

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Dejana Carić

Proučavanje utjecaja vezikula na enzimsku polimerizaciju anilina metodom elektronske
paramagnetske rezonancije

Doktorska disertacija

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstvena polja: Biologija i Kemija

Proučavanje utjecaja vezikula na enzimsku polimerizaciju anilina metodom elektronske paramagnetske rezonancije

Dejana Carić

Disertacija je izrađena u: Laboratoriju za magnetske rezonancije, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Mentor: dr.sc. Marina Ilakovac Kveder

Kratki sažetak doktorske disertacije:

U radu je istražen polianilin (PANI), vodljivi polimer anilina, nastao sintezom u vodenom mediju enzimskom šablonskom polimerizacijom metodom elektronske paramagnetske rezonancijske (EPR) spektroskopije. Tijekom šablonske polimerizacije kao šablone korištene su submikrometerske vezikule natrijevog bis(2etilheksil)sulfosukcinata (AOT) spinski označene templi-oktanoatom. Promatranjem molekulske dinamike na površini spinski označenih vezikula tijekom polimerizacije u prisutnosti enzima peroksidaze iz korijena hrena nije dokazana interakcija reaktanata polimerizacije s vezikulama AOT. Istražena su i magnetska svojstva, povezana s vodljivošću, PANI nastalih ovakvom vrstom polimerizacije u usporedbi s komercijalno dostupnim polianilinom. Utvrđeno je da PANI nastao šablonskom polimerizacijom ima nižu vodljivost od komercijalno dostupnog PANI, što je najvjerojatnije posljedica zaostalih AOT molekula.

Broj stranica: 105

Broj slika: 42

Broj tablica: 6

Broj literaturnih navoda: 147

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: polianilin, lakaza, peroksidaza, vezikule, enzimska šablonska polimerizacija, EPR, spinsko označavanje.

Datum obrane: 10. lipnja 2016.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Vladimir Mrša, redoviti profesor, Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, predsjednik
2. Dr. sc. Marina Ilakovac Kveder, savjetnica u trajnom zvanju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
3. Prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica, Odjel za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, član
4. Dr.sc. Boris Rakvin, zaslužni znanstvenik, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik

PhD thesis

Ruder Bošković Institute

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular

biosciences Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science

Scientific Field: Biology and Chemistry

The electron paramagnetic resonance study of impact of vesicles on enzymatic aniline polymerization

Dejana Carić

Thesis performed at: Ruđer Bošković Institute, Laboratory for magnetic resonance, Zagreb

Supervisor: PhD Marina Ilakovac Kveder, Scientific advisor

Short abstract:

In this Ph.D thesis polyaniline (PANI), conductive polymer of aniline was investigated using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. It was obtained through enzyme-catalyzed template polymerization in aqueous medium. Submicrometer-sized vesicles sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) were used as templates. Molecular dynamics on the surface of spin labeled vesicles during polymerisation in presence of horseradish peroxidase was investigated. Interactions between reactantes and AOT vesicles was not confirmed. In addition, magnetic properties related to conductivity for enzyme-catalyzed template polymerization PANI were compared with commercially available PANI. It was found that enzyme-catalyzed template polymerization PANI has lower conductivity most likely due to remained AOT molecules.

Number of pages:105

Number of figures:42

Number of tables:6

Number of references:147

Original in: Croatian

Key words: polyaniline, laccase, peroxidase, vesicles, enzyme-catalyzed template polymerization, EPR, spin labeling

Date of the thesis defense: 10. June 2016.

Reviewers:

1. Vladimir Mrša, PhD, Full Professor, Faculty of Food tehnology and Biotehnology, University of Zagreb
2. Marina Ilakovac Kveder, Scientific advisor, Ruđer Bošković Institute, Zagreb
3. Vera Cesar, PhD, Full Professor, Department of biology, J. J. Strossmayer University of Osijek, member
4. Boris Rakvin, PhD, Scientist Emeritus, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za magnetske rezonacije, Zavoda za fizičku kemiju,
Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr.sc. Marine Ilakovic Kveder.

Ovom prilikom želim zahvaliti mentorici dr. sc. Marini Ilakovac Kveder na svim savjetima pri izradi ovog rada, kao i velikom strpljenju pokazanom prema svim mojim pogreškama.

Velika hvala dr. sc. Borisu Rakvinu na svemu: uvođenju u ovu problematiku, učenju osnova EPR-a, te svim računima koje je izradio.

Posebna zahvala dr. sc. Vesni Nötig-Laslo, na svim podukama o spinskom označavanju i dr. sc. Zorici Veksli našoj laboratorijskoj enciklopediji za svaki kemijski problem.

Ostalim članovima Laboratorija za magnetske rezonancije zahvaljujem: Nadici na pomoći i podršci u izradi ovog rada, Dijani na proživaljavanju svih crvenih, zelenih i žutih minuta. Daliboru i Srećku na brzim odgovorima, a Jurici na dobrim kolačima.

Ovdje bih željela pokazati neizmjernu žalost za našim Mladenom, čiju sam odustnost osjetila tijekom pisanja ovog rada.

Mojoj ABC-edi doma, hvala na strpljivosti za vrijeme koje mi je škola oduzela od njih.

Prijateljima koji su vjerovali u mene više od mene same, mojim bivšim biokemičarima (Kristi, Igoru, Mirti, Vlatki i Vladku), jednoj vrijednoj skupini kolegica koja teži dohvatiti što bolje rezultate, te Hasi, Janji i Nedi, hvala na strpljivosti za moje jadikovke.

Mojim roditeljima i sestrama, bez kojih ne bi bila ovo što danas jesam, hvala na svemu što su mi pružili u životu.

1. UVOD	1
1.1. Enzimaska šablonska polimerizacija.....	4
1.1.1. Lakaza iz gljive <i>Trametes versicolor</i> (TvL).....	6
1.1.2. Peroksidaza iz korijena hrena <i>Armoracia rusticana</i> (HRPC)	7
1.1.3. Vezikule	10
1.2. Polianilin (PANI).....	11
1.2.1. Polimerizacija anilina	12
1.2.3. UV/Vis svojstva polianilina	14
1.2.4. Magnetska svojstva polianilina	15
1.2.5. Primjena polianilina	15
1.3. Polianilin emeraldinska sol PANI-ES	15
1.5. Metoda elektronske paramagnetne rezonancije (EPR).....	18
1.5.1. Energija elektrona u magnetskom polju.....	18
1.5.2. Elektronska spinska rezonancija	19
1.5.3. Magnetska susceptibilnost.....	24
1.5.4. Metoda spinskog označavanja.....	25
1.5.5. EPR spektar nitroksilnog radikala.....	27
1.6. Ciljevi i hipoteza istraživanja	30
2. MATERIJALI I METODE	31
2.1. Priprava vezikula AOT (natrijev bis(2-etilheksil)sulfosukcinat)	32
2.2. Označavanje AOT vezikula spinskom probom	33
2.3. Priprava otopina enzima	33
2.4. Priprava otopine monomera anilina.....	33
2.5. Otopina natrijeva dihidrogenfosfata	33
2.6. Otopina vodikova peroksida.....	34
2.7. Enzimaska polimerizacija anilina u prisutnosti HRPC	34

2.8.	Enzimaska polimerizacija anilina u prisutnosti TvL.....	34
2.9.	Izolacija sintetiziranih polimera	35
2.10.	UV/Vis spektroskopija.....	35
2.11.	EPR spektroskopija.....	35
2.12.	Simulacija EPR spektara.....	36
3.	REZULTATI	38
3.1.	Kinetika polimerizacije anilna.....	39
3.2.	Molekulska dinamika na površini vezikula AOT tijekom polimerizacije anilna.....	44
3.3.	Usporedba polimera PANI iz različitih reakcija polimerizacije.....	48
3.4.	Usporedba EPR mjerenja provedenih pri različitim frekvencijama	64
4.	RASPRAVA	67
4.1.	Kinetika polimerizacije anilina.....	68
4.2.	Molekulska dinamika na površini vezikula tijekom polimerizacije anilina.....	70
4.3.	Usporedba polimera PANI iz različitih reakcija polimerizacije.....	72
4.4.	Usporedba EPR mjerenja provedenih pri različitim frekvencijama	75
5.	ZAKLJUČCI	76
6.	LITERATURA	79
7.	SAŽETAK.....	90
8.	SUMMARY.....	92
9.	PRILOZI.....	94
9.1.	Popis kratica	95
9.2.	Primjer računalnog programa u simulaciji eksperimentalnih EPR podataka	97
10.	ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA.....	101

1. UVOD

Šablonska polimerizacije danas ima veliku upotrebu u raznim postupcima sinteze polimera, a posebno s aspekta zelene kemije. Jedan od primjera šablonske polimerizacije, koji je omogućio razvoj mnogih metoda molekularne biologije, kao napredak u cijelom području, jest lančana reakcija polimerazom (PCR) [1]. U literaturi postoji niz primjera upotrebe enzima u polimerizaciji *in vitro*. Enzimi u *in vitro* sintezi mogu provesti reakcije identične reakcijama koje provode *in vivo*, što je primjer spomenute lančane reakcije polimerazom. Potom mogu sudjelovati u reakcijama sinteze *in vitro*, dok *in vivo* kataliziraju procese razgradnje, kao pri sintezi celuloze iz aktiviranog monomera celubioze (β -D-celobiosil-fluorida) primjenom endoglukanaze i celobiohidrolaze [2, 3]. Treća mogućnost je da kataliziraju reakcije polimerizacije *in vitro* polimera koji se jako razlikuju od biopolimera prema kemijskoj strukturi. U ovom tipu reakcija primjenu su našli enzimi iz skupine lipaza, perkosidaza te oksidoreduktaza [4]. Ovakvim postupkom enzimske polimerizacije sintetiziran je polianilin uz peroksidazu iz korijena hrena *Armoracia rusticana* [5]. Znatna poboljšanja produkta u ovoj sintezi postignuta su uvođenjem vezikula, kao šablona [6, 7].

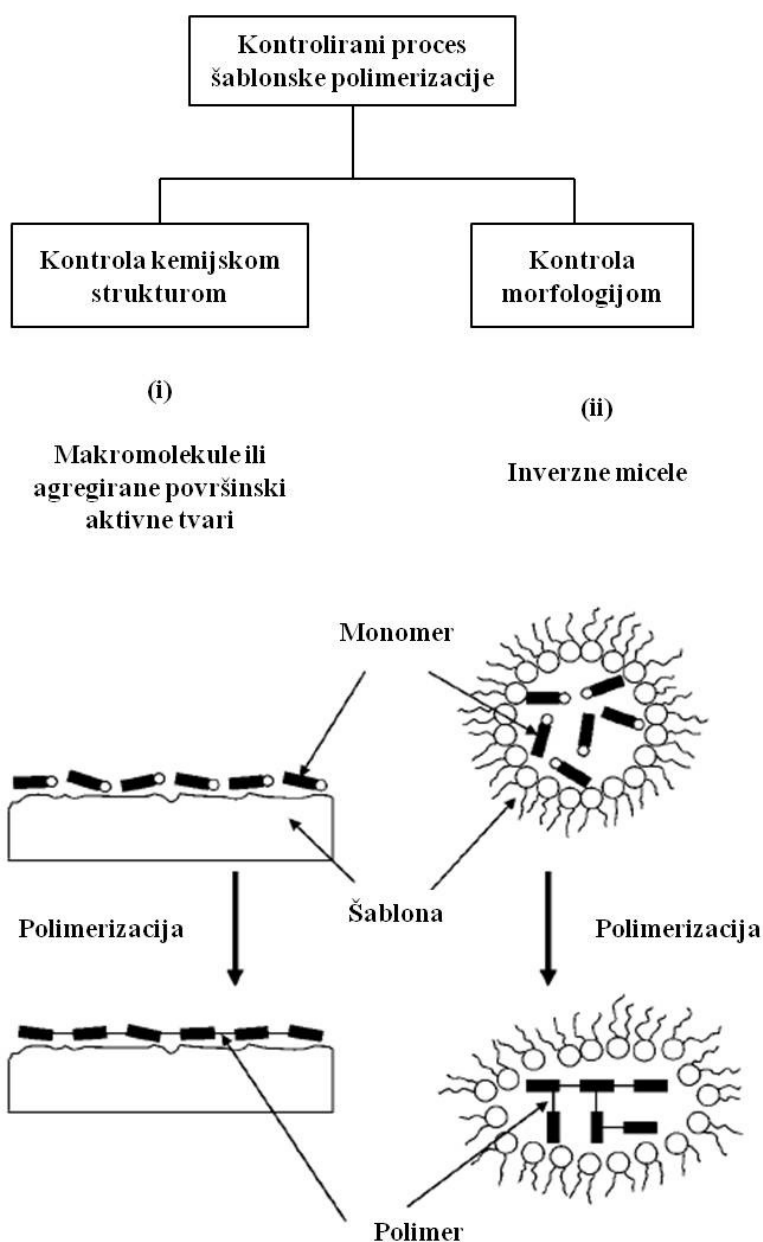
Same vezikule danas se intenzivno proučavaju radi njihove moguće primjene u različitim znanstvenim granama. Jedna grupa autora proučava ih kao prekursore u nastanku prvih stanica (engl. *protocells*), te smatra kako su važan korak u početku života (engl. *origin of life*) [8, 9]. Veliki potencijal ovih molekula leži u zatvaranju biološki aktivnih tvari unutar njihove strukture te prijenosu biomolekule do željenog mjesta. Vezikule su iskorištene kao efikasan način za prijenos lijekova do ciljanih stanica (engl. *drug delivery system*), čime se smanjuje toksični efekt a povećava efikasnost samog lijeka npr. u slučaju kemoterapije [10]. Liposomi, vrsta vezikula koje su građene od fosfolipidnih molekula amfifilnog karaktera, koriste se i kao modelni sustav za proučavanje bioloških membrana. Vezikule natrijeva bis(2-etilheksil)sulfosukcinata (AOT) korištene su u ovom radu kao šablona pri enzimskoj polimerizaciji vodljivog polimera polianilina.

Polianilin je jedan od najporučavanih vodljivih polimera, zahvaljujući svojoj raznolikoj primjeni. Koristimo ga u uređajima za pohranu energije (baterije, akumulatori), za poboljšanje kapaciteta uslijed bolje izmjene ciklusa punjena i pražnjena zahvaljujući velikoj površini polianilina [11]. Svoju primjenu polianilin nalazi i u elektrokromatskim uređajima, zbog reverzibilnih optičkih izmjena u polimeru uzrokovanih vanjskim naponom [12]. Nalazimo ga i u različitim sensorima gdje svoju primjenu ima zbog reverzibilnog utjecaja na proces oksidacije i redukcije [13]. Zbog svoje velike potencijalne primjene svojstva ovog polimera su jako interesantna za proćavanje, kao i način njihove sinteze.

U ovoj doktorskoj disertaciji obuhvatit će se interdisciplinarni pristup proučavanju utjecaja vezikula na sintezu polimera odnosno enzimske šablonske polimerizacije. Dinamika na površini vezikula tijekom polimerizacije, kao i svojstva sintetiziranog polimera proučit će se s obzirom na magnetska svojstva konačnog produkta primjenjujući spektroskopsku metodu elektronske paramagnetne rezonancije (EPR).

1.1. Enzimaska šablonska polimerizacija

U ovom doktorskom radu jedan od ključnih pojmova jest pojam šablonske polimerizacije čija je definicija: šablonska polimerizacija je polimerizacija monomera adsorbiranog ili orijentiranog, ili oboje, (a) na površini, (b) u polimernoj mreži ili (c) na polimeru u otopini, pri čemu je struktura nastalih polimernih lanaca određena orijentacijom monomernih molekula [14]. Ovaj koncept prikazan je na slici 1.1.



Slika 1.1. Dva moguća načina shematske polimerizacije. Slika preuzeta iz [4]

Vidljiva su dva tipa šablonske polimerizacije (slika 1.1). U prvom slučaju (i) monomer i/ili nastali polimer vežu se na šablonu više ili manje specifično, čime dolazi do usmjeravanja reakcije prema produktu željene kemijske strukture [15-21]. U drugom slučaju (ii) šablone razdjeljuju sustav na dva područja. U jednom su području monomeri i polimeri topljivi, a u drugome ne. Ovakav tip polimerizacije koristi se pri sintezi nano- i mezo-anorganskih materijala [20-24].

Upotreba enzima u šablonskim polimerizacijskim procesima omogućava blage uvjete reakcije kao što su sobna temperatura, pH blizu neutralnog, a reakcija teče pri atmosferskom tlaku.

U prirodi enzimi imaju veliku efikasnost i selektivnost pri katalizi. Sudjeluju u sintezi svih prirodnih polimera kao što su polisaharidi, celuloza, proteini, te DNA/RNA. U reakcijama katalize enzime odlikuje velika kemo-, enantio-, te stereo-selektivnost [25, 26]. No, prednost enzima je što nisu isključivi prema svojim prirodnim supstratima, već ih možemo koristiti u reakcijama za druge supstrate, te je njihova upotreba u *in vitro* sintezi polimera danas interesantno područje istraživanja [4, 27-29].

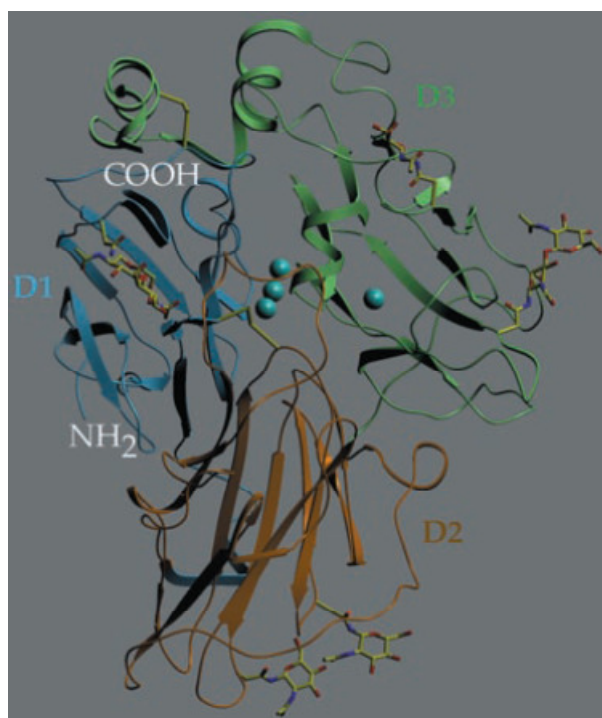
Do sada je mogućnost polimerizacije *in vitro* objavljena za nekoliko enzima iz skupine oksidoreduktaza (enzimi klase EC 1, npr. peroksidaza, lakaza), transferaza (EC 2, npr. glikoziltransferaza, aciltransferaza) te hidrolaza (EC 3, npr. glikozidaza, proteaza i lipaza) [30, 31]. No, danas se u enzimskoj polimerizaciji najčešće koriste peroksidaze i lipaze [4, 27-29]. Oba enzima mogu kao supstrat koristiti supstrat koji to nije u prirodnim uvjetima, ali imaju drugačiju mehaničku ulogu u katalizi polimera [4]. Lipaze kataliziraju kondenzacijske reakcije uključene u kontroliranje procesa nastajanja kovalentne veze preko prijenosa elektronskog para. Peroksidaze sudjeluju u nastajanju molekula s delokaliziranim nesparenim elektronom, koji potom u daljnjim reakcijama sudjeluje u stvaranju kovalentnih veza. Razlika između lipaza i peroksidaza je u tome što lipaze sudjeluju u svakom stupnju reakcije koja vodi do nastajanja i produljenja oligomera i polimera, dok se za peroksidaze pretpostavlja da sudjeluju samo u aktivaciji (npr. oksidaciji) monomera [4].

U ovom radu korišteni su enzimi peroksidaza iz korijena hrena *Armoracia rusticana* (EC 1.11.1.7) i oksidaza, lakaza, iz gljive *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2). Oba enzima pripadaju skupini oksidoreduktaza. Naziv oksidaza koristi se samo u slučaju kada je O₂ akceptor elektrona, dok peroksidaze kataliziraju oksidaciju različitih aromatskih supstrata kao što su amini, fenoli, tioanisi i vodikovim peroksidom H₂O₂.

1.1.1. Lakaza iz gljive *Trametes versicolor* (TvL)

Lakaza (EC 1.10.3.2) pripada grupi benzendiol:kisik oksidoreduktaza, skupini enzima koji u svojoj strukturi sadržavaju bakrove ione (engl. *multicopper enzymes*). U prirodi se nalazi u mnogim biljkama, bakterijama i gljivama [32-34]. Godine 1883. prvi put ju je opisao Yoshida, izoliranu iz drveta *Rhus vernicifera* [35], a karakterizirao ju je 1895. Bertrand [36] kao oksidazu koja u sebi sadržava metalni ion. Danas ima veliku primjenu zahvaljujući svojoj maloj specifičnosti prema supstratu, te prisutnosti kisika kao kosupstrata u reakciji. Lakaze su ekstracelularni enzimi čime su olakšani postupci izolacije i pročišćavanja. U industriji, lakaze, imaju široku primjenu, npr. u delignifikaciji, proizvodnji etanola, bistrenju vina, analizi lijekova, razgradnji onečišćivača okoliša, te u tekstilnoj industriji [37-42].

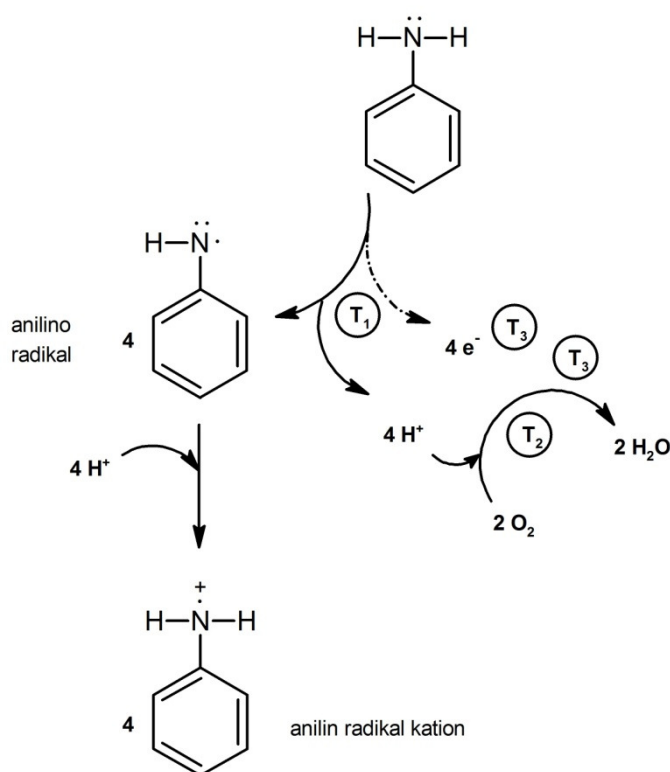
Kristalna struktura lakaze iz gljive *Trametes versicolor* (TvL) (slika 1.2) poznata je od 2002., izoelektrična točka joj je $pI = 3,5$, molarna masa 70 kDa. Moguće je izolirati pet izoenzima ovisno o stupnju glikozilacije [43, 44].



Slika 1.2. Kristalna struktura lakaze iz *Trametes versicolor* (TvL). Atomi bakra prikazani su kao plave kuglice. Slika preuzeta iz [43].

U aktivnom mjestu lakaza ima četiri atoma bakra, kako je prikazano na slici 1.2. Jedan bakar je tipa 1 (T1), tzv. plavi bakar koji je primarno oksidacijsko mjesto. Ostala tri bakra, jedan tipa T2

i dva tipa T3, nalaze se u trinuklearnom klasteru, na kojemu se reducira molekularni kisik. Bakar tipa T2 vidljiv je EPR spektroskopijom, dok su dva bakra tipa T3 nevidljivi zbog antiferomagnetskog međudjelovanja [43]. Smatra se da plavi bakar, T1, oksidira četiri reducirajuće molekule npr. anilina, u četiri jednoelektronske oksidacije uz istodobnu redukciju Cu(II) u Cu(I). Četiri elektrona nastala ovom reakcijom na klasteru T2/T3 reduciraju molekulu kisika pri čemu nastaju dvije molekule vode (slika 1.3) [45].



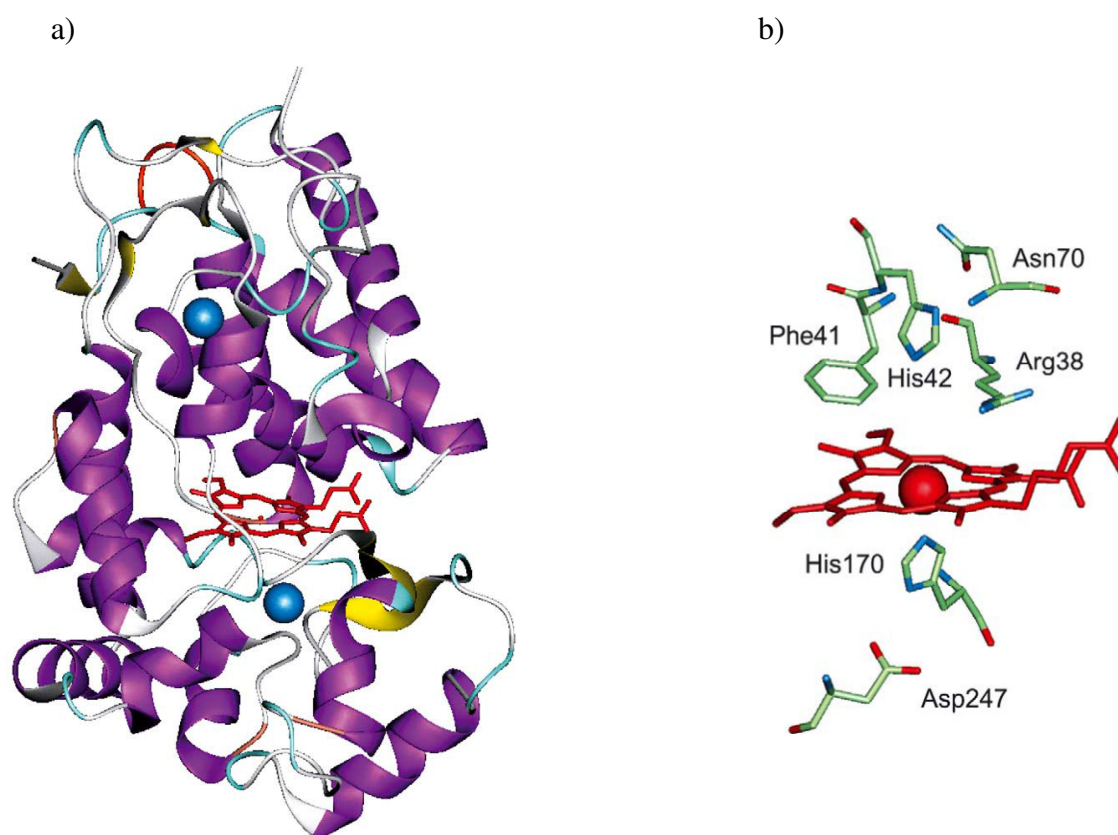
Slika 1.3. Mehanizam oksidacije anilina enzimom lakaza iz TvL. Slika preuzeta iz [46].

1.1.2. Peroksidaza iz korijena hrena *Armoracia rusticana* (HRPC)

Peroksidaza izolirana iz korijena hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) (EC 1.11.1.7) *Armoracia rusticana* pripada skupini III hem peroksidaza, te je jedna od najproučavanijih peroksidaza. Ima široku upotrebu kao važna komponenta u reagensima za kliničku dijagnostiku, te u različitim molekularno-biološkim eksperimentima [47, 48]. Prilikom izolacije iz korijena hrena dobiva se smjesa od najmanje 42 izoenzima u kojoj izoenzim C1A ima najveći udio (dalje u tekstu HRPC). Svi izoenzimi kataliziraju identičnu biokemijsku reakciju,

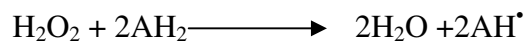
no male razlike u slijedu aminokiselina imaju za posljedicu razliku u njihovim fizikalnim, kemijskim te kinetičkim svojstvima [48].

HRPC ima molarnu masu oko 44 kDa. Sastoji se od 308 aminokiselinskih ostataka, dva iona Ca^{2+} , te četiri disulfidna mosta [49]. Izoelektrična točka joj je $\text{pI} \sim 9$ [50]. Fiziološka uloga, koja se pripisuje HRPC molekuli, jest metaboliziranje indol-3-octene kiseline, lignifikacija, umrežavanje polimera stanične stijenke, te rezistencija na infekcije [47]. Aktivno mjesto HRPC molekule sadržava hem grupu koja se sastoji od Fe (III) kompleksiranog u protoporfirin IX (slika 1.4).



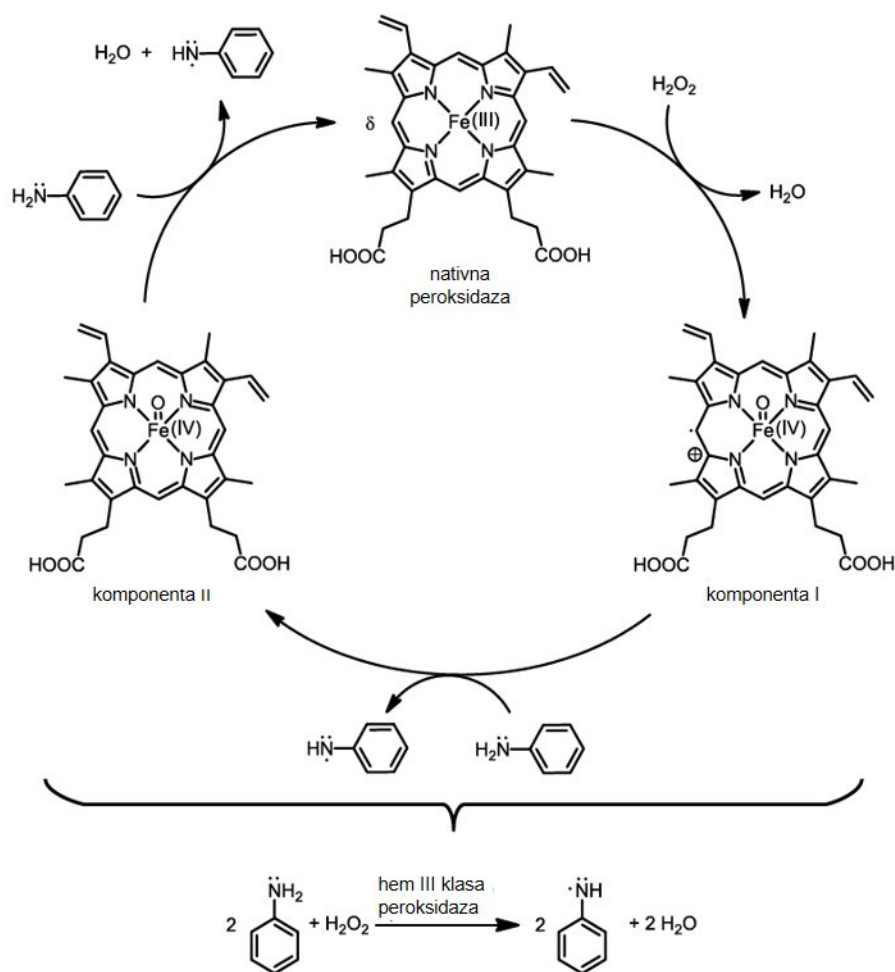
Slika 1.4. a) Kristalna struktura peroksidaze iz korijena hrena *Armoracia rusticana* izomer C1A (HRPC). b) Ključne aminokiseline za vezanje hem područja u enzimu. Slike preuzete iz [47].

Većina reakcija kataliziranih enzimom HRPC, kao i drugim izomerima može se prikazati kemijskom jednačbom:



u kojoj AH_2 i AH^\bullet predstavljaju reducirajući supstrat i njegov produkt, radikal. Uobičajeni supstrati uključuju i aromatske fenole, indole, amine te sulfonate [47].

Prvi korak u katalitičkom ciklusu jest redoks reakcija u kojoj vodikov peroksid (H_2O_2) oksidira Fe(III) u nativnom obliku enzima pri čemu nastaje komponenta I. Ta je intermedijer u oksidiranom stanju, koji sadržava Fe(IV) oksoferil centar i porfirinski kationski radikal, te je za dva oksidacijska stanja iznad nativnog oblika enzima. Komponenta I u prisutnosti reducirajućeg supstrata reducira se u komponentu II u kojoj je Fe(IV) oksoferil za jedno oksidacijsko stanje iznad nativnog oblika enzima. Obje komponente, I i II, snažni su oksidansi s redoks-potencijalom blizu +1 V. U drugoj jednoelektronskoj redukciji dolazi do povratka komponente II u nativno stanje enzima (slika 1.5) [47].



Slika 1.5. Katalitički ciklus klase III hem peroksidaze s anilinom kao supstratom i H_2O_2 kao oksidansom. Slika preuzeta iz [47].

