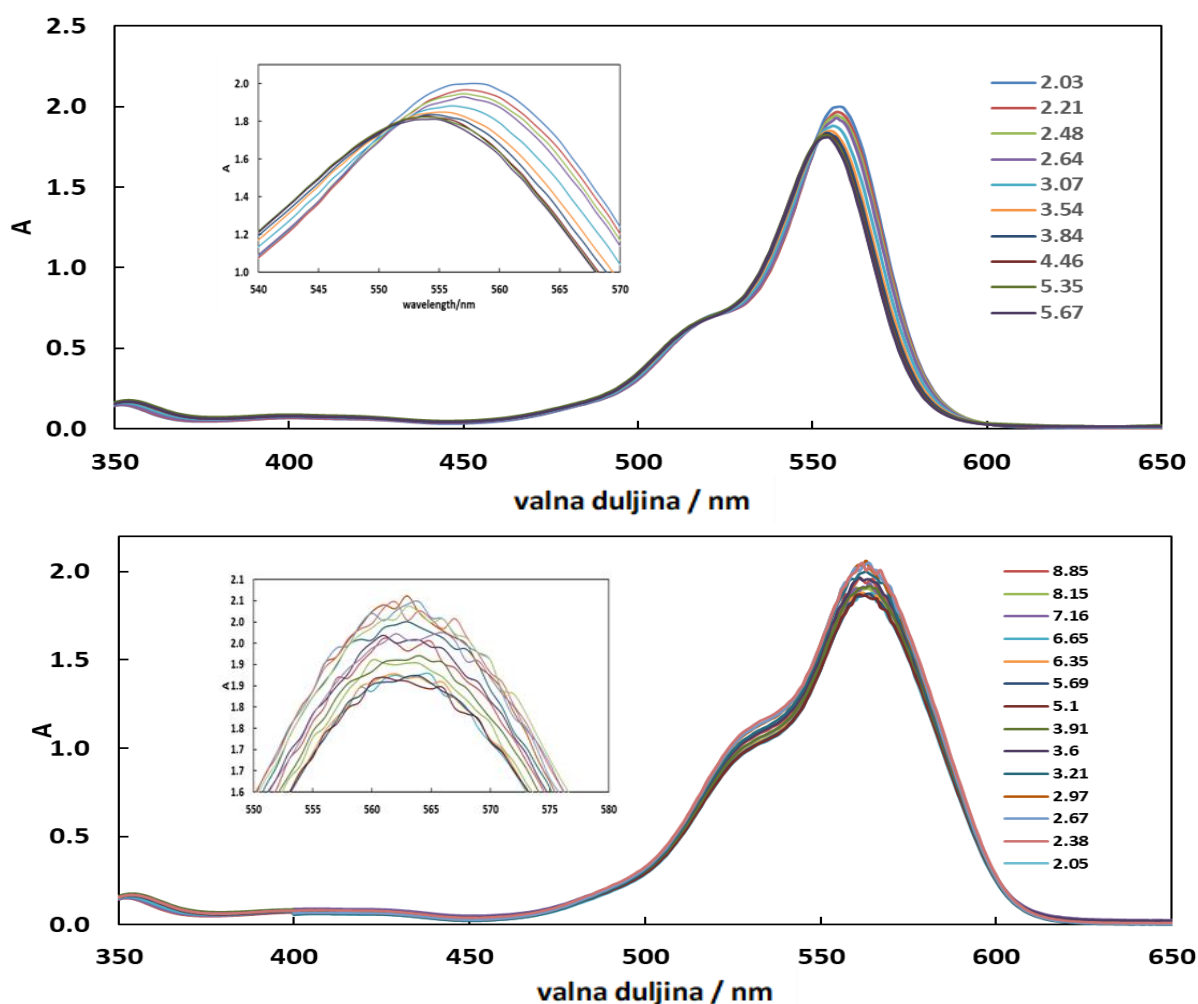
### 4.1. Spektrofotometrija u UV i vidljivom području

Samonakupljanje boja u vodenom mediju može imati značajan utjecaj na njihova elektronska stanja te interakciju s elektromagnetskim zračenjem koje je moguće proučavati tehnikom spektrofotometrije u UV/VIS području. S ciljem istraživanja razlike u elektronskim stanjima nosivih derivata i polaznih boja, snimljeni su apsorpcijski spektri u području valne duljine elektromagnetskog zračenja (EM) (350 – 650 nm) pri variranim pH vrijednostima oko  $pK_a$  vrijednosti polaznih spojeva (3,1 za RB i 11,4 za O2 [51,52]). U slikama 12 i 13 prikazani su redom UV/VIS spektri za rodamin B (**RB**) i boju **1** te orange-II (**O2**) i boju **2**.

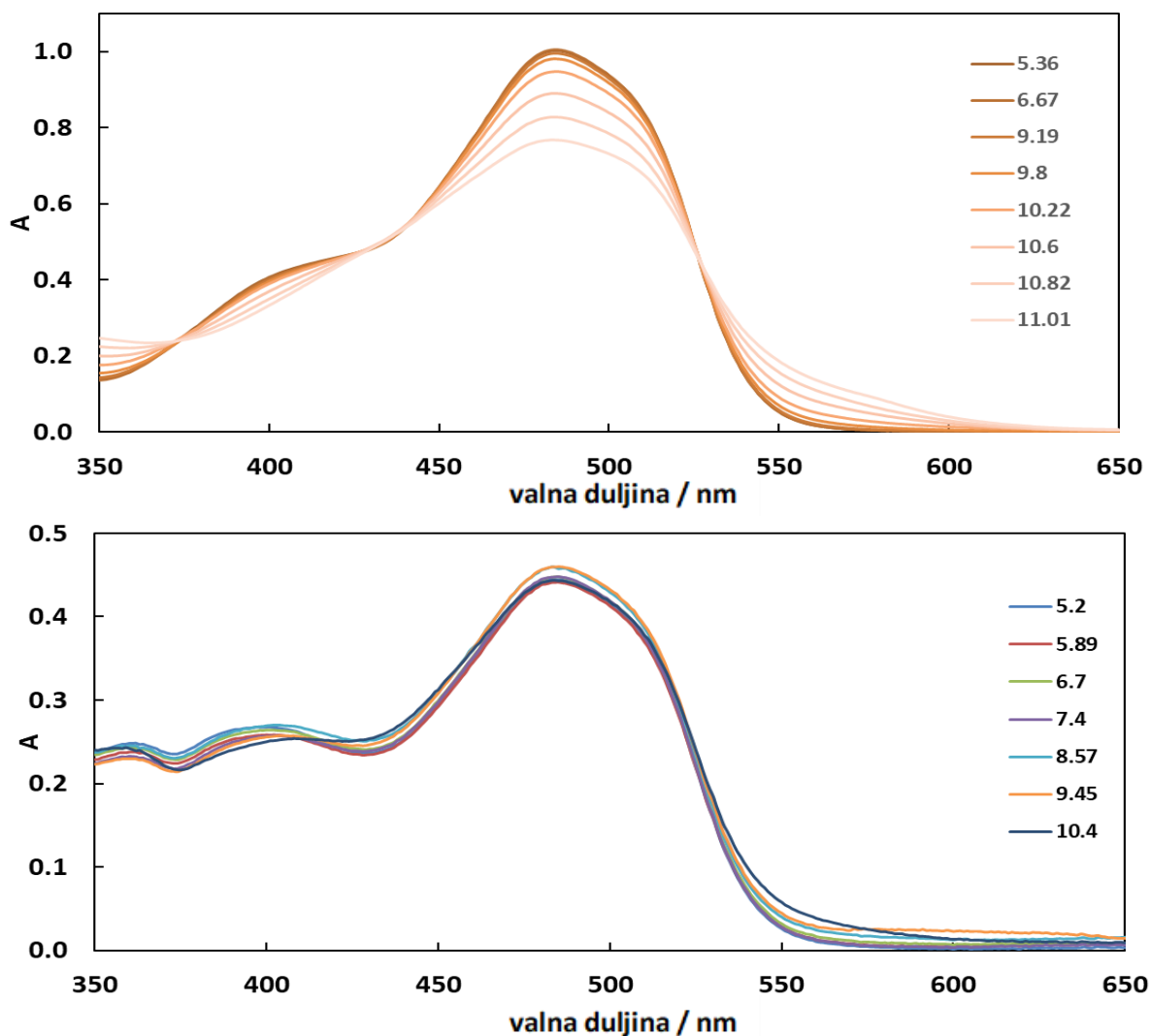
Apsorpcijski spektri za **RB** i boju **1** pokazuju maksimalne apsorbance pri valnim duljinama 560 nm i 350 nm uz pojavu ramena u području 520 – 540 nm. Usporedbom apsorpcijskih maksimuma za **RB** pri variranom pH, moguće je uočiti da deprotonacija slobodne karboksilne grupe rodamina B, pomiče  $\lambda_{max}$  prema kraćoj valnoj duljini (plavi pomak) te smanjuje apsorpcijski intenzitet. Spektar boje **1** pokazuje gotovo identičnu strukturu kao i za RB, no kod boje **1** više nije uočljiv trend apsorpcijskog maksimuma u ovisnosti o pH, već su vrijednosti maksimuma apsorbance nasumične odnosno ne ovise o pH otopine. Također, s obzirom da je spektar za boju **1** određen pri 10 puta većoj koncentraciji, moguće je uočiti smanjenje apsorpcijskog koeficijenta u cijelom području valne duljine u odnosu na polazni spoj.

Apsorpcijski spektar za **O2** pokazuje maksimalnu apsorbanu pri valnoj duljini oko 485 nm uz pojavu ramena u području 370 – 430 nm. Deprotonacijom slobodne hidroksilne skupine polazne boje, moguće je uočiti povećanje apsorpcijskog intenziteta u područjima valnih duljina 350-370 nm i 530 – 600 nm, odnosno smanjenje intenziteta u preostalom dijelu

spektra uz pojavu izozbestnih točaka (374 nm i 530 nm). Spektar za boju **2** pokazuje značajnu razliku u valnom području 350 – 450 nm gdje izostaje uzlazni trend spektra do postizanja  $\lambda_{\max}$ . Vezanjem alifatskog lanca nije više uočljiv trend ovisnosti intenziteta apsorpcije o pH u cijelom području valne duljine. Apsorpcijski spektri za boju 2 u cijelom području valnih duljina slični su spektru deprotonirane forme polazne boje O2. Također, budući da su spektri za oba spoja određeni pri istim koncentracijama, moguće je primijetiti smanjenje apsorpcijskog koeficijenta izuzev područja najnižih valnih duljina.



**Slika 12.** Apsorpcijski spektri u UV/VIS području valnih duljina EM zračenja izmjerenih za **RB** ( $c = 5 \times 10^{-6}$  M) (gore) i boju **1** ( $c = 5 \times 10^{-5}$  M) (dolje) pri ionskoj jakosti 10 mM (KCl) i variranim pH vrijednostima prikazanim na legendi te  $T=298,15$  K. Umetak prikazuje uvećani dio spektra oko  $\lambda_{\max}=560$  nm.

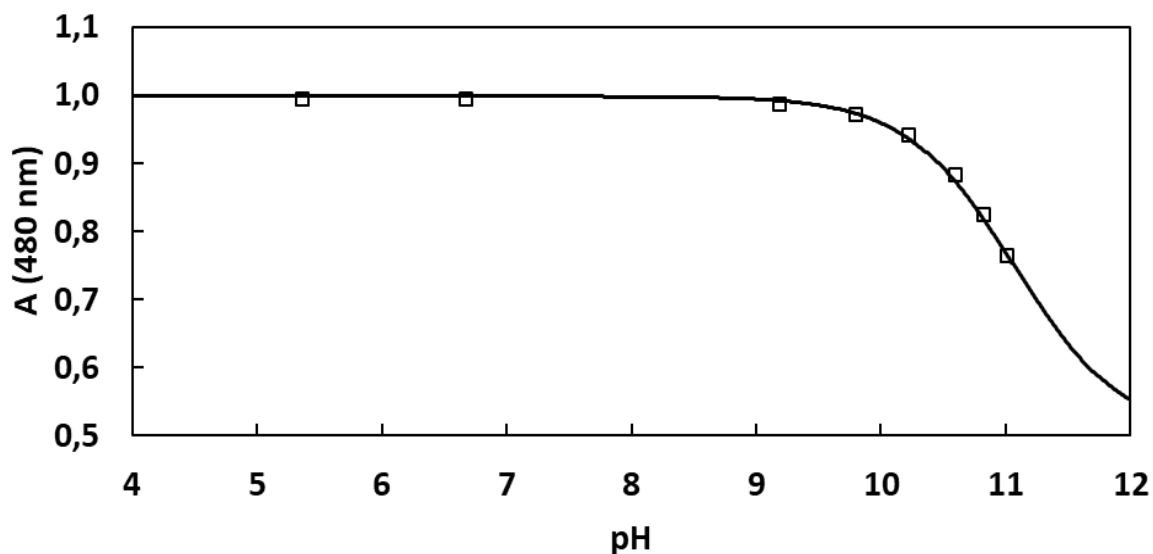


**Slika 13.** Apsorpcijski spektri u UV/VIS području valnih duljina EM zračenja izmjerenih za **O2** ( $c = 5 \times 10^{-5}$  M) (gore) i boju **2** ( $c = 5 \times 10^{-5}$  M) (dolje) pri ionskoj jakosti 10 mM (KCl) i variranim pH vrijednostima prikazanim na legendi te  $T=298,15$  K.

