

Optički nanosenzori dopirani fluorescentnim pH osjetljivim bojilima

Posavec, Mario

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:132644>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mario Posavec

**OPTIČKI NANOSENZORI DOPIRANI FLUORESCENTINM
pH OSJETLJIVIM BOJILIMA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Doc. dr. sc. Ivana Steinberg

Članovi ispitnog povjerenstva: Doc. dr. sc. Ivana Steinberg
dr. sc. Petar Kassal, poslijedoktorand
dr. sc. Nataša Perin, poslijedoktorand

Zagreb, lipanj 2015.

Posebne zahvale dugujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Steinberg zbog vodstva i stručnih savjeta te pomoći pruženima tijekom izrade ovog završnog rada. Emi Horak, asistentici na Zavodu za opću i anorgansku kemiju, zahvaljujem od srca zbog strpljivosti, pomoći, savjeta i poticaja tijekom pisanja rada. Također zahvaljujem i ostalim djelatnicima Zavoda za opću i anorgansku kemiju.

Osim toga, zahvaljujem i svojim kolegama, prijateljima, djevojci i obitelji zbog podrške, razumijevanja i strpljenja tijekom mojeg petogodišnjeg studija.

SAŽETAK

Cilj ovog rada jest priprava funkcionalnih nanočestica dopiranih fluorescentnim pH osjetljivim bojilima u svrhu razvoja novih optičkih nanosenzorskih sustava. Kao fluorescentna bojila korišteni su Rhodamin B, lipofilizirano Nile Blue bojilo i 2-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril (spoj **1**). Kao nosioci navedenih bojila, korištene su silika i polimerne nanočestice.

Pripravljene su 3 vrste silika nanočestica (čestice **1**, **2** i **3**) modificiranom Stöberovom metodom. Čestice **1** pripravljene su miješanjem 30 mL etanola s 1 mL tetraetil ortosilikata (TEOS), 2 mL amonijaka i 0,5 mL vode uz dodatak fluorescentnog bojila Rhodamina B. Čestice **2** su uz sve navedeno sadržavale i (3-aminopropil)trietoksilan (APTES) kao prekursor u sol – gel postupku stvaranja nanočestica, dok su čestice **3** pripravljene na način da je umjesto Rhodamina B (RB) u reakcijsku smjesu dodan derivat Rhodamina B (RBS) funkcionaliziran silanolnim grupama. Pripravljene silika nanočestice okarakterizirane su UV/VIS apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom u vodi i etanolu. Također su pretražnom elektronskom mikroskopijom određene veličina i raspodjela nanočestica.

Polimerne nanočestice dopirane lipofiliziranim Nile Blue bojilom i bojilom **1** pripravljene su metodom precipitacije otapanjem 50 mg polimera Eudragita® u 25 mL suhog acetona, 1,5 mg lipofiliziranog Nile Blue bojila / bojila **1** te potom naglog dodavanja 150 mL vode. Pripravljene polimerne nanočestice dopirane lipofiliziranim Nile Blue bojilom okarakterizirane su UV/VIS apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom u vodi i etanolu, dok su polimerne nanočestice dopirane bojilom **1** okarakterizirane u univerzalnom puferu u rasponu pH = 1,0 - 13,0. Također su pretražnom elektronskom mikroskopijom određene veličina i raspodjela nanočestica.

U danim eksperimentalnim uvjetima spoj **1** (2-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril), zarobljen u polimernim nanočesticama, pokazuje pH odziv koji je uz daljnja istraživanja potencijalno primjenjiv u senzorskim sustavima.

Ključne riječi: silika nanočestice
polimerne nanočestice
Rhodamin B
lipofilizirani Nile Blue (Chromoionophore 1)
2-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril

SUMMARY

The aim of this work was preparation of functional nanoparticles doped with fluorescent pH-sensitive dyes in order to develop novel optical nanosensor systems. Rhodamine B, lyophilized Nile Blue and 2-piperidinilbenzimidazo [1,2-*a*] quinoline-6-carbonitrile (dye **1**) were used as fluorescent dyes. Silica and polymer nanoparticles were used as dye carriers.

Three kind of silica nanoparticles were prepared (particles **1**, **2** and **3**) by modified Stöber method. Particles **1** were prepared by mixing 30 mL of ethanol with 1 mL of tetraethyl orthosilicate (TEOS), 2 mL of ammonia and 0.5 mL of water with the addition of Rhodamine B. Particles **2** had all of the above with addition of (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES), while particles **3** were prepared in a way that instead of adding Rhodamine B (RB), modified Rhodamine B (RBS) was added to the reaction mixture. Prepared silica nanoparticles were characterized by UV / VIS absorption and fluorescence spectroscopy in water and ethanol. In addition, size and distribution of nanoparticles were determined by scanning electron microscopy.

Polymeric nanoparticles doped with lipophilised Nile Blue dye and dye **1** were prepared by the precipitation method by dissolving 50 mg of polymer Eudragit® in 25 mL of dry acetone, 1.5 mg of lyophilised Nile Blue dye / dye **1** and the rapid addition of 150 mL of water. Prepared polymeric nanoparticles doped with Nile Blue dye were characterized by UV / VIS absorption and fluorescence spectroscopy in water and ethanol, whereas polymeric nanoparticles doped with dye **1** were characterized in water and ethanol as well as in universal buffer at pH = 1,0 – 13,0. In addition, size and distribution of nanoparticles were determined by scanning electron microscopy.

It was found that compound **1** (2-piperidinilbenzimidazo [1,2-*a*] quinoline-6-carbonitrile), trapped in a polymeric nanoparticle, shows the pH response which is, along additional research, potentially usable in sensor systems.

Key words: silica nanoparticles
polymeric nanoparticles
Rhodamine B
lyophilized Nile Blue (Chromoionophore 1)
2-piperidinilbenzimidazo [1,2-*a*] quinoline-6-carbonitrile

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Opći dio	3
2.1. Nanočestice i njihova primjena	4
2.2. Optički nanosenzori	5
2.2.1. Vrste optičkih nanosenzora	6
2.2.1.1. <i>Dendrimeri i makromolekularni konjugati</i>	7
2.2.1.2. <i>Nanosenzori temeljeni na polimernim materijalima</i>	7
2.2.1.3. <i>Nanosenzori temeljeni na sol-gel materijalima</i>	8
2.2.1.4. <i>Nanosenzori temeljeni na kvantnim točkama</i>	9
2.2.1.5. <i>Nanosenzori temeljeni na ostalim materijalima</i>	10
2.2.2. Metode pripreme optičkih nanosenzora	11
2.2.2.1. <i>Stöberova metoda</i>	11
2.2.2.2. <i>Metoda precipitacije</i>	12
2.3. Optički nanosenzori dopirani fluorescentnim bojilima	14
2.3.1. Fluorescentna bojila	14
2.3.1.1. <i>pH osjetljiva fluorescentna bojila</i>	16
2.3.2. Metode karakterizacije optičkih nanosenzora	17
2.3.2.1. <i>Apsorpcijska spektrofotometrija</i>	17
2.3.2.2. <i>Fluorescencijska spektrofotometrija</i>	18
2.3.2.3. <i>Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)</i>	19
2.3.3. Literaturni pregled optičkih nanosenzora dopiranih pH osjetljivim fluorescentnim bojilima	20
3. Eksperimentalni dio	24
3.1. Materijali	25
3.2. Instrumenti	27
3.3. Priprava otopina	27

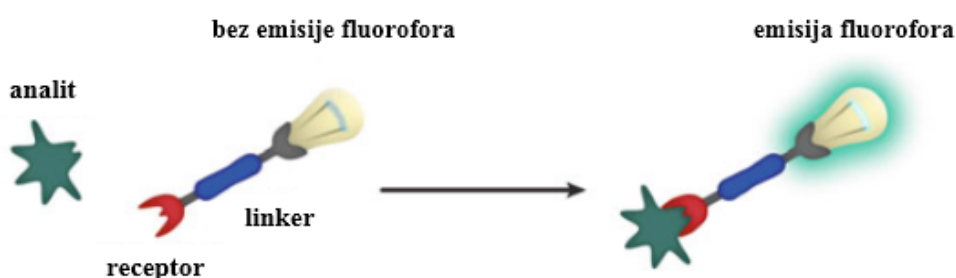
3.4.	Sinteza silika nanočestica	28
3.4.1.	Sinteza čistih silika nanočestica	28
3.4.2.	Sinteza silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B.....	28
3.4.3.	Spektrofotometrijska karakterizacija silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B	29
3.5.	Sinteza polimernih nanočestica	30
3.5.1.	Sinteza polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojilom (Chromoionophore 1).....	30
3.5.2.	Sinteza polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1	30
3.5.3.	Spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1.....	31
4.	Rezultati	32
4.1.	Sinteza silika nanočestica	33
4.1.1.	Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B	33
4.2.	Sinteza polimernih nanočestica	39
4.2.1.	Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojilom.....	39
4.2.2.	Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1	41
4.2.3.	Spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1 u ovisnosti o pH	45
5.	Rasprava	47
5.1.	Sinteza silika nanočestica	48
5.1.1.	Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B	48
5.2.	Sinteza polimernih nanočestica	50
5.2.1.	Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojilom.....	50

5.2.2. Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1	51
5.2.3. Spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1 u ovisnosti o pH	52
6. Zaključak	54
7. Literatura	57
ŽIVOTOPIS	63

1. Uvod

Fotokemija, koja se bavi temeljnim interakcijama svjetla s materijom, u posljednje vrijeme sve više privlači istraživače iz različitih područja. Konkretno, interes se prebacuje iz čisto molekularnih na supramolekularne strukture te u novije vrijeme nanostrukture, gdje intermolekularne interakcije mogu dovesti do novih fotokemijskih i fotofizikalnih svojstava. Takve su strukture zapravo idealna platforma za par elementarnih procesa (apsorpcija i emisija svjetlosti, prijenos energije i elektrona), ali i mnogo složenijih procesa (usmjerena migracija ekscitacijske energije ili fotoinjekcija više elektrona) kako bi se dizajnirali funkcionalni fotokemijski uređaji nano veličina.

Optički nanosenzori našli su široku primjenu u mnogim područjima kao što su praćenje stanja okoliša, kontrola procesa ili analiza hrane i pića. Područje optičkih nanosenzora predstavlja jedan od najbrže razvijajućih područja u biologiji i medicini. Najčešće korištena tehnika stvaranja i prijenosa signala pri tom je fluorescencija, zbog visoke osjetljivosti i mogućnosti minijaturizacije. Klasični dizajn optičkog senzora temeljenog na fluorescenciji uključuje dvije osnovne skupine, receptor odgovoran za prepoznavanje molekule analita i fluorofor odgovoran za signaliziranje (Slika 1.).



Slika 1. Shematski prikaz kemosenzora [1]

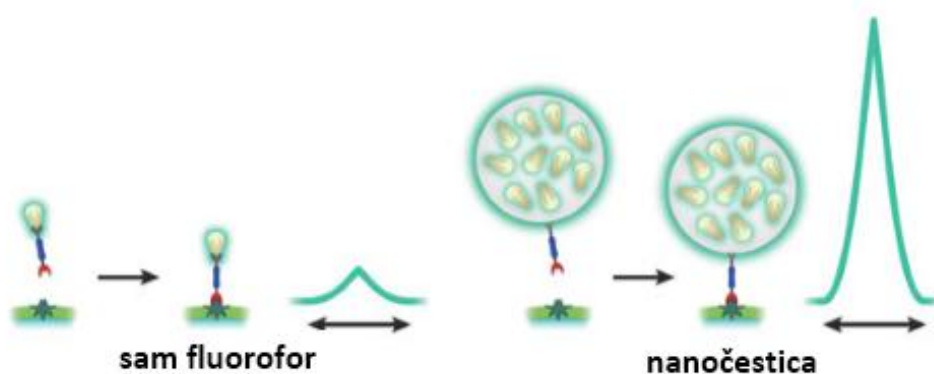
Optički nanosenzori predstavljaju napredne analitičke alate koji kombiniraju robusnost konvencionalnih optičkih senzora s fleksibilnošću otopljenih indikatora. Značajke optičkih nanosenzora uključuju mogućnost mjerenja u vrlo malim volumenima, prikladnost za 3D prikaz, nisku toksičnost, visoku selektivnost, specifičnost i otpornost na vanjske smetnje (kao što je voda) te fleksibilnost modificiranja većine svojstava unutar polimerne matrice [2].

2. Opći dio

2.1. Nanočestice i njihova primjena

Nanočestice su definirane kao disperzije krutih čestica u rasponu veličina od 10-10000 nm. U nanotehnologiji se čestica definira kao mali objekt koji se ponaša kao cjelina s obzirom na njegov transport i svojstva.

Nanočestice su trenutno područje intenzivnog znanstvenog istraživanja, a napredak u nanotehnologiji u proteklom desetljeću doveo je do širokog spektra njihove primjene u biomedicinskim, optičkim i elektroničkim područjima te dijagnostici [3]. Primjena nanotehnologije u dijagnostici je vrlo atraktivna jer je potreban mali volumen uzorka, čime je omogućeno postizanje vrlo niske granice detekcije. Korištenje nanočestica u dijagnostičkim testovima čini iste bržima i osjetljivijima u usporedbi s ispitivanjima temeljenima na reakcijama s biomolekulama. Nadalje, nanočestice posjeduju jedinstvena optička i magnetska svojstva ovisno o njihovom sastavu. Štoviše, ovisno o njihovoj namjeni, nanočestice se mogu modificirati kako bi zadovoljile traženim svojstvima. Svojstva nanočestica su jedinstvena te u mnogim područjima još uvijek nedovoljno istražena. Uporaba nanočestica kao (kemo)senzora je također jedno od atraktivnih znanstvenih područja istraživanja, pri čemu se jedinstvena svojstva nanočestica iskorištavaju u svrhu stvaranja i prijenosa signala (Slika 2.) [4].



Slika 2. Usporedba signala koji proizlazi iz molekularnog kemosenzora i kemosenzora temeljenog na nanočestici [1].

Nanočestice često mogu imati neočekivana optička svojstva koja se najčešće postižu uporabom bojila [5]. Bojilo može biti otopljeno, zarobljeno, inkapsulirano ili vezano za (nano)matricu (Slika 3.), a ovisno o načinu pripreve, dobivaju se nanočestice, nanosfere i nanokapsule.

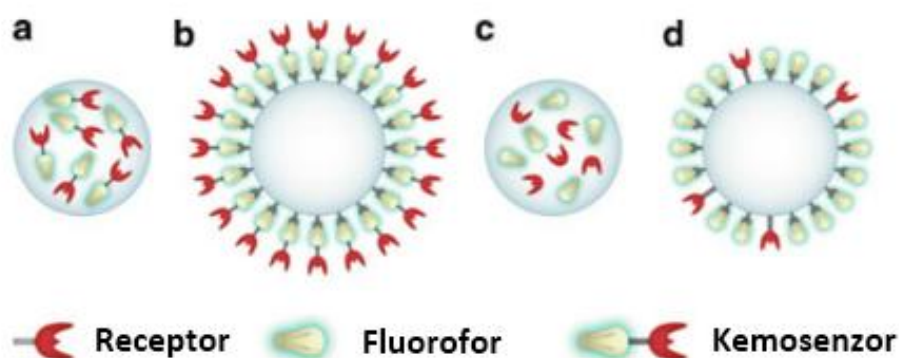
Nanokapsule su sustavi u kojima je bojilo zarobljeno u šupljini okruženoj jedinstvenom polimernom membranom, dok su nanosfere matricni sustavi u kojima je bojilo fizički i jednoliko raspršeno [6].

2.2. Optički nanosenzori

Optički senzori i biosenzori rašireni su u posljednja dva desetljeća, a danas se primjenjuju u mnogim područjima znanosti i tehnologije.

Općenito, optički nanosenzor se može definirati kao uređaj s dimenzijama manjim od 1 μm , koji je sposoban kontinuirano pratiti kemijski ili biološki parametar pretvarajući optičke informacije u analitički koristan signal.

Nanosenzor se sastoji od inertne matrice u kojoj su zarobljeni komponenta koja služi kao senzor za određeni analit i/ili optički reporter. Birani način prijenosa signala često je fluorescencija zbog visoke osjetljivosti i relativne jednostavnosti mjerenja. U većini nanosenzora dosad, kao senzorska komponenta korišteni su fluorofori koji su osjetljivi i selektivni na odabrani analit [7].



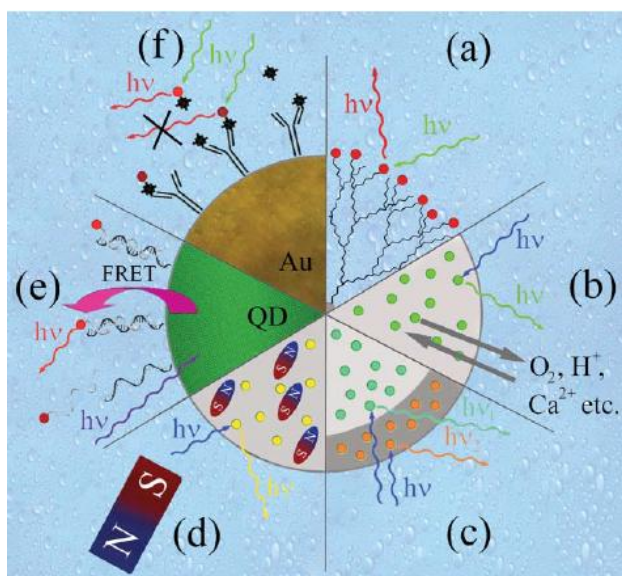
Slika 3. Različiti pristupi dizajnu nanostrukturiranih senzora; (a) kemosenzor ugrađen u jezgru nanočestice, (b) kemosenzor je vezan na površinu nanočestice, (c) odvojene receptorske i luminiscentne jedinice su kondenzirane u jezgru nanočestice, (d) odvojene receptorske i luminiscentne jedinice su vezane na površinu nanočestice [1].