1.1.3. Vezikule

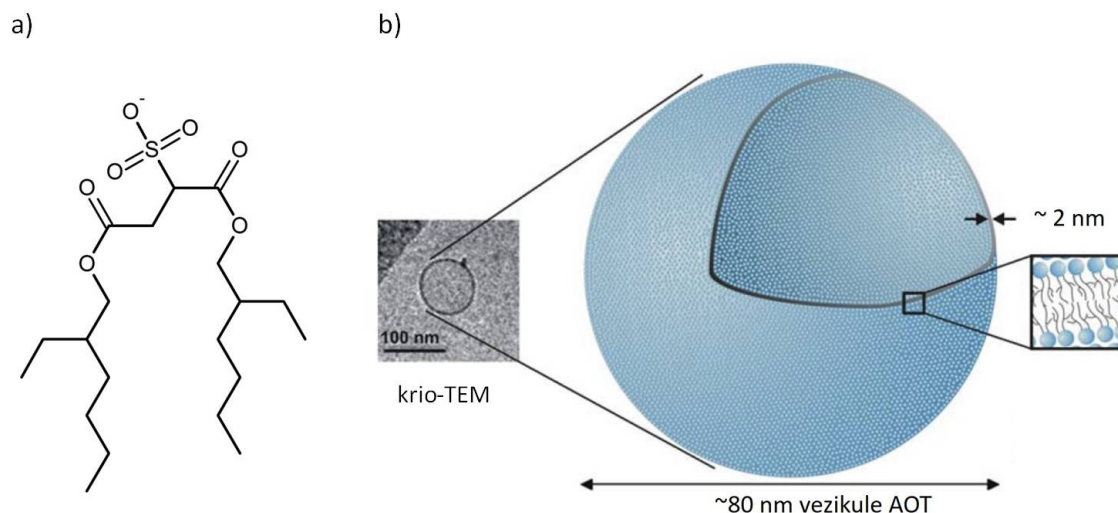
Naziv vezikula potječe od latinske riječi *vesicula(-ae)* što znači vrećica. Vezikule su supramolekularni agregati amifilnih molekula pri čemu se hidrofilni/hidrofobni dijelovi molekula samorganiziraju u supraamolekulske strukture. Oblik formiranih vezikula može biti različit, pa vezikule mogu imati sferičan, cilindričan te elipsoidni oblik. Amfifili se samoorganiziraju tako da im je površina (a) izložena otapalu optimalna na način da, vrijedi omjer $v/a = l$, gdje je v volumen, a l duljina hidrofobnog lanca molekule [8]. Strukturom se razlikuju višeslojne (engl. *multilamellar vesicle*, MLV) i jednoslojne (engl. *unilamellar vesicle*, ULV) vezikule. Veličina vezikula najčešće se određuje ultracentrifugiranjem, kriogenom transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM), nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR) [51].

Prema sastavu amifilnih molekula koje tvore vezikule razlikujemo tzv. lipidne vezikule koje su sastavljene od lipida prisutnih u biološkim membranama (fosfolipidi). Lipidne vezikule često se nazivaju i liposomi [52]. Vezikule pripremljene iz površinski aktivnih tvari, koje se često kemijski razlikuju od prirodnih amifila, nazivamo vezikule površinski aktivnih tvari [53], dok su vezikule pripravljene iz polimera poznate pod imenom polimerizomi [54].

Vezikule se često koriste kao modelni sustavi u istraživanju bioloških membrana, jer je izolacija bioloških membrana često otežana, dugotrajna te eksperimentalno zahtjevna. Nasuprot tomu, jednostavna priprava vezikula omogućila je nadvladavanje ovih problema. Osim toga, priprava vezikula iz specifičnih amifilnih komponenti omogućava proučavanje njihova utjecaja na svojstva realnih bioloških sustava. Uzimajući u obzir navedene prednosti, jasno je zašto su vezikule zauzele bitno mjesto u fundamentalnom istraživanju bioloških membrana.

Informacije o strukturi i uređenosti vezikula dobivaju se metodama raspršenja poput difrakcije rendgenskih zraka pod kutom uz napomenu da se tada sustav promatra u zamrznutom stanju. Eksperimentalne tehnike koje omogućavaju proučavanje vezikula u tekućini najčešće su infracrvena spektroskopija, te metode magnetskih rezonancija (NMR i EPR). Metoda spinskog označavanja vezikula omogućava proučavanje EPR spektroskopijom ugradnjom paramagnetskog centra koji postaje „glasnik“ dinamičke promjene kao i promjene polarnosti u okolini gdje je ugrađena spinska oznaka [55].

U ovom radu koriste se vezikule pripravljene iz natrijeva bis(2-etilheksil)sulfosukcinata (AOT) (slika 1.6a) za koje se pokazalo kako njihova prisutnost povećava efikasnost polimerizacije anilina [7].



Slika 1.6. a) Molekula AOT: natrijev bis(2-etilheksil)sulfosukcinat; b) Vezikula pripravljena iz molekula AOT promjera ~ 80 nm. Slika preuzeta iz [56].

AOT je anionska amfifilna molekula s dva kratka, razgranata hidrofobna lanca (slika 1.6b). Čestu upotrebu ima u tvorbi inverznih micela u organskim otapalima, npr. u izooktanu. Inverzne micelle nastaju zahvaljujući molekulskoj geometriji, pri čemu su polarne glave orjentirane prema polarnoj unutrašnjosti a nepolarni lanci prema organskom otapalu. U vodenom mediju AOT može agregirati micelle u vezikule, ovisno o uvjetima. Tako je nađeno da u niskim koncentracijama AOT-a dolazi do formacije vezikula [7].

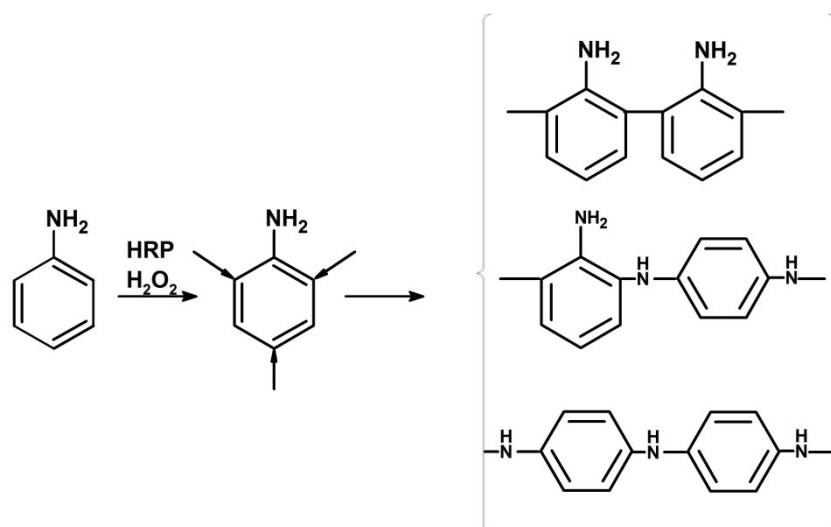
1.2. Polianilin (PANI)

Anilin (fenilamin) prvi je put izolirao Otto Unverdorben 1826. godine destilacijom indiga. Nazvao ga je „Cristallin“ [57]. Molarna masa anilina (C_6H_7N) iznosi 93,13 g / mol, točka tališta je na $-6^\circ C$, a vrelišta na $184^\circ C$, pK vrijednost mu je u kiselom području oko 4,6 [58]. Polimer anilina, polianilin (PANI), jedan je od najstarijih poznatih vodljivih polimera [59], a uz polipirol i najproučavaniji vodljivi polimer [60]. Prvi je put otkriven u 19. stoljeću, te nazvan imenom crni anilin [61, 62]. Kasnijim otkrićem njegove električne vodljivosti počinje veliki interes za ovaj polimer. Godine 1935. Willstätter i Stoll objavili su da se anilin može oksidirati peroksidazom izoliranom iz korijena hrena ili repe [5]. U razrijeđenoj octenoj kiselini pri pH = 4,5, u prisustvu peroksida enzim peroksidaza pretvara 2% -tnu otopinu anilina u smeđu tvar koja se postupno taloži. Nakon filtracije, filtrat se tretira lužinom pri čemu nastaje mala količina plave tvari, koju su autori definirali kao bazu smeđeg taloga. Smeđi talog, prvi put

sintetiziran enzimskom reakcijom, opisan je kao smjesa kompleksa sličnih tvari [63], i to je prvi enzimski sintetizirani polianilin. PANI je netopljiv u svim uobičajenim organskim otapalima i vodi, a raspada se na nižim temperaturama prije nego li dosegne točku tališta [64]. Zbog toga je polimerizacija anilina obogaćenog krajevima topljivim u određenim otapalima [65-69], kao i sinteza tzv. topljivog PANI šablonskom polimerizacijom [70-72], interesantno područje istraživanja.

1.2.1. Polimerizacija anilina

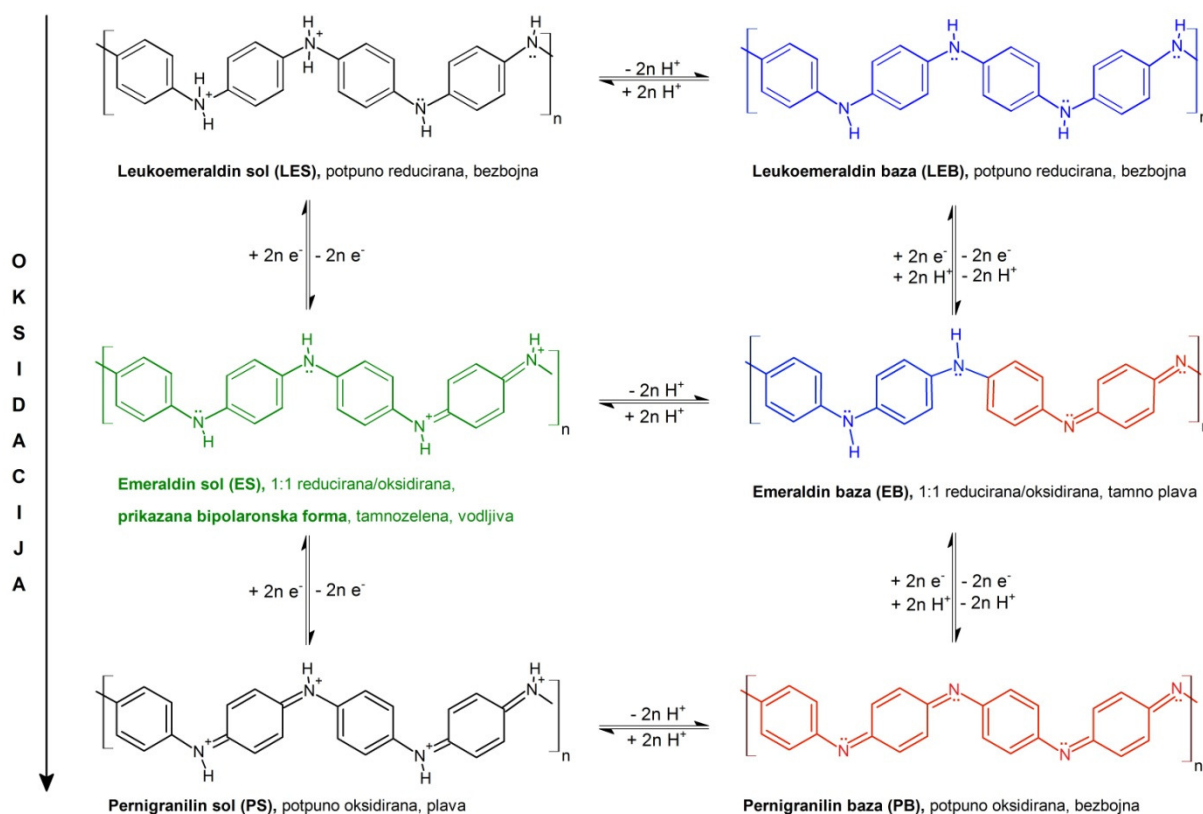
Tijekom polimerizacije molekule anilina međusobno se povezuju u *orto*- i u *para*- položajima, što rezultira nastankom razgranatog polimera. Razgranati polimer znatno je krući od linearnih struktura, a električna su mu svojstva niža. U savršeno linearnom PANI anilinske se jedinice međusobno vežu N-C-*para*-vezama, dok se defekti pojavljuju na N-N-, N-C- ili C-C-*orto*- ili C-C-*para* vezama (slika 1.7).



Slika 1.7. Enzimska polimerizacija anilina u kojoj nastaje razgranati produkt polianilin. Monomernne jedinice anilina međusobno su povezane *orto*-; *para*-C-C i C-N vezama. Kratica HRP označava peroksidazu iz korijena hrena. Slika preuzeta iz [70].

Stvaranje različitih veza tijekom reakcije posljedica je nastanka radikala u inicijacijskoj fazi polimerizacije bilo na dušikovu atomu bilo na *orto* ili *para* ugljiku. Kako bi se smanjila razgranatost sintetiziranog polimera, proveden je niz eksperimenata u kojima su mijenjani

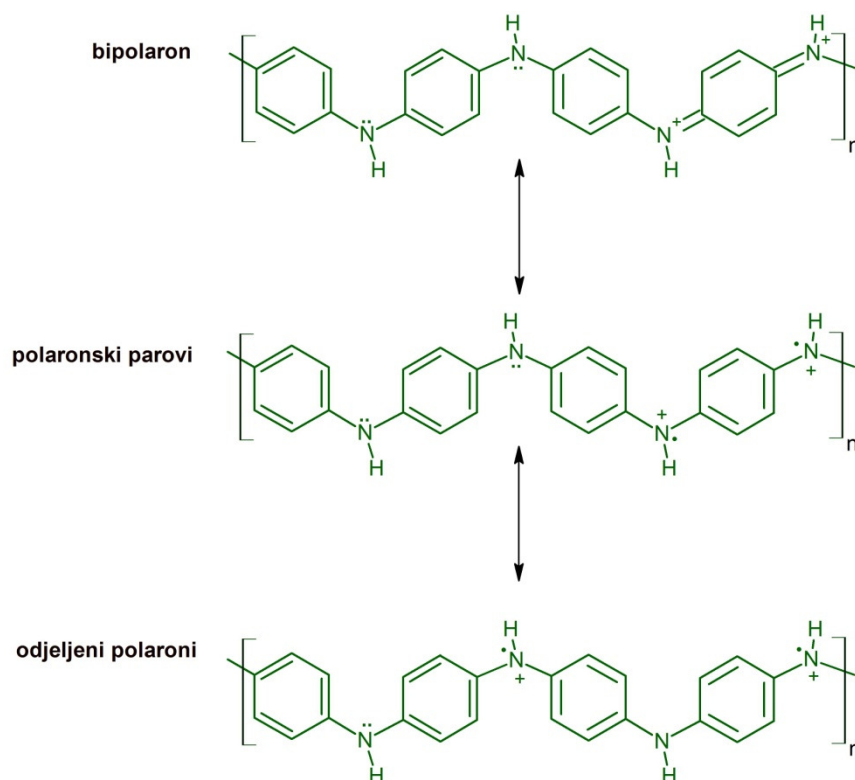
uvjeti polimerizacije, kao što su otapala u kojima se polimerizacija odvija [73, 74], reakcije u organiziranim okolinama kao što su inverzne micelle [75] i Langmuirovi monoslojevi [76]. Polimerizacijom anilina nastaje polianilin u obliku tankih filmova, no pod određenim uvjetima formira isprepletenu mrežu nanovlakana. Tijekom polimerizacije polianilin raste jednodimenzionalno [77], čime mu je mogućnost primjene znatno veća od drugih vodljivih polimera. Linearni PANI može postojati u različitim oksidiranim i protoniranim stanjima (slika 1.8).



Slika 1.8. Idealni linearni N-C *para* povezani PANI u svojim različitim oksidacijskim i protoniranim stanjima [78].

Potpuno reducirani PANI (leukoemeraldin) sastoji se samo od benzenskih jedinica. Protonirani oblik reduciranog PANI naziva se leukoemeraldinska sol, a neprotonirani oblik leukoemeraldinska baza. Potpuno oksidirani, kao i preoksidiran, oblik PANI sastoji se samo od kinonskih jedinica i naziva se pernigranilin (baza ako je neutralan, odnosno sol ako je protoniran). Oblik PANI u kojemu je pola jedinica protonirano, a pola jedinica reducirano sastoji se od jedne kinonske jedinice na četiri ponavljajuće jedinice anilina i poznat je kao

emeraldin. Neutralni oblik PANI, kojemu je pola jedinica reduciranog, a pola jedinica oksidiranog oblika, naziva se emeraldinska baza. Protonirani PANI, zeleni oblik, u kojemu je pola jedinica u reduciranom, a pola jedinica u oksidiranom obliku, naziva se emeraldinska sol (PANI-ES). PANI-ES je jedini vodljivi oblik PANI. Kroz redistribuciju elektrona i rearomatizaciju bipolaronski oblik PANI-ES mijenja oblik u polaronski [78, 79] (slika 1.9).



Slika 1.9. Bipolaron i polaronski oblici PANI-ES.

1.2.3. UV/Vis svojstva polianilina

Vodljivost PANI-ES kao i apsorpcijski maksimum ovise o linearnosti polimera [80], protuionu (dopantu) [81], te konformaciji molekule, tj. stupnju razvučenosti zavojnice [82]. PANI-ES u polaronskom obliku ima apsorpcijski maksimum blizu infracrvenog područja (NIR), iznad 800 nm, zbog prijelaza između $\pi \rightarrow$ polaronskih vrpca [78, 82-85], dok deprotonirani oblik PANI-EB ili preoksidirani imaju pomak prema plavom dijelu spektra s apsorpcijskim maksimumom oko ~ 650 nm (emeraldinska baza) [86] te ~ 750 nm (pernigranilin sol) [6]. Apсорpcijski maksimum PANI-ES u NIR području ovisi o konformaciji zavojnice na koju utječe duljina lanca [87, 88]. U tzv. „zbijenih“ zavojnica apсорpcijski je maksimum oko 750 nm [87-89], dok se u razvučenih maksimum nalazi pri oko 1000 nm [90]. Razgranati *orto*-PANI ima

apsorpcijski maksimum pri 550 nm s neznatnom apsorpcijom u području oko 1000 nm [80]. Zbog točno definiranih apsorpcijskih maksimuma, koji su ovisni o kemijskoj i konformacijskoj strukturi PANI, UV/Vis metoda često se koristi kao jednostavan alat za optimiziranje uvjeta polimerizacije anilina.

1.2.4. Magnetska svojstva polianilina

Proučavanje magnetskih svojstava polianilina u porastu je posljednje desetljeće [91-97]. Poznavanje ovih svojstava upućuje na prirodu nositelja naboja u polimernoj strukturi. Model polaron-bipolaron za vodljive prolimere govori da su potpuno reducirani dijelovi polimera dijamagnetski. Pojedini dijelovi polimera, koji su u oksidiranoj obliku (polaroni) su paramagnetski i imaju spin elektrona $S = 1/2$, dok su bipolaroni dvostruko oksidirani i dijamagnetski [78]. Detalji pojmova objašnjeni su u poglavlju 1.5.3. Većina PANI uzoraka proučavanih EPR metodom pokazuje skoro linearnu ovisnost umnoška magnetske susceptibilnosti (χ) i temperature (T), χT . Takvo ponašanje obično se opisuje uzimajući u obzir dva doprinosa: (i) temperaturno ovisni Curiejev paramagnetizam i (ii) temperaturno neovisni Paulijev paramagnetizam [98]. Paulijeva susceptibilnost vezana je za delokalizaciju spina i direktno je proporcionalna gustoći stanja na Fermijevoj razini. Ona se pripisuje vodljivom tzv. trodimenzionalnom „metalnom“ stanju PANI [92]. Kaohl i suradnici [95, 96] opisali su približno linearnu ovisnost χT o temperaturi kao doprinos neuređene lokalizacije polaronskih parova (parovi radikal kationa sa $S = 1/2$). Nelinearna ovisnost χT o temperaturi nedavno je opisana modelom koji uzima u obzir i feromagnetsku i antiferomagnetsku vezu polaronskih vrpca [99].

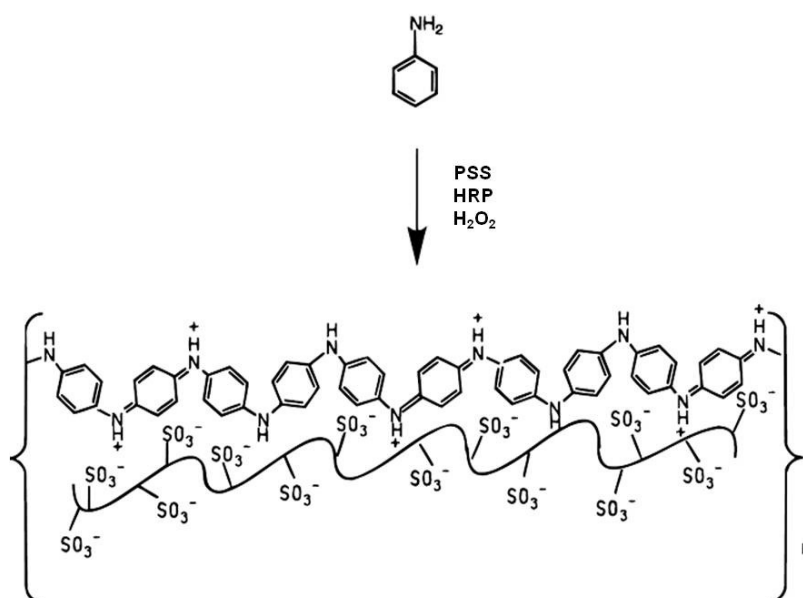
1.2.5. Primjena polianilina

Potencijalna je primjena ovog polimera višestruka. Koristi se kao ionski izmjenjivač u ionskoj kromatografiji [100], kao materijal za elektrode u punjivim baterijama [101], u solarnim ćelijama [102, 103], kao antikorozivno sredstvo [104], u sensorima za plin NH_3 [105-108], NO_2 [109] [110], HCl [111], CO [112], H_2 [113], te kao senzor za hlapljive organske tvari [114].

1.3. Polianilin emeraldinska sol PANI-ES

Oksidacijska polimerizacija anilina kao rezultat može imati cijeli niz produkata, koji ne samo da se razlikuju po stupnju oksidacije nego i po prirodi veze između anilinskih monomera,

stupnju razgranatosti polimera, prirodi kemijskih veza između anilinskih monomera te morfologiji [61, 78, 115-119]. Morfološka i kemijsko-fizikalna svojstva sintetiziranog PANI ovise o mnogo faktora: vrsti oksidansa koji se koristi, koncentraciji anilina i oksidansa, kao i njihovim omjerima u reakcijskoj smjesi, temperaturi te pH-vrijednosti reakcijske smjese [120, 121]. Samuelson i suradnici [70] u reakcijsku smjesu uveli su negativno nabijeni polistirensulfonat (PSS) kao šablonu (slika 1.10), pri čemu je nastao vodljivi oblik polianilina emeraldinska sol. Monomerne jedinice pri ovako sintetiziranom polimeru povezane su uglavnom *para*-N-C vezama, čime je smanjena razgranatost polimera koja se dobije klasičnom kemijskom sintezom. Daljnjim istraživanjima dokazano je da se kao šablona mogu koristiti negativno nabijeni polimer (npr. PSS) [58, 70, 122, 123], negativno nabijene micelle [122-125] ili negativno nabijene anorganske čestice [126].

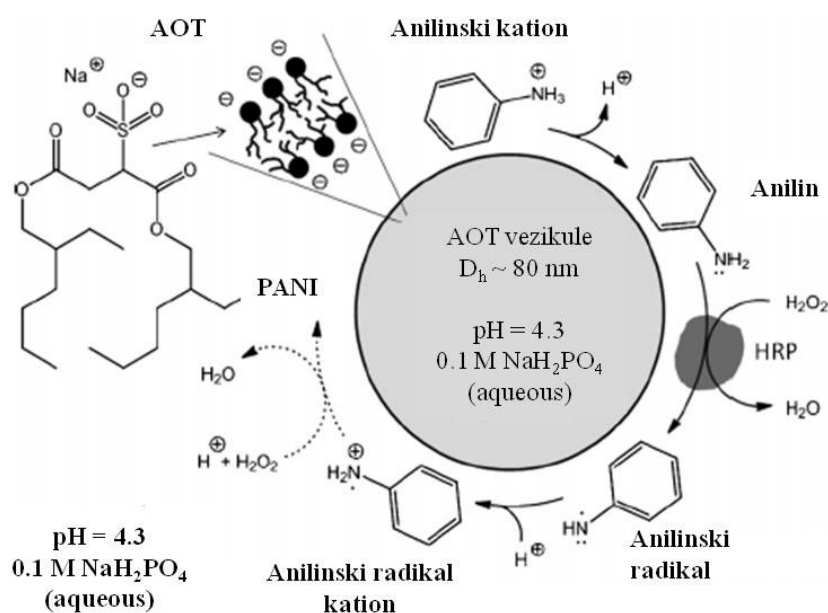


Slika 1.10. Enzimska šablonska polimerizacija anilina u kojoj nastaje emeraldinska sol polianilina. Monomerne jedinice anilina međusobno su povezane uglavnom *para* C-N vezama. Kratica PSS označava polistirensulfonat; HPR peroksidazu iz korijena hrena. Slika preuzeta iz [70].

Smatra se da šablone imaju nekoliko uloga pri polimerizaciji. Prva se uloga odnosi na usmjeravanje i koncentriranje pozitivno nabijenih anilinih iona, slučaja prikaznog na slici 1.10 gdje se pretpostavlja stvaranje N-H...O-S vodikovih mostova. Time je reakcija polimerizacije

regioselektivna te se monomeri prvenstveno vežu na *para* mjesto s obzirom na amino skupinu anilina. Ta regioselektivnost određuje omjer nastalog polimera vezanog *para*- i *orto*-vezama. Druga uloga šablona jest uloga protuiona (dopanta) koji kompleksirajući, najvjerojatnije preko N-H...O-S vodikovih veza [127], dispergira inače netopljiv PANI.

Skupina autora uvela je kao šablone, u reakcije polimerizacije, vezikule pripravljene iz natrijev-dodecilbenzenesulfonata (SDBS) i dekanske kiseline u omjeru 1 : 1 pri pH 4,3. Tim je vezikulama poboljšana stabilnost enzima u reakciji u usporedbi s reakcijama s PSS kao šablonama [6]. U kasnijim istraživanjima ista je skupina autora koristila vezikule pripravljene iz natrijeva bis(2-etilheksil)sulfosukcinata (AOT) (slika 1.11). U strukturi tih vezikula, za razliku od vezikula SDBS:dekanska kiselina, nema aromatskih prstena niti kemijske heterogenosti na površini. Reakcija polimerizacije u prisutnosti tih vezikula je poboljšana, jer ne dolazi do njihova taloženja na nižim temperaturama, tj. između 5°C i 10°C, za razliku od vezikula SDBS:dekanska kiselina, a stabilnost enzima u reakciji je zadržana [7].



Slika 1.11. Enzimska šablonska polimerizacija anilina uz AOT vezikule kao šablone za polimerizaciju. Slika preuzeta iz [128].

Poboljšavanje enzimske polimerizacije anilina istraženo je i enzimom lakaza iz gljive *Trametes versicolor* (TvL). Nastali produkt PANI-ES je preoksidiran, odnosno sadržava manje nesparenih elektrona, pa mu je vodljivost znatno niža, u odnosu na produkt nastao

polimerizacijom u prisutnosti enzima HPRC. Produkt reakcije može se također poboljšati ako se kao osnovna jedinica ne koristi anilin, već njegov dimer *p*-aminodifenilamin (PADPA). Upotrebom tog monomera povećava se brzina reakcije te je za reakciju potrebna niža koncentracija enzima TvL. Dobiveni poli(PADPA) nalik je PANI-ES u polaronskom obliku s velikim udjelom slobodnih nesparenih elektrona [129].

Tijek enzimske šablonske polimerizacije anilina može se podijeliti tri faze. Prva je tzv. inicijalna faza koja traje kratko, oko 5 minuta, pri čemu nastaje polianilin u različitim oblicima, a UV/Vis spektralne promjene unutar tog perioda su velike [128]. Druga faza traje nekoliko sati, a promjene UV/Vis spektra odvijaju se sporo. Treća je faza najsporija, traje dulje od 5 sati. Ukoliko uvjeti u reakcijskoj smjesi nisu optimizirani, kao produkt enzimske polimerizacije nastaje neželjeni PANI-ES, čija se prisutnost može utvrditi UV/Vis i NIR spektroskopijom [80, 84, 85, 130].

1.5. Metoda elektronske paramagnetne rezonancije (EPR)

Elektronska paramagnetska rezonancija je spektroskopska metoda kojom se detektiraju paramagnetski centri. Često se naziva i elektronska spinska rezonancija (ESR), ovisno o tome je li paramagnetski centar, tj. nespareni elektron osim spinskog karakteriziran i orbitalnim magnetskim momentom. EPR kao metoda ima raširenu primjenu u istraživanju bioloških sustava, osobito biokemijskih i biomedicinskih procesa, a predstavlja iznimno osjetljiv sustav za detekciju slobodnih radikala. Primjenjuje se za kvantifikaciju i identifikaciju slobodnih radikala nastalih kao intermedijeri u metaboličkim reakcijama, za promatranje stabilnih paramagnetskih radikala (npr. iona prijelaznih metala), kao i za detekciju slobodnih radikala nastalih utjecajem vanjskih faktora (npr. ionizirajuće zračenje). Metodu EPR moguće je primijeniti i za istraživanje dijamagnetskih sustava ugradnjom paramagnetskih proba (centara) kako je objašnjeno u poglavlju 1.9 [131].

1.5.1. Energija elektrona u magnetskom polju

Paramagnetske tvari sadržavaju nesparene elektrone, a s elektronom koji ima svojstvo spina, S , povezan je njegov magnetski moment $\vec{\mu}$ kako pokazuje sljedeći izraz:

$$\vec{\mu} = -g_e \mu_B \vec{S} \quad (1.1)$$

gdje je $g_e \approx 2,0023193$ Landéov g -faktor slobodnog elektrona, \vec{S} je operator spina, a μ_B Bohrov magneton definiran relacijom:

$$\mu_B = \frac{eh}{4\pi m_e} \quad (1.2)$$

pri čemu je e naboj elektrona, h Planckova konstanta a m_e masa elektrona. Potrebno je napomenuti kako je općenito u realnom sustavu g -faktor tenzorska veličina.

Energija međudjelovanja E magnetskog momenta elektrona $\vec{\mu}$ i magnetske indukcije \vec{B}_0 (veličina proporcionalna magnetskom polju dimenzije izražene SI jedinicom Tesla, T), tzv. Zeemanovo međudjelovanje, definirano je skalarnim produktom:

$$E = -\vec{\mu}\vec{B}_0 \quad (1.3)$$

Iz kvantizacije spinske kutne količine gibanja slijedi kvantizacija energetske razine magnetskog momenta

$$E = g\mu_B B_0 m_s \quad (1.4)$$

pri čemu za nesparni elektron kvantni broj m_s ima vrijednost $\pm 1/2$. Slijedom navedenog moguće su dvije energetske razine, α i β , kako je prikazano na slici 1.12:

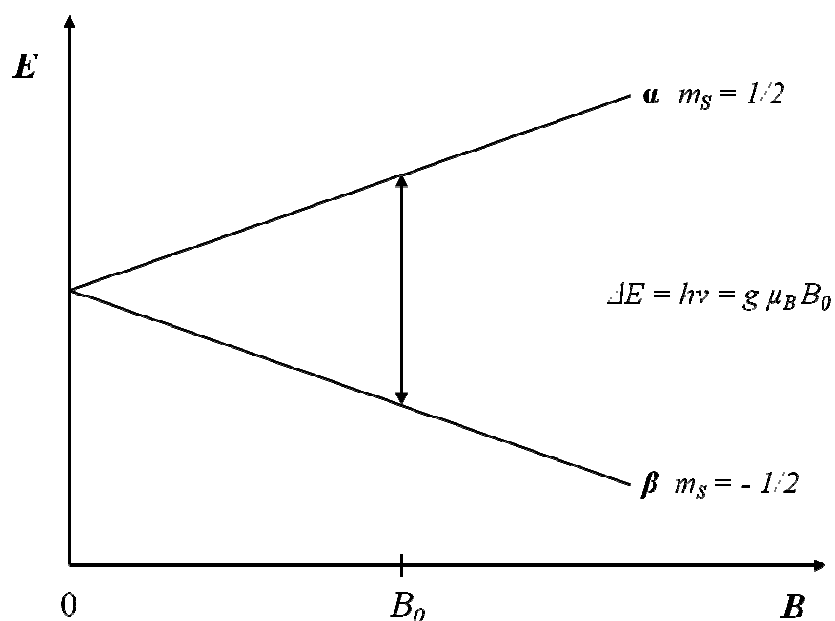
$$E_\alpha = \frac{1}{2} g\mu_B B_0 \quad (1.5)$$

$$E_\beta = -\frac{1}{2} g\mu_B B_0 \quad (1.6)$$

1.5.2. Elektronska spinska rezonancija

U odsutnosti magnetskog polja/indukcije energetske razine magnetskog momenta elektrona su degenerirane, tj. imaju istu energiju. Magnetsko polje podiže degeneraciju elektronskih razina (slika 1.12) na način da se prema izrazima (1.5) i (1.6) razlikuju razina niže i više energije uz energetski procijep između njih kako slijedi:

$$\Delta E = g\mu_B B_0 \quad (1.7)$$



Slika 1.12. Cijepanje energetske razine magnetskog momenta elektrona prema izrazu (1.4) za nespareni elektron u magnetskom polju indukcije B_0 .

Kada se promatrani sustav pobudi mikrovalnim elektromagnetskim zračenjem frekvencije ν , induciraju se prijelazi između tih dviju energetske razine (slika 1.12) pod uvjetom da je ostvaren rezonantni uvjet:

$$h\nu = \Delta E \quad (1.8)$$

tj. energija mikrovalnog zračenja mora biti jednaka razlici u energiji energetske razine [132, 133]. Rezonantni uvjet može se postići bilo ugađanjem frekvencije mikrovalnog zračenja bilo promjenom magnetskog polja/indukcije. Pregled odgovarajućih vrijednosti frekvencije mikrovalnog zračenja i odgovarajućeg rezonantnog polja prikazan je u tablici 1.1.

Iz povijesnih razloga neke frekvencije označene su slovima. Spektrometri u području 9,4 GHz (engl. *X-band*) najrašireniji su jer je magnetsko polje od oko 0,3 T lako postići elektromagnetima.

Tablica 1.1. Rezonantne frekvencije mikrovalnog zračenja pri različitim magnetskim indukcijama za slučaj magnetskog momenta nesporenog elektrona [134].