Na temelju izmjerenog apsorpcijskog spektra za orange II, eksperimentalno je određena krivulja deprotonacije te konstanta disocijacije ( $pK_a$ ) hidroksilne skupine prema modelu Henderson-Hasselbalchove jednadžbe za monoprotonsku kiselinu :

$$A = A_p - \frac{A_p - A_D}{10^{pK_a - pH} + 1} \quad (11)$$

Pritom  $A_D$  označava vrijednost apsorbance čiste deprotonirane forme te iznosi oko 0,5<sup>2</sup> dok je  $A_P$  apsorbance čiste protonirane forme. Najbolji opis eksperimentalnih podataka („fit“) dobiven je nelinearnom regresijom metodom najmanjih kvadrata za  $pK_a$  11,09<sup>3</sup>. Navedeni rezultati prikazani su u slici 14.



**Slika 14.** Ovisnost apsorbance pri 480 nm o pH otopine za orange II. Prazni kvadratići predstavljaju eksperimentalne vrijednosti apsorbance izmjerene pri 480 nm dok je titracijska krivulja (puna linija) dobivena fitanjem eksperimentalnih vrijednosti koristeći Henderson-Hasselbalch-ovu jednadžbu,  $pK_a=11,09$ .  $T=298,15$  K

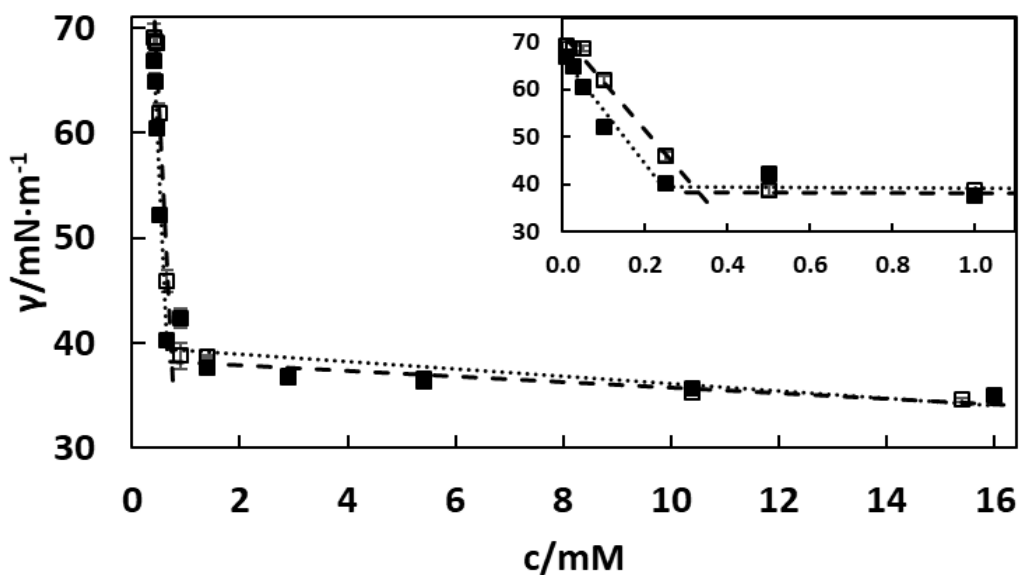
## 4.2. Mjerenje površinske napetosti i kritična koncentracija samonakupljanja

S ciljem istraživanja površinske aktivnosti amfifilnih derivata polaznih boja, izmjerene su površinske napetosti u ovisnosti o koncentraciji boja te pri variranim ionskim jakostima (KCl): 10 mM i 1 mM. Rezultati

<sup>2</sup> Ovaj podatak određen je kemometrijskim pristupom odnosno multivarijantnom regresijom iz eksperimentalnih spektara. S obzirom da se radi o doprinosu kolege Nine Požara te tematski izlazi iz okvira ovog rada, sam postupak nije prikazan.

<sup>3</sup> Za nelinearnu regresiju metodom najmanjih kvadrata korišten je MS EXCEL Solver

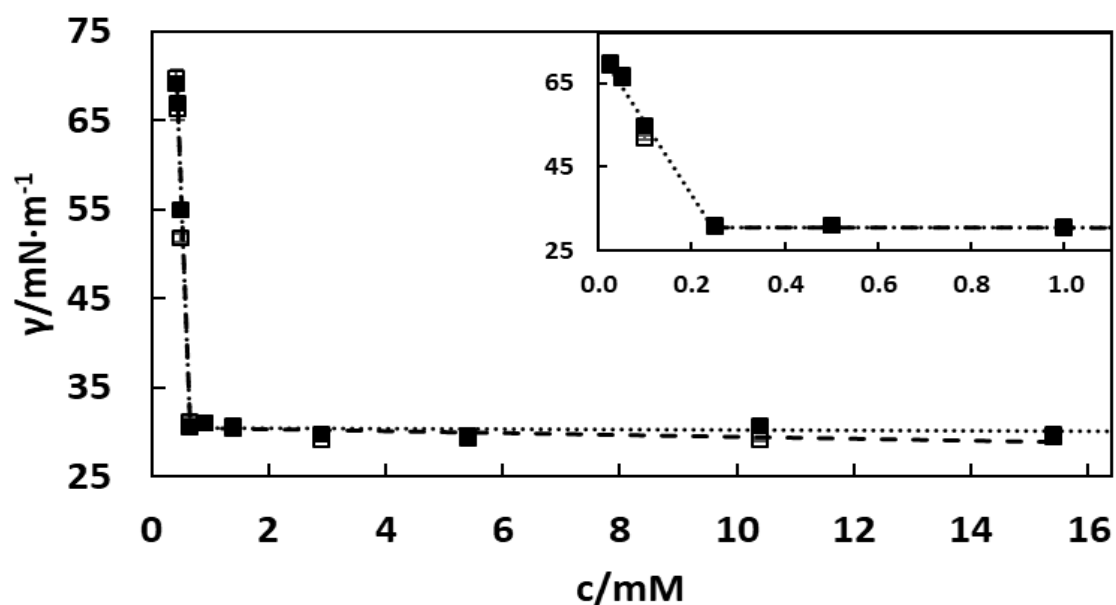
eksperimenta prikazani su u slici 15 (boja **1**) i 16 (boja **2**). Kod obiju boja moguće je uočiti da se povećanjem koncentracije, površinska napetost otopine inicijalno smanjuje te postaje konstantna oko vrijednosti 30  $\text{mNm}^{-1}$  uz karakterističan oštri pregib. Kritična koncentracija samonakupljanja (eng. *critical concentration of self-assembly, CC*<sup>4</sup>) za proučavane amfifilne boje određena je kao sjecište dvaju ekstrapoliranih pravaca za obje ionske jakosti. Kod boje **1**, kritična koncentracija iznosi 0,25 mM pri višoj ionskoj jakosti dok je pri nižoj ta vrijednost veća ( $CC=0,33$  mM). Za boju **2** CC vrijednosti iznose 0,25 mM za obje ionske jakosti. Vrijednosti kritičnih koncentracija pri različitim ionskim jakostima za obje boje prikazani su u tablici 2.



**Slika 15.** Ovisnost površinske napetosti o koncentraciji za boju **1** pri variranim ionskim jakostima (KCl): (▪) 10 mM; (◻) 1 mM, pH=3,5 te  $T=298,15$  K. Umetak prikazuje uvećani dio grafa pri nižim koncentracijama. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

<sup>4</sup> Ova veličina se literaturno poistovjećuje s CMC, međutim u ovom radu je odabrana da se naglasi kako se radi o micelizaciji, već o drugoj vrsti asocijacije





**Slika 16.** Ovisnost površinske napetosti o koncentraciji za boju **2** pri variranim ionskim jakostima (KCl): (▪) 10 mM; (◻) 1 mM, pH=5,5 te  $T=298,15$  K. Umetak prikazuje uvećani dio grafa pri nižim koncentracijama. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

**Tablica 2.** Prikaz kritičnih koncentracija samonakupljanja za boju 1 i 2 pri variranim ionskim jakostima, pH=3,5 (boja 1), 5,5 (boja 2) te  $T=298,15$  K.

$I / \text{mM}$	$CC / \text{mM}$	
	boja <b>1</b>	boja <b>2</b>
1	0,33	0,25
10	0,25	0,25

### 4.3. Mjerenje dinamičkog raspršenja svjetla i elektroforetske pokretljivosti

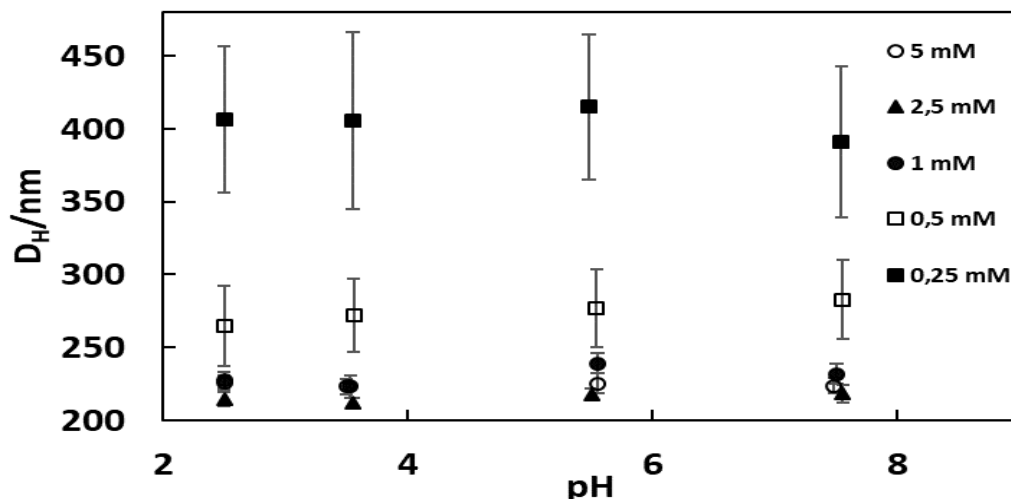
S ciljem istraživanja dosega procesa samonakupljanja amfifilnih boja, primijenjena je tehnika dinamičkog raspršenja svjetla (DLS). Određena je ovisnost izmjerene raspodjele vezikula<sup>5</sup> po promjeru, o koncentraciji dodanih novosintetiziranih surfaktanata. S ciljem utvrđivanja stabilnosti, DLS eksperiment je ponovljen pri istim uvjetima nakon 2 tjedna. Također, s ciljem određivanja elektrostatskog naboja na površini čestica, izmjerena je ovisnost elektroforetske pokretljivosti o ukupnoj koncentraciji surfaktanata u sustavu.

Srednja vrijednost promjera čestica i polidisperznost<sup>6</sup> u ovisnosti o pH u koncentracijskom rasponu iznad  $CC$  (u rasponu 0,25 – 5 mM) te pri ionskoj jakosti ( $I=10$  mM) su prikazani u slikama 17 i 18 (uzorak boje **1**) te 19 i 20 (uzorak boje **2**). Kod boje **1** sve vrijednosti hidrodinamičkog promjera pri variranim pH nalaze se unutar raspona od 50 nm, dok ta razlika kod boje **2** iznosi oko 20 nm. Također se niti vrijednosti polidisperznosti za boju **1** (slika 18) ne razlikuju promjenom pH vrijednosti suspenzije te se nalaze unutar raspona od 0,1. Slični rezultati su dobiveni i za boju **2** (slika 20).