Optički nanosenzori nude nekoliko prednosti u odnosu na direktno unošenje fluorescentnih bojila u stanicu. Te prednosti mogu se sažeti kao:

- i. Povećani broj analita koji se mogu mjeriti jer nanosenzori nisu ograničeni na korištenje jednog fluorofora te mogu iskoristiti kooperativne interakcije između ionofora, enzima, bojila itd.
- ii. Matrica nanosenzora štiti unutrašnju okolinu stanice od potencijalnih toksičnih efekata bojila.
- iii. Matrica nanosenzora štiti bojilo od potencijalnih interferenata u staničnom okruženju.
- iv. Poboljšana mjerenja omjera signala na dvije valne duljine (engl. *ratiometric*).
- v. *In vitro* kalibracija senzora vrijedi i za *in vivo* mjerenja [8].

2.2.1. Vrste optičkih nanosenzora

Optički nanosenzori mogu biti vrlo različitih struktura, funkcionalnosti i materijala koji su korišteni u njihovoj pripravi [9]. Na Slici 4. prikazan je pregled najčešćih nanosenzorskih koncepata.



Slika 4. Dendrimeri i mikromolekularni konjugati (a), nanosenzori temeljeni na polimernim i sol-gel materijalima (b), multifunkcionalni jezgra-ljuska sistemi (c), multifunkcionalne magnetske kuglice (d), nanosenzori temeljeni na kvantnim točkama (e) i nanosenzori temeljeni na metalnim kuglicama (f) [9]

2.2.1.1. Dendrimeri i makromolekularni konjugati

Dendrimeri su vrlo razgranate, zvjezdolike molekule nanometarskih dimenzija. Razgranati polimerni oklop dendrimera ne samo da omogućava topljivost indikatora u vodi, nego također pruža i zaštitu od nepoželjnih tvari i omogućava difuziju molekula analita. Ova svojstva čine dendrimere puno sličnijima drugim tipovima nanosenzora nego individualnim indikatorskim molekulama. Unatoč njihovoj potencijalnoj luminiscenciji, dendrimeri se rijetko upotrebljavaju u senzorske svrhe [10].

2.2.1.2. Nanosenzori temeljeni na polimernim materijalima

Područje polimernih nanočestica se u proteklih nekoliko desetljeća brzo širi i igra ključnu ulogu u širokom spektru područja, od elektronike do fotonike (*photonics*), senzora, medicine, biotehnologije, kontrole onečišćenja do tehnologije zaštite okoliša [11]. Pojam polimerne nanočestice je skupni pojam za bilo koji tip polimernih nanočestica, ali posebno često podrazumijeva oblik nanosfere i nanokapsule.

Nanosenzori temeljeni na polimernim materijalima (polimerne nanočestice, *polymer nanoparticles*, PNPs) pronašli su široku uporabu, najviše u medicini. Trenutno su najvažnija područja primjene polimernih nanočestica u optičkoj dijagnostici: analiza biomarkera, dijagnoza raka te imunotestovi. Vezanje ciljane biomolekule na nanočesticu ključan je korak u većini testova u kojima se koriste nanočestice. Kako bi se detektirao ciljani analit, vezivanje mora rezultirati u mjerljivom signalu koji se može kvantificirati [12].

Organska bojila su se pokazala kao jednostavni alati za korištenje u optičkoj dijagnostici, omogućujući detekciju analita s dobrom osjetljivošću, bilo kroz promjenu boje ili putem emisije ili fluorescencije. Nažalost, bojila su sklona ispiranju i često imaju asimetričan emisijski spektar. Fotostabilnost je važna u slučaju dužeg promatranja, gdje ispiranje uvelike utječe na njihovu sposobnost detektiranja pojedinačnih molekula. Nadalje, neka bojila kao što su primjerice derivati fluoresceina i rodamina pate od fenomena gašenja fluorescencije kada su prisutni u otopinama pri visokim koncentracijama. Unatoč

navedenim nedostacima, organska bojila su naširoko korištena zbog svoje niske cijene i jednostavnosti korištenja.

Polimerne nanočestice mogu biti napravljene od organskih polimera ili anorganskih materijala kao što je silika [13].

2.2.1.3. Nanosenzori temeljeni na sol-gel materijalima

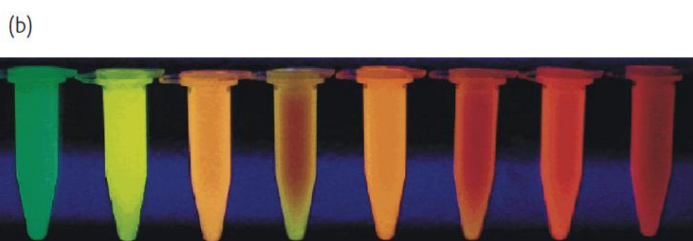
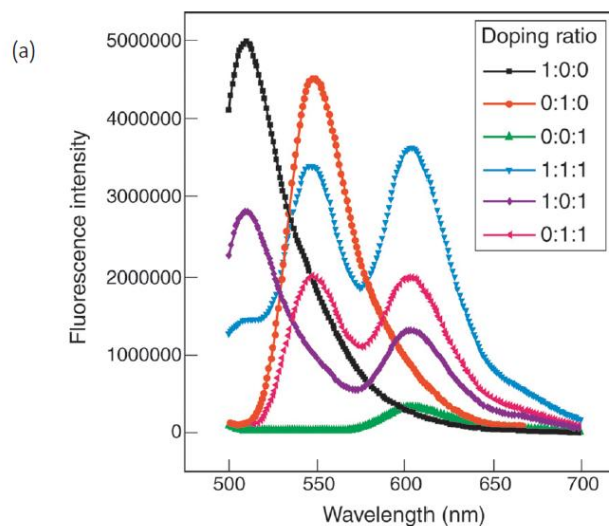
Sol-gel (anorganske silika kuglice i organski modificirana silika) vrlo su popularni materijali za izradu nanosenzora. Porozni su kako bi analit slobodno mogao difundirati, robusni su i biokompatibilni što ih čini pogodnima za unutarstanična mjerenja. Indikatorske molekule su obično zarobljene unutar pora kuglica, međutim to ne sprječava uvijek njihovo ispiranje u otopinu. Prema tome, kovalentno vezivanje je često poželjno [14].

Nanočestice temeljene na siliki (silika nanočestice, *silica nanoparticles*, SINPs) trenutno se koriste u mnogim područjima bioanalize. U usporedbi s nanočesticama temeljenim na polimerima koje se naširoko koriste u bioanalizi, silika nanočestice pokazuju manju tendenciju agregacije i manje ispiranje. Pomoću odgovarajućih uvjeta sinteze, velik broj molekula bojila se može ugraditi u jednu silika česticu [15].

Detaljnije značajke koje pruža ova vrsta nanočestica su sljedeće:

- i. silika je fotofizikalno inertna, stoga ne može biti uključena u gašenje luminiscencije ili procese fotodekompozicije
- ii. nisu toksične, međutim potrebno je provesti daljnja ispitivanja kako bi se procijenila prikladnost njihove uporabe u *in vivo* ispitivanjima
- iii. svaka silika nanočestica može sadržavati velik broj fotokemijski aktivnih vrsta omogućavajući svijetlu luminiscenciju
- iv. silika matrica štiti aktivne jedinice unutar nanočestice, potencijalno povećavajući njihovu fotostabilnost i fluorescentni kvantni prinos [16].

U području nanomaterijala, silika nanočestice dopirane fluorescentnim bojilom pokazale su izvrstan potencijal za korištenje u naprednoj bioanalizi kako bi se omogućilo i olakšalo dublje razumijevanje biologije i medicine na molekularnoj razini [17, 18].



Slika 5. Emisija silika nanočestica različitih omjera dopiranih bojila (FITC, R6G i ROX) (a); boja uzoraka nanočestica pobuđenih na valnoj duljini $\lambda = 300$ nm pri različitim omjerima dopiranih bojila [19].

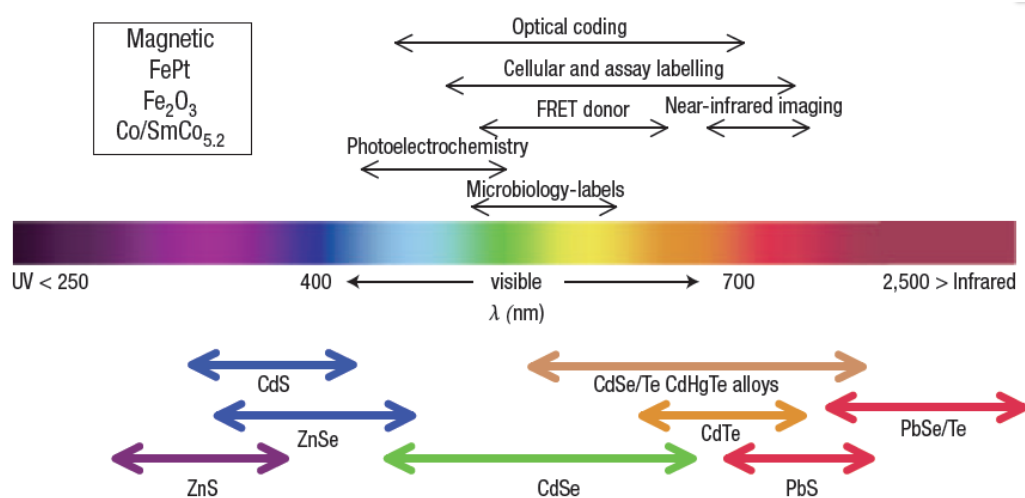
2.2.1.4. Nanosenzori temeljeni na kvantnim točkama

Poluvodički nanokristali ili kvantne točke (*quantum dots*, QDs) su nakupine od nekoliko stotina pa do tisuća atoma [20].

Kvantne točke (QDs) predstavljaju obećavajuće alternative organskim fluoroforima. Posjeduju snažan intenzitet luminiscencije, visoku fotostabilnost, široko područje apsorpcije koje omogućuje pobudu u širem rangu energija te relativno uski raspon emisije. No, uporaba kvantnih točaka u optičkim sensorima može biti ugrožena visokim stupnjem nespecifičnog vezivanja i činjenicom da mnoge tvari mogu djelovati kao gasioci. Osjetljivost na gašenje često je ozbiljan nedostatak. Međutim, može se iskoristiti za dizajn senzora, pod uvjetom da su ostale interferencije minimalne [21].

Veličina kvantnih točaka obično je u rasponu od 1 do 20 nm. Pri tako malim razmjerima, kvantne točke prilikom interakcije sa svjetlom pokazuju svojstva poput molekula u smislu elektronskih prijelaza [22].

Kvantne točke nude niz prednosti u odnosu na tradicionalne organske fluorofore u analizama temeljenim na fluorescenciji, kao što su visok intenzitet, duži životni vijek fluorescencije, bolja fotostabilnost, a također i uži i simetrični emisijski spektar. Ekscitacijski spektar kvantnih točaka proteže se daleko u UV područje te je stoga moguće pobuditi više kvantnih točaka pomoću jednog izvora svjetlosti. Kao rezultat toga, do 6 emisijskih spektara se može kombinirati bez značajnog spektralnog križanja [23].



Slika 6. Reprezentativni prikaz materijala koji se koriste kao jezgre kvantnih točaka u ovisnosti o valnoj duljini emisije [24].

2.2.1.5. Nanosenzori temeljeni na ostalim materijalima

Nanosenzori temeljeni na ostalim materijalima uključuju nanosenzore temeljene na jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama, silicijevim nanožicama i drugim materijalima koji su se pojavili u posljednje vrijeme [25].

2.2.2. Metode priprave optičkih nanosenzora

Postoje razne metode priprave nanočestica, odnosno optičkih nanosenzora. Metode priprave se odabiru ovisno o vrsti polimera i željenom svojstvu nanočestica. Već su spomenuti načini zarobljavanja željene molekule u nanočesticu - fizički ili kovalentno.

Najčešće metode za pripravu silika nanočestica su:

- 1) mikroemulzijska metoda i
- 2) Stöberova metoda,

dok su najčešće metode za pripravu polimernih nanočestica:

- 1) metoda taloženjem (metoda precipitacije)
- 2) metoda isoljavanjem
- 3) metoda dijalize
- 4) metoda sa superkritičnim fluidom
- 5) mikroemulzijska metoda
- 6) miniemulzijska metoda
- 7) metoda emulzije bez surfaktanata
- 8) metoda međufazne polimerizacije

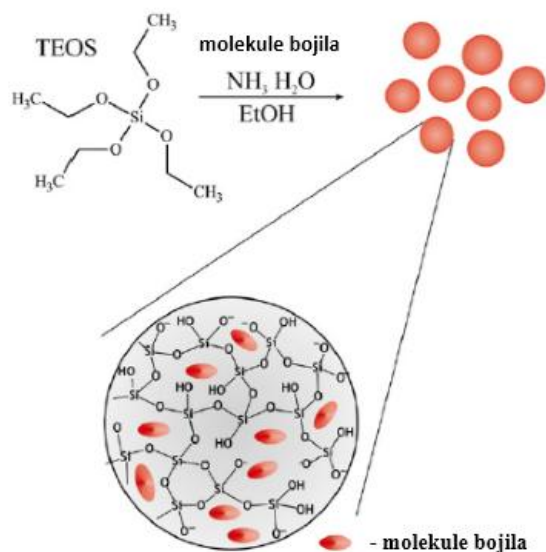
gdje su najčešće korišteni polimeri Eudragit®, poli(mliječna-ko-glikolna kiselina) (PLGA), polibutil cijanoakrilat (PBCA), dekstran ester, alilski škrob, polikaprolakton (PCL), PCL diol, polimliječna kiselina (PLA) [12].

2.2.2.1. Stöberova metoda

Stöberova metoda je najčešće korištena tehnika priprave silika nanočestica. Temelji se na modificiranom sol – gel postupku te je izvanredna u svojoj jednostavnosti. Stöberova metoda ne zahtjeva modifikacije površine ili dodatak surfaktanata kako bi se postigla izvrsna kontrola veličine čestica i glatka sferična morfologija silika čestica.

Stöberova metoda uključuje kondenzaciju i hidrolizu tetraetil ortosilikata (TEOS-a) u prisutnosti vode i amonijaka kao katalizatora (pH 11.0 - 12.0) u alkoholu. Optimiziranjem polazećih komponenata fizička i kemijska svojstva nanočestica, kao što su veličina

nanočestica, poroznost, monodisperznost i koloidna stabilnost, mogu se prilagoditi različitim primjenama [26, 27].

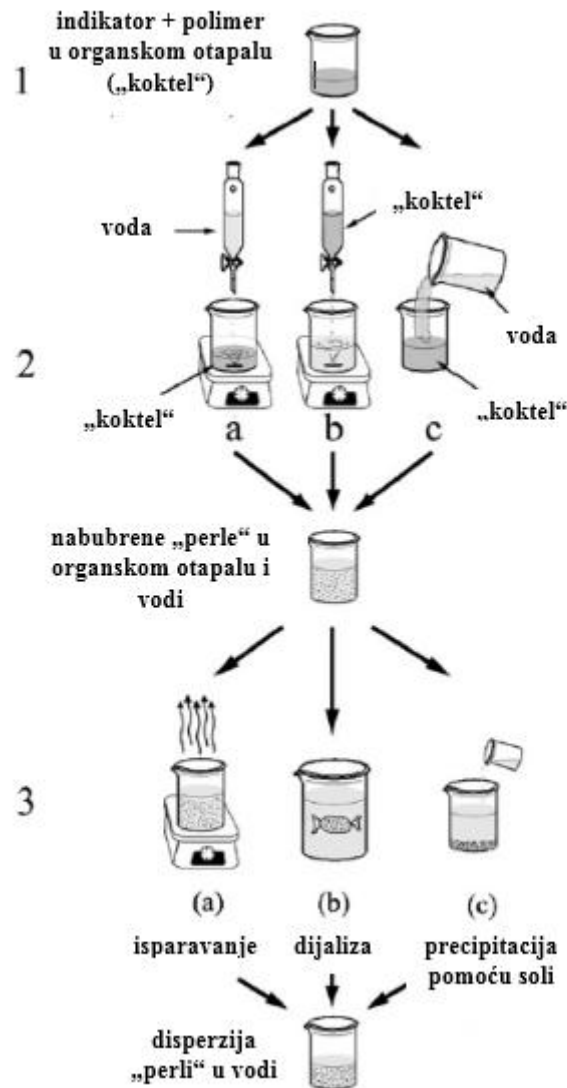


Slika 7. Shematski prikaz postupka Stöberove metode [26].

Metoda nudi mogućnost ne samo fizičkog zarobljavanja molekula fluorofora unutar matrice nanočestice, već i kovalentnog vezanja na silika matricu [28]. Fizičko zarobljavanje molekula bojila je lako te je najčešće ostvareno dodavanjem molekule izravno u reakcijsku smjesu. Nedostatak ove metode je u tome što se često opaža ispiranje bojila iz nanočestice [29].

2.2.2.2. *Metoda precipitacije*

Optički nanosenzori važnih analita poput kisika, pH, temperature itd. proizvedeni su na jednostavan način – precipitacijom. Precipitacijom, lipofilni indikatori se zarobljavaju u polimerne nanokuglice [30]. Metoda precipitacije prikazana je na Slici 8.



Slika 8. Priprema nanosenzora precipitacijom: (1) priprema „koktela“ otapanjem indikatora i polimera u organskom otapalu; (2) precipitacija čestica ((a) polagano dodavanje vode u „koktel“; (b) polagano dodavanje „koktela“ u vodu; (c) brzo miješanje „koktela“ i vode); (3) uklanjanje organskog otapala [30].

Priprema senzorskih zrnaca precipitacijom oslanja se na uporabu dvaju mješljivih otapala. Razlikujemo nekoliko ključnih koraka:

1. Priprava senzorskog „koktela“

Senzorski „koktel“ pripravlja se otapanjem indikatora i polimera u organskom otapalu ili mješavini nekoliko otapala. Dovoljne su umjerene topljivosti komponenata, a

tipične koncentracije potrebne su 0.1 – 0.4 % (w/w) polimera i 0.001 – 0.004 % (w/w) indikatora.

2. *Precipitacija*

Nanozrnca se formiraju razrjeđivanjem otopine „lošim“ otapalom, a treba naglasiti da ovaj proces ne zahtjeva dodatak surfaktanata. Voda je najčešće otapalo izbora zbog toga što su nanosenzori obično dizajnirani za mjerenja u vodenom mediju. Stoga je korištenje lipofilnih indikatora neophodno kako bi se osiguralo ne-ispiranje indikatora s nanočestica. Također je važno da indikator ima dobru topljivost u polimeru te da su oba slabo topljiva u mješavinama otapalo:voda.