Frekvencija / GHz	Oznaka	Rezonantno polje / T
1,1	L	0,04
3	S	0,11
9,5	X	0,34
34	Q	1,20
94	W	3,40
140	D	4,9
200		7,14
300		10,70
500		17,84

Induciranje prijelaza između energetske razine uvjetovano je mogućnošću povratka sustava u termodinamičku ravnotežu jer u protivnom dolazi do saturacije i mikrovalno zračenje ne može više stimulirati prijelaze između energetske razine. Snaga mikrovalnog zračenja, P , kojom se induciraju prijelazi, a da pri tome ne dolazi do saturacije, proporcionalna je magnetskom polju mikrovalnog zračenja B_1 :

$$P \sim B_1^2. \quad (1.9)$$

Mehanizmi kojima promatrani spinski sustav nakon pobude postiže termodinamičku ravnotežu definirani su njegovim međudjelovanjem s okolinom. Prijenos energije sa spinskog sustava na sve druge stupnjeve slobode (npr. zagrijavanjem) uključuje mehanizme spin-rešetka relaksacije koji su opisani relaksacijskim vremenom T_1 kao karakterističnim vremenom u kojemu se uspostavlja termalna ravnoteža između spinskog sustava i njegove okoline. Međudjelovanje spinova, pri čemu ne dolazi do prijenosa energije izvan spinskog sustava tj. na rešetku opisuje se spin-spin relaksacijskim vremenom T_2 kao karakterističnim vremenom u kojemu se gubi fazna koherencija između spinova.

U EPR spektroskopiji najčešće se mjeri apsorpcijski signal, koji se zbog tehničkih razloga prikazuje kao prva derivacija tog signala. Najčešći oblici EPR spektralnih linija su Gaussova krivulja te Lorentzova krivulja (slika 1.13).

Gaussova krivulja opisuje se relacijom:

$$Y = Y_{max} \frac{\Gamma^2}{\Gamma^2 + (H - H_r)^2} \quad (1.10)$$

dok se prva derivacija opisuje relacijom:

$$Y' = -Y_{max} \frac{2\Gamma^2(H - H_r)}{[\Gamma^2 + (H - H_r)^2]^2} \quad (1.11)$$

Pri tome je Y_{max} maksimum amplitude krivulje, a Γ širina linije na poluvisini apsorpcijskog signala, a H_r rezonantno magnetsko polje.

Lorentzova krivulja opisuje se relacijom:

$$Y = Y_{max} \exp \left[\frac{(-\ln 2)(H - H_r)^2}{\Gamma^2} \right] \quad (1.12)$$

dok se prva derivacija opisuje relacijom:

$$Y' = -Y_{max} \frac{2(\ln 2)(H - H_r)}{\Gamma^2} \exp \left[\frac{(-\ln 2)(H - H_r)^2}{\Gamma^2} \right] \quad (1.13)$$

Širina prve derivacije signala mjeri se od vrha do vrha amplitude i označava se s ΔH_{pp} . Za Gaussovu krivulju vrijedi:

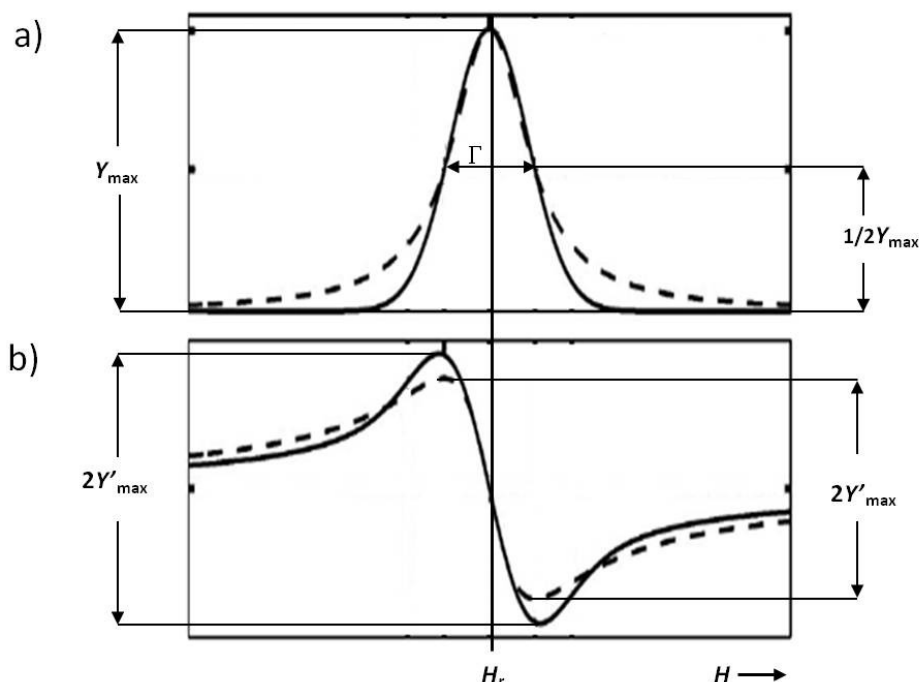
$$\Delta H_{pp} = \left(\frac{2}{\ln 2} \right)^{\frac{1}{2}} \Gamma \quad (1.14)$$

dok se kod Lorentzovu krivulju veza između Γ i ΔH_{pp} prikazuje relacijom:

$$\Delta H_{pp} = \frac{2}{\sqrt{3}} \Gamma. \quad (1.15)$$

Širina linije Γ povezana je sa spin-spin relaksacijskim vremenom:

$$\frac{1}{T_2} \sim \Gamma \quad (1.16)$$

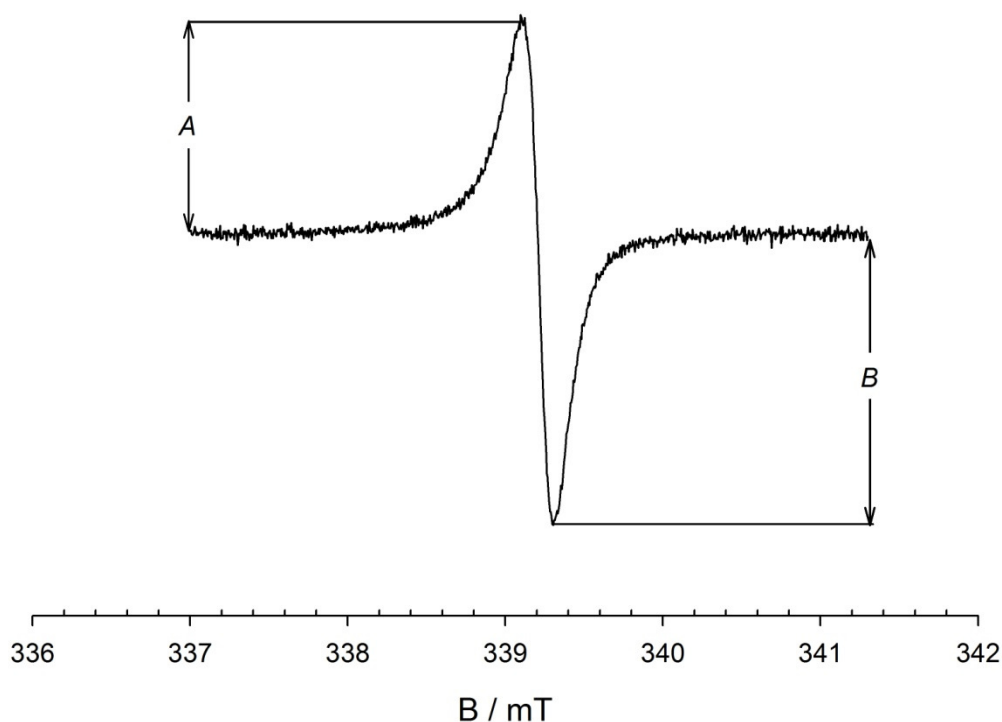


Slika 1.13. a) Prikaz apsorpcijskih signala definiranih izrazima (1.10) i (1.12) b) prva derivacija apsorpcijskog spektra definiranih izrazima (1.11) i (1.13). Lorentzova krivulja prikazana je punom linijom, a Gaussova isprekidanom.

Spektralne EPR linije realnih sustava mogu biti homogeno i nehomogeno proširene. Homogeno širenje linija pojavljuje se kad je svaki magnetski moment u sustavu izložen jednakom, vremenski usrednjenom magnetskom polju i opisuje se Lorentzovim oblikom krivulje. Nehomogeno širenje linija nastaje uslijed anizotropnih međudjelovanja i nehomogenosti lokalnog magnetskog polja. Tada se efektivna spektralna linija sastoji od mnogo homogeno proširenih linija koje se preklapaju i koje u konačnici vode na Gaussov oblik linije spektra.

1955. Dyson je opisao oblik EPR linije karakterističan za vodljive materijale [135]. Dysonova krivulja je asimetrična što je posljedica neujednačene distribucije mikrovalnog polja u uzorku (slika 1.14). Parametar asimetrije spektralne linije α prikazuje se omjerom parametara asimetrije A i B :

$$\alpha = A/B \quad (1.17)$$



Slika 1.14. EPR spektar PANI-ES pri sobnoj temperaturi. Spektar ima Dysonov oblik opisan parametrima asimetrije A i B .

1.5.3. Magnetska susceptibilnost

EPR eksperimenti provode se na materijalu koji sadržava veliki broj spinova. Tako se na primjer, za slučaj N istovrsnih spinova, koji međusobno ne djeluju, definira magnetizacija \vec{M} , kao makroskopska veličina promatranog sustava, izražena preko očekivanih vrijednosti magnetskih momenata:

$$\vec{M} = N\langle\vec{\mu}\rangle \quad (1.18)$$

Relacija koja opisuje vezu \vec{M} i magnetskog polja \vec{H} (dimenzija u SI sustavu je jedinica A/m) dana je sljedećim izrazom:

$$\vec{M} = \chi\vec{H} \quad (1.19)$$

$$\vec{B} = \mu_0\vec{H} \quad (1.20)$$

pri čemu je χ molarna magnetska susceptibilnost, koja se za magnetski izotropan uzorak može smatrati skalarom, a μ_0 je permeabilnost odnosno konstanta proporcionalnosti između magnetske indukcije i magnetskog polja.

Često se pri EPR mjerenjima pokušava razumjeti ovisnost parametara koji definiraju spektralne linije o temperaturi T . U ovom prisutpu najjednostavniji model prati Curiejev zakon prema kojemu je:

$$\chi \sim \frac{1}{T} \quad (1.21)$$

iz čega slijedi da umnožak χT mora biti neovisan o temperaturi.

Intenzitet EPR signala, I , također slijedi Curiejev zakon i može se opisati izrazom:

$$I \sim \chi \sim \frac{1}{T} \quad (1.22)$$

S obzirom na činjenicu da i kada su međusobno prostorno udaljeni magnetski momenti, rijetko se mogu smatrati idealno izoliranim objektima sa stanovišta magnetskih interakcija, modifikacija Curiejeva zakona vodi na dodatne članove u izrazima koji uključuju i slabe intermolekulske interakcije poput:

$$\chi T = C_0 + 4C_1 / (3 + \exp\left(\frac{J_1}{k_B T}\right)) + 4C_2 / (3 + \exp\left(\frac{J_2}{k_B T}\right)) + \dots \quad (1.23)$$

pri čemu su C_0 , C_1 i C_2 Curiejeve konstante, J međudjelovanje izmjene, k_B Boltzmanova konstanta koja iznosi $1,381 \text{ J K}^{-1}$ [98].

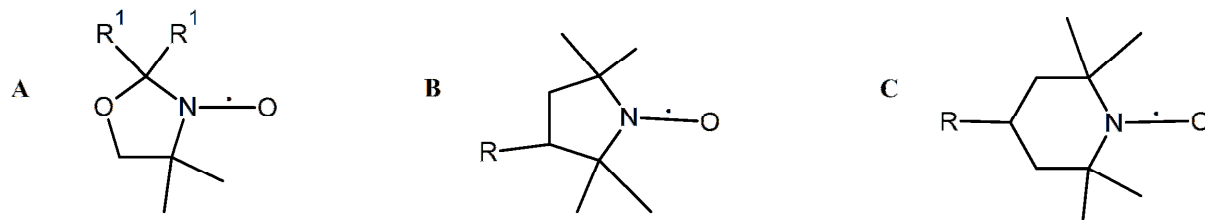
1.5.4. Metoda spinskog označavanja

Pri istraživanju dijamagnetskih sustava metodom EPR potrebno je u promatrani sustav ugraditi paramagnetske centre, odnosno provesti spinsko označavanje spinskim probama/oznakama [131]. Te paramagnetske reporterske molekule moraju ispuniti nekoliko zahtjeva:

- moraju biti osjetljive na dinamiku istraživanog sustava u svojoj okolini,
- njihova fizička svojstva moraju biti jedinstvena ili različita od istraživanog sustava,
- ne smiju promijeniti strukturu niti funkciju promatranog sustava.

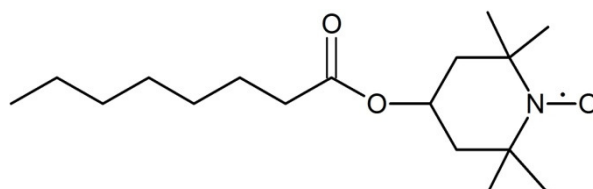
Idealne spinske oznake su stabilni (organski) slobodni radikali, koji daju informacije o strukturnim i dinamičkim karakteristikama promatranog sustava. Ugrađuju se na specifično mjesto u (biološkom) sustavu ili makromolekuli. Najčešće spinske oznake su nitroksilni radikali, a prvi iz te skupine molekula sintetizirali su Hoffman i Henderson 1961. godine [136]. Paramagnetizam nitroksilnog radikala posljedica je nesporenog elektrona duž N-O veze. Ti

radikali uobičajno su molekule peteročlanog ili šesteročlanog prstena koji su strukturni derivati oksazolidinskog (A), pirolidinskog (B) i piperidinskog (C) prstena (slika 1.15).



Slika 1.15. Shematski prikaz strukturnih formula nekih nitroksilnih radikala.

Metilne skupine prstena osiguravaju stabilnost ovih radikala s obzirom na mogućnost njihove rekombinacije. Kako se ne bi narušila svojstva promatranog sustava nitroksilni radikali u sustav se unose u količinskom udjelu do 1%, što je sa stanovišta EPR spektroskopije dovoljno budući da se EPR signal spinske oznake može detektirati za koncentraciju od 10^{-13} M. Nitroksilne radikale moguće je ugraditi u promatrani sustav na osnovi njihove topljivosti, odnosno partijskog koeficijenta u kojem slučaju govorimo o spinskim probama. Kada se nitroksilni radikal kovalentno veže za funkcionalnu grupu, npr. proteina tada govorimo o spinskim oznakama. Taj pristup se najčešće koristi u istraživanju dinamičkih i strukturnih karakteristika biološki važnih molekula npr. hemoglobina, citokrom C-oksidge, bakteriorodopsina i sl. [131]. Sam nitroksilni radikal može također biti integralni dio neke molekule poput fosfolipida ili masne kiseline pri čemu može biti vezan na različitim mjestima duž hidrofobnog lipidnog lanca (slika 1.6). U tom slučaju takva spinska oznaka omogućava, npr. praćenje dinamike i uređenosti molekula prirodne (modelne) membrane kroz cijeli njezin poprečni profil. Ovaj pristup također omogućava uvid u polarnost okoline gdje se nitroksilni radikal nalazi.



Slika 1.16. Tempil-oktanoat dobiven esterifikacijom oktanske kiseline 4-hidroksi-1-oksii-2,2,6,6-tetrametilpiperidinom (TEMPO).

1.5.5. EPR spektar nitroksilnog radikala

U analizi EPR signala nitroksilnog radikala potrebno je uzeti u obzir osim Zeemanova međudjelovanja, definiranog izrazom (1.3), također i međudjelovanje magnetskog momenta elektrona s magnetskim momentima jezgara $\vec{\mu}_n$ (npr. jezgre vodika) u njegovoj okolini. Za jezgru spina, I , različitog od nule, na isti način kao za slučaj elektrona, definira se veza s magnetskim momentom izrazom:

$$\vec{\mu}_n = g_n \beta_n \vec{I} \quad (1.24)$$

pri čemu je g_n konstanta proporcionalnosti, \vec{I} operator spina jezgre, a β_n nuklearni magneton definiran relacijom:

$$\beta_n = \frac{eh}{4\pi m_H} \quad (1.25)$$

uz oznaku za masu protona m_H . Uslijed međudjelovanja magnetskih momenta elektrona i jezgara u njegovoj blizini energetska razina magnetskog momenta u magnetskom polju/indukciji dodatno se cijepaju ovisno o magnetskom kvantnom broju jezgre m_I . Tako je za slučaj nitroksilnog radikala potrebno uzeti u obzir međudjelovanje magnetskog momenta elektrona s magnetskim momentom jezgre dušika ^{14}N spina $I = 1$ iz čega slijedi dodatno cijepanje energetskih razina elektrona na tri razine kako je prikazano na slici 1.17 uslijed mogućih vrijednosti $m_I = -1, 0, +1$. Pri tome je uvjet rezonancije zadovoljen za vrijednost magnetske indukcije:

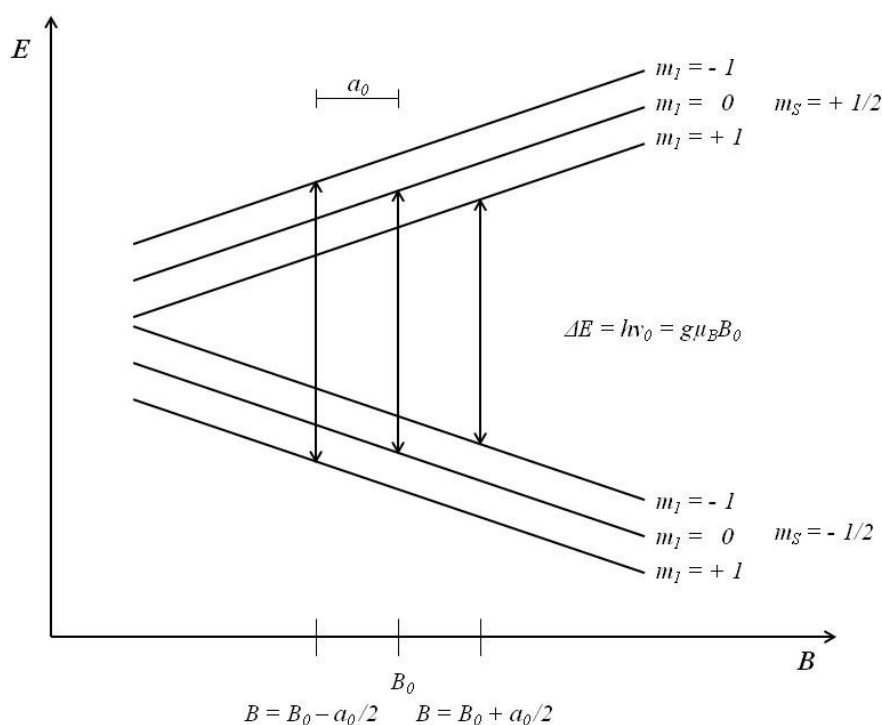
$$B = B_0 - a_0 m_I \quad (1.26)$$

pri čemu je a_0 izotropna konstanta hiperfinog cijepanja koja se u općenitom slučaju povezuje s tenzorom A .

Za slučaj brzog gibanja nitroksilnog radikala npr. u otopini anizotropija komponenti tenzora g ($g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}$) i A ($A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}$) svodi se na njihove izotropne vrijednosti g_0 i a_0 kako slijedi

$$g_0 = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (1.27)$$

$$a_0 = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (1.28)$$



Slika 1.17. Utjecaj hiperfinog međudjelovanja magnetskog momenta elektrona ($m_s = \pm 1/2$) i magnetskog momenta jezgre dušika ($m_I = +1, 0, -1$) na cijepanje energetskih razina magnetskog momenta elektrona u magnetskom polju indukcije B .

Kao mjera molekulske dinamike u sustavu koristi se rotacijsko-korelacijsko vrijeme τ_c koje označava vrijeme unutar kojega su stupnjevi slobode koji opisuju dinamička svojstva nitroksilnog radikala s obzirom na njegovu okolinu korelirani. Za brza gibanja opisana rotacijsko-korelacijskim vremenom u intervalu vrijednosti $10^{-11} \text{ s} \leq \tau_c \leq 3 \cdot 10^{-9}$ sa širina linije EPR signala, ΔH_{pp} , može se prikazati na sljedeći način

$$\Delta H_{pp} = a + bm_I + cm_I^2 \quad (1.29)$$

pri čemu su koeficijenti b i c opisani izrazima (1.30) [132]

$$b = \frac{8}{45} * \frac{\mu_B}{\hbar} * \left(A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy}) \right) * \left(g_{zz} - \frac{1}{2}(g_{xx} + g_{yy}) \right) * B_0 * \tau_c \quad (1.30)$$

$$c = \frac{1}{18} * \left(A_{zz} - \frac{1}{2} (A_{xx} + A_{yy}) \right)^2 * \tau_c$$

Korelacijsko vrijeme, τ , prema Arrheniusovu zakonu ovisno je o temperaturi:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad (1.31)$$

pri čemu je ΔE je aktivacijska energija, a k Boltzmanova konstanta [132].

1.6. Ciljevi i hipoteza istraživanja

S obzirom na onečišćenja okoliša, koja se pojavljuju tijekom klasičnih sinteza u kemijskoj industriji, danas se teži naći nove, „čistije“ načine proizvodnje materijala. Za polianilin nađeno je da se uspješno sintetizira u obliku polimera primjenom šablonske enzimске polimerizacije, uvjetima pogodnijim za okoliš.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. proučiti tijek polimerizacije anilina EPR spektroskopijom. U prisutnosti vezikula AOT kao šablona pratiti će se tijek polimerizacije, jer se tijekom polimerizacije pojavljuje paramagnetski centar u sustavu. Time je EPR metoda prikladna za izučavanje takvih sustava;
2. istražiti promjene na površini vezikula AOT tijekom polimerizacije anilina izomerom C- peroksidaze HRPC;
3. usporediti paramagnetska svojstva polianilina nastalih enzimskom polimerizacijom enzimom HRPC i enzimom lakazom iz TvL u prisustvu vezikula. Kao referentni uzorak koristit će se komercijalno dostupan PANI-ES.

Hipoteza:

Polianilin sintetiziran u prisutnosti vezikula AOT ima jednaku vodljivost kao i polianilin sintetiziran klasičnom kemijskom sintezom, pri čemu se koriste dosadašnje spoznaje da je u prisutnosti vezikula homogenija molekulska struktura polimernog lanca.

2. MATERIJALI I METODE

Anilin (99.8%) je od tvrtke Acros Organics (New Jersey, SAD)

Natrijev bis(2-etilheksil)sulfosukcinat (AOT \geq 99%), lakaza iz *Trametes versicolor* (> 20 U mg⁻¹) (TvL, EC: 1.10.3.2), polianilin emeraldin sol (Mw $> 15\ 000$) su od tvrtke Sigma-Aldrich (St. Luis, SAD).

HRPC - Horseradish peroxidase isoenzyme C (HRPC, EC 1.11.1.7) (Grade I, 280 U mg⁻¹) je od tvrtke Toyobo Enzymes, Japan.

Vodikov peroksid (30 %) je od tvrtke Merck (Darmstadt, Njemačka)

Spinska oznaka: tempil-oktanoat (slika 1.6) sintetizirao je prof. dr. sc. Slavko Pečar (Farmaceutski fakultet u Ljubljani). Tempil-oktanoat dobiven je esterifikacijom oktanske kiseline s 4-hidroksi-1-oksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidinom (TEMPO).

Tekući dušik i tekući helij su od tvrtke Messer Croatia plin, (Zaprešić, Hrvatska)

Ostale korištene kemikalije, analitičke čistoće (p.a.), su od Kemike, Zagreb.

Sve otopine pripravljene su u deioniziranoj vodi.

2.1. Priprava vezikula AOT (natrijev bis(2-etilheksil)sulfosukcinat)

AOT vezikule pripravljene su metodom višekratnog zamrzavanja i zagrijavanja [6]. Za pripravu 20 mM suspenzije vezikula, 0,178 g (0,4 mmol) AOT otopljeno je u oko 5 ml kloroforma u 100 mililitarskoj tikvici s okruglim dnom. Otapalo je ispareno plinovitim argonom, te se na ovaj način pripraviо tanki film na stijenkama tikvice. Tikvica je potom ostavljena preko noći u vakuumu da se otpari eventualno zaostalo otapalo. Film AOT molekula na stijenci tikvice potom je otopljen volumenom od 20 ml 0,1 M otopine natrijeva dihidrogenfosfata pH = 4,3. Dobivena se suspenzija zamrzava uranjanjem tikvice u tekući dušik, a zatim slijedi otapanje uranjanjem u vodenu kupelj zagrijanu na 60°C. Taj je postupak ponovljen deset puta. Tako pripremljene vezikule ujednačene su, s obzirom na veličinu, propuštanjem kroz ekstruder (Avanti Polar Lipids, Alabama, SAD) i polikarbonatnu membranu (Nucleopore) veličine pora 100 nm jedanest puta. Ekstruzijom se mehaničkim postupkom smanjuje broj slojeva molekula, koje tvore vezikulu, čime se smanjuje veličina vezikula uz istodobno ujednačavanje veličine vezikula. Tako pripremljene vezikule čuvaju se u tami pri sobnoj temperaturi.

2.2. Označavanje AOT vezikula spinskom probom

Amififilne molekule označene su nitroksilnim paramagnetskim molekulama na način da je spinska proba otopljena u acetonu direktno dodana u otopinu vezikula. Tim načinom spinskog označavanja dobivaju se vezikule kojima je spinski označen samo vanjski sloj molekula/površina višeslojne vezikule. Spinske probe dodane su u ishodnu suspenziju vezikula u koncentraciji nižoj od 1% s obzirom na koncentraciju AOT. U tom koncentracijskom području sve spinske probe ugrađene su u AOT vezikule, a pretpostavlja se da ne narušavaju promatrani sustav.

2.3. Priprava otopina enzima

Otopina enzima HRPC (izomer C peroksidaze iz korijena hrena *Armoracia rusticana*) koncentracije 67 μM , pripravljena je otapanjem liofiliziranog enzima u 0,1 M otopini natrijeva dihidrogenfosfata pH = 4,3. Koncentracija otopine provjerena je spektrofotometrijski (UV/Vis CARY 50; Varian, Australia) koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{430\text{nm}} = 102\,000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Otopina se čuva pri 4°C u tami te se može koristiti do četiri tjedna od pripreve.

Otopina TvL pripravljena je otapanjem 10 mg enzima u 1 ml deionizirane vode. Koncentraciju otopine lakaze iz *Trametes versicolor*, koja je pripravljena otapanjem u deioniziranoj vodi, nije bilo moguće odrediti spektrofotometrijski zbog nečistoća u kupljenom liofilizatu. Pripravljena otopina centrifugirana je 5 min pri 947 x g. Dalje je korišten samo supernatant. Otopina enzima čuva se pri 4°C u tami i može se koristiti do dva tjedna od pripreve.

2.4. Priprava otopine monomera anilina

Otopina anilina, 40 mM, pripravljena je otapanjem anilina 19,4 μl , u 5 ml otopine natrijeva dihidrogenfosfata, 0,1 M pH = 4,3. Nakon pripreve pH vrijednost podešena je na pH = 4,3 dodavanjem 0,1 M HCl. Otopina anilina se čuva pri 4°C u tami te se može koristiti do četiri tjedna nakon pripreve.

2.5. Otopina natrijeva dihidrogenfosfata

Otopina natrijevog dihidrogenfosfata, 0,1M, pripravljena je otapanjem 3 g NaH_2PO_4 u 250 ml deionizirane vode, a pH je podešen na 4,3, odnosno na 3,5 dodatkom 0,1 M NaOH ili 0,1 M HCl.

2.6. Otopina vodikova peroksida

Otopina 200 mM vodikova peroksida pripravljena je svaki put neposredno prije polimerizacije anilina razrjeđivanjem 102 μL 30% otopine vodikova peroksida do ukupnog volumena od 5 ml deioniziranom vodom.

2.7. Enzimaska polimerizacija anilina u prisutnosti HRPC

Polimerizacija anilina provedena je u 0,1 M otopini NaH_2PO_4 pri $\text{pH} = 4,3$ i sobnoj temperaturi. Uobičajeni volumen reakcijske smjese je 300 μl . Svi reaktanti pripremljeni su kako je prethodno opisano i dodani u epruvete s konusnim dnom volumena 1,5 ml prema točno određenom redoslijedu:

214,25 μl 0,1 M NaH_2PO_4 $\text{pH} = 4,3$

45 μl suspenzije AOT vezikula (konačna koncentracija u smjesi 3,0 mM)

29,9 μl otopine anilina (konačna koncentracija u smjesi 4,0 mM)

4,1 μl otopina HRPC (konačna koncentracija u smjesi 0,9 μM)

a reakcija započinje dodatkom 6,75 μl H_2O_2 (konačna koncentracija u smjesi 4,5 mM)

Reakcija polimerizacije bez prisutnosti vezikula AOT provedena je na sličan način, pri čemu je volumen vezikula nadomješten povećanjem volumena NaH_2PO_4 za volumen u kojemu se dodaju vezikule.

2.8. Enzimaska polimerizacija anilina u prisutnosti TvL

Polimerizacija anilina provedena je u 0,1 M otopini NaH_2PO_4 pri $\text{pH} = 3,5$ i sobnoj temperaturi. Uobičajni volumen reakcijske smjese je 500 μl . Svi reaktanti pripremljeni su kako je prethodno opisano i dodani u epruvete s konusnim dnom volumena 1,5 ml prema točno određenom redoslijedu:

362,5 μl 0,1 M NaH_2PO_4 $\text{pH} = 3,5$

37,5 μl suspenzije AOT vezikula (konačna koncentracija u smjesi 3,0 mM)

25,0 μl otopine anilina (konačna koncentracija u smjesi 4,0 mM)

reakcija započinje dodatkom 75,0 μl otopine TvL.

Reakcija polimerizacije bez prisutnosti vezikula AOT provedena je na sličan način, pri čemu je volumen vezikula nadomješten povećanjem volumena NaH_2PO_4 za volumen u kojemu se dodaju vezikule.

2.9. Izolacija sintetiziranih polimera

Polimeri sintetizirani nakon polimerizacije izolirani su iz reakcijske smjese dodatkom acetona u omjeru 1:1 u odnosu na volumen reakcijske smjese. Talog je iz smjese odvojen centrifugiranjem te je bogato ispran deioniziranom vodom. Kako bi se uklonile molekule AOT iz taloga, talog je tretiran pola sata 1 M HCl. Potom je talog ponovno ispran deioniziranom vodom, najmanje tri puta, nakon čega je osušen u vakuumu tijekom noći.

2.10. UV/Vis spektroskopija

Sva mjerenja izvedena su pri sobnoj temperaturi koristeći Varian Cary 50 spektrofotometru. Korištene su kvarcne kivete SUPRASIL® (QS) (Hellma, Switzerland) čiji je optički put 1 cm.

2.11. EPR spektroskopija

Svi eksperimenti provedeni su metodom EPR spektroskopije na način tzv. kontinuiranog vala (engl. *continuous wave* - CW). Spinski označene vezikule te praškasti uzorci polianilina karakterizirani su u temperaturnom području od 300-140 K koristeći Varian E-109 EPR spektrometar opremljen mikrovalnim mostom Bruker ER 041 XG, radne frekvencije u području 9,5 GHz (X-područje). Za samo snimanje eksperimentalnih podataka korištena je programska podrška naziva EW program-Data acquisition system 2.14A [137]. Temperaturno ovisna mjerenja napravljena su uz temperaturnu jedinicu ER 4111 VT tvrtke Bruker pri čemu je kontrola temperature ostvarena hlađenjem, odnosno grijanjem tekućim dušikom. Kao senzor temperature poslužio je termopar legure Chromela i Alumela smješten u EPR instrumentu točno ispod uzorka.

Određivanje koncentracije paramagnetskih centara u uzorcima te određivanje g -faktora provedeno je koristeći pravokutnu TE104 dvostruku rezonatorsku šupljinu. Pri tim mjerenjima u jednoj šupljini je uzorak koji služi kao standard, a u drugoj uzorak. Kao standardi korišteni su EPR standard tvrtke Varian tzv. „*strong pitch*“ čiji $g = 2,0028$, a koncentracija elektronskih spinova je $3 * 10^{15}$ spin cm^{-1} te DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) čiji $g = 2,0036$. Mjerenja su izvedena pri sobnoj temperaturi.

Za temperaturna mjerenja praškastog polianilina na temperaturama ispod 100 K korišten je EPR spektrometar Bruker ELEXSYS 580 FT/CW frekvencije mikrovalova 9,5 GHz (X-

područje). Budući da je spektrometar opremljen tempreaturnom jedinicom Oxford Instruments DTC2 te krio-linijom za tekući helij, bilo je moguće snimiti EPR spektre do temperature 5 K. EPR mjerenja pri visokoj frekvenciji mikrovalova od 94 GHz (W -područje) izvedena su korsiteći ELEXSYS 680. Za snimanje eksperimentalnih spektara koristila se programska podrška Xepr tvrtke Bruker.

Otopine spinski označenih uzoraka (50 μ l) mjerene su u staklenim kapilarama promjera 0,9 mm (Euroglass). Uzorci su snimani pri snazi mikrovala od 10 mW i modulacijskoj amplitudi 0,1 mT.

Prašasti uzorci prethodno izvagani, mjereni su u zataljenim EPR kvarcnim cjevčicama (Wilmad LabGlass) promjera 1mm. Uzorci su snimljeni pri snazi mikrovalova od ~ 1 μ W i modulacijskoj amplitudi od 0,1 mT.



Slika 2.1. Bruker Elexsys 580 FT/CW EPR spektrometar.

2.12. Simulacija EPR spektara

Eksperimentalni EPR spektri spinskih proba ugrađenih u vezikule simulirani su programskim paketom za simulaciju EPR spektara EasySpin [138]. Korištena je verzija 5.0.16 u okviru

MATLAB programa. U ovom radu korišteni su program izvornog naziva „*garlic*“, koji pretpostavlja brzo izotropno gibanje paramagnetskih centara, i „*chili*“, koji se primjenjuje za simulaciju spore molekulske dinamike.

