

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Miloš P. Pešić

**DOBIJANJE I KARAKTERIZACIJA NOVIH SORBENATA
NA BAZI MOLEKULSKI OBELEŽENIH POLIMERA ZA
ODABRANE STEROIDE I UV FILTERE**

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Miloš P. Pešić

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NEW
SORBENTS BASED ON MOLECULARLY IMPRINTED
POLYMERS FOR SELECTED STEROIDS AND UV
FILTERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentor:

dr Tatjana Verbić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr Aleksandar Lolić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Andrija Ćirić, docent, Univerzitet u Kragujevcu – Prirodno-matematički fakultet

Datum odbrane:

Dobijanje i karakterizacija novih sorbenata na bazi molekulski obeleženih polimera za odabrane steroide i UV filtere

Sažetak:

Molekulski obeleženi polimeri su funkcionalni materijali sa unapred definisanom selektivnošću ka određenom molekulu. Cilj ove disertacije bio je dobijanje i karakterizacija molekulski obeleženih polimera sa templatima iz klasa steroida (holesterol) i UV filtera (benzofenon-4). Sintetisano je nekoliko serija molekulski obeleženih polimera i njihovih neobeleženih analoga primenjujući nekovalentni pristup, tehnikom polimerizacije u masi. Dobijeni sorbenti su okarakterisani pomoću infracrvene spektroskopije, skenirajuće elektronske mikroskopije, fizisorpcijom azota, elementalnom analizom, kao i pomoću adsorpcionih izoterma. Na osnovu karakterizacije dobijenih polimera može se zaključiti da je proces obeležavanja za odabrane template uspešno izveden. Polimeri obeleženi holesterolom i benzofenonom-4 imaju veći kapacitet za vezivanje templata od neobeleženih analoga. Rezultati ispitivanja selektivnosti dobijenih polimera ukazuju da su dobijeni polimeri selektivni za vezivanje templata u odnosu na druga jedinjenja iz iste grupe. Ispitana je mogućnost primene dobijenih polimera za ekstrakciju benzofenona-4 iz vodenih rastvora. Pokušaji dobijanja molekulski obeleženih polimera za UV filtere na bazi ciklodekstrina, nisu, za sada, dali zadovoljavajuće rezultate.

Ključne reči: molekulski obeleženi polimeri, UV filteri, holesterol, benzofenon-4, selektivni sorbenti

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

Preparation and characterization of new sorbents based on molecularly imprinted polymers for selected steroids and UV filters

Abstract

Molecularly imprinted polymers represent functional materials with predetermined selectivity towards chosen molecule. The goal of this dissertation was preparation and characterization of molecularly imprinted polymers with steroid templates (cholesterol) and UV filters (benzophenone-4). Several series of imprinted polymers and their non-imprinted analogs were synthesized, applying non-covalent approach, by bulk polymerization. Prepared sorbents were characterized by infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, nitrogen physisorption, elemental analysis and adsorption isotherms. Results show that imprinting process was successful. Polymers imprinted with cholesterol and benzophenone-4 as templates have higher binding capacities than corresponding non-imprinted analogs. Selectivity of imprinted polymers was tested, showing that imprinted polymers are selective towards template compared to similar compounds binding. The application of benzophenone-4 imprinted polymers for solid-phase extraction from aqueous solutions was examined. Preparation of imprinted polymers for UV filters based on cyclodextrins was not successful so far.

Key words: molecularly imprinted polymer, UV filters, cholesterol, benzophenone-4, selective sorbents

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Analytical Chemistry

Zahvalnica

Ova disertacija je realizovana na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, a delimično i na Katedri za neorgansku i analitičku hemiju Budimpeštanskog univerziteta tehnologije i ekonomije.

Tema je proistekla iz saradnje van. prof. dr Tatjane Verbić sa akademikom Mađarske akademije nauka Georgom Horvajem (George Horvai). Ogromnu zahvalnost dugujem prof. Verbić što me je upoznala sa ovom izuzetno zanimljivom i korisnom oblašću, na svim korisnim savetima i sugestijama koje su doprinele kvalitetu disertacije. Još veću zahvalnost joj dugujem na podršci u svim sferama života koju mi je tokom godina pružila.

Akademik George Horvai je izuzetan čovek i hemičar od koga sam mnogo naučio, te zaslužuje posebno mesto u ovoj zahvalnici. Svaki razgovor sa prof. Horvai-jem dodatno mi je budio želju za napredovanjem, za sveobuhvatnim sagledavanjem problema kojim se bavimo i motivisao da trigram za rešenjima.

Izuzetno sam zahvalan svim svojim nastavnicima od kojih sam tokom studija i rada na fakultetu zaista mnogo naučio. Hvala za znanje, razumevanje i podršku koju ste mi pružili.

Zahvaljujem se Filipu Biheloviću, Igoru Opsenici i Bojanu Vuloviću na pomoći da napravim prve naučne korake.

Želim da se zahvalim svim svojim studentima koji su mi tokom godina držanja vežbi svojim entuzijazmom i željom za znanjem pomogli da nađem motivaciju i u trenucima kada to nije bilo lako.

Doktorska disertacija predstavlja plod višegodišnjeg rada, tokom kojeg sam imao prilike da sarađujem sa većim brojem kolega, volontera, diplomaca, master studenata. Zahvaljujem im se ovom prilikom što su dane u laboratoriji činili lepšim i lakšim.

Kolege iz laboratorije, Olivera Marković, Dragana Stojkov i Ilija Cvijetić neizostavni su deo ovog doktorata. Zahvaljujem im se na svim korisnim savetima i podršci tokom prethodnih godina.

Zahvaljujem se članovima komisije na strpljenju i razumevanju.

Hvala dr Jugoslavu Krstiću za svu pomoć i znanje koje mi je pružio.

Istraživačka stanica Petnica, svi ljudi koje sam imao priliku da upoznam u stanici, svi sa kojima sam imao prilike da sarađujem, ostavili su dubok i neizbrisiv trag u mom životu. Zahvaljujem im se na svemu što smo tokom godina prošli zajedno.

Godine rada na ovoj disertaciji činile su da ponekada preostane manje vremena za sve one dragocene i vredne ljude bez kojih bi sve bilo mnogo teže. Za mnogo razumevanja, podrške, bodrenja izuzetno sam zahvalan svojim prijateljima Igoru Jeremiću, Nemanji Aksiću, Jovanu Vardi, Miljani Todorov (Jovanović), Stefanu Ugrinovu, Jeleni Đajić, Aleksandru Salimu, Jovani Vukmirović, Vladimiru Jovanoviću, Borisu Stojilkoviću, Vuku Mrkobradi, Borisu Saviću, Bojanu Vuloviću, Gordani Krstić, Maji Šumar, Jeleni Stanić, Edvinu Faku, Mihajlu Novakoviću, Filipu Opinčalu, Draganu Miladinovu, Zlatku Jončevu, Marinu Kuntiću, Aleksi Dakiću... Hvala vam na svemu.

Zahvaljujem se Anji Dimić, Iliji Anđelkoviću, Luki Blagojeviću i Aleksi Dakiću na podršci pri finalizaciji ovog teksta.

Zahvaljujem se i svojoj sestri Dijani za svu podršku.

Naravno, porodica je ono bez čega sigurno ne bih bio gde danas jesam. Ne postoje dovoljno dobre reči kojima bih mogao da iskažem zahvalnost majci Nevenki, ocu Peri i bratu Igoru. HVALA!

Sadržaj

I Uvod	1
II Opšti deo.....	2
II.1 Osnovne komponente u sintezi molekulski obeleženih polimera.....	2
II.2 pristupi u sintezi molekulski obeleženih polimera	6
II.2.1 Nekovalentni pristup.....	6
II.2.2 Kovalentni pristup	7
II.2.3 Semikovalentni pristup	7
II.3 Tehnike polimerizacije i fizičke forme polimera.....	8
II.4 Proučavanje prepolimerizacionog kompleksa	9
II.4.1 Konduktometrijsko proučavanje prepolimerizacionog kompleksa	9
II.4.2 UV Vis spektroskopija.....	9
II.4.3 NMR spektroskopija.....	9
II.5 Svojstva i karakterizacija vezivnih mesta.....	10
II.5.1 Afinitet vezivnih mesta.....	11
II.5.2 Selektivnost vezivnih mesta	11
II.5.3 Adsorpcione izoterme.....	12
II.6 Fizička karakterizacija polimera.....	13
II.6.1 Infracrvena spektroskopija	13
II.6.2 Elementalna analiza.....	13
II.6.3 Morfološka karakterizacija	13
II.6.3.1 Mikroskopija.....	13
II.6.3.2 Fizisorpcija azota i živina porozimetrija.....	14
II.6.4 Termička analiza.....	14
II.7 Primena molekulski obeleženih polimera.....	14
II.7.1 Primena MOPa u ekstrakciji čvrstom fazom	14
II.7.2 Primena MOPa za kontrolisanu dostavu i otpuštanje lekova	15
II.7.3 Primena MOPa u hromatografiji	15
II.7.4 Primena MOPa u drugim oblastima	15
II.8 Molekulski obeleženi polimeri za steroidne molekule	16
II.9 Molekulski obeleženi polimeri na bazi ciklodekstrina	18
II.10 UV filteri	20
III Naši radovi	24
III.1 Molekulski obeleženi polimeri za holesterol i druge stereoide.....	24
III.1.1 Rastvorljivost holesterola u odabranim sistemima.....	24
III.1.2 Sinteza polimera za steroidna jedinjenja.....	25
III.1.3 Optimizacija rastvarača za ponovno vezivanje holesterola i odabir faznog odnosa polimer:rastvor	27

