

# Sinteza amfifilnih derivata indikatora metil crveno i fizikalno-kemijska karakterizacija njegovih supramolekularnih agregata

---

Ceranić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:193:664667>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**

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“

Marija Ceranić

**Sinteza amfifilnih derivata indikatora metil crveno i  
fizikalno-kemijska karakterizacija njegovih  
supramolekularnih agregata**

Diplomski rad

Rijeka, 2022.g

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
„Medicinska kemija“

Marija Ceranić

**Sinteza amfifilnih derivata indikatora metil crveno i  
fizikalno-kemijska karakterizacija njegovih  
supramolekularnih agregata**

Diplomski rad

Rijeka, 2022.g

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Duško Čakara  
Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Diplomski rad je obranjen dana 28. rujna 2022. pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Jurica Novak
2. doc. dr. sc. Maria Kolypadi Marković
3. izv. prof. dr. sc. Duško Čakara
4. izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Rad ima 80 stranica, 38 slika, 7 tablica, 45 literaturna navoda.

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

## **ZAHVALA**

*Želim izraziti iznimnu zahvalnost svom mentoru izv. prof. dr. sc. Dušku Čakari na pomoći oko izrade diplomskog rada, na svim savjetima, pruženim odgovorima koji su mi uvelike pomogli tijekom eksperimentalnog rada i znanstvenog pisanja, ali i na uloženom vremenu, strpljenju i prenesenom znanju.*

*Veliko hvala i komentorici izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti i njezinoj doktorandici Martini Mušković na lijepoj suradnji i pruženoj pomoći oko sintetskog dijela eksperimentalnog rada, na lijepim riječima i poticajnim razgovorima. Hvala i doktorandima Dariu Matulji i Filipu Vranješeviću na svim korisnim savjetima, ali i ugodnoj atmosferi u laboratoriju.*

*Hvala i mojim roditeljima i užoj obitelji na velikoj potpori tijekom svih godina studiranja, a posebno tati koji mi je dao auto na drugoj godini i spasio me od mukotrpane vožnje vlakom do Rijeke.*

*Za kraj hvala i mojim prijateljicama, Ivani, Doroteji, Marti i Heleni koje su uvijek bile uz mene. Zahvalna sam i mom partneru koji mi je pružio oslonac i naučio me da ne odustajem kad je najteže.*

## SAŽETAK

Ključne riječi: samonakupljanje (agregacija), amfifilne molekule, dinamičko raspršenje svjetlosti, površinska napetost, vezikule, stabilnost

Samonakupljanje molekula spontan je proces gdje je nastajanje supramolekularnih struktura rezultat djelovanja slabih nekovalentnih interakcija. Posljednjih godina se sve više pojavljuju studije usredotočene na interakcije sintetiziranih azo boja s različitim vrstama površinski aktivnih tvari, za koje promjene u UV-VIS spektru ukazuju na ostvarivanje međumolekulskih interakcija koje dovode do stvaranja agregata. Među njima veliku pažnju zauzimaju amfifilne boje koje djeluju kao kiselinsko-bazni indikatori, a primjenu pronalaze ne samo u industrijskim procesima, već i u biomedicinskim istraživanjima kao potencionalni agensi u prijenosu lijekova.

U ovom radu sintetizirani su amfifilni derivati indikatora metil crveno, supstitucijom alkilnog lanca sa 6 i 12 C atoma. Optimiziran je sintetski put promjenom parametara reakcije kao i otapala pri pročišćavanju te su istražena svojstva novih spojeva u vodenom mediju u odnosu na koncentraciju i pH. Fotofizikalna svojstva spojeva i njihovih agregata u vodenom mediju istražena su mjerenjem UV-VIS spektara, a proces samonakupljanja tehnikama dinamičkog raspršenja svjetlosti i tenziometrije s visećom kapi. Potencijalna primjena novih spojeva ispitana je eksperimentom vezanja na površinu hidrofobiziranog stakalca.

Pomaci u apsorpcijskim spektrima ukazali su na prisutnost agregata u vodenome mediju kao i nepostojanje ovisnosti apsorpcije o pH pripremljenih suspenzija. Mjerenjem veličine agregata i usporedbom vrijednosti hidrodinamičkih promjera uočeno je da sintetizirani spojevi agregiraju u

vezikule čija veličina ne ovisi značajno o koncentraciji. Također veličine vezikula izmjerene unutar duljeg vremenskog perioda ukazuju na razliku u njihovoj stabilnosti, pri čemu vezikule sačinjene od spoja s kraćim lancem, pokazuju uspostavu termodinamičke ravnoteže u kraćem vremenskom periodu. Mjerenjem površinske napetosti i potenciometrijskom titracijom, utvrđen je neionski karakter sintetiziranih spojeva, koji nikako (**spoj 1**) ili minimalno (**spoj 2**) smanjuju površinsku napetost na granici faza voda/zrak. Rezultati potenciometrijske titracije, kao i UV/VIS spektrofotometrije, pobijaju hipotezu da bi novi derivati mogli djelovati kao pH indikatori. Ipak, sintetizirani spojevi pojačano se vežu na hidrofobno staklo u odnosu na metil crveno, što pokazuje smjer za razvoj sličnih spojeva s mogućom primjenom u području funkcionalnih površina.

## SUMMARY

Keywords: self-assembly (aggregation), amphiphilic molecules, dynamic light scattering, surface tension, vesicles, stability

Self-assembly of molecules is a spontaneous process where the formation of supramolecular structures is the result of weak non-covalent interactions. In recent years, there has been an increase in the number of studies focusing on the interactions of synthesized azo dyes with different types of surfactants, for which changes in the UV-VIS spectrum indicate the existence of intermolecular interactions that lead to the formation of supramolecular assemblies (aggregates). Among those previously mentioned, amphiphilic dyes that act as acid-base indicators are quite prominent while their application is found not only in industrial processes, but also in biomedical research as potential agents in the transfer of drugs.

In this work, amphiphilic derivatives of the methyl red indicator were synthesized by substitution of the alkyl chain with 6 and 12 C atoms. The synthetic route was optimized by changing the parameters of the reaction and the solvent used in the purification. The properties of the new compounds were also tested in the aqueous medium with respect to concentration and pH. The photophysical properties of the compounds were investigated by measuring the UV-VIS spectrum, while the process of self-assembly was characterized by dynamic light scattering technique and pendant drop tensiometry. Potential applications of new compounds were tested by their binding at the surface of hydrophobized glass slides.

Shifts in the absorption spectra indicated the presence of aggregates in the aqueous solution, as well as the lack of pH-dependence of absorption by the



prepared suspensions. By measuring the size of the aggregates and comparing the values of their hydrodynamic diameters, it was evidenced that the synthesized compounds aggregate into vesicles whose size does not significantly depend on the concentration. The size of the vesicles formed by the two synthesized compounds, measured within a prolonged time period, point to a difference in the stability, whereby the vesicles formed by the compound with a shorter hydrocarbon chain, exhibit an establishment of a thermodynamic equilibrium in a shorter period of time. From the surface tension and potentiometric titration measurements, a non-ionic character of the compounds was established, whereby these compounds only minimally (**compound 2**) or not at all (**compound 1**) reduce the surface tension at the air/water interface. The results of the potentiometric titration and the UV/VIS spectrophotometry denounce the hypothesis that the new derivatives could act as pH indicators. Nevertheless, the observed increased binding of these compounds at the surface of hydrophobized glass, point to the perspective of development of similar compounds with an application in the field of functional surfaces.

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod .....</b>	<b>1</b>
1.1. Amfifilne molekule u procesu samonakupljanja .....	1
1.2. Čimbenici pakiranja i morfologija agregata .....	4
1.2.1. Kritična koncentracija micelizacije (CMC) .....	5
1.2.2. Dvosloji i vezikule .....	6
1.3. Mjerenje veličine agregata .....	6
1.4. Efekt amfifila na površinsku napetost .....	9
1.5. Amfifilne boje .....	11
1.5.1. Azo boje.....	12
1.5.2. Amfifilne boje kao pH indikatori.....	12
1.5.3. Metil crveno .....	13
<b>2. Tema, cilj i zadaci istraživanja .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Materijali i metode.....</b>	<b>18</b>
3.1. Kemikalije i reagensi .....	18
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Metode spektroskopije .....	19
3.3. Sinteza spojeva .....	20
3.3.1. ( <i>E</i> )-Heksil-2-( <i>N, N</i> -dimetil-4-aminofenil)azobenzenkarboksilat .....	20
3.3.2. ( <i>E</i> )-Dodecil-2-( <i>N, N</i> -dimetil-4-aminofenil)azobenzenkarboksilat .....	21
3.4. Metode određivanja veličine i površinske napetosti sintetiziranih spojeva .. .....	23
3.5. Priprema spoja 1 za potenciometrijsku titraciju.....	23

3.6.	Priprema silaniziranog stakla kao nosača sintetiziranih spojeva .....	24
3.6.1.	Metoda jetkanja .....	24
3.6.2.	Metoda silanizacije stakalca .....	25
3.6.3.	Metoda mjerenja kontaktnog kuta na silaniziranoj površini stakalca	25
<b>4.</b>	<b>Rezultati .....</b>	<b>26</b>
4.1.	Spektrofotometrija u UV-Vis području .....	26
4.2.	Mjerenje veličine agregata tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti ..	34
4.3.	Mjerenje površinske napetosti sintetiziranih derivata metil crvenog .....	44
4.4.	Potenciometrijska titracija spoja 1 .....	46
4.5.	Vežanje sintetiziranih spojeva na silanizirana stakalca i mjerenje kontaktnog kuta .....	47
<b>5.</b>	<b>Rasprava .....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>Zaključak .....</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>Popis literature .....</b>	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>Dodatni materijali .....</b>	<b>76</b>

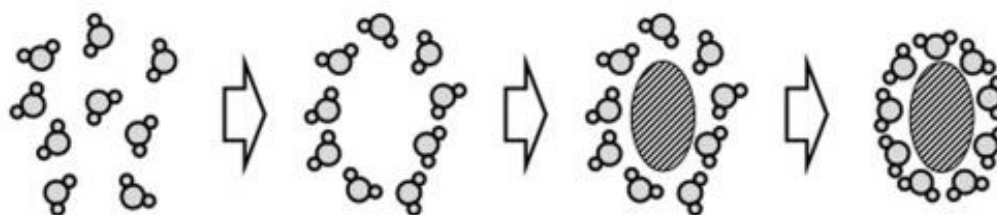
# 1. Uvod

Samonakupljanje (eng. *self-assembly*) obuhvaća procese u kojima dolazi do spontanog organiziranja, odnosno agregacije molekula u termodinamički stabilne strukture, kao posljedica djelovanja međumolekulskih nekovalentnih interakcija. Sam proces zapravo proizlazi iz složene ravnoteže između Van der Waalsovih i elektrostatskih interakcija među molekulama agregata, (de)solvatacije te entropijskog doprinosa kao posljedice nastajanja organiziranih struktura [1,2]. Samonakupljanje molekula u veće strukture privlači sve više pažnje te svoju primjenu pronalazi ponajviše u području nanotehnologije. Poseban primjer je u mikroelektronici gdje se polimeri i blok kopolimeri, zahvaljujući procesu samonakupljanja, koriste u izradi mikročipova, ali i ostalih materijala poput senzora, solarnih ćelija i sl. [3].

## 1.1. Amfifilne molekule u procesu samonakupljanja

Pojam amfifil je atribut koji potječe od dvije grčke riječi, *amphis* i *philia* što bi zajedno značilo „voljeti oboje“, odnosno mogli bi prevesti i kao „imati afiniteta za oboje“. To bi se očitovalo u tome da takve molekule imaju istovremeno naklonost prema polarnom otapalu (npr. vodi) kao i nepolarnom (npr. ulju). Amfifilne molekule dovedene u vodenu otopinu adsorbiraju se na tzv. međupovršinama (eng. *interfaces*) zbog čega se i nazivaju površinskim aktivnim tvarima, tenzioaktivima ili surfaktantima. Primjeri amfifila su lipidi, blok kopolimeri, kolesterol i mnogi drugi [4–6]. Kao pokretačka snaga amfifilnih samosastavljajućih sustava zaslužan je hidrofobni učinak zbog kojeg nepolarne molekule tvore agregate u vodi. Zbog prisutnosti brojnih međumolekularnih interakcija uključenih u proces samonakupljanja, još uvijek nedostaje potpuno razumijevanje ovog fenomena. Kad nepolarne molekule

dođe u kontakt s molekulama vode, oko nje se mora stvoriti „šupljina“ koja će prihvatiti nepolarnu molekulu (Slika 1.). Budući da nepolarne molekule ne mogu formirati vodikove veze, stvaranje šupljine zahtijeva ili kidanje vodikovih veza ili preuređenje molekula vode na način da se rasporede oko prisutnih tvari u otopini čime postaju još više uređenije, što je onda entropijski nepovoljno. Kada je prisutno mnogo molekula amfifila, koje se ne otapaju u vodi već im je povoljnije stanje u hidratiziranim nakupinama, gubitak entropije miješanja postaje prevelik te je povoljniji proces kidanje vodikovih veza među molekulama vode i stvaranja šupljina za smještaj velikog broja nepolarnih molekula, odnosno stvaranja njihovih agregata. Takav proces uzrokuje veliko privlačenje nepolarnih molekula, a zapravo je rezultat hidrofobnih interakcija.



Slika 1. Ilustracija formiranja šupljine i umetanja površinskih aktivnih tvari (amfifilnih molekula), kao rezultat djelovanja hidrofobnog učinka. Slika preuzeta iz [7].

S obzirom da amfifilne molekule sadrže i hidrofilni (glava) i hidrofobni (ugljkovodični lanac) dio, zbog hidrofobnog učinka formiraju različite strukture (agregate), koji minimiziraju kontakt između hidrofobnog dijela amfifila i molekula vode, a u slučaju ionskih surfaktanata, u njima je „optimizirano“ odbijanje između hidrofilnih glava. Za proces samonakupljanja i stvaranja agregata zaslužne su sile koje djeluju uglavnom na granici između površinskih aktivnih tvari i vode, a osim hidrofobnog učinka, zaslužne su i odbojne interakcije kao posljedica elektrostatskih ili steričkih odbijanja između hidrofilnih skupina (glava) i potrebe da one ostanu u kontaktu s molekulama vode [7,8]. Slabost uključenih interakcija čini strukture fleksibilnima omogućavajući sustavu da izdrži manje perturbacije uz očuvanje

reverzibilnosti samonakupljenih agregata. Glavne nekovalentne interakcije i njihove energije koje djeluju u procesu samonakupljanja prikazane su u Tablici 1. [6].

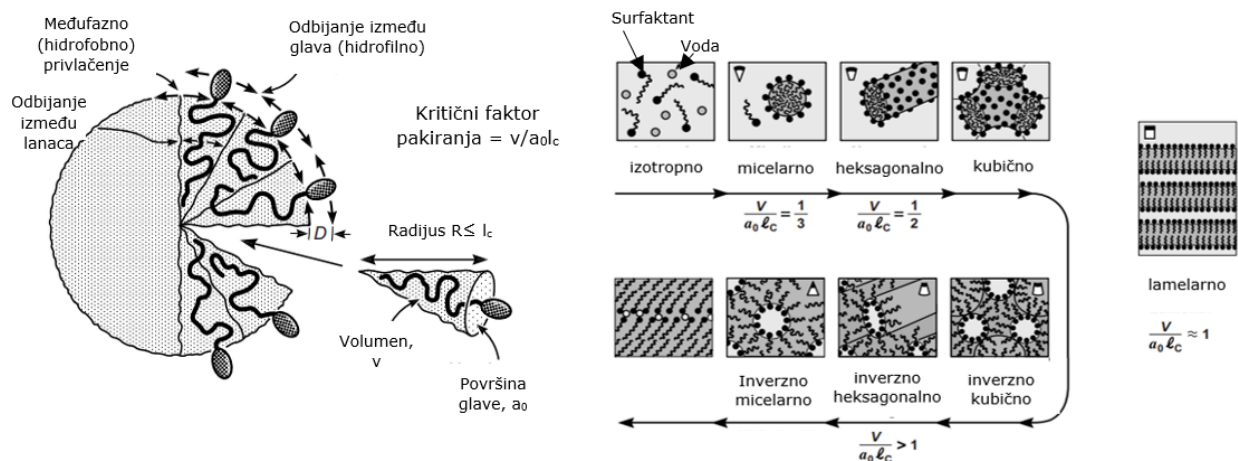
Tablica 1. Jačina glavnih nekovalentnih interakcija uključenih u proces samonakupljanja amfifilnih molekula.

<b>Vrsta interakcija</b>	<b>kJ/mol</b>
Kovalentna veza	100 - 400
Ion-ion/ion-dipol/dipol-dipol	200 – 300 / 50 – 200 / 5 - 50
Vodikova veza	4 - 120
Kation-n( $\pi$ ) interakcija	5 - 80
$\pi$ - $\pi$ interakcija	0 - 50
Van der Waals-ova interakcija	<5
Hidrofobni učinak	entropija
Metal-ligand	0 - 400

S obzirom da se amfifili sastoje od dva dijela, hidrofobnog repa, odnosno zasićenog ili nezasićenog ugljikovodičnog lanca, i hidrofilne (polarne) glave koja može biti ionska ili neionska, razlikujemo više vrsta amfifilnih molekula. U ionske pripadaju kationski i anionski, od kojih se anionski najčešće koriste kao deterdženti i sapuni, a sadrže negativno nabijenu glavu s pozitivno nabijenim protuionom (najčešće natrijev, kalijev ili amonijev ion). Anionske polarne glave najčešće su karboksilati, sulfati, sulfonati i fosfati. Postoje i zwitterionski amfifili čije glave pri neutralnom pH imaju i pozitivni i negativan naboj te se mogu ponašati kao anioni pri visokom pH, ili kationi pri niskom pH. S druge strane, mogući su i neionski surfaktanti koji nemaju nabijene glave, već sadrže hidrofilne skupine povezane hidrofobnim alkilnim lancem. Polarnost i veličina glave reguliraju topljivost u vodi i površinsku aktivnost. Jedna od karakteristika neionskih surfaktanata je da pH otopine ne utječe bitno na njihovu površinsku aktivnost [6].

## 1.2. Čimbenici pakiranja i morfologija agregata

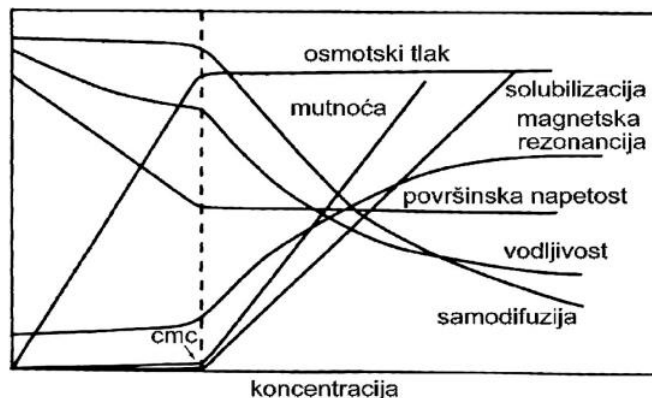
Udruživanje amfifila stvara različite strukture u vodenim otopinama te se mogu transformirati iz jedne strukture u drugu, promjenom uvjeta u otopini kao što su koncentracija, pH ili temperatura. Pri vrlo niskim koncentracijama formira se monosloj na granici faza voda-zrak. Iznad određene koncentracije, odnosno kritične koncentracije agregacije, moguće je formiranje različitih oblika agregata, kao što su štapići, sfere, micle, dvosloji i vezikule [8]. Oblik i veličina micelarnih agregata ovisi o obliku molekula surfaktanta koji je moguće izraziti preko parametra pakiranja (PP, formula na Slici 2. desno, gdje je  $v$  efektivni volumen kojeg zauzimaju hidrofobni ugljikovodični lanci u jezgri agregata,  $a_0$  je površina hidrofilne glave na površini agregat-otopina, a  $l_c$  je duljina hidrofobnih repova). Kako se povećava vrijednost PP, tako se mijenja i uvjet pakiranja u agregatima, koji je za sfernu micelu  $PP \leq 1/3$ , cilindričnu micelu  $1/3 \leq PP \leq 1/2$ , lamelu  $PP = 1$ . Za parametre u kojima je  $C_{pp} > 1$  mogući su inverzni micelarni oblici (Slika 2., desno). Uz poštivanje uvjeta pakiranja, u termodinamičkoj ravnoteži, stvoreni agregati poprimaju strukturu i veličinu za koju disperzija amfifila ima Gibbsovu energiju [4,9].



Slika 2. Prikaz gradacije preferiranih struktura s povećanjem parametra pakiranja (PP) od sferičnih micela, preko nesferičnih, cilindričnih, međusobno povezanih struktura, pa sve do vezikula i dvosloja kao i obrnutih micela. Slika preuzeta i izmijenjena prema [9].

### 1.2.1. Kritična koncentracija micelizacije (CMC)

U procesu samonakupljanja, kritična koncentracija micelizacije (CMC) koristi se kao termodinamički parametar procesa micelizacije i stvaranja micela te ostalih oblika agregata u otopinama. Ona označava koncentraciju pri kojoj daljnje dodavanje molekula surfaktanta u otapalo dovodi do njihovog ugrađivanja u micelle (agregate) konačne veličine, dok koncentracija otopljenog surfaktanta ostaje nepromijenjena. Dakle pri konc. ukupno dodanog surfaktanta većoj od CMC, konc. otopljenog surfaktanta iznosi CMC. Kod eksperimentalnog određivanja CMC vrijednosti najčešće se koristi tehnika mjerenja površinske napetosti, zatim mjerenje električne vodljivosti (za ionske surfaktante), i topljivosti (za spojeve s niskom topljivosti u vodi), ali i ostale prikazane na Slici 3. CMC se određuje kao točka sjecišta dvaju pravaca interpoliranih iz eksperimentalnih podataka pri visokim i niskim koncentracijama amfifila. Osim što ovisi o vanjskim čimbenicima (pH, temperatura, tlak) ovisi i o kemijskoj strukturi surfaktanta pa se tako CMC smanjuje s povećanjem duljine ugljikovodičnog lanca, odnosno CMC vrijednost pada za faktor 2-3 za svaku dodanu  $\text{CH}_2$  skupinu u lanac surfaktanta [7,9].



Slika 3. Shematski prikaz ovisnosti o koncentraciji nekih fizikalnih svojstava za otopine amfifila koji stvaraju micelle u kritičnoj koncentraciji micelizacije (CMC). Slika preuzeta i izmijenjena prema [6].



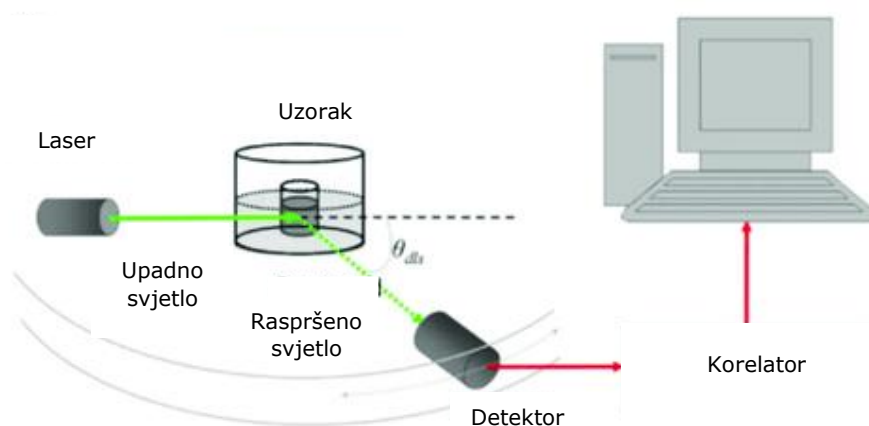
### **1.2.2. Dvosloji i vezikule**

Strukture koje nastaju kao rezultat samonakupljanja dva molekularna sloja amfifilnih molekula, nazivaju se dvosloj. U vodenom mediju, nepolarni dijelovi amfifilnih molekula usmjereni su jedni prema drugima. Također se mogu zatvarati u sfernu geometriju, čime nastaju vezikule koje se po veličini mogu razvrstati u dvije skupine: unilamelarne vezikule, radijusa do stotinjak nanometara, i multilamelarne vezikule, sastavljene od više dvosloja odvojenih molekulama vode, radijusa do nekoliko tisuća nanometara [4]. Odbojne interakcije ključan su uvjet za stabilnu formulaciju gdje se stabilnost vezikula i liposoma (sferičnih vezikula sastavljenih od lipidnog dvosloja) poboljšava povećanjem gustoće površinskog naboja i smanjenjem ionske jakosti. Raznolikost u strukturi vezikula izdvaja ih kao potencijalne nosače za širok spektar terapijskih agensa [10].

### **1.3. Mjerenje veličine agregata**

Za fizikalno-kemijsku karakterizaciju agregata nastalih samonakupljanjem amfifilnih molekula unutar koloidne suspenzije, osim njihovog oblika i strukture važno je i određivanje veličine, odnosno raspodjele po veličinama, nastalih nakupina. Postoje brojne tehnike koje nalaze primjenu u određivanju, ne samo veličine stvorenih nanočestica, već i njihove strukture i uređenja u vodenim otopinama, kao što su dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS), skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) kao i mikroskopija atomske sile (eng. *Atomic force microscopy*, AFM) [11]. Tehnika korištena u ovom radu je dinamičko raspršenje svjetlosti.

**Dinamičko raspršenje svjetlosti** (DLS, još se naziva i fotonska korelacijska spektroskopija PCS) temelji se na kvazi-elastičnom raspršenju svjetlosti (QUELS), a koristi se u svrhu određivanja veličine nanočestica u polimernoj otopini koloidne suspenzije. Tom tehnikom moguće je odrediti hidrodinamičku veličinu čestica na temelju fluktuacije intenziteta svjetlosti lasera, nakon raspršenja na česticama koloidne suspenzije. Prednost DLS-a je u tome što se veličina čestica može odrediti od nekoliko  $\mu\text{m}$  pa sve do nekoliko nm, na brz i jednostavan način. Mjerenje se vrši pri kutu raspršenja od 90 stupnjeva, odnosno pod tim kutom je smješten detektor u odnosu na upadnu svjetlost.



Slika 4. Prikaz principa rada uređaja za dinamičko raspršenje svjetlosti. Slika preuzeta i izmijenjena prema [12].

Čestice unutar koloidne suspenzije gibaju se nasumično, tj. difuzijski te je to gibanje karakterizirano difuzijskim koeficijentom  $D$ . Budući da se male čestice nasumično gibaju unutar tekućine (Brownovo gibanje čestica), udaljenost kojom raspršeni valovi putuju do detektora varira kao funkcija vremena. Raspršeni valovi mogu interferirati konstruktivno ili destruktivno ovisno o udaljenosti prijeđenoj do detektora. Rezultat je prosječni intenzitet

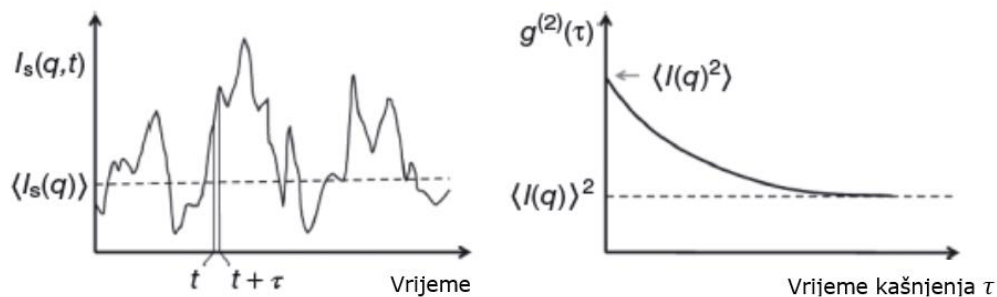
sa superponiranim fluktuacijama. Vrijeme slabljenja fluktuacija povezano je s koeficijentom difuzije  $D$ :

$$D = \frac{\tau_c}{q}; \quad q = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda/n} \quad (1)$$

gdje je  $q$  duljina vektora raspršenja,  $\tau_c$  korelacijsko vrijeme (izračunato iz autokorelacijske funkcije),  $\theta$  kut raspršenja, a  $\lambda$  valna duljina laserske svjetlosti. Za sferne čestice, difuzijski koeficijent je povezan s njihovim polumjerom preko Stokes Einsteinove jednadžbe:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d} \quad (2)$$

u kojoj je  $k$  je Boltzmanova konstanta,  $T$  je temperatura,  $\eta$  je dinamički viskozitet otapala, a  $d$  hidrodinamički polumjer čestica prisutnih u otopini. Nasumično kretanje čestica u otopini dovodi do fluktuacije u vremenskoj ovisnosti intenziteta raspršene svjetlosti. Fluktuirajući signal obrađuje se izradom autokorelacijske funkcije, prikazane u Slici 5 desno. Porastom vremena kašnjenja signala, korelacija se gubi te za monodisperzni sustav dispergiranih čestica, funkcija eksponencijalno trne prema kvadratu prosječnog intenziteta (konstanta).