Za promatrani sustav definiraju se, osim Zeemanova međudjelovanja, i sva ostala međudjelovanja koja se za slučaj npr. nitroksilnih radikala svode na hiperfine interakcije.

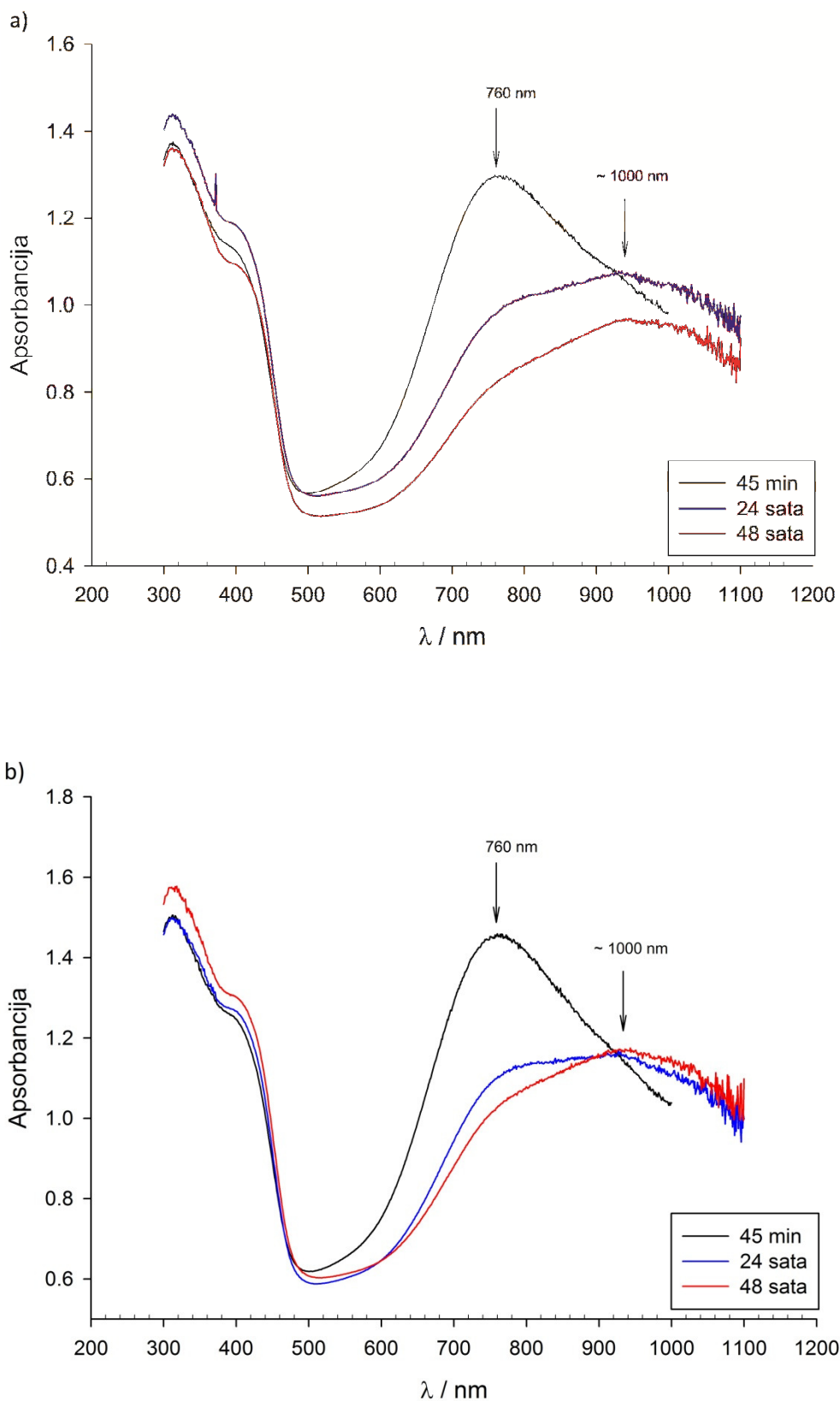
Na širine linija u EPR spektrima utječu razni čimbenici poput relaksacijskih vremena ili cijepanja energetske razina uslijed međudjelovanja magnetskog momenta elektrona s istovrsnim ili različitim magnetskim momentima radikala ili jezgara u njegovoj okolini. Program EasySpin omogućava simuliranje EPR linije s obzirom na njezin oblik i širinu. Podešavanje izračunatog širenja EPR linije s obzirom na eksperimentalni spektar postiže se u najjednostavnijem slučaju izotropne dinamike paramagnetskog sustava udjelom Lorentzove (1.13) i Gaussove krivulje (1.11). Za složenije tipove dinamike, kada je gibanje promatranog paramagnetskog sustava anizotropno tj. ovisi o orijentaciji spinskog sustava s obzirom na vanjsko magnetsko polje, moguće je širinu linije zadati npr. kao širinu linije na polovici maksimuma EPR signala.

3. REZULTATI

Ugradnjom spinskih proba u strukturu vezikula moguće je razlučiti promjene koje se odvijaju na površini ili unutar strukture ovisno o položaju nitroksilnog radikala vezanog na probu. Kao spinska proba za promatranje promjena na površini vezikula AOT odabran je tempil-oktanoat (slika 1.16). Ova spinska oznaka ima nitroksilni radikal vezan na hidrofobni lanac od 8 atoma ugljika koji je sumjerljiv duljini molekule AOT. Na taj način spinska oznaka se ugrađuje u sustav vezikule, a da pri tome ne remeti strukturu vezikule.

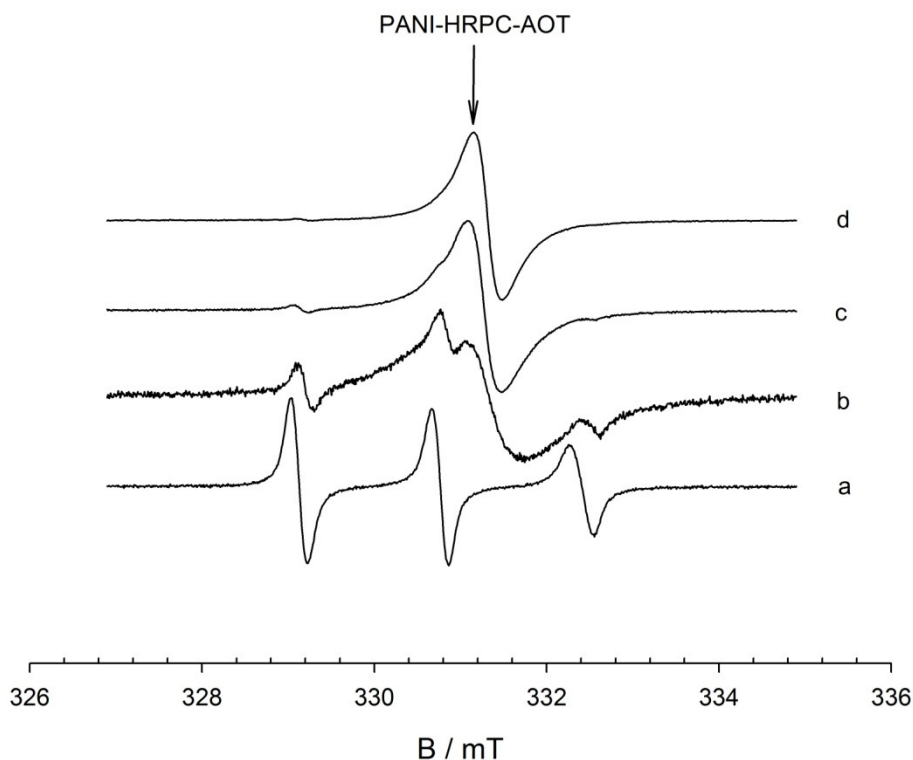
3.1. Kinetika polimerizacije anilna

Proces polimerizacije anilina do sada praćen je različitim spektroskopskim metodama. Sa stanovišta EPR tehnike, koja promatrani sustav prati između ostalog i ugradnjom paramagnetskog centra, bilo je potrebno prije iniciranja same kemijske reakcije provjeriti utječe li izabrani nitroksilni radikal na tijek same reakcije ili neovisno međudjelovanje s reaktantima. U tom smislu prvo je istražena mogućnost neposrednog utjecaja vodikova peroksida na izbranu spinsku probu tj. stabilnost paramagnetskog centra izloženog vodikovu perkoksidu. Taj je eksperiment izveden tako da je u suspenziju vezikula AOT spinski označenih tempil-oktanoatom dodan vodikov peroksid. Budući da pri tom ekperimentu nije opažena nikakva promjena EPR signala može se zaključiti da niti u uvjetima inducirane polimerizacije anilina pri istoj koncentraciji vodikova peroksida spinska proba ne reagira s vodikovim peroksidom. Mogući utjecaj tempil-oktanoata na sam proces polimerizacije proučavan je tako da je reakcija praćena UV/Vis spektroskopijom, standardnom metodom za promatranje tijeka polimerizacije anilina [78], pri čemu su vezikule AOT bile označene tempil-oktanoatom. Na slici 3.1. prikazan je UV/Vis spektar sniman tijekom inducirane polimerizacije na kojemu je vidljiv apsorpcijski maksimum oko 760 nm, nastao u prvih 45 min, a koji odgovara nastalom PANI-ES u bipolaronskom obliku kako objašnjavaju podaci u literaturi [87-89]. Tijekom vremena taj apsorpcijski maksimum se smanjuje, a raste novi maksimum na većoj valnoj duljini tj. oko 1000 nm, koji prema navodima u literaturi [90] odgovara nastajanju PANI-ES, molekule koja je paramagnetska uslijed postojanja nesparenih elektrona. Promjene koje nastaju tijekom reakcije u 48 sati posljedica su inter- i intramolekulskih redoks-procesa. Usporedbom UV/Vis spektara (slika 3.1) spinski neoznačenih i spinski označenih vezikula AOT može se uočiti da je tijekom reakcije identičan. U svim fazama polimerizacije nastale vrste PANI jednake su u slučaju označenih i neoznačenih vezikula AOT. Dakle, može se zaključiti da tempil-oktanoat ne utječe na tijek polimerizacije anilina.



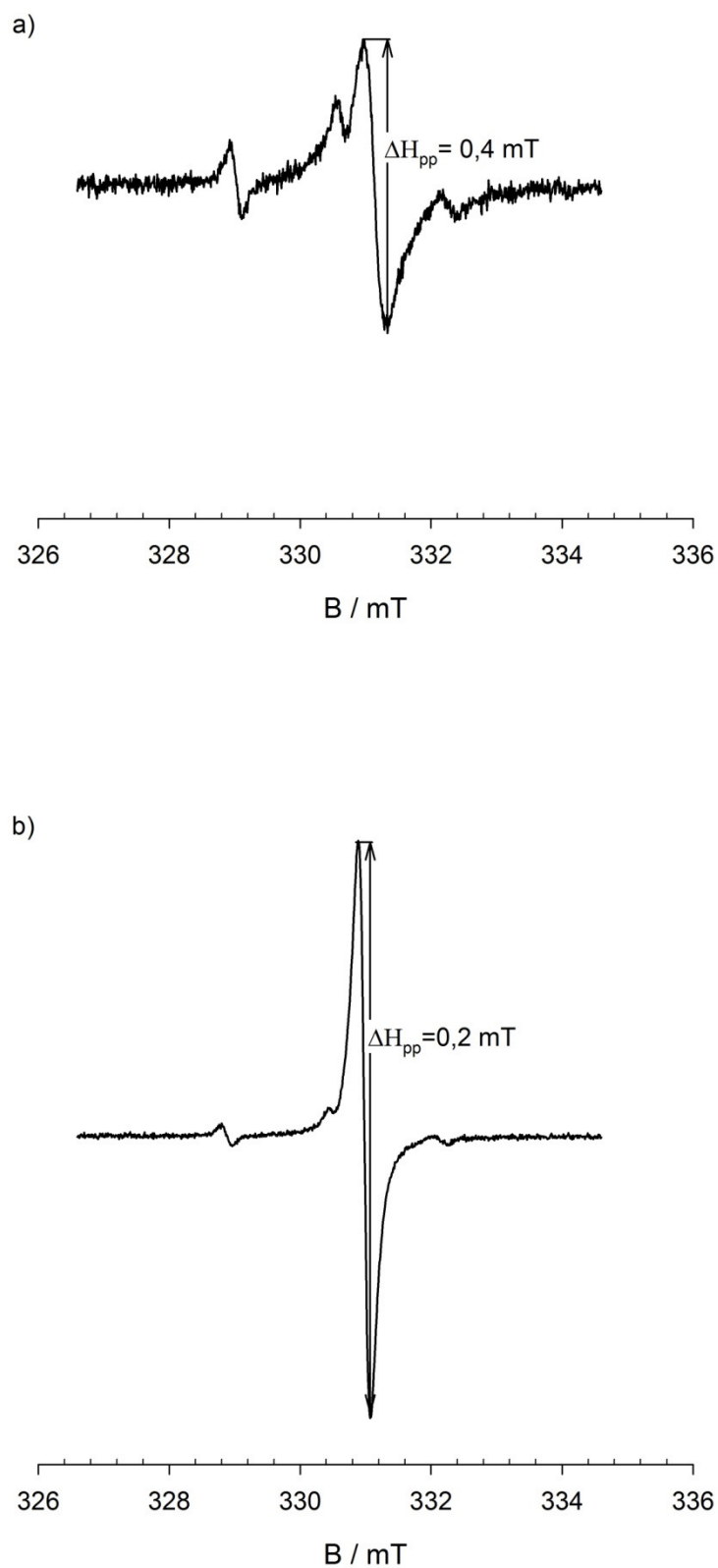
Slika 3.1. UV/Vis spektar reakcije polimerizacije anilina u prisutnosti vezikula AOT (a) i vezikula AOT označenih tempil-oktanoatom (b).

Nakon što je utvrđeno metodom UV/Vis spektroskopije da spinska proba ne utječe na samu reakciju polimerizacije anilina, metodom EPR spektroskopije praćen je tijekom same reakcije kao je prikazano na slici 3.2.



Slika 3.2. EPR spektri tijekom reakcije polimerizacije anilina u prisutnosti vezikula AOT spinski označenih tempil-oktanoatom. Strelicom je označena EPR spektralna linija PANI-AOT-HRPC. EPR spektri su normirani na amplitudu srednje linije i odnose se na sljedeća vremena u reakciji polimerizacije: 0 min. (a), 10 min. (b), 30 min. (c), 120 min (d).

Budući da se zna točna lokacija paramagnetskog centra u spinski označenoj vezikuli AOT, svaka promjena pridruženog EPR signala može se tumačiti s obzirom na točnu prostornu lokaciju kemijske reakcije. Uočava se da se EPR signal nitroksilnog radikala brzo smanjuje nakon induciranja polimerizacije anilina što nije neuobičajeno s obzirom da je i sama sinteza polianilina radikalska reakcija. Već nakon 10 minuta polimerizacije EPR signal spinski označenih vezikula AOT je mali što je vidljivo iz omjera signal šum. Međutim, usporedno se pojavljuje signal polianilina u centralnom dijelu spektralnog područja koji postaje dominantan EPR signal nakon 30 minuta reakcije iako je i tada još uvijek vidljiv rezidualni signal spinskih oznaka. Nakon dva sata od početka reakcije signal polianilina je velikog intenziteta i moguće je



Slika 3.3. EPR spektri tijekom reakcije polimerizacije anilina enzimom HRPC: u 15 minuti (a) i reakcija nakon 120 min (b). Spektralna širina linije signala polianilina, ΔH_{pp} , mjeri se tijekom reakcije kako je označeno na slici.

provesti analizu spektralne širine EPR linije (ΔH_{pp}) nastalog spoja, kako je prikazano na slici 3.3. Naime, detaljnom analizom uočava se da se spektralna širina EPR signala tijekom polimerizacije mijenja.

Nakon 10 minuta od iniciranja polimerizacije vodikovim peroksidom širina linije polianilina iznosi $\Delta H_{pp} = 0,7$ mT. To vrijeme odgovara tzv. fazi inicijacije reakcije polimerizacije u kojoj nastaju bipolaroni. Daljnim tijekom reakcije širina linije se smanjuje, te nakon 15 minuta iznosi $\Delta H_{pp} = 0,4$ mT (slika 3.3a), a nakon 120 minuta $\Delta H_{pp} = 0,2$ mT (slika 3.3b). Ovaj fenomen promjene širine linije tijekom reakcije tumači se u literaturi kao posljedica sinteze različitih vrsta PANI-ES koji nastaju tijekom polimerizacije u tri faze polimerizacije [128]. U početku reakcije, tzv. inicijalnoj fazi, nastaje PANI-ES u bipolaronskoj formi. Ta faza traje kratko. Zatim slijedi sporiji tijek reakcije, koji opisuju druga i treća faza polimerizacije kada se pojavljuju promjene UV/Vis apsorpcijskog spektra kako je vidljivo na slici 3.1. Nastaju apsorpcijski maksimumi pri $\lambda = 400$ nm i $\lambda = 1000$ nm koji se objašnjavaju inter- i intramolekulskim redistribucijama elektrona, rearomatizacijom te formiranjem polarona [128]. Dakle te promjene apsorpcijskih maksimuma UV/Vis spektara direktno se prate u EPR spektrima kroz promjenu širine linije ΔH_{pp} kako prikazuje slika 3.3.

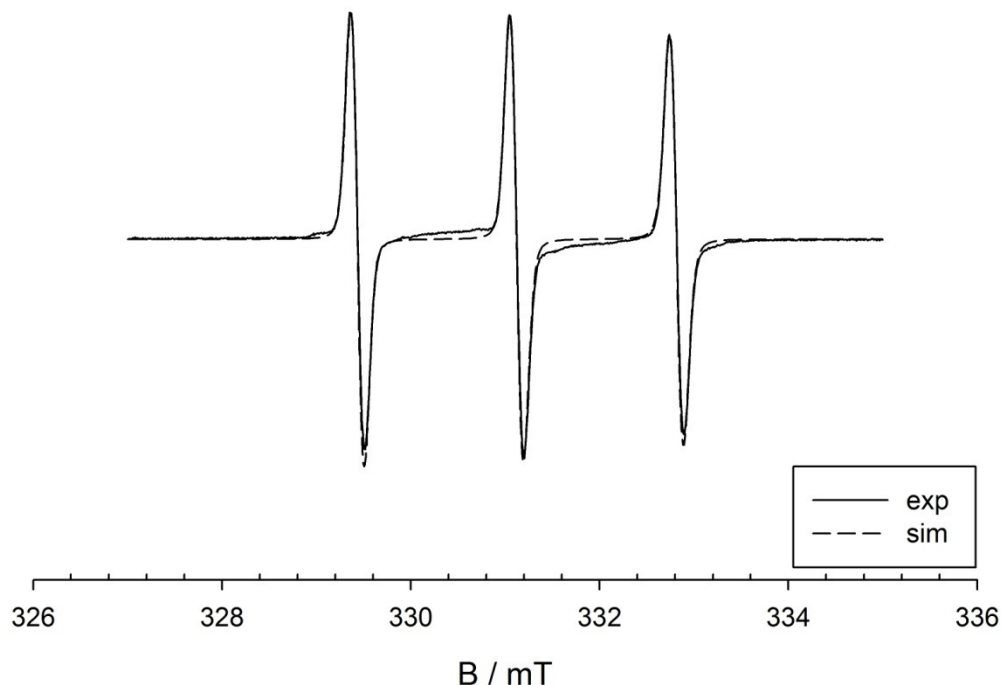
3.2. Molekulska dinamika na površini vezikula AOT tijekom polimerizacije anilna

Guo i suradnici [7] su fluorescencijskom spektroskopijom ispitali mogućnost interakcije vezikula AOT s reaktantima u procesu polimerizacije anilina. Pri tome su koristili fluorescentnu oznaku 6-*p*-toluidinil-6-naftalensulfonat (TNS) koja se ugrađuje u hidrofobni dio vezikula. Iz promjene intenziteta fluorescencije može se zaključiti o promjeni polarosti u okolini TNS molekule. Ovom metodom autori su zaključili da se HRPC veže na površini vezikule AOT, no da pri tome ne dolazi do promjene u strukturi samog enzima [7].

Metodom EPR spektroskopije uz spinski označene vezikule AOT može se također istražiti promjena polarosti i/ili dinamike u sustavu tijekom polimerizacije anilina. U tu su svrhu vezikule AOT označene tempil-oktanoatom (slika 1.16), spinskom oznakom koja se hidrofobnim lancem ugrađuje u hidrofobni površinski sloj vezikula. Pri tome je polarna glava, koju čini paramagnetski dio molekule, neposredno izložena na površini AOT vezikule. Svojstva površine vezikula AOT promatrana su u prisutnosti svakog od reaktanata ponaosob, te u njihovim kombinacijama. Analiza EPR spektara provedena je simulacijom eksperimentalnih spektara programima „*garlic*“ i „*chili*“ EasySpin programskog paketa [138]. Budući da u literaturi nisu navedene vrijednosti glavnih komponenti tenzora spinske oznake tempil-oktanoata, u računu su pretpostavljene slijedeće početne vrijednosti tenzora: $g_{xx}=2,0099$, $g_{yy}=2,0099$ i $g_{zz}=2,0024$, odnosno $A_{xx}=0,53$ mT, $A_{yy}=0,7$ mT i $A_{zz}=3,5$ mT. Te vrijednosti objavljene su za spinsku probu tempil-stearat [139].

Na slici 3.4. prikazani su eksperimentalni EPR spektar spinske oznake tempil-oktanoata u 0,1 M otopini NaH₂PO₄ te njegova najbolja simulacija dobivena „*garlic*“ računalnim programom. U tablici 3.1. navedene su numeričke vrijednosti parametara simulacije koje najbolje reproduciraju eksperimentalne podatke. Može se primijetiti da EPR spektar tempil-oktanoata karakteriziraju tri uske linije koje su posljedica brzog izotropnog gibanja spinske oznake uz rotacijsko korelacijsko vrijeme $\tau_c \sim 10^{-11}$ s koje dobro opisuje računalni program „*garlic*“. EPR spektar spinski označenih vezikula AOT tempil-oktanoatom kao i EPR spektar u početku reakcije polimerizacije prikazani su na slici 3.5. Međutim, za najbolju teorijsku simulaciju eksperimentalnih podataka nije bio prikladan računalni program „*garlic*“ jer ovaj uzorak opisuje sporija dinamika spinske oznake što ujedno i dokazuje ugradnju spinske oznake u vezikule. Naime, ugradnjom spinske oznake u vezikule sloboda gibanja spinske oznake je

smanjena i ograničena stupnjevima slobode koje definira prostor u kojem se spinska oznaka nalazi. Eksperimentalni spektri simulirani su računalnim programom „chili“ iz kojega slijedi da

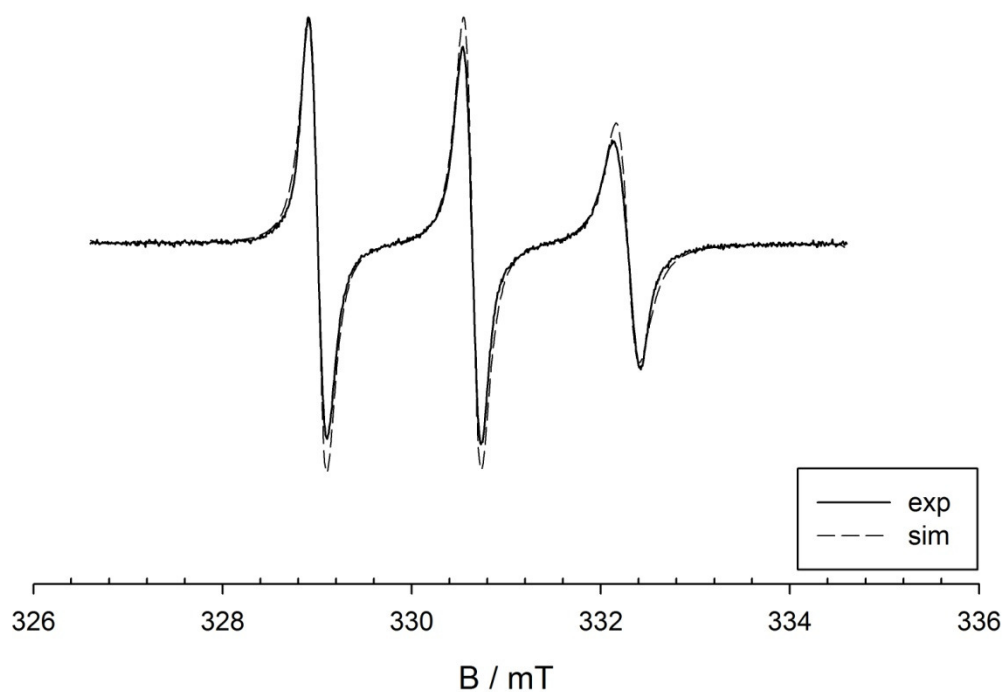


Slika 3.4. EPR spektar spinske oznake tempil-oktanoata u 0,1 M otopini NaH_2PO_4 pH = 4,3. Puna linija predstavlja eksperimentalni spektar, a isprekidana simulaciju programom „garlic“ programskog paketa EasySpin [138]. Simulacije daje vrijednosti koje najbolje opisuju eksperimentalni spektar: $g_{xx}= 2,0099$, $g_{yy} = 2,0061$ i $g_{zz}= 2,0024$, odnosno $A_{xx}= 0,24$ mT, $A_{yy}= 1,03$ mT i $A_{zz}= 3,8$ mT, $\tau_c = 1,995^{-11}$ s.

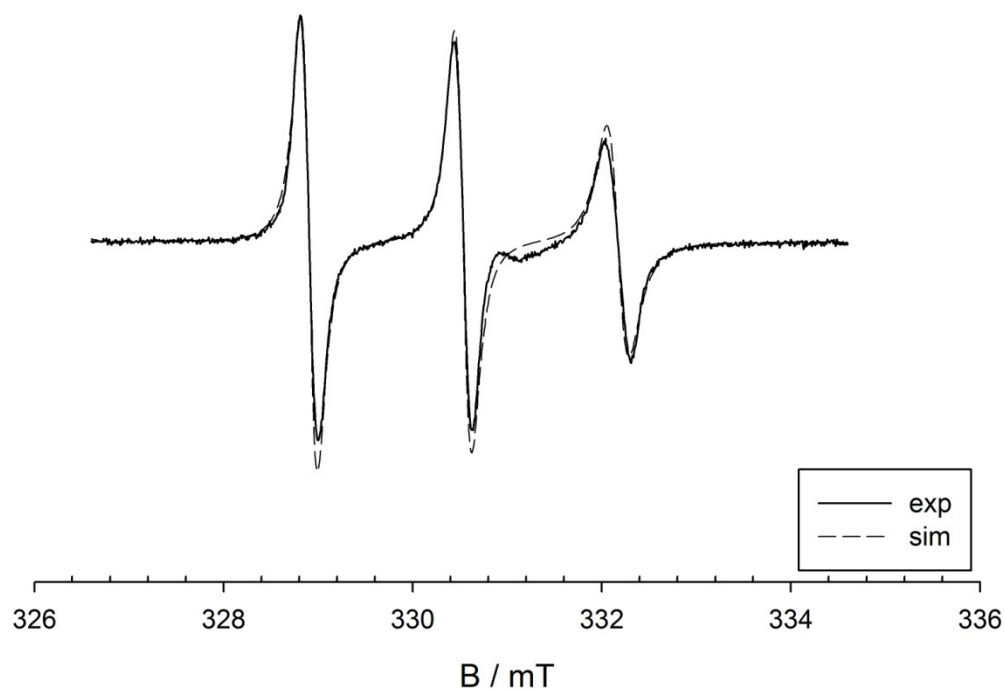
je dinamika spinske oznake, iako još uvijek brza i opisana rotacijskim korelacijskim vremenom $\tau_c \sim 10^{-9}$ s (tablica 3.1.), usporena u odnosu na dinamiku spinske oznake u otopini bez vezikula AOT. Dinamička svojstva spinskih oznaka ugrađenih u vezikule složena su i odražavaju se na širinu linije EPR spektra. EPR linija ne može se opisati jednim oblikom krivulje već se opisuje kombinacijom Gaussove i Lorentzove krivulje. Važno je istaknuti da se širina EPR linije spinske oznake ugrađene u vezikule ne mijenja s obzirom na prisutnost ostalih reaktanata u reakciji polimerizacije, što upućuje na činjenicu da reaktanti ne utječu na gibanja spinske oznake kada je ona ugrađena u vezikule.

Iz podataka dobivenih simulacijom eksperimentalnih EPR spektara spinski označenih vezikula te spinski označenih vezikula u prisutnosti reaktanata izračunata je izotropna konstanta hiperfinog cijepanja a_0 , prema izrazu (1.28). Vrijednost a_0 ne mijenja se i jednaka je kako za

a)



b)



Slika 3.5. Usporedba eksperimentalnih i simuliranih EPR spektara vezikula AOT označenih tempil-oktanoatom (a) te nakon početka reakcije polimerizacije anilina (b). Spektri su normirani na visinu amplitude srednje linije.

samu vezikulu AOT tako i u prisutnosti bilo kojeg od reaktanta, te i tijekom reakcije polimerizacije, i iznosi $a_0 = 1,64$ mT. To je u biti trag tenzora hiperfinog međudjelovanja, koji ako se ne mijenja, upućuje na interperatciju promjena komponenti hiperfinog cijepanja uslijed promjene dinamike a ne polarnosti okoline paramagnetskih centara [140]. Dakle, prisutnost anilina i/ili HRPC utvrđuje se kao dinamički efekt na svojstva hiperfinog cijepanja nitroksilnog radikala, pri čemu se tip gibanja ne mijenja bitno. Ovi rezultati pokazuju kako najvjerojatnije nema nikakve interakcije AOT vezikula s reaktantima.

Tablica 3.1. Numeričke vrijednosti parametara simulacije eksperimentalnih EPR spektara računalnim programima „*garlic*“ i „*chili*“ programskog paketa EasySpin [138]. Širina EPR linije označena je simbolom ΔH_{pp} pri čemu je (1) Gaussov oblik, a (2) Lorentzov oblik linije; A_{ii} označava komponente tenzora hiperfinog cijepanja ($ii = xx, yy, zz$) čija procijenjena pogreška je $\pm 0,05$ mT; a_0 je izotropna vrijednost tenzora A definirana (1.28); logtcorr je logaritam rotacijskog korelacijskog vremena.

Uzorak Parametar	tempil oktanoat	AOT	AOT ¹ anilin	AOT ² HRPC	AOT ³ Anilin HRPC	Reakcija
ΔH_{pp} (1) / mT	0,15	0,09	0,09	0,09	0,12	0,09
ΔH_{pp} (2) / mT	0,04	0,19	0,19	0,20	0,16	0,19
A_{xx} / mT	0,244	0,175	0,125	0,091	0,117	0,264
A_{yy} / mT	1,029	0,983	1,106	1,410	1,352	1,310
A_{zz} / mT	3,817	3,769	3,683	3,377	3,443	3,333
a_0 / mT	1,70	1,64	1,64	1,63	1,64	1,64
logtcorr /log s	-10,7	-9,56	-9,56	-9,50	-9,59	-9,49

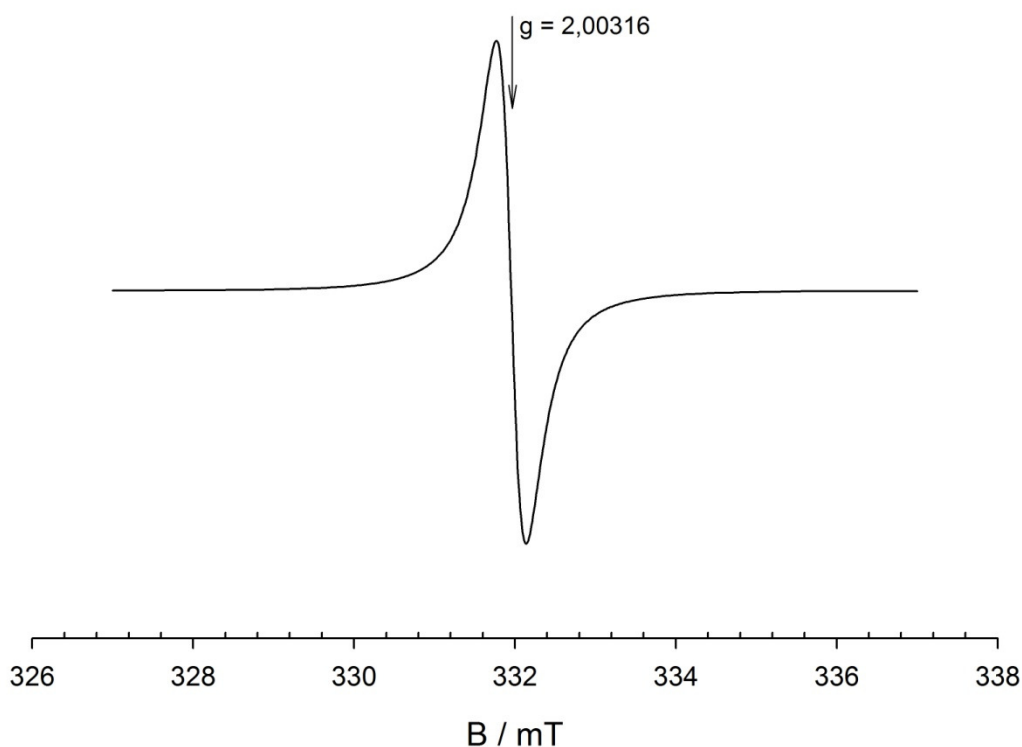
¹ grafički prikaz simulacije eksperimentalnog spektra prikazan je u prilogu, slika 8.1

² grafički prikaz simulacije eksperimentalnog spektra prikazan je u prilogu, slika 8.2

³ grafički prikaz simulacije eksperimentalnog spektra prikazan je u prilogu, slika 8.3

3.3. Usporedba polimera PANI iz različitih reakcija polimerizacije

U drugom dijelu ovog rada ispitana su magnetska svojstva sintetiziranih polianilina šablonskom polimerizacijom u prisutnosti različitih enzima. Uspoređeni su PANI nastali: a) enzimskom šablonskom polimerizacijom peroksidazom iz korijena hrena *Azadirachta indica*, pri čemu se kao oksidans koristio vodikov peroksid (PANI-HRPC-AOT); b) enzimskom šablonskom polimerizacijom lakazom iz gljive *Trametes versicolor* pri čemu se kao oksidans koristio kisik iz zraka (PANI-TvL-AOT); c) sintezom dimera anilina *p*-aminodofenilamina *p*(PADPA) u prisutnosti prethodno navedenih enzima i vezikula AOT: poly(PADPA)-HRPC-AOT i poly(PADPA)-TvL-AOT. Kao standard korišten je komercijalno dostupan polianilin, PANI-ES.