III.1.4	Vezivanje holesterola za neobeležene i obeležene polimere.....	28
III.1.5	Faktori obeležavanja	31
III.1.6	Selektivnost polimera	32
III.1.6.1	Vezivanje stigmasterola	32
III.1.6.2	Vezivanje estradiola	35
III.1.6.3	Vezivanje kortizola	38
III.1.7	Veza između hidrofobnosti umreživača i vezivanja holesterola	41
III.1.8	Adsorpcione izoterme	42
III.1.9	Ponovljivost sinteze polimera	42
III.1.10	Sinteza MOPa za holesterol sa različitim sadržajem templata	43
III.1.11	Karakterizacija polimera sa najboljim svojstvima	43
III.2	Molekulski obeleženi polimeri za UV filtere	45
III.2.1	Molekulski obeleženi polimeri bez funkcionalnog monomera	46
III.2.1.1	Sinteza polimera.....	46
III.2.1.2	Vezivanje UV filtera za sintetisane polimere.....	47
III.2.2	Molekulski obeleženi polimeri zasnovani na ciklodekstrinima	47
III.2.2.1	Sinteza ciklodekstrinskih polimera	47
III.2.2.2	Vezivanje templata za CD polimere.....	48
III.2.3	Molekulski obeleženi polimeri za benzofenon-4	50
III.2.3.1	Sinteza MOPa obeleženih benzofenonom-4	50
III.2.3.2	Faktori obeležavanja	51
III.2.3.3	Adsorpcione izoterme	53
III.2.3.4	Elementalna analiza.....	54
III.2.3.5	Adsorpcioni kapaciteti.....	54
III.2.3.6	Selektivnost polimera.....	56
III.2.3.7	Ekstrakcija čvrstom fazom.....	56
III.2.3.8	Infracrvena spektroskopija	56
III.2.3.9	Termogravimetrijska analiza.....	57
III.2.3.10	Fizisorpcija azota na 77 K.....	58
III.2.3.11	Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	60
IV	Eksperimentalni deo.....	62
IV.1	Reagensi.....	62
IV.2	Instrumenti	62
IV.3	Sinteza polimera za holesterol	62
IV.3.1	Vezivanje templata i drugih steroida za sintetisane polimere	64
IV.3.2	HPLC metode za steroide	64
IV.3.3	Određivanje rastvorljivosti holesterola	65
IV.3.4	Fizisorpcija azota na 77 K.....	65
IV.3.5	Skenirajuća elektronska mikroskopija	65

IV.4 Sinteza polimera za UV filtere.....	65
IV.4.1 HPLC metode.....	65
IV.4.2 Molekulski obeleženi polimeri bez funkcionalnog monomera	65
IV.4.2.1 Vezivanje UV filtera za polimere	67
IV.5 Molekulski obeleženi polimeri na bazi ciklodekstrina.....	67
IV.5.1 Sinteza polimera na bazi CD.....	67
IV.6 Sinteza polimera za benzofenon-4	69
IV.6.1 Ispitivanje vezivanja i adsorpcione izoterme	70
IV.6.2 Ispitivanje selektivnosti.....	70
IV.6.3 Ekstrakcija čvrstom fazom.....	70
IV.6.4 Konduktometrijske titracije.....	70
IV.6.5 Priprema uzoraka za FTIR i TGA.....	70
IV.6.6 TGA analiza	70
IV.6.7 Fizisorpcija azota	70
IV.6.8 SEM	70
V Zaključak.....	71
VI Reference	73
VII Prilog	80

I Uvod

Potreba za novim materijalima koji bi se mogli primeniti u različitim oblastima hemije nameće stalni razvoj ove oblasti. Polimerna hemija je u konstantnom usponu od sredine XX veka. Značajniji razvoj hemije molekulski obeleženih polimera počinje krajem XX veka, a nastavljen je tokom XXI veka. Molekulska obeležavanje predstavlja tehnologiju usmerenu ka dobijanju funkcionalnih materijala. Molekulska obeležena polimeri dobijaju se polimerizacijom odgovarajućih komponentni u prisustvu templata čija je uloga, u idealnom slučaju, da u polimeru izazove stvaranje šupljina komplementarnih po obliku i naelektrisanju. Nakon uklanjanja templata u dobijenom polimeru ostaju slobodna mesta u koja se ponovo može vezati templat ili templat sličan molekul (Sellergren, 2001).

Molekulska obeležena polimeri (MOPi) nalaze primenu u brojnim granama hemije: kao sorbenti u ekstrakciji čvrstom fazom, kao stacionarne faze u hromatografiji, aktivne komponente u senzorima, a mogu se koristiti i kao katalizatori (veštački enzimi) i mikroreaktori. Ovako široka primena MOPa omogućena je univerzalnošću ovih materijala, relativno jednostavnim dobijanjem, mogućnošću višestrukog korišćenja. MOPi se primenjuju i u kontrolisanoj dostavi i otpuštanju lekova (Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013).

Iako je raznovrsnost templata koji se mogu primeniti za dobijanje MOPa veoma velika, dobijanje MOPa željenih svojstava nije uvek jednostavno, a ponekad ni moguće. Ukoliko se kao templat koriste molekuli koji su slabo funkcionalizovani poput steroida, dobijanje MOPa koji ima zadovoljavajući kapacitet i selektivnost vezivanja zahteva primenu složenijih pristupa. U takvim slučajevima najčešće se sintetiše derivat templata sa monomerom, pa se nakon sinteze obeleženog polimera hidrolizuje veza između templata i monomera.

Cilj ove doktorske disertacije bio je dobijanje polimera za zahtevne template poput steroidnih molekula, gde je kao predstavnik steroida izabran holesterol, molekul koji pored osnovnog ugljovodoničnog skeleta sadrži samo jednu hidroksilnu grupu i jednu dvostruku vezu. Tokom izrade disertacije, primenjen je pristup gde se za sintezu koristi samo jedna polimerizabilna komponenta i to umreživač, uz visoku koncentraciju holesterola u prepolimerizacionoj smeši. Dobijanju holesterolom obeleženih polimera prethodila je optimizacija uslova polimerizacije: ispitano je nekoliko rastvarača, umreživača, i koncentracija holesterola u prepolimerizacionoj smeši. Dobijeni obeleženi polimeri, kao i neobeleženi analozi su okarakterisani primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), fizisorpcijom azota, kao i ispitivanjem vezivanja templata iz različitih rastvarača (konstrukcijom adsorpcionih izoterma). Takođe, ispitana je i selektivnost sintetisanih polimera.

U drugom delu disertacije, cilj je bio dobijanje MOPa za odabrane UV filtere. UV filteri su jedinjenja koja se nalaze u kremama za sunčanje i brojnim kozmetičkim preparatima u visokoj koncentraciji (i do 25%), a nakon dospevanja u životnu sredinu mogu izazvati brojne štetne posledice po vodeni živi svet. U naučnoj literaturi postoji svega nekoliko do sada objavljenih radova koji razmatraju dobijanje MOPa za UV filtere, iako je potreba za koncentrovanjem i sorpcijom ovih jedinjenja iz vodenih ekosistema velika. Pokušana je primena dva pristupa u sintezi MOPa za UV filtere, slobodno-radikalna polimerizacija vinilnih i akrilatnih monomera i dobijanje ciklodekstrinskih nanosundera. Pokušaje dobijanja ciklodekstrinskih polimera nisu bili uspešni, dobijeni polimeri nisu pokazali veći kapacitet za vezivanje templata u odnosu na neobeležene analoge. Sa druge strane, primena klasičnog nekovalentnog pristupa, rezultovala je dobijanjem obeleženog polimera za benzofenon-4 (BP4), jedan od predstavnika klase benzofenonskih UV filtera. Dobijeni polimeri za benzofenon-4 su okarakterisani primenom infracrvene spektroskopije (FTIR), elementalne analize, SEM, fizisorpcije azota, adsorpcionim izotermama. Selektivnost dobijenih polimera je visoka. BP4 obeleženi polimeri koji su sintetisani tokom izrade ove disertacije pokazuju dobro vezivanje i u vodenoj sredini, što značajno olakšava njihovu primenu i proširuje mogućnosti.

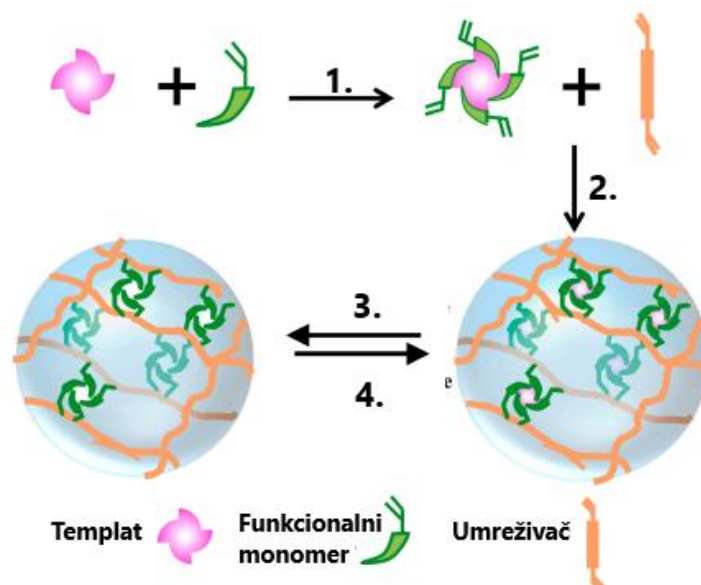
II Opšti deo

II.1 Osnovne komponente u sintezi molekulski obeleženih polimera

Molekulski obeleženi polimeri dobijaju se polimerizacijom funkcionalnog monomera u prisustvu molekula od interesa – templata. Templat može biti gotovo bilo koji molekul koji je stabilan u primenjenim uslovima polimerizacije. Funkcionalni monomer se bira tako da može da ostvaruje što jače interakcije sa templatom, u zavisnosti od pristupa u sintezi, čak i da reverzibilno formira kovalentne veze. U polimerizacionu smešu dodaje se i umreživač, čija je uloga da formira polimernu mrežu koja održava rigidnu strukturu polimera. Oko templata se samoorganizuju molekuli funkcionalnog monomera, zbog čega nakon polimerizacije i uklanjanja templata, u polimernoj strukturi ostane mesto po obliku i hemijskoj funkcionalnosti komplementarno templatu (Sellergren, 2001).