Mogu se koristiti 3 različite strategije precipitacije (Slika 8. - 2): Prvo, voda se može polagano dodati u „koktel“ uz snažno miješanje (2a). Drugo, „koktel“ se može polagano dodavati u vodu (2b). Treće, voda i koktel se mogu brzo pomiješati zajedno (2c). Brzo dodavanje vode rezultira u formiranju manjih zrnaca.

3. *Pročišćavanje zrnaca*

U ovom stupnju uklanja se organsko otapalo (Slika 8. - 3). Ako je vrelište otapala niže od vode, može se ukloniti na povišenim temperaturama pri sniženom tlaku ili čak propuhivanjem zrakom ili dušikom (3a). Ako je vrelište organskog otapala više, moguće su dvije strategije. Zrnca mogu biti istaložena uz pomoć natrijevog klorida (NaCl) (3c), odvojena centrifugiranjem i ispirana vodom nekoliko puta. Alternativno, može se koristiti dijaliza, ali je vrlo dugotrajna (3b) [31, 32].

2.3. Optički nanosenzori dopirani fluorescentnim bojilima

2.3.1. Fluorescentna bojila

Organska fluorescentna bojila razlikuju se u kemijskim, fotokemijskim i spektralnim svojstvima. Neke od bitnih karakteristika koje kvalitetna fluorescentna organska bojila moraju imati [33]:

- i. *Visoki molarni apsorpcijski koeficijent, ϵ .* Ovo je parametar koji definira sposobnost molekule da apsorbira svjetlost pri određenoj valnoj duljini.

Apsorbancija, A pri bilo kojoj valnoj duljini proporcionalna je koncentraciji, c (mol dm^{-3}) i duljini puta svjetlosti u uzorku l (cm). Može se ustvrditi da ε predstavlja koeficijent proporcionalnosti:

$$A = \varepsilon * c * l \quad (1)$$

Vrijednost ε^{max} pri maksimumu apsorpcijske vrpce predstavlja apsorbirajuću moć same boje. Za organske boje ε^{max} se kreće između $3/5 * 10^3 - 2/3 * 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ta vrijednost treba biti što veća jer je onda veća osjetljivost fluorescentne detekcije [34].

- ii. *Optimalna valna duljina pobude.* Da bi se postigao najjači intenzitet fluorescencije, valna duljina pobude treba biti što bliže valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma.
- iii. *Visoko kvantno iskorištenje, ϕ .* Kvantno iskorištenje je intrinzično svojstvo fluorofora i važno je za karakterizaciju fluorescentnih proba. Definira se kao omjer apsorbiranih i emitiranih fotona procesom fluorescencije.
- iv. *Optimalna valna duljina emisije.* U obzir se mora uzeti raspon valnih duljina koje detektor može detektirati. Ako je detektor ljudsko oko, emisija bi trebala biti u vidljivom području između 400 i 750 nm.
- v. *Stokesov pomak.* Stokesov pomak je razlika između vrijednosti maksimuma prve apsorpcijske vrpce i maksimuma fluorescencijskog spektra:

$$\Delta\nu = \nu_a - \nu_f \quad (2)$$

Gdje je $\Delta\nu$ Stokesov pomak, ν_a valna duljina maksimuma apsorpcije, a ν_f valna duljina maksimuma fluorescencije. Ovaj važan parametar može dati informacije o pobuđenom stanju, Na primjer, kada je dipolni moment fluorescentne molekule veći u pobuđenom stanju nego u osnovnom stanju, Stokesov pomak će se povećati porastom polarnosti otapala. Također, detekcija fluorescentnih vrsta ju puno lakša što je Stokesov pomak veći [35].

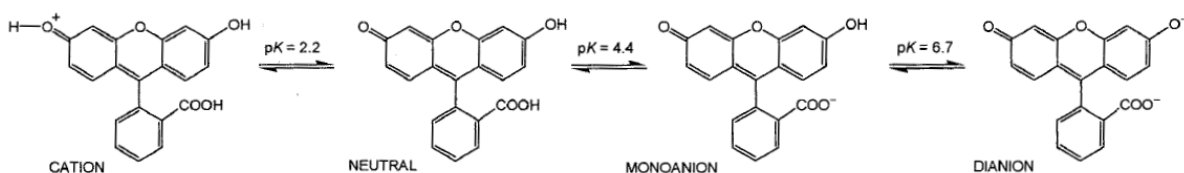
- vi. *Visoka fotostabilnost.* Svaka fluorescentna boja se može raspasti nakon nekoliko ciklusa pobude i emisije. Do raspada boje dolazi zbog fotokemijskih reakcija pri kojima dolazi do nastajanja singletnog kisika. Kvalitetni fluorofori mogu proći kroz 10^5 ciklusa pobude i emisije prije nego što dođe do raspada [36].
- vii. *Optimalna topljivost – prodiranje – reaktivnost u danim sustavima.* Svaka boja ima određena fizikalna i kemijska svojstva. Ta svojstva definiraju raspodjelu boje u heterogenim sustavima koja su posebno važna pri imobilizaciji fluorescentnih molekula za senzorske primjene. Također, boja mora biti kemijski stabilna i

njezina fluorescencija ne smije biti osjetljiva ili može biti slabo osjetljiva na faktore kao što su pH ili promjena temperature [35, 37].

2.3.1.1. pH osjetljiva fluorescentna bojila

pH je mjera koncentracije protona u istraživanom mediju. Također je pokazatelj stanja ionizacije mnogih spojeva otopljenih u vodi. Stoga su razvijeni su i aktivno se koriste mnogi fluorescentni pH indikatori i senzori.

Očitavanje pH se temelji na činjenici da se kod nekih fluorescentnih bojila ionizacijom vezanih grupa značajno mijenjaju spektroskopska svojstva vezanih grupa što dovodi do pojave novih vrpca u apsorpciji i emisiji. Budući da je kiselost tih skupina puno veća u pobuđenom nego u osnovnom stanju, pH raspon osjetljivosti u emisiji postaje značajno pomaknut prema nižim pH. Postepenom promjenom pH, maksimum fluorescencije jednog oblika spoja se smanjuje, dok se istovremeno pojavljuje maksimum na drugoj valnoj duljini. Ravnoteža između ta dva oblika se odvija trenutno [38, 39]. Neki od primjera najpoznatijih pH osjetljivih fluorofora su kumarini (najčešće 4-metilumbeliferon (4-metil-7-hidroksikumarin)), piranin te derivati piranina (DHPDS), fluorescein (Slika 9.) i derivati fluoresceina (CF (5 (ili 6) - karboksifluorescein) i BCECF (2', 7' - bis(karboksietil) - 5 (ili 6) - karboksifluorescein), SNARF i SNAFL itd.



Slika 9. Različiti oblici fluoresceina u vodenoj otopini

2.3.2. Metode karakterizacije optičkih nanosenzora

Optički nanosenzori mogu biti okarakterizirani spektroskopski i mikroskopski. Prikladno njihovoj namjeni i korištenju, koriste se metode koje najbolje opisuju uzorak i pružaju najkorisnije informacije.

U sljedećim poglavljima nalazi se pregled spektroskopskih i mikroskopskih metoda koje mogu biti uporabljene za karakterizaciju optičkih nanosenzora.

2.3.2.1. Apsorpcijska spektrofotometrija

Apsorpcijska spektrofotometrija je spektroskopska metoda u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra, a temelji se na elektronskim prijelazima u molekuli iz osnovnog u pobuđeno stanje. Apsorpcija u vidljivom dijelu spektra izravno utječe boju uzorka koju uočavamo.

Apsorpcijskom spektrofotometrijom mjeri se apsorpcija zračenja kao funkcija frekvencije i valne duljine kao posljedica interakcije s uzorkom. Uzorak apsorbira energiju, odnosno fotone, iz radijacijskog polja. Intenzitet apsorpcije varira kao funkcija frekvencije, a ta varijacija predstavlja apsorpcijski spektar [40].

Organski spojevi, a osobito spojevi s visokim stupnjem konjugacije, apsorbiraju UV i vidljivi dio elektromagnetskog spektra. UV/Vis spektrofotometrija može se koristiti za određivanje kvalitativne molekulske strukture, a također i za određivanje kvantitativnih karakteristika kemijskih reakcija. Za kvantitativno određivanje koncentracija nekog uzorka koristi se metoda koja slijedi Beer-Lambertov zakon:

$$A = \log(I_0/I) = \varepsilon * c * l \quad (3)$$

gdje je A apsorbancija, I_0 je intenzitet upadnog snopa zraka svjetlosti određene valne duljine, I je intenzitet izlaznog snopa zraka, l je duljina puta koji je svjetlost prošla, ε je apsorpcijski koeficijent, a c je koncentracija uzorka [41].

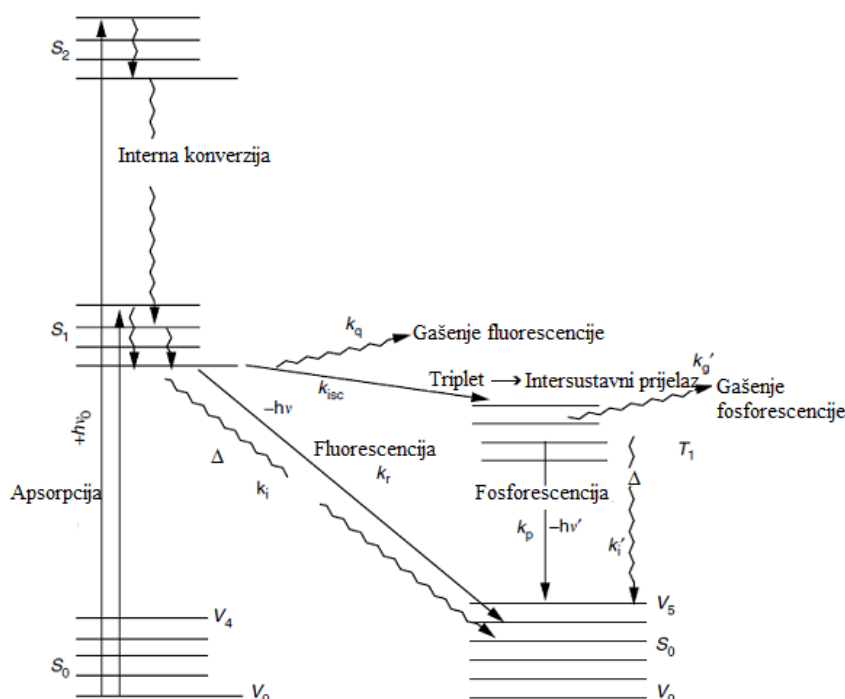
Instrument koji se koristi u UV/Vis spektrofotometriji naziva se UV/Vis spektrometar, a mjeri intenzitet zrake svjetlosti koja prolazi kroz uzorak i uspoređuje ga s intenzitetom izlazne zrake.

2.3.2.2. Fluorescencijska spektrofotometrija

Fluorescencijska spektrofotometrija jedna je od spektroskopskih metoda analize kojom se analizira fluorescencija uzorka. Uključuje korištenje snopa svjetlosti, obično ultraljubičasto svjetlo koje pobuđuje elektrone u molekulama i uzrokuje njihovu emisiju svjetlosti [42].

Molekule imaju različita stanja koja se nazivaju energijskim razinama. Općenito, uzorci koji se ispituju imaju osnovno stanje (niskoenergetsko stanje) i ekscitacijsko elektronsko stanje više energije. Unutar svakog od tih elektronskih stanja su različita vibracijska stanja.

Kod fluorescencijske spektrofotometrije, uzorak se prvotno pobuđuje, apsorbirajući foton te prelazi iz osnovnog stanja u jedno od vibracijskih stanja pobuđenog elektronskog stanja. Sudari s drugim molekulama uzrokuju gubitak vibracijske energije pobuđenih molekula dok se ne dosegne najniže vibracijsko stanje pobuđenog elektronskog stanja. Molekula tada pada u neku od vibracijskih razina osnovnog elektronskog stanja, emitirajući foton (Slika 10.). Kako molekula može pasti u bilo koju od vibracijskih razina osnovnog stanja, emitirani fotoni mogu imati različite energije, a time i frekvencije [43].



Slika 10. Elektronski prijelazi u molekuli [43].

Valna duljina emitiranog zračenja, a to ujedno znači i jačina emitirane svjetlosti, ovisi o energetskom rascjepu između osnovnog i pobuđenog stanja molekule. Bilanca energije za fluorescenciju se može napisati kao

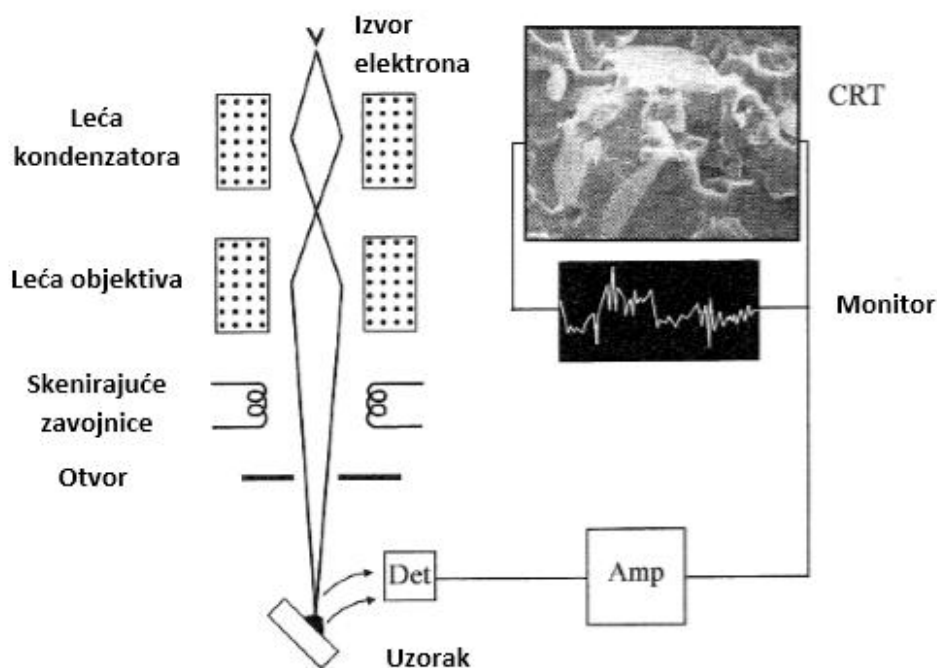
$$E_{fluor} = E_{abs} - E_{vib} - E_{otap.relax} \quad (4)$$

pri čemu je E_{fluor} energija emitiranog svjetla, E_{abs} energija apsorbiranog svjetla prilikom pobude molekule, E_{vib} energija izgubljena prilikom vibracijske relaksacije, a izraz $E_{otap.relax}$ je nastao zbog potrebe otapala koje okružuje molekulu da se reorganizira u pobuđenom stanju i ponovno reorganizira kada molekula dođe u osnovno stanje [44].

Instrument koji se koristi u fluorescencijskoj spektroskopiji naziva se fluorimetar, a mjeri intenzitet svjetlosti koje emitiraju molekule prilikom relaksacije [45].

2.3.2.3. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Pretražni elektronski mikroskop (SEM) koristi snop elektrona usmjeren prema uzorku. Prvenstveno se koristi za istraživanje površine, ili blizu površine, proučavanih primjeraka, a daje podatke o veličini, obliku, teksturi i sastavu uzorka [46]. Slika 11. prikazuje shematski dijagram SEM-a s glavnim komponentama i način rada



Slika 11. Shematski dijagram koji pokazuje osnovne komponente SEM-a [46]

Elektronski izvor (katoda) generira elektrone koji se ubrzavaju anodom (razlikom potencijala između anode i katode). Anoda također ima funkciju propuštanja elektrona točno definiranih energija. Tako ubrzani elektroni fokusiraju se sustavom elektromagnetskih leća u vrlo tanki elektronski snop. Skenirajuće zavojnice smještene pri dnu mikroskopske kolone otklanjaju elektronski snop kojim se pretražuje površina uzorka (Slika 11.). Slika SEM-a se stvara na temelju kretanja elektronske zrake po uzorku te se bilježi detektirani signal u ovisnosti o položaju zrake, a nastaje kao rezultat interakcije upadnih elektrona i uzorka pri čemu dolazi do raspršenja elektrona [47].

Većina uzoraka zahtijeva obradu prije postavljanja u vakuum komoru SEM-a. Najčešće pripreme uzoraka prije SEM analize su naparavanje nevodljivih uzoraka i dehidracija većine bioloških uzoraka. Osim toga, svi uzorci moraju podnositi niski tlak unutar vakuumske komore [48].

2.3.3. Literaturni pregled optičkih nanosenzora dopiranih pH osjetljivim fluorescentnim bojilima

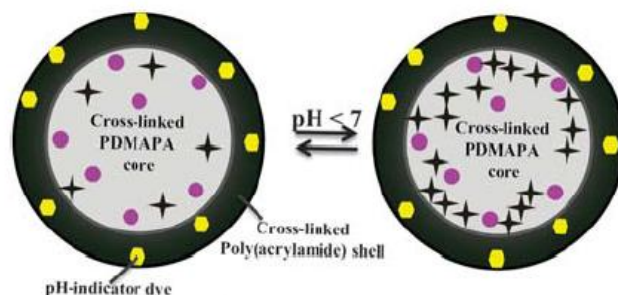
Rastući zahtjevi za praćenjem pH u okolišu, biomedicini i različitim bioprocima u zadnjih su nekoliko godina pridonijeli razvoju tehnika temeljenim na fluorescenciji zbog brojnih prednosti kao što su veća osjetljivost i selektivnost, lakoća minijaturizacije itd. [49, 50] Fluorescentni se pH nanosenzori uvelike koriste u analitičkoj kemiji, bioanalitičkoj kemiji, staničnoj biologiji za mjerenje unutarstaničnog pH i medicinskoj znanosti za praćenje pH ili pCO₂ u krvi.

Osnovne komponente pH nanosenzora su pH osjetljivi fluorofor (prijenosnik signala) i pH neosjetljiv referentni fluorofor (unutarnji standard) imobilizirani u inertnoj netoksičnoj matrici. Inertna matrica sprječava interferenciju između unutarstaničnih komponenata i osjetljivih elemenata te umanjuje štetne učinke nekih fluorofora na funkciju stanica.