Slika 3.6. EPR spektar PANI-HRPC-AOT pri sobnoj temperaturi. Na slici je strelicom označen g -faktor karakterističnog signala.

Budući da su sintetizirani polimeri paramagnetske molekule, njihovu međusobnu usporedbu moguće je provesti EPR spektroskopijom. Jedan od parametara je spektralna asimertija

definirana izrazom (1.17). Spektralna linija paramagnetskih centara u vodljivom polianilinu slijedi Dysonov oblik krivulje zbog doprinosa udjela disperzijskog dijela signal pored dominantnog apsorpcijskog dijela signala i različita je za različite uzorke (slika 3.6., tablica 3.2). Za sve PANI određeni su također karakteristični EPR parametri: koncentracija spinova, g -faktor, širina linije ΔH_{pp} te parametar asimetrije, α (tablica 3.2). Usporedbom koncentracija spinova vidi se da je koncentracija nastalih paramagnetskih centara u svim uzorcima istoga reda veličine, no najvišu koncentraciju ima PANI-HRPC-AOT. U odnosu na sve proučavane polianiline može se primijetiti da PANI-ES ima najmanju širinu EPR spektralne linije, no najveći parametar asimetrije α . Odstupanje g -faktora od vrijednosti za slobodni elektron, $g_e = 2,0023$ ovisi o prirodi i simetriji spinskih orbitala nesparenih elektrona te o veličini spin-staza interakcije. Vidi se da u svim uzorcima g -faktor odstupa od vrijednosti g -faktora za slobodni elektron (tablica 3.2). Također uočava se i različita širina spektralne linije ΔH_{pp} . Tako npr. na slici 3.7. prikazani su EPR spektri praškastih PANI-HRPC-AOT i PANI-HRPC. Vidljiva je značajna razlika u širini EPR linije pri čemu je širina linije tri puta veća kada je polimerizacija provedena bez AOT šablona.

Tablica 3.2. Karakterisitični EPR parametri različitih PANI uzoraka izmjereni pri sobnoj temperaturi: koncentracija spinova, širina linija EPR spektara ΔH_{pp} , parametar asimetrije α te g -faktor.

Uzorak	Koncentracija spin / g	ΔH_{pp} / mT	α^\ddagger	g -faktor
PANI-ES	$1,29 \times 10^{20}$	0,18	1,36	2,00280*
PANI-HRPC-AOT	$3,36 \times 10^{20}$	0,41	1,09	2,00316
PANI-HRPC	-	1,32	1,21	-
PANI-TvL-AOT	$1,47 \times 10^{20}$	0,28	1,21	2,00313
PANI-TvL	-	0,41 i 0,96	0,83	-
p(PADPA)-HRPC-AOT	$1,61 \times 10^{20}$	0,44	1,09	2,00301
p(PADPA)-TvL-AOT	$1,99 \times 10^{20}$	0,26	1,03	2,00301

*Pogreška je na podvučenoj znamenci +/-5

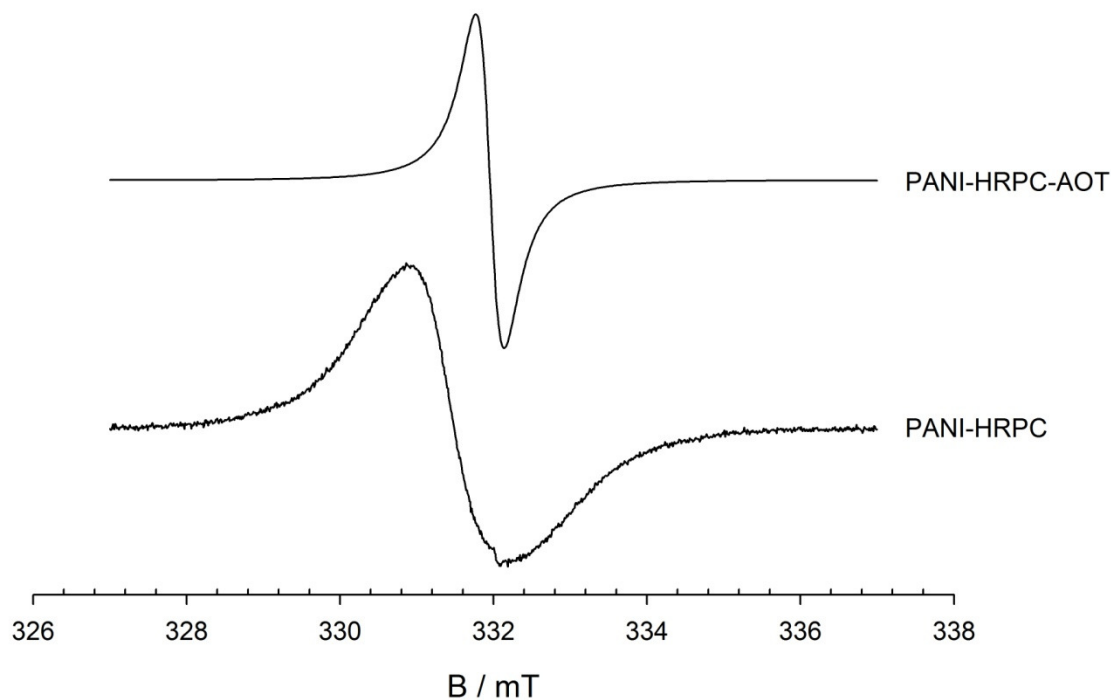
‡ parametar asimetije α računa se prema relaciji (1.17)

Slično opažanje prikazano je na slici 3.8 za spektre PANI-TvL-AOT i PANI-TvL. Dapače, u spektru PANI-TvL razlučene su dvije spektralne linije procijenjenih širina 0,41 mT i 0,96 mT, dok PANI-TvL-AOT ima homogenu liniju širine 0,28 mT.

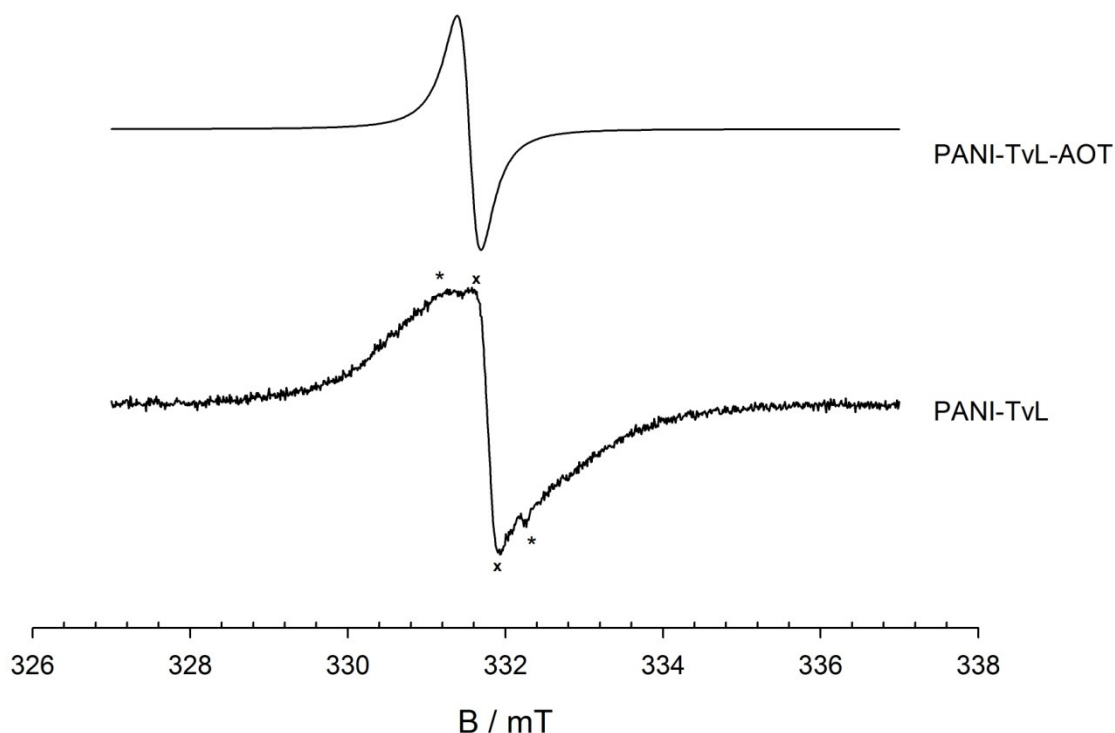
Nastali polimeri su različiti s obzirom na spektralnu asimetriju α , pri čemu je najveća za komercijalni PANI-ES.

Razlika u širini linija EPR spektara posljedica je (ne)homogenosti samih uzoraka. Uzorci sintetizirani u prisutnosti AOT vezikula su uniformi, odnosno dominira jedna vrsta polimera, dok su uzorci sintetizirani bez AOT nehomogeni i pri reakciji nastaju linearni kao i razgranati oblici polimera PANI-ES bogatih *orto*-vezama.

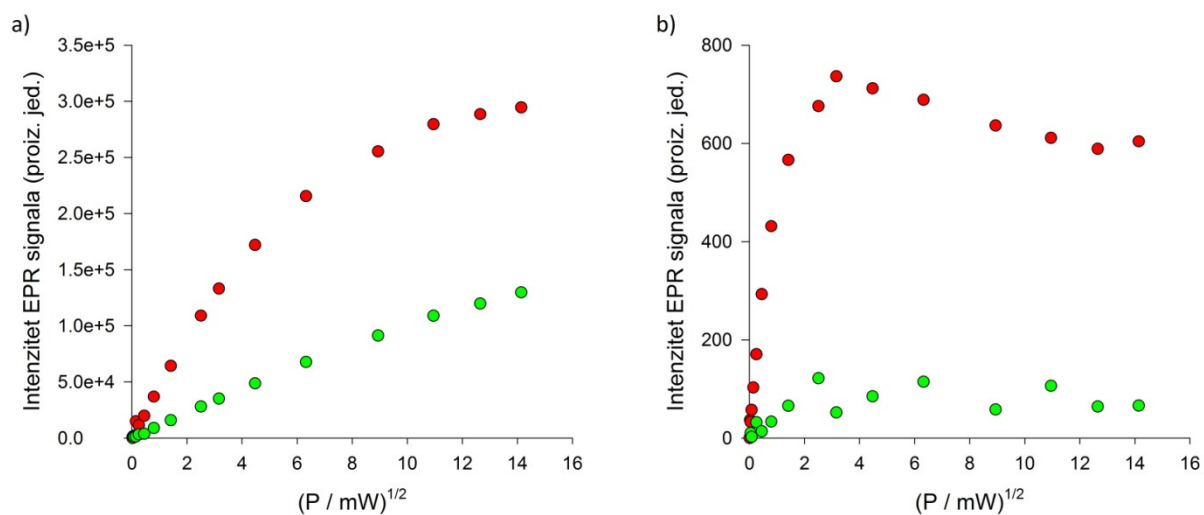
Iz omjera signal-šum na slikama 3.7 i 3.8, vidi se da je intenzitet polianilina sintetiziran bez vezikula AOT znatno niži u odnosu na polianilin nastao šablonskom polimerizacijom, što je posljedica polaronskog oblika polimera koji nastaje u prisutnosti AOT vezikula.



Slika 3.7. EPR spektri praškastih uzoraka PANI-HRPC-AOT i PANI-HRPC. Spektri su normirani na maksimalnu amplitudu signala.



Slika 3.8. EPR spektri praškastih uzorka PANI-TvL-AOT i PANI-TvL. Spektri su normirani na maksimalnu amplitudu signala. Dvije vrste nastalog polimera različitih širina spektralnih linija ΔH_{pp} , označeni su x i *.

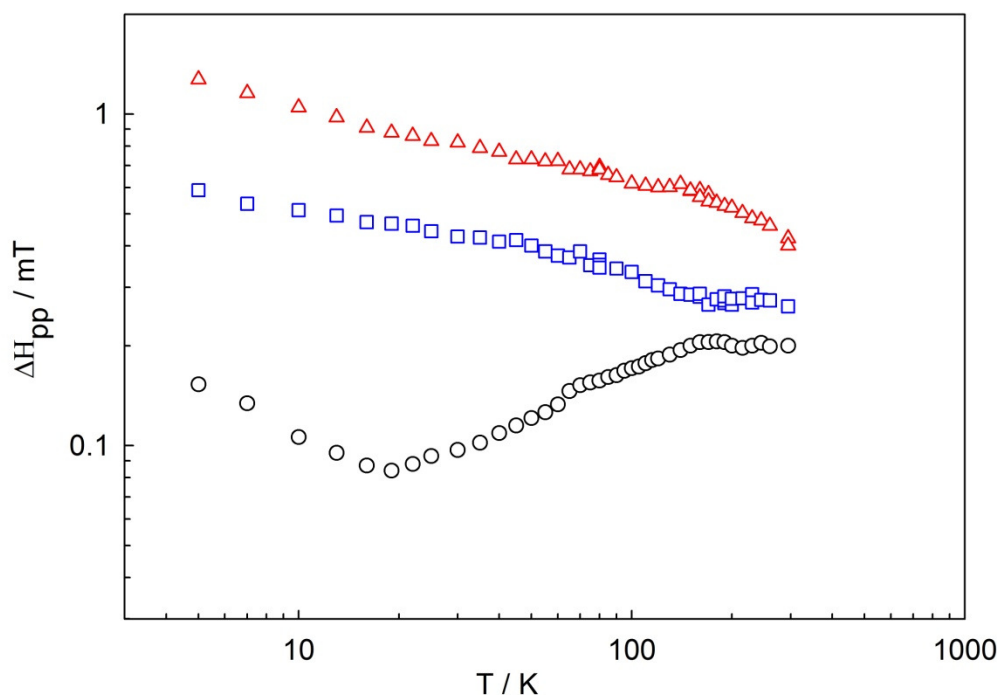


Slika 3.9. Ovisnost intenziteta EPR signala PANI uzorka o snazi mikrovalnog zračenja (P). a) uzorci sintetizirani enzimskom šablonskom polimerizacijom (PANI-HPRC-AOT crveno; PANI-TvL-AOT zeleno); b) uzorci sintetizirani enzimskom polimerizacijom (PANI-HRPC crveno; PANI-TvL zeleno).

Analiza saturacije EPR signala prikazana je na slici 3.9 pri čemu se prati linerna ovisnost intenziteta mjerenog signala o snazi mikrovalnog zračenja. Odsutpanje od te linearnosti odgovara zasićenju promatranog paramagnetskog sustava s obzirom na induciranje rezonantnih prijelaza između energetske razina i omogućuje usporedbu različitih uzoraka s obzirom na spregu magnetskog momenta nesporenog elektrona i njegove okoline [132]. Iz slike 3.9 vidi se kako se PANI nastao polimerizacijom bez prisustva vezikula AOT zasićuje već pri snagama mikrovalnog zračenja, P , manjim od 2 mW. Uzorak PANI-HRPC-AOT zasićuje se pri snagama većim od 5 mW, a uzorak PANI-TvL-AOT ne zasićuje se ni pri snagama od 200 mW. Iz ovoga slijedi da je razlika u zasićenju između uzoraka velika, što upućuje na različitu okolinu/strukturu matrice u kojoj se nalaze paramagnetski centri. Važno je napomenuti, da je u ostalim eksperimentima korištena snaga od $\sim 1 \mu\text{W}$ pri kojoj ne dolazi do saturacije, niti u jednom promatranom uzorku.

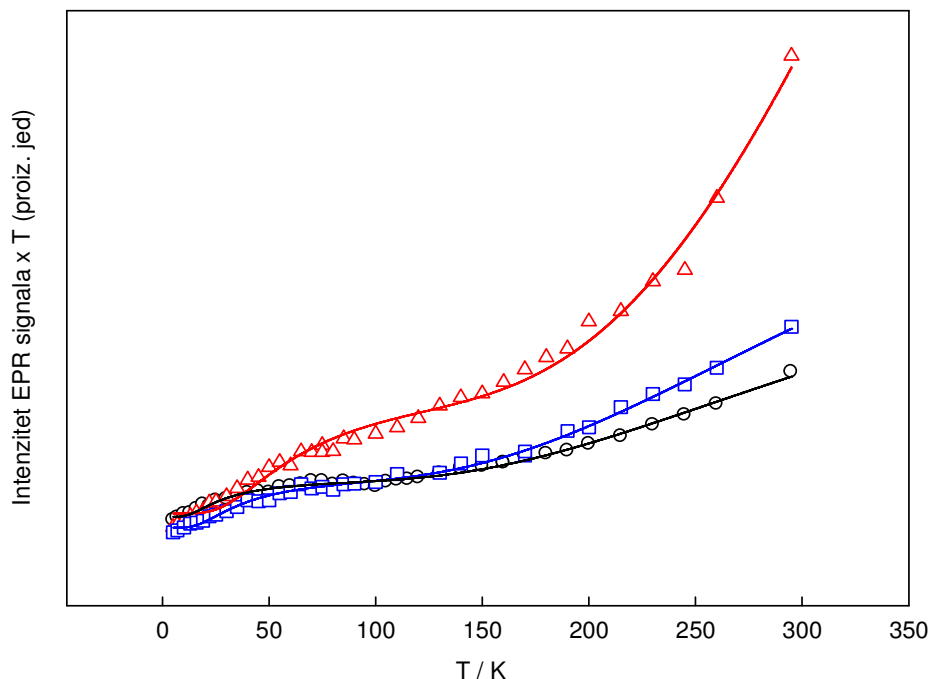
Ovisnost EPR spektara o temperaturi istražena je u području od 5 K do 300 K za uzorke PANI-HRPC-AOT, PANI-TvL-AOT i PANI-ES kako je prikazano na slici 3.10. Može se uočiti da se temperaturna ovisnost širine EPR spektralne linije polianilina sintetiziranog enzimskom šablonskom polimerizacijom razlikuje od one polianilina koji je komercijalno dostupan. Usporedbom širine linija za sva tri polimera može se uočiti da u cijelom temperaturnom području spektralne linije uzoraka PANI-HRPC-AOT i PANI-TvL-AOT imaju veću širinu linije od uzorka PANI-ES.

Također slijedi da se za uzorak PANI-ES mogu primjetiti tri područja temperaturne ovisnosti širine spektralnih linija. Pri niskim temperaturama od 5 K do 20 K dolazi do smanjenja širine spektralne linije s povećanjem temperature. Minimum širine linije opaža se oko 20 K, nakon čega se primjećuje porast širine spektralne linije do temperature od 200 K, kada se opaža maksimum. U temperaturnom području od 200 K do 300 K širina linije EPR spektra približno je neovisna o temperaturi. Nasuprot tomu, širina linije EPR spektara uzoraka PANI-HRPC-AOT i PANI-TvL-AOT u cijelom temperaturnom području od 5 K do 300 K raste sa snižavanjem temperature.



Slika 3.10. Ovisnost širine linije, ΔH_{pp} , EPR spektara različitih PANI uzoraka o temperaturi. Uzorci su označeni na slijedeći način: PANI-ES crnim krugovima; PANI-HRPC-AOT crvenim trokutima, a PANI-TvL-AOT plavim kvadratima.

Ovisnost intenziteta EPR signala uzorka PANI-HRPC-AOT, PANI-TvL-AOT te PANI-ES o temperaturi za sva tri uzorka pokazuje rast intenziteta signala s padom temperature. Međutim, kako se uočava sličnost prikazane temperaturne ovisnosti za sva tri uzorka, taj se pristup nije pokazao dovoljno osjetljivim za utvrđivanje razlika između uzoraka. Budući da je intenzitet EPR signala proporcionalan magnetskoj susceptibilnosti [132], može se analizirati s obzirom na jednostavan model opisan Curiejevim zakonom na način definiran izrazom (1.21). Taj pristup pretpostavlja međudjelovanje paramagnetstkih centara lokaliziranih spinova i rezultira linearnom ovisnošću EPR signala o temperaturi. Zbog toga je grafički prikazana ovisnost umnoška temperature i intenziteta EPR linija o temperaturi na slici 3.11. koja slijedi način uobičajen u razmatranju vodljivih polimera. Ovakav prikaz upućuje na odstupanje od jednostavnog Curiejeva zakona.



Slika 3.11. Ovisnost intenziteta EPR signala o temperaturi. Uzorci polimera označeni su sljedećim simbolima: PANI-ES crnim krugovima, PANI-HRPC-AOT crvenim trokutima, a PANI-TvL-AOT plavim kvadratima. Puna linija predstavlja simulaciju eksperimentalnih podataka prema relaciji (3.1).

Iz slike 3.11. jasno se razlučuju sva tri uzorka u području visokih temperatura dok su pri temperaturama ispod 50 K sva tri polimera praktički identična. Budući da jednostavnim Curievjevim zakonom nije moguće opisati eksperimentalne rezultate, primijenjen je složeniji model koji uzima u obzir i međudjelovanje samih polarona, a temelji se na izrazu (1.23) koji uzima u obzir samo prva tri člana.

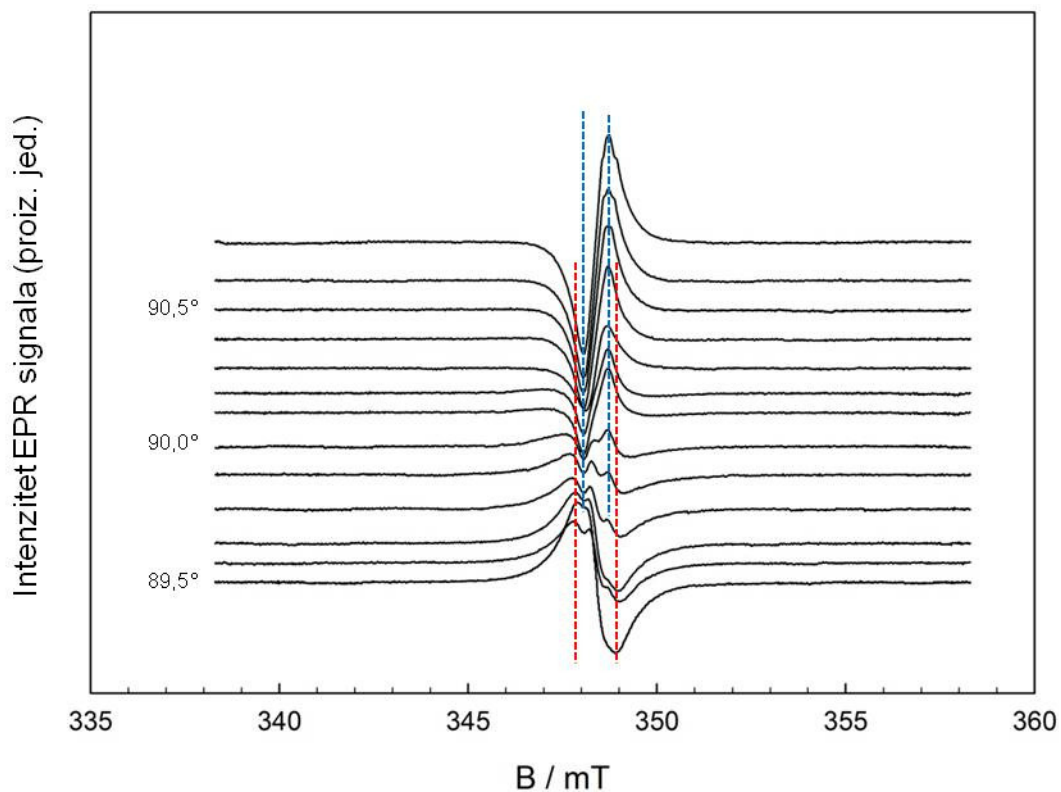
$$\chi T = C_0 + 4C_1 / \left(3 + \exp\left(\frac{J_1}{k_B T}\right)\right) + 4C_2 / \left(3 + \exp\left(\frac{J_2}{k_B T}\right)\right) \quad (3.1)$$

Pune linije na slici 3.11. predstavljaju simulaciju eksperimentalnih podataka prema izrazu (3.1) i vidimo da dobro reproduciraju izmjerene podatke. Vrijednosti parametara dobivenim ovim modelom prikazane su u tablici 3.3.

Tablica 3.3. Paramteri simulacije eksperimentalnih podataka prema modelu opisanim izrazom (3.1). J opisuje međudjelovanje polarona izmjene.

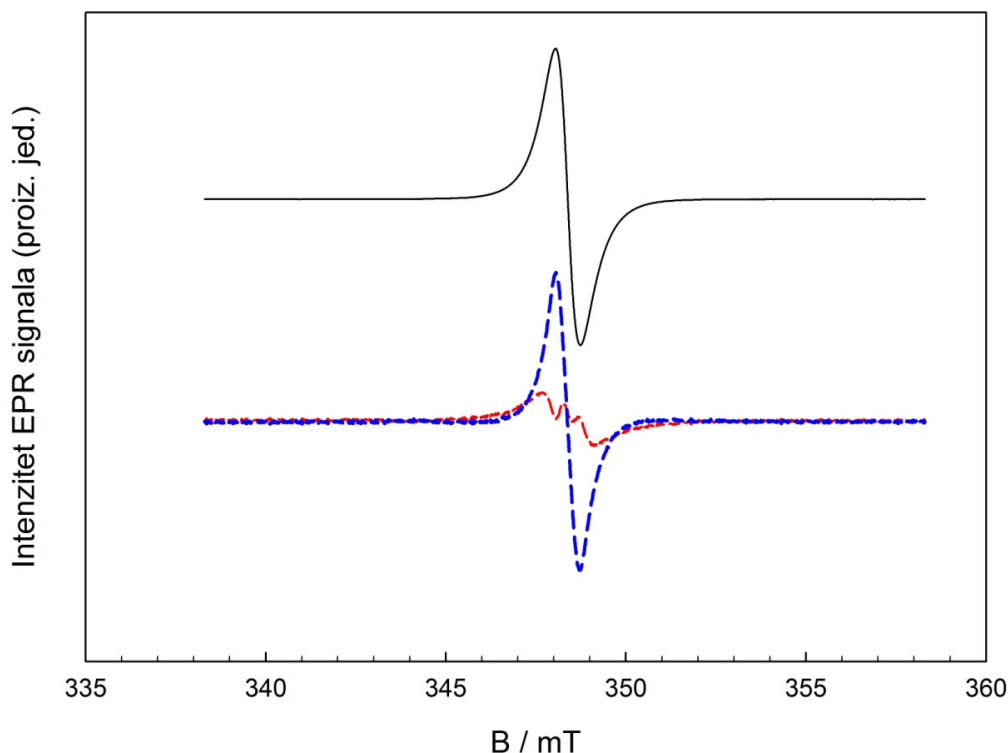
Uzorak	J_1 / K	J_2 / K
PANI-ES	52±4	744±24
PANI-HRPC-AOT	123±10	1133±67
PANI-TvL-AOT	70±6	752±26
poly(PADPA)-TvL-AOT	22±3	108±5

Može se uočiti da je uzorak PANI-HRPC-AOT opisan najvećim vrijednostima energije međudjelovanja izmjene koje su za barem faktor dva veće u odnosu na druge uzorke. Za polimer sintetiziran lakazom, poly(PADPA)-TvL-AOT, a gdje je kao monomer korišten *p*-aminodifenilamin umjesto anilina, vrijednosti J_1 i J_2 smanjuju se dodatno za više od tri puta. Razlike u ovim vrijednostima energije međudjelovanja upućuje na različitost distribucije polarona s obzirom na strukturu polimera. U prethodnim istraživanjima uočeno je da se pri niskim temperaturama EPR spektar uzorka PANI može razložiti na najmanje dva tipa linija [93, 141], koje odgovaraju različitim paramagnetskim centrima. Na tom tragu u ovom doktorskom radu primjenjena je metoda snimanja signala u / izvan faze modulacije magnetskog polja [142] kojom je provedena analiza EPR spektra uzorka PANI-TvL-AOT pri 5 K. Spektri su snimani izvan faze modulacije magnetskog polja kako je prikazano na slici 3.12. Faza je mijenjana u malim koracima od $0,1^\circ$ kako bi se uočile male promjene signala. Tom su metodom uočene i razlučene dvije komponente s obzirom na različite širine spektralnih linija, što upućuje na postojanje barem dviju različitih grupa paramagnetskih centara u uzorku koje je moguće u potpunosti razlučiti kako je prikazano na slici 3.13.



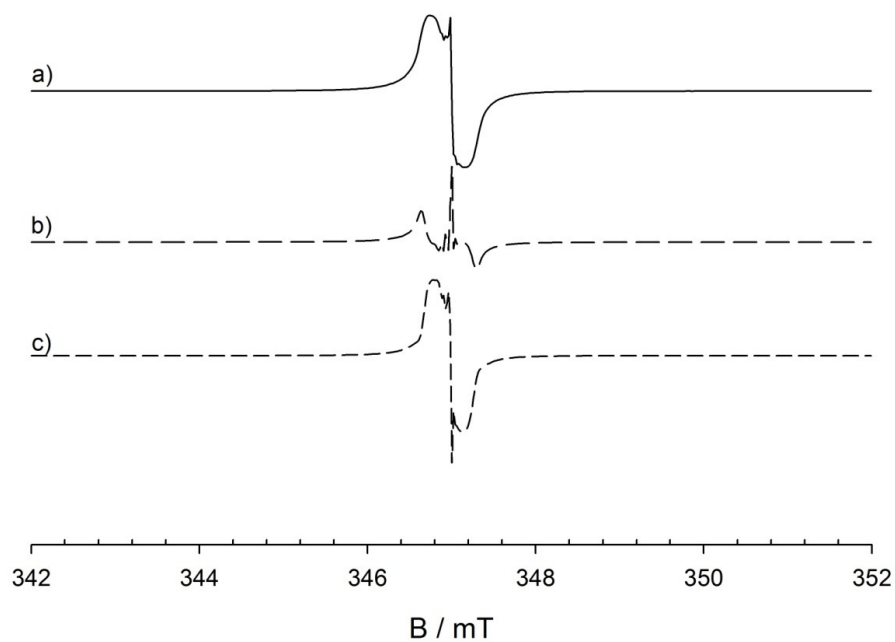
Slika 3.12. EPR spektri uzorka PANI-TvL-AOT snimljeni pri 5 K pri fazama modulacije magnetskog polja mijenjanim u intervalu od $89,5^\circ$ do $90,5^\circ$ u koracima od $0,1^\circ$. Crvenom i plavom bojom označena su cijepanja dviju komponenti.

Na slici 3.13. prikazan je EPR spektar PANI-TvL-AOT pri 5 K, te njegove dvije komponente dobivene metodom snimanja u / izvan faze modulacije magnetskog polja.

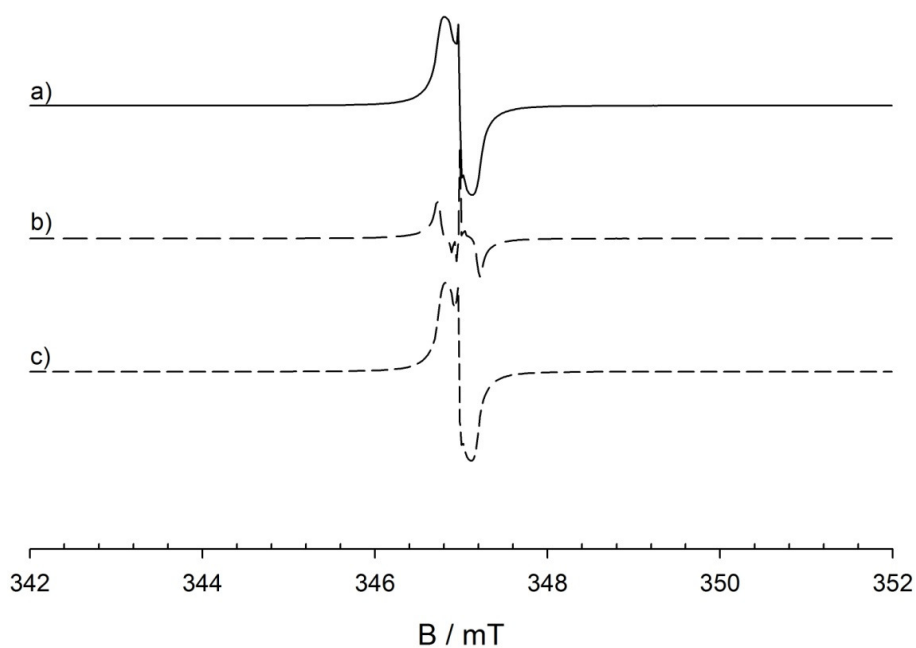


Slika 3.13. EPR signal uzorka PANI-TvL-AOT snimljen pri 5 K (crno) razložen na dvije spektralne komponente; crvenom bojom označena je komponenta snimljena izvan faze modulacije magnetskog polja, a plavom spektar dobiven oduzimanjem eksperimentalnog spektra od spektra snimljenog izvan faze.