Da bi se utvrdila uspešnost molekuskog obeležavanja, neophodno je obeleženi polimer uporediti sa odgovarajućim neobeležnim polimerom. Neobeleženi polimer dobija se na isti način kao obeleženi polimer, samo bez prisustva templata. Odsustvo templata ima za posledicu nasumični raspored monomera u polimeru. Ovakav polimer će sadržati mesta za koja se može vezati templat, ali imajući u vidu da su nasumično nastala, takva mesta će uglavnom imati manji afinitet za vezivanje templata od mesta nastalih u obeleženom polimeru (Sellergren, 2001; Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013).

Po tipu polimerizacije koja se izvodi, molekulski obeleženi polimeri se najčešće dobijaju radikalskom polimerizacijom, te je neophodan i odgovarajući inicijator polimerizacije. Polimerizacija se inicira termalno, ultraljubičastim ili gama zračenjem (Sellergren, 2001). Na **Slici 1** shematski je prikazan postupak nastajanja nekovalentno molekulski obeleženih polimera.



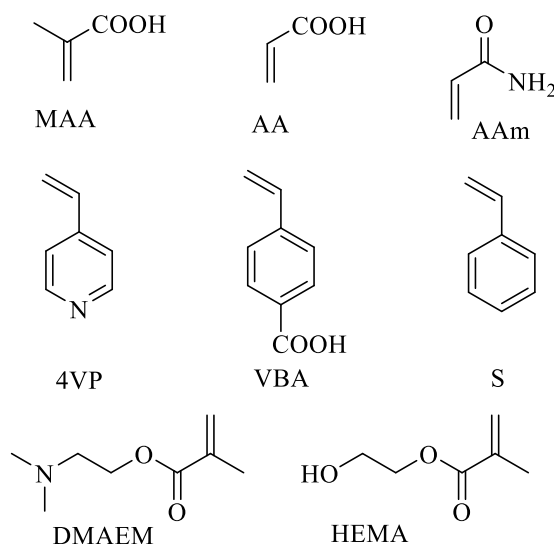
Slika 1. Shematski prikaz nastajanja molekulski obeleženog polimera. 1. formiranje prepolimerizacionog kompleksa; 2. formiranje polimera; 3. uklanjanje templata; 4. ponovno vezivanje templata.

Uspešna sinteza MOPa podrazumeva da je dobijeni MOP dovoljno selektivan, da ima dovoljan kapacitet, koji bi, po pravilu, trebalo da bude veći od kapaciteta neobeleženog polimera (NOPa) i da je hemijski i termički stabilan. Da bi proces obeležavanja bio uspešno izveden, neophodno je pravilno odabrati komponente koje učestvuju u dobijanju polimera, kao i da se te

komponente, koje se nalaze u određenom odnosu, polimerizuju pod pogodnim uslovima. Drugim rečima, dobar odabir templata, funkcionalnog monomera, umreživača, porogena, tehnike polimerizacije neki su od neophodnih uslova za dobijanje MOPa (Alvarez-Lorenzo, Concheiro 2013; Karim et al, 2005).

Molekul templata trebalo bi da bude takav da sadrži grupe koje mogu ostvariti interakcije sa funkcionalnim monomerom, dok ne sme da sadrži grupe koje su polimerizabilne pod primenjenim uslovima sinteze polimera. U literaturi postoje opisani primeri upotrebe amina, karboksilnih kiselina, amida, monosaharida, aminokiselina, alkaloida, estara i alkohola kao templata (izvor: <http://mipdatabase.com>). Templat može biti i enantiomerni oblik nekog molekula, pri čemu dobijeni MOP ima hiralna svojstva i pravi razliku pri vezivanju templata i njegovog enantiomera (Hebert et al, 2015; Sibrian-Vasquez, Spivak, 2003; Torres et al, 2012; Meador, Spivak, 2014; Piletsky, Turner, 2006; Ansell et al, 2005).

Templat sa funkcionalnim monomerom ostvaruje međumolekulske interakcije. Stoga, funkcionalni monomer, sa jedne strane, mora sadržati grupe hemijski komplementarne templatu, dok, sa druge strane, funkcionalni monomer mora sadržati polimerizabilne grupe. U zavisnosti od toga koje interakcije templat može da ostvaruje, tj. koje funkcionalne grupe sadrži, bira se funkcionalni monomer koji sadrži kisele, bazne, funkcionalne grupe, koje mogu graditi vodonične veze ili π - π interakcije i sl. (Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013, Liu et al, 2021). Na **Slici 2** prikazani su primeri funkcionalnih monomera koji se najčešće koriste u sintezi nekovalentnih MOPa.



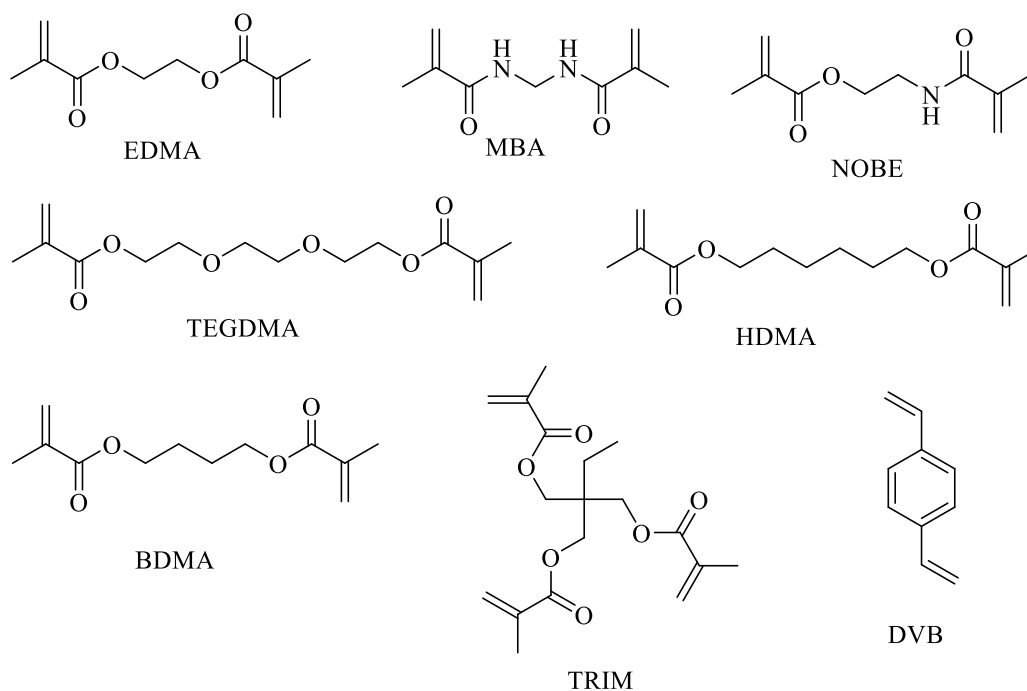
Slika 2. Strukturne formule funkcionalnih monomera koji se najčešće koriste u sintezi MOPa. MAA – metakrilna kiselina, AA – akrilna kiselina, AAm – akrilamid, 4VP – 4-vinilpiridin, VBA – vinilbenzojeva kiselina, S – stiren, DMAEM – dimetilaminoetil-metakrilat, HEMA – 2-hidroksietil-metakrilat

Funkcionalni monomer okružuje templat gradeći sa njim prepolimerizacioni kompleks. Kako je često građenje kompleksa zasnovano na slabim interakcijama, da bi se pospešilo nastajanje prepolimerizacionog kompleksa, količina monomera mora biti veća od količine templata. Međutim, višak funkcionalnog monomera vodi nastajanju mesta niskog afiniteta u obeleženom polimeru, umanjujući i selektivnost dobijenog polimera (Mattiasson, Ye, 2015).

Nastajanje i postojanost prepolimerizacionog kompleksa zavise od jačine templat-templat interakcija, ali postoji efekat monomer-monomer, rastvarač-templat, rastvarač-monomer interakcija (Mattiasson, Ye, 2015). Stabilnost prepolimerizacionog kompleksa zavisi i od temperature i pritiska

prepolimerizacije smeše, pri čemu se stabilnost kompleksa povećava sa smanjenjem temperature. Stoga, dobijanje MOPa gde je nestabilan prepolimerizacioni kompleks može se izvesti na sniženoj temperaturi (4°C) i uz fotoinicijaciju, umesto na 60-70°C i termalno iniciranom polimerizacijom (Sellergren, 2001; Alvarez-Lorenzo, Concheiro 2013).

Uloga umreživača jeste da polimeru da rigidnost tako da se struktura obeleženog mesta ne narušava pri ispiranju, pri ponovnom vezivanju templata ili pri promeni rastvarača. Stoga se umreživač najčešće primenjuje u većoj količini od funkcionalnog monomera: najčešće korišćeni odnos količina monomera i umreživača je 1:5. Nedovoljna količina umreživača dovodi do bubrenja polimera i narušavanja prostorne obeleženih mesta tj. mesta visokog afiniteta za vezivanje templata. Prevelika količina upotrebljenog umreživača, sa druge strane, dovodi do nastajanja polimera iz kog je teško ukloniti templat i gde je potrebno duže vreme za uspostavljanje ravnoteže pri ponovnom vezivanju templata. Uloga umreživača nije zanemarljiva ni pri građenju prepolimerizacionog kompleksa – u zavisnosti od polarnosti i strukture, on može uticati na stabilnost prepolimerizacionog kompleksa. Umreživači sadrže dve ili više dvostrukih veze. Na **Slici 3** prikazane su strukture često korišćenih umreživača u sintezi MOPa (Sellergren, 2001; Yan, Ramström, 2005).