Slika 5. Lijevo: Raspršeni intenzitet mjereno u vremenu, prikazuje tipične fluktuacije zbog gibanja raspršenih čestica u otopini. Desno: funkcija autokorelacije intenziteta iscrtana kao funkcija vremena kašnjenja,  $\tau$ . Slika preuzeta i izmijenjena prema [13].

Kao rezultat mjerenja, dobivena raspodjela veličina može biti utegnuta prema intenzitetu, a uz pretpostavku unimodalne raspodjele, može biti preračunata u raspodjelu utegnutu prema broju ili volumenu čestica [13]. U ovom radu uzete su raspodjele hidrodinamičkog promjera utegnute prema broju čestica.

#### **1.4. Efekt amfifila na površinsku napetost**

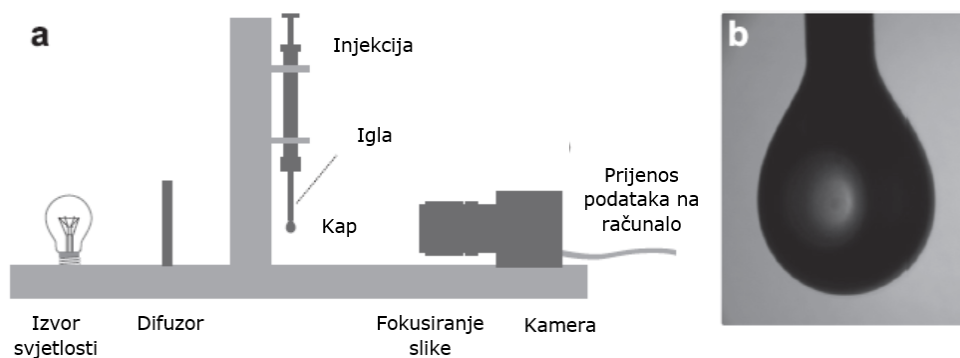
Površinska napetost na granici faza otapalo-zrak nastaje kao posljedica reducirane kohezijske sile među molekulama otapala na površini. Molekule otopljenih surfaktanata smanjuju površinsku napetost otapalo/zrak na način da particioniraju (vežu se) na površini, čime se smanjuje Gibbsova energija sustava. Osim povećanja koncentracije otopljenih surfaktanta, na smanjenje površinske napetosti utjecaj ima i razlika polarnosti između hidrofobnog i hidrofilnog dijela molekule. Ukoliko je glava surfaktanta izrazito polarna, povećanje ugljikovodičnog lanca (repa) rezultira povećanjem površinske aktivnosti. Prema Traube-ovom pravilu je izražen odnos hidrofobnog lanca i površinske aktivnosti za vodene otopine surfaktanata, u kojem vrijedi da se dodatak surfaktanta (izražen kao razlika koncentracija) potreban za ekvivalentno smanjenje površinske napetosti, trostruko smanjuje za svaku dodanu metilnu skupinu unutar lanca [14,15].

**Tenziometrija mjerenjem oblika viseće kapi.** Određivanje površinske napetosti pridonosi novim informacijama o kemijskom sastavu te adsorpciji i desorpciji površinskih aktivnih tvari. Mjerenjem površinske napetosti agregata u otopini može se odrediti i kritična koncentracija micelizacije, zbog čega je to mjerenje korišteno i u ovom radu. Jedna od tehnika za određivanje površinske napetosti je mjerenje oblika viseće kapi, prikazano na Slici 6. Kap se formira na vrhu igle. Kamera snima njenu sliku te

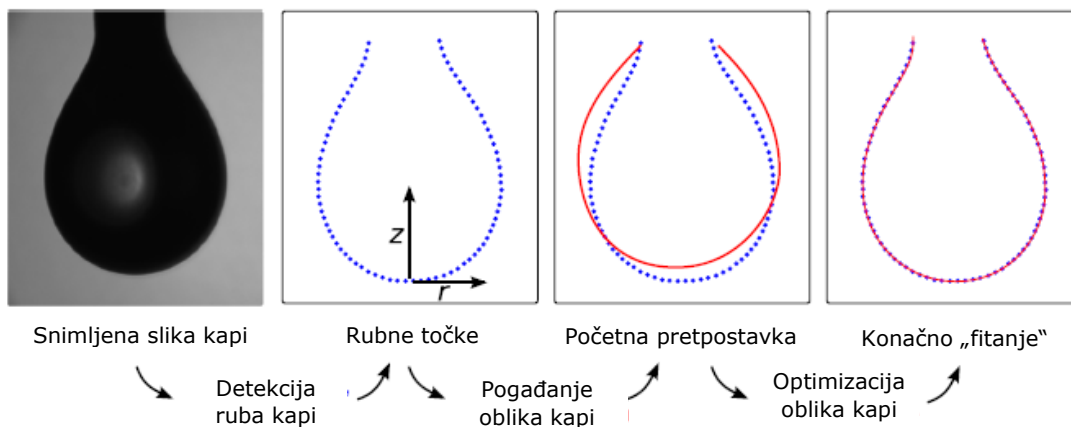
se analiza oblik kapi, a izračun površinske napetosti na međupovršini kap/zrak,  $\gamma$ , temelji se na Young-Laplaceovoj jednadžbi:

$$\gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta P \equiv \Delta P_0 - \Delta \rho g z \quad (3)$$

Gdje su  $R_1$  i  $R_2$  glavni polumjeri zakrivljenosti,  $\Delta P \equiv P_{\text{van}} - P_{\text{unut}}$  je Laplaceov tlak,  $\Delta \rho g z$  je hidrostatski tlak na visini  $z$  od donje granice viseće kapi (vidi sl. 7). Numeričko uklapanje teorijskog oblika kapi u oblik snimljen kamerom na kraju rezultira mogućnošću izračuna površinske napetosti iz jednadžbe (3). Iako se čini jednostavnim, uklapanje jednadžbe u eksperimentalnu sliku je složen postupak koji zahtjeva na samom početku izdvajanje profila kapi iz eksperimentalne slike, a zatim i iterativno optimiziranje parametara Young-Laplaceove jednadžbe [16]. Takav proces prikazan je na Slici 7.



Slika 6. (a) Osnovna eksperimentalna postavka za mjerenje površinske napetosti metodom viseće kapi; (b) tipična slika viseće kapi snimljena kamerom. Slika preuzeta i izmijenjena prema [16].



Slika 7. Shema procesa mjerenja površinske napetosti metodom viseće kapi, od sirove eksperimentalne slike do prilagođene („fitane“) slike iz koje se može dobiti  $\gamma$ . Slika preuzeta i izmijenjena prema [16].

## 1.5. Amfifilne boje

Organske boje često sadrže dva ili više aromatska prstena koja u sklopu delokaliziranog elektronskog sustava s konjugiranim dvostrukim vezama predstavljaju kromofore, koji induciraju obojenje otopine. U novije vrijeme, interakcije boja sa površinskim aktivnim tvarima i polielektrolitima privlače veliku pozornost u području kemije, tekstilne industrije, kozmetike, deterdženata i obrade otpadnih voda ([17] i reference 1-8 u toj publikaciji). Osim proučavanja interakcija, česta su istraživanja u kojima se pokazalo da površinski aktivne tvari asociraju s molekulama boje u vodenoj otopini prilikom čega se opažaju spektralne promjene. Konkretno vezanje azo boja na određene surfaktante uzrokuje pomak apsorpcijskog maksimuma prema kraćim valnim duljinama. Također poznato je da neke azo boje spontano agregiraju u vodenoj otopini surfaktanata što rezultira plavim pomakom (pomak na manje valne duljine) [18].

### **1.5.1. Azo boje**

Boje se klasificiraju na temelju kromofora kojeg sadrže, a najveća skupina bojila su azo boje koje karakterizira veza  $N=N$ . Ovisno o broju azo skupina ( $-N=N-$ ), azo boje se dijele na mono, diazo, triazo i poliazo spojeve. Azo skupina može biti vezana na aromatske prstenove, odnosno simetrične i/ili asimetrične alkilne ili arilne skupine. Različite nijanse iste boje imaju i različite intenzitete, upravo zbog vezanih bočnih aromatskih skupina [19].

Azo boje kao sintetička bojila imaju ključnu ulogu u industrijama kao što su tekstilna industrija, industrija bojanja, tiskanja, kozmetička industrija, kao i proizvodnji papira i sl. [20]. Osim toga, mogu se smatrati i amfifilnim bojama koje sudjeluju u procesu agregacije unutar vodene otopine, koji se povećava pri povećanju koncentracije i ionske jakosti te smanjuje povećanjem temperature. Sposobnost boje da stvara agregate povezivajući se sama sa sobom ovisi, između ostalog, o njezinoj sklonosti stvaranju hidrofobnih veza i to bi se trebalo odraziti na razliku hidrofilnog/hidrofobnog unutar strukture. Također se prilikom agregacije boje stvaraju strukture poput monomera, dimera, trimera i sl. [2].

Za neke boje, prilikom stvaranja agregata mijenja se i apsorpcijski spektar u odnosu na spektar monomera. Postoje J-agregati koje karakterizira crveni pomak u odnosu na monomere (pomak na veće valne duljine), i H-agregati koje karakterizira plavi pomak (hipsokromni pomak) [21].

### **1.5.2. Amfifilne boje kao pH indikatori**

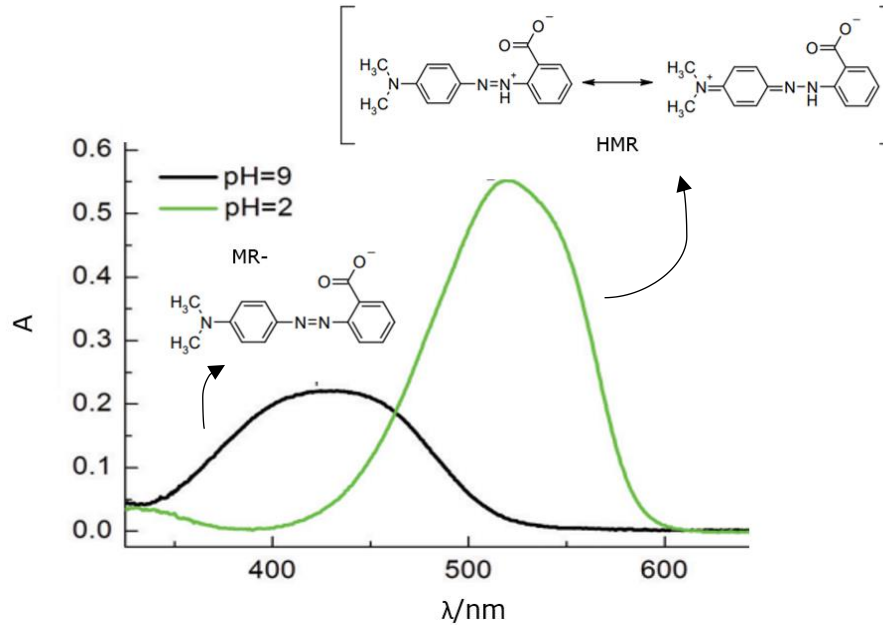
Kao primjer korištenja boja, kiselinsko-bazni indikatori mogu poslužiti kao univerzalni alat u ispitivanju raznovrsnih koloidnih agregata i međupovršina. Osim promjene boja ovisno o pH otopine, emisija svjetlosti

fluorescentnih indikatora često se koristi za praćenje svojstava micela. Informacije dobivene njihovim korištenjem zapravo ovise o samom položaju unutar agregata, gdje bi položaj kiselog i bazičnog oblika indikatora trebao biti sličan [22]. Valja napomenuti da je osim promjene apsorpcijskih spektara, nepravilna promjena  $pK_a$  vrijednosti također rezultat ugradnje boje unutar surfaktanta koja nastaje diferencijacijom kiselinske jakosti u micelarnoj pseudofazi [23]. Postoje brojne publikacije u kojima su korišteni različiti amfifilni indikatori, kao npr. kumarinski indikatori s dugim hidrofobnim ugljikovodičnim repom, zatim tzv. Reichardtova boja kao acidobazni indikator, kao i *N,N*-di-*n*-oktadecilrodamin [24,25].

### **1.5.3. Metil crveno**

Jedna od azo boja je i pH indikator metil crveno (MR), odnosno 2-(4-dimetilaminofenilazo)benzojeva kiselina, koji se koristi kao indikator u volumetrijskim kiselinsko-baznim titracijama. U vodenim otopinama postoji kao zwitterion s rezonantnom strukturom između kiselog (HMR) i bazičnog oblika (MR<sup>-</sup>), kao što je prikazano na Slici 8. Raspon pH vrijednosti u vodenoj otopini pri kojem dolazi do promjene boje je 4,4 – 6,2. U kiselim uvjetima pri nižem pH, otopina sa MR poprima crvenu boju, dok je u lužnatom otopina žute boje. Oba oblika snažno adsorbiraju u vidljivom području, pa se tako koncentracije MR<sup>-</sup> i HMR u otopinama mogu odrediti iz baždarnih pravaca pri valnoj duljini maksimalne apsorbanace, koja se za MR<sup>-</sup> nalazi pri 425 nm , a 520 nm za HMR [26].





Slika 8. UV vidljivi apsorpcijski spektri otopine metil crvenog izmjereni u bazičnim (pH=9) i kiselim (pH=2) otopinama, kao i prikazanim kiselinim i baznim oblicima koji odgovaraju apsorpcijskim krivuljama. Slika preuzeta i izmijenjena prema [26].

Osim što se MR koristi kao indikator u kiselinško-baznim titracijama, primjenu pronalazi i u kvantitativnom testu za mjerenje količine stvorene kiseline od strane različitih vrsta bakterija, tzv. test metil crveno. Koristi se za otkrivanje sposobnosti organizma da proizvodi i održava krajnje kisele produkte fermentacije glukoze te je time koristan u diferencijaciji između članova Enterobacteriaceae. Svi članovi Enterobacteriaceae mogu pretvoriti glukozu u pirogroždanu kiselinu, koja se onda poslije može još dodatno metabolizirati. Organizmi koji ju metaboliziraju, proizvodit će više kiselih krajnjih proizvoda, kao što su mliječna kiselina i octena kiselina, te će time održavati i kiseli okoliš. Kiseli pH izazvat će pozitivan rezultat testa metil crveno, te će se zadržati crvena boja u mediju. S druge strane, neki organizmi mogu metabolizirati pirogroždanu kiselinu putem butilen glikola i proizvesti neutralne produkte, koji podižu kulturu na neutralni pH, a u konačnici

rezultirat će se negativnim testom, odnosno zadržat će se žuta boja nakon dodavanja MR [27].

## 2. Tema, cilj i zadaci istraživanja

Tema diplomskog rada je istraživanje agregacijskih svojstava amfifilnih derivata azo boje metil crveno te njihovog utjecaja na apsorpciju elektromagnetskog zračenja. Sukladno tome, cilj rada je sintetizirati spojeve koji u vodenoj otopini stvaraju agregate te ih fizikalno-kemijski okarakterizirati korištenjem različitih tehnika, promatranjem utjecaja pH, koncentracije na površinsku napetost, te veličinu stvorenih agregata. Osim toga, tema diplomskog rada obuhvaća i mogućnost stvaranja spojeva koji bi stvarali agregate, ali i potencijalno djelovali kao pH indikatori. Diplomski rad bavit će se i analizom optimalnih tehnika u njihovoj karakterizaciji i dokazivanju.

Ciljevi diplomskog rada bit će ostvareni kroz nekoliko eksperimentalnih zadataka:

- 1) Sinteza amfifilnih derivata spoja metil crveno, nukleofilnom supstitucijom haloalkana na karboksilnoj skupini i potvrda kemijske strukture.
- 2) Usporedba metoda koje mogu biti korištene za određivanje topljivosti sintetiziranih spojeva: mjerenje ovisnosti površinske napetosti o koncentraciji spojeva, spektrofotometrijsko određivanje koncentracije u binarnom sustavu otapala oktanol/voda te turbidimetrija (dinamičko raspršenje svjetlosti). Mjerenja će biti izvršena pri variranim pH vrijednostima.
- 3) Mjerenje spektara u UV-VIS području elektromagnetskog zračenja, u ovisnosti o koncentraciji i pH.

- 4) Eksperimentalno određivanje ovisnosti veličine nanočestica sintetiziranih spojeva, o koncentraciji spojeva u otopini i njihovoj pH vrijednosti.
- 5) Usporedba vezanja sintetiziranih spojeva i čistog metil crvenog na silanizirana pokrovna stakalca.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Kemikalije i reagensi

Sve kemikalije i reagensi korišteni su bez prethodnog pročišćavanja: metil crveno (Sigma-Aldrich Co, SAD), cezijev karbonat (Sigma-Aldrich Co, SAD), 1-jodheksan, 1-jodododekan (Sigma-Aldrich Co, SAD).

Otapala korištena u kemijskim reakcijama i pročišćavanjima su: *N,N*-dimetilformamid (Acros Organics, Belgija), diklormetan i heksan (BDH Prolabo Chemicals, UK), a u spektroskopskim mjerenjima korišten je metanol, HPLC čistoće (BDH Prolabo Chemicals, UK).

Tijekom trajanja reakcije sinteze novih derivata, radi provjere tijeka reakcije korištene su TLC pločice presvučene silika gelom (0,20 mm silica gel 60 Å s fluorescentnim indikatorom UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel, Njemačka), kao i UV-lampa valnih duljina 254 i 356 nm. Za pročišćavanje i izolaciju konačnih produkata, korištena je kolonska kromatografija sa silika gelom (Silica 60 Å, 0,04-0,06 mm, Macherey-Nagel, Njemačka) i diklormetanom te heksanom kao eluensima.

Tijekom pripreme razrjeđenja sintetiziranih derivata, pH vrijednosti mjerene su pH metrom (Metrohm 799 GPT Titrino) prethodno kalibriranim puferima za kalibraciju (4.01, 7.00, 9.21, Hamilton Bonaduz AG, Švicarska), a pH vrijednosti mijenjane su korištenjem vodene otopine klorovodične kiseline i kalijeva hidroksida (BDH Prolabo Chemicals, UK). Željena ionska jakost dobivena je dodavanjem otopine kalijeva klorida (BDH Prolabo Chemicals, UK).

Prilikom čišćenja stakalca za silanizaciju, korišteni su: metanol (99,8%), klorovodična kiselina (37%), te konc. sulfatna kiselina (95%) (BDH Prolabo

Chemicals, UK). Stakalca su silanizirana trimetoksi(oktadecil)silanom (Sigma-Aldrich Co, SAD) u 99,8 % etanolu (GmbH, Hrvatska).

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Metode spektroskopije**

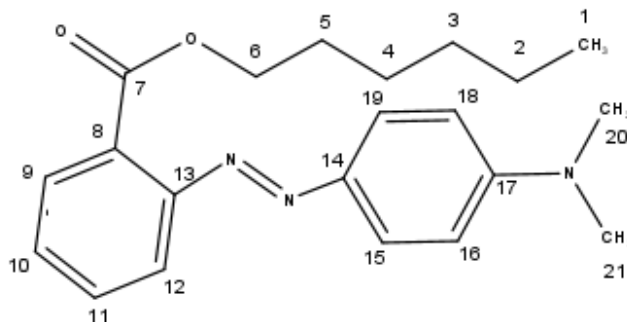
**NMR spektroskopija:**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su u Laboratoriju za spektroskopiju NMR, na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu koristeći spektrometar visoke rezolucije od 600 MHz. Kao otapalo za snimanje korišten je deuterirani kloroform.

**UV-Vis spektrofotometrija:** UV-Vis spektri snimljeni su u plastičnim kivetama (0,5 i 1 cm, BRAND GMBH, Njemačka) pomoću spektrofotometra *Agilent Cary 60 UV-Vis* (SAD) u valnom području apsorpcije od 300 do 800 nm. Uzorci su mjereni pri različitim koncentracijama i pH vrijednostima.

**FTIR-ATR spektrometrija:** Infracrveni spektri snimljeni su pomoću *Agilent Cary 630 FT-IR* spektrometra s ATR ( = prigušena totalna refleksija ) dodatkom.

### 3.3. Sinteza spojeva

#### 3.3.1. (*E*)-Heksil-2-(*N,N*-dimetil-4-aminofenil)azobenzenkarboksilat



Molekulska formula: C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Molekulska masa: 353,456 g/mol

Derivat metil crveno (kasnije **spoj 1**) sintetiziran je metodom prema protokolu kojeg su Rokitskaya i suradnici koristili, sa dodatnim modifikacijama [28]. Otopini metil crveno (310 mg, 1,15 mmol) u 2,5 ml *N,N*-dimetilformamida (DMF) dodana je vodena otopina cezijeve karbonata (0,3 ml, 1 M). Reakcijska smjesa grijana je na 100 °C i miješana u vodenoj kupelji do ključanja te je ohlađena na sobnoj temperaturi i otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Zaostali produkt suši se u eksikatoru preko noći i koristi bez daljnjeg pročišćavanja.

Smjesa cezijeve soli metil crvenog (1,15 mmol, 1 ekv.) i 1-jodheksana (338 µL, 486 mg, 2,29 mmol, 2 ekv.) otopljena je u 5 ml DMF-a. Reakcijska smjesa grijana je na 60 °C i miješana 5 sati u vodenoj kupelji te je ostavljena na sobnoj temperaturi do sljedećeg dana. Nakon provjere dobivenog produkta tankoslojnom kromatografijom, otapalo je uklonjeno *in vacuo* i produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom sa silika gelom uz diklormetan kao

eluens. Iz dobivene frakcije, uklonjeno je otapalo i izoliran je uljasti produkt, **spoj 1**, tamno crvene boje (148,8 mg, 37 %).

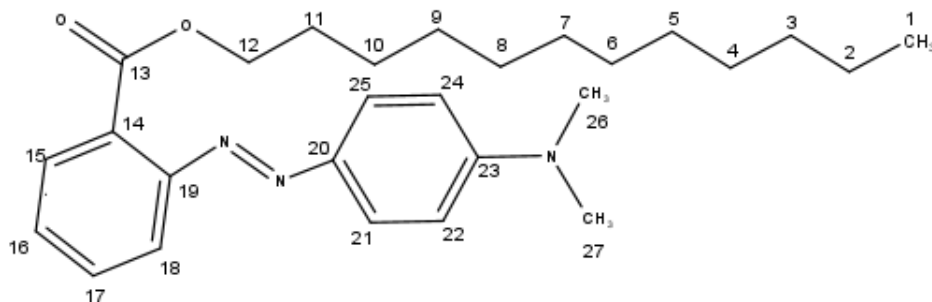
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ /ppm 0,83 (t,  $J = 7,20$  Hz, 3H,  $^1\text{CH}_3$ ); 1,20 - 1,23 (m, 4H,  $^{2,3}\text{CH}_2$ ); 1,29 - 1,34 (m, 2H,  $^4\text{CH}_2$ ); 1,63 - 1,67 (q,  $J = 6,60$  Hz, 2H,  $^5\text{CH}_2$ ); 3,05 (s, 6H,  $^{20,21}\text{CH}_3$ ); 4,28 - 4,30 (t,  $J = 6,60$  Hz, 2H,  $^6\text{CH}_2$ ); 6,71 - 6,72 (d,  $J = 9,00$  Hz, 2H,  $^{16,18}\text{CH}$ ); 7,36 - 7,38 (dt,  $J = 7,80$  Hz,  $J = 1,20$  Hz, 1H,  $^{10}\text{CH}$ ); 7,50 - 7,53 (dt,  $J = 7,80$  Hz,  $J = 1,20$  Hz, 1H,  $^{11}\text{CH}$ ); 7,58 - 7,60 (d,  $J = 7,80$  Hz, 1H,  $^{12}\text{CH}$ ); 7,74 - 7,76 (d,  $J = 7,80$  Hz, 1H,  $^9\text{CH}$ ); 7,85 - 7,86 (d,  $J = 9,00$  Hz, 2H,  $^{15,19}\text{CH}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ /ppm 14,0 ( $^1\text{CH}_3$ ); 22,5 ( $^2\text{CH}_2$ ); 25,7 ( $^4\text{CH}_2$ ); 28,7 ( $^5\text{CH}_2$ ); 31,4 ( $^3\text{CH}_2$ ); 40,2 ( $^{20,21}\text{CH}_2$ ); 65,5 ( $^6\text{CH}_2$ ); 111,3 ( $^{16,18}\text{CH}$ ); 119,1 ( $^{12}\text{CH}$ ); 128,4 ( $^{15,19}\text{CH}$ ); 129,4 ( $^8\text{C}$ ); 129,5 ( $^{10,11}\text{CH}$ ); 131,5 ( $^9\text{CH}$ ); 143,7 ( $^{14}\text{CN}$ ); 152,5 ( $^{13}\text{CN}$ ); 152,6 ( $^{17}\text{CN}$ ); 168,4 ( $^7\text{COO}$ ).

UV-Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm} = 418$ ,  $\log \epsilon = 1,28$

FTIR-ATR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 2860, 2935 ( $^{1-6}\text{C-H}$  istežanje); 1725 ( $^7\text{C=O}$  istežanje); 1598, 1366 (C=C istežanje, aromatski); 1516, 1448 (N=N); 1247 ( $^{13,14,17}\text{C-N}$  istežanje); 1142, 1120 ( $^{20,21}\text{C-N}$  istežanje); 1075 ( $^7\text{C-O}$  istežanje). (Dodatni materijali, Slika 2.)

### 3.3.2. (*E*)-Dodecil-2-(*N,N*-dimetil-4-aminofenil)azobenzenkarboksilat





Molekulska formula: C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Molekulska masa: 395,582 g/mol

Drugi derivat boje metil crveno (kasnije **spoj 2**) sintetiziran je po jednakom protokolu kao i za **spoj 1**, ali sa dodatnim promjenama u drugom dijelu sinteze. Nakon dobivene cezijeve soli metil crvenog, dodan je 1-jodododekan (232 µL, 279 mg, 1,035 mmol, 0,90 ekv.) te je smjesa otopljena u 5 ml DMF-a, grijana na 60 °C i miješana 7 sati u vodenoj kupelji. Reakcijska smjesa je tada ostavljena do sljedećeg dana na sobnoj temperaturi. Nakon provjere tankoslojnom kromatografijom, uklonjeno je otapalo pomoću rotacijskog uparivača i produkt je pročišćen dvjema kolonskim kromatografijama sa silika gelom. Jedna kolona uz DCM kao eluens, a druga uz heksan i DCM u omjeru od 40 : 60 (%). Iz dobivenih frakcija izoliran je uljasti produkt crvene boje, **spoj 2** (185,4 mg, 41 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm 0,88 (t, *J* = 7,00 Hz, 3H, <sup>1</sup>CH<sub>3</sub>); 1,20 - 1,33 (m, 16H, <sup>2-10</sup>CH<sub>2</sub>); 1,62 - 1,67 (m, *J* = 6,60 Hz, 2H, <sup>11</sup>CH<sub>2</sub>); 3,09 (s, 6H, <sup>26,27</sup>CH<sub>3</sub>); 4,27 - 4,30 (t, *J* = 6,70 Hz, 2H, <sup>12</sup>CH<sub>2</sub>); 6,72 - 6,75 (d, Hz, 2H, <sup>22,24</sup>CH); 7,37 - 7,39 (dt, *J* = 7,50 Hz, *J* = 1,30 Hz, 1H, <sup>16</sup>CH); 7,52 - 7,54 (dt, *J* = 7,70 Hz, *J* = 1,40 Hz, 1H, <sup>17</sup>CH); 7,58 - 7,60 (dd, *J* = 8,10 Hz, *J* = 1,30 Hz, 1H, <sup>18</sup>CH); 7,74 - 7,76 (dd, *J* = 7,70 Hz, *J* = 1,40 Hz, 1H, <sup>15</sup>CH); 7,84 - 7,87 (m, Hz, 2H, <sup>21,25</sup>CH).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm 14,1 (<sup>1</sup>CH<sub>3</sub>); 22,7 (<sup>2</sup>CH<sub>2</sub>); 26,1 (<sup>10</sup>CH<sub>2</sub>); 28,8 (<sup>11</sup>CH<sub>2</sub>); 29,3 - 29,7 (<sup>4-9</sup>CH<sub>2</sub>); 31,9 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>); 40,3 (<sup>26,27</sup>CH<sub>2</sub>); 65,5 (<sup>12</sup>CH<sub>2</sub>); 111,4 (<sup>22,24</sup>CH); 119,1 (<sup>18</sup>CH); 125,5 (<sup>21,25</sup>CH); 128,2 (<sup>16</sup>CH); 128,5 (<sup>14</sup>C); 129,5 (<sup>17</sup>CH); 131,6 (<sup>15</sup>CH); 143,8 (<sup>20</sup>CN); 152,5 (<sup>19</sup>CN); 152,7 (<sup>23</sup>CN); 168,4 (<sup>13</sup>COO).