Nekoliko značajnih pH nanosenzora razvijeno je u proteklih nekoliko godina od kojih se većina temelji na promjeni fluorescencije pH osjetljivog reagensa ili bojila u ovisnosti o pH ili na promjeni života fluorescencije pH osjetljivog reagensa u ovisnosti o pH [51, 52].

Mohr i suradnici su 2010. godine osmislili pH nanosenzor temeljen na mjerenju omjera signala na dvije valne duljine (engl. *ratiometric*) (Slika 12.) u poli(akrilamid)-nim

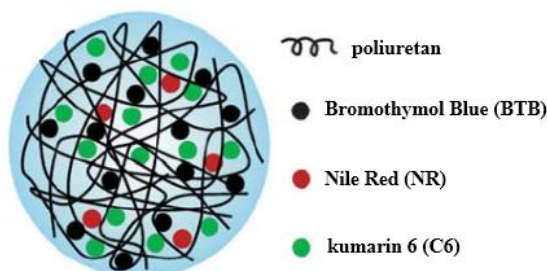
nanogelovima. Taj je polimer korišten za kovalentno vezivanje naftalimida kao pH osjetljivog reportera na ljusku i Rhodamina kao pH neosjetljivog referentnog bojila u jezgri [53]. Dvije vrste fluorofora sačinjavali su FRET sistem (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) između ljuske i jezgre.



Slika 12. Ratiometric pH senzor temeljen na nanogelu [53].

Isto tako, fluorescentni *ratiometric* biosenzor temeljen na dendrimerima razvijen je od strane Albetrazzija [54]. Senzor je bio konjugiran sa pH osjetljivim i pH neosjetljivim fluoroforima kako bi se kontrolirao prijenos energije, a matrica dendrimera je bila sposobna za ciljano određivanje podskupina organela podešavanjem fizikalno-kemijskih svojstava kroz odgovajući odabir pH osjetljivih bojila, što omogućava selektivno određivanje pH različitih organela živih stanica.

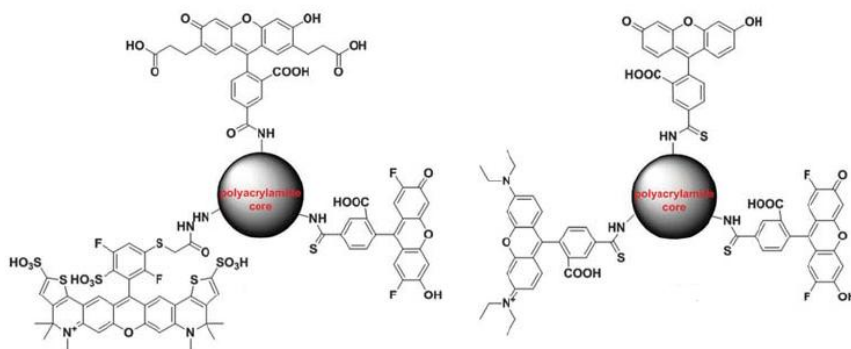
Wolfbeis i suradnici pripravili su prvi fluorescentni *ratiometric* nanogel za praćenje unutarstaničnog pH u rasponu od 6-8 [55]. Nanogel se sastojao od poliuretana, Bromothymol Bluea (BTB), Nile Red-a (NR) i kumarina 6 (C6) (Slika 13.). Poliuretan je bio pogodan kao materijal matrice u nanogelovima jer ima i hidrofilna i hidrofobna područja, a obujam mu se ne mijenja s varijacijama pH. Do učinkovitog FRET-a došlo je između C6 i NR unutar nanogela u vodenoj otopini te je pokazalo snažnu i inverznu fluorescenciju (povećanje fluorescencije C6 te smanjenje fluorescencije NR) s pH.



Slika 13. Fluorescentni *ratiometric* pH senzor temeljen na nanogelu [55].

Chiu je 2011. godine napravio prvu *rationometric* pH nanoprobnu temeljenu na poluvodučkim polimernim nanokristalima (kvantnim točkama) vezivanjem fluoresceina na polifenilalkilnu skupinu [56]. Brzo praćenje pH ostvareno je na temelju *rationometric* fluorescencije s jednom ekscitacijskom valnom duljinom i dva različita maksimuma emisije. Polimerne kvantne točke su pokazale linearni odaziv na pH u rasponu od 5-8 te su pokazale izvrsnu reverzibilnost i stabilnost prilikom korištenja za mjerenje unutarstaničnog pH.

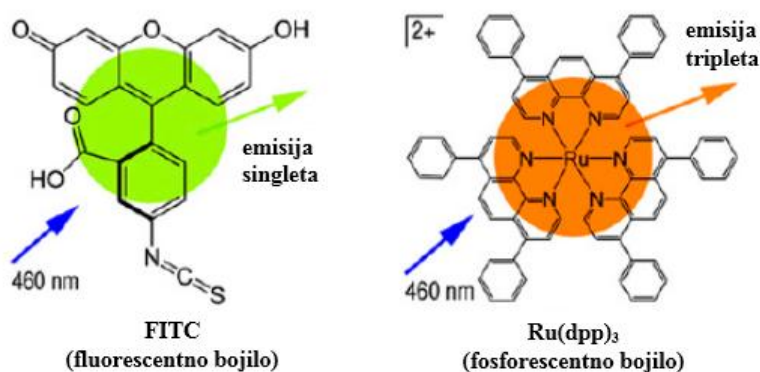
Andersen i suradnici pripravili su *rationometric* pH nanosenzor korištenjem nanočestica označenim s 3 organska bojila. Dva pH osjetljiva fluorofora, Oregon Green i fluorescein, s različitim pK_a vrijednostima te referentni fluorofor Rhodamin B su inkorporirani u nanočesticu čineći FRET sistem [57]. Također su dalje razvijeni niz poliakrilamidnih nanočestica koje su sadržavale slične komponente za uporabu u pH istraživanjima. pH osjetljiva Oregon ($pK_a = 4,8$) i fluorescein ($pK_a = 6,4$) bojila i pH neosjetljiv fluorofor Rhodamin B su pomiješani kako bi se dobio nanosenzor koji može mjeriti pH u rasponu od 3,9 do 7,3. Drugi nanosenzor dobiven je primjenom pH osjetljivog derivata fluoresceina ($pK_a = 7,0$) i pH neosjetljive komponente Alexa 663. Time je omogućen pomak u osjetilnom području pH od 3,9 do 7,9, pokazujući visoki potencijal za praćenje pH u stanicama sisavaca (Slika 14.).



Slika 14. Nanočestice označene s 3 bojila kao *rationometric* fluorescentni pH senzori [57].

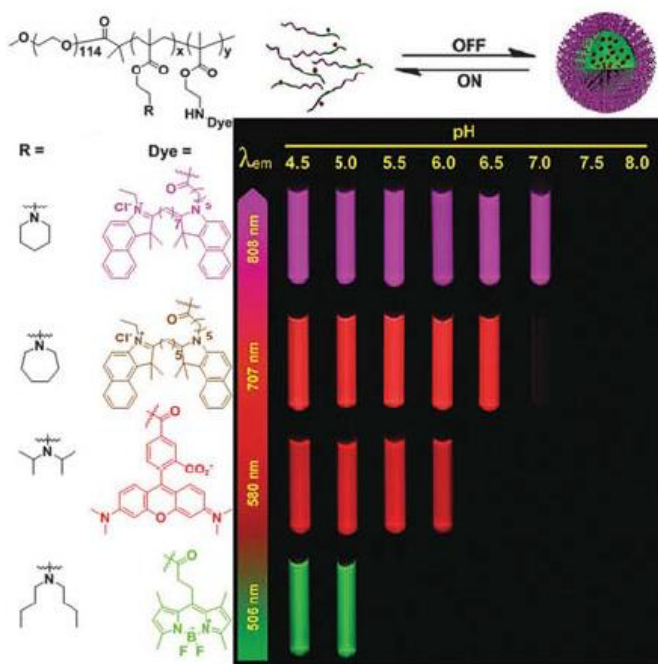
Kako bi dobili uvid u komplicirane procese bolesti, 2011. godine Babilas i suradnici razvili su optički nanosenzor s 2D visokom rezolucijom za snimanje pH *in vivo* [58]. FITC i rutenij(II)tris-(4,7-difenil-1,10-fenantrolin) ($Ru(dpp)_3$) prvotno su korišteni za vezivanje ili ugrađivanje u nanočestice temeljene na aminocelulozi i poliakrilonitrilu (Slika 15.). Neinvazivna metoda je korištena za 2D i potencijalno praćenje pH u realnom vremenu. *In*

vivo i *in vitro* eksperimenti pokazali su da su ciljani senzori visoke preciznosti i točnosti pH detekcije tijekom kroničnog zacjeljivanja rana kod ljudi.



Slika 15. Kemijska struktura indikatorskog bojila (FITC) i indikatorskog bojila (Ru(dpp)₃) [58]

Gao i suradnici su predstavili opću metodu za dobivanje podesivih, izrazito pH osjetljivih višebojnih fluorescentnih nanočestica (Slika 16.) [59]. Aminogrupe u nanoprobama su vezane kako bi se mogle upotrijebiti kao pH osjetljive jedinice, a najčešći dostupni pH neosjetljivi fluorofori sa emisijom u rasponu od zelene do približno infracrvenog područja su uvedeni kao fluorescentni reporteri. Promjena pH izaziva aktivaciju fluorescencije između „ON“ i „OFF“ stanja unutar samo 2 pH jedinice.



Slika 16. Podesivi i višebojni fluorescentni pH nanosenzori [59]

3. Eksperimentalni dio

U ovom radu pripravljene su silika i polimerne nanočestice dopirane organskim bojilima u svrhu razvoja novog optičkog nanosenzora. Silika nanočestice pripravljene su Stöberovom metodom [27] te sličnim modificiranim metodama, dok su polimerne nanočestice pripravljene metodom precipitacije [30] prema preuzetim recepturama. U silika nanočestice zarobljen je organski fluorofor Rhodamin B, dok su u polimerne nanočestice zarobljeni fluorofori Chromophore 1 (lipofilizirani Nile Blue) te novosintetizirani 2-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril (Spoj 1/Bojilo 1) (Slika 17.c) koji je prethodno pokazao kemosenzorsku aktivnost u otopini [60].

Spektralna karakterizacija dobivenih silika nanočestica provedena je u vodi i etanolu, dok je karakterizacija polimernih nanočestica provedena u vodi te različitim puferima u rasponu pH od 1,0 do 13,0.

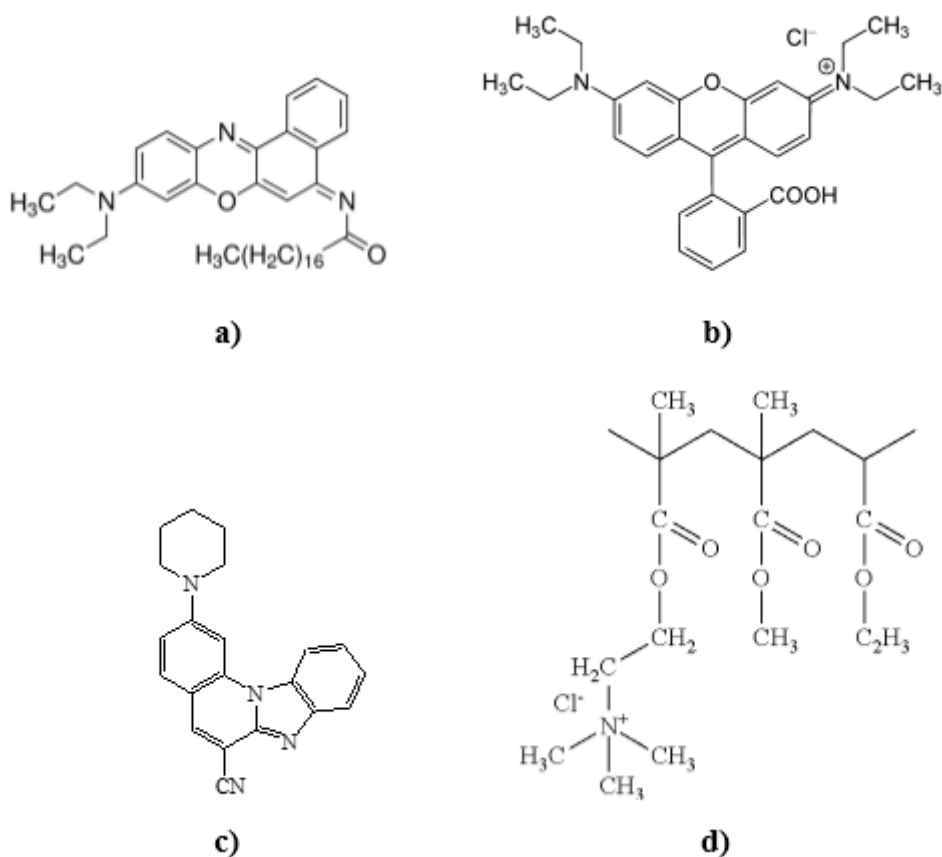
Također, dobivene polimerne nanočestice dopirane spojem 1 karakterizirane su pretražnom elektronskom mikroskopijom te je na radnim otopinama ispitan Tyndallov efekt.

3.1. Materijali

Za pripravu optičkih nanosenzora i mjernih otopina rabljene su sljedeće kemikalije:

- citratna kiselina, *Kemika d.d., Zagreb*
- fosforna kiselina, *Laborchemie Apolda*
- borna kiselina, *Laborchemie Apolda*
- natrijev hidroksid, *Kemika d.d., Zagreb*
- etanol za pranje, *Carlo Erba Reagents*
- metanol, *Sigma Aldrich*
- aceton, *Sigma Aldrich*
- kloroform, *Sigma Aldrich*
- diklormetan, *Sigma Aldrich*
- kalijev karbonat, *Fisher Chemical*
- natrijev klorid, *Alkaloid AD*
- deionizirana voda
- 2-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril (Spoj 1/Bojilo 1)
- Eudragit® RL 100, *Evonik Industries*
- Tetraetil ortosilikat (TEOS), *Fluka*

- Rhodamin B, *Fisher Chemical*
- 3-Octadekanoilimino-7-(dietilamino)-1,2-benzofenoksazin (Chromoionophore 1), *Fluka*
- (3-Aminopropil)trietoksilan (APTES), *Sigma Aldrich*



Slika 17. Prikaz molekulske strukture Chromoionophora 1 (a), Rhodamina B (b), 2-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila (Spoj 1/Bojilo 1) (c) i polimera Eudragita® (d)

3.2. Instrumenti

Pri izvedbi eksperimenata rabljeni su sljedeći instrumenti:

- ultrazvučna kupelj, *Transsonic T 460/H, Elma Hans Schmidbauer GmbH& Co KG*
- pH metar, *MA 5740, Iskra d.d.*
- UV/VIS spektrofotometar, *Cary 100 Scan*
- UV/VIS spektrofluorimetar, *Cary Eclipse*
- SEM mikroskop, *Tescan Vega Easy Probe*

3.3. Priprava otopina

Priprava otopine univerzalnog pufera

Otopine univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH pripravljene su miješanjem otopine A koja se sastoji od 100 mL 0,33 M otopine citratne kiseline, 100 mL 0,39 M otopine fosforne kiseline, 343 mL 1 M otopine NaOH i 3,54 g borne kiseline. Određeni volumen otopine A i otopine B (0,1 M otopina HCl) stavlja se u odmjernu tikvicu prema jednadžbi (5), te se nadopuni do oznake deioniziranom vodom.

$$20 \text{ mL } A + x \text{ mL } B \text{ (u 100 mL)} \quad (5)$$

x (B) = volumen klorovodične kiseline (mL)

3.4. Sinteza silika nanočestica

3.4.1. Sinteza čistih silika nanočestica

Čiste silika nanočestice sintetizirane su Stöberovom metodom tako da je u Erlenmeyerovoj tikvici pomiješano 30 mL etanola s 1 mL TEOS-a, 2 mL amonijaka i 0,5 mL vode, uz konstantno miješanje. Reakcijska smjesa ostavljena je na magnetskoj miješalici preko noći. Pripravljene čestice tri puta su centrifugirane pri sobnoj temperaturi na 3000 omin^{-1} po 30 min i sva 3 puta ispirane pomoću etanola. Isprane čestice su zatim sušene u sušioniku na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 4h.

3.4.2. Sinteza silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B

Pripravljene su silika nanočestice dopirane Rhodaminom B na 3 načina:

1. Čestice **1** pripravljene su tako da je u Erlenmeyerovoj tikvici, koja je stavljena na magnetsku miješalicu, pomiješano 30 mL etanola s 1 mL TEOS-a, 2 mL amonijaka i 0,5 mL vode te je u sve to dodano 11,5 g Rhodamina B [61]. Dobivene čestice su tri puta centrifugirane pri sobnoj temperaturi na 3000 omin^{-1} po 30 min i sva 3 puta ispirane pomoću acetona. Isprane čestice su zatim sušene u sušioniku na $90 \text{ }^\circ\text{C}$.
2. Čestice **2** pripravljene su tako da je u Erlenmeyerovoj tikvici, koja je stavljena na magnetsku miješalicu, pomiješano 30 mL etanola s 1 mL TEOS-a, 2 mL amonijaka i 0,5 mL vode te je u sve to dodano 11,8 g Rhodamina B i $5,5 \text{ } \mu\text{L}$ otopine APTES-a [61]. Dobivene čestice su tri puta centrifugirane pri sobnoj temperaturi na 3000 omin^{-1} po 30 min i sva 3 puta ispirane pomoću acetona. Isprane čestice su zatim sušene u sušioniku na $90 \text{ }^\circ\text{C}$.
3. Čestice **3** su pripravljene tako da je prvotno Rhodamin B modificiran APTES-om. U okruglu tikvicu je dodano 0,96 g Rhodamina B ($n(\text{RhB}) = 2,004 \text{ mmol}$), $0,456 \text{ mL}$ APTES-a ($n(\text{APTES}) = 1,986 \text{ mmol}$) i 30 mL kloroforma te je reakcijska

smjesa ostavljena na temperaturi vrenja preko noći. Nakon 16h u istu tikvicu dodano je još 0,23 mL APTES-a i 30 mL diklormetana te ostavljeno preko noći. Dobiveni produkt je modificirani Rhodamin B (RBS) u obliku gela [62]. Sljedeći korak je bila priprava nanočestica prema ranije opisanom postupku. U Erlenmeyerovoj tikvici pomiješan je funkcionalizirani RB (RBS) dodano je 1 mL TEOS-a, 2 mL amonijaka i 0,5 mL vode kako bi proveli reakciju sinteze silika nanočestica [63]. Nakon sinteze, otopinu s česticama smo prvotno uparavali pod sniženim tlakom kako bi uklonili organsko otapalo i koncentrirali otopinu. Dobivene čestice su tri puta centrifugirane pri sobnoj temperaturi na 3000 omin^{-1} po 30 min i sva 3 puta ispirane pomoću acetona. Isprane čestice su zatim sušene u sušioniku na $90 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4.3. Spektrofotometrijska karakterizacija silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B

Spektrofotometrijska karakterizacija silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B provedena je u vodi i etanolu. Prvotno su pripravljene *stock* otopine čestica **1**, **2** i **3**. *Stock* otopine pripravljene su odvagom 5,0 mg čestica u 5 mL vode ili etanola. Prije snimanja spektara *stock* otopina se homogenizirala na ultrazvučnoj kupelji 30 min, te prilikom snimanja spektara nije primjećeno taloženje. Spektri su snimani u kvarcnoj kivetu optičkog puta 10 mm, u području valnih duljina 200 do 800 nm. Alikvot 3 mL *stock* otopine je stavljen u kivetu te je snimljen UV/Vis apsorpcijski i emisijski spektar. Svaki sljedeći uzorak sniman na apsorpcijskom i emisijskom spektrofotometru je bila upola razrijeđena otopina.