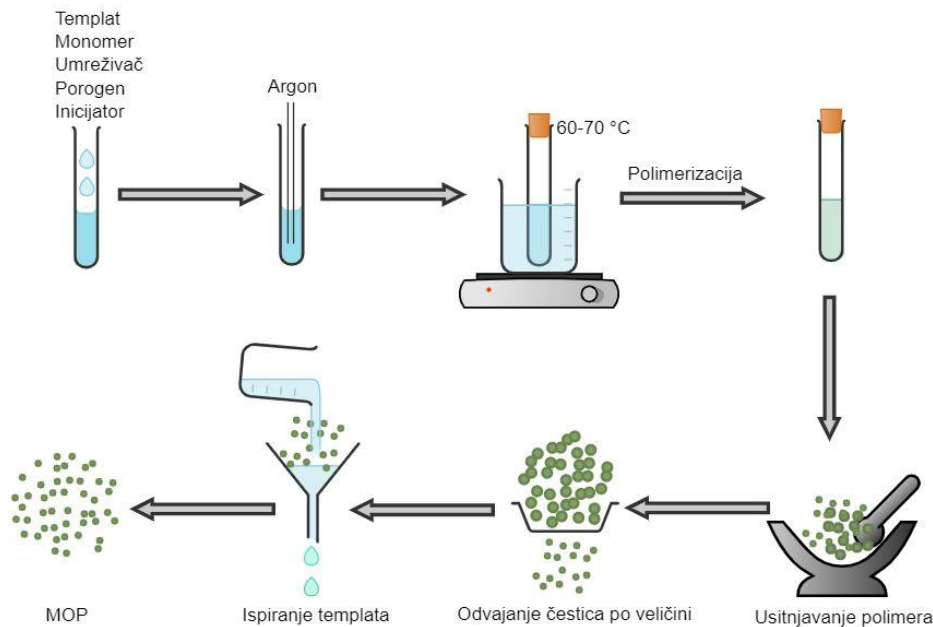
Slika 3. Strukturne formule najčešće korišćenih umreživača: EDMA – etilenglikol-dimetakrilat, MBA – metilen-bisakrilamid, NOBE – *N,O*-bismetakriloloil-etanolamin, TEGDMA – trietilenglikol-dimetakrilat, HDMA – 1,6-heksandiol-dimetakrilat, BDMA – 1,4-butandiol-dimetakrilat, TRIM – trimetilolpropan-trimetakrilat, DVB – divinilbenzen.

Najčešće korišćeni umreživači su EDMA i DVB. Prednost EDMA polimera jeste njihova termička i mehanička stabilnost, dobra kvašljivost u različitim rastvaračima, kao i brz transfer mase. Sa druge strane, prednosti DVB polimera su veća rigidnost i manje izraženo bubrenje, ali su manje kvašljivi u pojedinim organskim rastvaračima, i uglavnom manje selektivni u odnosu na EDMA polimere. Primena amidnih umreživača može biti značajna za sintezu polimera za polarne template poput peptida i proteina (Sellergren, 2001; Iturralde, 2014).

Porogen, rastvarač koji se koristi pri sintezi polimera, ima nekoliko uloga pri sintezi MOPa – zaslužan je za formiranje pora u polimeru, ali i za stabilizaciju prepolimerizacionog kompleksa. Rastvarači poput toluena, acetonitrila i hloroforma se često koriste kao porogeni, dok se u određenim slučajevima mogu koristiti i aceton, dimetil-sulfoksid, *N,N*-dimetilformamid, u sistemima u kojima

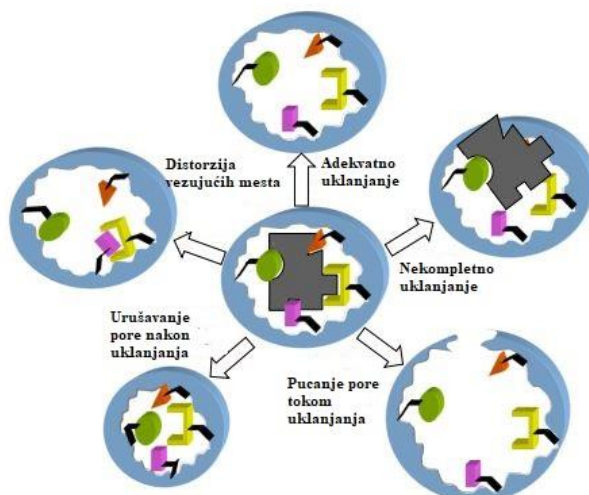
primena ovih rastvarača ne utiče značajno na stabilnost prepolimerizacionog kompleksa (Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013; He et al, 2007).

Pre sinteze MOPa, neophodno je iz funkcionalnog monomera i umreživača ukloniti inhibitore polimerizacije. Porogen ne bi trebalo da sadrži vlagu kako ne bi bile narušene templat-monomer interakcije. Iz prepolimerizacione smeše se, pre polimerizacije, produvanjem inertnog gasa uklanja kiseonik koji je inhibitor polimerizacije. Inicijacija polimerizacije može se izvesti nekim od slobodno-radikalskih inicijatora, poput azobisisobutironitrila, benzoil-peroksida i sl. Na **Slici 4** shematski je prikazan postupak sinteze polimera.



Slika 4. Shematski prikaz sinteze MOPa.

Nakon polimerizacije, prilikom obrade polimera i uklanjanja templa dolazi do delimičnog oštećenja ili urušavanja obeleženih mesta što za posledicu ima smanjenje selektivnosti i kapaciteta polimera uz istovremeno povećanje heterogenosti obeleženih mesta u polimeru (**Slika 5**) (Lorenzo et al, 2011).



Slika 5. Shematski prikaz mogućih deformacija obeleženih mesta u polimeru. Adaptirano iz Lorenzo et al (2011).

Imajući u vidu da postoje različiti pristupi u sintezi MOPa, sem ukoliko nije drugačije naglašeno, u daljem tekstu biće razmatran nekovalentni pristup, koji je eksperimentalno primenjen u ovoj disertaciji.

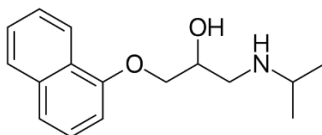
II.2 Pristupi u sintezi molekulski obeleženih polimera

Postoje tri glavna pristupa u sintezi molekulski obeleženih polimera: nekovalentni, semi-kovalentni i kovalentni pristup. Odabir pristupa koji će biti primenjen zavisi od strukture templata i uslova polimerizacije, tj. od interakcija koje templat može da ostvari u datim uslovima. Kod nekovalentnog pristupa, čija primena je danas najrasprostranjenija, interakcije između templata i funkcionalnog monomera su Van der Waals-ove interakcije, vodonične veze, jonski parovi. Nekovalentni pristup je vremenski najmanje zahtevan i najjednostavniji za izvođenje. Kod kovalentnog pristupa, neophodno je napraviti derivat templata i monomera, pri čemu su kovalentne veze između templata i monomera takve da se mogu lako raskinuti i uspostaviti. Nakon polimerizacije, vrši se hidroliza templat-monomer veza, pri čemu ponovno vezivanje templata zahteva i ponovno uspostavljanje kovalentnih veza. Semi-kovalentni pristup, kombinacija dva prethodno navedena, podrazumeva kovalentno vezivanje templata za monomer pre polimerizacije. Nakon polimerizacije, dolazi do hidrolize templat-monomer kovalentnih veza, a ponovno vezivanje templata se zasniva na nekovalentnim interakcijama (Selligren, 2001; Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013; Yan, Ramström, 2005; Kutner, Sharma, 2018; Piletsky, Turner, 2006; Mattiasson, Ye; 2015).

II.2.1 Nekovalentni pristup

Već je rečeno da je nekovalentni pristup najjednostavniji pristup u sintezi MOPa. Jednostavnost ovog pristupa ogleda se u tome što nije neophodno formirati kovalentno jedinjenje između templata i monomera. Na osnovu strukture molekula templata može se odabrati funkcionalni monomer, primenom racionalnog dizajna i računarskih metoda ili koristeći se hemijskom logikom.

Propranolol (**Slika 6**) je jedan od često korišćenih templata u nekovalentnom pristupu molekulskom obeležavanju (Itturalde, 2014). Amino i hidroksilna grupa mogu biti i donori i akceptori vodoničnih veza, dok etarska funkcionalnost može biti akceptor vodonične veze. Naftalenski motiv može ostvarivati π - π interakcije. Imajući u vidu i to da amino grupa ima bazna svojstva, logičan izbor za funkcionalni monomer bilo bi jedinjenje koje sadrži funkcionalnu grupu sa kiselim svojstvima, poput metakrilne kiseline.



Slika 6. Strukturna formula propranolola.

Funkcionalni monomer se, gotovo po pravilu, dodaje u višku u odnosu na količinu templata, kako bi ravnoteža bila pomerena u smeru nastajanja prepolimerizacionog kompleksa (Mattiasson, Ye, 2015). Najčešći odnos količina templata i monomera jeste 1:4, mada se u literaturi može naći opseg odnosa od 1:2 čak i do 1:16 (Serrano et al, 2015; Yoshimatsu, 2012, Nagy-Szakolczai et al, 2018; He et al, 2007).

U zavisnosti od interakcija između templata i monomera, biraju se i uslovi polimerizacije. Polimerizacija se često inicira termalno, zagrevanjem smeše koja sadrži templat, monomer, umreživač, porogen i inicijator, na 60°C (He et al, 2007). Međutim, ukoliko su interakcije između

templata i monomera slabe, može se razmotriti UV inicijacija polimerizacije na sobnoj ili čak sniženoj temperaturi (4°C) (Li et al, 2015; He et al, 2007).