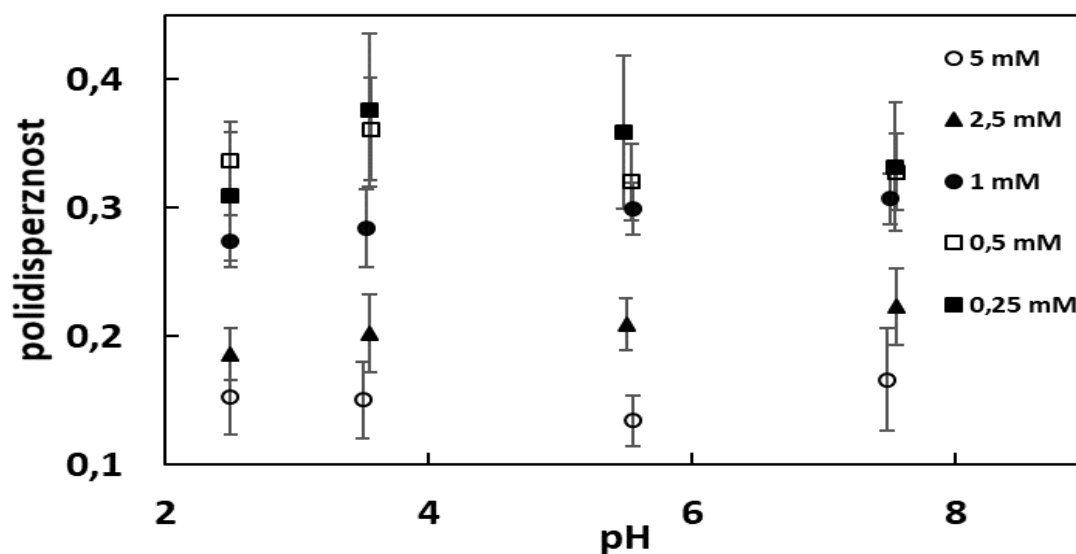
---

<sup>5</sup> Napomena: u čitavom prikazu rezultata koristit će se pojam vezikula

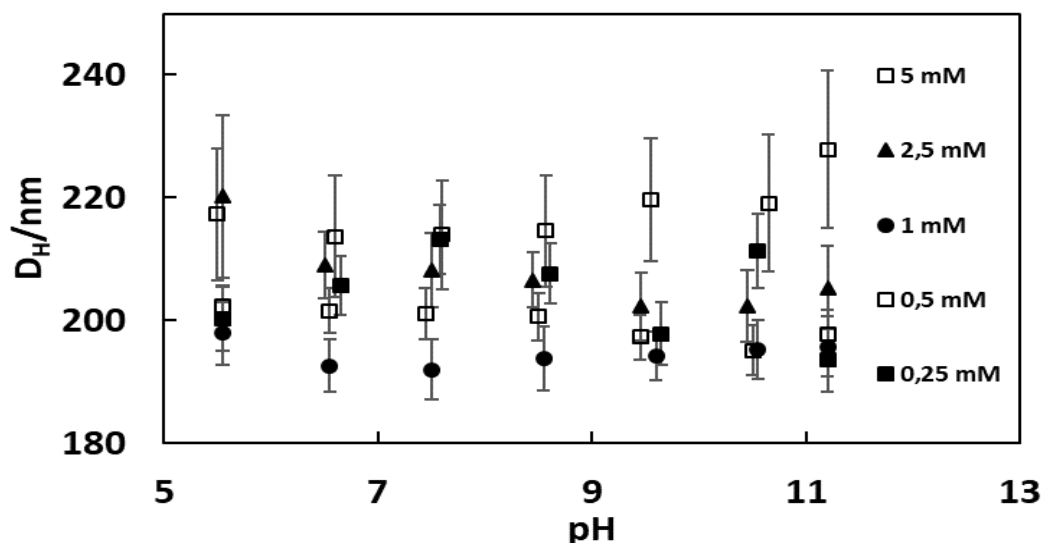
<sup>6</sup> Po definiciji, indeks polidisperznosti je kvadrat omjera standardne devijacije i srednje vrijednosti hidrodinamičkog promjera dobivenih DLS mjerenjem



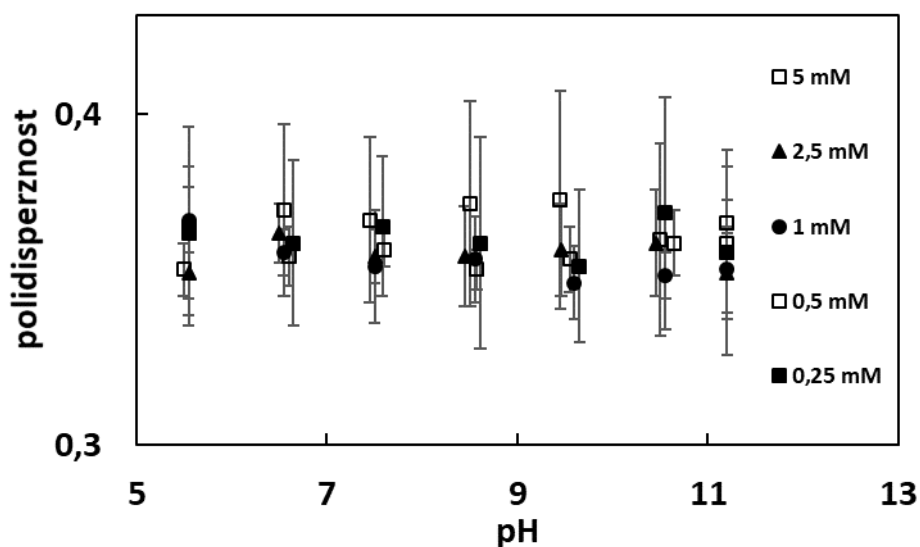
**Slika 17.** Hidrodinamički promjer ( $D_H$ ) vezikula boje **1** u ovisnosti o pH otopine, izmjereno tehnikom DLS pri različitim koncentracijama (prikazano na legendi) i ionskoj jakosti (KCl) 10 mM. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.  $T=298,15$  K



**Slika 18.** Polidisperznost vezikula boje **1** u ovisnosti o pH otopine, izmjerena tehnikom DLS pri različitim koncentracijama (prikazano na legendi) i ionskoj jakosti (KCl) 10 mM. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.  $T=298,15$  K



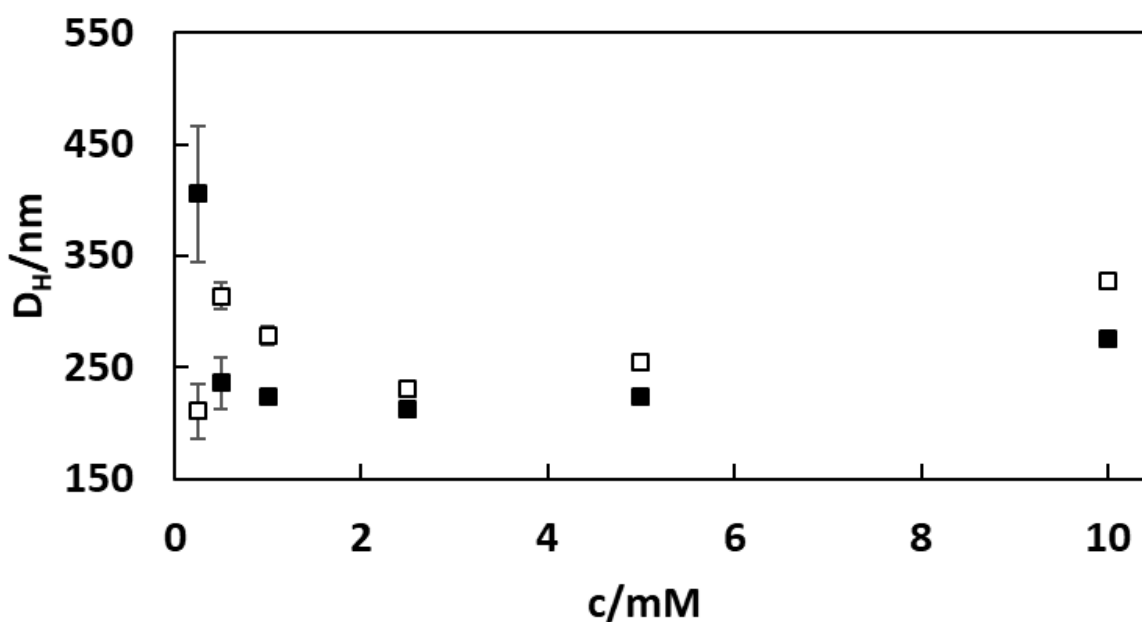
**Slika 19.** Hidrodinamički promjer ( $D_H$ ) vezikula boje **2** u ovisnosti o pH otopine, izmjeren tehnikom DLS pri različitim koncentracijama (prikazano na legendi) i ionskoj jakosti (KCl) 10 mM. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.  $T=298,15$  K



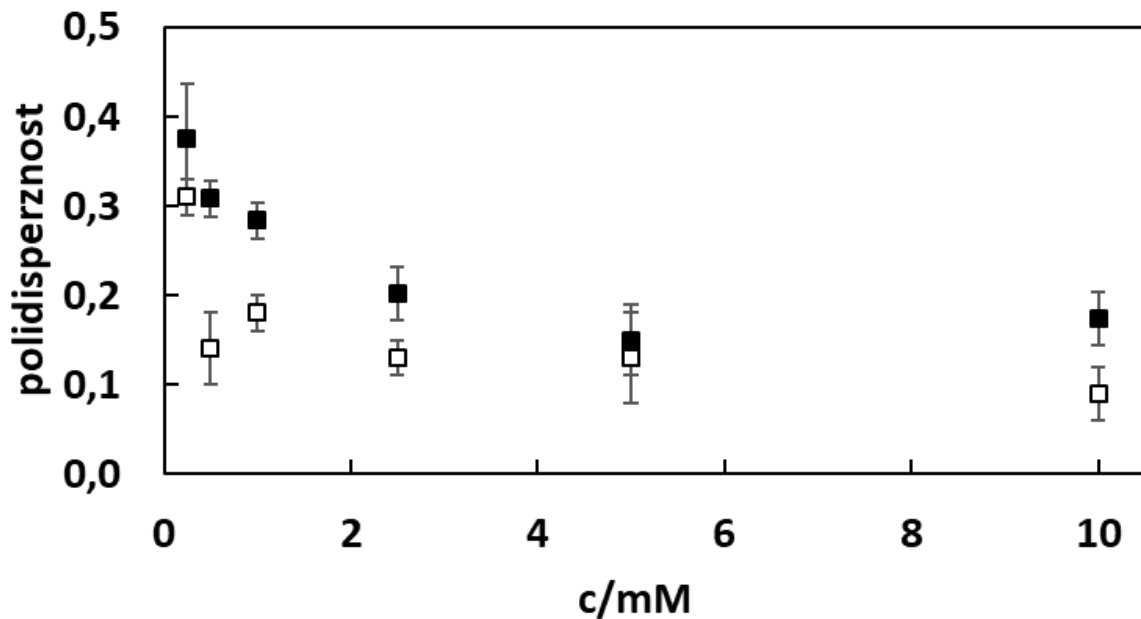
**Slika 20.** Polidisperznost vezikula boje **2** u ovisnosti o pH otopine, izmjerena tehnikom DLS pri različitim koncentracijama (prikazano na legendi) i ionskoj jakosti (KCl) 10 mM. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.  $T=298,15$  K

U nastavku su prikazani rezultati mjerenja DLS tehnikom pri točno određenoj pH vrijednosti vodene otopine boje **1** i boje **2**, u ovisnosti o koncentraciji i ionskoj jakosti. Ti rezultati su izdvojeni iz gore prikazanih

podataka. U slikama 21 i 22 prikazani su hidrodinamički promjer vezikula i polidisperznost za boju **1**, izmjereni odmah, odnosno dva tjedna nakon dispergiranja pri većoj ionskoj jakosti (10 mM KCl), pH=3,5 i  $T=298,15$  K. Promjer vezikula izmjeren odmah nakon priprave uzoraka nalazi se u rasponu od 200 do 250 nm izuzev pri najnižoj koncentraciji gdje on iznosi oko 400 nm i gdje je odstupanje podataka najveće. Nakon 2 tjedna, veličina vezikula je veća za ili manje od 50 nm, osim pri najnižoj koncentraciji gdje je izmjerena veličina manja od 250 nm. Ovisnost polidisperznosti vezikula kako o vremenu tako i koncentraciji pokazuje silazni trend. Nakon dva tjedna vezikule u otopinama postaju uniformnije s vrijednošću  $PDI < 0,2$  pri čemu je jedina iznimka vrijednost izmjerena pri najnižoj koncentraciji (0,25 mM).

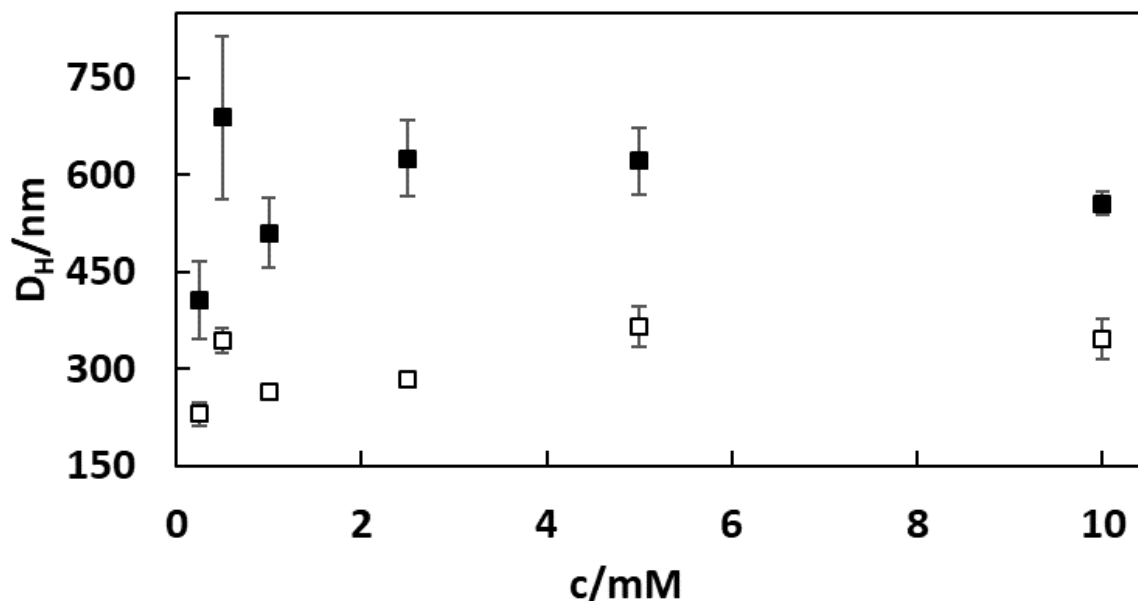


**Slika 21.** Hidrodinamički promjer ( $D_H$ ) vezikula boje **1** u ovisnosti o koncentraciji izmjeren tehnikom DLS odmah nakon priprave uzorka (•) te nakon 2 tjedna (◻) pri ionskoj jakosti (KCl) 10 mM, pH=3,5 i  $T=298,15$  K. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