3.5. Sinteza polimernih nanočestica

3.5.1. Sinteza polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojiom (Chromoionophore 1)

Polimerne nanočestice dopirane lipofiliziranim Nile Blue bojiom (Chromoionophore 1) sintetizirane su metodom precipitacije. Prvotno je u Erlenmeyerovoj tikvici na magnetskoj miješalici otopljeno 50 mg polimera Eudragita® u 25 mL suhog acetona. Suhi aceton pripremljen je tako da je u 125 mL acetona dodana vrhom puna žličica kalijeva karbonata te je smjesa stajala poklopljena i zaštićena nekoliko sati. Nakon što se polimer otopio, dodano je 1,5 mg lipofiliziranog Nile Blue bojila ($n(\text{Nile Blue}) = 9,506 \cdot 10^{-2} \text{ mmol}$) te je naglo dodano 150 mL vode uz jako miješanje. Dobivena otopina polimernih nanočestica je tada uparavana pod sniženim tlakom kako bi se uklonilo organsko otapalo i dodatno koncentrirala otopina. Naposljetku je dodano je 1 mL zasićene otopine natrijeva klorida kako bi se čestice istaložile i ostavljeno preko noći.

Dobivene čestice nekoliko su tri puta centrifugirane pri sobnoj temperaturi na 3500 omin^{-1} po 15 min i sva 3 puta ispirane pomoću vode. Isprane čestice su zatim sušene u sušioniku na $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 4h.

3.5.2. Sinteza polimernih nanočestica dopiranih bojiom 1

Polimerne nanočestice dopirane bojiom 1 pripravljene su metodom precipitacije. Priprava je provedena na način da je prvotno u Erlenmeyerovoj tikvici na magnetskoj miješalici otopljeno 50 mg polimera Eudragita® u 25 mL suhog acetona. Nakon što se polimer otopio, dodano je 1,5 mg bojila 1 ($n(\text{spoj 1}) = 1,612 \cdot 10^{-1} \text{ mmol}$). Nakon što se bojilo otopilo, naglo je dodano 150 mL vode uz jako miješanje kroz 5 min. Dobivena otopina polimernih nanočestica je tada uparavana pod sniženim tlakom kako bi se uklonilo organsko otapalo i dodatno koncentrirala otopina. Naposljetku je dodano je 1 mL zasićene otopine natrijeva klorida kako bi se čestice istaložile i ostavljeno preko noći.

Dobivene čestice nekoliko su tri puta centrifugirane pri sobnoj temperaturi na 3500 omin^{-1} po 15 min i sva 3 puta ispirane pomoću vode. Isprane čestice su zatim sušene u sušioniku na $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 4h.

3.5.3. Spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1

Spektrofotometrijska karakterizacija polimernih čestica dopiranih bojilom **1** provedena je u vodi i univerzalnom puferu u rasponu pH od 1,0 do 13,0 na UV/VIS spektrofotometru i UV/VIS spektrofluorimetru. Prvotno je pripravljena *stock* otopina nanočestica dopiranih bojilom **1** odvagom posušenih čestica ($m = 0,6 \text{ mg}$) u 5 mL vode. Nakon toga, mjerenje je obavljeno na taj način da je uzeto 15 μL iz *stock* otopine u 3 mL vode koja se nalazila u kiveti (0,6 mg / 5 mL). Svako sljedeće sadržavalo po još 15 μL *stock* otopine koje je otopljeno u istoj kiveti. Prije snimanja spektara *stock* otopina se homogenizirala na ultrazvučnoj kupelji 30 min, te prilikom snimanja spektara nije primjećeno taloženje.

Spektrofotometrijska karakterizacija polimernih čestica dopiranih bojilom **1** u univerzalnom puferu u rasponu pH od 1,0 do 13,0 provedena je tako da je u 3 mL univerzalnog pufera otopljeno 50 μL pripremljene *stock* otopine (0,6 mg / 5 mL). Spektri su snimani u kvarcnoj kiveti optičkog puta 10 mm, u području valnih duljina 200 do 800 nm.

4. Rezultati

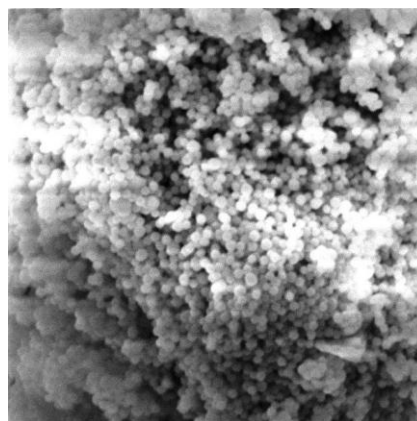
4.1. Sinteza silika nanočestica

Prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.1., Stöberovom metodom pripravljene su čiste silika nanočestice. Njihov oblik, veličina i raspodjela određeni su pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM).

Na slici 18a. prikazana je fotografija pripremljenih čistih silika nanočestica, dok je na slici 18b. prikazana SEM slika istih čestica.



a)



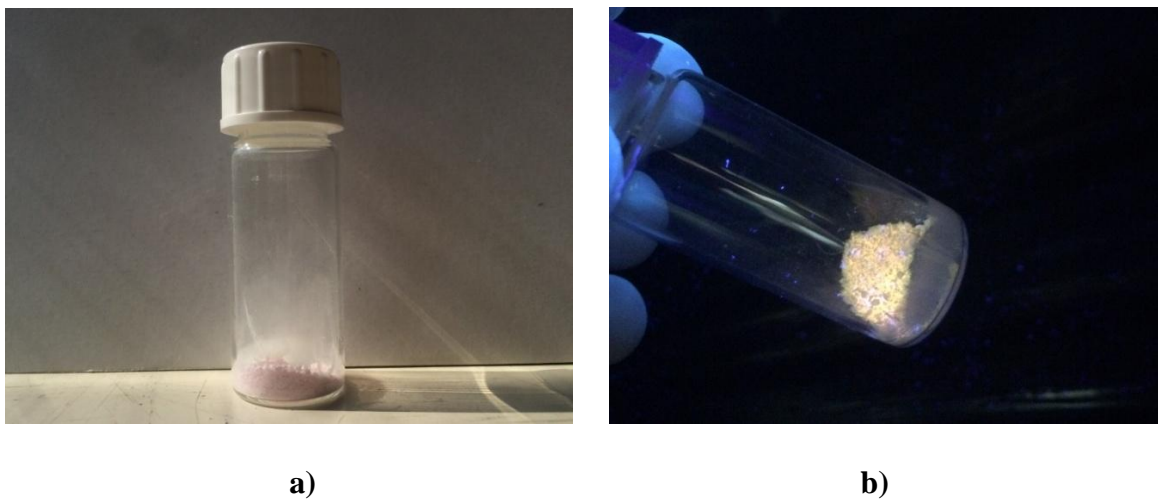
b)

Slika 18. Čiste silika čestice na danjem svjetlu (a); SEM slika čistih silika čestica (b)

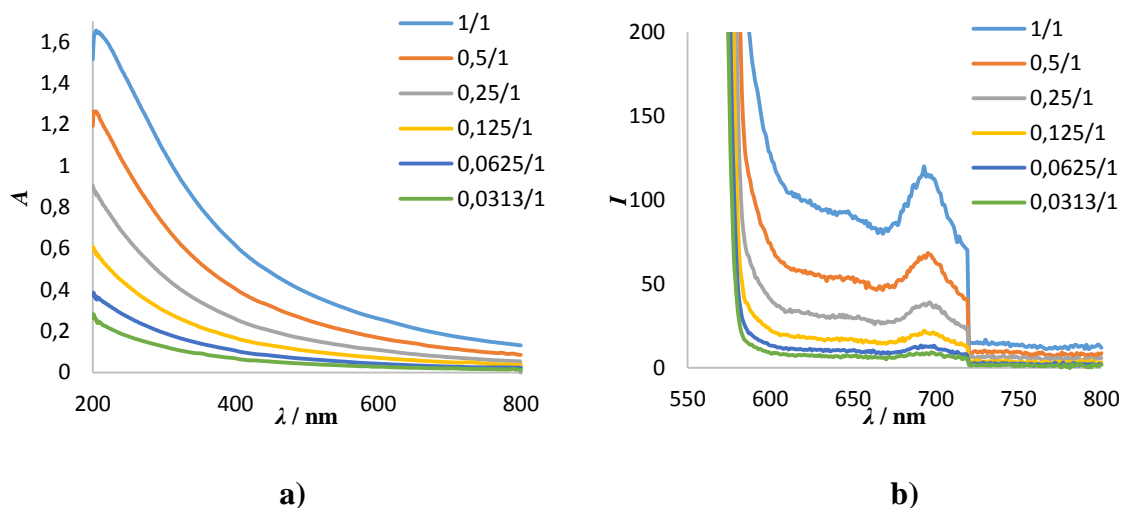
4.1.1. Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B

Prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.2., pripravljene su silika nanočestice dopirane Rhodaminom B, a nazvane su česticama **1**, **2** i **3**.

Čestice **1** pripravljene su modificiranom Stöberovom metodom uz jednostavno dodavanje bojila Rhodamina B u reakcijsku smjesu tijekom procesa pripreve. Na slici 19. prikazana je fotografija čestica **1** na danjem svjetlu i pod UV lampom. Na slici 20. prikazan je apsorpcijski i emisijski spektar silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B (čestica **1**) u etanolu kroz različita razrjeđenja. Valna duljina pobude je maksimum apsorpcije bojila u otopini, $\lambda_{exc} = 548 \text{ nm}$.

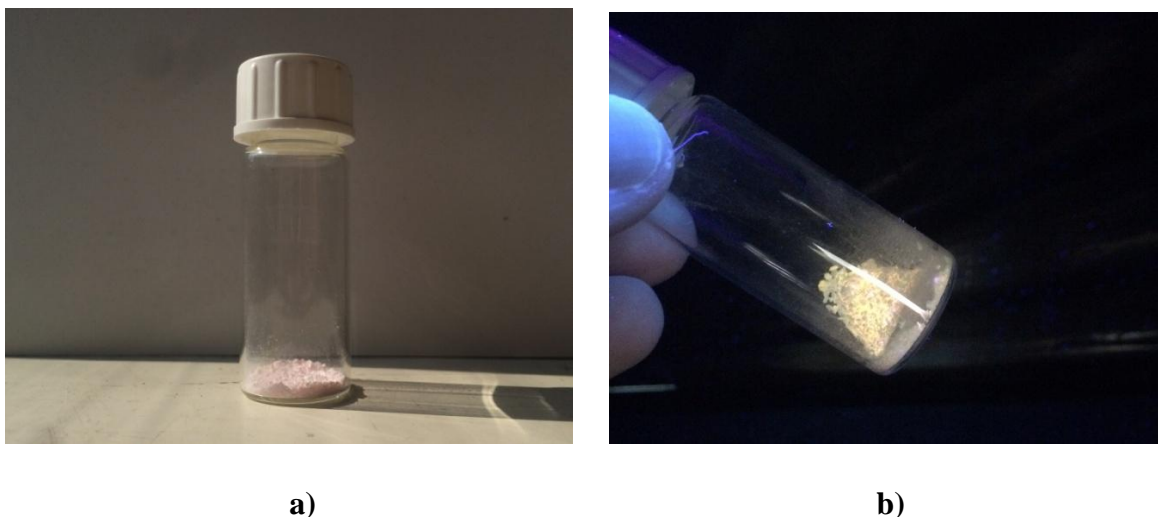


Slika 19. Silika čestice dopirane Rhodaminom B **1** na danjem svjetlu (a); Silika čestice dopirane Rhodaminom B **1** pod UV lampom (b)

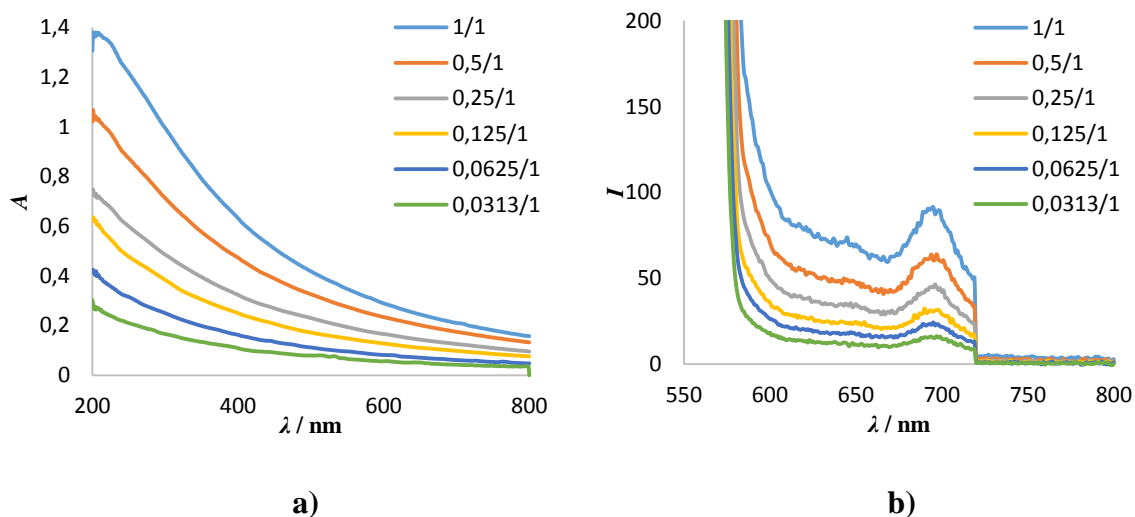


Slika 20. Apsorpcijski (a) i emisijski ($\lambda_{exc} = 548 \text{ nm}$) (b) spektar silika čestica **1** u različitim omjerima mase nanočestica i volumena etanola (mg / mL)

Čestice **2** pripravljene su korištenjem APTES-a kao prekursora kako bi se površina nanočestica funkcionalizirala molekulama alkoksilana. Na slici 21. prikazana je fotografija čestica **2** na danjem svjetlu i pod UV lampom. Na slici 22. prikazan je apsorpcijski i emisijski spektar čestica **2** u etanolu kroz različita razrjeđenja. Valna duljina pobude je maksimum apsorpcije bojila u otopini, $\lambda_{exc} = 548$ nm.

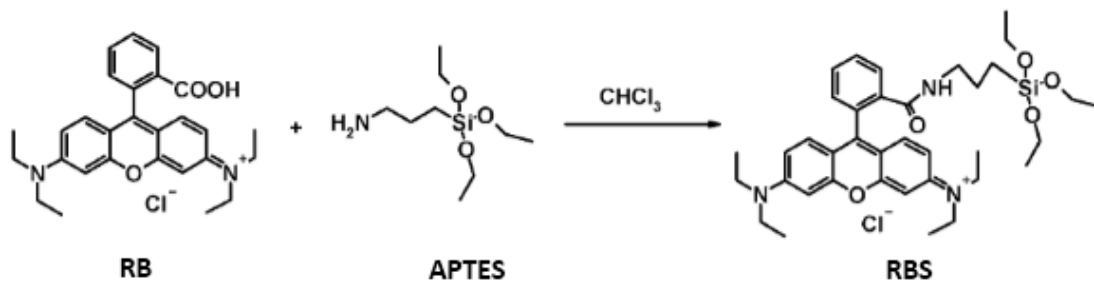


Slika 21. Silika čestice dopirane Rhodaminom B **2** na danjem svjetlu (a); Silika čestice dopirane Rhodaminom B **2** pod UV lampom (b)



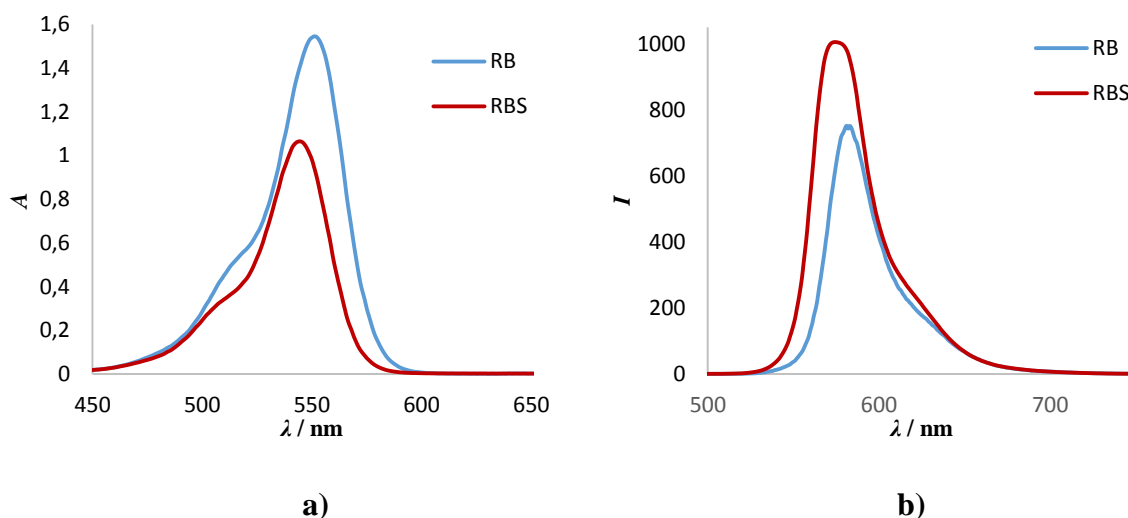
Slika 22. Apsorpcijski (a) i emisijski ($\lambda_{exc} = 548$ nm) (b) spektar silika čestica **2** u različitim omjerima mase nanočestica i volumena etanola (mg / mL)

Čestice **3** pripravljene su korištenjem modificiranog Rhodamina B (RBS) koji je dobiven prethodnom funkcionalizacijom Rhodamina B (RB) APTES-om klasičnom reakcijom organske sinteze, kako je prikazano na Slici 23.