Nakon sinteze nekovalentnog molekularno obeleženog polimera, neophodno je ukloniti molekule templata, kako bi polimer dalje mogao da bude ispitan i primenjen. Templat se može ukloniti ispiranjem odgovarajućim rastvaračem, koji treba da bude takav da naruši interakcije između templata i nastalog polimera. Ukoliko je u pitanju templat koji sadrži bazne funkcionalne grupe i monomer koji sadrži kisele funkcionalnosti (poput metakrilne kiseline, MAA, **Slika 2**) često se primenjuje 10% sirćetna kiselina u metanolu za uklanjanje templata. Uklanjanje templata može biti potpomognuto na različite načine: povećanjem pritiska, mikrotalasima, ultrazvukom, a može se izvoditi i kontinualna čvrsto-tečna ekstrakcija po Soksletu. Kada se templat ukloni, što se proverava analizom sadržaja templata u supernatantu, polimer se suši, po potrebi se vrši frakcionisanje čestica po veličini nakon čega je sintetisani polimer spreman za dalju analizu i upotrebu (Dorko et al, 2017, Nagy-Szakolczai et al, 2018).

Sibrian-Vasquez i Spivak su opisali primenu *N,O*-bismetakriloiletanolamina (NOBE) kao monomera koji je ujedno i umreživač. Ovaj monomer-umreživač primenjen je u sintezi hiralnih molekularno obeleženih polimera (Sibrian-Vasquez, Spivak, 2004).

Prednosti nekovalentnog pristupa su relativno jednostavna sinteza, primenjivost za template veoma različitih struktura, kao i to što je ponovno vezivanje templata za dobijeni polimer brzo. Mane nekovalentnog pristupa su veliki broj nespecifičnih mesta usled upotrebe viška monomera i formiranja prepolimerizacionog kompleksa koji nije dovoljno stabilan (Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013).

II.2.2 Kovalentni pristup

Kovalentni pristup u sintezi molekularno obeleženih polimera, kao što je već rečeno, podrazumeva građenje derivata templata sa monomerom. Najčešće primenjivani derivati su Šifove baze, boronski estri, acetali. Dobijeni derivat se potom polimerizuje u prisustvu odgovarajućeg umreživača. Templat se uklanja hidrolizom kovalentnih veza sa formiranim polimerom, dok je za ponovno vezivanje templata neophodno i ponovno uspostavljanje kovalentnih veza. Ovaj pristup u sintezi naziva se još i 'hemijski' pristup (Selligren, 2001).

Prednosti kovalentnog pristupa su to što se smanjuje heterogenost obeleženih mesta u formiranom polimeru, kao i to što se upotrebljava stehiometrijska količina funkcionalnog monomera. Glavne mane ovog pristupa su što se uvode dodatni koraci u sintezi: neophodno je napraviti derivat templata i funkcionalnog monomera, kao i izvršiti hidrolizu templat-monomer veze nakon sinteze. Uspostavljanje ravnoteže pri ponovnom vezivanju templata može biti sporo, u zavisnosti od veze koja se uspostavlja. Ovaj pristup se može primeniti na ograničen broj templata i funkcionalnih monomera (Alvarez-Lorenzo, 2013).

Sarhan et al. opisali su hiralno razdvajanje bademove kiseline pomoću hiralno obeleženog polimera primenom kovalentnog pristupa. Monomer, 4-vinilfenilboronska kiselina sa templatom, L-bademovom kiselinom, gradi boronat koji se potom polimerizuje u prisustvu umreživača divinilbenzena, dajući kovalentno obeleženi polimer. Hidrolizom boronatnog estera u prisustvu metanola i vode, u polimeru ostaju obeležene šupljine za vezivanje L-bademove kiseline (Sarhan et al, 1989).

II.2.3 Semikovalentni pristup

Semikovalentni pristup kombinuje prednosti prethodno navedenog kovalentnog i nekovalentnog pristupa. Naime, kod semikovalentnog pristupa, prvo se napravi derivat između templata i funkcionalnog monomera, izvrši se polimerizacija, potom se (selektivno) hidrolizuje veza

između templata i funkcionalnog monomera, a ponovno vezivanje templata se dešava usled nekovalentnih interakcija. Semikovalentni pristup se najčešće koristi u slučajevima kada templat ne sadrži dovoljno funkcionalnosti da nastane stabilan prepolimerizacioni kompleks, pa bi bilo potrebno primeniti veliki višak monomera kako bi se favorizovalo nastajanje kompleksa. Neki od primera opisanih u literaturi su MOPi za steroide (Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013; Sellergren, 2001; Sajini et al, 2021). Jedan od primera semi-kovalentnog pristupa jeste dobijanje semi-kovalentnih obeleženih polimera za testosteron. Sintetisan je testosteron-metakrilat koji je potom u prisustvu EDMA polimerizovan dajući obeleženi polimer. Potom je izvršena hidroliza templata iz dobijenog polimera, primenjujući baznu hidrolizu estara, pri čemu u polimeru zaostaje obeleženo mesto sa metakrilnom kiselinom u koje se potom može vezati testosteron nekovalentnim interakcijama (Cheong et al, 1997).

Prednosti semikovalentnog pristupa su, kao i kod kovalentnog, homogenost vezivnih mesta, smanjenje nespecifičnih interakcija, kao i brza kinetika vezivanja što je karakteristika nekovalentnog pristupa. Mane semikovalentnog pristupa su, kao i kod kovalentnog, uvođenje dodatnih koraka u sintezi, poput sinteze templat-monomer derivata i hidroliza veze templat-monomer nakon sinteze polimera (Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013).

II.3 Tehnike polimerizacije i fizičke forme polimera

Polimerizacija se može izvršiti na različite načine što za posledicu ima različite oblike polimera i polimernih čestica koje se mogu dobiti. Sve veća primena MOPa u različitim oblastima za posledicu ima i razvoj tehnika polimerizacije i oblika polimera koji su neophodni. Dobijanje monolitnih polimera, polimernih filmova, sfernih čestica ili core-shell čestica značajno proširuje mogućnosti primene MOPa.

Polimerizacija u masi predstavlja najčešće primenjivanu tehniku polimerizacije u hemiji MOPa. Ovom tehnikom polimerizacije dobijaju se monolitni polimeri koji se po potrebi mogu usitniti do čestica odgovarajuće veličine. Polimerizacija u masi se izvodi zapravo iz koncentrovanih rastvora komponentni u porogenu, pri čemu ukupni udeo monomera i umreživača ne prelazi 5% (masenih). Polimerizacija može biti termalno ili fotohemijski inicirana (retko γ -zracima), a trajanje polimerizacije je najčešće 18-24 sati. Usitnjavanjem dobijenog monolita, ispiranjem templata i sejanjem, dobijaju se čestice nepravilnog oblika. Glavni nedostatak polimerizacije u masi predstavlja široka raspodela veličine čestica nakon usitnjavanja kao i njihov nepravilni oblik. Značajno je napomenuti da prilikom usitnjavanja polimera dolazi do delimičnog uništavanja obeleženih mesta što nepovoljno utiče na selektivnost i kapacitet vezivanja. *In situ* polimerizacija u nastavcima za automatske pipete ili hromatografskim kolonama može doprineti eliminisanju nekih od prethodno pomenutih nedostataka (He et al, 2021; Pratiwi et al, 2019; Sajini et al, 2021).

Ukoliko je za primenu MOPa neophodno dobiti čestice definisanog oblika i veličine, kao što je to slučaj u ekstrakciji čvrstom fazom (SPE – solid-phase extraction) ili hromatografiji, polimerizacija u masi ne može ispuniti ove zahteve, te se primenjuju druge tehnike polimerizacije poput taložne polimerizacije. Taložna polimerizacija izvodi se iz razblaženih rastvora komponenti u porogenu, tako da je udeo komponenti koje polimerizuju manji od 5% (m/v). Uz ravnomerno mešanje smeše, moguće je dobiti sferne čestice sličnih veličina. Prednost ovako dobijenih polimera jeste što nema uništavanja obeleženih mesta usled usitnjavanja, dobijene čestice imaju i veću površinu što utiče na veći kapacitet vezivanja (Sajini et al, 2021).

Postoje brojne druge tehnike polimerizacije koje se mogu primeniti za dobijanje MOPa željenih karakteristika. Suspenzionom polimerizacijom mogu se dobiti čestice prečnika nekoliko desetina mikrometara. Polimerizacija se može izvesti i na pre-formiranim česticama poput čestica

magnetita ili silika česticama. Postoje i tehnike polimerizacije koji omogućavaju dobijanje polimernih membrana, kao i nanoštapića (Sellergren, 2001; Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013).

II.4 Proučavanje prepolimerizacionog kompleksa

Karakterizacija prepolimerizacionog kompleksa značajna je za optimizaciju sinteze polimera u cilju određivanja optimalnog odnosa količine templata i funkcionalnog monomera prilikom polimerizacije. Pojedine tehnike, poput NMR spektroskopije mogu rasvetliti strukturu prepolimerizacionog kompleksa, tj. dati odgovor na pitanje kako je orjentisan funkcionalni monomer oko molekula templata. Najčešće primenjivane tehnike u tumačenju sastava i strukture prepolimerizacionog kompleksa su UV Vis spektrofotometrija, konduktometrija i NMR spektroskopija (Hasanah et al, 2021).

II.4.1 Konduktometrijsko proučavanje prepolimerizacionog kompleksa

Konduktometrijski se sastav prepolimerizacionog kompleksa može proučavati ukoliko tokom građenja istog dolazi do nastajanja jonskih parova tj. dolazi do jonizacije neke od komponenti prepolimerizacione smeše. Jedna od uobičajenih konduktometrijskih analiza koja se može izvesti jeste konduktometrijska titracija templata funkcionalnim monomerom. Templat, rastvoren u porogenu i u prisustvu umreživača, biva titrovani funkcionalnim monomerom ili rastvorom monomera, pri čemu dolazi do interagovanja sa molekulima templata uz nastajanje prepolimerizacionog kompleksa. Iz zavisnosti provoljivosti od količine dodatog templata, može se odrediti optimalni odnos templat/monomer (Nagy-Szalkolczai et al, 2018).