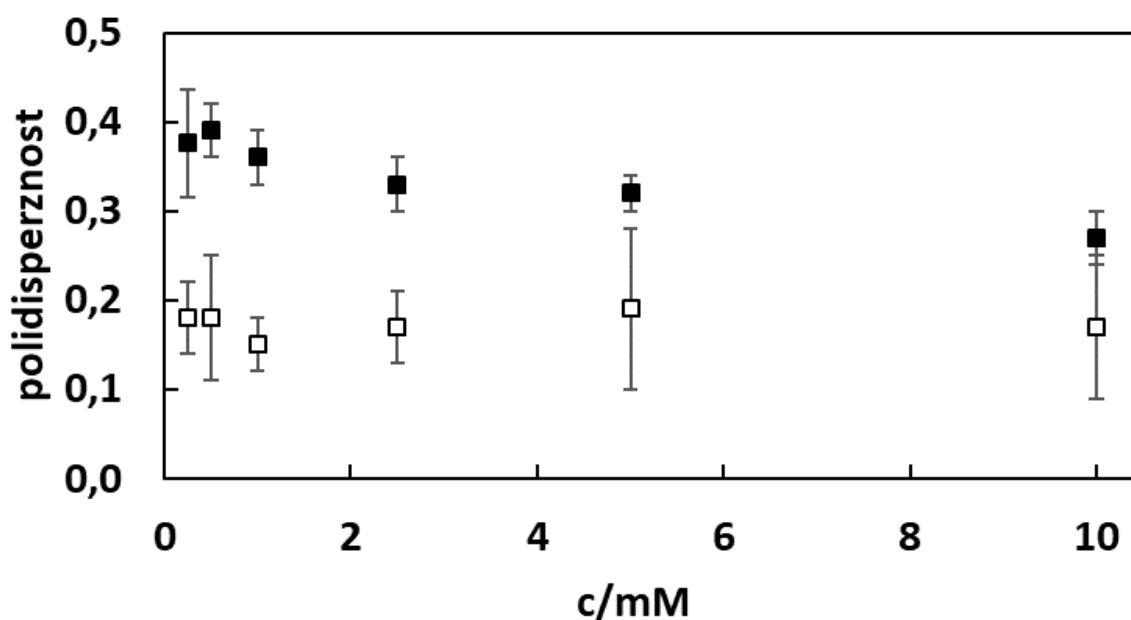


**Slika 22.** Polidisperznost vezikula boje **1** u ovisnosti o koncentraciji izmjerena tehnikom DLS odmah nakon pripreve uzorka (▪) te nakon 2 tjedna (◻) pri ionskoj jakosti (KCl) 10 mM, pH=3,5 i  $T=298,15$  K. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

U slikama 23 i 24 prikazani su rezultati promjera i polidisperznosti za istu boju izmjerenih pri nižoj ionskoj jakosti (1 mM), pH=3,5 i  $T=298,15$  K, odmah nakon pripreve uzorka te nakon dva tjedna. Na početku miješanja veličina vezikula je u rasponu od 350 do 550 nm te postiže maksimalnu vrijednost (700 nm) pri koncentraciji boje 0,5 mM uz najveći rasap podataka. Nakon dva tjedna promjer se smanjuje u čitavom koncentracijskom rasponu, a razlika je izraženija nego pri višoj ionskoj jakosti te iznosi  $\geq 200$  nm. Polidisperznost se također smanjuje s vremenom pa vrijednost nakon dva tjedna iznosi oko 0,2. Dodatno, koncentracijski trend polidisperznosti prisutan odmah po dispergiranju boje **1** više nije uočljiv nakon 2 tjedna.

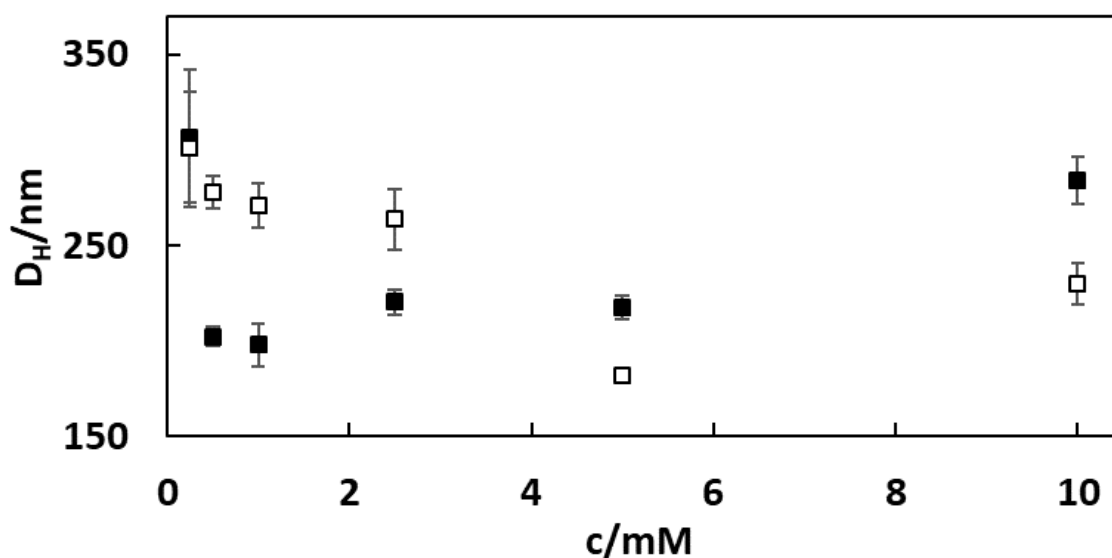


**Slika 23.** Hidrodinamički promjer ( $D_H$ ) vezikula boje **1** u ovisnosti o koncentraciji, izmjeren tehnikom DLS odmah nakon pripreve uzorka (▪) te nakon 2 tjedna (◻) pri ionskoj jakosti (KCl) 1 mM, pH=3,5 i  $T=298,15$  K. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.



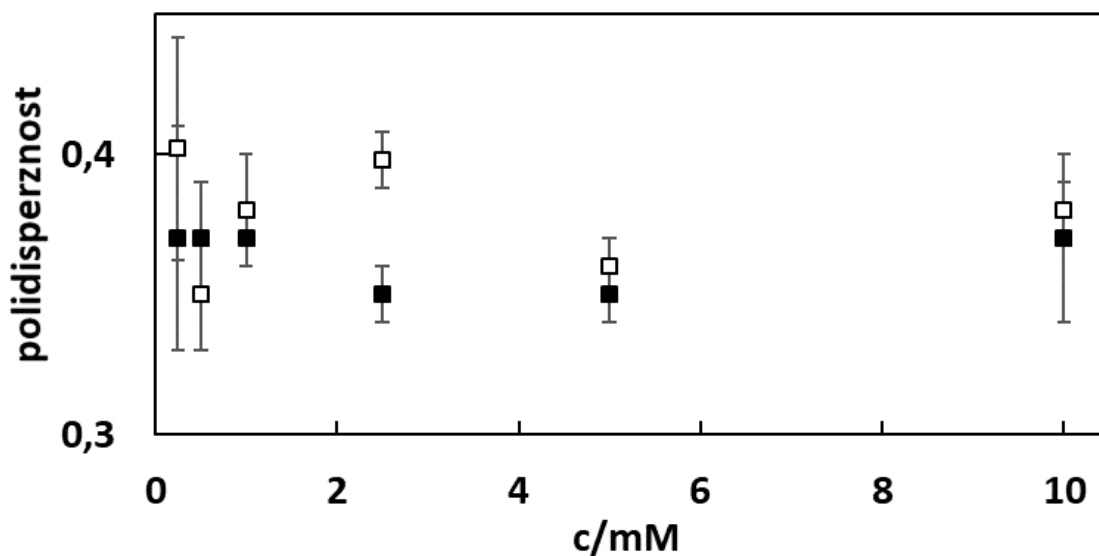
**Slika 24.** Polidisperznost vezikula boje **1** u ovisnosti o koncentraciji, izmjerena tehnikom DLS odmah nakon pripreve uzorka (▪) tenakon 2 tjedna (◻) pri ionskoj jakosti (KCl) 1 mM, pH=3,5 i  $T=298,15$  K. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

Promjeri vezikula i polidisperznost za boju **2**, prikazani su u slikama 25, odnosno 26 za višu ionsku jakost (10 mM) te 27, odnosno 28 za nižu ionsku jakost (1 mM). Odmah nakon dispergiranja boje promjer iznosi oko 200 nm, s tim da su veće vrijednosti (oko 300 nm) izmjerene pri najvišoj i najnižoj koncentraciji boje (10 mM i 0,25 mM) gdje je preciznost podataka manja. Nakon dva tjedna, moguće je uočiti promjenu promjera za  $\geq 50$  nm. Najveća vrijednost (oko 300 nm) je izmjerena pri najnižoj koncentraciji (0,25 mM) uz najveće odstupanje podataka te se gotovo podudara s vrijednošću izmjerenom odmah nakon pripreve uzorka. Polidisperznost u oba slučaja (slika 26) se kreće unutar raspona  $0,35 < \text{PDI} < 0,40$  dok razlika u odnosu na vrijeme mjerenja iznosi manje od 0,1. Veća odstupanja polidisperznosti zabilježena su pri najnižoj i najvišoj koncentraciji što korelira s veličinom vezikula.



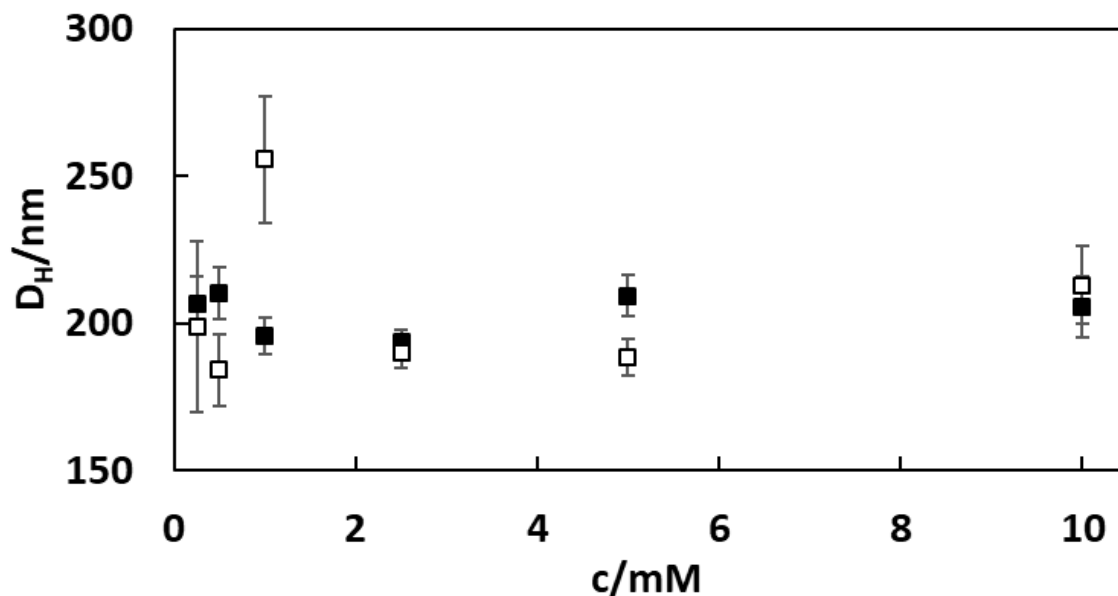
**Slika 25.** Hidrodinamički promjer ( $D_H$ ) vezikula boje **2** u ovisnosti o koncentraciji, izmjeren tehnikom DLS odmah nakon pripreve uzorka (•) te nakon 2 tjedna (◻) pri ionskoj jakosti (KCl) 10 mM, pH=5,5 i  $T=298,15$  K. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.