UV-Vis (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>OH): λ<sub>max</sub>/nm = 415, log ε = 1,24

FTIR-ATR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 2928, 2851 ( $^{1-12}\text{C-H}$  istezanje); 1729 ( $^{13}\text{C=O}$  istezanje); 1603,1372 (C=C istezanje, aromatski); 1521, 1454 (N=N); 1253 ( $^{19,20,23}\text{C-N}$  istezanje); 1148 ( $^{26,27}\text{C-N}$  istezanje); 1081 ( $^{13}\text{C-O}$  istezanje). (Dodatni materijali, Slika 3.)

### **3.4. Metode određivanja veličine i površinske napetosti sintetiziranih spojeva**

Za mjerenje veličine nanočestica koloidnih suspenzija korišten je *Brookhaven NanoBrook OMNI zetasizer*. Mjerenje je odrađeno tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS, eng. *Dynamic Light Scattering*) pri temperaturi od 25 °C, broju od 10 ciklusa mjerenja i kutu raspršenja od 90 °. Korišten je algoritam za distribuciju veličine Contin te opcija oblika čestica „Uniform Spheres“. Korišten je laser s crvenom diodom (35 mW) i nominalnom valnom duljinom (640 nm).

Površinska napetost i aktivnost čestica koloidnih suspenzija određena je metodom viseće kapljice na granici faza voda/zrak (eng. *Pendant Drop Method*), korištenjem uređaja *Drop Shape Analyzer (Krüss)*. Uređaj računa površinsku napetost pomoću snimljenog oblika kapi iz Young-Laplace-ove jednadžbe. Za uspješnu provedbu eksperimenata, samo mjerenje površinske napetosti i aktivnosti zahtjeva prethodnu prilagodbu visine stabilizacije slike, izoštravanje fokusa kamere i kalibraciju određivanjem promjera igle, a sve u svrhu točnog izračunavanja traženih parametara.

### **3.5. Priprema spoja 1 za potenciometrijsku titraciju**

**Spoj 1** ( $n=79 \mu\text{mol}$ ,  $m = 28 \text{ mg}$ ) otopljen je u dekarboniziranoj vodi te je titracija provedena korištenjem potenciometrijskog titratora s kontrolom ionske jakosti, kako bi se odredio površinski naboj koloidnih čestica i

polielektrolita u vodenom mediju, u ovisnosti o pH. Provedene su tri titracije u pH rasponu 3 - 10 te tri titracije unatrag u pH rasponu 10 - 3 pri različitim ionskim jakostima ( $I = 1 \text{ mM}$ ,  $I = 50 \text{ mM}$ ,  $I = 100 \text{ mM}$ ). Tijekom titracija, korištene su otopine klorovodične kiseline ( $c = 0,25 \text{ M}$ ) i kalijevog hidroksida ( $c = 0,25 \text{ M}$ ) za promjenu pH vrijednosti, a vodena otopina kalijevog klorida ( $c = 3 \text{ M}$ ) korištena je za mijenjanje ionske jakosti. Za mjerenje pH vrijednosti tijekom titracije, korišten je pH metar, prethodno kalibriran puferima za kalibraciju (4.01, 7.00, 9.21).

### **3.6. Priprema silaniziranog stakla kao nosača sintetiziranih spojeva**

Korištena su borosilikatna pokrovna stakalca dimenzije 24 x 32 mm (ISOLAB, Njemačka) koja su prvo očišćena metodom jetkanja, a zatim su silanizirana 0,02 % otopinom trimetoski(oktadecil)silana u 99,8 % etanolu. Nakon svakog koraka provjeren je kontaktni kut. Svaki korak odrađen je pri sobnoj temperaturi.

Nakon silanizacije, stakalca su uronjena u otopine **spoja 1** i **spoja 2** u metanolu, kao i metil crvenog (kontrola) pri tri različite koncentracije – ishodna otopina, otopina 5 puta manje koncentracije i otopinu 10 puta manje koncentracije, tijekom 30 min. Stakalca su izvučena pincetom i osušena, te su snimljeni UV-Vis spektri.

#### **3.6.1. Metoda jetkanja**

Metoda čišćenja stakalca provedena je prema Metodi 1 u radu J.J. Crasa i suradnika, sa dodatnim promjenama u vremenu držanja stakalca u otopinama [29]. Stakalca su uronjena u otopinu MeOH/HCl (1:1) na 45

minuta, nakon čega su isprana deioniziranom vodom. Isprana stakalca osušena su pod mlazom dušika. Nakon toga, uronjena su u koncentriranu sulfatnu kiselinu tijekom 45 minuta te su ponovno isprana mlazom deionizirane vode i osušena mlazom dušika.

### **3.6.2. Metoda silanizacije stakalca**

Očišćena stakalca uronjena su u 0,02% otopinu trimetoksi(oktadecil) silana u 99,8 % etanolu te su tako ostavljena tijekom 4 sata. Silanizacija je provedena u gloveboxu, pri sniženom tlaku i u odsutnosti kisika. Kasnije su dodatno isprana etanolom te osušena pod strujom dušika. Uspješnost silanizacije provjerena je mjerenjem kontaktnog kuta silaniziranih stakalca.

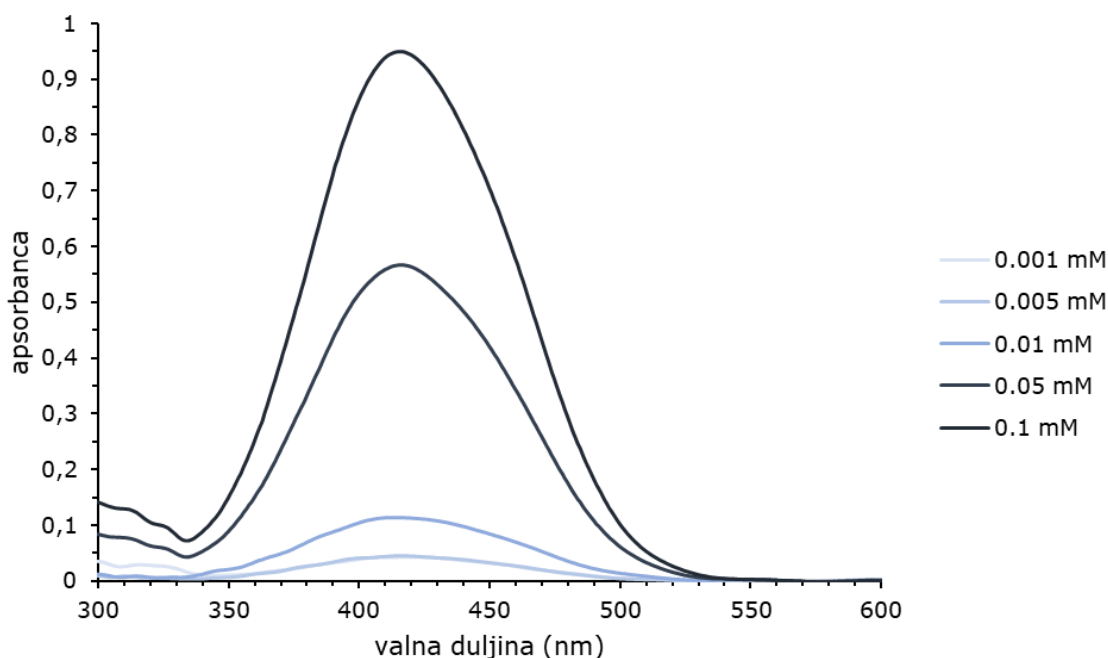
### **3.6.3. Metoda mjerenja kontaktnog kuta na silaniziranoj površini stakalca**

Hidrofobnost površine stakalca odrađena je metodom mjerenja kontaktnog kuta (eng. *Contact Angle Method*) korištenjem uređaja *Drop Shape Analyzer (Krüss)*. Uređaj iz snimljene kapljice na površini stakalca mjeri kontaktni kut preko modela fitanja „tangent“, odnosno mjeri kut između bazne linije (eng. *baseline*) i tangente na krivulji presjeka na trofaznoj kontaktnoj točki. Zadan volumen kapljice je 3  $\mu\text{L}$ , a prilikom snimanja kapljica, uzet je prosjek 10 snimljenih vrijednosti kontaktnih kuteva, na tri različita mjesta na stakalcu.

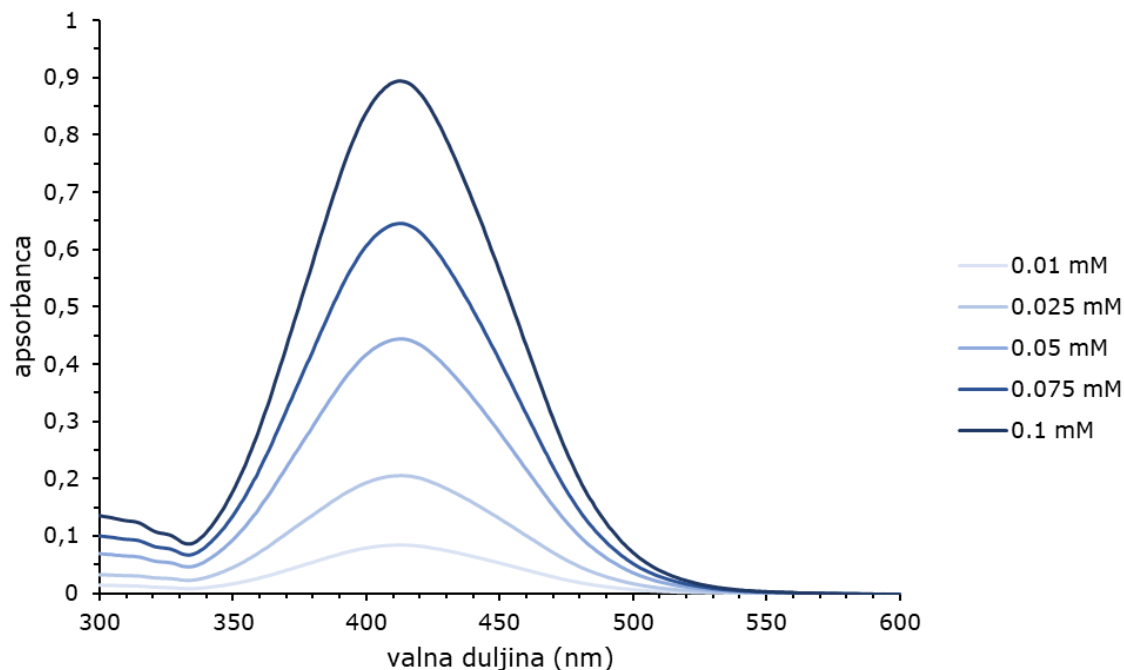
## 4. Rezultati

### 4.1. Spektrofotometrija u UV-Vis području

Snimljeni su apsorpcijski spektri u UV-Vis području (300 - 800 nm) za **spoj 1** i **spoj 2**, pri variranim koncentracijama, najprije u metanolu i/ili oktanolu, a zatim u vodenim otopinama pri dvjema različitim pH vrijednostima. S obzirom da sam metil crveno nije dovoljno dobro topljiv u vodi [30], **spoj 1** i **spoj 2** najprije su otopljeni u metanolu i/ili oktanolu kako bi bio snimljen apsorpcijski spektar (Slika 9. i Slika 10.) potpuno otopljenih sintetiziranih spojeva.

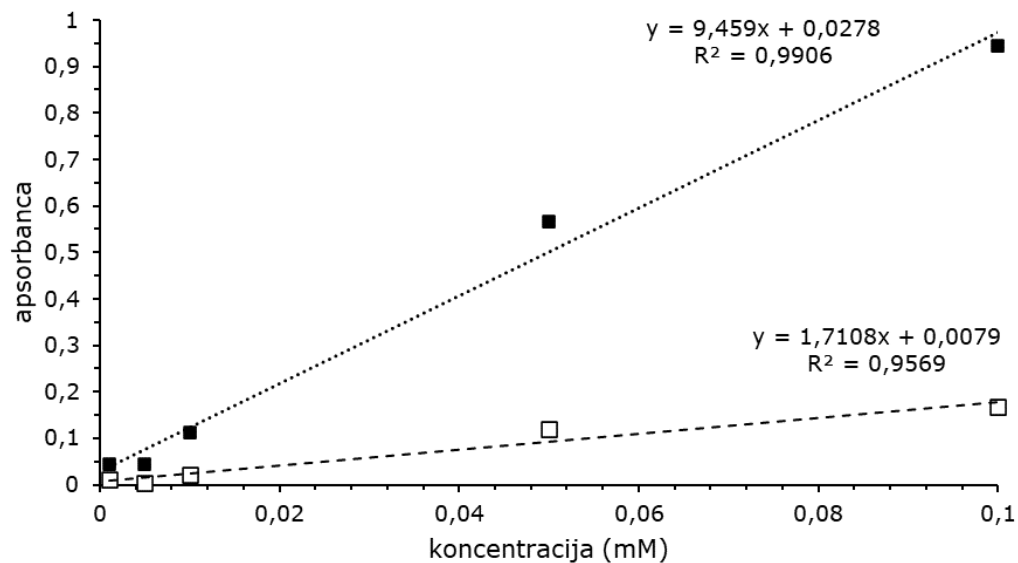


Slika 9. Apsorpcijski spektri **spoja 1** otopljenog u metanolu (HPLC čistoće) izmjereni u rasponu valne duljine (300 - 800 nm) te koncentracijama u rasponu 0,001 - 0,1 mM (prikazane u legendi) i temperaturi 298,15 K. Korištena je plastična kiveta debljine 0,5 cm.

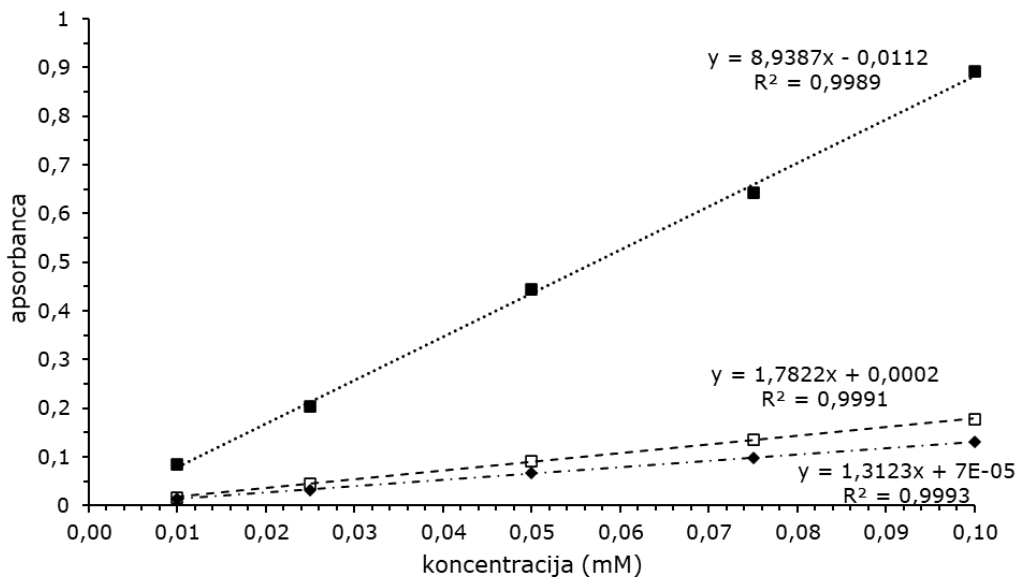


Slika 10. Apсорpcijski spektri **spoja 2** otopljenog u oktanolu izmjerени u rasponu valne duljine (300 - 800 nm) te koncentracijama u rasponu 0,01 - 0,1 mM (prikazane u legendi) i temperaturi 298,15 K. Korištena je plastična kiveta debljine 0,5 cm.

Za **spoj 1** iz snimljenih spektara moguće je uočiti da, sukladno Beer-Lambertovom zakonu, porastom koncentracije sintetiziranih spojeva, linearno se povećava i maksimum apsorbanca pri 418 nm, kao i pri nasumično odabranoj valnoj duljini od 350 nm (Slika 11.). Isto vrijedi i za **spoj 2**, za kojeg je maksimum apsorbanca uočljiv pri maksimumu od 415 nm (Slika 12.).

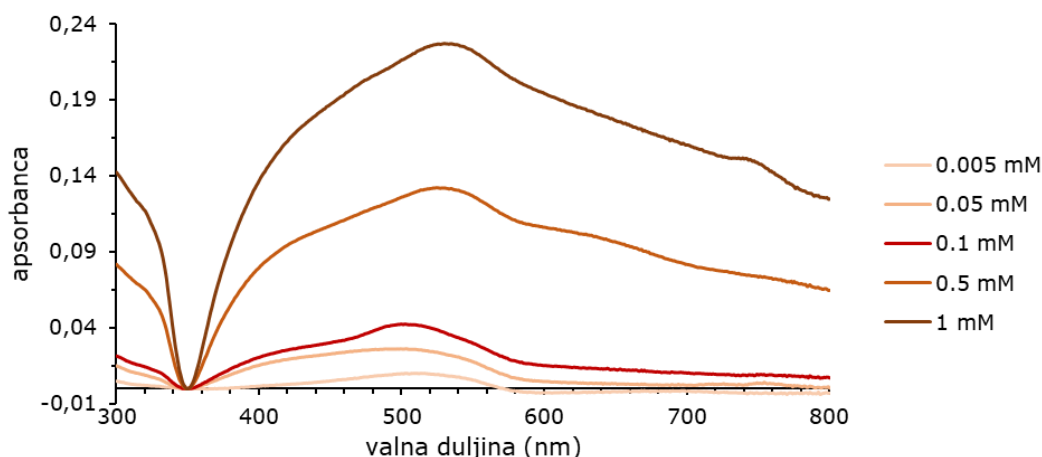


Slika 11. Ovisnost apsorbance pri  $\lambda_{max}$  (■) i  $\lambda = 350$  nm (□) o koncentraciji **spoja 1** otopljenog u metanolu. Podaci su izmjereni pri temperaturi 298,15 K. Prikazani pravci, dobiveni su iz linearne regresije (metodom najmanjih kvadrata), prikazuju teoretsku ovisnost sukladno Beer-Lambertovom zakonu.



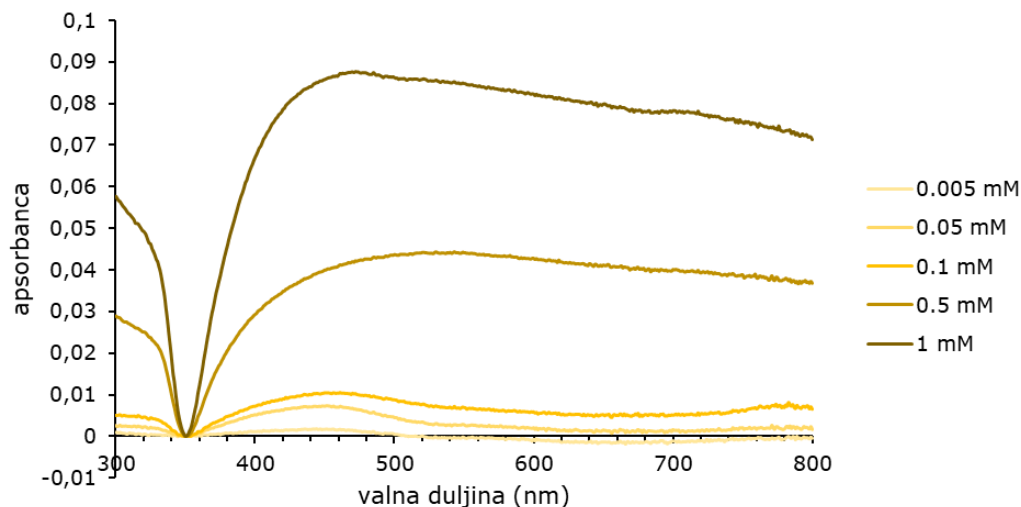
Slika 12. Ovisnost apsorbance pri  $\lambda_{max}$  (■),  $\lambda = 350$  nm (□) i  $\lambda = 305$  nm (◆) o koncentraciji **spoja 2** otopljenog u oktanolu. Podaci su izmjereni pri temperaturi 298,15 K. Prikazani pravci, dobiveni su iz linearne regresije (metodom najmanjih kvadrata), prikazuju teoretsku ovisnost sukladno Beer-Lambertovom zakonu.

Apsorpcijski spektri **spoja 1** u vodi pri pH = 3 (Slika 13.) mjereni su pri nižim koncentracijama u odnosu na mjerenja u metanolu. Za suspenziju **spoja 1** u vodenom mediju, iz Slike 13. razaznajemo podudaranje valne duljine minimuma apsorbance, zbog čega je ta valna duljina uzeta kao referentna točka, u odnosu na koju možemo uspoređivati apsorbanču u cijelom spektru. Pri najvećoj izmjerenoj koncentraciji od 1 mM, maksimum apsorbance nalazi se pri 530 nm, dok je pri nižim koncentracijama taj maksimum pomaknut prema manjim valnim duljinama (hipsokromni pomak). Za koncentraciju 0,5 mM,  $A_{\max}$  uočavamo pri 525 nm, a za koncentraciju 0,1 mM, pri 514 nm. Spektri izmjereni pri najnižim koncentracijama pokazuju maksimume pri konstantnoj valnoj duljini oko 500 nm. Ovi trendovi koreliraju s uočenim pomakom bazne linije u lijevom dijelu spektra, zbog čega možemo pretpostaviti da su, barem djelomično, uzrokovani raspršenjem svjetlosti na nanočesticama agregata. Pri istim koncentracijama i pH = 5, spektri prikazani u Slici 14. ispoljavaju maksimume u području od 445 nm do 472 nm. Općenito uočavamo sličnost s trendovima u spektrima opisanim za **spoj 1** pri pH = 3, no pri pH = 5 ne uočavamo „brijeg“ karakterističan za protoniranu formu MR.



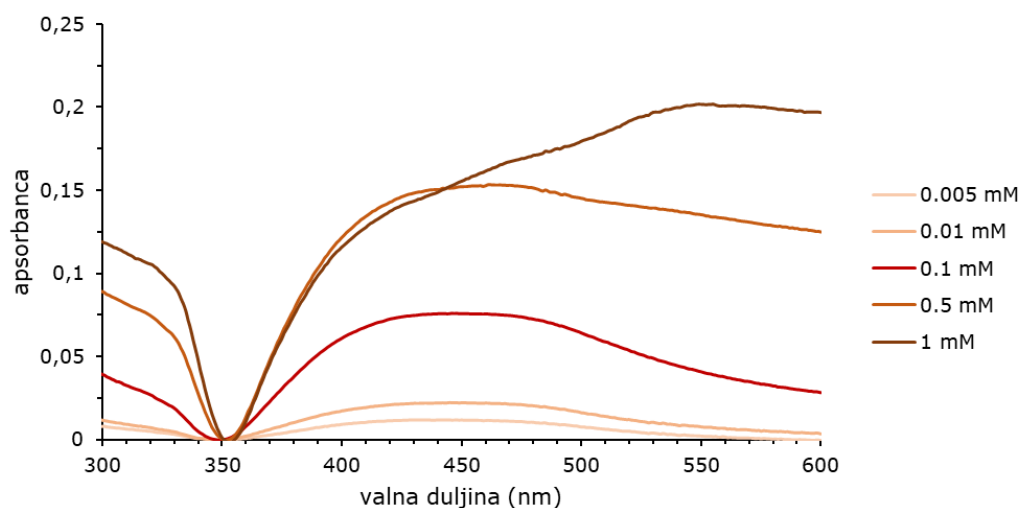
Slika 13. Apsorpcijski spektri **spoja 1** u vodi pri pH = 3, izmjereni nakon pripreme u ultrazvučnoj kupelji, u UV-Vis području valne duljine (300 - 800 nm) te rasponu koncentracije 0,005 – 1 mM (točne konc. prikazane u legendi) i temperaturi 298,15 K. Korištena je plastična kiveta (1 cm). Izmjereni spektri prikazani su nakon oduzimanja vrijednosti A pri 350 nm (minimum).





Slika 14. ApSORPCIJSKI spektri **spoja 1** u vodi pri pH = 5, izmjereni nakon pripreme u ultrazvučnoj kupelji, u UV-Vis području valne duljine (300 - 800 nm) te rasponu koncentracije 0,005 – 1 mM (točne konc. prikazane u legendi) i temperaturi 298,15 K. Korištena je plastična kiveta (1 cm). Izmjereni spektri prikazani su nakon oduzimanja vrijednosti A pri 350 nm (minimum).

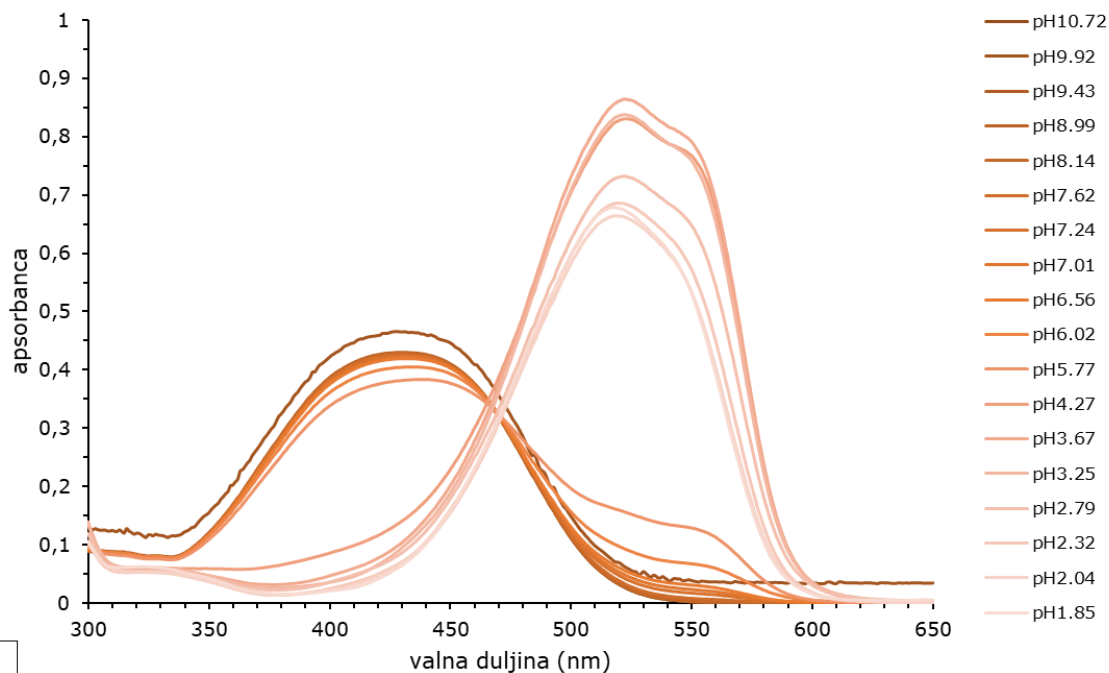
Vrijednosti maksimuma apsorbanca za **spoj 2** nalaze se u širokom području između 420 i 490 nm, dok se pri najvećoj izmjerenoj koncentraciji maksimum uočava pri 550 nm (Slika 15.).