Slika 23. Reakcija kondenzacije između APTES-a i Rhodamina B u kloroformu

Slika 24. Prikazuje apsorpcijski i emisijski spektar Rhodamina B (RB) i modificiranog Rhodamina B (RBS) u vodi, što odgovara literaturnim podacima [62]. Valna duljina pobude je maksimum apsorpcije, $\lambda_{\text{exc}} = 548 \text{ nm}$.



Slika 24. Apсорpcijski (a) i emisijski ($\lambda_{\text{exc}} = 548 \text{ nm}$) (b) spektar Rhodamina B (RB) i modificiranog Rhodamina B (RBS) u vodi

Na slici 25. prikazana je fotografija čestica **3** na danjem svjetlu i pod UV lampom. Na slici 26. prikazan je apсорpcijski i emisijski spektar čestica **3** u etanolu kroz različita razrjeđenja. Valna duljina pobude je maksimum apсорpcije bojila u otopini, $\lambda_{\text{exc}} = 548 \text{ nm}$.

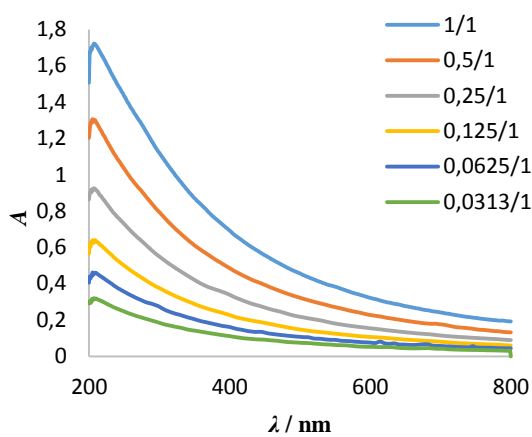


a)

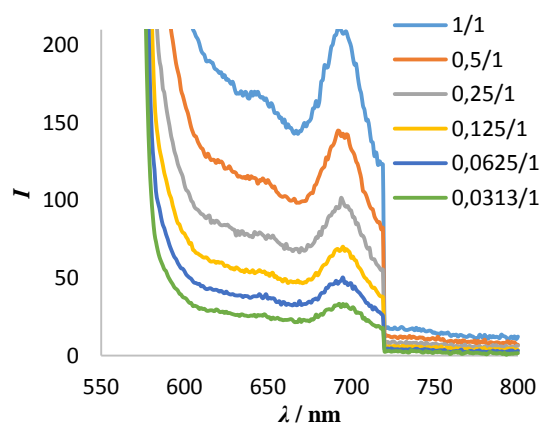


b)

Slika 25. Silika čestice dopirane RBS bojom **3** na danjem svjetlu (a); Silika čestice dopirane RBS bojom **3** pod UV lampom (b)



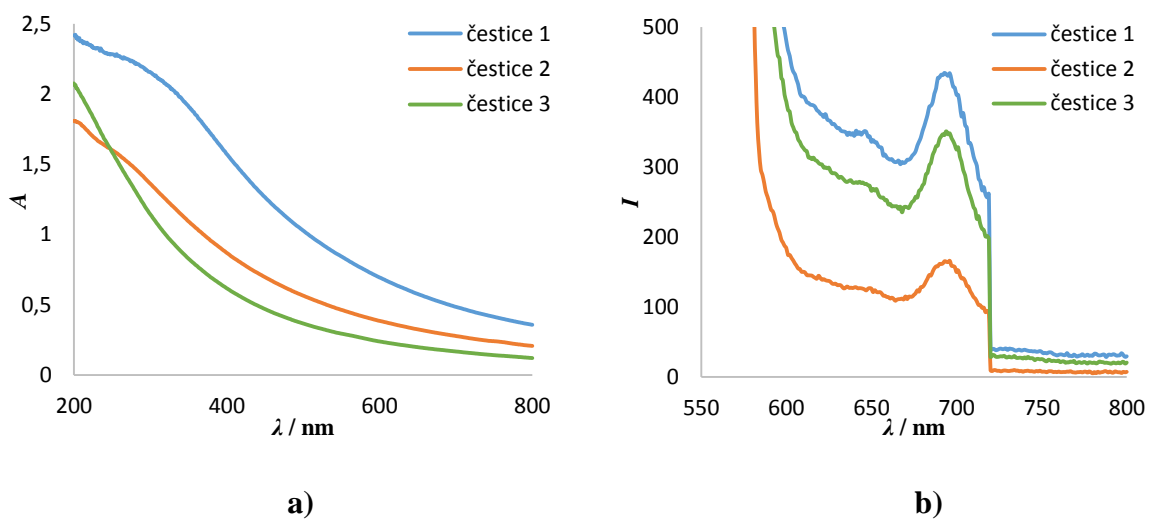
a)



b)

Slika 26. ApSORpcijski (a) i emisijski ($\lambda_{exc} = 548 \text{ nm}$) (b) spektar silika čestica **3** u različitim omjerima mase nanočestica i volumena etanola (mg / mL)

Sumarni prikaz apsorpcijskih i emisijskih spektara koncentriranih (*stock*) otopina silika čestica **1**, **2** i **3** u vodi prikazan je na slici 27. Masena koncentracija silika nanočestica 1, 2 i 3 je ista i iznosi $\gamma = 5 \text{ mg} / 5 \text{ mL}$. Valna duljina pobude je maksimum apsorpcije bojila u otopini, $\lambda_{\text{exc}} = 548 \text{ nm}$.



Slika 27. Usporedbeni apsorpcijski (a) i emisijski ($\lambda_{\text{exc}} = 548 \text{ nm}$) (b) spektar silika čestica dopiranih Rhodaminom B **1**, **2** i **3** ($\gamma = 5 \text{ mg} / 5 \text{ mL}$)

4.2. Sinteza polimernih nanočestica

4.2.1. Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojilom

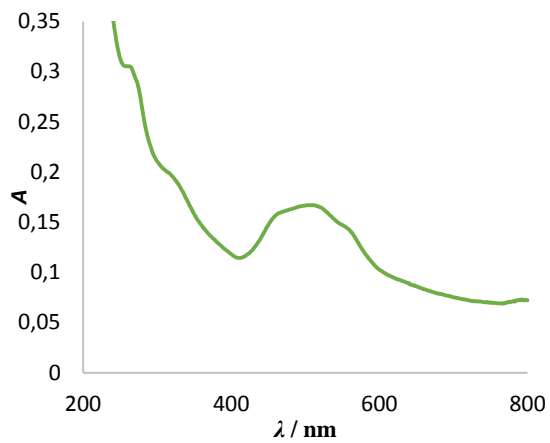
Polimerne nanočestice dopirane lipofiliziranim Nile Blue bojilom pripravljene su metodom precipitacije kako je opisano u poglavlju 3.2.1. te su okarakterizirane UV-Vis apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom.

Na slici 28. prikazana je fotografija *stock* otopine polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojilom na danjem svjetlu i pod UV lampom. Točna masena koncentracija prikazane *stock* otopine nije poznata zbog eksperimentalnih poteškoća.

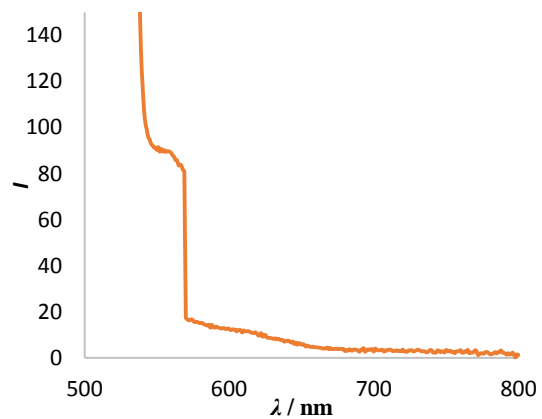
Na slici 29. prikazan je apsorpcijski i emisijski spektar polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojilom. Valna duljina pobude je maksimum apsorpcije bojila u otopini, $\lambda_{exc} = 527$ nm.



Slika 28. *Stock* otopina polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojilom na danjem svjetlu (a); *Stock* otopina polimernih nanočestica dopiranih Nile Blue bojilom pod UV lampom (b)



a)



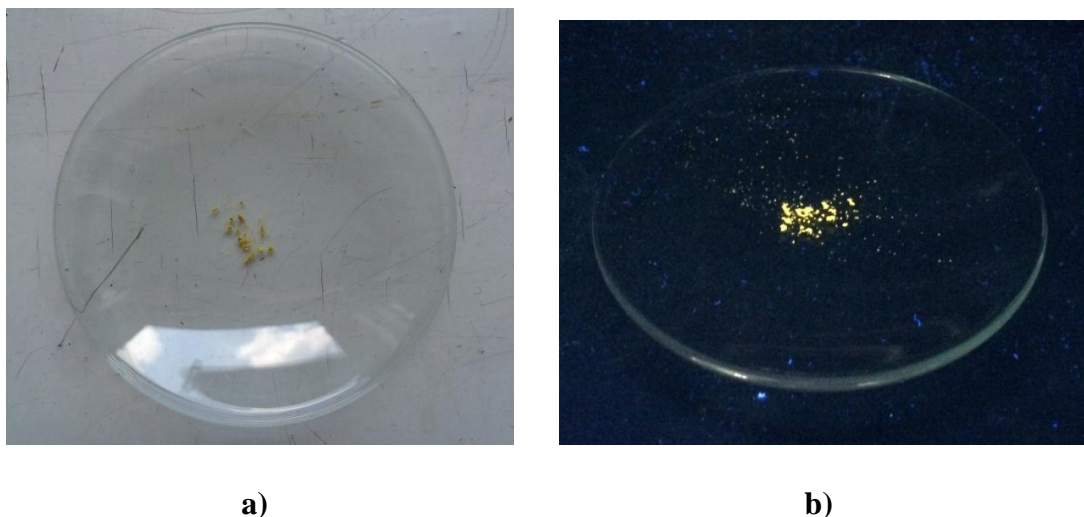
b)

Slika 29. Apsorpcijski (a) i emisijski ($\lambda_{exc} = 527$ nm) (b) spektar polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojiom

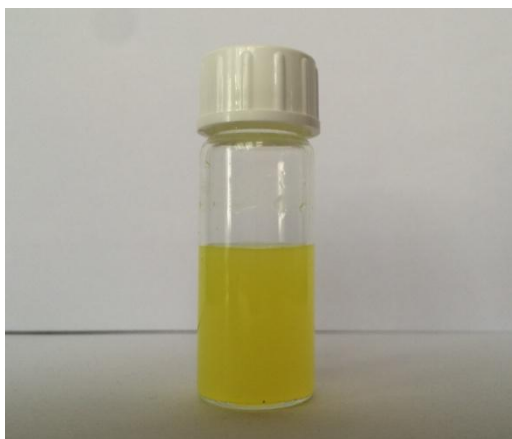
4.2.2. Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1

Polimerne nanočestice dopirane bojilom 1 pripravljene su metodom precipitacije kako je opisano u poglavlju 3.2.3. te su okarakterizirane UV-Vis apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom. Njihov oblik, veličina i raspodjela određeni su pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM).

Na slici 30. prikazana je fotografija polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1 na danjem svjetlu i pod UV lampom. Na slici 31. prikazana je fotografija *stock* otopine polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1 ($\gamma = 0,6 \text{ mg} / 5 \text{ mL}$) na danjem svjetlu i pod UV lampom.



Slika 30. Polimerne nanočestice dopirane bojilom 1 na danjem svjetlu (a); Polimerne nanočestice dopirane bojilom 1 pod UV lampom (b)



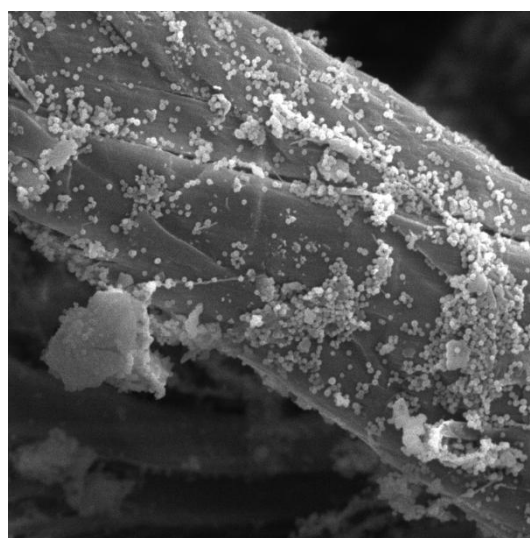
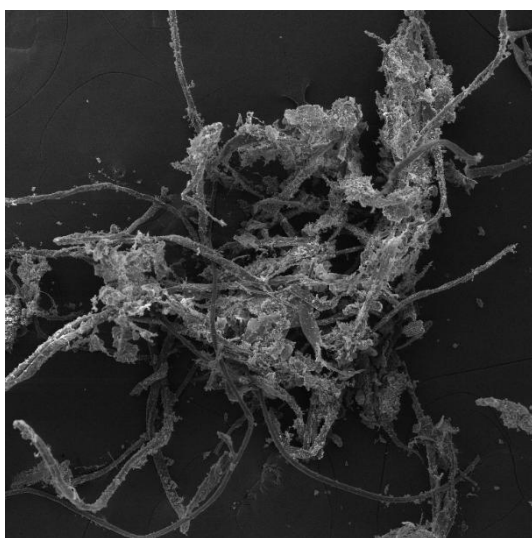
a)



b)

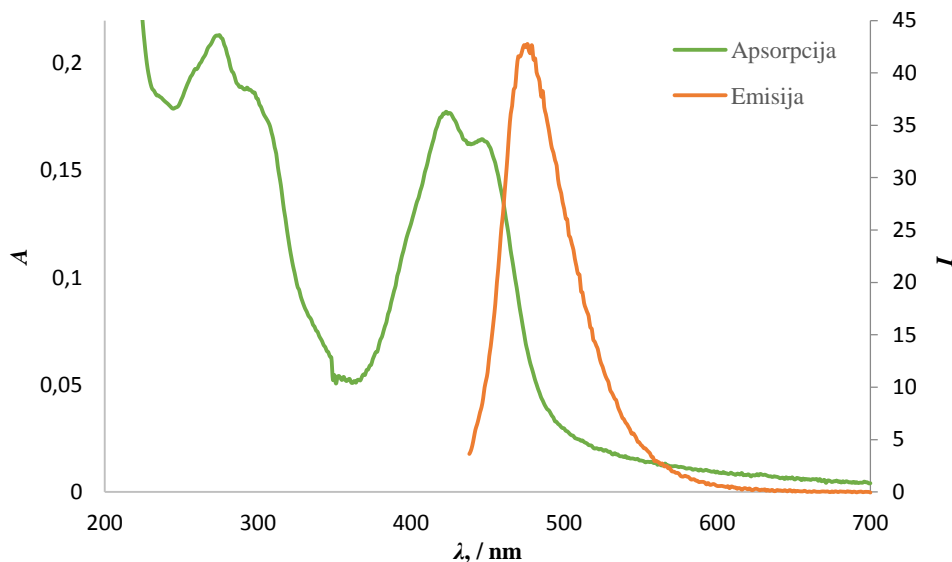
Slika 31. Stock otopina polimernih nanočestica dopiranih bojilom **1** na danjem svjetlu (a); Stock otopina polimernih nanočestica dopiranih bojilom **1** pod UV lampom (b) ($\gamma = 0,6 \text{ mg} / 5 \text{ mL}$)

Na slici 32. prikazana su SEM slike polimernih nanočestica dopiranih bojilom **1**



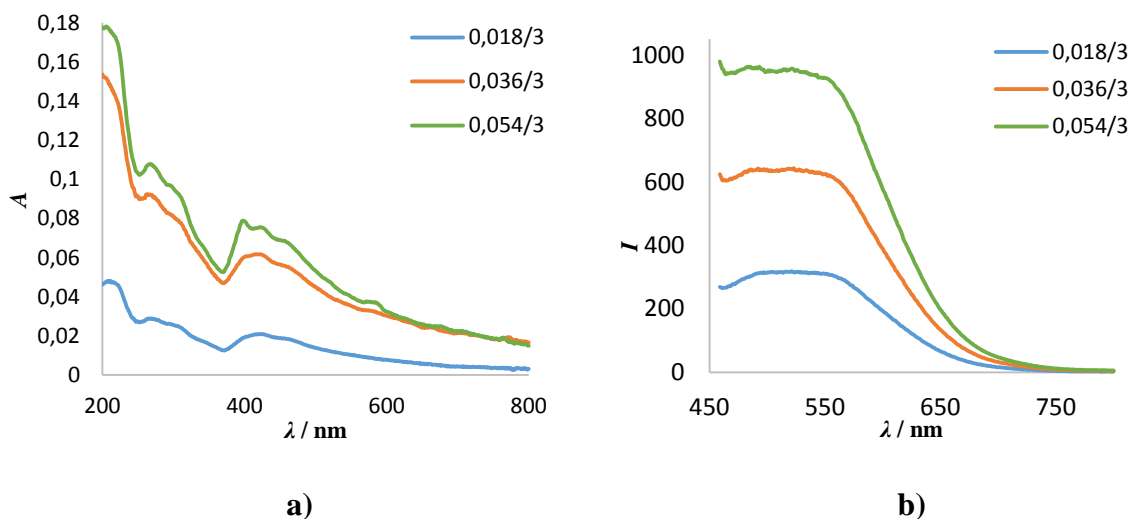
Slika 32. SEM slika polimernih nanočestica dopiranih bojilom **1**

Kako bi se protumačila svojstva spoja **1** zarobljenog u polimerne nanočestice, snimljeni su i usporedbeno prikazani apsorpcijski i emisijski spektra spoja **1** u vodi (Slika 33.). Valna duljina pobude je maksimum apsorpcije bojila u otopini, $\lambda_{exc} = 430$ nm.