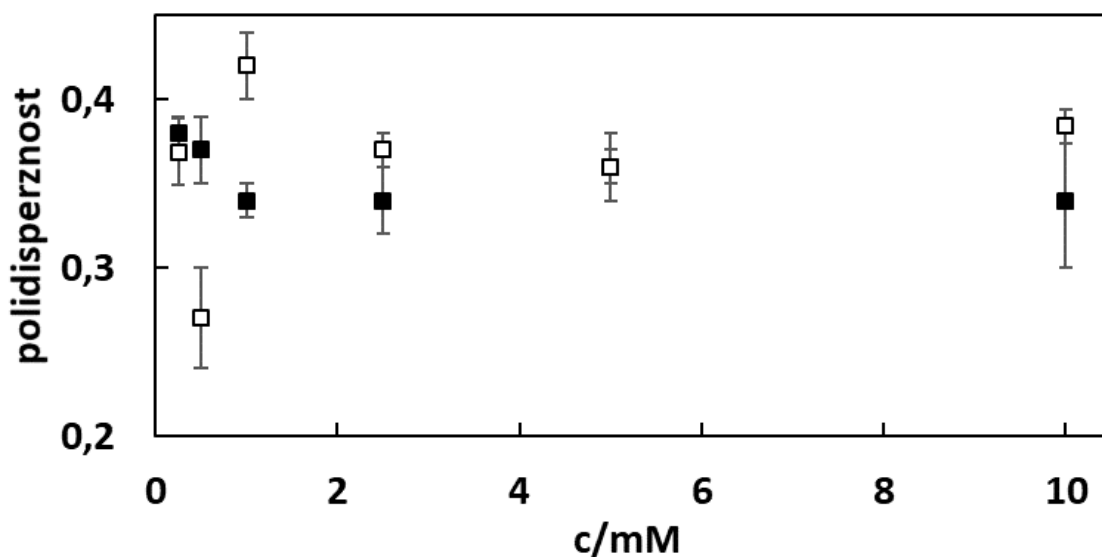


**Slika 26.** Polidisperznost vezikula boje **2** u ovisnosti o koncentraciji, izmjerena tehnikom DLS odmah nakon pripreve uzorka (•) te nakon 2 tjedna (◻) pri ionskoj jakosti (KCl) 10 mM, pH=5,5 i  $T=298,15$  K. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

Pri nižoj ionskoj jakosti (1 mM, slika 27) promjer vezikula poprima vrijednost oko 200 nm kao i pri višoj ionskoj jakosti, međutim vremenski trend više nije uočljiv. Najveće odstupanje moguće je uočiti kod podatka izmjenjenog pri koncentraciji boje 1 mM gdje je promjer vezikula bitno veći za oko 50 nm od ostalih izmjerenih vrijednosti. Polidisperznost agregata (slika 28) kreće se u rasponu  $0,35 < PDI < 0,40$  pri čemu su odstupanja od prosjeka za podatke izmjerene dva tjedna nakon pripreve uzorka, najveća pri nižim koncentracijama boje **2**.



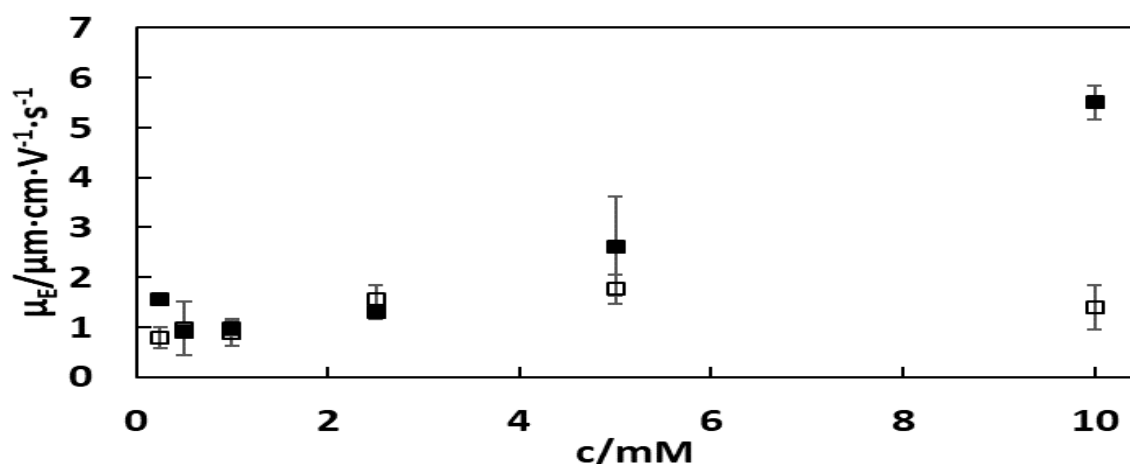
**Slika 27.** Hidrodinamički promjer ( $D_H$ ) vezikula boje **2** u ovisnosti o koncentraciji, izmjeren tehnikom DLS odmah nakon pripreme uzorka (▪) te nakon 2 tjedna (◻) pri ionskoj jakosti (KCl) 1 mM, pH=5,5 i  $T=298,15$  K. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.



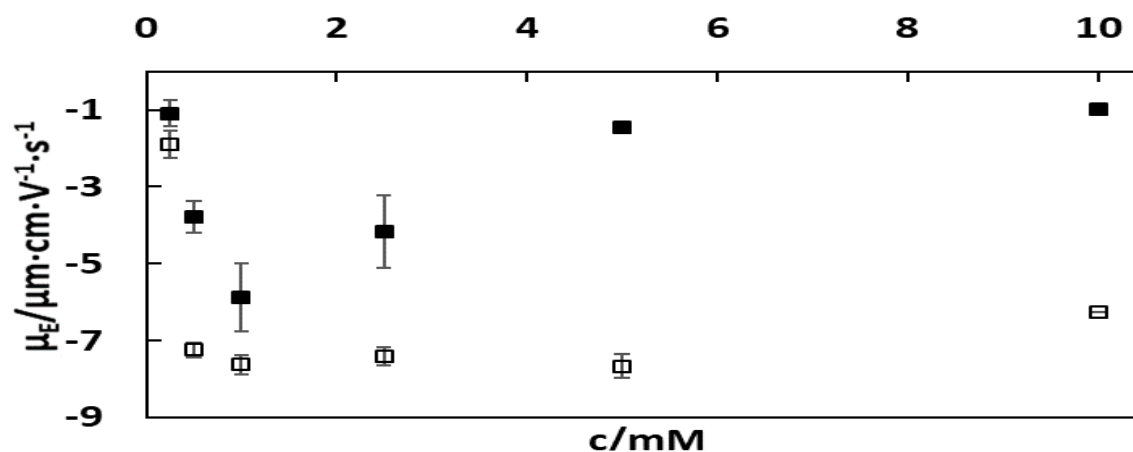
**Slika 28.** Polidisperznost vezikula boje **2** u ovisnosti o koncentraciji, izmjerena tehnikom DLS odmah nakon pripreme uzorka (▪) te nakon 2 tjedna (◻) pri ionskoj jakosti (KCl) 1 mM, pH=5,5 i  $T=298,15$  K. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina 15 ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

Rezultati mjerenja ovisnosti elektroforetske pokretljivosti za boju **1** o koncentraciji pri variranim ionskim jakostima,  $\text{pH}=3,5$  i  $T=298,15$  K prikazani su u slici 29. Izmjerene su pozitivne vrijednosti elektroforetske pokretljivosti pri objema ionskim jakostima. Pri višoj ionskoj jakosti, povećanjem koncentracije boje elektroforetska pokretljivost pokazuje uzlazni trend do postizanja maksimalne vrijednosti od  $5 \mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Smanjenjem ionske jakosti elektroforetska pokretljivost poprima niže vrijednosti između  $1$  i  $2 \mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , s manjom raspršenosti podataka izmjerenih pri konstantnoj koncentraciji te manjom varijancom prilikom promjene koncentracije.

Boja **2** formira vezikule za koje su izmjerene negativne vrijednosti elektroforetske pokretljivosti (slika 30). U ovisnosti o koncentraciji, pri višoj ionskoj jakosti ( $10$  mM) moguće je uočiti različite trendove podataka, s izraženim minimumom  $\mu_E$  pri  $c(\text{boja } \mathbf{2})=1$  mM. Smanjenjem ionske jakosti na  $1$  mM, elektroforetska pokretljivost poprima veće negativne vrijednosti  $\mu_E \approx -8 \mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Veći rasap podataka izmjerenih pri konstantnoj koncentraciji uočljiv je pri većoj ionskoj jakosti.



**Slika 29.** Elektroforetska pokretljivost za boju **1** u ovisnosti o koncentraciji, izmjerena tehnikom PALS pri variranim ionskim jakostima (KCl): ( $\blacksquare$ )  $10$  mM; ( $\square$ )  $1$  mM,  $\text{pH}=3,5$  i  $T=298,15$  K. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.



**Slika 30.** Elektroforetska pokretljivost za boju **2** u ovisnosti o koncentraciji, izmjerena tehnikom PALS pri variranim ionskim jakostima (KCl): (▪) 10 mM; (◻) 1 mM, pH=5,5 i  $T=298,15$  K. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ponovljenih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

## 5. RASPRAVA

Jednostavnim reakcijama nukleofilne supstitucije sintetizirani su amfifilni derivati organskih boja Rodamina B i Orange-II uvođenjem alkilnog, hidrofobnog lanca 12 C-atoma. S ciljem istraživanja moguće primjene tih sustava izmjerena su njihova koloidna svojstva, tj. tip, veličina i stabilnost samonakupljenih vezikula, u ovisnosti o ionskim uvjetima u vodenom mediju. Rezultati provedenih eksperimenata će u ovom poglavlju biti sagledani u svjetlu odnosa naboj-struktura samonakupljenih amfifila. Također, izmjereni rezultati omogućuju raspravu primjenjivosti i dosega fizikalno-kemijskih mjernih tehnika korištenih u ovom radu, za karakterizaciju prikazanih sustava te kvantitativno praćenje veličina određenih procesom samoudruživanja, kao što su raspodjela agregata po veličinama te površinska napetost na granici faza voda/zrak.

Jedna od posljedica samonakupljanja boja je promjena njihovih elektronskih stanja koja se očituju u cijepanju spektralnih vrpca u UV/VIS području spektra, njihovim energetske pomacima te promjeni intenziteta [38]. Provedena su mnoga istraživanja koja su navedene promjene pripisala pojavi različitih agregata boja i njihovih intermedijera [38,41,53,54]. Kako bi ispitali spektroskopska svojstva nosintetiziranih spojeva, usporedili smo njihove apsorpcijske spektre sa spektrima polaznih boja pri variranim pH vrijednostima. U slikama 12 i 13 uočava se nekoliko promjena u elektronskom spektru nakon vezanja alkilnih lanaca. Variranjem pH vrijednosti suspenzija dolazi do pomaka apsorpcijskih vrpca za rodamin B i orange-II uz pojavu izozbestnih točaka za potonju boju. Rodamin B ima slobodnu karboksilnu skupinu čija ionizacija dovodi do pomaka apsorpcijskog maksimuma po energiji, tj. valnoj duljini uz istovremenu promjenu intenziteta apsorpcije. Dakle, povećanjem pH vrijednosti dolazi do hipokromnog efekta i hipsokromnog pomaka [55]. Istovremeno, ne uočava se značajno cijepanje vrpce i pojave više valnih duljina maksimalne apsorpcije što bi ukazivalo na stvaranje dimera ili agregata viših struktura kao što su zabilježili Selwyn i suradnici za slične

spojeve [56]. Vežanjem lanca na rodamin B iščezavaju spomenuti hipokromni i hipsokromni pomaci, a uočavaju se vrijednosti maksimuma apsorpcije neovisne o pH unutar preciznosti mjerenja, što uz NMR spektar, dodatno potvrđuje uspješnost vežanja lanca na karboksilnu skupinu i stvaranje estera. Kod orange-II, povećanjem pH vrijednosti primjetan je jedino hipokromni efekt, a promjena spektra može se pripisati deprotonaciji slobodne hidroksilne skupine, za koji je određena termodinamička konstanta disocijacije  $pK_a=11,09$ . Ta vrijednost ponešto odstupa od jedine koja je pronađena u literaturi te iznosi 11,4 [52], no moguće je zaključiti da kiselinsko-bazna svojstva ove boje još uvijek nisu u potpunosti istražena. Jedan od razloga za to je i relativno visoka vrijednost  $pK_a$ , zbog čega je podešavanje pH vrijednosti suspenzija na dovoljno visoke vrijednosti da bi došlo do potpune deprotonacije spoja nemoguće bez značajne promjene ionske jakosti otopine. Iz istog razloga je nemoguće mjeriti kalibracijski spektar za potpuno deprotoniranu formu, što bitno utječe na pouzdanost određivanja  $pK_a$  iz spektrofotometrijskih podataka. U ovom radu je za određivanje apsorbanca potpuno deprotonirane forme pri  $\lambda_{max}=480$  nm korištena vrijednost izračunata multivarijatnom regresijom (ljubaznošću kolege Nine Požara), što znatano poboljšava pouzdanost gore navedene vrijednosti  $pK_a$ . Kao i kod amfifilnog derivata rodamina, derivat orange-II boje ne pokazuje ovisnost UV/VIS spektra o pH suspenzije, ali se u odnosu na apsorpcijski maksimum pojavljuje hiperkromni pomak u valnom području 350-450 nm. Mogući uzrok ovog pomaka je elastično (Rayleigh-evo) raspršenje karakteristično za suspenzije nanočestica. Uspoređujući izmjerene apsorbanca za obje amfifilne boje s onima za izvorne spojeve u cijelom području spektra, uočavamo hipokromni efekt. Moguće objašnjenje ovog opažanja je da dolazi do gašenja apsorpcije elektromagnetskog zračenja (tzv. *quenching*) zbog mogućnosti prijenosa elektrona ili parcijalnog naboja s jedne glave molekule na drugu [36,57].