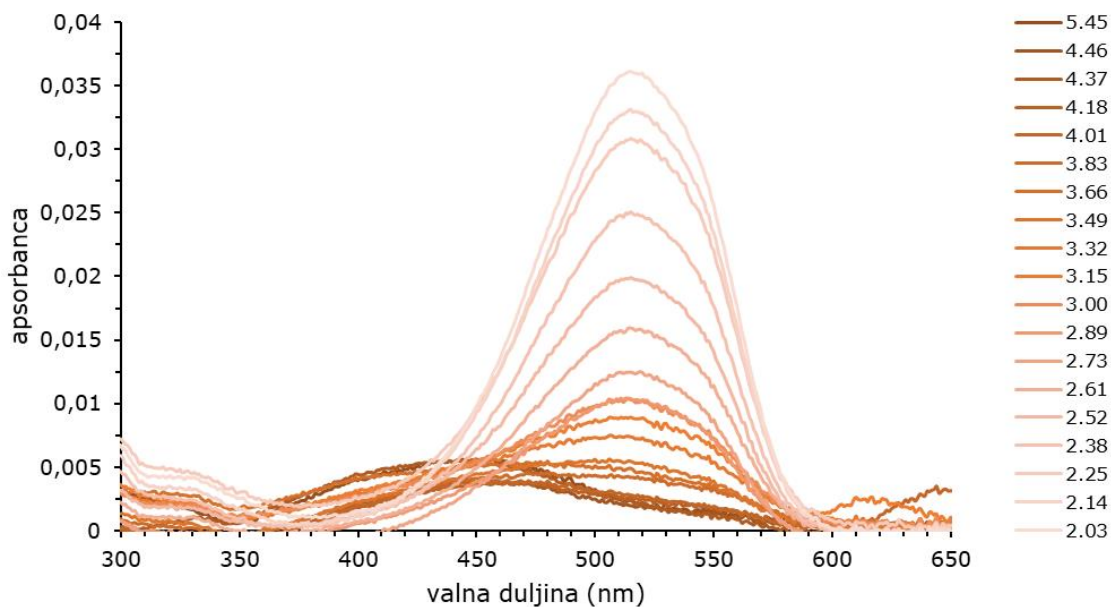
Slika 15. ApSORPCIJSKI spektri **spoja 2** u vodi pri pH = 3, izmjereni nakon pripreme u ultrazvučnoj kupelji, u UV-Vis području valne duljine (300 - 800 nm) te rasponu koncentracije 0,005 – 1 mM (točne konc. prikazane u legendi) i temperaturi 298,15 K. Korištena je plastična kiveta (1 cm). Izmjereni spektri prikazani su nakon oduzimanja vrijednosti A pri 350 nm (minimum).

Slika 16. prikazuje spektre izmjerene prilikom kiselinsko-bazne titracije za metil crveno (A) i **spoj 1** (B). Za otopine oba spoja, pri nižim pH vrijednostima, maksimumi se nalaze pri 522 nm. Za deprotoniranu formu MR uočavamo maksimum pri 432 nm, dok se kod **spoja 1** pojavljuje široki pojas u području od 410 nm do 460 nm, ali bitno slabijeg intenziteta. Za MR može se lako odrediti izozbestička točka pri 470 nm, a kod **spoja 1** ona nije jasno definirana te se već pri  $\text{pH} < 4,01$  maksimum pomiče prema većoj valnoj duljini, karakterističnoj za protoniranu formu MR. Vidljivo je i da su intenziteti apsorpcije dosta manji kod **spoja 1** u odnosu na MR.

A



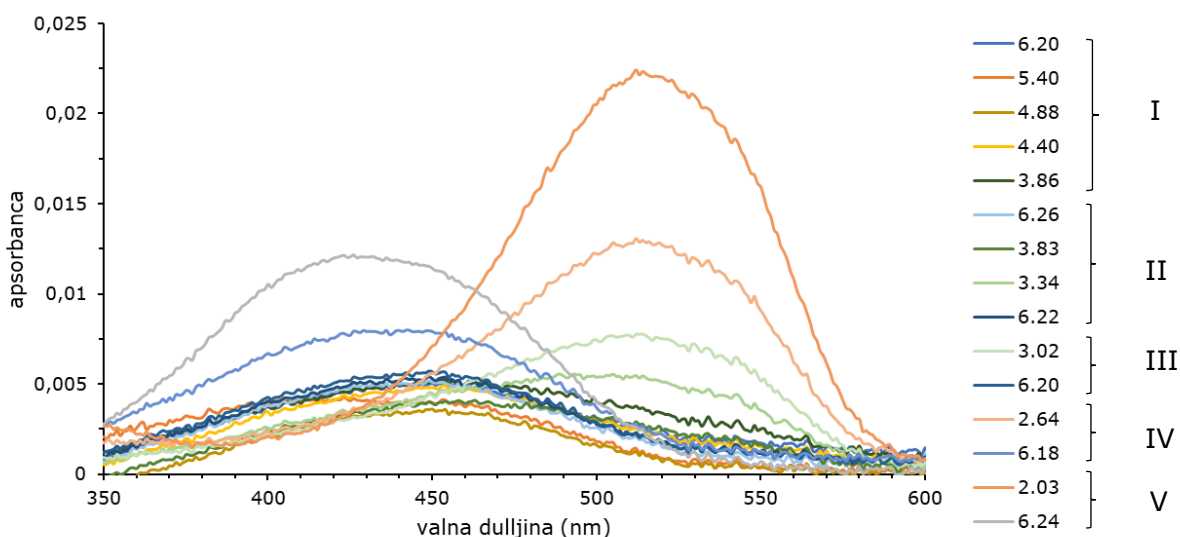
B



Slika 16. Apsorpcijski spektri metil-crvenog (A) i **spoja 1** (B), koncentracije 0,01 mM u vodenom mediju, izmjereni u UV-Vis području valne duljine (300 - 800 nm) pri variranim pH vrijednostima (prikazani u legendi), i ionskoj jakosti 10 mM (KCl) te temperaturi 298,15 K.

S ciljem provjere reverzibilnosti protonacije, izmjereni su apsorpcijski spektri **spoja 1** tijekom reverzne titracije u pH rasponu od 6 prema 2, pri čemu je

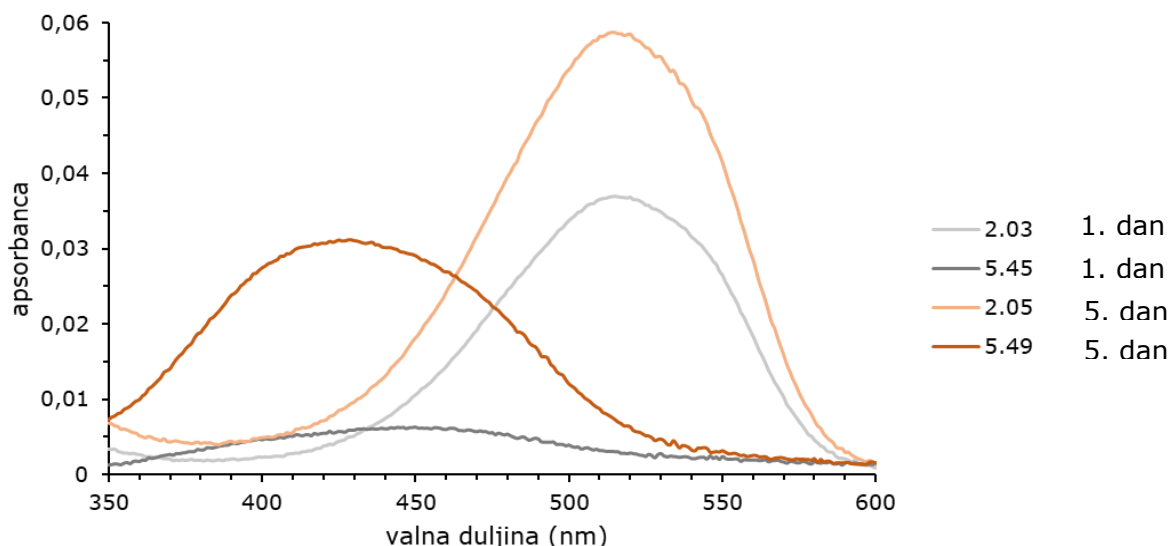
nakon svakog koraka u kojem je dodavana kiselina, pH vraćen na  $\text{pH} \approx 6$  dodatkom baze (Slika 17.). Spektri označeni nijansama plave boje prikazuju spektre pri  $\text{pH} \approx 6$  te se oni preklapaju za sve korake pri kojima je pH podešavan na vrijednosti  $\geq 3,02$ . Također uočavamo da se nakon dva koraka u kojima je pH podešavan dodatkom kiseline na  $\text{pH} \leq 3,02$ , spektri pri  $\text{pH} \approx 6$  više ne podudaraju s prethodno mjerenima. Također, spektri izmjereni u I fazi se uglavnom podudaraju, bez obzira na to da je pH variran u području 6,20 – 3,86, dok se u II, III, IV i V fazi, u kojoj je pH podešavan na vrijednosti  $\leq 3,34$ , uočava pojava spektara koji su karakteristični za protoniranu formu MR. Moguće je zaključiti da protonacija **spoja 1** izostaje pri  $\text{pH} \geq 3,83$ , dok pri nižim vrijednostima, nije reverzibilna.



Slika 17. Apsorpcijski spektri **spoja 1** ( $c = 10 \mu\text{M}$ ) izmjereni u UV-Vis području valne duljine (300 - 800 nm) pri variranim pH vrijednostima (prikazani u legendi) i temperaturi 298,15 K, mjereni tijekom reverzne titracije. Jednake boje pokazuju približno jednake pH vrijednosti.

S ciljem potvrde gore navedenog zaključka o reverzibilnosti protonacije **spoja 1**, reverzna titracija je ponovo provedena uz dulji period stajanja otopine pri  $\text{pH} \approx 2$ . Spektri izmjereni pri  $\text{pH} \approx 5,5$  i  $\text{pH} \approx 2$  prikazani su u Slici 18., u kojoj je označeno i vrijeme mjerenja. Maksimalna apsorbanca za  $\text{pH} \approx 2$  prvog i

petog dana iznosi 515 nm, dok je pri pH  $\approx 5,5$  prvog dana na 450 nm, a petog dana je došlo do pomaka na manju valnu duljinu, odnosno na 429 nm.



Slika 18. Apsorpcijski spektri **spoja 1** ( $c = 10 \mu\text{M}$ ) izmjereni u UV-Vis području valne duljine (300 - 800 nm) pri različitim pH vrijednostima (prikazani u legendi) i temperaturi 298,15 K. Spektri su mjereni dva puta u razmaku od pet dana (siva boja – prvi dan, narančasta boja – peti dan).

#### 4.2. Mjerenje veličine agregata tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti

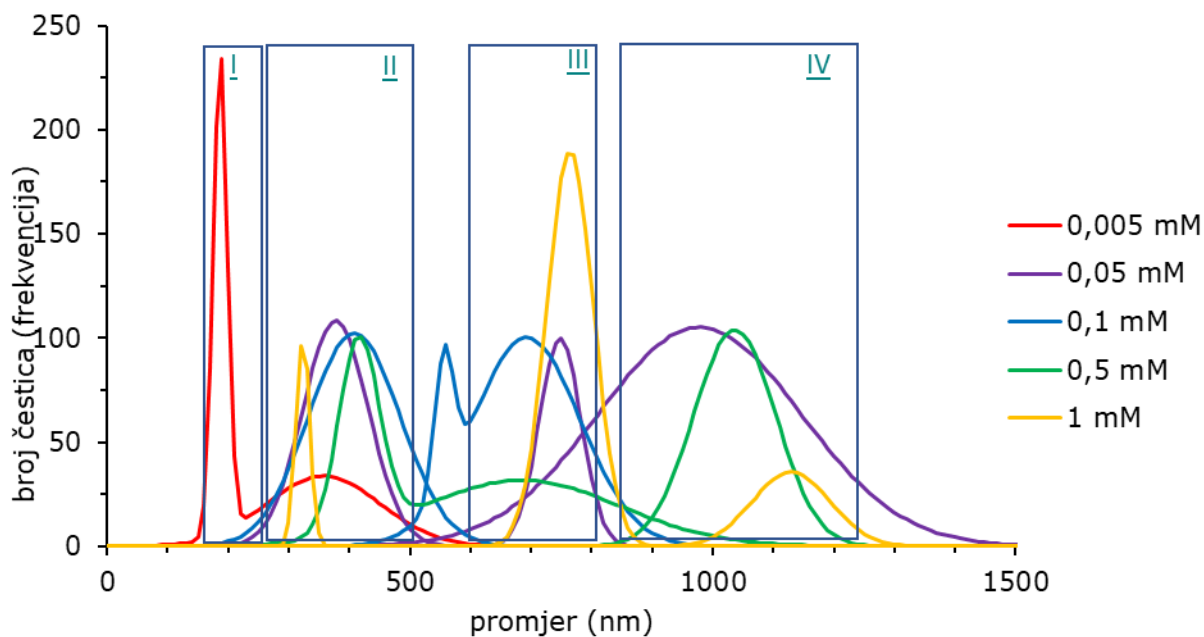
Tehnikom dinamičkog raspršenja svjetla (DLS) izmjerene su raspodjele promjera agregata prisutnih u vodenim suspenzijama **spoja 1** i **spoja 2** različitih koncentracija i pH vrijednosti, a sve s ciljem istraživanja utjecaja tih parametara na proces samonakupljanja. Osim istraživanja prisutnosti i veličine stvorenih agregata u vodenim otopinama, promatrana je i stabilnost agregata u vremenu pri konstantnim termodinamičkim uvjetima, pa je mjerenje ponovljeno s vremenskim razmakom od tjedan dana. U svim grafovima prikazane su raspodjele promjera čestica utegnute prema njihovom broju, koje su računski (u software-u za obradu mjerenih podataka) dobivene

iz eksperimentalnih raspodjela utegnutih prema intenzitetu raspršenog zračenja, izračunatih iz direktno mjerenih autokorelacijskih funkcija primjenom CONTIN metode. Prikazane funkcije su uni- ili bimodalne Gaussove raspodjele izračunate metodom najmanjih kvadrata iz eksperimentalnih podataka. Preklapanjem tih jednostavnih funkcija lagano je uočiti i raspodjele s više moda (npr. trimodalne), ukoliko proizlaze iz mjerenih podataka.

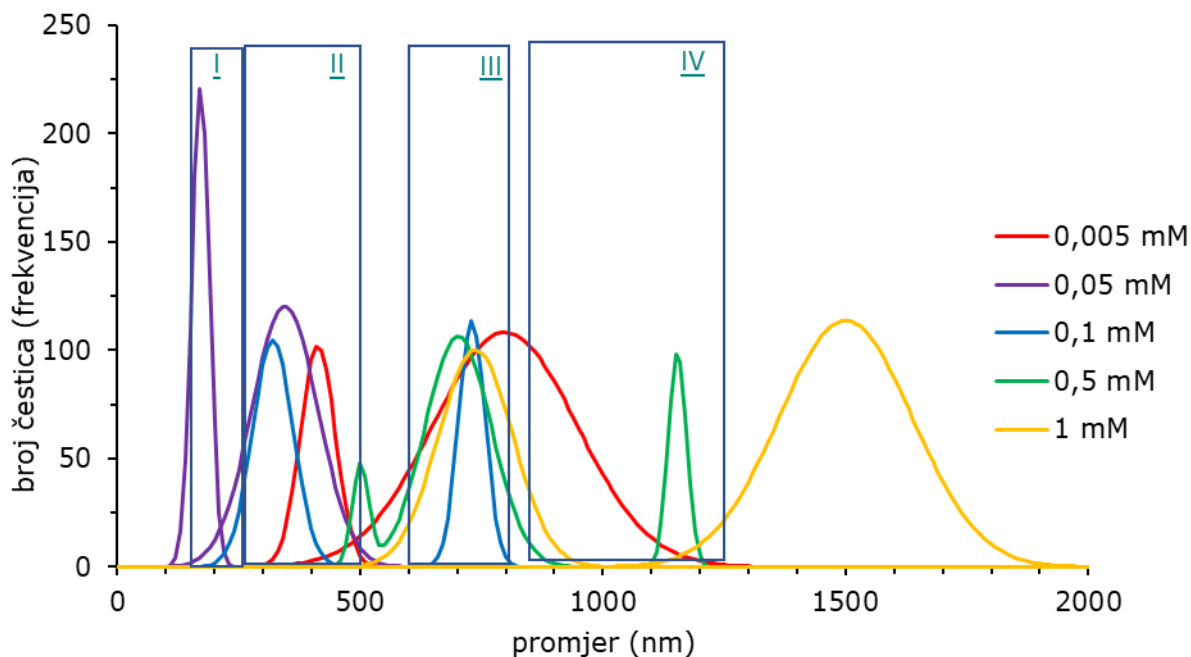
Slike 19. i 20. prikazuju raspodjelu veličina agregata **spoja 1** u koncentracijskom rasponu od 0,005 – 1 mM pri pH = 3, odnosno pH = 5, dok Slika 21. prikazuje raspodjelu promjera agregata za **spoj 2**, u koncentracijskom rasponu 0,005 – 1 mM, pri pH = 3. Mode raspodjela veličine agregata nalaze se pri otprilike 200, 400, 700 i 1000 nm za obje pH vrijednosti. Pri pH = 5 detektirani su i agregati veličine oko 1400 – 1500 nm (Tablica 2.). Pri najmanjoj mjerenoj koncentraciji **spoja 1**, detektirana je bimodalna raspodjela, s populacijama u rasponu promjera 170 – 210 nm, odnosno 313 – 460 nm, pri čemu prva populacija ima užu raspodjelu. Pri koncentraciji od 0,05 mM detektirani su također promjeri oko 400 nm, kao i agregati u rasponu promjera 870 – 1140 nm. Pri ostalim koncentracijama pri pH = 3, s većom frekvencijom su čestice promjera 408 i 680 nm (za 0,1 mM) te 416 i 1036 nm, a manjom frekvencijom promjeri od 684 nm (za 0,5 mM). Pri najvećoj koncentraciji od 1 mM detektirane su čestice promjera 766 i 1030 nm, ali su se i pojavili agregati veličine oko 324 nm.

Iz Slike 19. moguće je razaznati da se mode raspodjela, izmjerene pri različitim koncentracijama, nalaze u nekoliko pojaseva („zona“): I) 170 – 250 nm; II) 250 – 500 nm; III) 600 – 800 te IV) 850 – 1250 nm. Pri najnižoj koncentraciji (0,005 mM), uočavamo bimodalnu raspodjelu za koju se prva moda nalazi u zoni I, a druga u zoni II. Raspodjele pri 0,05 mM, 0,5 mM i 1 mM pokazuju tri mode u zonama II, III i IV, dok raspodjela pri 0,1 mM pokazuje dvije „glavne“ mode u zonama II i III, te jednu slabije izraženu

između tih dviju zona. Također je moguće uočiti da izraženost moda, za koncentracije 0,05 mM, 0,5 mM i 1 mM, poprima obrnuti trend u III i IV zoni.



Slika 19. Raspodjela promjera agregata **spoja 1** u rasponu koncentracije 0,005 – 1 mM (prikazanih u legendi), pri pH = 3 i temperaturi od 298,15 K. Gaussove funkcije su metodom najmanjih kvadrata određene iz eksperimentalnih, brojem utegnutih raspodjela promjera.



Slika 20. Raspodjela promjera agregata **spoja 1** u rasponu koncentracije 0,005 – 1 mM (prikazanih u legendi), pri pH = 5 i temperaturi od 298,15 K. Gaussove funkcije su metodom najmanjih kvadrata određene iz eksperimentalnih, brojem utegnutih raspodjela promjera.

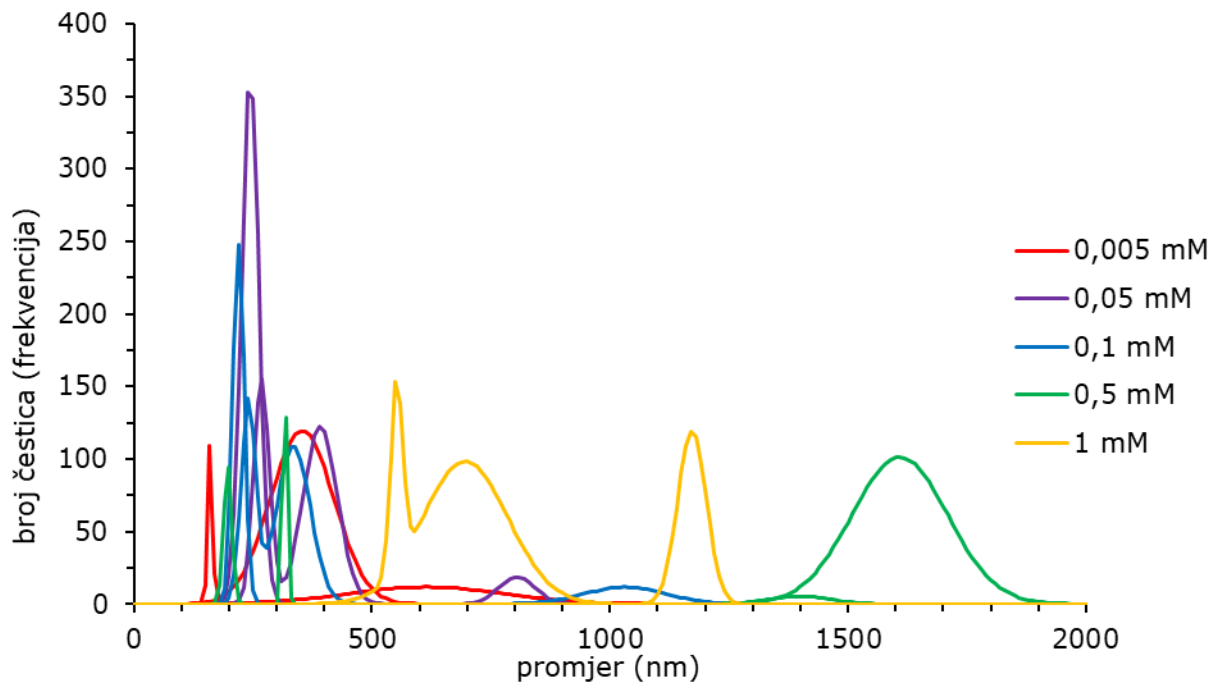
Iz Slike 20. moguće je uočiti da pri pH = 5,0 raspodjele agregata po promjeru pokazuju vrlo slične zone moda, kao i pri pH = 3, no uz ponešto različite trendove s obzirom na koncentraciju **spoja 1**. Također, pri koncentraciji 1 mM, uočljiva je i populacija s modom oko 1500 nm.



Tablica 2. Srednje vrijednosti moda veličine detektiranih agregata ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ) pri različitim koncentracijama **spoja 1** i pH vrijednostima, standardne devijacije ( $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ) za svaku detektiranu populaciju vezikula, kao i ukupnim brojem vezikula ispod Gaussove krivulje (N).

	<b>c (mM)</b>	<b>N</b>	<b><math>\mu_1</math> (nm)</b>	<b><math>\mu_2</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_1</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_2</math> (nm)</b>
<b>pH = 3</b>	<b>0,005</b>	246,00	<b>187,01</b>	<b>357,20</b>	11,63	93,45
		225,66	<b>377,40</b>		54,29	
	<b>0,05</b>	134,50	<b>748,03</b>		34,66	
		133,37	<b>978,19</b>		166,95	
	<b>0,1</b>	186,00	<b>408,07</b>		76,13	
		350,26	<b>556,48</b>	<b>692,41</b>	15,82	88,76
	<b>0,5</b>	243,49	<b>415,80</b>	<b>683,94</b>	33,43	164,14
		630,73	<b>1036,11</b>		67,81	
	<b>1</b>	175,04	<b>764,45</b>		38,51	
		131,21	<b>323,47</b>	<b>1129,40</b>	11,20	64,08
<b>pH = 5</b>	<b>0,005</b>	238,80	<b>798,37</b>		148,05	
		399,24	<b>412,95</b>		35,83	
	<b>0,05</b>	228,8	<b>345,09</b>		67,87	
		155,94	<b>171,70</b>		18,31	
	<b>0,1</b>	130,73	<b>730,14</b>		27,81	
		192,17	<b>320,40</b>		42,07	
	<b>0,5</b>	107,51	<b>1153,79</b>		18,99	
		190,36	<b>500,45</b>	<b>701,88</b>	17,32	68,69
	<b>1</b>	138,71	<b>737,84</b>		76,43	
		123,90	<b>1500,00</b>		137,35	

Kod **spoja 2** (Slika 21., Tablica 3.), uočljiva je dominantna prisutnost agregata promjera manjeg od 500 nm za koncentracije  $\leq 0,1$  mM. Pri koncentracijama  $\geq 0,5$  mM, detektirane su i mode pri većim promjerima agregata. Nadalje, za **spoj 2** nisu uočljive zone u kojima bi se preklapale mode detektirane za različite koncentracije, već se za koncentracije  $\leq 0,1$  mM mode preklapaju u širem području  $100 \text{ nm} \leq d \leq 500 \text{ nm}$ .



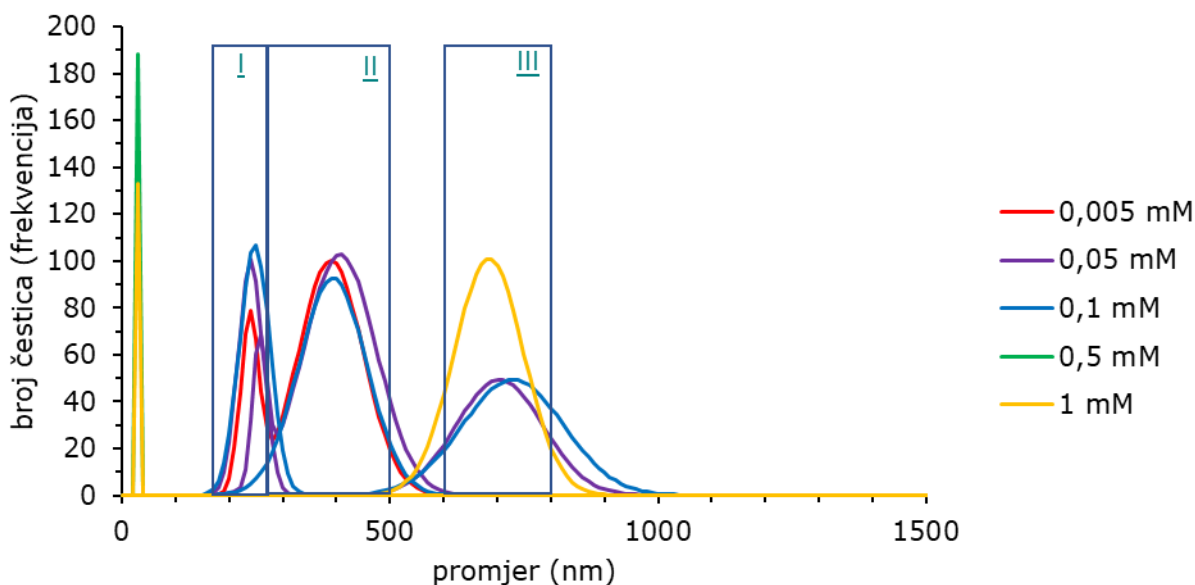
Slika 21. Raspodjela promjera agregata **spoja 2** u rasponu koncentracije 0,005 – 1 mM (prikazanih u legendi), pri pH = 3 i temperaturi od 298,15 K. Gaussove funkcije su metodom najmanjih kvadrata određene iz eksperimentalnih, brojem utegnutih raspodjela promjera.

Tablica 3. Srednje vrijednosti moda veličine detektiranih agregata ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ) pri različitim koncentracijama **spoja 2** i pH vrijednostima, standardne devijacije ( $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ) za svaku detektiranu populaciju vezikula, kao i ukupnim brojem vezikula ispod Gaussove krivulje (N).

	<b>c (mM)</b>	<b>N</b>	<b><math>\mu_1</math> (nm)</b>	<b><math>\mu_2</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_1</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_2</math> (nm)</b>
<b>pH = 3</b>	<b>0,005</b>	246,02	<b>353,52</b>		67,13	
		134,87	<b>160,59</b>	<b>614,41</b>	5,12	163,82
	<b>0,05</b>	281,72	<b>268,01</b>	<b>391,51</b>	16,48	36,34
		260,86	<b>244,58</b>	<b>804,83</b>	18,34	38,61
	<b>0,1</b>	255,28	<b>240,37</b>	<b>334,97</b>	15,37	35,72
		219,37	<b>219,81</b>	<b>1031,99</b>	11,88	85,99
	<b>0,5</b>	100,00	<b>316,72</b>		4,97	
		107,40	<b>197,18</b>	<b>1398,54</b>	8,49	63,72
		153,12	<b>1608,71</b>		100,87	
	<b>1</b>	154,21	<b>1172,66</b>		30,16	
		526,89	<b>552,33</b>	<b>696,30</b>	12,48	89,40

S ciljem provjere stabilnosti agregata, raspodjele njihovih promjera za suspenzije **spoja 1** i **spoja 2** ponovno su izmjerene nakon tjedan dana stajanja pripremljenih uzoraka pri sobnoj temperaturi. Osim toga, pripremljene su suspenzije manje koncentracije **spoja 2** s ciljem detekcije kritične koncentracije pri kojoj nastaju agregati (kritična koncentracija agregacije). Iz rezultata prikazanih na Slici 22. i Tablice 4. za **spoj 1**, moguće je uočiti da se nakon 7 dana mode raspodjela za uzorke različitih koncentracija puno jasnije podudaraju u strože određenim područjima promjera čestica, u Slici 22. označene zonama. Te zone se gotovo u potpunosti podudaraju sa zonama raspodjele, uočenim za **spoj 1** odmah nakon pripreme uzoraka (Slika 19). Međutim, nakon stajanja uzoraka, u raspodjelama pri koncentracijama  $\geq$

0,5 mM, jasno je detektirana i populacija čestica s vrlo uskom raspodjelom promjera pri cca. 30 nm.