Slika 33. Apсорpcijski i emisijski ($\lambda_{exc} = 430$ nm) spektar spoja **1** u vodi

Na slici 34. prikazan je apсорpcijski i emisijski spektar polimernih nanočestica dopiranih bojilom **1** u različitim omjerima mase nanočestica i volumena vode (mg / mL). Valna duljina pobude je maksimum apсорpcije bojila u otopini, $\lambda_{exc} = 416$ nm.



Slika 34. Apсорpcijski (a) i emisijski ($\lambda_{exc} = 416$ nm) (b) spektar polimernih nanočestica dopiranih bojilom **1** u različitim omjerima mase nanočestica i volumena vode (mg / mL)

Također, kako bismo potvrdili nastanak nanočestica, provedena je proba na Tyndallov efekt prethodno snimljenih otopina (Slika 35.).

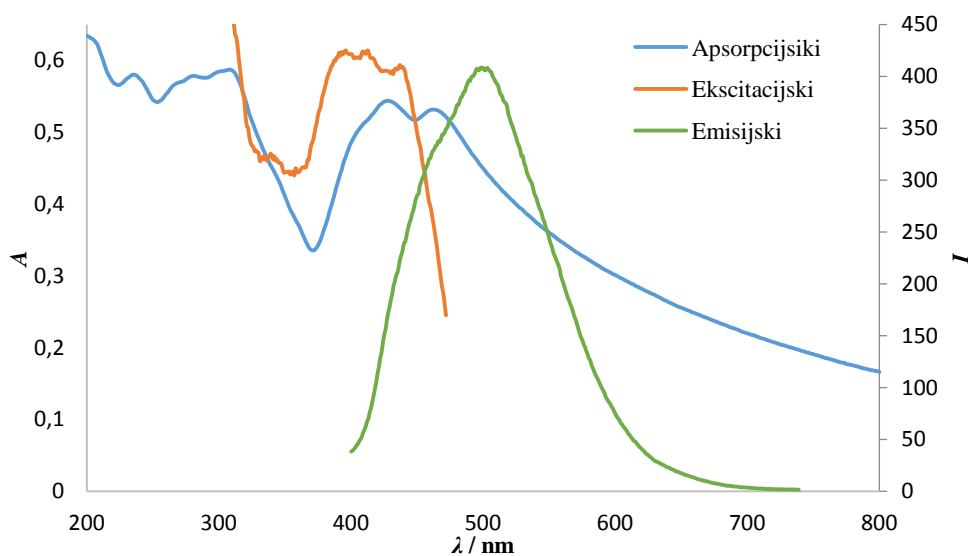


Slika 35. Proba na Tyndallov efekt polimernih nanočestica dopiranih bojilom **1**
(voda s nanočesticama – lijevo; čista voda – desno)

4.2.3. Spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih bojilom **1** u ovisnosti o pH

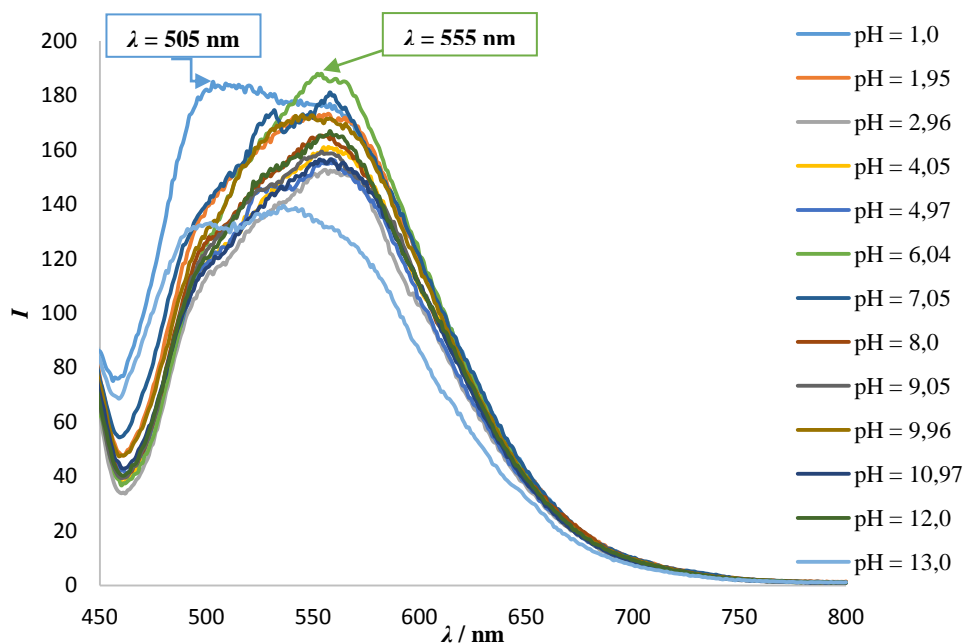
Zbog potrebe za pripravom optičkih nanosenzora dopiranih fluorescentnim pH osjetljivim bojilima te prethodnim rezultatima o pH osjetljivosti spoja **1**, polimerne nanočestice dopirane spojem **1** okarakterizirane su u univerzalnom puferu kroz različite vrijednosti pH (pH = 1,0 – 13,0).

Slika 36. prikazuje apsorpcijski, emisijski i ekscitacijski spektar polimernih nanočestica dopiranih spojem **1** raspršenih u vodi.

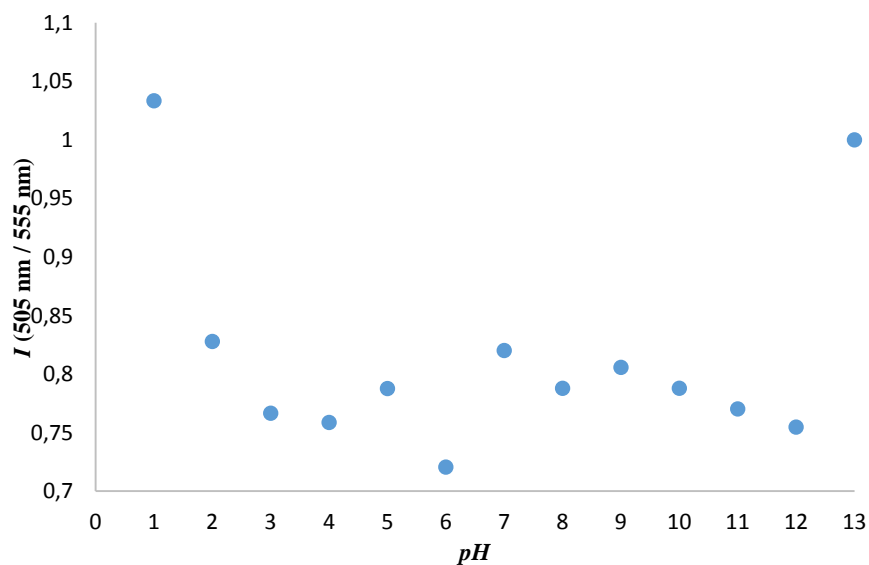


Slika 36. Apsorpcijski, emisijski ($\lambda_{\text{exc}} = 416 \text{ nm}$) i ekscitacijski ($\lambda_{\text{emiss}} = 498 \text{ nm}$) spektar polimernih nanočestica dopiranih spojem **1** otopljenih u vodi

Kako bi se ispitala mogućnost primjene ispitivanih nanočestica u pH osjetljivim optičkim senzorima,, snimljeni su spektri u univerzalnom puferu (pH = 1,0 – 13,0). Slika 37. Prikazuje emisijski spektar polimernih nanočestica dopiranih spojem **1** u ovisnosti o pH. Slika 38. prikazuje omjer emisijskih maksimuma ($\lambda = 505 \text{ nm} / \lambda = 555 \text{ nm}$) pri različitim vrijednostima pH u rasponu pH = 1,0 do pH = 13.



Slika 37. Emisijski spektar ($\lambda_{\text{exc}} = 416 \text{ nm}$) polimernih nanočestica dopiranih spojem **1** u ovisnosti o pH



Slika 38. Omjer emisijskih maksimuma ($\lambda = 505 \text{ nm} / \lambda = 555 \text{ nm}$) za različite pH u rasponu pH = 1,0 do pH = 13

5. Rasprava

U ovom diplomskom radu pripravljene su nanočestice dopirane fluorescentnim pH osjetljivim bojilima. Stöberovom metodom i metodom precipitacije pripravljene su silika i polimerne nanočestice koje su okarakterizirani metodama UV/VIS apsorpcijske i fluorescencijske spektrofotometrije u vodi, etanolu te univerzalnom puferu u rasponu pH od 1,0 do 13,0.

5.1. Sinteza silika nanočestica

Uspješno su pripravljene silika nanočestice Stöberovom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.1. Dobivene čestice su u obliku bijelog praha (Slika 18a), a pretražnom elektronskom mikroskopijom utvrđena je raspodjela i veličina čestica. Dobivena je homogena raspodjela veličina čestica s česticama dimenzija oko 200 nm (Slika 18b).

5.1.1. Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B

Prva vrsta pripremljenih nanočestica s ciljem razvoja novih optičkih nanosenzora su silika nanočestice dopirane fluorescentnim organskim bojilom Rhodaminom B. U svrhu efikasnije integracije bojila unutar silika nanočestice korištene su 3 metode pripreve. Uspješno su pripravljena sva 3 tipa silika nanočestica dopiranih Rhodaminom B, nazvanih česticama **1**, **2** i **3**, modificiranim Stöberovim metodama kao što je opisano u poglavlju 3.4.2.

Dobivene čestice **1** dopirane Rhodaminom B bile su roza boje na danjem svjetlu dok su pod UV lampom pokazivale žuto-rozu fluorescenciju kao što je vidljivo na Slici 19. Kako bi se utvrdio utjecaj količine nanočestica u uzorcima ispitivanim na spektrofotometru, snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri u ovisnosti o masi nanočestica u vodi i/ili etanolu (od 1 mg/1 mL do 0,313 mg/1 mL) kao što je opisano u poglavlju 3.4.3. Prvotno je snimljen spektar *stock* otopina (5 mg/5 mL = 1 mg/1 mL) te je za svako sljedeće mjerenje korištena upola razrijeđena otopina. Na apsorpcijskom spektru (Slika 20.a) vidljivo je da s porastom razrijeđenja pravilno opadaju vrijednosti apsorbancije prema Beer-Lambertovom

zakonu. Očekivani maksimum apsorpcije na $\lambda = 555$ nm, koji odgovara maksimumu apsorpcije čistog Rhodamina (RB) u vodi (Slika 24.a), nije vidljiv, već je vidljivo široko područje valnih duljina u kojem nanočestice apsorbiraju. Na emisijskom spektru (Slika 20.b) uočen je porast fluorescencije s porastom koncentracije. Očekivani maksimum emisije na $\lambda = 590$ nm koji odgovara čistom Rhodaminu (RB) (Slika 24.b) nije vidljiv, već je vidljivo široko područje fluorescencije nakon pobude (pobuda na $\lambda_{exc} = 548$ nm) te blagi maksimum emisije na $\lambda = 700$ nm.

Također su uspješno pripravljene čestice **2** dopirane Rhodaminom B modificiranom Stöberovom metodom uz korištenje APTES-a kao što je opisano u poglavlju 3.4.2. APTES je korišten kao prekursor kako bi se površina nanočestica funkcionalizirala molekulama alkoksilana. Pripravljene čestice su bile roza boje (Slika 21.a), a pod UV lampom su fluorescirale rozo-žuto (Slika 21.b). Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri kroz različite količine nanočestica u otopinama (od 1 mg/1 mL do 0,313 mg/1 mL). Na apsorpcijskom spektru vidljiv je pravilan pad apsorpcije prema Beer-Lambertovom zakonu (Slika 22.a), dok je na emisijskom vidljiv porast intenziteta fluorescencije s koncentracijom nanočestica (Slika 22.b). Maksimumi apsorpcije i emisije također se ne poklapaju s maksimumom od $\lambda = 550$ nm i $\lambda = 590$ nm čistog Rhodamina B (RB) (Slika 24) već poprimaju iste vrijednosti kao čestice **1**.

Uz gore navedene čestice, pripravljene su i čestice **3** dopirane Rhodaminom B prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.2. Pri pripravi je prethodno Rhodamin B funkcionaliziran silanolnim grupama reakcijama klasične organske sinteze te je pripremljen modificirani Rhodamin (RBS), kao što je prikazano na Slici 23. Novi derivat Rhodamina (RBS) pokazuje maksimum apsorpcije i emisije nekoliko nanometara manje od Rhodamina B (RB), no intenzivniju fluorescenciju (Slika 24.) Modificirani Rhodamin B (RBS) sadrži slobodne silanolne grupe koje lako mogu sudjelovati u sol – gel procesu stvaranja nanočestica te je stoga korišten kako bi se boja bolje uklopila u česticu. Dobivene su čestice koje su bile intenzivnije roze boje (Slika 25.a) i koje su pokazivale intenzivniju rozo-žutu fluorescenciju prilikom izlaganja UV svjetlu (Slika 25.b), što ukazuje na veći broj molekula Rhodamina zarobljenih u nanočesticama. Snimljeni su apsorpcijski (Slika 26.a) i emisijski (Slika 26.b) spektri čestica **3** gdje se može uočiti isto ponašanje s promjenom koncentracije (od 1 mg/1 mL do 0,313 mg/1 mL) kao i kod čestica **1** i **2**.

Također su prikazani sumarni apsorpcijski i emisijski spektar čestica **1**, **2** i **3** pri istoj koncentraciji u vodi (Slika 27.) prema kojima potvrđujemo vizualno zapažanje o intenzivnijoj boji i fluorescenciji čestica **3** naspram **1** i **2**.

5.2. Sinteza polimernih nanočestica

Osim silika nanočestica, uspješno su pripravljene i polimerne nanočestice u svrhu razvoja novog optičkog nanosenzora. Polimerna matrica je na posljetku odabrana kao nositelj novosintetiziranog bojila **1** za pripravu potencijalnog optičkog nanosenzora zbog jednostavnosti pripreme i ispitivanja spektralnih svojstava.

5.2.1. Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojilom

Polimerne nanočestice dopirane lipofiliziranim Nile Blue bojilom pripravljene su korištenjem polimera Eudragita® metodom precipitacije kako je opisano u poglavlju 3.5.1. Eudragit® je amonijev metakrilat kopolimer tip A, koji je korišten kao polimerni nosač u ovom radu i mnogim sličnim znanstvenim istraživanjima.

Lipofilizirani Nile Blue je fluorescentno bojilo koje svoju fluorescenciju naročito pokazuje u nepolarnim otapalima, selektivno je za H⁺ ione te se rabi u optičkim i potenciometrijskim sensorima kao pH indikator. Lipofilizirani Nile Blue je zbog dugog ugljikovodičnog lanca idealan za senzorsku primjenu zbog smanjene topljivosti u vodi.

Zbog eksperimentalnih poteškoća, nije bilo moguće izvesti kvantitativna mjerenja. Pripravljene polimerne nanočestice su okarakterizirane kvalitativno. Nanočestice su roza boje (Slika 28.a) koje prilikom stavljanja pod UV lampu fluoresciraju ljubičasto (Slika 28.b). Također su provedena i spektrofotometrijska ispitivanja kako je opisano u poglavlju 3.5.2. Snimljeni su apsorpcijski (Slika 29.a) i emisijski (Slika 29.b) spektri polimernih nanočestica u vodi. Očekivani maksimum emisije lipofiliziranog Nile Blue bojila je $\lambda = 663$ nm, no kod bojila zarobljenog u polimerne nanočestice uočen je maksimum emisije pri $\lambda = 563$ nm s repom koji nastavlja na više valne duljine (Slika 29.b). Maksimum apsorpcije lipofiliziranog Nile Blue bojila je oko $\lambda = 540$ nm, no uočeni je maksimum apsorpcije bojila u polimernim nanočesticama $\lambda = 512$ nm.

5.2.2. Sinteza i spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih bojilom 1

Uspješno su pripravljene polimerne nanočestice dopirane spojem 1/bojilom 1 metodom precipitacije kako je opisano u poglavlju 3.5.1. Kao polimerni nosač korišten je polimer Eudragit®. Spoj 1 (2-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril) pripremljen je pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Hranjec na Zavodu za organsku kemiju, a prethodno izvedenim eksperimentima u laboratoriju Zavoda za opću i anorgansku kemiju, spoj 1 je spektrofotometrijski okarakteriziran te su utvrđeni apsorpcijski maksimumi spoja u vodi (Slika 30). Spoj 1 je osjetljiv na promjenu vrijednosti pH te potencijalno može biti senzor za pH.

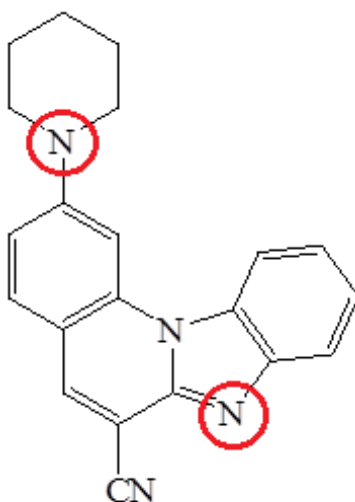
Pripravljene su polimerne nanočestice (Slika 30.) žute boje koje pod UV svjetlom fluoresciraju žuto. Pripravljene *stock* otopine (Slika 31.) su također žute boje, koje prilikom stavljanja pod UV lampu fluoresciraju intenzivno žuto (Slika 30.b i 31.b). Također, pretražnom elektronskom mikroskopijom utvrđena je raspodjela i veličina čestica te je uočeno sa je dobivena smjesa polimernih vlakana i nakupina nanočestica veličine oko 500 nm (Slika 32.). Isto tako, polimerne nanočestice dopirane bojilom 1 spektrofotometrijski su okarakterizirane u vodi kako je opisano u poglavlju 3.5.2. pri različitim omjerima mase nanočestica i volumena vode od 0,018 mg / 3 mL do 0,054 mg / 3 mL tako da je pri svakom sljedećem mjerenju dodavano po 0,018 mg nanočestica. Iz apsorpcijskog spektra (Slika 34.a) vidljivo je da s porastom koncentracije pravilno rastu vrijednosti apsorbancije prema Beer-Lambertovom zakonu, dok očekivani maksimum apsorpcije na $\lambda = 430$ nm, koji odgovara maksimumu apsorpcije čistog spoja 1 u vodi (Slika 33.), nije vidljiv, već je vidljivo široko područje apsorpcije te maksimum na $\lambda = 412$ nm. Isto tako, na emisijskom spektru (Slika 34.b) uočen je porast fluorescencije s porastom koncentracije, dok očekivani maksimum emisije na $\lambda = 480$ nm koji odgovara čistom spoju 1 (Slika 33.) također nije vidljiv već je vidljivo široko područje u kojem nanočestice fluoresciraju ($\lambda = 460$ nm – 550 nm).