II.4.2 UV Vis spektroskopija

Ukoliko prilikom interakcija monomera sa templatom dolazi do promena u UV Vis spektrima bilo koje od ovih komponenti, UV Vis spektroskopija se može primeniti za ispitivanje ovih interakcija. Koristeći podatke dobijene iz UV Vis spektrofotometrijskih titracija može se izračunati odrediti stehiometrija i konstanta asocijacije templat-monomer kompleksa, primenom Benesi-Hildebrand jednačine. Veća konstanta asocijacije trebalo bi da uslovi i nastajanje polimera sa većim aifinitetom ka templatu, ali ovo nije uvek slučaj (Hasanah et al, 2021; Fu et al, 2015; Hasanah et al, 2019).

II.4.3 NMR spektroskopija

NMR spektroskopija daje veoma detaljne informacije o strukturi prepolimerizacionog kompleksa. Promene hemijskog pomeranja u NMR spektrima templata usled dodatka funkcionalnog monomera omogućavaju da se utvrdi koji delovi molekula templata interaguju sa funkcionalnim monomerom i na koji način. Moguće je izvesti i NMR titraciju, tj. dodavati sve veće količine funkcionalnog monomera i pratiti kako dolazi do promena u hemijskom pomeranju. Prednost NMR spektroskopije je u tome što se iz jednog seta eksperimenata može izvesti nekoliko setova rezultata, ukoliko se signali određenih protona ili ugljenika posmatraju odvojeno, čime se povećava pouzdanost određivanja. Dodatna prednost je u tome što postoji mogućnost upotrebe deuteroanaloga funkcionalnih monomera, što pojednostavljuje izgled spektra, npr. umesto 4-vinilpiridina moguće je koristiti deuteropiridin, a umesto metakrilne kiseline moguće je koristiti deuteriosirćetnu kiselinu (Hasanah et al, 2021; Sanchez-Gonzalez, 2019; Ansell et al, 2005; O'Mahony et al, 2005; Del Sole et al, 2009; Shoravi et al, 2014).

NMR spektroskopija veoma je korisna i pri proučavanju prepolimerizacionih kompleksa templata sa ciklodekstrinima, gde je moguće utvrditi kako je molekul templata orjentisan u ciklodekstrinskoj šupljini.

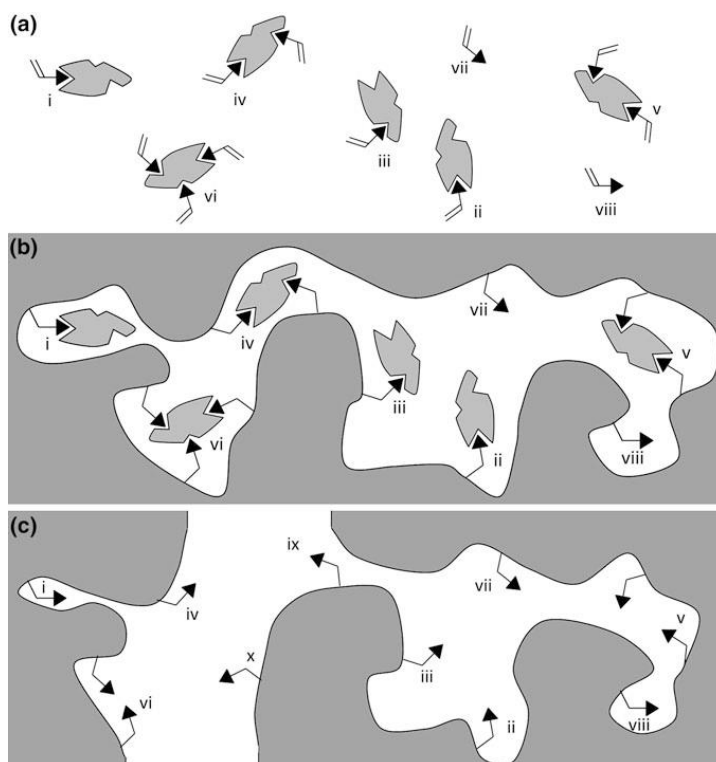
Sem navedenih, za proučavanje prepolimerizacionog kompleksa koriste se još i fluorescentna spektroskopija, infracrvena spektroskopija, ramanska spektroskopija. (Hasanah et al, 2021).

II.5 Svojstva i karakterizacija vezivnih mesta

Kao što je već rečeno, jedna od osnovnih karakteristika vezivnih mesta molekularno obeleženih polimera jeste njihova heterogenost, koja potiče od različitog rasporeda monomera unutar vezivnog mesta u polimeru. Ukoliko bi se poredio afinitet vezivnih mesta u polimeru sa karakteristikama antitela, MOPi bi bili analogni poliklonskim, a ne monoklonskim antitelima. Načelno, možemo podeliti vezivna mesta na mesta visokog afiniteta i mesta niskog afiniteta. Mesta niskog afiniteta prisutna su i u obeleženom i u neobeleženom polimeru i nastaju nasumičnom orijentacijom monomera i umreživača prilikom polimerizacije.

Kod polimera dobijenih nekovalentnim pristupom, postojanje mesta različitih afiniteta direktna je posledica stabilnosti prepolimerizacionog kompleksa, kao i odnosa količina upotrebljenih funkcionalnog monomera i templata tokom sinteze. Veća stabilnost prepolimerizacionog kompleksa uz manju količinu funkcionalnog monomera znači veći udeo mesta visokog afiniteta u ukupnom vezivnom kapacitetu. U zavisnosti od tehnike polimerizacije, mesta niskog afiniteta mogu se javiti i na površini sfernih čestica (ukoliko je u pitanju npr. taložna polimerizacija) ili mogu nastati usitnjavanjem polimera (nakon polimerizacije u masi). Mestima visokog afiniteta smatraju se mesta koja su nastala uklanjanjem (ispiranjem) templata iz obeleženog polimera nakon polimerizacije. Mesta visokog afiniteta obično su i selektivnija za vezivanje templata u odnosu na druge, slične molekule, dok mesta niskog afiniteta pokazuju manju selektivnost (Sellergren, 2001; Mattiasson, Ye, 2015; Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013; Yan, Ramström, 2005).

Na **Slici 7** shematski su predstavljene probleme do kojih može doći prilikom sinteze, a potom i tokom obrade polimera i ispiranja templata.



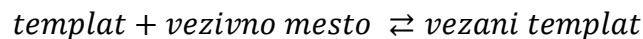
Slika 7. Poreklo heterogenosti obeleženih mesta: a) vrste kompleksa prisutne u prepolimerizacionoj smeši, b) nastali umreženi polimer, c) polimer nakon uklanjanja templata, sa mestima različitog afiniteta. Preuzeto iz Characterization of the Binding Properties of Molecularly Imprinted Polymers (Ansell, 2015) (u okviru Mattiasson, Ye, 2015).

Posmatrajući deo slike (a) vidi se da u prepolimerizacionoj smeši postoje kompleksi monomera i templata različitog stehiometrijskog sastava (1:1, 2:1, 3:1) i slobodni molekuli funkcionalnog monomera. Ukoliko se posmatra nastali polimer pre (b) i nakon ispiranja templata (c), može se videti da mesta **i** i **ii** koja su pre ispiranja bila identična, sada se razlikuju usled okruženja u kome se nalaze; isto važi i za mesta **iv** i **v**, kao i za mesta **vii** i **viii**. U ispranom polimeru (c) došlo je do urušavanja obeleženog mesta **i**, kao i do oštećenja mesta **iv** i **vi** do kojih je došlo usitnjavanjem polimera. Mesta **ix** i **x** predstavljaju mesta niskog afiniteta za vezivanje templata.

Karakterizacija vezivnih mesta može se izvršiti eksperimentima vezivanja tj. adsorpcije templata iz rastvora, na čvrsti polimer (Ansell, 2015; Dorko et al, 2015).

II.5.1 Afinitet vezivnih mesta

Vezivanje templata za polimer može se predstaviti ravnotežom:



Za koju je konstanta ravnoteže tj. konstanta vezivanja, K_a (izražena u M^{-1}), predstavljena jednačinom (1):

$$K_a = \frac{n_{\text{vezano}}}{n_{\text{slobodno}} \times F} = \frac{1}{K_d} \quad (1)$$

gde je K_d konstanta disocijacije izražena u M , n_{vezano} količina vezanog templata za polimer (mol), n_{slobodno} količina slobodnih mesta u polimeru (mol), a F slobodna koncentracija templata u rastvoru nakon vezivanja (M). Jednačina (1) važi u slučaju da su sva vezivna mesta u polimeru identična.

Kako mesta u polimeru nisu ekvivalentna, svako vezivno mesto ima svoju konstantu vezivanja. Ovo predstavlja problem kada je potrebno izračunati kapacitet polimera, zbog čega se često računa procenat vezivanja templata ili distribicioni faktor D , koji važi za definisane eksperimentalne uslove (2):

$$D = \frac{B}{F} = \frac{n_{\text{vezano}}/m_{\text{MOP}}}{n_{\text{slobodno}}/V} \quad (2)$$

gde je D distribicioni faktor (L/g), B koncentracija vezanog analita (mol/g), m masa polimera (g), V zapremina rastvora templata (ili kompetitora) (L), a n_{slobodno} količina templata u rastvoru nakon vezivanja (mol) (Mattiasson, Ye, 2015).

II.5.2 Selektivnost vezivnih mesta

Postojanje obeleženih mesta najčešće se utvrđuje poređenjem vezivanja templata za obeleženi polimer sa vezivanjem za neobeleženi polimer. Faktor obeležavanja (IF) može se izračunati kao odnos distribicionih faktora za MOP i NOP (3) (Yan, Ramström, 2005; Mattiasson, Ye, 2015, Becskereki et al, 2021):

$$IF = \frac{D_{\text{MOP}}}{D_{\text{NOP}}} \quad (3)$$

IF treba da ima vrednost veću od 1 da bi se moglo reći da je obeležavanje uspešno izvedeno. Što je veći IF to je veća razlika u vezivanju između obeleženog i neobeleženog polimera, tj. obeležavanje je uspešnije (Yan, Ramström, 2005; Mattiasson, Ye, 2015).