Kako bi se ispitala površinska aktivnost sintetiziranih amfifila provedena su mjerenja površinske napetosti. Prema rezultatima prikazanim

u slikama 3 i 4 primjetno je značajno smanjenje površinske napetosti povećanjem koncentracije sintetiziranih spojeva što ukazuje na činjenicu da dolazi do adsorpcije ispitivanih amfifilnih boja na međupovršinu voda-zrak. Navedeni trend je prisutan pri vrlo niskim koncentracijama spojeva, dok je pri višim koncentracijama površinska napetost konstantna. U tablici 2. su navedene kritične koncentracije asocijacije (CC), koje su vrlo oštro izražene u izmjerenim podacima za oba spoja. Oštro izražena CC pokazuje dobro definiran agregacijski broj (u slučaju dvosloja on označava broj unimera po volumenu dvosloja), termodinamičku stabilnost vezikula ali i odsutnost nečistoća u uzorcima jer one narušavaju strukturu agregata i ravnotežu agregacije [58,59]. Za ionske surfaktante je očekivano sniženje kritične koncentracije s povećanjem koncentracije soli zbog efekta zasjenjenja odbojnih elektrostatskih interakcija među glavama [60,61]. Taj efekt je uočen kod boje **1**, no vrijednosti kritičnih koncentracija za boju **2** ne pokazuju ovisnost o ionskoj jakosti. Stoga je moguće zaključiti da za boju **2** elektrostatske interakcije glava ne predstavljaju dominantan doprinos Gibbs-ovoj energiji asocijacije, već je to hidrofobno privlačenje repova, što će biti od važnosti u daljnjoj diskusiji uočenih trendova u izmjerenim podacima.

Za određivanje raspodjele samonakupina po veličini, primijenjena je tehnika dinamičkog raspršenja svjetla, DLS. Rezultati tog eksperimenta potkrjepljuju gore navedene zaključke izvedene iz uočenih promjena u spektrima. Budući da izmjereni promjer agregata za obje boje iznosi  $\geq 200$  nm, prema podacima iz literature moguće je pretpostaviti da ispitivane amfifilne boje u vodenom mediju formiraju unilamelarne vezikule (liposome) [15,62]. Svakako, ovu pretpostavku bi trebalo provjeriti tehnikama koje pružaju direktnu informaciju o obliku i veličini čestica poput krioskopske transmisijske elektronske mikroskopije (krio-TEM) ili eventualno *in-situ* mikroskopije atomske sile (*in-situ* AFM).

Kod boje **1**, usporedbom srednjeg promjera pri ionskim jakostima 1 mM i 10 mM izmjerenom odmah po nastanku disperzije, moguće je uočiti

povećanje promjera vezikula smanjenjem ionske jakosti (KCl) (slike 21 i 23, ispunjeni simboli), koje je također praćeno porastom polidisperznosti. Potonje se u literaturi smatra posljedicom agregacije koloidnih čestica [16]. Ukoliko pretpostavimo model po kojem veće vezikule nastaju od manjih fuzijom u procesu limitiranom agregacijom, trend povećanja promjera pri nižoj ionskoj jakosti suprotan je od očekivanja, s obzirom da prema DLVO teoriji, sniženje ionske jakosti vodi k većem elektrostatskom odbijanju nanočestica [3,6]. Ipak, Claessens i suradnici su uočeni efekt objasnili tako da se početno smanjenje veličine vezikule s povećanjem koncentracije soli može pripisati kompresiji električkog dvosloja na površini koje vodi k smanjenju modula elastičnosti [17,63]. Taj efekt soli uočen je za zwitterionske fosfolipide. U slučaju boja **1** i **2** vjerojatno dolazi do još većeg efekta jer one imaju kationsku odnosno anionsku glavu. Dodatno treba uzeti u obzir i da su Cl<sup>-</sup> više hidratirani od ostalih aniona te zbog tog njihova akumulacija na površini vodi dehidrataciji membrana, što također utječe na povećanje modula elastičnosti [64]. Sabin i suradnici predložili su još jedan model utjecaja ionske jakosti, prema kojem njenim povećanjem u mediju, na membrani nastaje osmotski tlak zbog kojeg liposomi gube vodu te im se smanjuje veličina [63].

Tijekom skladištenja liposomne disperzije može doći do promjene u veličini zbog agregacije ili fuzije vezikula [17]. Usporedbom promjera izmjerenih za boju **1** dva tjedna nakon pripreme uzorka (slike 21 i 23, prazni simboli), uočavamo da veličina vezikule prestaje ovisiti o koncentraciji prisutne soli. Međutim uočeno smanjenje promjera u odnosu na početnu vrijednost izraženije je pri nižoj ionskoj jakosti, što ukazuje na činjenicu da su elektrostatske interakcije važne za dinamiku postizanja ravnotežnog stanja. Ipak, iz prethodne diskusije utjecaja ionske jakosti na CC, ta dinamika nije uvjetovana agregacijom već interakcijama unimera u dvosloju i njihovom topljivošću u vodenoj fazi (vidi dolje).

Sljedeći uočeni efekt je koncentracijska ovisnost veličine vezikula. Pri višim koncentracijama amfifila, promjer ostaje konstantan ili se blago



povećava (slika 5) dok se pri nižim koncentracijama uočava maksimalni promjer vezikule. Istražujući strukture koje tvore anionski i kationski surfaktanti u smjesi tvoreći "katantionske" micelle ili vezikule, Bergström i suradnici uočili su porast veličina micela kao posljedicu smanjenja koncentracije surfaktanta, što su obrazložili time da dolazi do povećanja frakcije otopljenih unimera [65]. U tom slučaju se sastav agregata, micela ili vezikula, mijenja na način da se gustoća površinskog naboja anionskih i kationskih agregata smanjuje. Dodatno su primijetili i da se debljina dvosloja kod vezikula smanjuje porastom koncentracije amfifilnih molekula. Međutim ti podaci se ne slažu s onima koje su dobili Zhu i suradnici za laktozil lipide, za koje veličina vezikula raste porastom koncentracije, što je pripisano smanjenju odbojnih sila između grupa glave [66]. O tome da koncentracija surfaktanta utječe na samoudruživanje govore i dva različita moguća puta nastanka unilamelarnih vezikula preko intermedijera, koji ovise o koncentraciji i sastavu amfifilnih molekula [67].

Indeks polidisperznosti (eng. *polydispersity indeks*, PDI) je vrijednost koja služi za utvrđivanje kvalitete i homogenosti veličina čestica u uzorku neke disperzije. Uvriježeno je da se uzorke smatra monodisperznim za vrijednosti  $PDI \leq 0,1$  dok vrijednosti  $PDI \geq 0,7$  ukazuju na polidisperznost sustava i neprikladnost analize tehnikom DLS [68]. Kod boje **1**, srednje maksimalne vrijednosti PDI ne prelaze vrijednost od 0,4, no kod obje ionske jakosti primjećuje se koncentracijski i vremenski trend polidisperznosti. Pri višoj ionskoj jakosti, PDI izmjeren odmah nakon pripreme uzorka opada porastom koncentracije boje. Za uzorke nakon dva tjedna PDI je znatno manji i ne pokazuje nikakav trend u ovisnosti o koncentraciji, ukazujući na to da se protokom vremena sustav stabilizirao, a čestice postaje ujednačenije po veličini. Rezultat je u skladu s mjerenjem veličine vezikula koje pokazuje da porastom koncentracije promjer postaje neovisan o koncentraciji. Pri nižoj ionskoj jakosti nije primijećena toliko izražena ovisnost o koncentraciji, već kao i kod više ionske jakosti, smanjenje PDI nakon dva tjedna stajanja uzoraka. Poput promjera vezikula, PDI nakon 2

tjedna stajanja uzoraka također poprima približno jednake vrijednosti za obje koncentracije soli (oko 0,2). Rezultati ukazuju da suspenzije boje **1** vremenom prelaze u termodinamički stabilnije stanje te da ne dolazi do fuzije vezikula niti stvaranja makroagregata. Ruozi i suradnici su uočili da u liposomskim koloidnim suspenzijama nakon nekoliko mjeseci dolazi do porasta veličine i indeksa polidisperznosti te to pripisali agregaciji liposoma u hijerarhijski više strukture zbog Van der Waalsovih privlačnih interakcija [16]. S obzirom da je u ovom radu uočeno značajno smanjenje veličine i polidisperznosti boje **1** nakon 2 tjedna skladištenja, navedeni mehanizam je moguće isključiti, a uočeni trend pripisati većoj topljivosti boje pri nižoj ionskoj jakosti. Potonji zaključak je potkrijepljen već spomenutim trendom u izmjerenoj kritičnoj koncentraciji samonakupljanja.

Rezultati za boju **2** (slike 17-20) pokazuju manju vremensku i koncentracijsku ovisnost promjera vezikule i indeksa polidisperznosti u odnosu na amfifilni derivat rodamina B. Suprotno od zaključaka iznesenih za potonji spoj, suspenzija vezikula boje **2** stabilizirana je elektrostatskim odbojnim interakcijama među vezikulama koje sprječavaju agregaciju koloidnih čestica sukladno DLVO teoriji [2,3,28]. Do tog zaključka dolazimo temeljem eksperimentalnog opažanja da pri nižoj ionskoj jakosti raspodjele po promjeru te PDI pokazuju veću ujednačenost veličine vezikula te manju ovisnost o koncentraciji surfaktanta. Također, pri višoj ionskoj jakosti (slika 17) te nižim koncentracijama, moguće je uočiti povećanje veličine vezikule nakon dva tjedna stajanja uzorka, što ukazuje na fuziju uzrokovanu agregacijom. Navedena opažanja i zaključci su u skladu s rezultatima koje su objavili Frokjaer i suradnici, koji su također uočili da se smanjenjem ionske jakosti povećava fizikalna stabilnost lipidnih dvosloja naspram agregaciji [69].

Prema DLVO teoriji, dinamika agregacije nanočestica, uključujući i vezikule odnosno liposome sačinjene od ionskih surfaktanata, određena je ravnotežom privlačnih i odbojnih interakcija [70,71]. Pri tomu elektrostatsko odbijanje ne dozvoljava približavanje čestica sprječavajući

time njihovu daljnju agregaciju. Prikazana mjerenja elektroforetske pokretljivosti pružaju informaciju o gustoći naboja na površini istraživanih vezikula odnosno jačini elektrostatskog odbijanja. Naime primjenom Henryjeve jednadžbe sa Smoluchowski-jevim ograničenjem (7), elektroforetska pokretljivost proporcionalna je zeta potencijalu koji određuje odbojni elektrostatski doprinos DLVO potencijalu (slika 5), a obrnuto proporcionalna veličini čestica [27]. Time mjerenja elektroforetske pokretljivosti pružaju važan doprinos razumijevanju gore diskutiranih trendova. Očekivano, izmjerene elektroforetske pokretljivosti potvrđuju da boja **1** stvara kationske (slika 29) a boja **2** anionske (slika 30) vezikule. Za obje boje izmjerene su vrijednosti ovisne kako o koncentraciji, tako i ionskoj jakosti. Kod boje **1**, pokretljivost je relativno mala i smanjuje se sniženjem ionske jakosti. Pri tom se Debye-eva udaljenost povećava, što bi u principu vodilo do veće vrijednosti zeta-potencijala odnosno elektroforetske pokretljivosti [3,27]. No u slučaju boje **1**, elektroforetsku pokretljivost ne određuje veličina zeta potencijala (on je relativno malen) već promjer čestica. Korelacijom s mjerenjima veličine vezikula (DLS), moguće je zaključiti da je uočeni trend smanjenja elektroforetske pokretljivosti pri nižoj ionskoj jakosti uzrokovan povećanjem vezikula. Svakako, taj zaključak ukazuje na kompleksniji mehanizam ovisnosti elektroforetske pokretljivosti o ionskoj jakosti nego što je to za čvrste nanočestice, koji kao što je već spomenuto, uključuje promjenu veličine vezikula kroz otapanje i izmjenu unimera.

Za boju **2** se, suprotno trendu uočenom za boju **1**, smanjenjem ionske jakosti elektroforetska pokretljivost povećava. Pri ionskoj jakosti 1mM ona poprima vrlo izraženu vrijednost (oko  $-8 \mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) što korelira s uočenim značajno većim vezikulama. Iz navedenog je moguće zaključiti da je elektrostatski potencijal na površini vezikula boje **2** znatno veći nego u slučaju boje **1**, što uzrokuje veći modul savijanja i posljedično vezikule s manjom zakrivljenošću dvosloja. S druge strane, takve vezikule su prema DLVO-teoriji vrlo stabilne s obzirom na agregaciju (slike 27 i 28), što bitno usporava uspostavu njihove termodinamički najstabilnije veličine [64].

Drugim riječima, pri toj ionskoj jakosti one se nalaze u termodinamički nestabilnom (točnije metastabilnom) stanju u kojem dominiraju elektrostatska odbijanja glava boje **2** što uzrokuje značajan površinski potencijal, te posljedično i intervezikularna elektrostatska odbijanja [1]. Pri ionskoj jakosti 10 mM elektroforetska pokretljivost za vezikule boje **2** poprima znatno manje vrijednosti (osim pri koncentraciji 1 mM), što korelira s uočenom manjom stabilnošću suspenzije (slike 25 i 26), odnosno agregacijom i fuzijom vezikula u tim uvjetima.