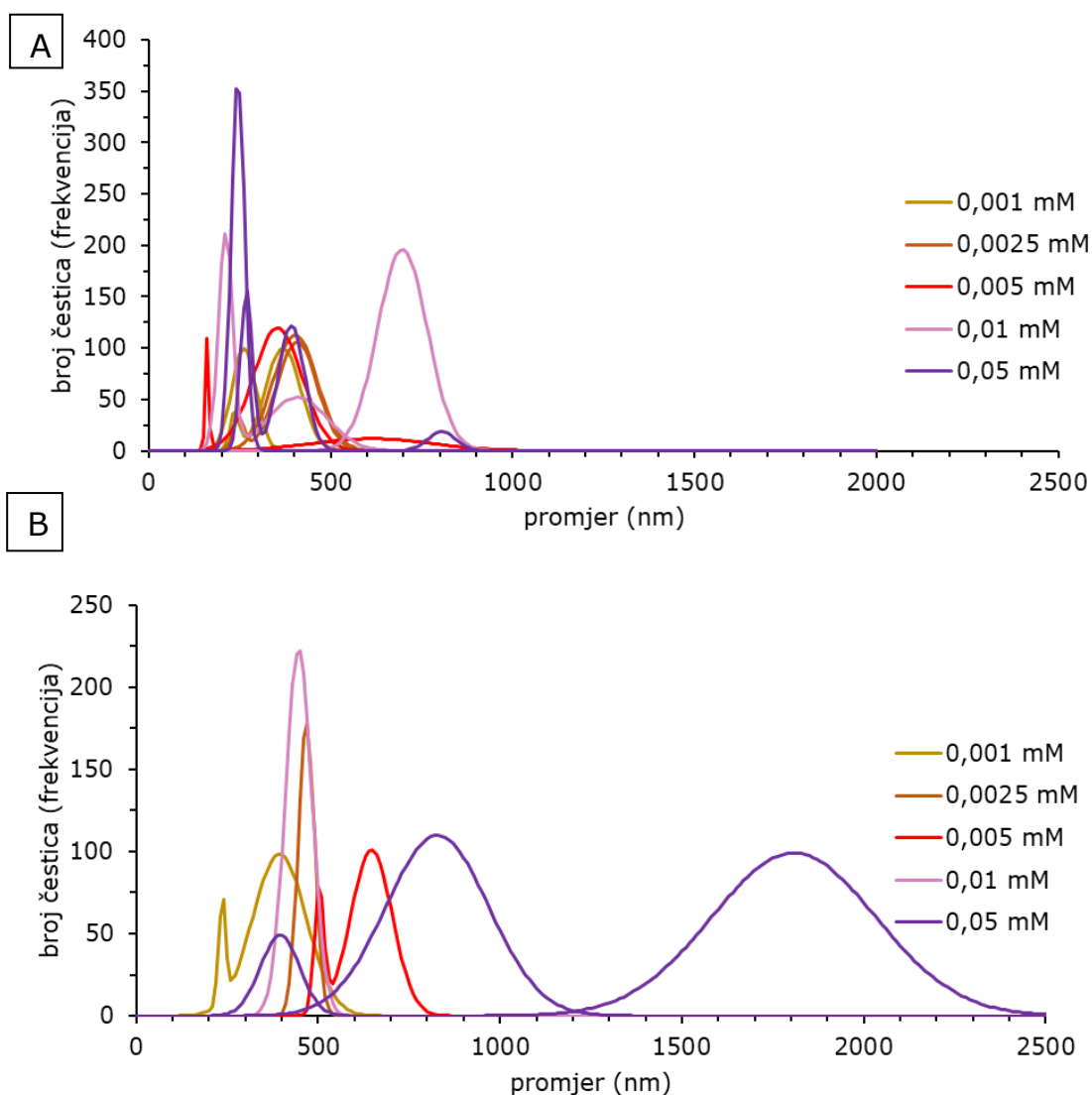


Slika 22. Raspodjela promjera agregata **spoja 1** u rasponu koncentracije 0,005 – 1 mM (prikazanih u legendi), mjenjenih nakon 7 dana, pri pH = 3, i temperaturi od 298,15 K. Gaussove funkcije su metodom najmanjih kvadrata određene iz eksperimentalnih, brojem utegnutih raspodjela promjera

Tablica 4. Srednje vrijednosti moda veličine detektiranih agregata ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ) pri različitim koncentracijama **spoja 1** nakon tjedan dana pri pH = 3, standardne devijacije ( $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ) za svaku detektiranu populaciju vezikula, kao i ukupnim brojem vezikula ispod Gaussove krivulje (N).

	<b>c (mM)</b>	<b>N</b>	<b><math>\mu_1</math> (nm)</b>	<b><math>\mu_2</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_1</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_2</math> (nm)</b>
<b>pH = 3</b>	<b>0,005</b>	260,73	<b>249,23</b>	<b>390,52</b>	25,05	60,34
	<b>0,05</b>	232,77	<b>256,52</b>	<b>406,65</b>	13,01	68,01
		297,94	<b>240,03</b>	<b>704,00</b>	23,14	80,92
	<b>0,1</b>	228,69	<b>393,39</b>		63,01	
		334,93	<b>247,51</b>	<b>729,40</b>	28,24	94,21
	<b>0,5</b>	127,92	<b>28,59</b>		1,00	
	<b>1</b>	101,52	<b>30,63</b>		1,00	
		158,26	<b>684,49</b>		64,68	

Usporedbom raspodjela promjera agregata za **spoj 2**, izmjerenih prvog i sedmog dana nakon pripreve suspenzija, prikazanih u Slici 23., moguće je uočiti da se i nakon sedam dana pojavljuju agregati veličine do 500 nm, no da su te raspodjele ipak pomaknute prema većim promjerima. Prvog dana su veličine od 160 – 270 nm detektirane i kod većih koncentracija, ali nakon sedam dana su pri većim koncentracijama mode raspodjele detektirane pri promjeru  $\geq 370$  nm.



Slika 23. Raspodjela promjera agregata **spoja 2** u rasponu koncentracije 0,001 – 0,05 mM (prikazanih u legendi), mjerenih prvi dan (A) i nakon 7 dana (B), pri pH = 3, i temperaturi od 298,15 K. Gaussove funkcije su metodom najmanjih kvadrata određene iz eksperimentalnih, brojem utegnutih raspodjela promjera.

Vidljiva je i razlika u tome što su se nakon sedam dana pojavile veći agregati od oko 828 nm i 1807 nm. Zanimljivo opažanje je da za **spoj 2** nije uočena populacija pri cca. 30 nm, već su nakon sedam dana, sve mode pomaknute prema većem promjeru.

Tablica 5. Srednje vrijednosti moda veličine detektiranih agregata ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ) pri različitim koncentracijama **spoja 2** mjerenih odmah nakon pripreme, pri pH = 3, standardne devijacije ( $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ) za svaku detektiranu populaciju vezikula, kao i ukupnim brojem vezikula ispod Gaussove krivulje (N).

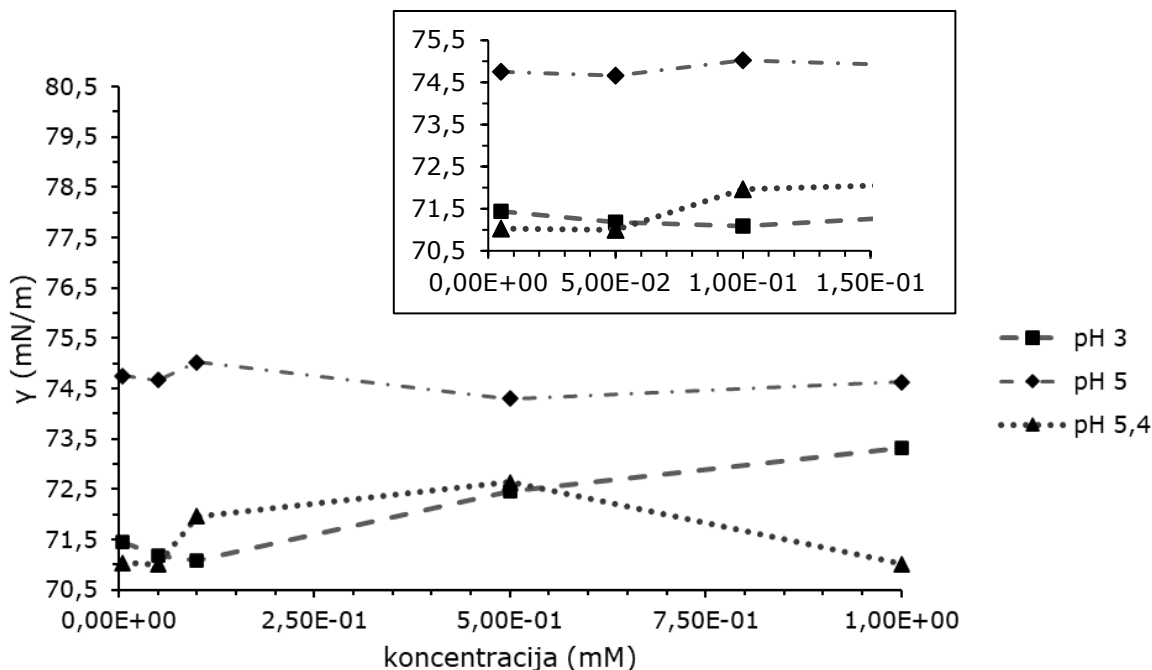
	<b>c (mM)</b>	<b>N</b>	<b><math>\mu_1</math> (nm)</b>	<b><math>\mu_2</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_1</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_2</math> (nm)</b>
<b>pH = 3</b>	<b>0,001</b>	221,25	<b>261,02</b>		33,22	
		151,61	<b>405,38</b>		64,04	
	<b>0,025</b>	164,05	<b>245,56</b>	<b>407,45</b>	14,62	55,24
		278,82	<b>402,27</b>		60,69	
	<b>0,005</b>	246,02	<b>353,52</b>		67,13	
		134,87	<b>160,59</b>	<b>614,41</b>	5,12	163,82
	<b>0,01</b>	186,03	<b>696,89</b>		68,22	
		229,73	<b>210,66</b>	<b>409,03</b>	19,34	81,38
	<b>0,05</b>	281,72	<b>268,01</b>	<b>391,51</b>	16,48	36,34
		260,86	<b>244,58</b>	<b>804,83</b>	18,34	38,61

Tablica 6. Srednje vrijednosti moda veličine detektiranih agregata ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ) pri različitim koncentracijama **spoja 2** mjerenih nakon 7 dana, pri pH = 3, standardne devijacije ( $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ) za svaku detektiranu populaciju vezikula, kao i ukupnim brojem vezikula ispod Gaussove krivulje (N).

	<b>c (mM)</b>	<b>N</b>	<b><math>\mu_1</math> (nm)</b>	<b><math>\mu_2</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_1</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_2</math> (nm)</b>
<b>pH = 3</b>	<b>0,001</b>	297,74	<b>258,79</b>	<b>402,49</b>	18,23	46,57
	<b>0,025</b>	142,77	<b>467,59</b>		22,59	
	<b>0,005</b>	245,90	<b>503,10</b>	<b>646,54</b>	13,21	57,11
	<b>0,01</b>	151,27	<b>446,42</b>		36,37	
	<b>0,05</b>	272,12	<b>395,13</b>	<b>1807,46</b>	54,05	225,76
		193,37	<b>827,57</b>		141,00	

### 4.3. Mjerenje površinske napetosti sintetiziranih derivata metil crvenog

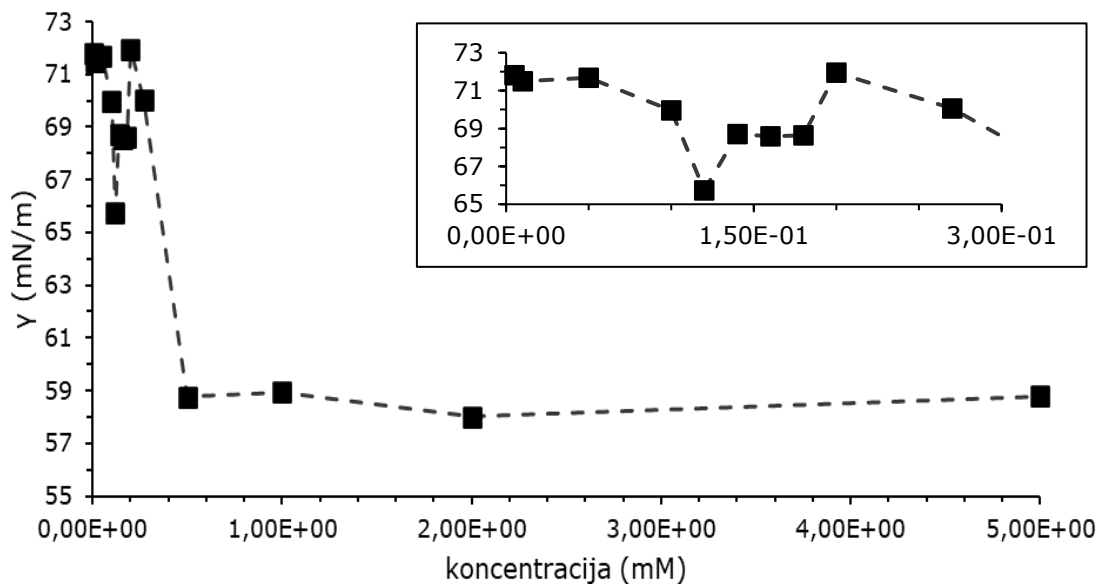
Kako bi se istražila površinska aktivnost sintetiziranih derivata boje metil crveno, izmjerena je površinska napetost na granici faza voda/zrak u ovisnosti o koncentraciji suspenzije **spoja 1** pri različitim pH vrijednostima (pH = 3, 5, 5,4). Za **spoj 2** je isti eksperiment proveden pri nižoj pH vrijednosti (pH = 3). Sintetizirani derivati dispergirani su pomoću ultrasonične kupelji u ultračistoj vodi u kojoj je podešen pH. Za kontrolu eksperimentalnih uvjeta, prije mjerenja površinske napetosti za pripremljene suspenzije, izmjerena je i površinska napetost čiste vode, koja iznosi otprilike 72 – 73 mN/m, što je u skladu s literaturnom vrijednošću [31]. Za **spoj 1** vidljivo je da površinska napetost varira između 70 i 75 mN/m pri svim pH vrijednostima (Slika 24.). Pri nižim koncentracijama **spoja 1**, površinska napetost za pH = 3 i pH = 5,4 iznosi između 71 i 72 mN/m, dok pri većoj koncentraciji od 1 mM, površinska napetosti pri pH = 3 se povećala i iznosi 73,3 mN/m, a pri pH = 5,4 iznosi 71,0 mN/m. Vrijednosti površinske napetosti pri pH = 5 su nešto veće i iznose između 74,3 i 75,0 mN/m pri svim izmjerenim koncentracijama.



Slika 24. Ovisnost površinske napetosti voda/zrak o koncentraciji **spoja 1** u koncentracijskom rasponu od 0,005 - 1 mM pri različitim pH vrijednostima (prikazanim u legendi). Umetak prikazuje vrijednosti pri nižim koncentracijama. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 10 ponovljenih mjerenja.

Za **spoj 2** izmjerena je površinska napetost u koncentracijskom rasponu od 0,005 mM do 5 mM (Slika 25.). Pri najmanjim koncentracijama, površinska napetost približno je jednaka površinskoj napetosti vode. U koncentracijskom rasponu 0 – 0,2 mM, uočljiv je trend smanjenja površinske napetosti, no pri nešto većim koncentracijama, u rasponu 0,2-0,5 mM, površinska napetost ponovo poprima veće vrijednosti između 68 mN/m i 71,9 mN/m. Pri koncentracijama **spoja 2** većim od 0,5 mM, površinska napetost iznosi oko 58 mN/m i ne ovisi o koncentraciji.

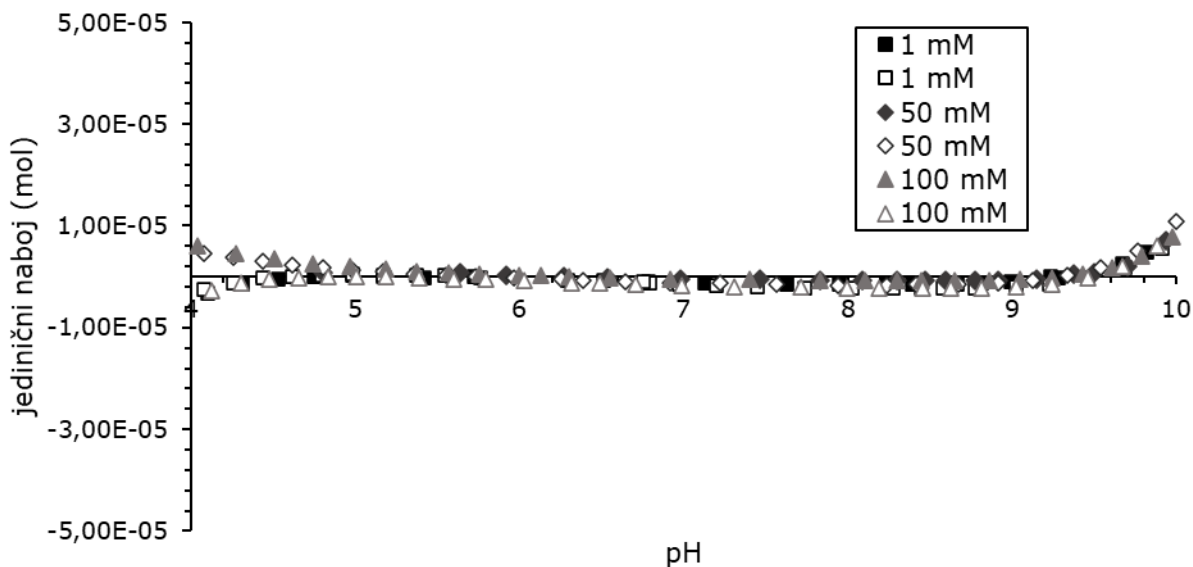




Slika 25. Ovisnost površinske napetosti voda/zrak o koncentraciji **spoja 2** u koncentracijskom rasponu od 0,005 - 5 mM pri pH = 3. Umetak prikazuje rezultate pri nižim koncentracijama. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 10 ponovljenih mjerenja.

#### 4.4. Potenciometrijska titracija spoja 1

Iz potenciometrijske titracije **spoja 1** pri ionskim jakostima od 10 mM, 50 mM i 100 mM izračunata je krivulja naboja prikazana u Slici 26. koja pokazuje da ne dolazi do protonacije ili deprotonacije spoja u rasponu  $4 \leq \text{pH} \leq 10$ . Izvan ovog raspona, nije moguće pouzdano odrediti naboj molekule zbog ograničenja u preciznosti mjerenja pH.



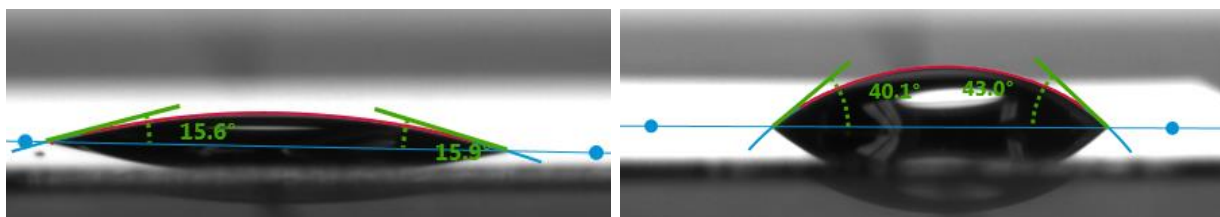
Slika 26. Krivulje naboja **spoja 1** ( $n=79 \mu\text{mol}$ ), pri različitim ionskim jakostima (prikazanim u legendi) izmjerene u titracijama u pH rasponu 4 - 10. Ispunjeni simboli prikazuju titraciju od pH 4 do pH 10, a prazni oblici titraciju unatrag (pH 10 do pH 4).

#### 4.5. Vežanje sintetiziranih spojeva na silanizirana stakalca i mjerenje kontaktnog kuta

Uspješnost uklanjanja nečistoća i jetkanost stakla, kao i vežanje silana kojim je hidrofobizirana njegova površina, provjereni su mjerenjem kontaktnog kuta, koji je određen metodom tangente u dvjema trojnim točkama (kontakt triju faza: površina/voda/zrak). Na Slici 27. lijevo je prikazana kapljica vode i kontaktni kut na čistom jetkanom staklu, koji iznosi  $15,06^\circ$ . Kontaktni kut također je provjeren nakon 45 min uranjanja stakalca u 0,02 % otopinu trimetoski(oktadecil) silana te naknadnog ispiranja metanolom i vodom, nakon čega on iznosi oko  $41^\circ$  (Slika 27. desno). Time je potvrđeno da je došlo do kovalentnog vežanja trimetoski(oktadecil)skupina na površinu stakalca.

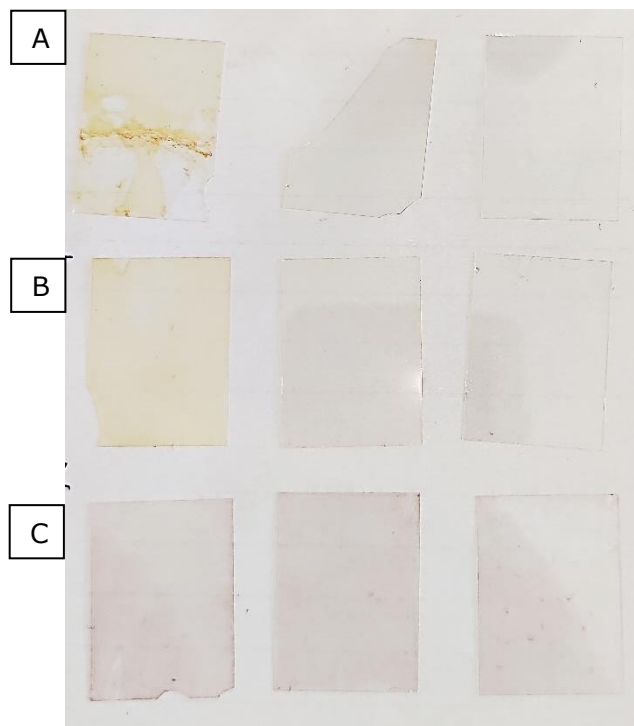
Tablica 7. Vrijednosti kontaktnih kuteva ( $^{\circ}$ ) običnog stakalca, nakon jetkanja i nakon silanizacije. Vrijednosti su prikazane kao prosjek 10 mjerenja sa standardnom devijacijom.

Obično staklo	Jetkano staklo	Silanizirano staklo
$55,94 \pm 0,39$	$15,6 \pm 0,29$	$41,08 \pm 0,23$

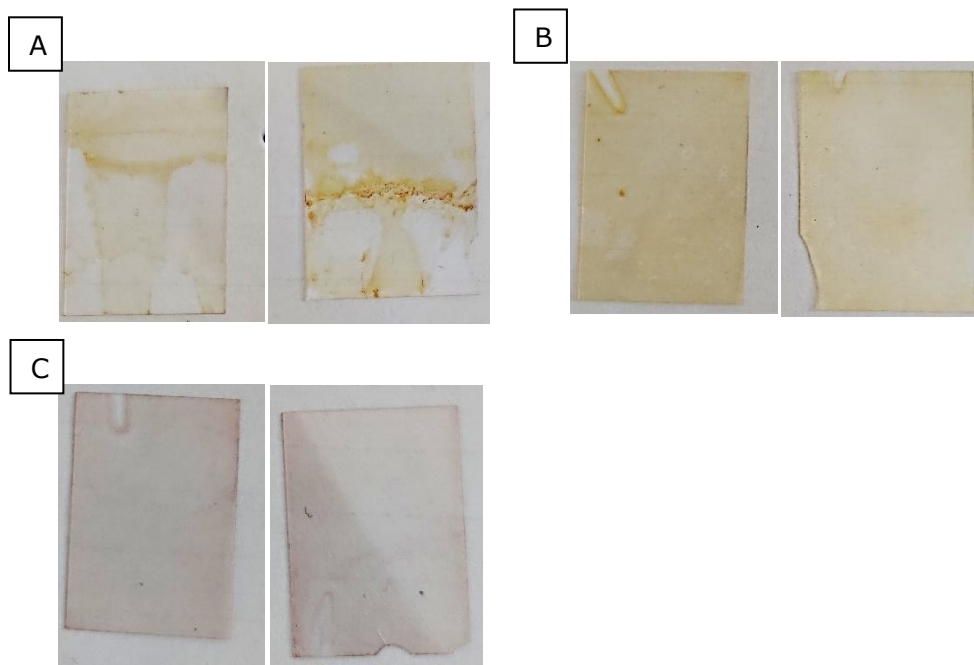


Slika 27. Prikaz kapljice tijekom mjerenja kontaktnog kuta nakon jetkanja stakalca (lijevo) i silanizacije stakalca (desno).

Slika 28. prikazuje stakalca nakon uranjanja u otopine **spoja 1**, **spoja 2** i MR u metanolu, pri tri različite koncentracije. Usporedbom, može se uočiti da se i **spoj 1** i **spoj 2** pri najvećoj koncentraciji vežu na staklo, dok se MR veže pri svim trima koncentracijama, odnosno pri koncentraciji 5 puta manjoj i 10 puta manjoj je više obojilo staklo u odnosu na **spoj 1** i **spoj 2**, kod kojih je jedva vidljivo njihovo vezanje tj. obojenje stakalca. Osim toga, u otopine su bile uronjena i samo jetkana stakalca, odnosno ona koja nisu prošla silanizaciju, te je također vidljivo da dolazi do obojenja i kod **spoja 1**, **spoja 2**, ali i kod MR-a (Slika 29.).

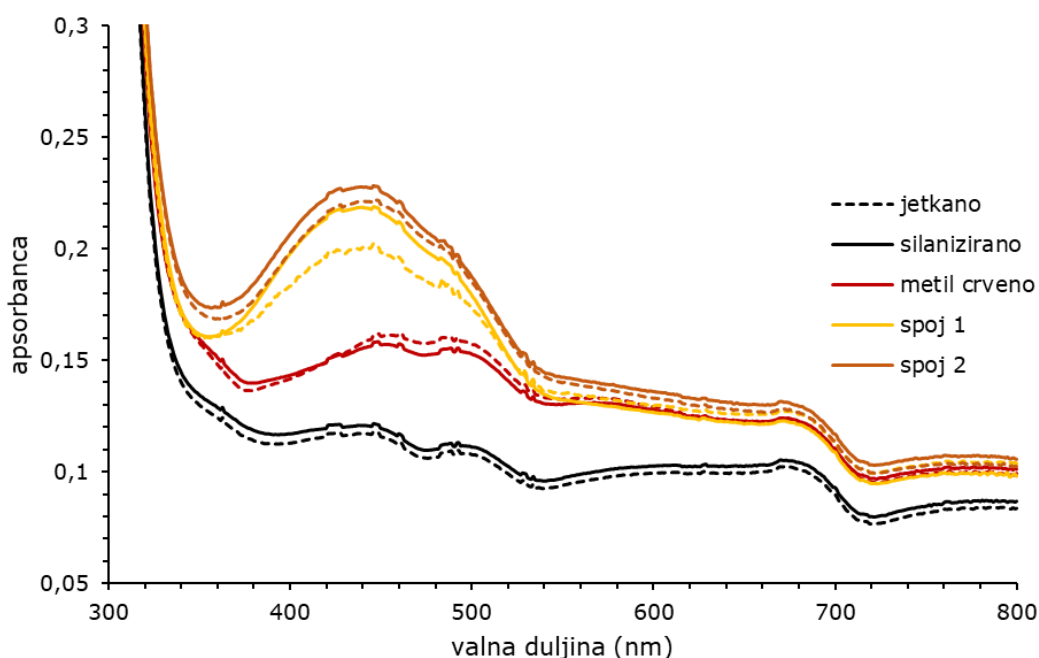


Slika 28. Stakalca nakon uranjanja u otopine **spoja 1** (A), **spoja 2** (B) i metil crvenog (C) pri ishodnoj koncentraciji (2,41 Mm), 5 puta manjoj koncentraciji i 10 puta manjoj koncentraciji (s lijeva na desno).