Međutim, visok IF ne mora da znači da će polimer selektivno vezivati templat u odnosu na kompetitore, već samo da MOP vezuje templat bolje od NOPa. Faktor selektivnosti, α , poredi selektivnost vezivanja templata u odnosu na kompetitor, za obeleženi polimer (4):

$$\alpha = \frac{D_{\text{templat, MOP}}}{D_{\text{kompetitor, MOP}}} \quad (4)$$

Što je faktor selektivnosti, α , ima višu vrednost, to MOP bolje vezuje templat u odnosu na kompetitore (Yan, Ramström, 2005; Mattiasson, Ye, 2015).

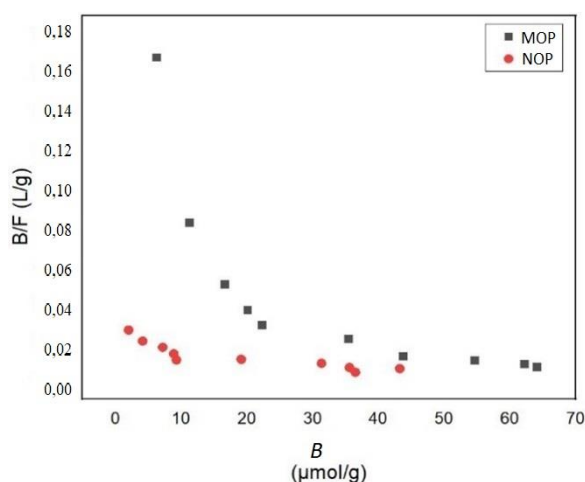
II.5.3 Adsorpcione izoterme

Tumačenje svojstava polimera na osnovu procenta vezivanja templata ili na osnovu distribucionog faktora, često nije dovoljno dobro jer navedeni faktori ne važe u opštem slučaju, već samo za primenjene eksperimentalne uslove, pri upotrebi iste mase polimera i iste zapremine rastvora templata određene koncentracije. Iz navedenih razloga, informativnije i pouzdanije je da se odrede adsorpcione izoterme: za fiksnu masu polimera, odredi se vezivanje templata u odabranom opsegu koncentracija. Dobijeni podaci mogu se prikazati grafički i na njih se može, ali ne mora, primeniti neki od modela adsorpcije. Da bi izoterma bila validna, neophodno je da temperatura pri vezivanju bude konstanta, a podrazumeva se i da se vezivanje izvodi iz istog rastvarača pri konstantnoj kiselosti sredine (Yan, Ramström, 2005; Mattiasson, Ye, 2015; Martinez Saavedra et al, 2018; Panahi et al, 2008).

Jedan od korisnih modela za modelovanje adsorpcije templata na polimer jeste *Scatchard*-ov model, proistekao iz *Langmuir*-ovog modela, koji je predstavljen izrazom (5):

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_d} \times B + \frac{B_{\text{max}}}{K_d} \quad (5)$$

Grafik B/F u zavisnosti od B trebao bi da pokazuje linearnu zavisnost, pri čemu je koeficijent pravca prave $-1/K_d$, a odsečak B_{max}/K_d . Primer *Scatchard*-ovog grafika prikazan je na **Slici 8**. Za neobeleženi polimer, ovakav grafik bi trebalo da je linearan u celom opsegu, ukazujući na postojanje samo jednog tipa vezivnih mesta – mesta niskog afiniteta za vezivanje templata. Sa druge strane, grafik za MOP drugačijeg je izgleda, obično se aproksimira sa dve linearne zavisnosti izrazito različitih koeficijenata pravca iz kojih se mogu dobiti podaci o razlikama u vezivanju templata za mesta visokog i niskog afiniteta. Iako se dosta primenjuje, *Scatchard*-ov grafik često ne daje zadovoljavajuće rezultate (Mattiasson, Ye, 2015).



Slika 8. Primer *Scatchard*-ove izoterme. Preuzeto iz Marušić, 2021.

Ukoliko se za model vezivanja primeni *Freundlich*-ova izoterma, prednost je mogućnost linearizacije i konstruisanje tzv. log-log izoterme. U ovom slučaju, zavisnost se može prikazati kao (6):

$$\log B = \log A + m \times \log F \quad (6)$$

gde su A (mL/mg) i m (bezdimenziona veličina) empirijske konstante. Veličina m se može tumačiti kao mera heterogenosti vezivnih mesta, ukoliko je $m=1$, znači da su vezivna mesta homogena. Ovi parametri se mogu povezati sa gustinom vezivnih mesta i konstantama disocijacije, K_d , ali je ova zavisnost složena (Mattiasson, Ye, 2015, Dorko et al, 2017).

Karakterizacija vezivnih mesta može se izvesti eksperimentima vezivanja, ali i frontalnom hromatografijom, zonskom hromatografijom, kalorimetrijski, radiometrijski (Mattiasson, Ye, 2015, Li et al, 2015).

II.6 Fizička karakterizacija polimera

Karakterizacija polimera može se izvršiti na više načina, primenom hemijskih ili fizičkih metoda. Fizičkim metodama karakterizacije neophodno je izvršiti analizu veličine čestica, termičku analizu, određivanje specifične površine pomoću fizisorpcije azota ili živine porozimetrije. Hemijske metode karakterizacije omogućavaju određivanje sastava polimera, kapaciteta i afiniteta vezivnih mesta, selektivnosti. U hemijske metode karakterizacije ubrajaju se infracrvena spektroskopija, nuklearna magnetna rezonancija čvrstog stanja, elementalna analiza. Karakterizacija vezivnih mesta može se izvršiti adsorpcionim eksperimentima (Selligren, 2001).

II.6.1 Infracrvena spektroskopija

Primena infracrvene spektroskopije za karakterizaciju polimera ogleda se u mogućnosti analize sastava polimera, utvrđivanja prisustva zaostalih dvostrukih veza, kao i eventualnom utvrđivanju interakcija između templata i polimera. Prednost infracrvene spektroskopije u analizi polimera jeste i jednostavnost izvođenja tj. snimanja spektara; snimanje ATR-FTIR spektara je veoma jednostavno i brzo i praktično ne zahteva pripremu uzorka (Fu et al, 2015; Hasanah, 2021).

Stepen polimerizacije može se utvrditi posmatranjem traka na 1639 cm^{-1} koje potiču od C=C veza, dok se frekvencija vibracije karbonilne grupe ($1650\text{-}1850\text{ cm}^{-1}$) može povezati sa vodoničnim vezivanjem. Poređenjem infracrvenih spektara NOPa i MOPa nakon uklanjanja templata, može se zaključiti da li je proces polimerizacije protekao identično, tj. da li je sastav dobijenih polimera isti (Alvarez-Lorenzo, Concheiro, 2013).

II.6.2 Elementalna analiza

Elementalna analiza može biti značajna u analizi uspešnosti polimerizacije. Elementalni sastav polimera može se uporediti sa sastavom monomera i umreživača koji su stupili u reakciju. Ukoliko funkcionalni monomer sadrži npr. azot, a preostale komponente ga ne sadrže, moguće je na osnovu elementalnog sastava izračunati procenat funkcionalnog monomera u polimeru, a samim tim i maksimalni kapacitet vezivanja. Elementalnom analizom moguće je utvrditi i prisustvo templata u polimeru, mada osetljivost ove metode može predstavljati problem. Elementalna analiza danas se može izvesti kao deo SEM analize, u sklopu SEM-EDX (Fu et al, 2021; Saldivar Guerra, 2013).

II.6.3 Morfološka karakterizacija

II.6.3.1 Mikroskopija

Mikroskopija se često primenjuje u analizi MOPa. Može se primeniti optička mikroskopija, skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), transmisiona elektronska mikroskopija (TEM), a ponekada i mikroskopija atomskih sila (AFM). Najčešće se u analizi polimera koristi SEM koji pruža informacije o veličini čestica i njihovoj površini. Pri uvećanjima od nekoliko desetina hiljada puta, mogu se uočiti razlike u morfologiji MOPa i NOPa, ukoliko ih ima. Kao što je već rečeno, danas se koristi i SEM-EDX. Za analizu polimera može se primeniti i TEM, mada je skuplji i rezultate je teže

interpretirati nego u slučaju SEM. Za SEM i TEM analizu potrebno je svega nekoliko miligrama polimernog materijala (Pratiwi et al, 2019; Yang et al, 2015; Liu et al, 2019).

II.6.3.2 Fizisorpcija azota i živina porozimetrija

Fizisorpcija gasova može se primeniti u analizi specifične površine, veličine pora i poroznosti polimera. Određivanje fizisorpcije gasova se izvodi tako što se suvom uzorku koji se nalazi u vakuumu dovodi gas pod pritiskom. Nakon uspostavljanja ravnoteže, postupak se ponavlja. Na ovaj način omogućeno je konstruisanje zavisnosti dodate zapremine gasa od relativnog pritiska što predstavlja adsorpcionu izotermu. Oblik dobijene adsorpcione izoterme zavisi od teksturalnih karakteristika površine polimera. Pored fizisorpcije gasova (najčešće azota) može se koristiti i živina porozimetrija, gde, pod pritiskom, živa prodire u pore polimera. Mana živine porozimetrije u analizi obeleženih polimera jeste što može doći do urušavanja pora usled velikog pritiska žive. Za određivanje specifične površine polimera najčešće se koristi *Brunauer-Emmett-Teller* metod. Specifična površina, izražena u m^2/g , daje informaciju o tome da li je polimer mikroporozan, mezoporozan ili makroporozan. Podaci o specifičnoj površini i poroznosti polimera mogu pružiti značajne informacije o potencijalu polimera za vezivanje. Veća specifična površina najčešće znači i veći vezivni kapacitet (Sellergren, 2001; Singh et al, 1985; Lowell et al, 2004; Wei et al, 2007; Fu et al, 2015).