Uz sve to, postojanje polimernih nanočestica ispitano je probom na Tyndallov efekt. Tyndallov efekt je raspršenje svjetlosti na vrlo sitnim česticama disperznih sustava, najčešće koloidnih sustava, a koristi se kako bi se utvrdilo je li smjesa prava ili koloidna otopina [64]. Prilikom puštanja laserske zrake kroz čistu vodu i vodu s polimernim nanočesticama uočeno je da zraka kroz vodu slobodno prolazi, dok kroz vodu s

nanočesticama dolazi do raspršenja snopa svjetlosti što je ujedno i dokaz postojanja nanočestica (Slika 35.).

5.2.3. Spektrofotometrijska karakterizacija polimernih nanočestica dopiranih bojilom **1** u ovisnosti o pH

U svrhu razvoja novog optičkog pH nanosenzora, ispitan je utjecaj pH na apsorpciju i emisiju dobivenih polimernih nanočestica dopiranih spojem **1**. Spektralna svojstva spoja **1** mijenjaju se s promjenom vrijednosti pH jer spoj ima nekoliko protonabilnih mjesta (Slika 39.). Vrijednost pK_a ispitivanog spoja iznosi 1,75.



Slika 39. Protonabilna mjesta spoja **1**

Na slici 36. prikazan je apsorpcijski, emisijski i ekscitacijski spektar polimernih nanočestica dopiranih spojem **1** raspršenih u vodi iz kojeg sumarno možemo usporediti maksimume apsorpcije ($\lambda = 435$ nm), emisije ($\lambda = 500$ nm), te ekscitacijski maksimum ($\lambda = 400$ nm). Spektrofotometrijskom karakterizacijom spoja **1** zarobljenog u polimerne nanočestice kroz različite vrijednosti pH (od pH = 1,0 do pH = 13,0) (Slika 37.) uočena je blaga promjena maksimuma emisije pri određenim vrijednostima pH. To se naročito primijeti kod pH = 1, 0 gdje maksimum emisije iznosi $\lambda = 505$ nm te kod pH = 13,0 gdje maksimum emisije iznosi $\lambda = 540$ nm, što je vjerojatno posljedica jakih kiselih / lužnatih uvjeta gdje se boja počinje ispirati iz polimera te se pojavljuje maksimum bojila u vodi. Kod ostalih vrijednosti pH (od pH = 1,95 do pH = 12,0) emisijski su maksimumi približno

isti i iznose $\lambda = 550$ nm. Međutim, možemo pretpostaviti da u jako kiselim i jako lužnatim otopinama dolazi do ispiranja bojila iz polimernog nosača, stoga nema velikih spektralnih promjena, već su potrebni daljnji eksperimenti kako bi se razvio optički nanosenzor.

Također je prikazan i omjer intenziteta na dva maksimuma emisije ($\lambda = 505$ nm / $\lambda = 555$ nm) za različite pH u rasponu pH = 1,0 do pH = 13 (Slika 38.).

6. Zaključak

Postignut je temeljni cilj ovog rada, odnosno uspješno su pripravljene nanočestice dopirane fluorescentnim pH osjetljivim bojilima u svrhu razvoja novih optičkih nanosenzorskih sustava.

Pripravljene su silika nanočestice dopirane Rhodaminom B te polimerne nanočestice dopirane lipofiliziranim Nile Blue bojilom i 2-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrilom (bojilo **1**) Stöberovom i modificiranim metodama.

Silika nanočestice su roze boje te pod UV lampom fluoresciraju. Očekivani maksimum apsorpcije ($\lambda_{max} = 555$ nm u vodi) nije vidljiv, već je vidljivo široko područje valnih duljina u kojem nanočestice apsorbiraju. Očekivani maksimum emisije ($\lambda_{max} = 590$ nm u vodi) nije vidljiv, već je vidljivo široko područje fluorescencije nakon pobude (na $\lambda = 548$ nm) te blagi maksimum emisije na $\lambda = 700$ nm. Pretražnom elektronskom mikroskopijom utvrđena je raspodjela i veličina čistih silika nanočestica. Dobivena je homogena raspodjela veličina čestica s česticama dimenzija oko 200 nm.

Metodom precipitacije dobivene su polimerne nanočestice dopirane lipofiliziranim Nile Blue bojilom te bojilom **1** (2-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril) korištenjem polimera Eudragita® u svrhu polimernog nosača. Zbog eksperimentalnih poteškoća, nije bilo moguće izvesti kvantitativna mjerenja polimernih nanočestica dopiranih Nile Blue bojilom, već su iste okarakterizirane kvalitativno. Polimerne nanočestice dopirane lipofiliziranim Nile Blue bojilom bile su roza boje te su fluorescirale ljubičasto prilikom stavljanja pod UV lampu. Provedena su spektrofotometrijska ispitivanja u vodi polimernih nanočestica dopiranih lipofiliziranim Nile Blue bojilom. Uočeni su različiti maksimumi apsorpcije i emisije od očekivanih maksimuma koji su odgovarali čistom Nile Blue bojilu.

Dobivene polimerne nanočestice dopirane bojilom **1** su žute boje. Pretražnom elektronskom mikroskopijom utvrđena je raspodjela i veličina čestica. Pripravljena je smjesa polimernih vlakana i nanočestica veličine oko 500 nm. Spektrofotometrijskom karakterizacijom polimernih nanočestica dopiranih bojilom **1** u vodi uočeno je da s porastom koncentracije pravilno rastu vrijednosti apsorpcije prema Beer-Lambertovom zakonu, a očekivani maksimum apsorpcije nije vidljiv ($\lambda_{max} = 430$ nm) već je vidljivo široko područje apsorpcije te maksimum na $\lambda = 412$ nm. Očekivani maksimum emisije ($\lambda_{max} = 480$ nm) nije vidljiv već je vidljivo široko područje u kojem nanočestice fluoresciraju ($\lambda = 460$ nm – 550 nm).

Probom na Tyndallov efekt ispitano je postojanje polimernih nanočestica. Prilikom puštanja laserske zrake kroz čistu vodu i vodu s polimernim nanočesticama uočeno je da zraka kroz vodu slobodno prolazi, dok kroz vodu s nanočesticama dolazi do raspršenja snopa svjetlosti što je ujedno i dokaz postojanja nanočestica.

U svrhu razvoja novog optičkog pH nanosenzora, ispitan je utjecaj pH na apsorpciju i emisiju dobivenih polimernih nanočestica dopiranih spojem **1**. Iz dobivenih spektara možemo pretpostaviti da u jako kiselim i jako lužnatim otopinama dolazi do ispiranja bojila iz polimernog nosača.

7. Literatura

1. Bonacchi, S., et al., *Luminescent Chemosensors Based on Silica Nanoparticles*, in *Luminescence Applied in Sensor Science*, L. Prodi, M. Montalti, and N. Zaccheroni, Editors. 2011, Springer Berlin Heidelberg. p. 93-138.
2. Borisov, S.M. and I. Klimant, *Optical nanosensors-smart tools in bioanalytics*. *Analyst*, 2008. **133**(10): p. 1302-1307.
3. Taylor, R., et al., *Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids*. *Journal of Applied Physics*, 2013. **113**(1): p. 011301.
4. Jain, K.K., *Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics*. *Clinica Chimica Acta*, 2005. **358**(1-2): p. 37-54.
5. Hewakuruppu, Y.L., et al., *Plasmonic "pump probe" method to study semi-transparent nanofluids*. *Applied Optics*, 2013. **52**(24): p. 6041-6050.
6. Mohanraj, V. and Y. Chen, *Nanoparticles-a review*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2007. **5**(1): p. 561-573.
7. Bau, L., P. Tecilla, and F. Mancin, *Sensing with fluorescent nanoparticles*. *Nanoscale*, 2011. **3**(1): p. 121-133.
8. Aylott, J.W., *Optical nanosensors - an enabling technology for intracellular measurements*. *Analyst*, 2003. **128**(4): p. 309-312.
9. Borisov, S.M. and I. Klimant, *Optical nanosensors - smart tools in bioanalytics*. *Analyst*, 2008. **133**(10): p. 1302-1307.
10. Rozhkov, V., D. Wilson, and S. Vinogradov, *Phosphorescent Pd porphyrin-dendrimers: Tuning core accessibility by varying the hydrophobicity of the dendritic matrix*. *Macromolecules*, 2002. **35**(6): p. 1991-1993.
11. Schmid, G., *Nanoparticles: from theory to applications*, in *Nanoparticles*. 2005, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-3.
12. Rao, J.P. and K.E. Geckeler, *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters*. *Progress in Polymer Science*, 2011. **36**(7): p. 887-913.
13. Canfarotta, F., M.J. Whitcombe, and S.A. Piletsky, *Polymeric nanoparticles for optical sensing*. *Biotechnology Advances*, 2013. **31**(8): p. 1585-1599.
14. Ab Rahman, I. and V. Padavettan, *Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites-A Review*. *Journal of Nanomaterials*, 2012: p. 15.
15. Yan, J., et al., *Dye-doped nanoparticles for bioanalysis*. *Nano Today*, 2007. **2**(3): p. 44-50.

16. Bae, S.W., W.H. Tan, and J.I. Hong, *Fluorescent dye-doped silica nanoparticles: new tools for bioapplications*. Chemical Communications, 2012. **48**(17): p. 2270-2282.
17. Montalti, M., et al., *Dye-doped silica nanoparticles as luminescent organized systems for nanomedicine*. Chemical Society Reviews, 2014. **43**(12): p. 4243-4268.
18. Schulz, A. and C. McDonagh, *Intracellular sensing and cell diagnostics using fluorescent silica nanoparticles*. Soft Matter, 2012. **8**(9): p. 2579-2585.
19. Wang, L. and W. Tan, *Multicolor FRET silica nanoparticles by single wavelength excitation*. Nano letters, 2006. **6**(1): p. 84-88.
20. Leutwyler, W.K., S.L. Bürgi, and H. Burgl, *Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots*. Science, 1996. **271**(5251): p. 933-937.
21. Maurel, V., et al., *Free radical sensor based on CdSe quantum dots with added 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine oxide functionality*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(33): p. 16353-16358.
22. Nirmal, M. and L. Brus, *Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystals*. Accounts of Chemical Research, 1999. **32**(5): p. 407-414.
23. Jain, K.K., *Nanodiagnostics: application of nanotechnology in molecular diagnostics*. 2003.
24. Medintz, I.L., et al., *Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing*. Nature materials, 2005. **4**(6): p. 435-446.
25. Barone, P.W. and M.S. Strano, *Reversible Control of Carbon Nanotube Aggregation for a Glucose Affinity Sensor*. Angewandte Chemie International Edition, 2006. **45**(48): p. 8138-8141.
26. Korzeniowska, B., et al., *Silica nanoparticles for cell imaging and intracellular sensing*. Nanotechnology, 2013. **24**(44): p. 20.
27. Natte, K., et al., *Synthesis and characterisation of highly fluorescent core-shell nanoparticles based on Alexa dyes*. Journal of Nanoparticle Research, 2012. **14**(2): p. 10.
28. Rampazzo, E., et al., *Surface modification of silica nanoparticles: a new strategy for the realization of self-organized fluorescence chemosensors*. Journal of Materials Chemistry, 2005. **15**(27-28): p. 2687-2696.
29. Rossi, L.M., et al., *Stober synthesis of monodispersed luminescent silica nanoparticles for bioanalytical assays*. Langmuir, 2005. **21**(10): p. 4277-4280.

30. Borisov, S.M., et al., *Precipitation as a simple and versatile method for preparation of optical nanochemosensors*. *Talanta*, 2009. **79**(5): p. 1322-1330.
31. Noguera, C., B. Fritz, and A. Clément, *Precipitation mechanism of amorphous silica nanoparticles: A simulation approach*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015. **448**(0): p. 553-563.
32. Kahouli, M., et al., *Structural and optical properties of ZnO nanoparticles prepared by direct precipitation method*. *Superlattices and Microstructures*, 2015. **85**(0): p. 7-23.
33. Demchenko, A.P., *Introduction to fluorescence sensing*. 2008: Springer Science & Business Media.
34. Wetzl, B., et al., *Set of fluorochromophores in the wavelength range from 450 to 700 nm and suitable for labeling proteins and amino-modified DNA*. *Journal of Chromatography B*, 2003. **793**(1): p. 83-92.
35. Valeur, B. and M.N. Berberan-Santos, *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2012: John Wiley & Sons.
36. Eggeling, C., et al., *Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(13): p. 2651-2659.
37. Wolfbeis, O.S., et al., *Fluorimetric analysis*. *Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, 1983. **314**(2): p. 119-124.
38. Laws, W.R. and L. Brand, *Analysis of two-state excited-state reactions. The fluorescence decay of 2-naphthol*. *Journal of Physical Chemistry*, 1979. **83**(7): p. 795-802.
39. Davenport, L., J.R. Knutson, and L. Brand, *Excited-state proton transfer of equilenin and dihydroequilenin: interaction with bilayer vesicles*. *Biochemistry*, 1986. **25**(5): p. 1186-1195.
40. Skoog, D.A. and D.M. West, *Principles of instrumental analysis*. Vol. 158. 1980: Saunders College Philadelphia.
41. Ingle Jr, J.D. and S.R. Crouch, *Spectrochemical analysis*. 1988.
42. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2007: Springer Science & Business Media.
43. Albani, J.R., *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. 2008: John Wiley & Sons.

44. Weiss, S., *Fluorescence spectroscopy of single biomolecules*. Science, 1999. **283**(5408): p. 1676-1683.
45. Lakowicz, J.R., *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 1: Techniques*. Vol. 1. 1991: Springer Science & Business Media.
46. Goodhew, P.J., J. Humphreys, and R. Beanland, *Electron microscopy and analysis*. 2000: CRC Press.
47. Joy, D.C., *Scanning electron microscopy*. Materials Science and Technology, 1971.
48. Goldstein, J.I., et al., *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. A text for biologists, materials scientists, and geologists*. 1981: Plenum Publishing Corporation.
49. Kim, S., H.E. Pudavar, and P.N. Prasad, *Dye-concentrated organically modified silica nanoparticles as a ratiometric fluorescent pH probe by one- and two-photon excitation*. Chemical Communications, 2006(19): p. 2071-2073.
50. Yao, G., et al., *FloDots: luminescent nanoparticles*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **385**(3): p. 518-524.
51. Gao, F., et al., *A fluorescence ratiometric nano-pH sensor based on dual-fluorophore-doped silica nanoparticles*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2007. **67**(2): p. 517-521.
52. Gao, F., et al., *A novel nano-sensor based on rhodamine-beta-isothiocyanate - Doped silica nanoparticle for pH measurement*. Microchimica Acta, 2005. **152**(1-2): p. 131-135.
53. Schulz, A., et al., *Fluorescent nanoparticles for ratiometric pH-monitoring in the neutral range*. Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(8): p. 1475-1482.
54. Albertazzi, L., et al., *Delivery and subcellular targeting of dendrimer-based fluorescent pH sensors in living cells*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(51): p. 18158-18167.
55. Peng, H.-s., et al., *A Nanogel for Ratiometric Fluorescent Sensing of Intracellular pH Values*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(25): p. 4246-4249.
56. Chan, Y.-H., et al., *Development of ultrabright semiconducting polymer dots for ratiometric pH sensing*. Analytical chemistry, 2011. **83**(4): p. 1448-1455.
57. Marín, M.J., et al., *Localized Intracellular pH Measurement Using a Ratiometric Photoinduced Electron-Transfer-Based Nanosensor*. Angewandte Chemie, 2012. **124**(38): p. 9795-9799.

58. Schreml, S., et al., *2D luminescence imaging of pH in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(6): p. 2432-2437.
59. Zhou, K., et al., *Multicolored pH-tunable and activatable fluorescence nanoplatfom responsive to physiologic pH stimuli*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(18): p. 7803-7811.
60. Hranjec, M., et al., *Synthesis, crystal structure and spectroscopic study of novel benzimidazoles and benzimidazo [1, 2-a] quinolines as potential chemosensors for different cations*. Dyes and Pigments, 2012. **95**(3): p. 644-656.
61. Enrichi, F., et al. *Luminescent dye-doped or rare-earth-doped monodisperse silica nanospheres as efficient labels in DNA microarrays*. in *SPIE NanoScience+ Engineering*. 2009. International Society for Optics and Photonics.
62. Nedelčev, T., D. Račko, and I. Krupa, *Preparation and characterization of a new derivative of rhodamine B with an alkoxy silane moiety*. Dyes and Pigments, 2008. **76**(2): p. 550-556.
63. Gao, X., et al., *Synthesis and characterization of functionalized rhodamine B-doped silica nanoparticles*. Optical Materials, 2009. **31**(11): p. 1715-1719.
64. Eidenschink, H.H. and M. Eidenschink, *Scattering of light beam by tyndall effect*. 1981, Google Patents.

ŽIVOTOPIS

Rođen sam 11. veljače 1991. godine u Koprivnici. Pohađao sam osnovnu školu „Đuro Ester“ u Koprivnici, a zatim maturirao s vrlo dobrim uspjehom u gimnaziji „Fran Galović“ u Koprivnici. Godine 2010. upisao sam preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Završni rad na temu „Imobilizacija novih fluorescentnih derivata benzimidazola u tanke polimerne filmove“ obranio sam u rujnu 2013. godine.