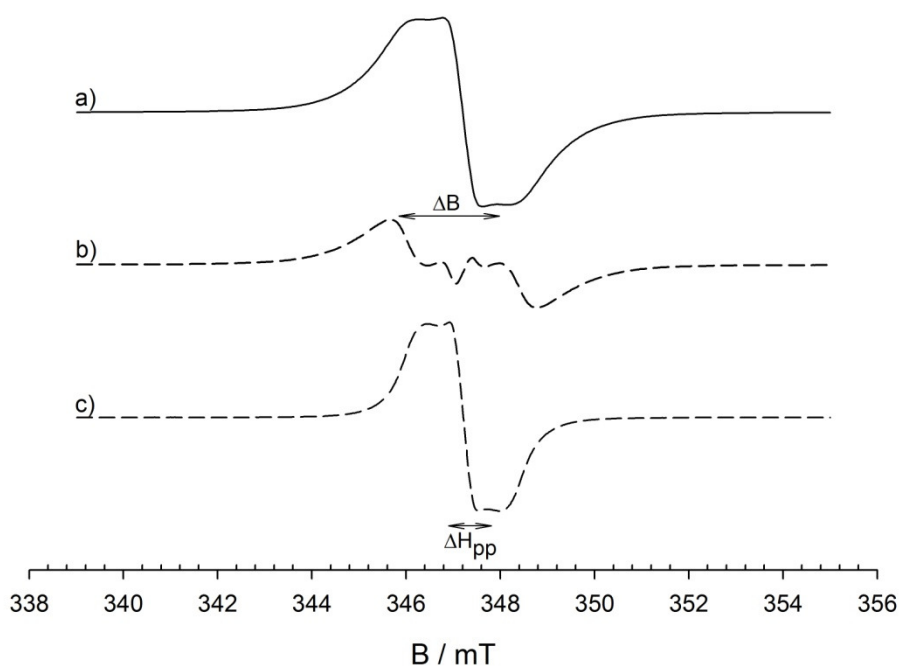
Zagrijavanjem uzorka iznad 5 K za sva tri PANI uzorka uočava se nejednako nestajanje spektralnih komponenti, što je iskorišteno kao jednostavan način razlaganja EPR spektara na spektralne komponente. Interpretacija tih komponenti upućuju na postojanje različitih paramagnetskih centara u uzorcima. Tako je, na primjer, EPR spektar PANI-ES pri 5 K (slika 3.14) složeni spektar, u kojemu se ističu dvije komponente. Utvrđeno je da se dio spektra, opisan širokom linijom, smanjuje s porastom temperature, dok istodobno uska centralna linija postaje još uža s porastom temperature. To opažanje, potvrđuje da EPR spektri PANI sadržavaju minimalno dvije komponente, koje ćemo nazvati RC_1 i RC_2 . Oduzimanjem EPR spektra snimljenog izvan faze modulacije magnetskog polja pri višoj temperaturi (7 K) od spektra snimljenog u fazi pri nižoj temperaturi (5 K) procjenjuje se spektralna komponenta koja ima dvije približno simetrične linije, RC_1 , te uz drugu komponentu, RC_2 , doprinosi ukupnom signalu u fazi pri 5 K (slika 3.14). S obzirom na to da se porastom temperature intenzitet pojedinih komponenti različito mijenja (slika 3.15), slijedi da ta dva dominantna paramagnetska centra imaju različitu lokalnu dinamiku. Prva komponenta brzo nestaje s porastom temperaturom te je ovakvu analizu moguće provesti samo do 35 K.



Slika 3.14. Razlaganje EPR signala PANI-ES snimljenog pri 5 K na dvije komponente: a) eksperimentalni spektar snimljen u fazi; b) spektar dobiven oduzimanjem spektra snimljenog pri 7 K izvan faze od spektra snimljenog u fazi pri 5 K; c) rezultat oduzimanja spektra b) od spektra a)

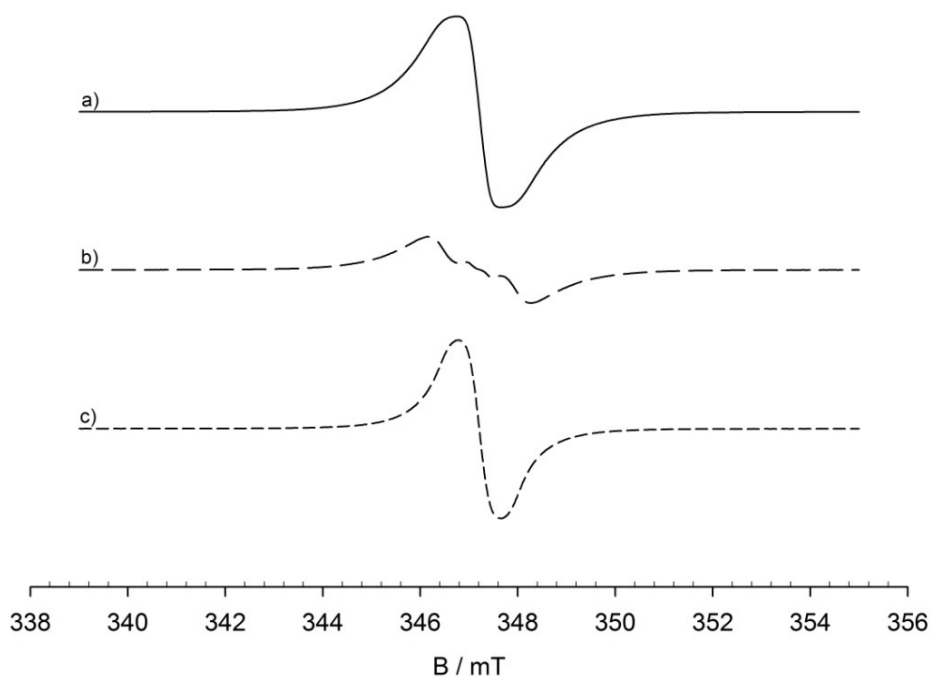


Slika 3.15. Razlaganje EPR signala PANI-ES snimljenog pri 13 K na dvije komponente: a) eksperimentalni spektar snimljen u fazi; b) spektar dobiven oduzimanjem spektra snimljenog pri 15 K izvan faze od spektra snimljenog u fazi pri 13 K; c) rezultat oduzimanja spektra b) od spektra a)



Slika 3.16. Razlaganje EPR signala PANI-HRPC-AOT snimljenog pri 5 K na dvije komponente: a) eksperimentalni spektar snimljen u fazi; b) spektar dobiven oduzimanjem spektra snimljenog pri 7 K izvan faze od spektra snimljenog u fazi pri 5 K; c) rezultat oduzimanja spektra b) od spektra a). Strelica iznad spektra b) prikazuje spektralno cijepanje ΔB , dok strelica ispod spektra c) prikazuje širinu linije ΔH_{pp} .

Na sličan način može se provesti analiza za polimere nastale enzimskom šablonskom polimerizacijom PANI-HRPC-AOT (slike 3.16 i 3.17) čiji su EPR spektri znatno širi nego li spektri PANI-ES. Na razlučenim komponentama spektra RC_1 i RC_2 moguće je definirati parametar spektralnog cijepanja ΔB i širinu linije ΔH_{pp} .



Slika 3.17. Razlaganje EPR signala PANI-HRPC-AOT snimljenog pri 13 K na dvije komponente: a) eksperimentalni spektar snimljen u fazi; b) spektar dobiven oduzimanjem spektra snimljenog pri 15 K izvan faze od spektra snimljenog u fazi pri 13 K; c) rezultat oduzimanja spektra b) od spektra a).

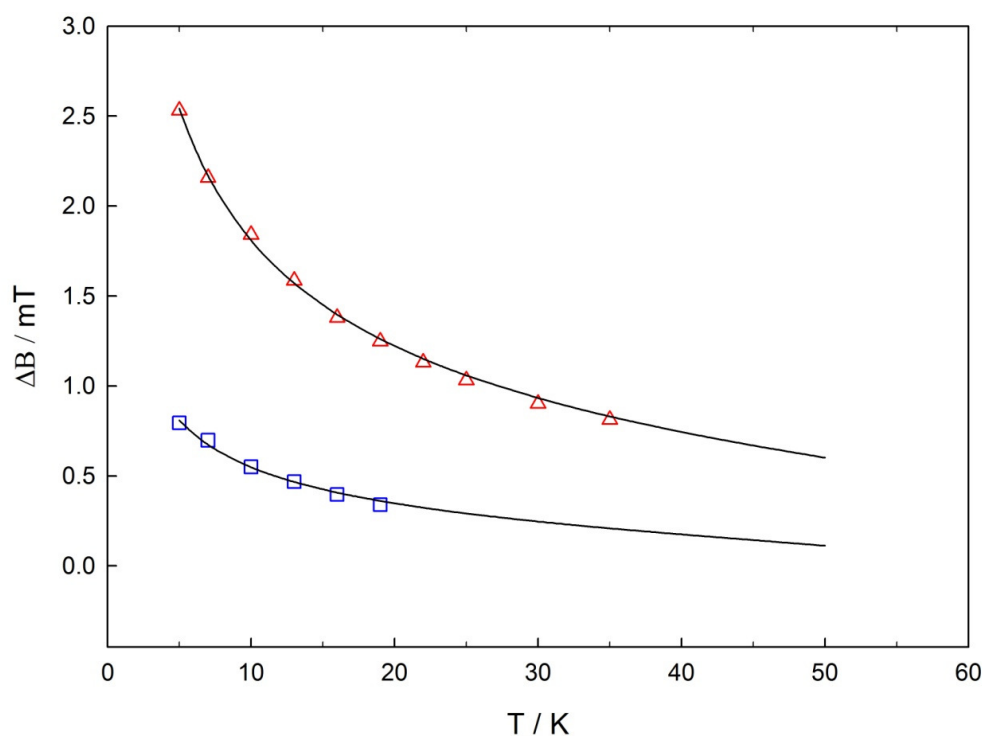
Temperaturne ovisnosti parametara spektralnog cijepanja, ΔB , (slika 3.18) i širine linije, ΔH_{pp} , (slika 3.19) analizirane su u temperaturnom intervalu od 5 do 35 K. Može se uočiti da se ΔB smanjuje s porastom temperature. Eksperimentalni podaci prikazani na slici 3.18 mogu se dobro simulirati pretpostavljajući spajanje dviju linija uslijed termički aktiviranog procesa opisanog korelacijskim vremenom τ kako ga definira izraz (1.31) u granici spore dinamike. Spektralno cijepanje dano je izrazom [132]:

$$\Delta B = [(\Delta B_0)^2 - 2(\gamma\tau)^{-2}]^{1/2}; \quad \gamma = \frac{e}{2m_e} \quad (3.2)$$

pri čemu prvi član ΔB_0 predstavlja doprinos koji ne ovisi o energiji aktivacije, a drugi član je termički aktiviran proces. U ovom slučaju vrijedi konceptualni pristup:

$$\Delta B_0 = konst * \frac{1}{r^3}; \quad (3.3)$$

Parametri dobiveni ovakvim pristupom dani su u tablici 3.4. Iz parametra ΔB_0 izrazom (3.3) procijenjene su udaljenosti između lanaca polimera (r).

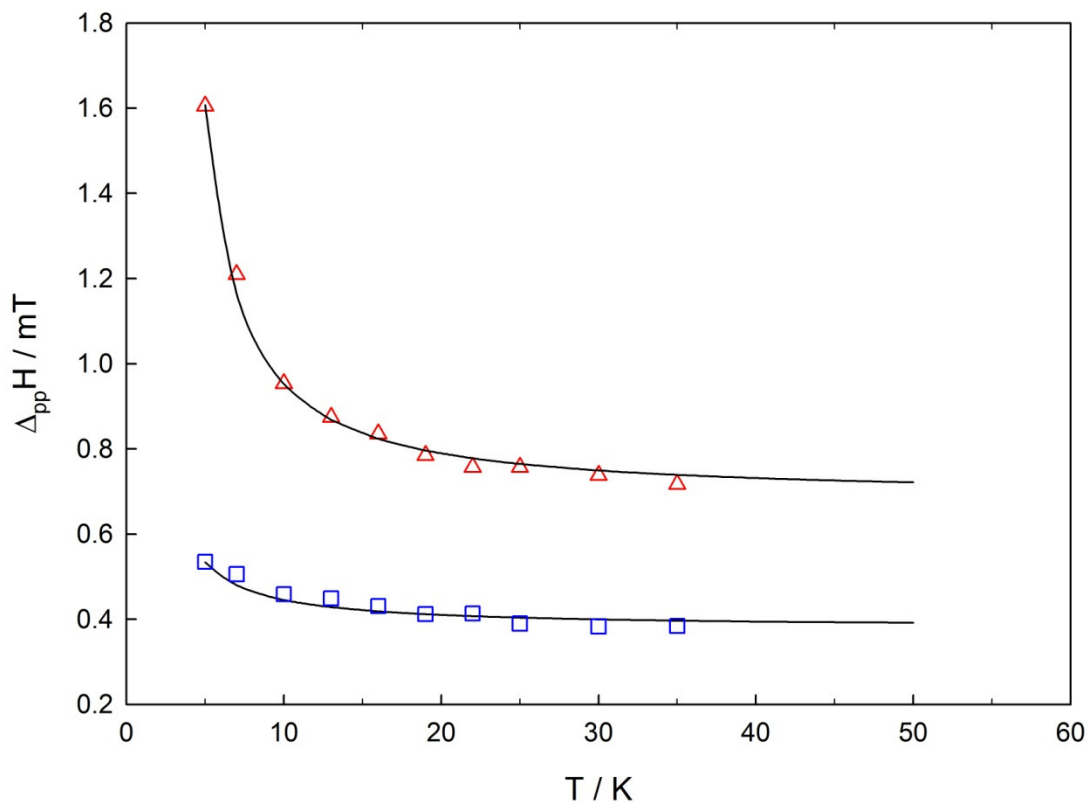


Slika 3.18. Temperaturna ovisnost parametara spektralnog cijepanja ΔB uzoraka PANI-HRPC-AOT (crveni trokuti) i PANI-TvL-AOT (plavi kvadrati). Linije predstavljaju najbolju simulaciju eksperimentalnih podataka izrazom (3.2) uz parametre navedene u tablici 3.4.

Na slici 3.19. prikazana je ovisnost širine linije o temperaturi iz koje se vidi kako širina linije pada s porastom temperature. Za simulaciju eksperimentalnih podataka korišten je izraz (3.4) [132] koji opisuje sužavanje linije pretpostavljajući brzu molekulska dinamiku prema relaciji

$$\Delta H_{pp} = \Delta H_{pp0} + c\tau \quad (3.4)$$

pri čemu je ΔH_{pp0} širina linije za ($\tau \rightarrow 0$), a c konstanta proporcionalnosti. Budući da korelacijsko vrijeme ovisi o energiji aktivacije, ΔE , prema izrazu (1.31), iste su izračunate iz relacija (3.2) i (3.4) te prikazane u tablici 3.4.



Slika 3.19. Temperaturna ovisnost širine linije PANI-HRPC-AOT (trokuti) i PANI-TvL-AOT (kvadrati). Linije predstavljaju simulaciju eksperimentalnih podatka izrazom (3.3) uz parametre navedene u tablici 3.4

Može se uočiti da je udaljenost lanaca u polianilinu sintetiziranom enzimskom šablonskom polimerizacijom PANI-HRPC-AOT i PANI-TvL-AOT veća nego udaljenost lanaca u PANI-ES iz kemijske sinteze [143]. Sukladno razlikama u udaljenosti lanaca vidljiva je razlika u aktivacijskim energijama.

Tablica 3.4. Parametri dobiveni simulacijom eksperimentalnih podataka (slika 3.19. i 3.20.) izrazima (3.2) i (3.4)^x.

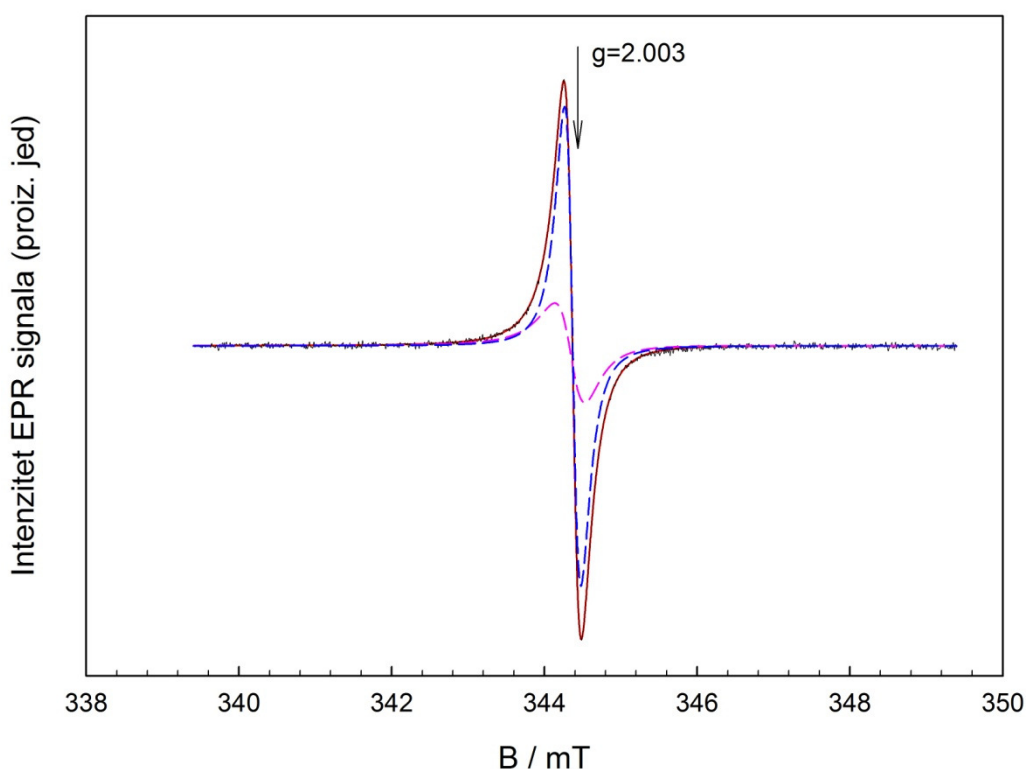
Parmagnetski centar	$\Delta B_0 / \text{mT}$	$\Delta H_{pp0} / \text{mT}$	$\Delta E / \text{K}$	τ_0 / ns	r / nm
RC ₁ PANI-HRPC-AOT	$5,2 \pm 0,3$		$0,78 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,3$	$0,93 \pm 0,02$
RC ₂ PANI-HRPC-AOT		0,5	4,76		
RC ₁ PANI-TvL-AOT	$4,8 \pm 0,5$		$0,08 \pm 0,03$	$1,7 \pm 0,5$	$0,96 \pm 0,03$
RC ₂ PANI-TvL-AOT	3,287	0,244	3,67		0,79
RC ₁ Poly(PDPA)-TvL-AOT	1,974	0,389			$0,88 \pm 0,06$
RC ₂ Poly(PDPA)-TvL-AOT	2,796	0,210			$0,79 \pm 0,02$
RC ₂ PANI-ES		0,068	$\sim (5,6 - 90)$		$0,57-0,70^*$

* preuzeto iz [143]

^x Račun i simuliranje prema izrazima (3.1) (3.2) i (3.3) proveo je dr. sc. Boris Rakvin.

3.4. Usporedba EPR mjerenja provedenih pri različitim frekvencijama

U prethodnim poglavljima prikazani su EPR spektri različitih PANI uzoraka snimljeni pri frekvenciji od 9,5 GHz koji upućuje na Dysonov oblik spektralne linije, koji je karakterističan za vodljive polimere, a mogu se razložiti na barem dvije različite komponente (slike 3.14 - 3.17).



Slika 3.20. EPR spektar poly(PADPA)-TvL-AOT snimljen pri 9,5 GHz i sobnoj temperaturi. Crna linija predstavlja eksperimentalni spektar, a crvena puna linija njegovu simulaciju izrazom (3.5) uz vrijednosti prikazane u tablici 3.5. Isprekidanim linijama prikazane su dvije spektralne komponente koje opisuje izraz (3.5).

Tako npr. EPR spektar uzorka poly(PADPA)-TvL-AOT, snimljen pri 9,5 GHz (slika 3.20), može se razložiti na dvije komponente pretpostavljajući Lorentzov oblik linije [144]

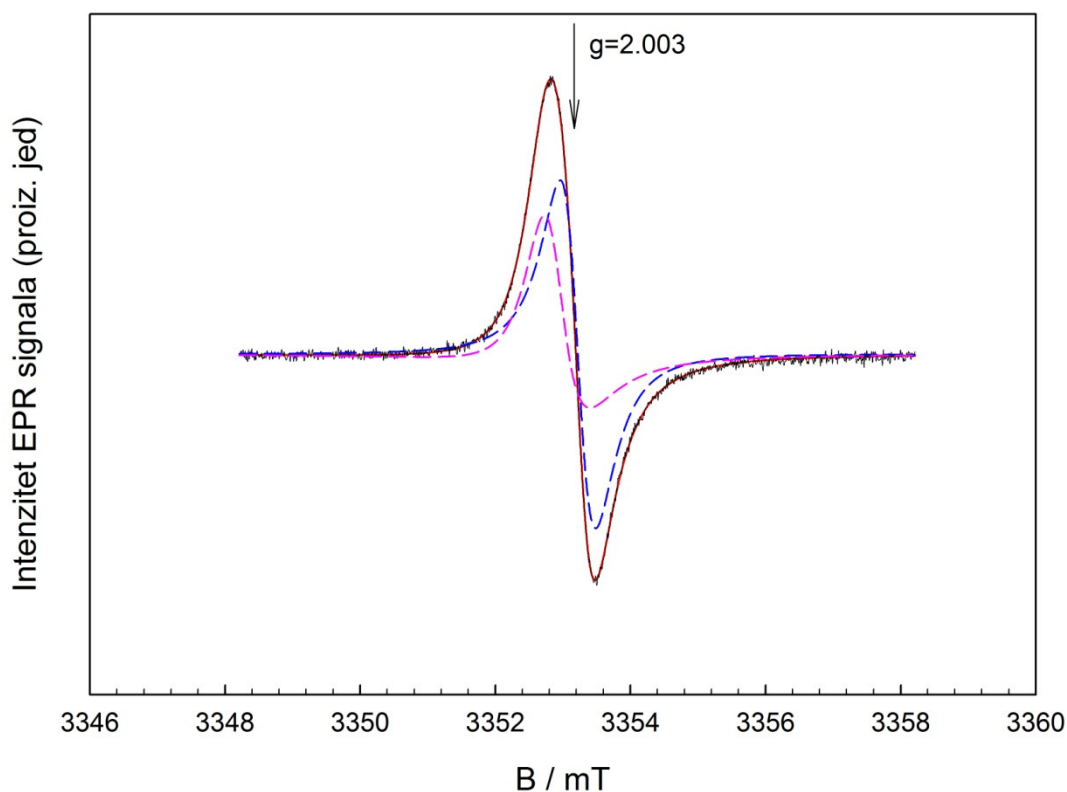
$$Y' = A \frac{2x}{(1+x^2)^2} + D \frac{1-x^2}{(1+x^2)^2}; \quad x = \frac{2(B-B_0)}{\sqrt{3}\Delta H_{pp}} \quad (3.5)$$

Koeficijenti A i D odgovaraju odnosu amplituda Dysonova spektra, α , definiranog izrazom (1.17) na sljedeći način:

$$\alpha = 1 + 1,45 D/A \quad (3.6)$$

Prikazana EPR spektralna linija na izgled je centrirana pri $g = 2,00301$ (slika 3.20), ali razlaganjem prema izrazu (3.4) može se rastaviti na dvije komponente različitih g -faktora 2,00301 i 2,00299 koje pripisujemo dvama paramagnetskim centrima RC_1 i RC_2 (tablica 3.5). Te komponente pokazuju različite širine spektralnih linija različite spektralne asimetrije, pri čemu je omjer komponenti u EPR spektru procijenjen na $RC_1 / RC_2 = 1,5$. Ovim pristupom u uzorcima PANI-TvL-AOT i PANI-ES uočena je dominantna komponenta koju pripisujemo komponenti RC_2 (tablica 3.5)

Za slučaj EPR spektra uzorka p(PADPA)-TvL-AOT prikazanog na slici 3.21, snimljenog pri 10 puta višoj frekvenciji, može se uočiti također Dysonov oblik linije. Simulacija eksperimentalnog spektra prema izrazu (3.5) potvrđuje složenu strukturu spektralne linije koju je lakše razlučiti na dvije komponente jer je širina spektralnih linija gotovo za faktor dva veća u odnosu na EPR spektar snimljen pri nižoj frekvenciji (tablica 3.5). Spektralna asimetrija za paramagnetski centar RC_1 izraženija je pri višoj frekvenciji dok komponenta RC_2 je spektralno simetrična pri obje izmjerene frekvencije. Omjer komponenti u EPR spektru snimljen pri 94 GHz procijenjen je na $RC_1 / RC_2 = 1,8$.



Slika 3.21. EPR spektar poly(PADPA)-TvL-AOT snimljen pri 94 GHz i pri sobnoj temperaturi. Crna linija predstavlja eksperimentalni spektar, a crvena puna linija njegovu simulaciju izrazom (3.5) uz vrijednosti prikazane u tablici 3.5. Isprekidanim linijama prikazane su dvije spektralne komponente koje opisuje izraz (3.5).

Tablica 3.5. EPR spektralne linije snimljene pri dvjema različitim frekvencijama mikrovalnog zračenja analizirane prema izrazu (3.5)^x za različite PANI uzorke. RC₁ i RC₂ označavaju komponente EPR spektra kako je definirano u poglavlju 3.3.

Uzorak	g -faktor	9,5 GHz		94 GHz	
		ΔH_{pp} / mT	α	ΔH_{pp} / mT	α
PANI-TvL-AOT RC ₂	2,0031 $\underline{3}$	0,24 $\underline{8}$	1,145 \pm 0,04	0,61 $\underline{3}$	1,058 \pm 0,03
poly(PADPA)-TvL-AOT RC ₁	2,0030 $\underline{1}$	0,3 $\underline{9}$	1,363 \pm 0,04	0,61 $\underline{1}$	2,494 \pm 0,29
poly(PADPA)-TvL-AOT RC ₂	2,0029 $\underline{9}$	0,21 $\underline{4}$	\sim 1	0,52 $\underline{5}$	\sim 1
PANI-ES RC ₂	2,0028 $\underline{0}$	0,20 $\underline{9}$	1,14 $\underline{8}$	0,24 $\underline{8}$	1,56 $\underline{8}$

*Pogreška je na podvučenoj znamenici +/-5

^x Račun i simuliranje prema izrazima (3.5) proveo je dr. sc. Boris Rakvin.

4. RASPRAVA

U ovom doktorskom radu fokus istraživanja je polimerizacija anilina enzimskom šablonskom polimerizacijom metodom EPR spektroskopije. Ova je spektroskopska metoda uspoređena s UV/Vis spektroskopijom za praćenje tijeka polimerizacije. Potom je praćena dinamika na površini spinski označenih vezikula AOT. Konačno, istražen je produkt polimerizacije, vodljivi polimer, polianilin. Uspoređena su magnetska svojstva i vodljivost polianilina nastalog enzimskom šablonskom polimerizacijom s komercijalno dostupnim polianilinom.

4.1. Kinetika polimerizacije anilina

Ranije studije pokazale su da se tijek sinteze polianilina može pratiti UV/Vis spektroskopijom, što je danas i uobičajena metoda praćenja ove sinteze. Pri enzimskoj polimerizaciji anilina nastaju različiti produkti, koji mogu imati linearnu ili razgranatu strukturu. Struktura nastalih produkata odgovara specifičnim apsorpcijskim maksimuma UV/Vis spektara [6, 78, 80-90]. Kako polianilin u obliku emeraldinske soli ima nespareni elektron, a time i svojstvo paramagnetičnosti, samo njegovo nastajanje može se direktno pratiti metodom EPR spektroskopije. EPR spektroskopija ima niz prednosti u usporedbi s UV/Vis spektroskopijom jer detektira lokalna svojstva u okolini paramagnetskog centra, u strogo definiranom prostoru kemijske reakcije. Tijek polimerizacije anilina podijeljen je u tri faze. Prva, inicijalna, faza traje kratko, do 10 minuta. U inicijalnoj fazi reakcije polimerizacije osim nastanka *para*-N-C veza između monomera, koje daju linearni produkt, nastaje u manjoj količini i razgranati polimer vezan *orto*-; *para*-C-C te C-N vezama. U ovoj fazi sinteze u UV/Vis spektru pojavljuje se apsorpcijski maksimum pri 760 nm (slika 3.1). Taj odgovara nastalom PANI-ES u bipolaronskom obliku [87-89]. Istodobno, promatranjem EPR spektra PANI-HRPC-AOT, uočava se, u toj fazi polimerizacije, mali EPR signal, čija širina spektralne linije iznosi $\Delta H_{pp} = 0,7$ mT (slika 3.2b). U drugoj fazi polimerizacije intenzitet apsorpcije pri 760 nm pada, a raste intenzitet pri ~ 1000 nm (slika 3.1). Objašnjenje ove faze kemijske reakcije je u prelasku polimera iz bipolaronskog oblika u polaronski oblik [128]. EPR spektar slijedi ovu fazu polimerizacije kroz promjenu spektralne linije čija se širina smanjuje i u početku druge faze je $\Delta H_{pp} = 0,4$ mT (slika 3.3a). Prelazak iz prve u drugu fazu polimerizacije odvija se u minutama, a promjene u UV/Vis spektru moguće je dobro je razlučiti [128], dok se u EPR spektrima uočava mali rast intenziteta spektra, uz veliku promjenu širine linije ΔH_{pp} . Nehomogenost u strukturi polimera rezultira širom EPR spektralnom linijom. Kako polimerizacija teče, sve je više linearnog produkta, te se i EPR spektralna linija sužava za skoro faktor dva. Međutim, intenzitet signala ne prati tu dinamiku, jer se prelazak bipolarona u polaronski oblik odvija

sporije, a bipolarone EPR ne detektira, jer nisu paramagnetski. Treću fazu polimerizacije, koja je najduža, prati daljnje snižavanje apsorpcijskog maksimuma pri 760 nm. Širina EPR spektralne linije nastalog polimera je sada $\Delta H_{pp} = 0,2$ mT. Intenzitet linije raste tijekom polimerizacije što odgovara prelasku iz bipolaronske forme polimera u polaronski oblik.

Iz ovih rezultata može se zaključiti da se tijekom polimerizacije anilina može dobro pratiti EPR spektroskopijom, a sve faze mogu korelirati sa standardiziranim promjenama UV/Vis apsorpcijskih maksimuma. Promjena intenziteta EPR linije upućuje na polaronski oblik nastalog polimera, dok je širina spektralne linije ΔH_{pp} dobar parametar za određivanje faze polimerizacije. Slijedi da je u složenim sustavima s monogo reaktanta u reakciji prednost EPR metode u pružanju specifične informacije kao što je pokazano u ovom slučaju polimerizacije anilina, u kojemu detektiramo isključivo preraspodjelu/transformaciju naboja na nastajućem polimernom lancu.

4.2. Molekulska dinamika na površini vezikula tijekom polimerizacije anilina

Poznato je da se enzimskom šablonskom polimerizacijom sintetizira polianilin sa znatno poboljšanim svojstvima, tj. linearni, a ne razgranati polimer veće vodljivosti. U reakciju polimerizacije uvedene su šablone, poput micela [123], sa svrhom optimizacije polimerizacije. Lokalni pH oko šablona niži je nego u reakcijskoj smjesi, te u okolini šablona dolazi do poboljšanja protonacije anilina. U tim uvjetima monomer anilina pozicionira se u orijentaciji koja rezultira linearnim produktom. Razlika pH u reakcijskoj smjesi i pH oko šablone omogućava i veću stabilnost enzima koji se nalazi u reakcijskoj smjesi i kojemu odgovara viši pH. Šablonama se osiguravaju neophodni protuioni za dopiranje, te se održava topljivost nastalog polianilina u vodenim otopinama [58]. Grupa autora predložila je model prema kojemu ioni anilina sa svojim benzenskim dijelom ulaze u hidrofobni dio strukture micela izgrađenih od natrijeva dodceli difeniloksid disulfonata (DODD) [125]. U ovom doktorskom radu, primjenjena je EPR spektroskopija uz spinski označene vezikule. Općenito, spinsko označavanje je prikladna metoda za istraživanje strukturnih, dinamičkih te molekulskih svojstava lipida i proteina, biomembrana ili sintetiziranih vezikula [131]. Zbog mogućnosti, koje ova metoda nudi, odabarana je za istraživanje dinamike na površini vezikula tijekom enzimске šablonske polimerizacije anilina. Vezikula AOT označena je spinskom probom tempil-oktanoatom (slika 1.6), koja se svojim hidrofobnim lancem ugrađuje u strukturu vezikule, a pretpostavlja se da pri tome ne remeti njihovu strukturu. Da bi se osiguralo da je paramagnetski centar spinske oznake ugrađen u vanjski monosloj vezikule, spinsko označavanje provedeno je nakon što su vezikule formirane. EPR spektar slobodne spinske oznake tempil-oktanoata u 0,1 M otopini natrijeva dihidrogenfosfata (slika 3.5.) ima uske spektralne linije koje karakterizira brzo izotropno gibanje. Ugradnjom tempil-oktanoata u vezikule AOT dolazi do usporavanja gibanja spinske oznake (slika 3.6a), te se rotacijsko korelacijsko vrijeme usporava s $\tau_c \sim 10^{-11}$ s na $\tau_c \sim 10^{-9}$ s (tablica 3.1) što potvrđuje ugradnju spinske oznaka u vezikule.