U svjetlu gornje diskusije, interesantna je uočena eksperimentalna činjenica da boja **2** početno stvara vezikule manje veličine u odnosu na boju **1**, dakle s većom zakrivljenošću površine. Iako je to stanje za nju termodinamički nepovoljno, nastaje kao posljedica brzog *start*-procesa koji je pogonjen snažnim privlačenjem hidrofobnih dijelova molekule [3]. Tom brзом asocijacijom nastaju elektrostatski napregnute površine vezikula, koje nemaju mogućnost relaksacije u termodinamički stabilnije stanje zbog intervezikularnog odbijanja [1,64]. Prema tome, disperzija vezikula boje **2** je kratkoročno puno stabilnija od one za boju **1**, posebice sniženjem ionske jakosti. No, povećanjem ionske jakosti ubrzava se postizanje termodinamički stabilnijeg stanja dvosloja s manjom zakrivljenošću, što vodi k stvaranju većih vezikula.

Dakle, moguće je zaključiti da boje **1** i **2** asociiraju u vezikule različitim putevima, te preostaje razmotriti uzroke za tu razliku na temelju strukture molekula. Uočavamo da je kod boje **2** naboj koncentriran u jednoj jedinoj ionskoj (sulfonskoj) skupini koja se nalazi na kraju molekule te taj naboj nije delokaliziran. Posljedično, u tom spoju sulfonska skupina u stvari predstavlja ionsku glavu s relativno velikim efektivnim (ionskim) radijusom zbog odbijanja susjednih glava na površini dvosloja [72]. Iako to izraženo odbijanje smanjuje parametar pakiranja, on i dalje odgovara dvosloju koji je rigidniji pogotovo pri niskoj ionskoj jakosti te podnosi manju zakrivljenost. S druge strane, lokalizacija naboja u sulfonskoj skupini pridonosi snažnijem hidrofobnom karakteru ostatka molekule. Razumljivo

je dakle da ta molekula brzim *start*-procesom tvori gusto pakirani dvosloj što istovremeno rezultira velikim elektrostatskom naprežanjem njegove međupovršine prema vodenoj fazi. S druge strane, kod boje **1** naboj kvaterne amonijeve skupine delokaliziran je kroz cijeli ksantenski  $\pi$ -sustav [73]. Time cijeli taj sustav postaje glava surfaktanta, no s relativno malom gustoćom naboja. Posljedično, parametar pakiranja manji je nego kod boje **2**, ali očito ne dovoljno da bi takve molekule u vodi tvorile micidele. To je vjerojatno stoga što efektivni radijus glave ne odgovara dimenzijama ksantenskog sustava, već dosegu elektrostatskog odbijanja dvaju naboja na površini, koji je znatno manji od tih dimenzija. No, boja **1** zbog slabe elektrostatske interakcije glava stvara dvosloj sa znatno manjim površinskim elektrostatskim potencijalom, te ne prolazi kroz metastabilno stanje kao boja **2**, već polako izmjenom unimera stvara termodinamički stabilne vezikule manjih dimenzija.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom istraživačkom radu sintetizirani su amfifilni derivati često korištenih organskih boja, rodamina B i orange-II, jednostavnim reakcijama supstitucije i uvođenjem dodecilmog alkilnog lanca. Koloidno ponašanje novosintetiziranih spojeva i proces samoudruživanja navedenih amfifilnih boja ispitali su se spektrofotometrijskom titracijom, tehnikama dinamičkog rasapa svjetla i analize faza raspršenog svjetla te analizom oblika viseće kapi. Eksperimenti su provedeni na disperzijama strogo kontroliranih ionskih jakosti, koncentracija i pH vrijednosti.

Fotofizikalna svojstva spojeva analizirana su u UV/VIS području te se uočava gubitak trenda i neovisnost apsorpcijskih vrpca pri variranim pH vrijednostima suspenzija što ukazuje na promjenu elektronskog stanja novih boja u odnosu na polazne. Mjerenja površinske napetosti pokazala su veliku površinsku aktivnost sintetiziranih spojeva koji pokazuju dobro definiranu i izraženu kritičnu koncentraciju samonakupljanja. Izmjerene raspodjele veličina samonakupina pokazala su da ti spojevi u vodenom mediju stvaraju vezikule promjera  $\geq 200$  nm. Utvrđena je vremenska i koncentracijska ovisnost veličine vezikula uvjetovana koncentracijom soli (KCl) za regulaciju ionske jakosti. Glavna razlika između dviju ispitivanih amfifilnih boja je u njihovim putevima asocijacije te termodinamičkoj stabilizaciji, koji su uvjetovani kako međumolekulskim, tako i međuvezikularnim interakcijama. Amfifilni derivat rodamina u disperziji formira vezikule većeg promjera kojima treba određeno vrijeme da se veličinom i oblikom termodinamički stabiliziraju. Pri tom je dinamika stabilizacije određena izmjenom odnosno topljivošću unimera, koja je za tu boju nešto veća pogotovo pri niskoj ionskoj jakosti (1 mM). S druge strane, derivat orange-II boje, pri toj ionskoj jakosti stvara neravnotežne vezikule manjeg promjera s izrazitim elektrostatskim potencijalom na površini. Potonji pridonosi održavanju takvog metastabilnog stanja sprječavajući agregaciju vezikula. Pri višim ionskim jakostima, metastabilno stanje stajanjem disperzije prelazi u termodinamički stabilno stanje u kojem

veličina vezikula ovisi o koncentraciji amfifila. Zaključno, rezultati istraživanja upućuju na kompleksno ponašanje ionskih amfifilnih boja u vodenim otopinama, uvjetovano različitim doprinosima privlačnih i odbojnih interakcija energiji samoudruživanja, ionskim uvjetima u mediju, topljivošću unimera te prisutnosti odbojnog elektrostatskog odbijanja među vezikulama.

Ovim radom razvijena je metoda za karakterizaciju koloidnih svojstava amfifilnih derivata organskih boja koja može biti primijenjena i na druge slične spojeve za primjenu u *in vitro* i *in vivo* biomedicinskim eksperimentima. Rezultati ovog rada mogu poslužiti kao smjernica za daljnja istraživanja. Pogotovo, neka od pitanja koja se mogu postaviti su utjecaj promjene duljine lanca, nešto veće ionske jakosti u mediju, promjene temperature, miješanja različitih surfaktanata i boja, na proučavana svojstva. Vrlo bi zanimljivo bilo i promatranje starenja vezikula (eng. *aging*) kroz znatno duži vremenski period. Time bi se dobila šira slika i dodatno unaprijedilo područje koloidne i supramolekularne kemije amfifilnih boja, s ciljem njihove šire uporabe kako u medicini, tako i različitim tehnološkim procesima

## 7. POPIS LITERATURE

- [1] Israelachvili JN. Intermolecular and surface forces. Third. Academic Press; 2011.
- [2] Norde W. Colloids and interfaces in life sciences. Marcel Dekker; 2003.
- [3] Evans DF, Wennerström H. The colloidal domain: where physics, chemistry, biology, and technology meet. Wiley-VCH; 1999.
- [4] Zhang J. Amphiphilic Molecules. *Encycl. Membr.*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014, str. 1–4.
- [5] Clarke S. The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes, 2nd edition (Tanford, Charles). *J Chem Educ* 1981;58:A246.
- [6] Lombardo D, Kiselev MA, Magazù S, Calandra P. Amphiphiles self-assembly: Basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches. *Adv Condens Matter Phys* 2015;2015.
- [7] Holmberg K, Jönsson B, Kronberg B, Lindman B. *Colloidal Forces. Surfactants Polym. Aqueous Solut.*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2002, str. 181–9.
- [8] Marsh D. Thermodynamics of phospholipid self-assembly. *Biophys J* 2012;102:1079–87.
- [9] Diamant H, Andelman D. Free energy approach to micellization and aggregation: Equilibrium, metastability, and kinetics. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2016;22:94–8.
- [10] Nagarajan R. Molecular packing parameter and surfactant self-assembly: The neglected role of the surfactant tail. *Langmuir* 2002;18:31–8.



- [11] Cui X, Mao S, Liu M, Yuan H, Du Y. Mechanism of surfactant micelle formation. *Langmuir* 2008;24:10771–5.
- [12] Understanding Interfaces - DataPhysics bez datuma. <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/#pendantdrop> (pristupljeno 04. kolovoz 2018.).
- [13] Owen SC, Doak AK, Wassam P, Shoichet MS, Shoichet BK. Colloidal aggregation affects the efficacy of anticancer drugs in cell culture. *ACS Chem Biol* 2012;7:1429–35.
- [14] Verma AK, Dash RR, Bhunia P. A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. *J Environ Manage* 2012;93:154–68.
- [15] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Woo Joo S, Zarghami N, Hanifehpour Y, i ostali. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 2013;8:1.
- [16] Ruozi B, Tosi G, Forni F, Fresta M, Vandelli MA. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur J Pharm Sci* 2005;25:81–9.
- [17] Carrión FJ, De La Maza A, Parra JL. The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. *J Colloid Interface Sci* 1994;164:78–87.
- [18] Huynh E, Zheng G. Porphysome nanotechnology: A paradigm shift in lipid-based supramolecular structures. *Nano Today* 2014;9:212–22.
- [19] Verwey EJW, Overbeek JTG. Theory of the stability of lyophobic colloids. *J Colloid Sci* 1955;10:224–5.
- [20] Shaw DJ. Charged interfaces and Colloid stability. *Introd. to Colloid Surf. Chem. Fourth Ed.*, 2013, str. 174–243.

- [21] Malvern I. Tech Note: Zeta potential - An introduction in 30 minutes 2000. [http://www.materials-talks.com/wp-content/uploads/2017/09/mrk654-01\\_an\\_introduction\\_to\\_zeta\\_potential\\_v3.pdf](http://www.materials-talks.com/wp-content/uploads/2017/09/mrk654-01_an_introduction_to_zeta_potential_v3.pdf) (pristupljeno 01. kolovoz 2018.).
- [22] Holmberg K, Shah DO, Schwuger MJ, Wiley J. HANDBOOK OF APPLIED SURFACE AND COLLOID CHEMISTRY Volume 1-2. 2002.
- [23] Adachi Y. Dynamic aspects of coagulation and flocculation. *Adv Colloid Interface Sci* 1995;56:1–31.
- [24] Hyde AM, Zultanski SL, Waldman JH, Zhong Y-L, Shevlin M, Peng F. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. *Org Process Res Dev* 2017;21:1355–70.
- [25] An Overview of the Zeta Potential - Part 2: Measurement | American Pharmaceutical Review - The Review of American Pharmaceutical Business & Technology bez datuma. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/134634-An-Overview-of-the-Zeta-Potential-Part-2-Measurement/> (pristupljeno 01. kolovoz 2018.).
- [26] Kaszuba M, Corbett J, Mcneil F, Jones A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Trans R Soc A* 2010;368:4439–51.
- [27] Swan JW, Furst EM. A simpler expression for Henry's function describing the electrophoretic mobility of spherical colloids. *J Colloid Interface Sci* 2012;388:92–4.
- [28] Babick F. Characterisation of Colloidal Suspensions. *Suspens. Colloid. Part. Aggregates*, vol. 20, 2016, str. 7–74.
- [29] Zetasizer Nano Series User Manual 2003:270.

[http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf) (pristupljeno 02. kolovoz 2018.).

- [30] Lim J, Yeap S, Che H, Low S. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res Lett* 2013;8:381.
- [31] Berry JD, Neeson MJ, Dagastine RR, Chan DYC, Tabor RF. Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry 2015.
- [32] Stauffer CE. The Measurement of Surface Tension by the Pendant Drop Technique. *J Phys Chem* 1965;69:1933–8.
- [33] Walmsley F. Aggregation in dyes. A spectrophotometric study. *J Chem Educ* 1992;69:583.
- [34] Karimi Goftar M, Moradi K, Kor NM. Spectroscopic studies on aggregation phenomena of dyes. *Eur J Exp Biol* 2014;4:72–81.
- [35] Mallamace F, Micali N, Romeo A, Monsù Scolaro L. Fractal aggregation of dyes such as porphyrins and related compounds under stacking. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2000;5:49–55.
- [36] Heyne B. Self-assembly of organic dyes in supramolecular aggregates. *Photochem Photobiol Sci* 2016;15:1103–14.
- [37] Ishibashi KI, Sato O, Baba R, Tryk DA, Hashimoto K, Fujishima A. Characterization of the chromophore orientation of rhodamine B amphiphiles in Langmuir-Blodgett monolayers. *J Colloid Interface Sci* 2001;233:361–3.
- [38] Yuzhakov VI. Aggregation of dye molecules and its influence on the spectral luminescent properties of solutions. *Russ Chem Rev Russ Chem Rev Uspekhi Khimii* 1992;61:1114–114142.
- [39] Valdes-Aguilera O, Neckers DC. Aggregation Phenomena in Xanthene

Dyes. *Acc Chem Res* 1989;22:171–7.