Slika 29. Usporedba stakalca nakon jetkanja (lijevo) i nakon silanizacije (desno) **spoja 1** (A), **spoja 2** (B) i metil crvenog (C). Stakalca su uronjena u otopine pri najvećoj (2,41 mM) koncentraciji.

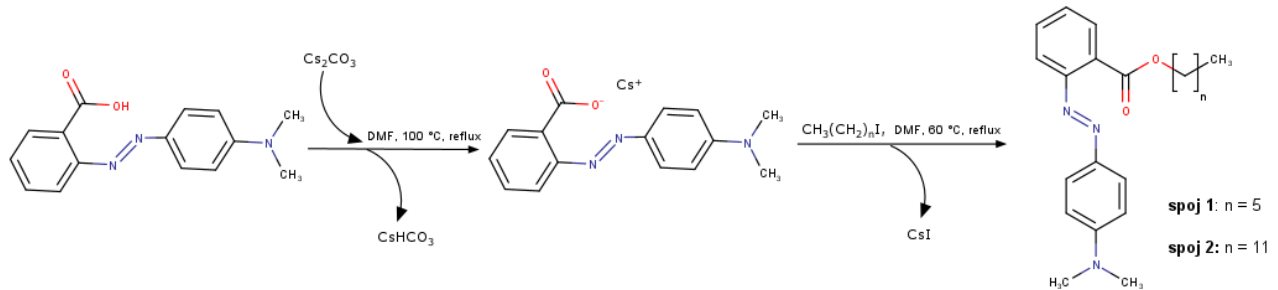
Snimljeni su apsorpcijski spektri nakon vezanja **spoja 1**, **spoja 2** i MR na jetkana (čista) i silanizirana stakalca, kao i samo silaniziranog i jetkanog stakla (Slika 30.). Rezultati pokazuju da nema razlike u apsorpciji između čistog i silaniziranog stakalca (crne linije na Slici 30.). Pri najvećim pripremljenim koncentracijama **spoja 1** i **spoja 2**, dolazi do pojave maksimuma na 445 nm, dok je MR pri najvećoj koncentraciji maksimum apsorpcije na 505 nm. Također je uočljivo da je apsorpcija stakalca sa **spojem 2** nešto veća. Iz usporedbe apsorpcijskih spektara moguće je zaključiti da je za oba sintetizirana spoja apsorpcija veća nego kod MR pri istoj koncentraciji otopina. Također, za **spoj 1** i **spoj 2** uočavamo veću apsorpciju, tj. površinsku koncentraciju, na silaniziranim stakalcima, u odnosu na nesilanizirana.



Slika 30. Apsorpcijski spektri jetkanih i silaniziranih stakalca nakon uranjanja u otopine metil crvenog, **spoja 1** i **spoja 2** u metanolu, pri koncentracijama 2,41 mM (ishodna konc.) na jetkanom stakalcu (crtkana linija) i na silaniziranom stakalcu (puna linija).

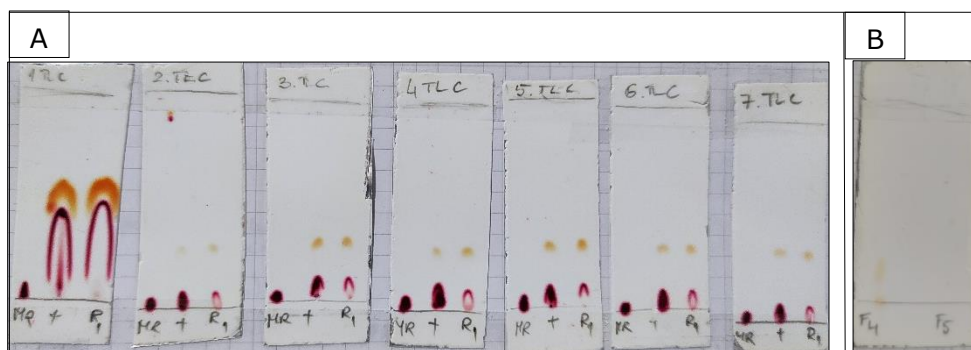
## 5. Rasprava

Sinteza oba derivata spoja MR temeljila se na nukleofilnoj supstituciji haloalkana na karboksilnu skupinu MR (Slika 31.), čime je lanac sa 6 C atoma i lanac s 12 C atoma vezan esterskom vezom na MR (**spoj 1**, odnosno **spoj 2**).



Slika 31. Reakcijska shema sinteze **spoja 1** i **spoja 2**.

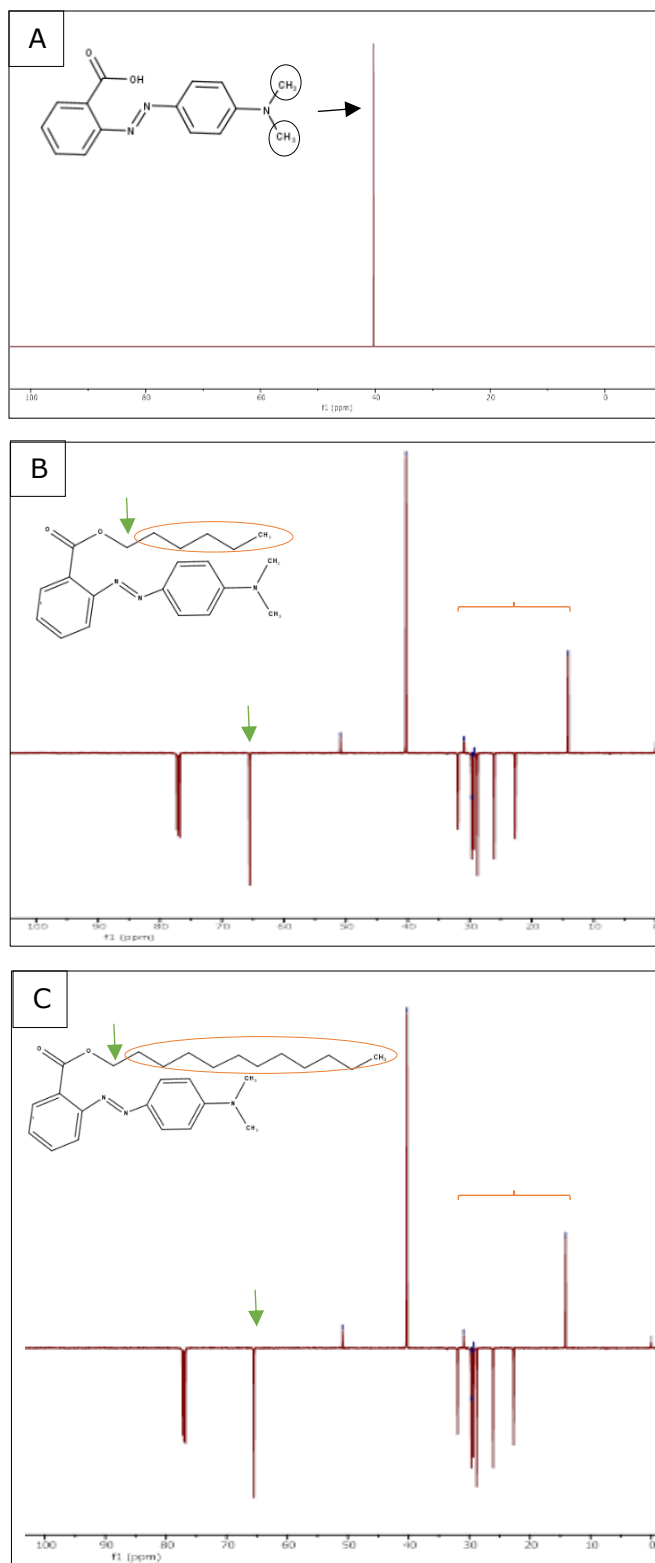
Sama sinteza **spoja 1** odvijala se brže od očekivanog, u odnosu na sintezu opisanu u radu Rokitskaye i suradnika, gdje je ukupna sinteza trajala i do 5 dana [28]. Za sintezu **spoja 1** bilo je dovoljno zagrijavanje i miješanje u vodenoj kupelji svega 5 sati. S obzirom da je provjera TLC-om potvrdila dobivanje produkta jednakim rezultatima na TLC pločicama (Slika 32., A), zagrijavanje više nije bilo potrebno te je tako reakcija puštena na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje do drugog dana. Dodatna provjera tijekom reakcije napravljena je drugog dana dvjema TLC pločicama, te je potvrđen kraj reakcije dobivanjem jednakih rezultata.



Slika 32. A) Prikaz TLC pločica kao potvrda dobivanja **spoja 1** gdje je uzorak uzet svakih sat vremena trajanja reakcije. Zadnje dvije pločice rezultat su odvijanja reakcije pri sobnoj temperaturi i uzimanja uzorka dan nakon pokretanja reakcije. B) TLC pločica s frakcijama (F4 i F5) **spoja 1** nakon kromatografije na stupcu i DCM-om kao eluensom.

Na TLC pločicama vidljivo je da ima zaostalog reaktanta, odnosno boje metil crveno koja ne izreagira do kraja s cezijevim karbonatom već se dobije manja količina smjese cezijeve soli i MR, što može biti razlog i dobivanja manjeg iskorištenja konačnog produkta nakon pročišćavanja. Produkt (**spoj 1**) se izolirao iz reakcijske smjese i pročistio kromatografijom na stupcu sa DCM kao eluensom, te je njegova struktura i čistoća potvrđena TLC-om (Slika 32., B) i na NMR spektrima. Dobiveni  $^{13}\text{C}$  NMR spektar<sup>1</sup> nije imao signal C-OH koji ima MR, već O-C (vezan lanac) na 65,5 ppm-a, ali i dodatne signale koji odgovaraju alifatskom lancu na 14,0 – 31,5 ppm-a za **spoj 1** i 14,1 - 31,9 ppm-a za **spoj 2** (Slika 33.).

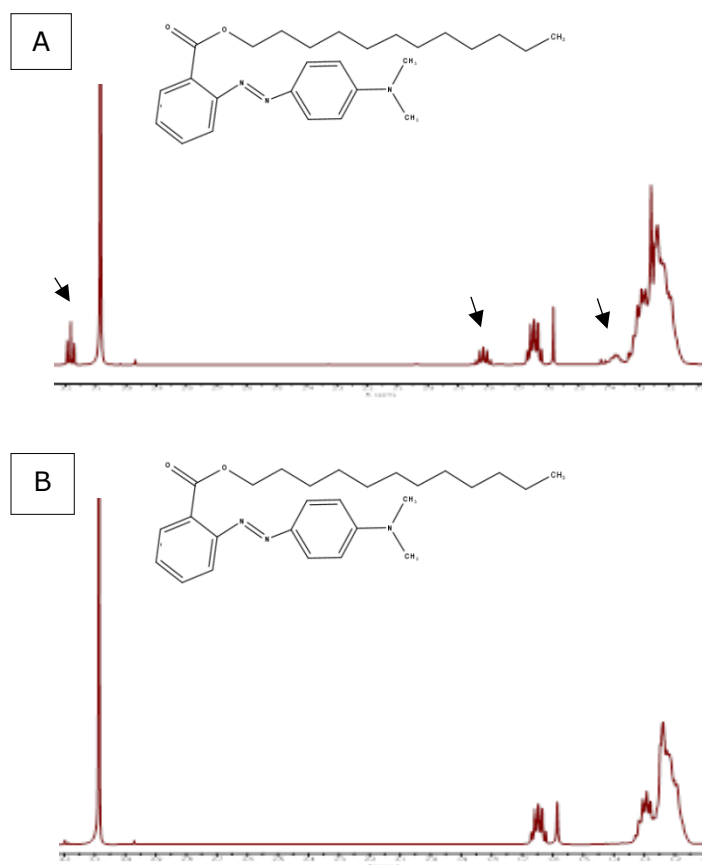
<sup>1</sup> NMR spektri u cijelom radu prikazani su nakon obrade u programu MestReNova (verzija 14.2.1.)



Slika 33. Alifatski dio  $^{13}\text{C}$  NMR spektara metil crvenog (A), **spoja 1** (B) i **spoja 2** (C). Prikazi uvećani iz Slika 4., 1., 2. (dodatni materijali).



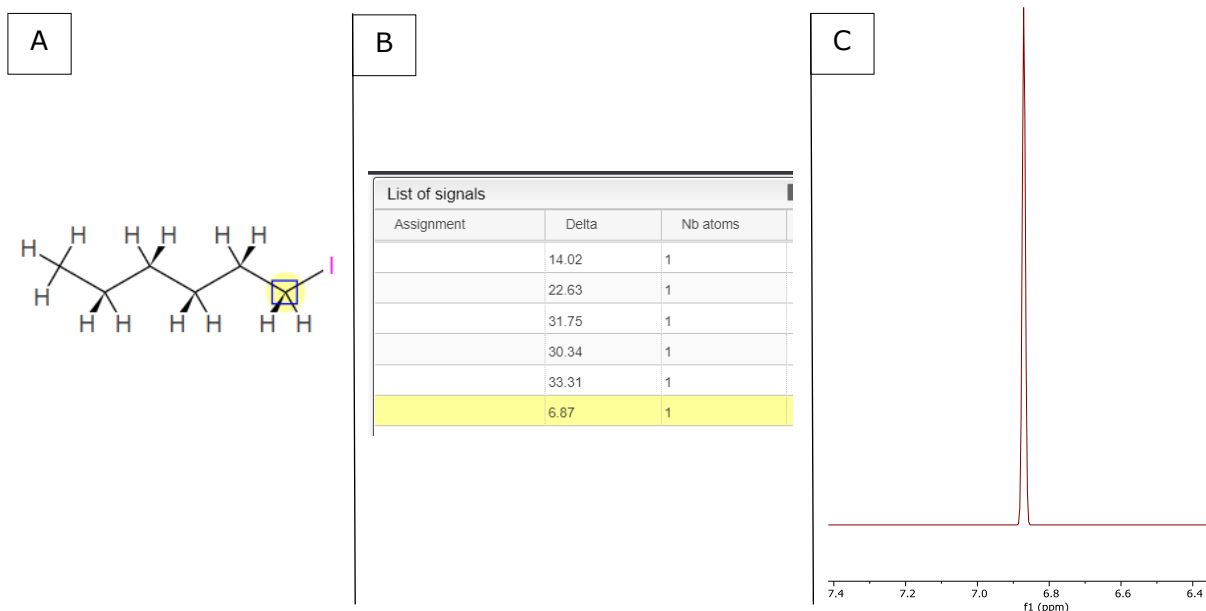
Nakon prvog pokušaja sinteze **spoja 2** korištenjem 2 ekvivalenta haloalkana (kao i za **spoj 1**), u prvom dijelu sinteze je ponovno ostalo neizreagiranog metil crvenog, što je dokazano TLC-om. Zatim su tijekom pročišćavanja kromatografijom na stupcu i DCM kao eluensom, prikupljene dvije frakcije od kojih prva frakcija nije sadržavala dovoljno čist produkt, čak ni nakon dodatnog pročišćavanja smjesom DCM i HEX u volumnom omjeru 60 : 40. Analizom  $^1\text{H}$  NMR spektra ustanovljeno je da je ostalo dosta neizreagiranog lanca, s obzirom na prisutnost signala na 1,40, 1,80 i 3,19 ppm-a (Slika 34., A). Druga skupljena frakcija je također dodatno pročišćena s DCM : HEX (60 : 40) kao eluensima, nakon čega je NMR spektar pokazao da je sintetiziran čist produkt (Slika 34., B).



Slika 34. Usporedba alifatskog dijela  $^1\text{H}$  NMR spektra nepročišćenog (A) i pročišćenog **spoja 2** (B). Prikazi uvećani iz Slike 3. i Slike 2. (dodatni materijali).

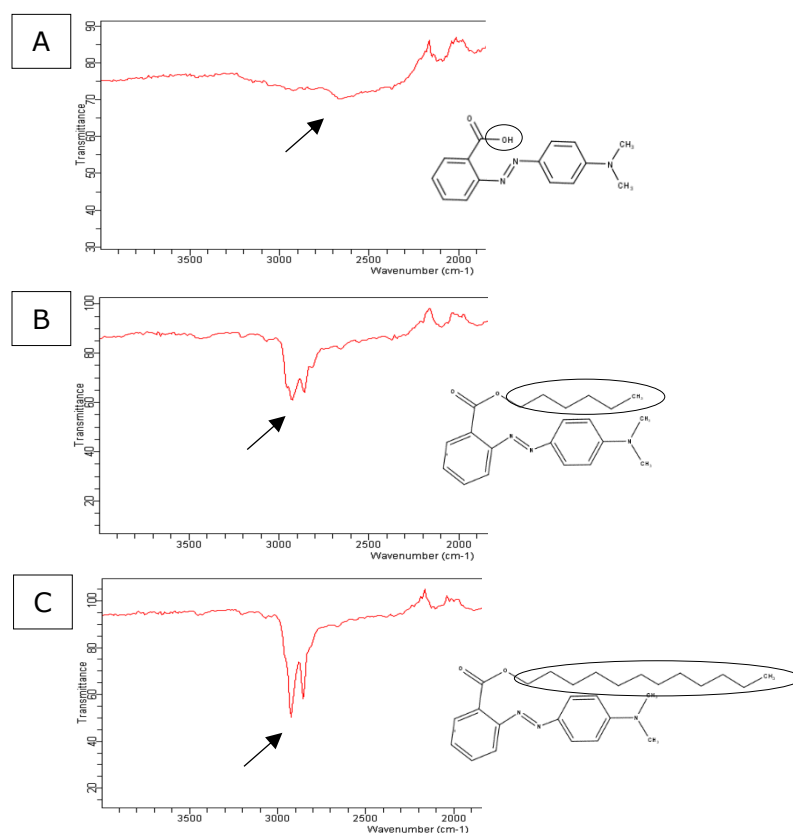
Sinteza **spoja 2** ponovljena je, ali s novim uvjetima reakcije. Smanjen je omjer jodododekana (0,9 ekv) u odnosu na metil crveno, a dobivena smjesa pročišćena je ovog puta korištenjem duže kolone te dvjema kolonskim kromatografijama.  $^1\text{H}$  NMR spektar pokazao je čist produkt sa svim pripadajućim pikovima (Slika 2., dodatni materijali).

Kao dodatna potvrda dobivanja čistih produkata u kojima nema zaostalih haloalkana korištenih u sintezi, u programu dostupnom na web stranici <https://www.nmrdb.org/>, predviđen je  $^{13}\text{C}$  NMR spektar gdje se signal C-I (Slika 35.) pojavljuje na 6,87 ppm, dok kod **spoja 1** i **spoja 2** on nije vidljiv. Prvi signal kod produkata pojavljuje se tek na 14,02 ppm (Slika 33., B i C).



Slika 35. Proces predviđanja  $^{13}\text{C}$  NMR spektra jodoheksana u programu na web stranici <https://www.nmrdb.org/> od strukture reaktanta i označavanja C atoma (A), predviđenog signala (B) te predviđenog spektra (C).

FTIR-ATR spektroskopijom snimljeni su IR spektri metil crvenog korištenog u sintezi i dobivenih produkata, odnosno **spoja 1** i **spoja 2**. FTIR-ATR zahtjeva minimalnu pripremu uzorka te daje uvid u prisutnost određenih funkcionalnih skupina, ali je i korisna za klasifikaciju nepoznatih spojeva [32]. U Slici 36. se iz snimljenih spektara može vidjeti da je došlo do nestanka OH skupine na karbonilnom ugljiku metil crvenog, te je umjesto tog prisutan signal koji označava C-H istežanje (lanac alkana).



Slika 36. FTIR ATR spektri (dio) metil crvenog (A), **spoja 1** (B) i **spoja 2** (C). Prikazi uvećani iz Slike 5., Slike 6. i Slike 7. (dodatni materijali).

Proces samonakupljanja organskih molekula očituje se u njihovim spektroskopskim svojstvima, u kojima dolazi do promjene intenziteta apsorpcije, cijepanja spektralnih vrpca, kao i pomicanja elektronskih spektara

te pojave novih vibracijskih prijelaza [21]. Takve promjene pripisuju se stvaranju i prisutnosti agregata u vodenim otopinama, koje su i dokazane u nekim već provedenim istraživanjima kod različitih organskih boja [33– 36].

Kako bi se analizirala spektroskopska svojstva sintetiziranih spojeva, pripremljeni su uzorci u određenom rasponu koncentracija pri različitim pH vrijednostima te su snimljeni apsorpcijski spektri uspoređeni spektrom MR-a kao kontrolom u ovim eksperimentima. S obzirom na nisku topljivost indikatora MR u vodi [30], pretpostavljeno je da bi i topljivost novosintetiziranih spojeva također bila niska. Stoga su najprije snimljeni spektri potpuno otopljenih produkata u metanolu i/ili oktanolu. U spektrima prikazanim u Slikama 9. i 10. uočena je linearna ovisnost apsorbance o koncentraciji, za **spoj 1** ili **spoj 2**, sukladno Beer-Lambertovom zakonu. Prilikom pripreme uzoraka za mjerenje tih spektara, otopine u metanolu su bile narančasto obojane te prozirne. S druge strane, otapanje **spoja 1** i **spoja 2** u vodi nije u početku bilo uspješno, već se priprema svodila na to da su otopine pripremljene pri nižoj pH vrijednosti ( $\text{pH} = 3$ ) te su na određeno vrijeme stavljene u ultrazvučnu kupelj. Već u pripremi ishodne otopine, bilo je uočeno narančasto zamućenje, što ukazuje da se radilo o koloidnoj suspenziji, koja sadrži određenu količinu agregata koji raspršuju svjetlost. U spektrima vodenih disperzija oba sintetizirana produkta može se uočiti da se radi o pomaku na veće valne duljine (crveni pomak), jer MR u protoniranom stanju apsorbira na oko 520 nm, a u deprotoniranom na 435 nm [26]. Prisutnost pomaka na veće ili manje valne duljine može upućivati na prisutnost određenih agregata [21]. U odnosu na polaznu boju od koje su nastali produkti, snimljeni spektri i vrijednosti absorbanci za oba spoja ukazuju na hipokromni efekt. Razlog tome je što pojava agregacije može utjecati na apsorpciju svjetlosti i dovesti do međumolekularnih procesa u prijenosu elektrona ili naboja, te tako pokrenuti proces gašenja (tzv. *quenching*) apsorpcije elektromagnetskog zračenja [2,37].

Zbog slabe topljivosti apsorpcijski spektri **spoja 1** u vodi pri  $\text{pH} = 3$  (Slika 13.) mjereni su pri nižim koncentracijama u odnosu na mjerenja u metanolu te se izmjereni spektri bitno razlikuju od onih izmjerenih u metanolu. Kao prvo, uočavamo apsorpciju u puno širem području valnih duljina: za otopine u metanolu apsorbanca pri  $\lambda > 550 \text{ nm}$  iznosi  $\approx 0$ , dok za **spoj 1** u vodi je bitno veća od nule. Nadalje, za prave otopine u odsutnosti samonakupljanja uzrokovanog međumolekulskim privlačnim interakcijama, očekivano je podudaranje valne duljine maksimuma apsorbanca, za uzorke različitih koncentracija. Za varirane koncentracije, uočavamo da se mijenja oblik spektara. S obzirom na uočene razlike u apsorbanca pri valnoj duljini minimuma u spektru (koja je oduzeta od spektara), možemo pretpostaviti da su oblik spektara i pomaci pri variranim koncentracijama uzrokovani kako raspršenjem svjetlosti na nanočesticama, tako i perturbiranim elektronskim konfiguracijama u agregatima [21]. Ti pomaci rezultat su Rayleighovog raspršenja koje opisuje raspršenje svjetlosti upadne zrake na čestice unutar otopine. Pomak maksimuma kod većih koncentracija na veće valne duljine, kao i smanjenje jakosti apsorpcijskog maksimuma zbog pomaka bazne linije rezultat je raspršenja svjetlosti zbog prisutnih agregata. Taj efekt prati i Tydallov učinak koji opisuje povećanje jačine raspršenja povećanjem volumena materije koja raspršuje svjetlost. U ovom slučaju, intenzitet je proporcionalan volumenu pojedinačnih čestica pa je tako povećanjem veličine stvorenih agregata raspršenje intenzivnije [38,39]. Zbog toga je moguća pojava pomaka bazne linije povećanjem koncentracije kod **spoja 1** i **spoja 2**. Pri  $\text{pH} = 3$ , uočavamo „brijeg“ pri valnoj duljini koja odgovara maksimumu apsorbanca za MR (vidi Sliku 16., A).

Reverznom titracijom provjerena je reverzibilnost spektara. U Slici 17. uočavamo da se intenzitet apsorpcije nakon vraćanja sa  $\text{pH} \leq 3,02$  na  $\text{pH} \approx 6$  povećao, što bi ukazivalo da je pri  $\text{pH} \leq 3,0$  došlo do hidrolize novostvorene esterske veze prisutne u **spoju 1** te da sama titracija pri nižem  $\text{pH}$  nije

reverzibilna. Kidanje esterske veze u kiselim uvjetima ( $\text{pH} < 3$ ) [40] dodatno je potvrđeno mjerenjem apsorpcijskih spektara u razmaku od 5 dana: iz Slike 18. uočavamo da vrijednosti intenziteta apsorbance nisu jednake, odnosno povećale su se nakon 5 dana stajanja pri  $\text{pH} = 2,03$ , što ukazuje na raspad produkta te oslobađanje MR.

Raspodjela hidrodinamičkog promjera detektiranih agregata **spoja 1** i **spoja 2** određena je CONTIN metodom iz autokorelacijskih funkcija, izmjerenih tehnikom dinamičkog raspršenja svjetla. Nasumično gibanje čestica unutar tekućine rezultira fluktuacijom u određenom vremenskom intenzitetu raspršene svjetlosti te se taj signal obrađuje formiranjem autokorelacijske funkcije [41]. S obzirom da se promatrala prisutnost i veličina određenih agregata u otopinama **spoja 1** i **spoja 2**, prije uzimanja podataka efektivnog promjera utegnutog prema broju detektiranih čestica, uspoređivane su autokorelacijske krivulje za svako pojedino mjerenje. Valja napomenuti da je u izmjerenim autokorelacijskim funkcijama, ponegdje uočena i prisutnost znatno većih agregata ( $d > 5 \mu\text{m}$ ), koje su isključene iz statističke obrade, tj. „fitanja“ Gaussove raspodjele prema formuli:

$$n(x) = N \times \Delta x \times \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{x-\mu}{\sqrt{2}\sigma}\right)^2 \quad (4)$$

gdje su vrijednosti parametara, dakle srednje vrijednosti ( $\mu$ ), standardne devijacije ( $\sigma$ ), i širine razreda  $\Delta x$ , dobivene metodom najmanjih kvadrata u software-u Data Solver (Excel).

Svaka od raspodjela prikazanih u Slikama 19. – 23. pokazuje nekoliko moda sa srednjim vrijednostima promjera detektiranih agregata većim od 150-180 nm. Iz tog se može pretpostaviti da se radi o vezikulama (liposomima) [42]. Također je uočljivo da povećanjem koncentracije ne dolazi do trenda rasta veličine agregata, već se i pri većim koncentracijama detektiraju manje mode veličine u zonama II i III. Kod **spoja 1** je to prikazano pri  $\text{pH} = 3$ , gdje se kod koncentracije od 1 mM pojavljuju manje vezikule u

zoni II veličine oko 320 nm, koje su prisutne i kod manje koncentracije od 0,05 mM. Pri pH = 5 nema velike razlike u detektiranim veličinama, dok se jedino može istaknuti da se pri najvećoj mjerenoj koncentraciji stvaraju vezikule s modom oko 1400-1500 nm, dok su pri manjem pH one u IV zoni oko 1000 nm. Usporedbom rezultata pri pH = 3 od dva sintetizirana spoja, uočljivo je da se kod **spoja 2** javljaju slične veličine kao i kod **spoja 1** pri svim koncentracijama, odnosno promjeri vezikula variraju od 150 – 1000 nm. Razlika je uočljiva u najvećem detektiranom promjeru koji kod **spoja 2** iznosi oko 1600 nm, dok se kod **spoja 1** pri istoj pH vrijednosti, nalazi pri oko 1000 nm (Tablica 2. i 3.). Stvaranje liposoma iz pojedinačnih molekula tenzioaktiva je proces, koji se u najjednostavnijem približenju, termodinamički može opisati u dva koraka: prvi je stvaranje dvosloja agregacijom pojedinačnih molekula pod utjecajem kohezijske sile. Drugi korak je savijanje dvosloja u sferu pod utjecajem površinske napetosti, a čemu se odupire elastičnost dvosloja [43].