Dinamika na površini vezikula ispitana je u prisutnosti svih reaktanata polimerizacije anilina. Budući da molekula anilina ima hidrofobni dio, a prema literaturnim navodima on ulazi u strukturu šablone [125], istražena je interakcija između molekula AOT i anilina. Omjer koncentracija anilina i molekula AOT u reakcijskoj smjesi bio je sumjerljiv (1,3:1). Analizom snimljenog EPR spektra računalnim programima utvrđeno je da se rotacijsko korelacijsko

vrijeme tempil-oktanoata ugrađenog u vezikule AOT ne mijenja u prisustnosti anilina (tablica 3.1). Kako se i vrijednosti tenzora hiperfinog cijepanja A ne mijenjaju dolazimo do zaključka da se anilin ne ugrađuje u vezikule, niti postoji interakcija sa samom površinom vezikula. Sličan su rezultat dobili fluorescencijskom spektroskopijom Guo i suradnici analizom površine vezikula označenih fluorescentnom probom TNS [7]. Isti autori istražili su dolazi li do interakcije enzima HRPC s površinom vezikula. Kako je već spomenuto, reakcija polimerizacije odvija se u vodenom mediju pri pH 4,3. Pri toj pH vrijednosti površina vezikula ima negativan naboj (slika 1.11a) koji potječe od sulfonske funkcionalne skupine. Budući da je $pI \sim 9$ za HRPC, enzim je pri pH reakciji pozitivno nabijen, te postoji mogućnost vezanja na negativnu funkcionalnu sulfonsku skupinu. Dođe li do tog vezanja, spinska proba bi trebala pokazati promjenu u dinamici gibanja. Iz tablice 3.1. nije vidljiva promjena rotacijskog korelacijskog vremena. Međutim, uočava se promjena komponenti tenzora hiperfinog cijepanja, pri čemu se komponenta A_{zz} izrazito smanjuje. To opažanje upućuje na promjenu gibanja duž $\cdot N-O$ veze i moguću promjenu polarnosti koja bi upućivala na interakciju između vezikula AOT i enzima HRPC. No kako je pri tome trag tenzora hiperfinog cijepanja a_0 jednak i za samu spinsku oznaku tempil-oktanoata i za spinsku oznaku ugrađenu u vezikulu AOT u prisutnosti svakog od reaktanata, zaključak upućuje na dominantni dinamički efekt [140]. Može se zaključiti da su u prisutnosti proteina stupnjevi slobode vezani uz rotacijsku dinamiku spinske probe (paramagnetskog centra) promijenjeni. Paramagnetski centar detektira prisutnost proteina, odnosno njegovo pozicioniranje u blizini površine vezikule, a ne nužno na njezinoj površini. Važno je napomenuti da je u ovim eksperimentima koncentracija enzima u odnosu na AOT molekule bila četiri reda veličine manja, te se s aspekta EPR spektroskopije sama interakcija između HRPC i velikula AOT ne može u potpunosti isključiti. Naime, postoji mogućnost da mali broj molekula spinske oznake detektira vezanje molekula HRPC na vezikule AOT, no u uvjetima eksperimenta promjena njihove dinamike nevidljiva je u ukupnom EPR spektru. Ovakav je rezultat EPR spektroskopije u suprotnosti s rezultatima koje su Guo i suradnici dobili fluorescentnom spektroskopijom [7], koja je podložna mnogim artefaktima za razliku od metode spinskog označavanja. U prilog načinu razmišljanja koje slijedi EPR rezultate mogu ići eksperimenti reakcije enzimske šablonske polimerizacije u prisutnosti enzima TvL, čija je $pI \sim 3,5$, a sama reakcija se odvija se na pH 3,5. Pri ovom pH enzim se nalazi u neutralnom obliku te se ne veže na negativnu sulfonsku skupinu, što znači da vezanje enzima na AOT vezikulu nije nužno za uspješnu enzimsku šablonsku polimerizaciju.

4.3. Usporedba polimera PANI iz različitih reakcija polimerizacije

Porastom interesa za područje nanotehnologije vodljivi polimeri postaju sve zanimljiviji za istraživanje te zauzimaju važno mjesto u području zelene kemije. Potencijalna primjena polianilina u sensorima za različite plinove [105-114], potom u punjivim baterijama [101], solarnim ćelijama [102, 103] te u nanoelektroničkim uređajima [145] upućuju na veliku mogućnost primjene ovog polimera. Vodljivi polimeri nalaze se u polaronskom obliku sa spinom elektrona $S = 1/2$, te se za njihovo istraživanje koristi i metoda EPR spektroskopije. Ta metoda ima veliku osjetljivost i spektralnu rezoluciju s obzirom na razlučivanje gradbenih komponenti čime je omogućeno istraživanje različitih magnetskih i električnih svojstava različitih vodljivih polimera [146], među njima i polianilina [93].

EPR spektroskopija korištena je u ovom radu za analizu polimera u cilju detekcije svojstava lokalnog paramagnetizma kao i za utvrđivanje distribucije različitih magnetskih vrsta u polimernim lancima PANI-ES. Analizirana svojstva polianilina sintetiziranih metodom enzimске šablonske polimerizacije na vezikulama AOT kao šablonama u prisutnosti dvaju različitih enzima, HRPC i TvL, uspoređena su s polianilinom PANI-ES, dobivenim klasičnom kemijskom sintezom. Svim uzorcima PANI određeni su karakteristični EPR parametri, koncentracija paramagnetskih centara, širina EPR linije te g -faktor (tablica 3.2). Spektralna EPR linija polimera odstupa od klasičnog Gaussova ili Lorentzova oblika linije i opisuje ga Dysonova krivulja, koja je karakteristična za vodljive polimere. Parametar asimetrije, α , Dysonove krivulje pojavljuje se u dijelu apsorpcijskog signala u dominantnom apsorpcijskom signalu, a najveća vrijednost α utvrđena je u uzorku PANI-ES. Koncentracije paramagnetskih centara u uzorcima kreću se na skali od oko 10^{20} spina/g, no najveća koncentracija izmjerena je u PANI-HRPC-AOT. Najširu EPR spektralnu liniju imaju polianilini sintetizirani u prisutnosti enzima HRPC. Usporedbom EPR spektara polianilina sintetiziranih u / bez prisutnosti vezikula AOT u reakcijskoj smjesi (slike 3.7 i 3.8) vidljivo je kako polianilin sintetiziran u prisutnosti AOT vezikula kao šablonama, je homogen. To opažanje upućuje na dominantnost jednog oblika polimera kao produkta polimerizacije. U prisutnosti vezikula anilinski monomeri međusobno se povezuju N-C vezama u *para* položaju anilina. Bez prisutnosti vezikula, broj molekula anilina, koji se međusobno povezuje u *orto* poziciji, raste [70] što se na EPR spektrima vidi kao širenje linije, koja je posljedica nehomogenosti u strukturi nastalog polimera. Iz odnosa signal/šum vidi se da je koncentracija paramagnetskih centara veća u polimerima sintetiziranim u prisutnosti vezikula AOT uz približno istu masu uzorka.

Širinu linije EPR spektra snimljenog pri frekvenciji 9,5 GHz za uzorak PANI-ES analizirali su Krinichniy i suradnici [93] u temperaturnom području od 5 do 300 K. Našli su kako širina linije linearno raste s porastom temperature u području $T < T_c$, a potom pada s porastom temperature u području $T > T_c$. T_c kritična temperatura je oko 200 K pri kojoj dolazi do promjene ovisnosti širine linije o temperaturi. PANI pokazuje najjaču vodljivost pri temperaturi T_c [93]. Predložen je model prema kojem PANI tvore klasteri, slične klasterima u metalima, koji su sastavljeni od međusobno čvrsto povezanih polimernih lanaca s delokaliziranim vodljivim elektronima. Taj model opisuje eksperimentalne podatke u području od 100 do 300 K [93]. U ovom doktorskom radu pokazana je temperaturna ovisnost širine EPR spektralnih linija uzoraka PANI sintetiziranih enzimskom šablonskom polimerizacijom u cijelom temperaturnom području 5 – 300 K, koja raste s padom temperature. S obzirom na to da ovdje prikazani rezultati ne slijede temperaturnu ovisnost širine linije prema PANI-ES modelu [93], slijedi zaključak da se za polimere nastale šablonskom polimerizacijom ne može primjeniti taj model. Kako je ponašanje PANI-ES u temperaturnom području od 5 do 20 K drugačije nego uzorka PANI ispitivanog u literaturi [93], za shvaćanje mehanizma spinske dinamike potrebno je eksperimentalne podatke analizirati na drugačiji način. Slično širini spektralne linije, i za uzorak PANI-ES kao i uzorke PANI, nastale enzimskom šablonskom polimerizacijom intenzitet signala raste s padom temperature. Iz ovisnosti samog intenziteta o temperaturi nije se mogla utvrditi razlika između uzoraka ali iz umnoška intenziteta EPR spektra i temperature razlučeni su različiti uzorci. Taj pristup zasniva se na proporcionalnosti EPR signala magnetskoj susceptibilnosti, a prikaz ovisnosti umnoška magnetske susceptibilnosti i temperature o temperaturi uobičajeno se koristi za analizu vodljivih polimera. Ovom analizom utvrđena je razlika između uzoraka na višim temperaturama, dok je pri nižim temperaturama razlika zanemariva (slika 3.11). U ranijim istraživanjima za kemijski sintetizirani PANI [96] nađena je linearna temperaturna ovisnost umnoška χT pri višim temperaturama koja je objašnjena izmjenom sparenih polaronskih parova. Nauprot tomu, PANI uzorci obuhvaćeni ovom studijom, pokazuju odstupanje od linearne temperaturne ovisnosti umnoška intenziteta EPR signala i temperature pri višim temperaturama. Za objašnjenje dobivenih eksperimentalnih rezultata, napravljen je račun prema modelu koji uzima u obzir i korelaciju polaronskih vrpca (3.1) [99]. Razlika između vrijednosti međudjelovanja izmjene upućuju na razliku distribucije polarona u strukturi polimera. Iz ovog modela dobiveno je da najveću neuređenost sustava pokazuje PANI-HRPC-AOT. Kako je već utvrđeno da je širina linije za ovaj uzorak veća nego za druge PANI uzorke, može se zaključiti da prilikom sinteze polianilina u prisustvu enzima HRPC nastaju lanci koji su različitih duljina pa se ovakva nehomogenost u duljini lanaca vidi i kao širenje EPR spektralne linije.

Dobivene vrijednosti za energiju međudjelovanja podudaraju se unutar reda veličine s očekivanim vrijednostima dobivenim kvantno kemijskim računima za dimere i tetramere anilina za singlet-tripletne prijelaze u relativno kratkim dijelovima polimernih lanaca [147]. Polaronima s većim (manjim) vrijednostima J odgovaraju kraći (dulji) lanci polimera. Tako se za uzorak PANI-HRPC-AOT može pretpostaviti da ima kraće lance u odnosu na druge sintetizirane polimere. Izračunata vrijednost J predstavlja efektivnu vrijednost budući da je EPR signal analiziranih uzoraka nehomogenog karaktera, sastavljen od nekoliko komponenti, koje su izraženije na nižim temperaturama. Spektralne komponente polianilina nedvojbeno su razlučene pri višim frekvencijama magnetskog polja [95, 141]. Razlaganje spektralnih komponenti, pri nižim frekvencijama u ovom je radu uspješno postignuto metodom snimanja u i izvan faze magnetskog polja pri niskim temperaturama [142]. Ovom metodom razlučene su najmanje dvije komponente, koje potječu od dva različita paramagnetska centra, RC_1 i RC_2 , a različite su lokalne dinamike. Komponente su karakterizirane parametrom spektralnog cijepanja ΔB te širinom spektralne linije ΔH_{pp} . Simulacijom temperaturne ovisnosti ΔB i ΔH_{pp} prema izrazima (3.2) (3.3) i (3.4) utvrđeno je da uzorci PANI nastali u enzimskoj šablonskoj polimerizaciji imaju veće spektralno cijepanje, kao i veću širinu linije nego uzorcima PANI-ES. Iz izračunatih podataka procijenjena je i udaljenost između lanaca polimera te slijedi da je udaljenost između lanaca PANI nastalih enzimskom šablonskom polimerizacijom veća od udaljenosti u PANI-ES. Pretpostavlja se da je razlika u udaljenosti između lanaca posljedica zaostalih vezikula AOT. Takav zaključak omogućava objašnjenje ranijih analiza ovako sintetiziranih polimera koje su pokazale da ovi polimeri imaju nižu vodljivost od PANI-ES [46]. Također je poznato da je nastali PANI-TvL-AOT preoksidiran [46], dok to nije slučaj s PANI-HRPC-AOT [128]. Iz svega ovoga može se zaključiti da zaostale vezikule AOT narušavaju transport elektrona između lanaca polianilina, što rezultira smanjenom vodljivošću PANI sintetiziranih enzimskom šablonskom polimerizacijom. Međutim, usprkos manjoj vodljivosti polimera sintetiziranih šablonskom polimerizacijom u prisutnosti AOT vezikula, njihova važnost u zelenoj kemiji te upućuje na daljnju optimizaciju u smislu pronalaženja metode uklanjanja zaostalih molekula AOT iz produkta sinteze.

4.4. Usporedba EPR mjerenja provedenih pri različitim frekvencijama

Metodom snimanja EPR spektara u i izvan faze magnetskog polja pri frekvenciji od 9,5 GHz [142] u uzorcima PANI utvrđena je prisutnost najmanje dviju vrsta paramagnetskih centara, RC_1 i RC_2 . Da bi se zaista potvrdila prisutnost ovih dviju komponenti uzorci su snimljeni pri 10 puta višoj frekvenciji. Svrha ovih eksperimenata je u činjenici da se pri višim frekvencijama povećava spektralna rezolucija s obzirom na razlučivost g -faktora čime se pojednostavljuje interpretacija složenih EPR spektara.

Primjerice, uzorak p(PADPA)-TvL-AOT snimljen pri nižoj frekvenciji karakterizira jedan EPR signal Dysonov oblika, uobičajen za vodljive polimere [135]. Analiza i simulacija eksperimentalnih podataka potvrđuju spektralne komponente RC_1 i RC_2 . Omjer komponenti RC_1 i RC_2 u snimljenom EPR spektru procijenjen je na 1,5. Pri višoj EPR frekvenciji dvije spektralne komponente daleko su bolje razlučene što je dokazano simulacijom eksperimentalnih podataka. Omjer komponenti RC_1 i RC_2 u spektru procijenjen je na 1,8, što je neupitna potvrda rezultata pri nižoj frekvenciji.

Na sličan način primjena različitih frekvencija EPR spektroskopije može imati veliki potencijal u detekciji i analizi strukturnih i konformacijskih razlika u poli(arilamin) uzorcima nastalim sintezama u prisutnosti različitih oksidacijskih enzima.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja utjecaja AOT vezikula kao šablona u enzimskoj šablonskoj polimerizaciji anilina i dobivenih rezultata možemo izvesti sljedeće zaključke:

1. EPR metoda može se uspješno koristiti pri praćenju tijeka polimerizacije anilina. Intenzitet EPR spektralne linije upućuje na polaronski oblik polimera, dok širina spektralne linije ΔH_{pp} upućuje na fazu polimerizacije.
2. Metodom spinskog označavanja i dobivenih rezultata nije EPR spektroskopijom nedvojbeno dokazana interakcija između reaktanata i površine vezikula AOT, iako za to postoje navodi u literaturi. Paramagnetski centar spinske probe detektira prisutnost HRPC u blizini površine vezikule, ali ne nužno i na samoj površini.
3. Iz energije međudjelovanja izmjene polarona utvrđeno je da PANI-HRPC-AOT pokazuje najveću neuređenost sustava, odnosno pri sintezi polimera u prisustvu HRPC nastaju kraći lanci polimera u odnosu na PANI-TvL-AOT i PANI-ES.
4. PANI uzorci nastali enzimskom, šablonskom polimerizacijom sadržavaju najmanje dva tipa paramagnetskih centara koji se međusobno razlikuju po svojstvima.
5. Analizom uzoraka pri višoj frekvenciji nepobitno su potvrđena najmanje dva paramagnetska centra u uzorcima polianilina.
6. Udaljenost lanaca u polimeru sintetiziranom enzimskom šablonskom polimerizacijom veća je nego udaljenost lanaca polimera nastalog klasičnom kemijskom sintezom. Veća je udaljenost najvjerojatnije posljedica zaostalih molekula AOT između lanaca, koje ometaju transport elektrona između lanaca polianilina.
7. Vodljivost polianilina nastalih enzimskom šablonskom polimerizacijom manja je od vodljivosti polimera nastalog kemijskom sintezom. Niža je vodljivost posljedica veće udaljenosti između lanaca.

Rezultati istraživanja nisu potvrdili hipotezu da polianilin nastao u prisutnosti vezikula AOT ima jednaku vodljivost kao polianilin sintetiziran klasičnom kemijskom sintezom. Budući da je

smanjena vodljivost posljedica zaostalih molekula AOT, potrebno je poboljšati metodu njihova ukljanjanja iz konačnog produkta, te time poboljšati i njegovu vodljivost u smislu optimizacije predstavljene kemijske sinteze koja pokazuje veliku primjenu u segmentu zelene kemije.

6. LITERATURA

1. Mullis, K.B. and F.A. Faloon, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, in *Methods in Enzymology*, 1987. **155**: p. 335-350.
2. Kobayashi, S., et al., *Novel method for polysaccharide synthesis using an enzyme: the first in vitro synthesis of cellulose via a nonbiosynthetic path utilizing cellulase as catalyst*. *Journal of the American Chemical Society*, 1991. **113**: p. 3079-3084.
3. Kobayashi, S. and M. Ohmae, *Enzymatic Polymerization to Polysaccharides*, in *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers*, 2006, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
4. Walde, P. and Z. Guo, *Enzyme-catalyzed chemical structure-controlling template polymerization*. *Soft Matter*, 2011. **7**: p. 316-331.
5. Willstätter, R. and A. Stoll, *Über Peroxydase*. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1918. **416**: p. 21-64.
6. Guo, Z., et al., *Vesicles as Soft Templates for the Enzymatic Polymerization of Aniline*. *Langmuir*, 2009. **25**: p. 11390-11405.
7. Guo, Z., et al., *AOT vesicles as templates for the horseradish peroxidase-triggered polymerization of aniline*. *Soft Matter*, 2011. **7**: p. 180-193.
8. Chen, I.A. and P. Walde, *From Self-Assembled Vesicles to Protocells*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010. **2**: p. a002170.
9. Szostak, J.W., D.P. Bartel, and P.L. Luisi, *Synthesizing life*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 387-390.
10. Abdus, S., Y. Sultana, and M. Aqil, *Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review*. *Current Drug Delivery*, 2007. **4**: p. 297-305.
11. Novák, P., et al., *Electrochemically Active Polymers for Rechargeable Batteries*. *Chemical Reviews*, 1997. **97**: p. 207-282.
12. Argun, A.A., et al., *Multicolored Electrochromism in Polymers: Structures and Devices*. *Chemistry of Materials*, 2004. **16**: p. 4401-4412.
13. Lange, U., N.V. Roznyatovskaya, and V.M. Mirsky, *Conducting polymers in chemical sensors and arrays*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **614**: p. 1-26.
14. Vidović, E., *Glosar pojmova vezanih uz kinetiku, termodinamiku i mehanizme polimerizacije*. *Kemija u industriji*, 2012. **61**: p. 215-236.
15. Bamford, C.H. and Z. Shiiki, *Free-Radical Template Polymerization*. *Polymer*, 1968. **9**: p. 595-598.
16. Challa, G. and Y.Y. Tan, *Template Polymerization*. *Pure and Applied Chemistry*, 1981. **53**: p. 627-641.

17. Tan, Y.Y.a.C., G., *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. 2ndedn. 1989, John Wiley & Sons, New York,
18. Polowinski, S., *Template polymerisation and co-polymerisation*. Progress in Polymer Science, 2002. **27**: p. 537-577.
19. Szwarc, M., *Replica polymerization*. Journal of Polymer Science, 1954. **13**: p. 317-318.
20. Xu, P., A. Singh, and D. Kaplan, *Enzymatic Catalysis in the Synthesis of Polyanilines and Derivatives of Polyanilines*, in *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers*, 2006, Springer Berlin Heidelberg.
21. Shen, Y., et al., *Synthesis and characterization of water-soluble conducting polyaniline by enzyme catalysis*. Journal of Applied Polymer Science, 2005. **96**: p. 814-817.
22. Antonietti, M., *Surfactants for novel templating applications*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2001. **6**: p. 244-248.
23. John, V.T., et al., *Recent developments in materials synthesis in surfactant systems*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2002. **7**: p. 288-295.
24. Pileni, M.-P., *The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals*. Nat Mater, 2003. **2**: p. 145-150.
25. Sigg, S.J., et al., *Horseradish Peroxidase as a Catalyst for Atom Transfer Radical Polymerization*. Macromolecular Rapid Communications, 2011. **32**: p. 1710-1715.
26. Kobayashi, S. and A. Makino, *Enzymatic Polymer Synthesis: An Opportunity for Green Polymer Chemistry*. Chemical Reviews, 2009. **109**: p. 5288-5353.
27. Singh, A. and D. Kaplan, *In Vitro Enzyme-Induced Vinyl Polymerization*, in *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers*, 2006, Springer Berlin Heidelberg.
28. Loos, K.E., *Biocatalysis in Polymer Chemistry*. 2011, Wiley-VCH Verlag & Co. KgaA:Weinheim.
29. Hollmann, F. and I.W.C.E. Arends, *Enzyme Initiated Radical Polymerizations*. Polymers, 2012. **4**: p. 759-793.
30. Kobayashi, S., H. Uyama, and S. Kimura, *Enzymatic Polymerization*. Chemical Reviews, 2001. **101**: p. 3793-3818.
31. Gross, R.A., A. Kumar, and B. Kalra, *Polymer Synthesis by In Vitro Enzyme Catalysis*. Chemical Reviews, 2001. **101**: p. 2097-2124.
32. Solomon, E.I., U.M. Sundaram, and T.E. Machonkin, *Multicopper Oxidases and Oxygenases*. Chemical Reviews, 1996. **96**: p. 2563-2606.
33. Claus, H., *Laccases: structure, reactions, distribution*. Micron, 2004. **35**: p. 93-96.

34. Baldrian, P., *Fungal laccases – occurrence and properties*. FEMS Microbiology Reviews, 2006. **30**: p. 215-242.
35. Yoshida, H., *LXIII.-Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1883. **43**: p. 472-486.
36. Bertrand, G., *Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase*. CR Acad. Sci. Paris, 1895. **120**: p. 266-269.
37. Mayer, A.M. and R.C. Staples, *Laccase: new functions for an old enzyme*. Phytochemistry, 2002. **60**: p. 551-565.
38. Larsson, S., P. Cassland, and L.J. Jonsson, *Development of a Saccharomyces cerevisiae strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**: p. 1163-1170.
39. Bauer, C.G., et al., *New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1999. **364**: p. 179-183.
40. Servili, M., et al., *A novel method for removing phenols from grape must*. American Journal of Enology and Viticulture, 2000. **51**: p. 357-361.
41. Wong, Y. and J. Yu, *Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes*. Water Research, 1999. **33**: p. 3512-3520.
42. Pazarlıoğlu, N.K., M. Sariışık, and A. Telefoncu, *Laccase: production by Trametes versicolor and application to denim washing*. Process Biochemistry, 2005. **40**: p. 1673-1678.
43. Piontek, K., M. Antorini, and T. Choinowski, *Crystal structure of a laccase from the fungus Trametes versicolor at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**: p. 37663-37669.
44. Bertrand, T., et al., *Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics*. Biochemistry, 2002. **41**: p. 7325-7333.
45. Kudanga, T., et al., *Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review*. Enzyme and Microbial Technology, 2011. **48** p. 195-208.
46. Junker, K., et al., *The use of Trametes versicolor laccase for the polymerization of aniline in the presence of vesicles as templates*. Enzyme and Microbial Technology, 2014. **55**: p. 72-84.
47. Veitch, N.C., *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. Phytochemistry, 2004. **65**: p. 249-259.

48. Azevedo, A.M., et al., *Behaviour of horseradish peroxidase in AOT reversed micelles*. Biocatalysis and Biotransformation, 2001. **19**: p. 213-233.
49. Welinder, K.G., *Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase*. European Journal of Biochemistry, 1979. **96**: p. 483-502.
50. Lavery, C.B., et al., *Purification of Peroxidase from Horseradish (Armoracia rusticana) Roots*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**: p. 8471-8476.
51. Lasic, D.D., *Liposomes: from physics to applications*. 1993, Amsterdam: Elsevier.
52. Szoka, F. and D. Papahadjopoulos, *Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)*. Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 1980. **9**: p. 467-508.
53. Fendler, J.H., *Surfactant vesicles as membrane mimetic agents: characterization and utilization*. Accounts of Chemical Research, 1980. **13**: p. 7-13.
54. Discher, B.M., et al., *Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers*. Science, 1999. **284**: p. 1143-1146.
55. Swamy, M.J., et al., *Coexisting Domains in the Plasma Membranes of Live Cells Characterized by Spin-Label ESR Spectroscopy*. Biophysical Journal, 2006. **90**: p. 4452-4465.
56. Junker, K., et al., *Preparation of aqueous polyaniline-vesicle suspensions with class III peroxidases. Comparison between horseradish peroxidase isoenzyme C and soybean peroxidase*. Chemical Papers, 2013. **67**: p. 1028-1047.
57. Unverdorben, O., *Ueber das Verhalten der organischen Körper in höheren Temperaturen*. Annalen der Physik, 1826. **84**: p. 397-410.
58. Liu, W., et al., *Enzymatically Synthesized Conducting Polyaniline*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**: p. 71-78.
59. Reddinger, J. and J. Reynolds, *Molecular Engineering of π -Conjugated Polymers*, in *Radical Polymerisation Polyelectrolytes*, 1999, Springer Berlin Heidelberg.
60. Stejskal, J., I. Sapurina, and M. Trchová, *Polyaniline nanostructures and the role of aniline oligomers in their formation*. Progress in Polymer Science, 2010. **35**: p. 1420-1481.
61. Geniès, E.M., et al., *Polyaniline: A historical survey*. Synthetic Metals, 1990. **36**: p. 139-182.
62. Syed, A.A. and M.K. Dinesan, *Review: Polyaniline—A novel polymeric material*. Talanta, 1991. **38**: p. 815-837.
63. Mann, P.J.G. and B.C. Saunders, *Studies in Peroxidase Action. I.--The Oxidation of Aniline*. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 1935. **119**: p. 47-60.

-
64. Gettinger, C.L., et al., *Solution characterization of surfactant solubilized polyaniline*. Synthetic Metals, 1995. **74**: p. 81-88.
 65. Manohar, S.K., et al., *N-substituted derivatives of polyaniline*. Synthetic Metals, 1989. **29**: p. 349-356.
 66. DeArmitt, C., et al., *A novel N-substituted polyaniline derivative*. Polymer, 1993. **34**: p. 158-162.
 67. Liao, Y.-H., M. Angelopoulos, and K. Levon, *Ring-substituted polyaniline copolymers combining high solubility with high conductivity*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 1995. **33**: p. 2725-2729.
 68. Lee, C.-W., Y.-H. Seo, and S.-H. Lee, *A Soluble Polyaniline Substituted with t-BOC: Conducting Patterns and Doping*. Macromolecules, 2004. **37**: p. 4070-4074.
 69. Bidan, G., E.M. Genies, and J.F. Penneau, *Poly(2-propylaniline): an electroactive polymer, soluble in organic medium in the reduced state*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1989. **271**: p. 59-68.
 70. Samuelson, L.A., et al., *Biologically Derived Conducting and Water Soluble Polyaniline*. Macromolecules, 1998. **31**: p. 4376-4378.
 71. Shannon, K. and J.E. Fernandez, *Preparation and properties of water-soluble, poly(styrenesulfonic acid)-doped polyaniline*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1994: p. 643-644.
 72. Hirao, T., et al., *Conjugated palladium complex with poly(3-heptylpyrrole) and its application*. Synthetic Metals, 2006. **156**: p. 1378-1382.
 73. Akkara, J.A., K.J. Senecal, and D.L. Kaplan, *Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 1991. **29**: p. 1561-1574.
 74. Ikeda, R., H. Uyama, and S. Kobayashi, *Novel Synthetic Pathway to a Poly(phenylene oxide). Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Syringic Acid*. Macromolecules, 1996. **29**: p. 3053-3054.
 75. Akkara, J.A., et al., *Biomimetic Membrane and Interface Templates for Enzyme-Based Polymerization Reactions*. Biomimetics, 1994. **2**: p. 331-339.
 76. Bruno, F.F., et al., *Enzymic Mediated Synthesis of Conjugated Polymers at the Langmuir Trough Air-Water Interface*. Langmuir, 1995. **11**: p. 889-892.
 77. Tran, H.D., et al., *Toward an Understanding of the Formation of Conducting Polymer Nanofibers*. ACS Nano, 2008. **2**: p. 1841-1848.

-
78. Dmitrieva, E., Y. Harima, and L. Dunsch, *Influence of Phenazine Structure on Polaron Formation in Polyaniline: In Situ Electron Spin Resonance–Ultraviolet/Visible–Near-Infrared Spectroelectrochemical Study*. The Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**: p. 16131-16141.
79. Huang, W.-S., B.D. Humphrey, and A.G. MacDiarmid, *Polyaniline, a novel conducting polymer. Morphology and chemistry of its oxidation and reduction in aqueous electrolytes*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases, 1986. **82**: p. 2385-2400.
80. Epstein, A.J.M., R. P.; Ginder, J. M.; MacDiarmid, A. G., *Spectroscopy of advanced materials*. 1991, John Wiley & Sons, Chichester.
81. Hatchett, D.W., M. Josowicz, and J. Janata, *Acid Doping of Polyaniline: Spectroscopic and Electrochemical Studies*. The Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**: p. 10992-10998.
82. Zheng, W., et al., *Effect of organic vapors on the molecular conformation of non-doped polyaniline*. Synthetic Metals, 1997. **84**(1–3): p. 63-64.
83. Monkman, A.P. and P. Adams, *Optical and electronic properties of stretch-oriented solution-cast polyaniline films*. Synthetic Metals, 1991. **40**: p. 87-96.
84. Cao, Y., P. Smith, and A.J. Heeger, *Spectroscopic studies of polyaniline in solution and in spin-cast films*. Synthetic Metals, 1989. **32**: p. 263-281.
85. Stejskal, J., P. Kratochvíl, and N. Radhakrishnan, *Polyaniline dispersions 2. UV—Vis absorption spectra*. Synthetic Metals, 1993. **61**: p. 225-231.
86. Lindfors, T. and L. Harju, *Determination of the protonation constants of electrochemically polymerized poly(aniline) and poly(o-methylaniline) films*. Synthetic Metals, 2008. **158**: p. 233-241.
87. MacDiarmid, A.G. and A.J. Epstein, *Workshop on the Metallic Phase of Conducting Polymers The concept of secondary doping as applied to polyaniline*. Synthetic Metals, 1994. **65**: p. 103-116.
88. Xia, Y., et al., *Camphorsulfonic Acid Fully Doped Polyaniline Emeraldine Salt: Conformations in Different Solvents Studied by an Ultraviolet/Visible/Near-Infrared Spectroscopic Method*. Chemistry of Materials, 1995. **7**: p. 443-445.
89. Moulton, S.E., et al., *Polymerisation and characterisation of conducting polyaniline nanoparticle dispersions*. Current Applied Physics, 2004. **4**: p. 402-406.
90. Lim, C.H. and Y.J. Yoo, *Synthesis of ortho-directed polyaniline using horseradish peroxidase*. Process Biochemistry, 2000. **36**(3): p. 233-241.
91. Mizoguchi, K., et al., *Spin dynamics in the conducting polymer, polyaniline*. Physical Review Letters, 1989. **63**: p. 66-69.

-
92. Wang, Z.H., et al., *Transport and EPR studies of polyaniline: A quasi-one-dimensional conductor with three-dimensional "metallic" states*. Physical Review B, 1992. **45**: p. 4190-4202.
 93. Krinichnyi, V.I., S.D. Chemerisov, and Y.S. Lebedev, *EPR and charge-transport studies of polyaniline*. Physical Review B, 1997. **55**: p. 16233-16244.
 94. Kon'kin, A.L., et al., *EPR, charge transport, and spin dynamics in doped polyanilines*. Physical Review B, 2002. **66**: p. 075203.
 95. Kahol, P.K., *Pauli-like magnetic susceptibility in emeraldine base polyaniline*. Solid State Communications, 2002. **124**: p. 93-96.
 96. Kahol, P.K., A. Raghunathan, and B.J. McCormick, *A magnetic susceptibility study of emeraldine base polyaniline*. Synthetic Metals, 2004. **140**: p. 261-267.
 97. Kahol, P.K. and N.J. Pinto, *An EPR investigation of electrospun polyaniline-polyethylene oxide blends*. Synthetic Metals, 2004. **140**: p. 269-272.
 98. Kahn, O., *Molecular Magnetism*. 1993, New York: Wiley-VHC Inc.
 99. Nascimento, O.R., et al., *The ferromagnetic behaviour of conducting polymers revisited*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2008. **20**: p. 035214.
 100. Syed, A.A. and M.K. Dinesan, *Polyaniline: Reaction stoichiometry and use as an ion-exchange polymer and acid/base indicator*. Synthetic Metals, 1990. **36**: p. 209-215.
 101. De Surville, R., et al., *Electrochemical chains using protolytic organic semiconductors*. Electrochimica Acta, 1968. **13**: p. 1451-1458.
 102. Lee, B.H., et al., *Novel Film-Casting Method for High-Performance Flexible Polymer Electrodes*. Advanced Functional Materials, 2011. **21**: p. 487-493.
 103. Tai, Q., et al., *In Situ Prepared Transparent Polyaniline Electrode and Its Application in Bifacial Dye-Sensitized Solar Cells*. ACS Nano, 2011. **5**: p. 3795-3799.
 104. Ren, Y.J., J. Chen, and C.L. Zeng, *Corrosion protection of type 304 stainless steel bipolar plates of proton-exchange membrane fuel cells by doped polyaniline coating*. Journal of Power Sources, 2010. **195**: p. 1914-1919.
 105. Menegazzo, N., et al., *Discourse on the utilization of polyaniline coatings for surface plasmon resonance sensing of ammonia vapor*. Talanta, 2011. **85**: p. 1369-1375.
 106. Menegazzo, N., et al., *DC Magnetron Sputtered Polyaniline-HCl Thin Films for Chemical Sensing Applications*. Analytical Chemistry, 2012. **84**: p. 5770-5777.
 107. Rizzo, G., et al., *Flexible, all-organic ammonia sensor based on dodecylbenzene sulfonic acid-doped polyaniline films*. Thin Solid Films, 2010. **518**: p. 7133-7137.