- [40] Tajalli H, Ghanadzadeh Gilani A, Zakerhamidi MS, Moghadam M. Effects of surfactants on the molecular aggregation of rhodamine dyes in aqueous solutions. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 2009;72:697–702.
- [41] Demchenko JLB and YLS and IDP and AP. Fluorescent J-aggregates of cyanine dyes: basic research and applications review. *Methods Appl Fluoresc* 2018;6:12001.
- [42] Reeves RL, Harkaway SA. Surface tensions of aqueous solutions of some azo dye sulfonates and analogs. *J Colloid Interface Sci* 1978;64:342–7.
- [43] Ghomashchi E, Ghanadzadeh A, Mahjani MG, Hasanpour M, Niavaran HZ. On the aggregative properties of rhodamine 6G in ethanolic solutions. *Spectrochim Acta Part A Mol Spectrosc* 1991;47:211–7.
- [44] Mchedlov-Petrosyan NO, Kholin Y V. Aggregation of Rhodamine B in Water. *Russ J Appl Chem* 2004;77:414–22.
- [45] Aviv H, Harazi S, Schiff D, Ramon Y, Tischler YR. Synthesis of an amphiphilic rhodamine derivative and characterization of its solution and thin film properties. *Thin Solid Films* 2014;564:86–91.
- [46] García E, Medina R, Lozano M, Hernández Pérez I, Valero M, Franco A. Adsorption of Azo-Dye Orange II from Aqueous Solutions Using a Metal-Organic Framework Material: Iron- Benzenetricarboxylate. *Materials (Basel)* 2014;7:8037–57.
- [47] Asakura T, Ishida M. A nuclear magnetic resonance study on aggregation of an azo dye, Orange II, in aqueous solution. *J Colloid Interface Sci* 1989;130:184–9.
- [48] Abbott LC, Batchelor SN, Oakes J, Gilbert BC, Whitwood AC, Smith

- JRL, i ostali. Experimental and computational studies of structure and bonding in parent and reduced forms of the azo dye orange II. *J Phys Chem A* 2005;109:2894–905.
- [49] Bessekhoud Y, Chaoui N, Trzpit M, Ghazzal N, Robert D, Weber JV. UV–vis versus visible degradation of Acid Orange II in a coupled CdS/TiO<sub>2</sub> semiconductors suspension. *J Photochem Photobiol A Chem* 2006;183:218–24.
- [50] Rokitskaya TI, Sumbatyan N V., Tashlitsky VN, Korshunova GA, Antonenko YN, Skulachev VP. Mitochondria-targeted penetrating cations as carriers of hydrophobic anions through lipid membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2010;1798:1698–706.
- [51] López Arbeloa F, López Arbeloa T, Tapia Estévez MJ, López Arbeloa I. Photophysics of rhodamines. Molecular structure and solvent effects. *J Phys Chem* 1991;95:2203–8.
- [52] Momeni S, Nematollahi D. New insights into the electrochemical behavior of acid orange 7: Convergent paired electrochemical synthesis of new aminonaphthol derivatives. *Nat Publ Gr* 2017;7.
- [53] Maiti NC, Mazumdar S, Periasamy N. J- and H-Aggregates of Porphyrin–Surfactant Complexes: Time-Resolved Fluorescence and Other Spectroscopic Studies †. *J Phys Chem B* 1998;102:1528–38.
- [54] D’Ilario L, Martinelli A. Toluidine blue: Aggregation properties and structural aspects. *Model Simul Mater Sci Eng* 2006;14:581–95.
- [55] Škorić I. Spektroskopija ili spektrofotometrija-studij interakcije materije i svjetla odnosno elektromagnetskog zračenja. Zagreb: 2014.
- [56] Selwyn JE, Steinfeld JJ. Aggregation of equilibriums of xanthene dyes. *J Phys Chem* 1972;76:762–74.
- [57] Baheti A, Tyagi P, Thomas KRJ, Hsu YC, Lin JT sue. Simple

- triarylamine-based dyes containing fluorene and biphenyl linkers for efficient dye-sensitized solar cells. *J Phys Chem C* 2009;113:8541–7.
- [58] Mukerjee P, Mysels K. Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems. *J Pharm Sci* 1971;61:319–319.
- [59] Miles GD, Shedlovsky L. Minima in surface tension-concentration curves of solutions of sodium alcohol sulfates. *J Phys Chem* 1944;48:57–62.
- [60] Scholz N, Behnke T, Resch-Genger U. Determination of the Critical Micelle Concentration of Neutral and Ionic Surfactants with Fluorometry, Conductometry, and Surface Tension—A Method Comparison. *J Fluoresc* 2018;28:465–76.
- [61] Chen LG, Bermudez H. Solubility and aggregation of charged surfactants in ionic liquids. *Langmuir* 2012;28:1157–62.
- [62] Yoon J, Jo W, Jeong D, Kim J, Jeong H, Park J. Generation of nanovesicles with sliced cellular membrane fragments for exogenous material delivery. *Biomaterials* 2015;59:12–20.
- [63] Sabín J, Prieto G, Ruso JM, Hidalgo-Álvarez R, Sarmiento F. Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. *Eur Phys J E* 2006;20:401–8.
- [64] Claessens MMAE, Van Oort BF, Leermakers FAM, Hoekstra FA, Stuart MAC. Charged lipid vesicles: Effects of salts on bending rigidity, stability, and size. *Biophys J* 2004;87:3882–93.
- [65] Bergström M, Pedersen JS, Schurtenberger P, Egelhaaf SU. Small-Angle Neutron Scattering (SANS) Study of Vesicles and Lamellar Sheets Formed from Mixtures of an Anionic and a Cationic Surfactant. *J Phys Chem B* 1999;103:9888–97.
- [66] Zhu J, Yan F, Guo Z, Marchant RE. Surface modification of liposomes

- by saccharides: Vesicle size and stability of lactosyl liposomes studied by photon correlation spectroscopy. *J Colloid Interface Sci* 2005;289:542–50.
- [67] Gummel J, Sztucki M, Narayanan T, Gradzielski M. Concentration dependent pathways in spontaneous self-assembly of unilamellar vesicles. *Soft Matter* 2011;7:5731.
- [68] Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, i ostali. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* 2018;10:1–17.
- [69] Frokjaer S, Hjorth EL, Worts O. Stability testing of liposomes during storage. *Liposome Technol* 1984;1:235–45.
- [70] Kobayashi M, Skarba M, Galletto P, Cakara D, Borkovec M. Effects of heat treatment on the aggregation and charging of Stöber-type silica. *J Colloid Interface Sci* 2005;292:139–47.
- [71] Behrens SH, Christl DI, Emmerzael R, Schurtenberger P, Borkovec M. Charging and Aggregation Properties of Carboxyl Latex Particles: Experiments versus DLVO Theory. *Langmuir* 2000;16:2566–75.
- [72] Tang Y, De Guire MR. Forces between sulfonate self-assembled monolayers (SAMs) and zirconia particles in aqueous solutions. *J Mater Chem* 2004;14:1173–9.
- [73] Adhikesavalu DN, Mastropaolo D. Two rhodamine derivatives: trihydrate. *Acta Crystallogr Sect C* 2001;c57:657–9.

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBN INFORMACIJE

Matulja Dario

📍 Vladimira Gortana 7, 51211 Matulji (Hrvatska)

📞 099 784 31 54

✉️ dario.matulja@gmail.com

Spol Muško | Datum rođenja 05.12.1994. | Državljanstvo hrvatsko

### RADNO ISKUSTVO

veljača/2018 Demonstrator na kolegiju: BIL302 Fizikalna kemija

studeni 2016. Demonstrator na kolegiju: BIL302 Fizikalna kemija

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2017.–  
danas Sveučilište u Rijeci, Centar za mikro i nano znanosti i tehnologije  
I Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

Eksperimentalni rad u svrhu izrade diplomskog rada u laboratoriju za koloide, polielektrolite i međupovršine. Korištenje opreme za karakterizaciju koloidnih sustava:

- 1) Kruss Drop Shape Analyzer, Brookhave Nanobrook Omni
- 2) UV-Vis spektrofotometar Agilent Cary 60
- 3) Titrator Metrohm
- 4) NanoBrook Omni Particle Size Analyzer
- 5) Agilent Cary Eclipse spektrofotometar za fluorescenciju

Eksperimentalni rad u Laboratoriju za organsku kemiju I kemiju čvrstog stanja. Usvojene tehnike tankoslojne kromatografije, kromatografije na stupcu, uparavanja pod sniženim tlakom, očitavanje NMR spektara.

2016.–  
danas Odjel za biotehnologiju, diplomski sveučilišni studij "Medicinska kemija", Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

2013.– Sveučilišni prvostupnik biotehnologije i istraživanja lijekova (univ. bacc. biotech. et pharm. inv.)



2016. Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)
- lipanj 2016.– srpanj 2016. Jadran galenski laboratorij, Rijeka (Hrvatska)  
Praksa na Odjelu za razvojnu analitiku i stabilnost pod mentorstvom dr.sc. Danijela Štanfel.
- Siječanj 2016. Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)  
Rad u laboratoriju na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju prilikom izrade završnog rada, pod mentorstvom dr. sc. Marina Šantić, dipl. sanit. ing. u sklopu projekta: Francisella tularensis-unutarstanični život i patogeneza tularemije u miša (062-0621273-0950)
- 2009.– 2013. Prva riječka hrvatska gimnazija, Rijeka (Hrvatska)

## OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	B2	B2	B2	B2	B2
talijanski	A1	A1	A1	A1	A1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik  
- C1 i C2: Iskusni korisnik

Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine

Dobre komunikacijske vještine stečene kroz rad sa studentima na demonstraturama i tijekom održavanja seminara/radionica/tečajeva u sklopu Case Study natjecanja.

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Iskusni korisnik

- dobro vladanje alatima Microsoft Office (Word, Excel i PowerPoint)
- računalni biokemijski programi: PyMol, Chimera-Vina, VMD-NAMD, PBS, PDB2PQR, Avogadro-WinGAMESS-MacMolPlot, Tenua, KinTek
- statistički programi: Statistica, MedCalc
- osnove rada u programskim softverima R i Igor Pro 8

Vozačka dozvola                      B

#### DODATNE INFORMACIJE

Priznanja i nagrade

- Nagrada za osvojeno 1.mjesto na JGL-Case Study natjecanju 2017.godine
- Nagrada za osvojeno 3.mjesto na natjecanju Realizator 2017.
- Priznanje za ulazak u finale na Case Study Competition eStudent
- Rektorova nagrada za izvrsnost za akademsku godinu 2017./2018.
- Priznanje Student generacije (zbog izvrsnog uspjeha na studiju te iznimnih postignuća u znanstvenoj i javnoj djelatnosti) za akademsku godinu 2017./2018.

Pohvale

Uspjeh studiranja na preddiplomskom studiju pohvaljen s pohvalom SUMMA CUM LAUDE

Konferencije

sudjelovanje:

- 1) pasivno: 8. Međunarodna konferencija o tularemiji (Opatija, 2015.)
- 2) aktivno: 6. Hrvatski mikrobiološki kongres (Sveti Martin na Muri, 2016.)

- Survival of Francisella novicida after exposure to drying and different growth conditions // 6th Croatian Congress of Microbiology with International Participation - Book of Abstract / Antolović, Roberto

(ur.).Zagreb: Croatian Microbiological Society, 2016. str. 74-74 (poster, domaća recenzija, znanstveni)

3) ko-autor postera prezentiranog na Kongresu svjetskog udruženja koloidnih i međupovršinskih znanstvenika (IACIS), održanog 21.-25.5. 2018. Rotterdamu:

N. Požar, D. Matulja, N. Malatesti, D. Čakara\*, "*Determination of the dissociation constants of aggregated indicator dyes from the UV/VIS spectra without calibration*"

4) autor postera prezentiranog na Konferenciji europskog društva za koloide i međupovršine (ECIS 2018), održanoj 2.9-7.9. 2018. U Ljubljani:

D. Matulja, N. Požar, N. Malatesti, D. Čakara, "*Self-assembly of weakly acidic photoactive dyes in aqueous solution at varied pH and ionic strength*"

- |                      |  |
|----------------------|--|
| Natjecanja           | <ul style="list-style-type: none"><li>▪ JGL-Case Study natjecanje 2016. i 2017. godine</li><li>▪ Case Study Realizator 2017.</li><li>▪ Case Study Competition eStudent</li></ul>   |
| Stipendiranje        | Stipendija za izvrsnost Sveučilišta u Rijeci za akademsku godinu: 2013./2014., 2014./2015., 2015./2016., 2016./2017. i 2017./2018.   |
| Seminari i radionice | <ul style="list-style-type: none"><li>▪ "Tips and tricks za pripremu i pisanje poslovnih rješenja" i "Generiranje poslovnih ideja: Tehnike &amp; alati"(Predavač: Neven Tamarut, mag. oec., MBA)</li><li>▪ "Inovacija proizvoda i usluga" (Predavač: Boris Golob, mag. ing.)</li><li>▪ "Pitching trening: 3 minute do uspjeha" (Predavač: Dario Zorić, mag.oec.)</li></ul> |
| Volontiranje         | <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Sudjelovanje u aktivnostima otvorenog dana Odjela za biotehnologiju (2015. - 2018.) i u natjecanju Tetragon (2017.)</li><li>▪ Znanost i umjetnost na ulici (2016.)</li><li>▪ Putujući znanstvenici (2015.)</li><li>▪ Student mentor (2016./2017.)</li></ul>  |