Kao što je već spomenuto, nije uočena korelacija između povećanja koncentracije sintetiziranih spojeva i promjera agregata, već se pojava moda Gaussovih raspodjela u nekoliko zona promjera može hipotetski pripisati pojavi multilamelarnih vezikula. Ova pretpostavka temelji se na opažanju zona u raspodjeli promjera agregata. Prema literaturi, moguće su manje unilamelarne vezikule (<100 nm) i one veće (>100 nm), kao i strukture u kojima je jedna ili više manjih vezikula formirana unutar jedne veće, te stvara multilamelarnu strukturu (>500 nm) [10,44]. Stoga, predložena je hipotetska interpretacija rezultata DLS, po kojoj su pri svim koncentracijama prisutne unilamelarne vezikule promjera do 400 nm, koje se zbog gibanja unutar vodene sredine spajaju i stvaraju veće multilamelarne vezikule i do oko 1600 nm. Kod **spoja 1** pri pH = 3, pojava multilamelarnih vezikula uočena je za koncentracije  $\geq 0,05$  mM, jer su kod najmanje koncentracije prisutne one s promjerom oko 200 i 400 nm (Tablica 2.). S druge strane, kod **spoja 2** su već

pri najmanjoj koncentraciji 0,005 mM detektirani promjeri veći od 500 nm što ukazuje na započinjanje procesa spajanja u multilamelarne vezikule od oko 600 nm (Tablica 3.). Svakako, ova interpretacija je tek hipoteza, koju bi bilo moguće provjeriti jedino korištenjem vrlo naprednih eksperimentalnih tehnika, kao što su krio-elektronska mikroskopija ili raspršenje neutrona pri malim kutovima (SANS).

Nakon tjedan dana stajanja, uočena je promjena u promjeru detektiranih vezikula kod oba sintetizirana spoja. Sam proces agregacije određen je difuzijom koje je za veće čestice sporije, zbog Stokesovog koeficijenta otpora proporcionalnog polumjeru [4]. Zbog toga se veće vezikule gibaju sporije, unutar vodenog medija. Nakon proteklog vremena, **spoj 1** stvara vezikule sa modama u zoni I, II i III, veličina oko 200, 400 i 700 nm za sve koncentracije do 0,1 mM, dok su pri najvećoj koncentraciji 1 mM detektirane mode pojavljuju u zoni I, kao moda manje veličine od 31 nm (Slika 22., Tablica 4.). Manja detektirana veličina od 29 nm uočljiva je i kod koncentracije 0,5 mM. Razlog tome može biti uspostava ravnoteže u kojoj je suspenzija zasićena vezikulama, tj. one zauzimaju sav dostupan volumen, a višak spoja je „prisiljen“ agregirati u manje agregate. U usporedbi s modama uočenim u području promjera  $\geq 100$  nm, ta populacija ne može biti pridijeljena istom tipu agregata, te se najvjerojatnije radi o agregatima (micelama ili čvrstim nanočesticama) koje, uz vezikule promjera  $\geq 100$  nm, nastaju pri koncentracijama  $\geq 0,5$  mM. Kod **spoja 2** se s druge strane nakon tjedan dana formiraju vezikule većeg promjera, oko 1810 nm pri najvećoj koncentraciji, dok se kod manjih koncentracija pojavljuju mode od oko  $200 \text{ nm} \leq d \leq 600 \text{ nm}$  (Slika 23.,B, Tablica 6.). S obzirom da prvi dan nisu bile prisutne vezikule  $\geq 1000$  nm (Slika 23., A, Tablica 5.), moguće je da je zapravo zbog sporijeg kretanja vezikula dolazi i do sporije uspostave ravnotežnog stanja, odnosno da se kod **spoja 2** još uvijek nije ostvarila ravnoteža nakon tjedan dana stajanja. Svakako bi se mjerenja trebala ponoviti nakon dužeg vremena, kako



bi se uočio mogući trend i potvrdile navedene karakteristike prilikom uspostave ravnotežnog stanja. Osim toga, korisno bi bilo i primijeniti druge tehnike u kombinaciji sa DLS-om, kao na primjer kriogenu transmisivnu elektronsku mikroskopiju, SANS ili mikroskopiju atomskih sila (AFM), kako bi se dodatno potvrdila struktura, oblik te veličina stvorenih agregata [11], ali i utvrdila njihova stabilnost tijekom vremena.

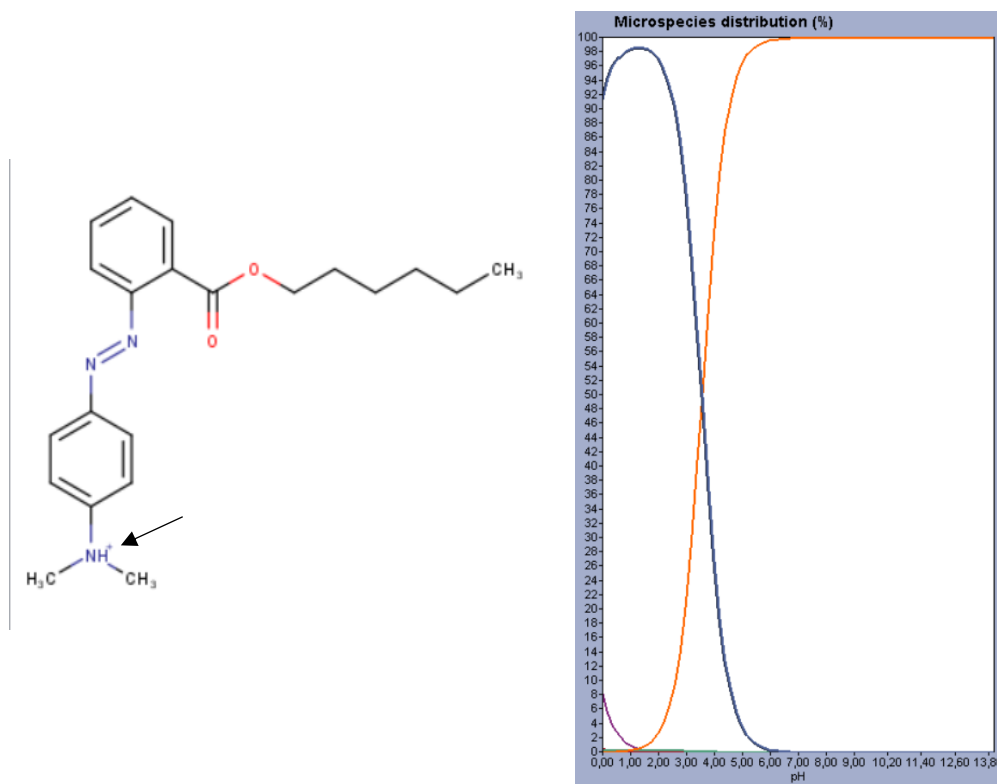
Određivanje površinske aktivnosti sintetiziranih spojeva provedeno je mjerenjem površinske napetosti na granici faza voda/zrak. Prema rezultatima prikazanim u Slikama 24. i 25. uočeno je da ne dolazi do velikog smanjenja površinske napetosti u ovisnosti o koncentraciji, već su izmjerene vrijednosti približno jednake površinskoj napetosti čiste vode pri svim mjerenim koncentracijama za **spoj 1**, dok se kod **spoja 2** one nešto smanjuju na koncentraciji 0,5 mM te ostaju konstantne na većim koncentracijama. Ti rezultati ukazuju na slabu adsorpciju sintetiziranih spojeva na međupovršinu. Također kod **spoja 1** promjena pH ne igra ulogu u mijenjanju površinske aktivnosti, što može biti razlog sintetiziranja spojeva koji u vodenoj otopini djeluju kao neionski surfaktanti. Valja napomenuti da su mjerenja pri različitim pH vrijednostima provedene u razmacima od nekoliko dana, pri čemu se razlike u izmjerenim vrijednostima mogu pridijeliti i razlikama u relativnoj vlažnosti zraka [45]. Osim toga, kod ovih spojeva nije moguće odrediti točnu kritičnu koncentraciju agregacije, kao ni topljivost mjerenjem površinske napetosti, jer su sintetizirani spojevi zapravo površinski neaktivni spojevi, ali se zbog detekcije agregata DLS metodom može pretpostaviti da je topljivost ispod 0,005 mM za **spoj 1**, te ispod 0,001 mM za **spoj 2**.

Ovisnost površinske napetosti na granici faza voda/zrak, prikazana u Slikama 24. i 25., ponešto se razlikuje za **spoj 1**, odnosno **spoj 2**, pa je te rezultate potrebno prvo promotriti odvojeno. Za **spoj 1** (Slika 24.) se u promatranom rasponu koncentracija (0 – 1 mM) ne uočava promjena površinske napetosti, već ona u granicama pouzdanosti mjerenja, ostaje

približno jednaka vrijednosti izmjerenoj za čistu vodu (70,5 – 75,0 mN/m, ovisno o uvjetima). Izostanak ovisnosti površinske napetosti o koncentraciji je jednak za mjerenja provedena pri različitim pH vrijednostima. Uočenu nešto veću površinsku napetost izmjerenu za uzorke pri pH = 5,4 vjerojatno valja pripisati različitoj relativnoj vlažnosti zraka [45]. S druge strane, za **spoj 2** pri pH = 3, površinska napetost ponešto ovisi o koncentraciji spoja na način prikazan u Slici 25. Pri koncentracijama u rasponu 0,05 – 0,10 mM, površinska napetost se smanjuje (umetak, Slika 25.), međutim, u rasponu 0,10 – 0,20 mM ponovo raste do vrijednosti izmjerene za čistu vodu. Moguće je zaključiti da se u prvom rasponu **spoj 2** adsorbira na međupovršinu voda/zrak, a u drugom desorbira. Zatim, u rasponu 0,20 – 0,50 mM, površinska napetost se smanjuje do vrijednosti oko 58,5 mN/m, što ponovo znači adsorpciju na međupovršinu, a pri većim koncentracijama (> 0,5 mM), površinska napetost ostaje konstantna pri navedenoj vrijednosti. Pretpostavimo li da se adsorpcijska ravnoteža uspostavlja između otopljenih molekula **spoja 2** u vodenoj fazi te međupovršine, mogli bismo zaključiti da u rasponu 0,10 – 0,20 mM dolazi do desorpcije zbog stvaranja agregata u unutrašnjosti vodene faze, u kojima su molekule **spoja 2** termodinamički stabilnije nego u otopini. Pri nižim koncentracijama, proces agregacije je vjerojatno nepovoljan zbog utjecaja Laplaceovog tlaka koji pomaže održavanju prezasićene otopine, tj. koncentracija spoja je niža od kritične koncentracije nukleacije [4]. Ponovno smanjenje površinske napetosti može biti uzrokovano vezanjem dvosloja ili unilamelarnih vezikula na međupovršinu, sve do koncentracije oko 0,5 mM, nakon koje više ne dolazi do vezanja na međupovršinu voda zrak (vjerojatno zbog njenog zasićenja) te pri kojoj mjerenja DLS pokazuju nastajanje većih agregata **spoja 2** (> 1500 nm). Dakle, za **spoj 2**, rezultati DLS i mjerenja površinske napetosti pokazuju određenu korelaciju u odnosu na koncentraciju spoja, koja upućuje na kompleksnost ravnoteža u tom sustavu. Za **spoj 1** nije uočena ovisnost

površinske napetosti o koncentraciji, ali niti nastajanje agregata  $>1000$  nm, pa je pretpostavka da u tom sustavu nukleacija ne predstavlja energetska barijeru za nastajanje agregata (vezikula), već one nastaju i pri najmanjim koncentracijama. Iz svega navedenog, dalo bi se pretpostaviti da je površinska napetost na površini vezikula, znatno veća za **spoj 2**, što i korelira s njegovom znatno većom hidrofobnošću.

Potenciometrijska titracija **spoja 1** provedena je s ciljem određivanja krivulje naboja u ovisnosti o pH te iz nje, pKa vrijednosti. Prema izračunu provedenom pomoću programa Marvin Sketch (21.18.0., ChemAxon Ltd.), za **spoj 1** predviđeno je da promjenom pH otopine, dolazi do protonacije na dimetilaminskoj skupini, pri čemu bi za taj dušik mikroskopska konstanta deprotonacije iznosila  $pK_a = 3,6$  (Slika 37.), a što bi svakako moralo biti detektirano i u eksperimentalnoj krivulji naboja. Prema literaturi Z. Jian-Hua i suradnika [26], MR se također protonira i na azo skupini, što bi onda trebalo vrijediti i za **spoj 1**, ali se zbog predikcije u Marvin Sketch fokus stavio samo na protonaciju amino dušika, koja je prema korištenom programu potvrđena kao moguća, iako ne možemo biti potpuno sigurni u njezinu točnost.

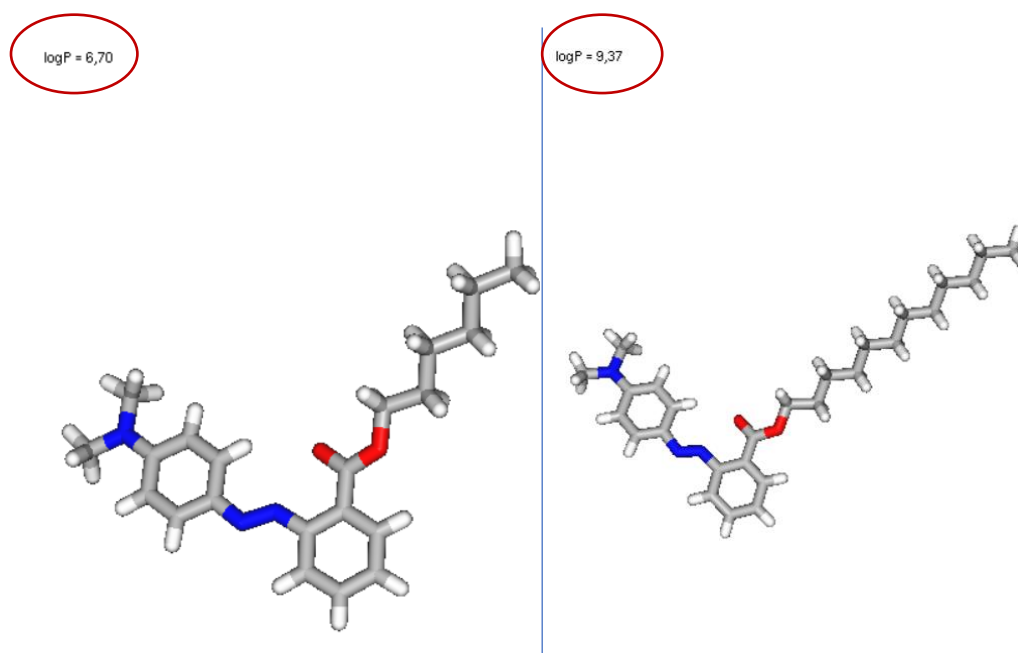


Slika 37. Predviđena protonirana struktura (lijevo) i titracijska krivulja (desno) **spoja 1**, dobivena pomoću programa Marvin Sketch (21.18.0., ChemAxon Ltd.)

Sukladno tome, provedena je potenciometrijska titracija pri različitim ionskim jakostima (1 mM, 50 mM, 100 mM), no krivulja naboja prikazana u Slici 26. prikazuje da u pH rasponu ( $4 < \text{pH} < 10$ ) ne dolazi do protonacije. Također tijekom samog eksperimenta nije došlo do promjene boje, već je u cijelom pH rasponu suspenzija ostala žuto-narančasta. Stoga je moguće zaključiti da je predikcija pomoću programa Marvin Sketch pogrešna, a sintetizirane spojeve možemo smatrati neionskim spojevima. S obzirom da u vodi tvore agregate tipa vezikula, te da je za **spoj 2** izmjerena slaba (za **spoj 1** nikakva) površinska aktivnost, ne možemo ih smatrati pravim surfaktantima, zbog preslabe polarnosti MR u tim spojevima. S obzirom na to da je **spoj 2** bitno slabije topljiv u vodi, a krivulja naboja za **spoj 1** je jasno određena, provedba potenciometrijske titracije za **spoj 2** nije provedena

(također, razlog je i štednja elektroda, na koje se ovi spojevi vrlo jako adsorbiraju te im štete).

Osim naboja, u programu Marvin Sketch proveden je izračun za dobivanje logP vrijednosti kao dodatan hipotetski pokazatelj topljivosti sintetiziranih spojeva. Izračunato je (pomoću programa) za **spoj 1** da logP iznosi 6,70 (Slika 38., lijevo), dok za **spoj 2** iznosi 9,37 (Slika 38., desno). To ukazuje na vrlo malu topljivost spojeva u vodi i veliku lipofilnost, odnosno eksperimentalno bi bilo jako teško odrediti koncentraciju pri kojoj su navedeni spojevi topljivi u vodenom mediju, a time i logP.



Slika 38. Prikaz strukture i izračunate logP vrijednosti za **spoj 1** (lijevo) i **spoj 2** (desno), dobivenih pomoću programa Marvin Sketch (21.18.0., ChemAxon Ltd.).

Mjerenje kontaktnog kuta provedeno je kao test za silanizaciju površine stakalca kovalentnim vezanjem trimetoksi(oktadecil)skupina, koja su kasnije korištena za fizisorpciju sintetiziranih spojeva. Uspješnost fizisorpcije je provjerena i mjerenjem apsorpcijskih spektara za **spoj 1**, **spoj 2** i MR. Iako su izmjerene veće apsorpcije na silaniziranim stakalcima, još uvijek nije velika

razlika u odnosu na nesilanizirana, odnosno samo jetkana stakalca. Razlog tome može biti što je kontaktni kut nakon silanizacije i dalje manji od 90 °C, što upućuje na to da nakon silanizacije, oktadecilne skupine ne prekrivaju u potpunosti površinu. Sukladno tome, neće biti niti veća površinska koncentracija jer sintetizirani spojevi nemaju dovoljno veliku mogućnost ostvarivanja interakcija sa silaniziranim skupinama na površini stakalca. Bolja apsorpcija mogla bi se ostvariti korištenjem drugih silanskih skupina, odnosno silana s kraćim lancem (npr. C8, a ne C18) jer bi manji lanci stvarali manje steričke smetnje prilikom kovalentnog vezanja na površinu stakalca, pa bi se i u većoj mjeri samo staklo silaniziralo, što bi onda u konačnici trebalo potvrditi mjerenjem kontaktnog kuta, koji bi očekivano bio veći ili barem približno jednak 90 °. Sam eksperiment proveden je kao svojevrsna proba buduće primjene sintetiziranih spojeva. S obzirom da metil crveno nalazi primjenu u detekciji sposobnosti određenih bakterija za proizvodnju i održavanje kiselih uvjeta fermentacijom glukoze, pripremljene pločice mogle bi se također koristiti u tu svrhu [27]. Prethodnim eksperimentima potvrđeno je da se **spoj 1** u kiselim uvjetima na pH < 3 raspada, što bi onda značilo da bi kontaktom sa kiselom sredinom došlo i do skidanja spoja sa stakalca te potvrdom prisutnosti mliječne, octene i mravlje kiseline razgradnjom piruvata.

## 6. Zaključak

U provedenom istraživačkom radu po prvi puta sintetizirana su dva derivata indikatora metil crveno reakcijom supstitucije haloalkana na karboksilnoj skupini. Kao potvrda sinteze novih derivata korištena je NMR i FTIR-ATR spektroskopija. Fizikalno-kemijske karakteristike sintetiziranih spojeva te njihovo ponašanje kao amfifilnih molekula unutar vodene otopine ispitane su mjerenjem i analizom UV-VIS spektara, potenciometrijskom titracijom, mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti te površinske napetosti, kao i mjerenjem uspješnosti vezanja na silanizirana stakalca, u svrhu potencijalne buduće primjene novih spojeva. Provedeni eksperimenti spojeva unutar koloidnih suspenzija regulirani su pri točno određenim koncentracijama i pH vrijednostima.

Tijekom sinteze novih spojeva, promijenjen je omjer otapala tijekom pročišćavanja, te je smanjena količina dodanog reaktanta pa je time optimizirana sinteza derivata. Spektroskopska svojstva spojeva analizirana su u UV-VIS području elektromagnetskog zračenja gdje se za otopine u metanolu i oktanolu uočava trend praćenja Beer-Lambertovog zakona, dok se on gubi za uzorke pri različitim pH vrijednostima unutar suspenzija. Pomaci u apsorpcijskim vrpcama rezultat su promjene elektronskih stanja i raspršenja uzrokovanog stvaranjem agregata. Mjerenjem veličine stvorenih agregata uočavaju se različiti rasponi veličina prisutni kod svih mjerenih koncentracija, čime se ne uočava ovisnost veličine o koncentraciji, kao ni utjecaj pH na stvorene agregate. Derivat s kraćim lancem formira vezikule koje u kraće vrijeme postižu stabilizaciju u odnosu na onaj s dužim lancem. Njihova asocijacija i termodinamička stabilizacija uvjetovana je prisutnim međuvezikularnim interakcijama te utjecajem topljivosti koja ovom metodom nije potpuno određena već se pretpostavlja da je topljivost  $<0,005$  mM. Izmjerena površinska napetost ne pokazuje ovisnost o koncentraciji za **spoj**

**1**, dok se povećanjem koncentracije **spoja 2** ona minimalno smanjuje zbog vezanja na površinu voda/zrak i privlačenja repa van der Waalsovih silama na površinu. Potenciometrijska titracija ukazuje da su novi derivati neionski tenzioaktivni, u startu zbog slabe topljivosti glave, a onda i produljenjem lanca se ta topljivost još više smanjuje te ju je teško i odrediti. Potvrđeno je da novi spojevi, iako stvaraju agregate unutar vodene otopine, ipak ne mogu djelovati kao pH indikatori zbog nemogućnosti protonacije/deprotonacije. Vezanje na hidrofobno silanizirano staklo je u određenoj mjeri moguće, pa bi tako pripremljena stakalca mogla pronaći upotrebu u različitim testovima detekcije određenih bakterija i mikroorganizama. Za nastavak ovog eksperimenta potrebno je optimizirati postupak čišćenja stakalca i koristiti kraće silane kako bi hidrofobnost, a time i vezanje spojeva bilo uspješnije.

Ovim radom pokazano je da korištene tehnike nisu u potpunosti uspješne u određivanju topljivosti spojeva, što je posljedica korištenja nedovoljno topljive boje kao polaznog spoja. Ipak rezultati mogu poslužiti za daljnja ispitivanja, gdje bi se tehnikama kriogene mikroskopije dodatno potvrdila veličina i oblik stvorenih agregata. Također zanimljivo bi bilo promatrati spojeve kroz duže vrijeme s ciljem uvida u njihovu stabilizaciju. Osim toga, određene promjene u strukturi spojeva mogle bi imati utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva u vodenim otopinama, čime bi se samo proširilo područje upotrebe amfifilnih boja kako u tehnološkim procesima, tako i u biomedicinskim primjenama.



## 7. Popis literature

- [1] S. R. S. Iyer i G. S. Singh, „Aggregation of Anionic Dyes in Aqueous Solutions“, *J. Soc. Dye. Colour.*, sv. 89, izd. 4, str. 128–132, tra. 1973, doi: 10.1111/j.1478-4408.1973.tb03138.x.
- [2] B. Heyne, „Self-assembly of organic dyes in supramolecular aggregates“, *Photochem. Photobiol. Sci.*, sv. 15, izd. 9, str. 1103–1114, 2016, doi: 10.1039/C6PP00221H.
- [3] R. Bogue, „Self-assembly: a review of recent developments“, *Assem. Autom.*, sv. 28, izd. 3, str. 211–215, kol. 2008, doi: 10.1108/01445150810889466.
- [4] W. Norde, *Colloids and Interfaces in Life Sciences*. CRC Press, 2003.
- [5] K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg, i B. Lindman, „Surfactant Micellization“, u *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002, str. 39–66.
- [6] D. Lombardo, M. A. Kiselev, S. Magazù, i P. Calandra, „Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches“, *Adv. Condens. Matter Phys.*, sv. 2015, str. 1–22, 2015, doi: 10.1155/2015/151683.
- [7] B. Kronberg, „The hydrophobic effect“, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, sv. 22, str. 14–22, tra. 2016, doi: 10.1016/j.cocis.2016.02.001.
- [8] J. N. Israelachvili, „Thermodynamic Principles of Self-Assembly“, u *Intermolecular and Surface Forces*, Elsevier, 2011, str. 503–534.
- [9] J. N. Israelachvili, „Soft and Biological Structures“, u *Intermolecular and Surface Forces*, Elsevier, 2011, str. 535–576.
- [10] T. Olusanya, R. Haj Ahmad, D. Ibegbu, J. Smith, i A. Elkordy, „Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs“, *Molecules*,

- sv. 23, izd. 4, str. 907, tra. 2018, doi: 10.3390/molecules23040907.
- [11] N. Raval, R. Maheshwari, D. Kalyane, S. R. Youngren-Ortiz, M. B. Chougule, i R. K. Tekade, „Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development“, u *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, Elsevier, 2019, str. 369–400.
- [12] L. Jitkang, Y. S. Pin, C. H. Xin, i L. S. Chun, „Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering“, *Nanoscale Res. Lett.*, sv. 8, izd. 1, str. 308–381, 2013, [Na internetu]. Dostupno na: [www.nanoscalereslett.com/content/8/1/381](http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/381).
- [13] L. Yin, „Dynamic Light Scattering“, u *Nanotechnology Research Methods for Foods and Bioproducts*, izd. April, Wiley, 2012, str. 145–161.
- [14] A. T. Florence i D. Attwood, „Surfactants“, u *Physicochemical Principles of Pharmacy*, London: Macmillan Education UK, 1998, str. 199–251.
- [15] A. Krishnan, C. A. Siedlecki, i E. A. Vogler, „Traube-Rule Interpretation of Protein Adsorption at the Liquid–Vapor Interface“, *Langmuir*, sv. 19, izd. 24, str. 10342–10352, stu. 2003, doi: 10.1021/la035308t.
- [16] J. D. Berry, M. J. Neeson, R. R. Dagastine, D. Y. C. Chan, i R. F. Tabor, „Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry“, *J. Colloid Interface Sci.*, sv. 454, str. 226–237, ruj. 2015, doi: 10.1016/j.jcis.2015.05.012.
- [17] S. Narayan Yadav, S. Rai, P. Shah, N. Roy, i A. Bhattarai, „Spectrophotometric and conductometric studies on the interaction of surfactant with polyelectrolyte in the presence of dye in aqueous medium“, *J. Mol. Liq.*, sv. 355, izd. March, str. 118949, lip. 2022, doi: 10.1016/j.molliq.2022.118949.

- [18] R. T. Buwalda, J. M. Jonker, i J. B. F. N. Engberts, „Aggregation of Azo Dyes with Cationic Amphiphiles at Low Concentrations in Aqueous Solution“, *Langmuir*, sv. 15, izd. 4, str. 1083–1089, 1999, doi: 10.1021/la980824i.
- [19] S. Benkhaya, S. M’rabet, i A. El Harfi, „Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes“, *Heliyon*, sv. 6, izd. 1, str. e03271, sij. 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03271.
- [20] B. Said, R. Souad M’, i E. H. Ahmed, „A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes“, *Inorg. Chem. Commun.*, sv. 3, izd. March, str. 107891, 2020.
- [21] N. J. Hestand i F. C. Spano, „Expanded Theory of H- and J-Molecular Aggregates: The Effects of Vibronic Coupling and Intermolecular Charge Transfer“, *Chem. Rev.*, sv. 118, izd. 15, str. 7069–7163, kol. 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00581.
- [22] N. O. Mchedlov-Petrosyan, V. S. Farafonov, T. A. Cheipesh, S. V. Shekhovtsov, D. A. Nerukh, i A. V. Lebed, „In search of an optimal acid-base indicator for examining surfactant micelles: Spectrophotometric studies and molecular dynamics simulations“, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, sv. 565, str. 97–107, ožu. 2019, doi: 10.1016/j.colsurfa.2018.12.048.
- [23] N. O. Mchedlov-Petrosyan, V. S. Farafonov, i A. V. Lebed, „Examining surfactant micelles via acid-base indicators: Revisiting the pioneering Hartley–Roe 1940 study by molecular dynamics modeling“, *J. Mol. Liq.*, sv. 264, str. 683–690, 2018, doi: 10.1016/j.molliq.2018.05.076.
- [24] N. O. Mchedlov-Petrosyan, „Protolytic equilibrium in lyophilic nanosized dispersions: Differentiating influence of the pseudophase and salt effects“, *Pure Appl. Chem.*, sv. 80, izd. 7, str. 1459–1510, sij.