-
108. Tuan, C.V., et al., *Electrochemical synthesis of polyaniline nanowires on Pt interdigitated microelectrode for room temperature NH₃ gas sensor application*. Current Applied Physics, 2012. **12**: p. 1011-1016.
109. Tiwari, A., et al., *Nanofibrous polyaniline thin film prepared by plasma-induced polymerization technique for detection of NO₂ gas*. Polymers for Advanced Technologies, 2010. **21**: p. 615-620.
110. Xie, D., et al., *Fabrication and characterization of polyaniline-based gas sensor by ultra-thin film technology*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2002. **81**(2-3): p. 158-164.
111. Chen, J., et al., *NH₃ and HCl sensing characteristics of polyaniline nanofibers deposited on commercial ceramic substrates using interfacial polymerization*. Synthetic Metals, 2010. **160**: p. 2452-2458.
112. Liu, C., et al., *Development of a polyaniline nanofiber-based carbon monoxide sensor for hydrogen fuel cell application*. International Journal of Hydrogen Energy, 2012. **37**: p. 13529-13535.
113. Zou, W., et al., *Patterned Growth of Polyaniline Nanowire Arrays on a Flexible Substrate for High-Performance Gas Sensing*. Small, 2011. **7**(23): p. 3287-3291.
114. Chithra Iekha, P., et al., *Sensing properties of polyoxomolybdate doped polyaniline nanomaterials for oxidising and reducing volatile organic compounds*. Current Applied Physics, 2010. **10**: p. 457-467.
115. MacDiarmid, A.G. and A.J. Epstein, *Polyanilines: a novel class of conducting polymers*. Faraday Discussions of the Chemical Society, 1989. **88**: p. 317-332.
116. Stejskal, J., P. Kratochvíl, and A.D. Jenkins, *The formation of polyaniline and the nature of its structures*. Polymer, 1996. **37**: p. 367-369.
117. Trchová, M., et al., *Evolution of Polyaniline Nanotubes: The Oxidation of Aniline in Water*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**: p. 9461-9468.
118. Kříž, J., et al., *NMR Investigation of Aniline Oligomers Produced in the Early Stages of Oxidative Polymerization of Aniline*. The Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**: p. 6666-6673.
119. Bhadra, S., et al., *Progress in preparation, processing and applications of polyaniline*. Progress in Polymer Science, 2009. **34**: p. 783-810.
120. Cao, Y., et al., *Influence of chemical polymerization conditions on the properties of polyaniline*. Polymer, 1989. **30**: p. 2305-2311.
121. Sapurina, I. and J. Stejskal, *The mechanism of the oxidative polymerization of aniline and the formation of supramolecular polyaniline structures*. Polymer International, 2008. **57**: p. 1295-1325.

-
122. Sahoo, S.K., et al., *An Enzymatically Synthesized Polyaniline: A Solid-State NMR Study*. *Macromolecules*, 2004. **37**: p. 4130-4138.
123. Liu, W., et al., *The Role of Template in the Enzymatic Synthesis of Conducting Polyaniline*. *Journal of the American Chemical Society*, 1999. **121**: p. 11345-11355.
124. Liu, W., et al., *Enzymatic Synthesis of Conducting Polyaniline in Micelle Solutions*. *Langmuir*, 2002. **18**: p. 9696-9704.
125. Rumbau, V., et al., *A new bifunctional template for the enzymatic synthesis of conducting polyaniline*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007. **40**: p. 1412-1421.
126. Nabid, M.R., et al., *Preparation of the γ -Al₂O₃/PANI nanocomposite via enzymatic polymerization*. *Polymer Composites*, 2009. **30**: p. 841-846.
127. Foreman, J.P. and A.P. Monkman, *Theoretical Investigations into the Structural and Electronic Influences on the Hydrogen Bonding in Doped Polyaniline*. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2003. **107**: p. 7604-7610.
128. Junker, K., et al., *Mechanistic aspects of the horseradish peroxidase-catalysed polymerisation of aniline in the presence of AOT vesicles as templates*. *RSC Advances*, 2012. **2**: p. 6478-6495.
129. Junker, K., et al., *Efficient Polymerization of the Aniline Dimer p-Aminodiphenylamine (PADPA) with *Trametes versicolor* Laccase/O₂ as Catalyst and Oxidant and AOT Vesicles as Templates*. *ACS Catalysis*, 2014. **4**: p. 3421-3434.
130. Huang, W.S. and A.G. MacDiarmid, *Optical properties of polyaniline*. *Polymer*, 1993. **34**: p. 1833-1845.
131. Berliner, L.J., *Spin labeling: Theory and applications*. 1976, Academic Press, New York.
132. Weil J. A., Bolton J.R., J. E. Wertz, *Electron Spin Resonance; Elementary Theory and Practical Applications*. 1994, Wiley, New York, NY, U.S.A.
133. Abragam, A. and B. Bleaney, *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*. 1970, Clarendin Press, Oxsford, UK.
134. Gatteschi, D., R. Sessoli, and J. Villain, *Molecular Nanomagnets*. 2006, Oxford University Press, Oxford, UK.
135. Dyson, F.J., *Electron Spin Resonance Absorption in Metals. II. Theory of Electron Diffusion and the Skin Effect*. *Physical Review*, 1955. **98**: p. 349-359.
136. Hoffmann, A.K. and A.T. Henderson, *A new stable free radical: di-t-butyl nitroxide*. *Journal of the American Chemical Society*, 1961. **83**: p. 4671-4672.
137. Morse, P.D., *Thirty-first Annual Meeting 22–26 February 1987 Rivergate Convention Center, New Orleans, Louisiana: Wednesday, February 25, 1987, 1:30 - 5:00 p.m., Penn Hall, Part 2*. *Biophysical Journal*, 1987. **51**: p. 440a-495a.

-
138. Stoll, S. and A. Schweiger, *EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR*. Journal of Magnetic Resonance, 2006. **178**: p. 42-55.
139. Alves, M. and M. Peric, *An EPR study of the interfacial properties of phosphatidylcholine vesicles with different lipid chain lengths*. Biophysical Chemistry, 2006. **122**: p. 66-73.
140. Steinhoff, H.-J., *A simple method for determination of rotational correlation times and separation of rotational and polarity effects from EPR spectra of spin-labeled biomolecules in a wide correlation time range*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1988. **17**: p. 237-247.
141. Krinichnyi, V.I., *2-mm Waveband electron paramagnetic resonance spectroscopy of conducting polymers*. Synthetic Metals, 2000. **108**: p. 173-222.
142. Maltar-Strmečki, N., et al., *Relaxation mechanism in γ -ray-irradiated L-alanine studied by transfer saturation EPR and pulse EPR*. Applied Magnetic Resonance, 2002. **22**: p. 551-560.
143. Jozefowicz, M.E., et al., *Multiple lattice phases and polaron-lattice-spinless-defect competition in polyaniline*. Physical Review B, 1989. **39**: p. 12958-12961.
144. Krinichnyi, V.I., et al., *EPR study of charge transfer in polyaniline highly doped by p-toluenesulfonic acid*. Synthetic Metals, 2006. **156**: p. 1368-1377.
145. MacDiarmid, A.G., et al., *Electrostatically-generated nanofibers of electronic polymers*. Synthetic Metals, 2001. **119**: p. 27-30.
146. Krinichnyi, V.I., *High Field ESR Spectroscopy of Conductive Polymers, in Advanced ESR Methods in Polymer Research*, 2006, Wiley, Hoboken, New Jersey.
147. Kulikov, A.V., et al., *Spin crossover in polyaniline*. Russian Chemical Bulletin. **56**: p. 2026-2033.

7. SAŽETAK

Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) kao spektroskopska metoda korištena je za istraživanje enzimske šablonske polimerizacije polianilina te njegovih magnetskih svojstva. Polimer PANI-TvL-AOT sintetiziran je u prisustvu lakaze iz gljive *Trametes versicolor* (TvL) dok je PANI-HRPC-AOT nastao u reakciji s peroksidazom iz korijena hrena *Armoracia rusticana* (HRPC). Kao šablone, pripravljene su vezikule natrijevog bis(2-etilheksil)sulfosukcinata (AOT). Za praćenje dinamike na površini vezikula tijekom polimerizacije, vezikule AOT označene su spinskom oznakom tempil-oktanoatom. Ovim pristupom nije utvrđeno postojanje interakcije između reaktanata s površinskim slojem vezikula. Komercijalno dostupan uzorak polianilina PANI-ES, koji je dobro karakteriziran, korišten je za usporedbu i korelaciju eksperimentalnih podataka dobivenih za PANI-TvL-AOT i PANI-HRPC-AOT. Magnetska svojstva PANI uzoraka mogu se povezati s njihovim vodljivim svojstvima, te je nađeno da su ona niža za uzorke PANI nastale enzimskom šablonskom polimerizacijom. Također utvrđena je veća efektivna udaljenost lanaca ovih polimera nego PANI-ES, koja je najvjerojatnije posljedica zaostalih AOT molekula. PANI uzorci snimljeni su pri dvije EPR frekvencije mikrovlanog zračenja, čime je olakšano razlučivanje tipova različitih paramagnetskih centara. Mjerenjem pri višoj frekvenciji potvrđeno je prisustvo dvaju paramagnetskih centara u uzorcima koja su uočena pri nižoj frekvenciji metodom snimanja u / izvan faze magnetskog polja. Rezultati istraživanja nisu potvrdili hipotezu da polianilin nastao u prisustvu AOT vezikula ima jednaku vodljivost kao polianilin sintetiziran klasičnom kemijskom sintezom. Međutim otvoren je put optimizacije predstavljene sinteze koja pokazuje veliku primjenu u segmentima zelene kemije.

8. SUMMARY

Electron paramagnetic resonance (EPR) as a spectroscopic method was used to examine enzyme-catalyzed template polymerisation of polyanilines and their magnetic properties. PANI-TvL-AOT was synthesized in the presence of *Trametes versicolor* laccase (TvL) while PANI-HRPC-AOT was obtained with horseradish peroxidase *Armoracia rusticana* (HRPC). Vesicles from sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) were prepared as templates. Molecular dynamics on the surface of vesicles were investigated during polymerization using TEMPO-octanoate as spin label. With this approach no interactions between the reactants and vesicle surface were detected. A commercially available sample of well-characterized polyaniline (PANI-ES) was used for comparison, and correlation with experimental data obtained for PANI-TvL-AOT and PANI-HRPC-AOT. Magnetic properties of the PANI samples could be related to their conductivities. It was found that conductivity of PANI obtained from enzyme-catalyzed template polymerisation is lower than PANI-ES. Additionally, it was found that effective distance between the polyaniline chains is larger in those polymers than PANI-ES. This finding is most likely due to remaining AOT molecules. All PANI samples were recorded at two EPR frequencies to distinguish different types of paramagnetic centers. Measurements at higher frequency confirmed the presence of two paramagnetic centers in PANI samples which were observed at lower frequency using the method of in phase and out of phase detection. Results of this study have not confirmed the hypothesis that polyaniline synthesized in the presence of AOT vesicles has the same conductivity as polyaniline obtained in classical chemical synthesis. However, the described synthesis and characterisation of final products paves the way optimization steps for syntheses targeted towards various powerful applications of green chemistry.

9. PRILOZI

9.1. Popis kratica

AOT	Natrijev bis(2-etilheksil)sulfosukcinat
CW-EPR	<i>engl. continuous wave</i> , EPR kontinuiranog vala
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
DPPH	2,2-difenil- β -pikril hidrazil
EB	Emeraldinska baza
EPR	Elektronska paramagnetska rezonancija
ES	Emeraldinska sol
ESR	Elektronska spinska rezonancije = EPR
HRP	<i>engl. Horse radish peroxidase</i> : peroksidaza iz korijena hrena <i>Armoracia rusticana</i>
HRPC	Izoenzim C1A HRP
LEB	Leukoemeraldinska baza
LES	Leukoemeraldinska sol
MLV	<i>engl. Multilamellar vesicle</i> , višeslojne vezikule
NIR	<i>engl. near infrared</i>
NMR	Nuklearna magnetska rezonancije
PADPA	<i>p</i> -aminodifenilamin
PANI	Polianilin
PANI-EB	Polianilin emeraldinska baza
PANI-ES	Polianilin emeraldinska sol (komercijalni uzorak)
PANI-HRPC-AOT	Polianilin sintetiziran peroksidazom u prisustvu AOT vezikula
PANI-HRPC	Polianilin sintetiziran peroksidazom
PANI-TvL-AOT	Polianilin sintetiziran lakazom u prisustvu AOT vezikula
PANI-TvL	Polianilin sintetiziran lakazom
PCR	<i>engl. polymerase chain reaction</i> , lančana reakcija polimerazom
poly(PADPA)-HRPC-AOT	Polianilin sintetiziran iz <i>p</i> -aminodifenilamin peroksidazom u prisustvu AOT vezikula
poly(PADPA)-TvL-AOT	Polianilin sintetiziran iz <i>p</i> -aminodifenilamin lakazom u prisustvu AOT vezikula
PB	Pernigranilinska baza
PS	Pernigranilinska sol
PSS	Polistirensulfonat

RC ₁	Paramagnetski centar 1 PANI
RC ₂	Paramagnetski centar 2 PANI
RNA	Ribonukleinska kiselina
SDBS	Natrijev-dodecilbenzensulfonat
T1	Bakar tipa 1
T2	Bakar tipa 2
T3	Bakar tipa 3
TEM	Transmisijska elektronska mikroskopija
tempil-oktanoat	2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil-4-il-oktanoat
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil-4-il
TNS	6- <i>p</i> -toluidinil-6-naftalensulfonat
TvL	Lakaza iz <i>Trametes versicolor</i>
ULV	<i>eng. unilamerllar vesicle</i> , jednoslojne vezikule
UV/Vis	<i>eng. ultraviolet, visible</i>
A	Tenzor hiperfinog cijepanja s glavnim komponentama: A_{xx} , A_{yy} i A_{zz}
a ₀	Izotropna konstanta hiperfinog cijepanja
<i>g</i>	<i>g</i> -tenzor s glavnim komponentama: g_{xx} , g_{yy} i g_{zz}
<i>J</i>	Energija međudjelovanja izmjene
<i>P</i>	Snaga mikrovalnog zračenja
α	Parametar asimetrije Dysonovg oblika spektra
ΔB	Parametar spektralnog cijepanja
ΔH_{pp}	Širina EPR spektralne linije
τ	Korelacijsko vrijeme
τ_c	Rotacijsko korelacijsko vrijeme
χ	Magnetska susceptibilnost

9.2. Primjer računalnog programa u simulaciji eksperimentalnih EPR podataka

U nastavku prikazan je primjer simulacije EPR spektra programom „garlic“ programskog paketa EasySpin [138]. Program „garlic“ prigodan je za simulaciju brzog izotropnog gibanja.

```
clear all, close all

%-----

% Eksperimentalni parametri

Exp = struct('mwFreq',9.2812);
%LLKM = [6 4 4 2]
%Opt = struct('LLKM', LLKM, 'Verbosity', 0);
Exp.nPoints=1000; %broj tocaka na spektru
Exp.Range = [326.6 334.6]; % u mT,

%-----

% Parametri sustava i Simulacijal

g1 = [2.0099 2.0061 2.0024];
A1 = [7.39647 36.7089 93.4229];
lw1 = [0.09 0.19];
Sys1 = struct('g',g1, 'Nucs', '14N', 'A',A1, 'lw',lw1);
Sys1.logtcorr = -9.49;
Sys1.Diffpa = [00 90 00]*pi/180;
%Sys1.lambda = [0.0 0.0];
%[BS,spektarS1] = garlic(Sys1,Exp,Opt);
[BS,spektarS1] = chili(Sys1,Exp);

%-----

% Eksperimentalni spektar;

[x,spektarE]=
textread('C:\Users\Dejana\Desktop\doktoratfitnje\4_07_2011\07040711.ASC');

%-----

% Crtanje
E = plot(x/10, (spektarE/max(spektarE)), 'r');
hold on;
S1 = plot(BS,spektarS1/max(spektarS1), 'b');
axis tight;
xlabel ('B / mT');
legend ('exp', 'sim')
title('reakcija');

%-----

%Normiranje
spektarSg=(spektarS1/max(spektarS1))'
poljeB=x/10

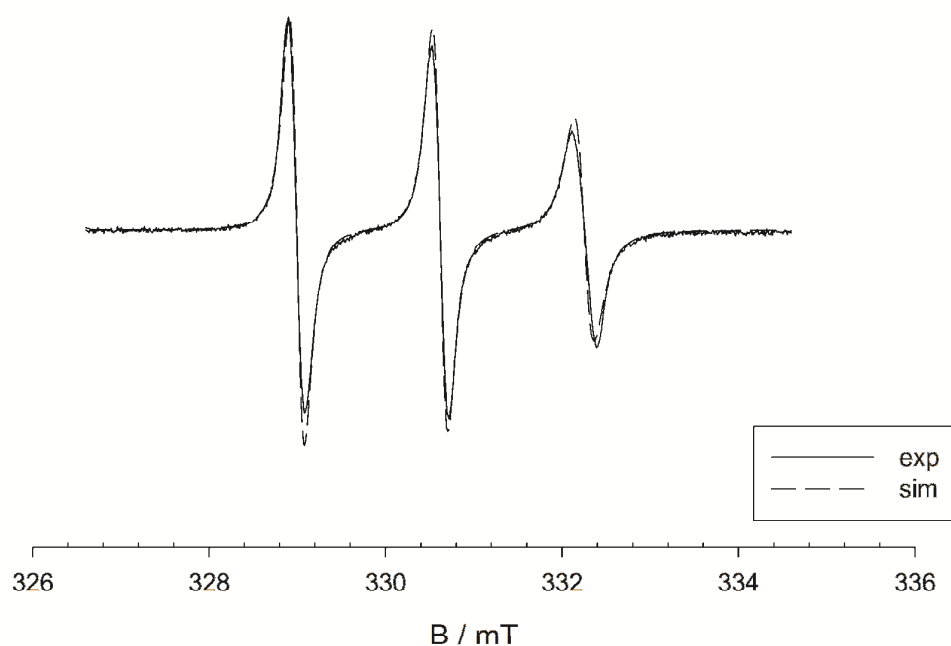
%-----
```



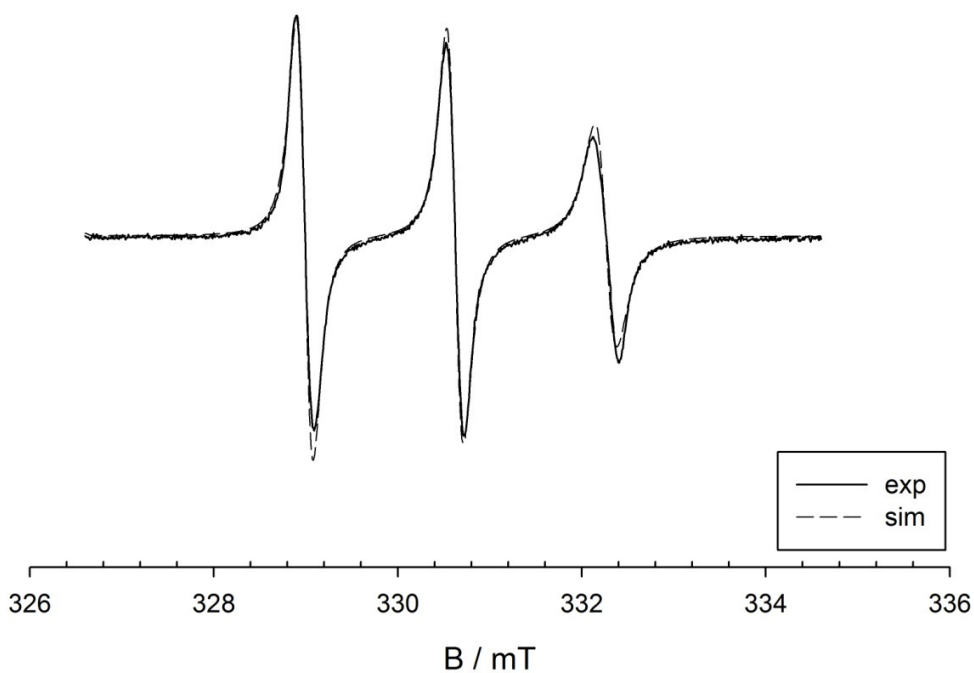
```
%Pohrana
```

```
save('C:\Users\Dejana\Desktop\spektarS1.txt', 'spektarSg', '-ASCII')  
save('C:\Users\Dejana\Desktop\polje.txt', 'poljeB', '-ASCII')
```

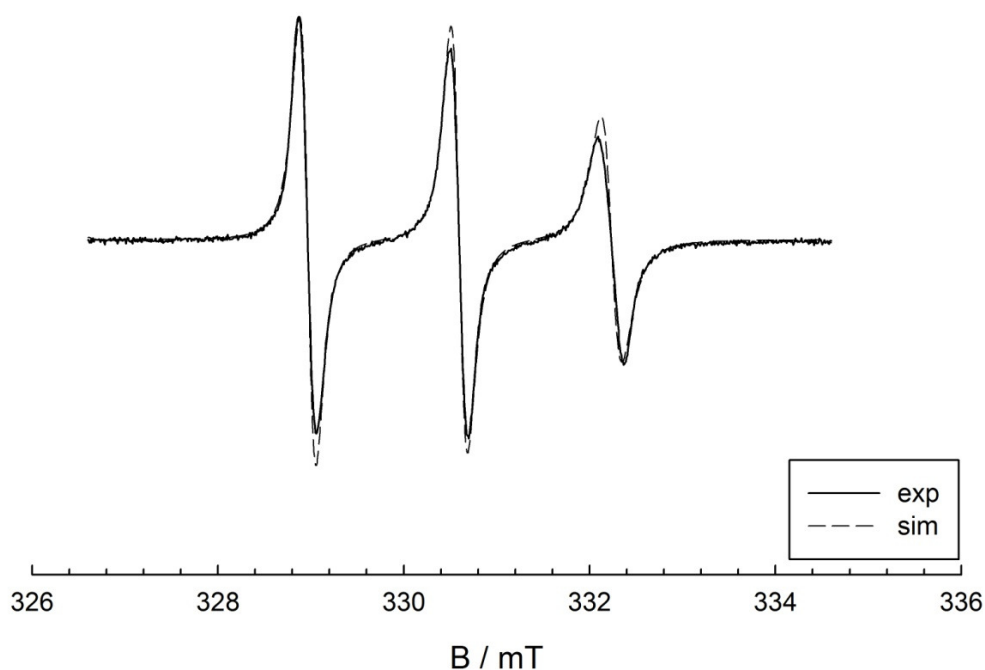
Primjenom ovog računalnog programa simulirani su eksperimentalni spektri prikazani na slikama 8.1, 8.2 i 8.3.



Slika 8.1. Usporedba eksperimentalnog i simuliranog EPR spektra vezikula AOT označenih tempil-oktanoatom u prisustvu anilina. Spektri su simulirani „chili“ računalnim programom programskog paketa EasySpin [138], pogodnim za sporu molekulska dinamiku. Parametri simulacije koji najbolje opisuju eksperimentalni spektar: $g_{xx} = 2,0099$, $g_{yy} = 2,0061$ i $g_{zz} = 2,0024$, odnosno $A_{xx} = 0,125$ mT, $A_{yy} = 1,106$ mT i $A_{zz} = 3,683$ mT, $\tau_c = 2,75 \cdot 10^{-10}$ s.



Slika 8.2. Usporedba eksperimentalnog i simuliranog EPR spektra vezikula AOT označenih tempil-oktanoatom u prisustvu enzima HRPC. Spektri su simulirani „chili“ računalnim programom programskog paketa EasySpin [138], pogodnim za sporu molekulska dinamiku. Parametri simulacije koji najbolje opisuju eksperimentalni spektar: $g_{xx} = 2,0099$, $g_{yy} = 2,0061$ i $g_{zz} = 2,0024$, odnosno $A_{xx} = 0,091$ mT, $A_{yy} = 1,410$ mT i $A_{zz} = 3,377$ mT, $\tau_c = 3,16^{-10}$ s.



Slika 8.3. Usporedba eksperimentalnog i simuliranog EPR spektra vezikula AOT označenih tempil-oktanoatom u prisustvu anilina i enzima HRPC. Spektri su simulirani „chili“ računalnim programom programskog paketa EasySpin [138], pogodnim za sporu molekulska dinamiku. Parametri simulacije koji najbolje opisuju eksperimentalni spektar: $g_{xx} = 2,0099$, $g_{yy} = 2,0061$ i $g_{zz} = 2,0024$, odnosno $A_{xx} = 0,117$ mT, $A_{yy} = 1,352$ mT i $A_{zz} = 3,443$ mT, $\tau_c = 2,57 \cdot 10^{-10}$ s.

10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

IME I PREZIME		Dejana Carić (rođ. Kokanj)
MJESTO I DATUM ROĐENJA		11.06.1973.; Doboj, BiH
STRUČNA SPREMA		biotehnolog, diplomirani inženjer prehrambene tehnologije
ZAPOSLENJE		Institut Ruđer Bošković, Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za magnetske rezonancije
OBRAZOVANJE	2000.	Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu diplomirani inženjer prehrambene tehnologije, smjer biokemijsko inženjerstvo
	1995.	Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu inženjer prehrambene tehnologije, smjer biokemijsko inženjerstvo
RADNO ISKUSTVO	2015.-	Laboratorij za magnetnske rezonancije Zavod za fizičku kemiju, Institut Ruđer Bošković viši stručni suradnik u sustavu znanosti i visokog obrazovanja
	2008. - 2015.	Laboratorij za mangetnske rezonancije Zavod za fizičku kemiju, Institut Ruđer Bošković stručni suradnik u sustavu znanosti i visokog obrazovanja
	2008. - 2008.	Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu tehnički suradnik
	2001. - 2008.	Zavod za kemiju Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu znanstveni novak
	2000. - 2001.	Laboratorij za biokemiju Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu zamjena na poslovima asistanta
ODRŽAVANJE NASTAVE		Sudjelujem u izvođenju kolegija „Biomembrane“ na Diplomskom sveučilišnom studiju Molekularne biologije, Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

POPIS RADOVA

Carić, D.; Rakvin, B.; Kveder, M.; Junker,K.; Walde, P.; Reijerse, E.

A multi frequency EPR study of poly(PADPA) synthesized with Trametes versicolor laccase from the aniline dimer p-aminodiphenylamine (PADPA) in the presence of anionic vesicles. Current Applied Physics, 2015. **15**(11): p. 1516-1520

Vojta, L.; **Carić, D.**; Cesar, V.; Antunović Dunić, J.; Lepeduš, H.; Kveder, M.; Fulgosi, H.
TROL-FNR interaction reveals alternative pathways of electron partitioning in photosynthesis. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 10085.

Koprivnjak, O.; Kriško, A.; Valić, S.; **Carić, D.**; Krapac, M.; Poljuha, D.
Antioxidants, radical-scavenging and protein carbonylation inhibition capacity of six monocultivar virgin olive oils in Istria (Croatia). Acta alimentaria, 2015 (prihvaćen za objavljivanje doi:10.1556/AAlim.2015.0018)

Rakvin, B.; **Carić, D.**; Andreis, M.; Junker, K.; Walde, P.
EPR Study of Polyaniline Synthesized Enzymatically in the Presence of Submicrometer Sized AOT Vesicles. Journal of Physical Chemistry B, 2014. **118**(8): p. 2205-2213.

Andreis, M.; **Carić, D.**; Šijaković Vujičić, N.; Jokić, M.; Žinić, M.; Kveder, M.
Self-assembly of gelator molecules in liquid crystals by ESR. Chemical physics, 2012. **403**: p. 81-88.

Gredičak, M.; Bregović, N.; **Carić, D.**; Jerić, I.
Amino acid-based tweezers: the role of turnlike conformation in the binding of copper(II). Journal of Inorganic Biochemistry, 2012. **116**: p. 45-52.

Starčević, K.; Hranjec, M.; **Carić, D.**; Karminski-Zamola, G.
Synthesis and spectroscopic properties of new furyl-phenyl-acrylates and naphthofurans and their interaction with ct-DNA. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly, 2008. **139**(8): p. 975-983.

Carić, D.; Tomišić, V.; Kveder, M.; Galić, N.; Pifat, G.; Magnus, V.; Šoškić, M.
Absorption and fluorescence spectra of ring-substituted indole-3-acetic acids. Biophysical Chemistry, 2004. **111**(3): p. 247-257.

Carić, D.; Mrša, V.
Lokalizacija i fiziološka uloga proteina stanične stijenke kvasca Saccharomyces cerevisiae. Kemija u industriji, 2002. **51**(12): p. 515-524.

Kokanj, D.; Mrša, V.
Localization and physiological role of Saccharomyces cerevisiae cell wall proteins. Periodicum biologorum, 2001. **103**: p. 123-133.

PATENT

Mihaljević, K.; Azarić, J.; Bajić, B; Mrša, V.; **Kokanj, D.**
Acarbose purification process, US 6,734,300 B2

SAŽETCI U ZBORNICIMA SKUPOVA

Carić, D.; Andreis, M.; Junker, K.; Walde, P.; Rakvin, Boris.

EPR study of polyaniline synthesized enzymatically in the presence of AOT vesicles.

e-WISPOC 2014/ Physical Organic Chemistry of Complex Systems. 2014. 339-P13 (poster)

Rakvin, B.; **Carić, D.**; Kveder, M.; Junker, K.; Walde, P.; Reijerse, E

EPR study of conducting polymer ; Poly(PADPA) synthesized enzymatically from the aniline dimer p-aminodiphenylamine in the presence of submicrometer-sized AOT vesicles.

Book of Abstracts Euromar 2014.Zürich, 2014. SY764-SY764 (poster)

Aladrović, J.; **Carić, D.**; Beer Ljubić, B.; Laškaj, R.; Karadjole, M.; Majić Bajić, I.; Marković, F.; Maltar-Strmečki, N.

Reduction of boar semen sperm motility by oxidation on membrane lipid bilayer.

The 5th International Congress "Veterinary Science and Profession", Book of Abstract 2013. Zagreb : Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, 2013. 73-73 (predavanje)

Carić, D.; Ilakovac-Kveder, M.; Šijaković Vujičić, N.; Jokić, M.; Žinić, M.; Andreis, M.

The ESR Study of Gelator - Liquid Crystal Interactions

e-WISPOC 2013 European Winter School on Physical Organic Chemistry : Supramolecular Chemistry. 2013. 555-555 (poster)

Fulgosi, H.; Vojta, L.; **Carić, D.**; Ilakovac-Kveder, M.

Electron partitioning beyond photosystem I involves TROL-FNR interaction and reveals alternative pathways of energy transfer in photosynthesis.

Book of abstracts of the 2nd International Workshop: Natural and Artificial Photosynthesis, Bioenergetics and Sustainability / Barber, James (ur.). Sigapore : Nanyang Technological University, 2012. 43-43 (poster)

Ilakovac Kveder, M.; **Carić, D.**; Šijaković Vujičić, N.; Jokić, M.; Žinić, M.; Andreis, M.

ESR study of gelator self-assembly in a liquid crystal

2nd Scientific meeting of COST Action CM1005: Supramolecular Chemistry in Water. Lisabon, 2012. 24-24 (poster)

Rakvin, B.; **Carić, D.**; Andreis, M.; Junker, K.; Walde, P.

EPR study of triplet states in conductive polyaniline.

The 45th Annual International Meeting of the ESR Spectroscopy Group of the Royal Society of Chemistry, Conference book. Manchester : The University of Manchester, 2012. P16-P16 (poster)

Vojta, L.; **Carić, D.**; Antunović, J.; Lepeduš, H.; Ilakovac-Kveder, M.; Cesar, V.; Fulgosi, H.

TROL-FNR interakcija utječe na raspodjelu fotosintetskih elektrona prema daljnjim putevima prijenosa energije.

Zbornik sažetaka (11. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem) Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885, 2012. 171-172 (predavanje)

Pavić, A.; Kerhač, V.; Maltar-Strmečki, N.; **Carić, D.**; Matašin, Ž.

Antioxidant activities of several Croatian honeys studied by electrons spin resonance.

Book of Abstracts ; The International Congress "Veterinary science and profession", Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 2011. 60-60 (predavanje)

Carić, D.; Tomišić, V.; Kveder, M.; Galić, N.; Magnus, V.; Šoškić, M.

Absorbance and fluorescence spectra of ring-substituted indole-3-acetic acids.

Zbornik sažetaka 8. Hrvatskog biološkog kongresa (Proceedings of Abstracts of the 8th Croatian Biological Congress. Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885 (Croatian Biological Society), 2003. P-204 (poster)

Mrša, V.; **Kokanj, D.**; Ecker, M.; Tanner, W.

S. cerevisiae Cell Wall Proteins.

Biotechnology and environment Zagreb: Croatian Society of Biotechnology, 2001. 15-15 (poster)

Mrša, V.; **Kokanj, D.**; Ecker, M.; Tanner, W.

Localisation of NaOH-extractable proteins (PIR-protein family) in the Saccharomyces cerevisiae cell wall.

Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis Monte Verità; Ascona, 2001. 24 (poster)

Kokanj, D.; Ecker, M.; Widmar, T.; Mrša, V.

Pir Protein in the S. cerevisiae Cell Wall.

Drugi hrvatski mikrobiološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo, 2000. 146-146 (predavanje, poster)

Mrša, V.; **Kokanj, D.**; Ecker, M.; Tanner, W.

Localization of the PIR Protein Family in the S. cerevisiae Cell Wall.

Tenth International Symposium on Yeasts "The rising power of yeasts in science and industry". Delft: Delft University Press, 2000. 171 (pozvano predavanje)

ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE

- | | |
|------|--|
| 2014 | European Winter School on Physical Organic Chemistry of Complex Systems, Bressanone, Italy |
| 2013 | European Winter School on Physical Organic Chemistry of Supramolecular Chemistry; , Bressanone, Italy |
| 2003 | 8 th International Summer School on Biophysics, Supramolecular Structure and Function, Rovinj, Hrvatska |