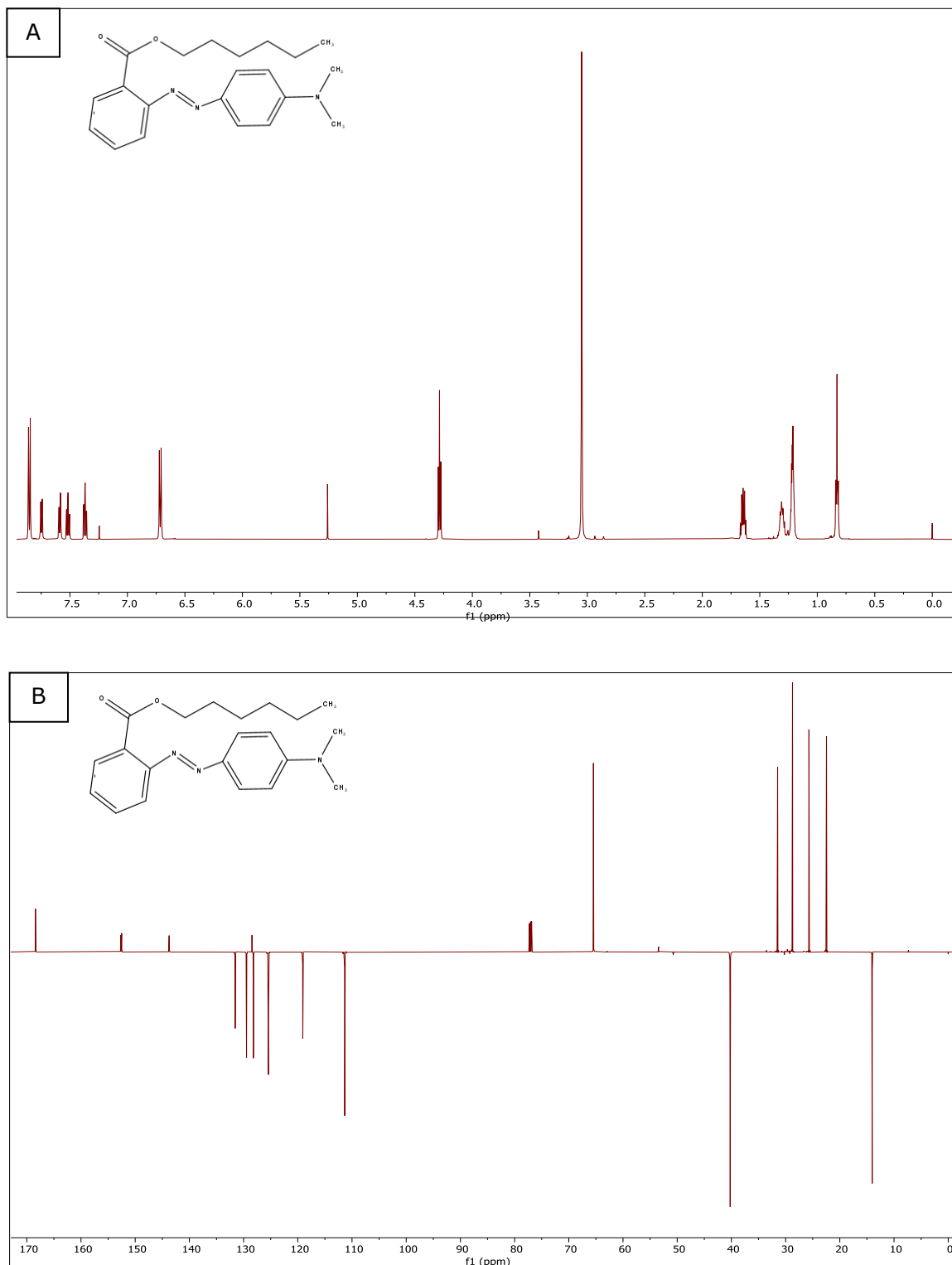
2008, doi: 10.1351/pac200880071459.

- [25] N. O. Mchedlov-Petrossyan, N. A. Vodolazkaya, A. G. Yakubovskaya, A. V. Grigorovich, V. I. Alekseeva, i L. P. Savvina, „A novel probe for determination of electrical surface potential of surfactant micelles: N,N'-di-n-octadecylrhodamine“, *J. Phys. Org. Chem.*, sv. 20, izd. 5, str. 332–344, svi. 2007, doi: 10.1002/poc.1150.
- [26] Z. Jian-Hua, L. Qiong, C. Yu-Miao, L. Zhao-Qing, i X. Chang-Wei, „Determination of Acid Dissociation Constant of Methyl Red by Multi-Peaks Gaussian Fitting Method Based on UV-Visible Absorption Spectrum“, *Acta Physico-Chimica Sin.*, sv. 28, izd. 05, str. 1030–1036, 2012, doi: 10.3866/PKU.WHXB201203025.
- [27] A. L. Leber, „Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria“, u *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Washington, DC, USA: ASM Press, 2016, str. 3.17.1.1-3.17.48.3.
- [28] T. I. Rokitskaya, N. V. Sumbatyan, V. N. Tashlitsky, G. A. Korshunova, Y. N. Antonenko, i V. P. Skulachev, „Mitochondria-targeted penetrating cations as carriers of hydrophobic anions through lipid membranes“, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, sv. 1798, izd. 9, str. 1698–1706, ruj. 2010, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2010.05.018.
- [29] J. J. Cras, C. A. Rowe-Taitt, D. A. Nivens, i F. S. Ligler, „Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization“, *Biosens. Bioelectron.*, sv. 14, izd. 8–9, str. 683–688, 1999, doi: 10.1016/S0956-5663(99)00043-3.
- [30] D. Beri, A. Pratami, P. L. Gobah, P. Dwimala, i A. Amran, „Solubility limitation of methyl red and methylene blue in microemulsions and liquid crystals of water, SDS and penthanol systems“, *arXiv*, str. 1–10, 2017.

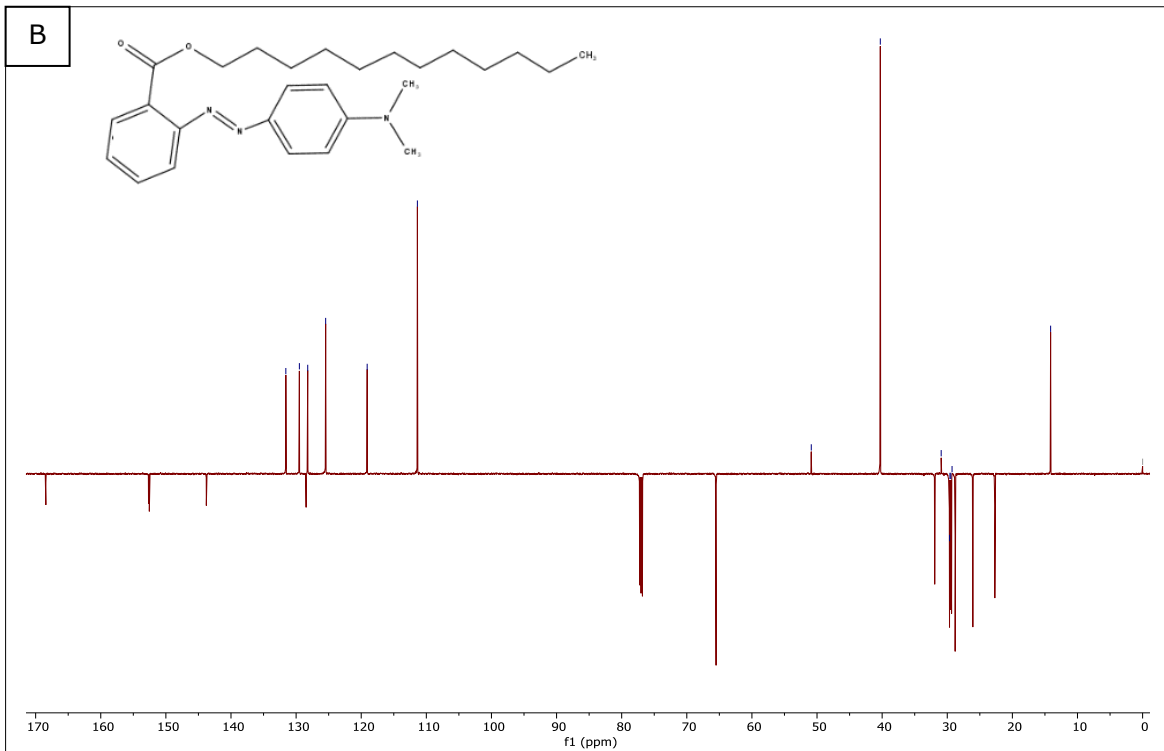
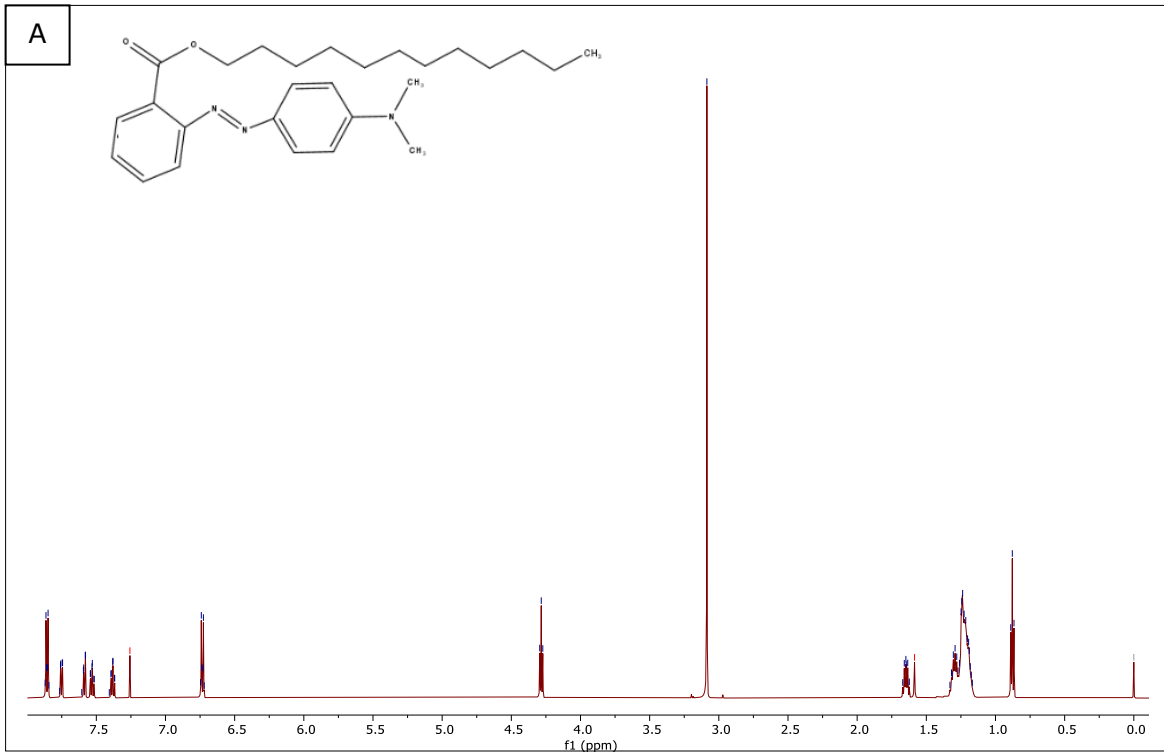
- [31] A. H. Johnstone, „CRC Handbook of Chemistry and Physics-69th Edition Editor in Chief R. C. Weast, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1988, pp. 2400, price £57.50. ISBN 0-8493-0369-5“, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, sv. 50, izd. 2, str. 294–295, tra. 2007, doi: 10.1002/jctb.280500215.
- [32] F. Ahmed, R. Dewani, M. K. Pervez, S. J. Mahboob, i S. A. Soomro, „Non-destructive FT-IR analysis of mono azo dyes“, *Bulg. Chem. Commun.*, sv. 48, izd. 1, str. 71–77, 2016, [Na internetu]. Dostupno na: <http://webbook.nist.gov>.
- [33] V. I. Yuzhakov, „Aggregation of dye molecules and its influence on the spectral luminescent properties of solutions“, *Russ. Chem. Rev.*, sv. 61, izd. 6, str. 613–628, 1992, doi: 10.1070/rc1992v061n06abeh000988.
- [34] B. Neumann, K. Huber, i P. Pollmann, „A comparative experimental study of the aggregation of Acid Red 266 in aqueous solution by use of <sup>19</sup>F-NMR, UV/Vis spectroscopy and static light scattering“, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, sv. 2, izd. 16, str. 3687–3695, 2000, doi: 10.1039/b004172f.
- [35] B. Neumann, „On the aggregation behavior of pseudoisocyanine chloride in aqueous solution as probed by UV/vis spectroscopy and static light scattering“, *J. Phys. Chem. B*, sv. 105, izd. 34, str. 8268–8274, 2001, doi: 10.1021/jp0111259.
- [36] L. D’Ilario i A. Martinelli, „Toluidine blue: Aggregation properties and structural aspects“, *Model. Simul. Mater. Sci. Eng.*, sv. 14, izd. 4, str. 581–595, 2006, doi: 10.1088/0965-0393/14/4/003.
- [37] A. Baheti, P. Tyagi, K. R. J. Thomas, Y. Hsu, i J. T. Lin, „Simple Triarylamine-Based Dyes Containing Fluorene and Biphenyl Linkers for Efficient“, *J. Phys. Chem. C*, sv. 113, izd. 20, str. 8541–8547, 2009.

- [38] G. Wang, Y. Zhang, Y. Cui, M. Duan, i M. Liu, „Study on the behavior of Hyper-Rayleigh scattering for silver nanoparticles with aggregation effects“, *J. Phys. Chem. B*, sv. 109, izd. 3, str. 1067–1071, 2005, doi: 10.1021/jp0472919.
- [39] K. Milton i Erker, „Scattering by a Sphere“, u *The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation*, Elsevier, 1969, str. 27–96.
- [40] V. J. Parekh, V. K. Rathod, i A. B. Pandit, *Substrate Hydrolysis: Methods, Mechanism, and Industrial Applications of Substrate Hydrolysis*, Second Edi., sv. 2. Elsevier B.V., 2011.
- [41] Brookhaven Instruments Corporation, *Instruction Manual for the NanoBrook Series Particle/Protein Size and Zeta Potential Analyzer*, sv. NanoBrook,. 2014.
- [42] X. Ge, M. Wei, S. He, i W. E. Yuan, „Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery“, *Pharmaceutics*, sv. 11, izd. 2, 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11020055.
- [43] U. Seifert, „Configurations of fluid membranes and vesicles“, *Adv. Phys.*, sv. 46, izd. 1, str. 13–137, velj. 1997, doi: 10.1080/00018739700101488.
- [44] S. M. Shaheen, F. R. Shakil Ahmed, N. Hossen, M. Ahmed, S. Amran, i Anwar-Ul-Islam, „Liposome as a carrier for advanced drug delivery“, *Pakistan J. Biol. Sci.*, sv. 9, izd. 6, str. 1181–1191, 2006, doi: 10.3923/pjbs.2006.1181.1191.
- [45] J. L. Pérez-Díaz, M. A. Álvarez-Valenzuela, i J. C. García-Prada, „The effect of the partial pressure of water vapor on the surface tension of the liquid water-air interface“, *J. Colloid Interface Sci.*, sv. 381, izd. 1, str. 180–182, 2012, doi: 10.1016/j.jcis.2012.05.034.

## 8. Dodatni materijali

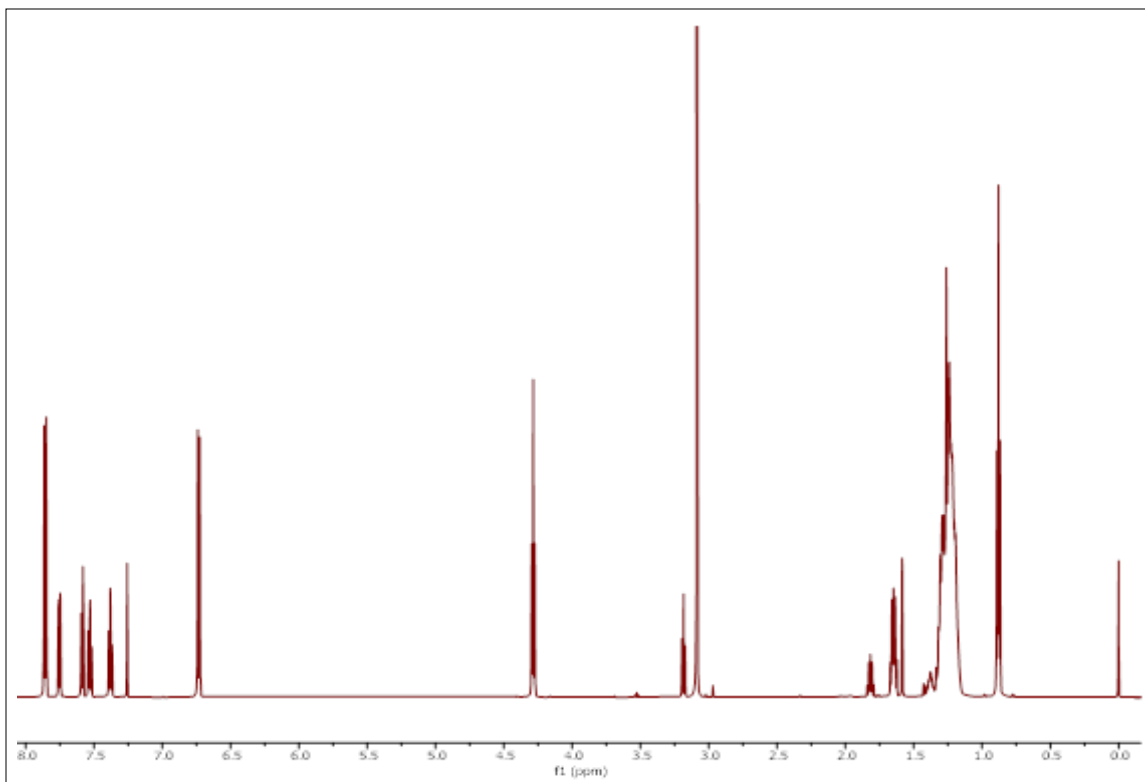


Slika 1.  $^1\text{H}$  NMR spektar (A) i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (B) **spoja 1**.

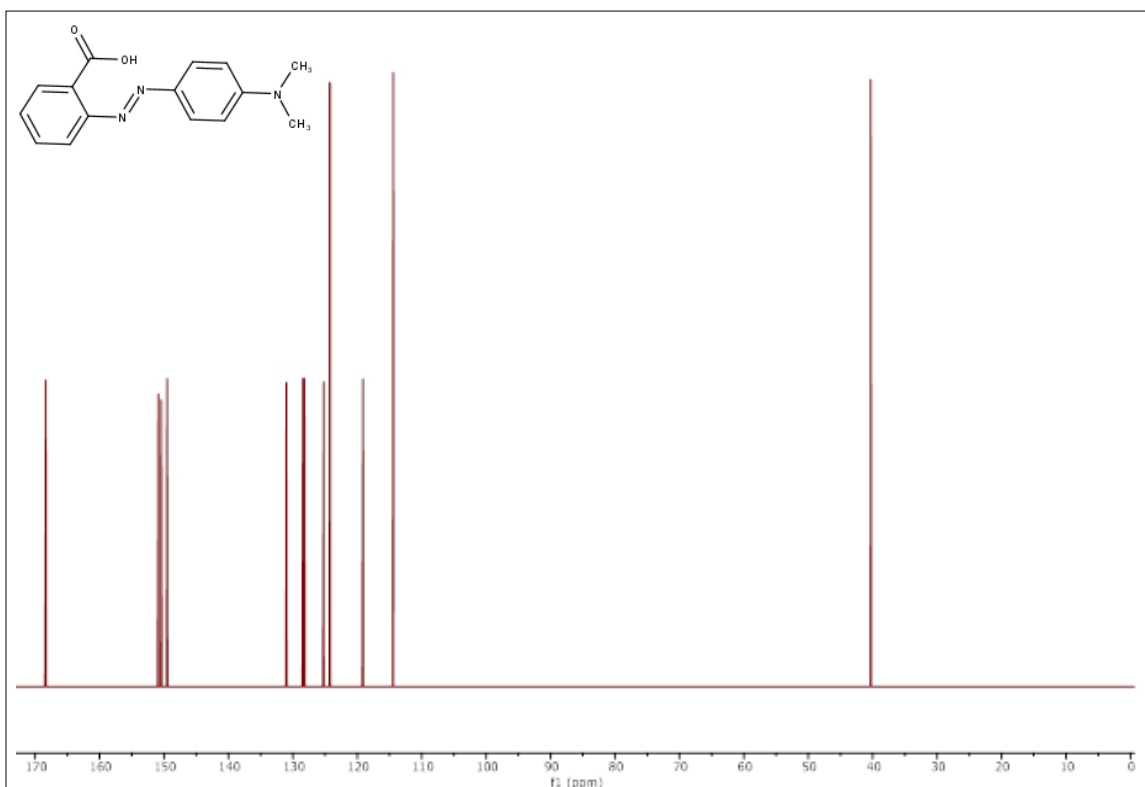


Slika 2.  $^1\text{H}$  NMR spektar (A) i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (B) **spoja 2.**

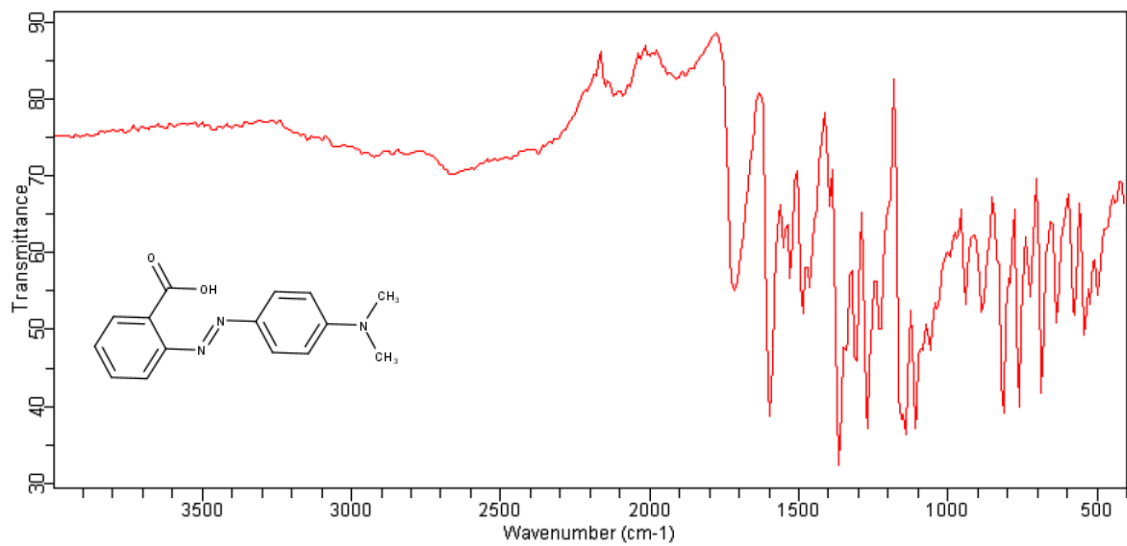




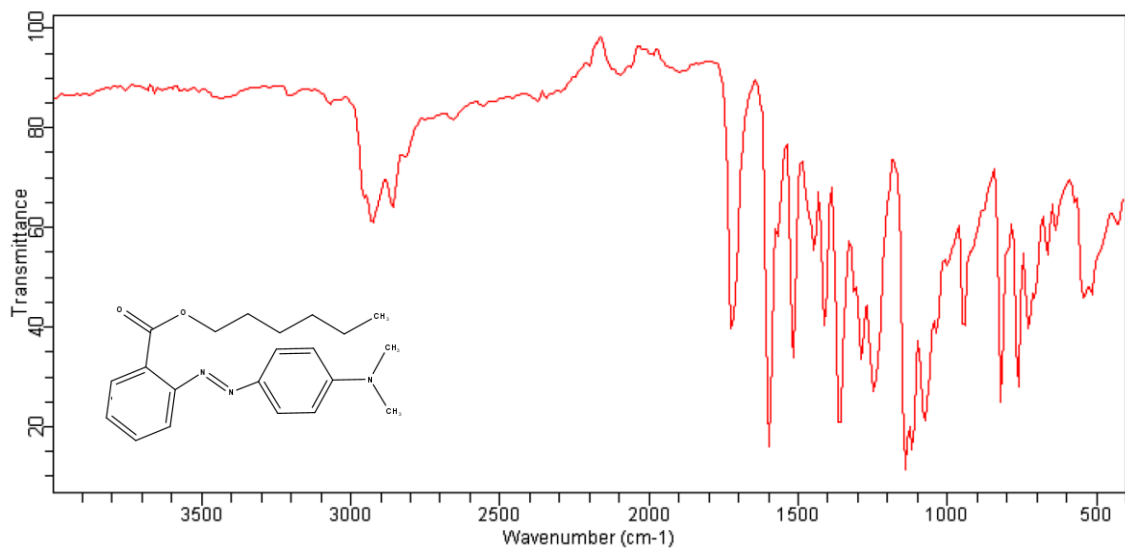
Slika 3.  $^1\text{H}$  NMR spektar nepročišćenog **spoja 2**.



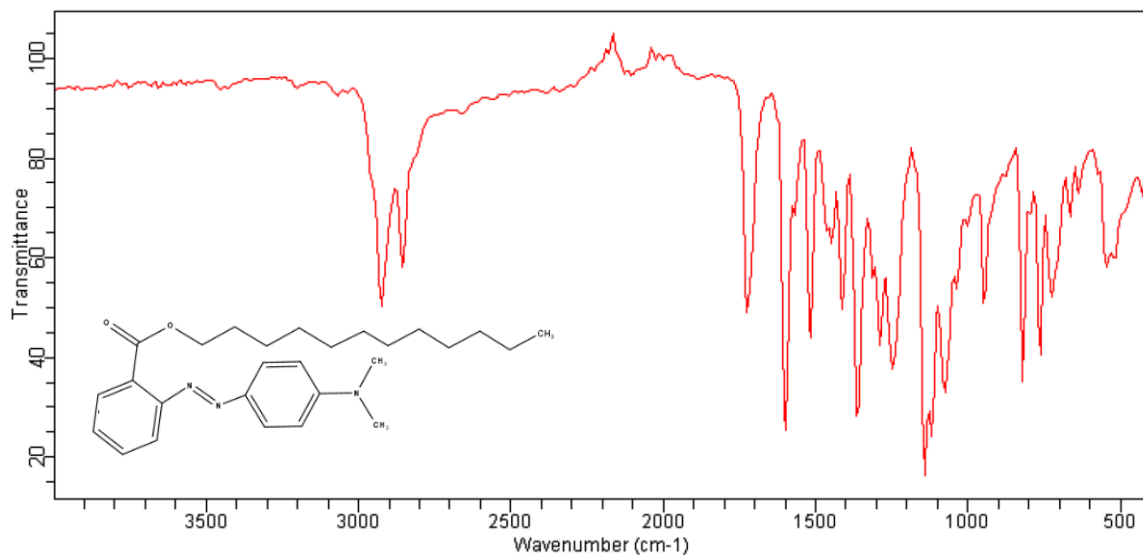
Slika 4.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar metil crvenog.



Slika 5. FTIR-ATR spektar metil crvenog.



Slika 6. FTIR-ATR spektar **spoja 1**.



Slika 7. FTIR ATR spektar **spoja 2**.