II.6.4 Termička analiza

Molekulski obeleženi polimeri mogu se analizirati i primenom metoda termičke analize, najčešće primenom termogravimetrije (TGA) i diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC). Termogravimetrijskom analizom se ispituje promena mase polimera sa promenom temperature. Analiza dobijenih termograma za NOPE i MOPe daje podatke o eventualnom sadržaju vlage u polimeru i o termičkoj stabilnosti polimera. DSC analiza entalpijskih promena može dati podatke o fizičkim ili hemijskim promenama do kojih dolazi u polimeru (Cowie, 1991; Sellergren, 2001).

II.7 Primena molekulski obeleženih polimera

Molekulski obeleženi polimeri mogu biti primenjeni u različitim oblastima hemije, poput analitičke, organske, biohemije itd. Rasprostranjena primena molekulski obeleženih polimera rezultat je njihovih povoljnih karakteristika poput jednostavnog dobijanja, hemijske inertnosti, selektivnosti, afiniteta za vezivanje templata i mogućnosti ponovnog korišćenja. Oblasti gde se MOPi intenzivno primenjuju su ekstrakcija čvrstom fazom, hromatografija, senzori, kontrolisano otpuštanje lekova, a primenjuju se i kao veštački enzimi i sintetički receptori (Li et al, 2016; Liu et al, 2021; Kutner, Sharma, 2018; Haupt, 2012).

II.7.1 Primena MOPa u ekstrakciji čvrstom fazom

Priprema uzorka jedna je od kritičnih tačaka u izvođenju bilo kakve analize realnih uzoraka. U ekstrakciji analita iz realnog uzorka često se koriste sorbenti koji sadrže C18 ili aminopropil modifikaciju silika gela, kao i druge materijale koji nespecifično vezuju različite molekule iz uzorka, umanjujući željeni efekat izdvajanja analita iz matriksa. MOPi svojom selektivnošću prema vezivanju templata mogu nadomestiti neke od nedostataka klasičnih SPE sorbenata. Uz to, njihova hemijska, mehanička i termička stabilnost, zajedno sa mogućnošću čuvanja u ambijentalnim uslovima, čini ih poželjnim sorbentima u pripremi uzoraka (Yan, Ramström, 2005). Na tržištu postoji više komercijalno dostupnih MOPa za ekstrakciju čvrstom fazom poput SupelMIP (izvor: <http://www.sigmaaldrich.com>).

Idealni MOP za primenu u SPE trebalo bi da ima veliki afinitet prema vezivanju templata, specifičnost i kapacitet, brzi transfer mase, kompatibilnost sa različitim rastvaračima, kao i stabilnost

u dužem vremenskom periodu. Minijaturizacija sinteze polimera omogućava primenu MOPa u mikroekstrakciji (Yan, Ramström, 2005).

Primena MOPa za SPE opisana je u literaturi za brojne analite i različite matrikse, poput ibuprofena u rečnim vodotokovima (Caro et al, 2006), kokaina u kosi (Thibert et al, 2012), metamfetamina u urinu (Djozan et al, 2012), mikotoksina u žitaricama (Lucci et al, 2010), teofilina u ljudskom krvnom serumu (Khorrami, Rashidpur, 2009), parabena u zemljištu i morskom sedimentu (Núñez et al, 2010), atrazina u voću i povrću (Mhaka et al, 2009).

II.7.2 Primena MOPa za kontrolisanu dostavu i otpuštanje lekova

Kontrolisana dostava i otpuštanje lekova značajni su zbog toga što proširuju mogućnosti klasične primene lekova. Potreba da se pronađu selektivni polimeri sa velikim kapacitetom i afinitetom prema aktivnom farmaceutskom sastojku, uvela je upotrebu MOPa u kontrolisano otpuštanje i dostavu lekova. MOPi, zbog svoje selektivnosti, stabilnosti i biokompatibilnosti postali su značajni nosači u dostavi lekova. U literaturi je opisano mnogo primera primene MOPa u ovoj oblasti, poput primene MOPa za dermalnu primenu, za kontrolisanu dostavu antikancerskih agenasa, kao mekih kontaktnih sočiva za dostavu oftalmoloških lekova (Liu et al, 2021).

II.7.3 Primena MOPa u hromatografiji

Imajući u vidu prirodu MOPa i vezivnih mesta koja poseduje, hromatografija zasnovana na MOPima, slična je afinitetnoj, tj. imunoafinitetnoj hromatografiji. Prednosti primene MOPa kao pseudoimunoafinitetnih sorbenata u odnosu na klasičnu imunoafinitetnu hromatografiju jesu manja cena proizvodnje i primene, velika otpornost na uslove denaturacije (već pomenuta hemijska stabilnost), kao i reproducibilnost pri sintezi. Stabilnost MOPa pri različitim pH vrednostima, uz slabo izraženo bubrenje pri upotrebi različitih rastvarača i različitim koncentracijama soli, proširuje mogućnosti primene MOPa u hromatografiji (Yan, Ramström, 2005).

Stacionarna faza u hromatografiji bi trebalo da sadrži monodisperzne čestice reda veličine mikrometra, uobičajeno prečnika 2-10 μm , ali nekada i do nekoliko desetina mikrometara i po mogućstvu pravilnog tj. sfernog oblika, kako bi razdvajanje bilo ravnomerno u celoj masi stacionarne faze. Čestice odgovarajućih veličina MOPa mogu se dobiti primenom tehnika polimerizacije iz razblaženih rastvora poput taložne polimerizacije, ređe se primenjuje i polimerizacija u masi. Sem monodisperznih čestica, moguće je napraviti i monolitne kolone, gde se polimerizacija izvodi direktno u nosaču stacionarne faze. Alternativa navedenim načinima sinteze može biti površinska polimerizacija na pre-formiranim česticama silika gela ili stiren-divinilbenzen polimerima (Yan, Ramström, 2005).

Mogućnost dobijanja hiralnih MOPa značajna je za primenu ovih sorbenata kao stacionarnih faza u hromatografiji. Uspešno obeležavanje polimera jednim enantiomerom odabranog templata ima za posledicu mogućnost razdvajanja racemske smeše primenom dobijenog polimera. Nedostaci MOPa pri primeni u hromatografiji jesu pre svega jako izražena asimetrija pika (tzv. 'peak tailing'), kao i širenje hromatografskih zona što otežava razdvajanje (Meng et al, 1999; Sellergren, Shea, 1993, Sellergren, 1989; Andersson et al, 1990; Fischer et al, 1991).

II.7.4 Primena MOPa u drugim oblastima

MOPi se mogu napraviti u obliku membrane, te se mogu primeniti u brojnim sensorima poput konduktometrijskih i potenciometrijskih senzora. Elektropolimerizacijom monomera poput pirola ili anilina u prisustvu odgovarajućeg templata mogu se dobiti modifikovane elektrode koje se mogu primenjivati kao voltametrijski senzori. Takođe, MOPi se mogu primeniti za modifikaciju elektroda za kvarcne mikrovage (Kutner, Sharma, 2018).

Mogućnost hiralne diskriminacije uz veliku selektivnost MOPa, dovela je do razvoja MOPa koji se mogu koristiti kao mikroreaktori ili veštački enzimi (Li et al, 2016).

II.8 Molekulski obeleženi polimeri za steroidne molekule

Imajući u vidu sve što je do sada rečeno o primeni MOPa, jasno je da MOPi za steroide mogu značajno olakšati pripremu realnih uzoraka. Međutim, tehnologija molekulskog obeležavanja najbolje rezultate daje za template koji mogu da ostvaruju jonske interakcije sa monomerima, što sa steroidnim molekulima (sa izuzetkom žučnih kiselina i njihovih derivata) nije slučaj. Većina steroidnih molekula sadrži hidroksilne ili karbonilne grupe u različitim položajima skeleta, što mogućnost uspostavljanja interakcija sa molekulima funkcionalnih monomera svodi na samo formiranje vodoničnih veza. Dodatna otežavajuća okolnost jeste veliki hidrofobni ugljovodonični skelet koji jedino hidrofobne interakcije može da ostvaruje sa monomerom, umreživačem i nastajućim polimerom. Radovi koji opisuju nekovalentni pristup u sintezi MOPa za steroide, uglavnom se svode na primenu različitih monomera koji mogu da ostvaruju vodonične veze sa templatima. Najčešće korišćeni monomeri su MAA, 4VP, HEMA (**Slika 2**). Kao umreživači su korišćeni uglavnom EDMA i DVB (**Slika 3**). (Shi et al, 2006; Hwang i Lee, 2002; Hashim et al, 2016; Hashim et al, 2014).

Shi et al. opisali su nekovalentni pristup za dobijanje MOPa za holesterol. Polimeri su dobijeni UV iniciranjem polimerizacijom na 4°C uz MAA i EDMA u smeši hloroforma i toluena kao porogenu. Vezivanje templata za polimere je ispitano koristeći rastvor holesterola u toluenu. Izračunato je obeležavanjem-indukovano poboljšanje vezivanja kako za holesterol, tako i za estradiol i estron. Optimizovana je MISPE (molecularly imprinted solid phase extraction) koristeći heksan kao rastvarač za nanošenje uzorka, heksan i heksan/toluen 9/1 za ispitivanje i, finalno, hloroform/etanol/sirćetna kiselina 3/1/1 za eluiranje. Ovi eksperimenti su izvedeni koristeći rastvor holesterola 50 µg/mL (Shi et al, 2006).

Hwang i Lee opisuju primenu nekovalentnim pristupom dobijenih obeleženih polimera za holesterol za hromatografsko razdvajanje holesterola i srodnih jedinjenja. Pomoću hromatografskih kolona kod kojih je kao stacionarna faza korišćen obeleženi polimer omogućeno je razdvajanje holesterola od estradiola. Veličine čestica kojima su punjene hromatografske kolone bile su 25-44 µm. Pokazano je da adsorpcioni kapacitet polimera značajno zavisi od primenjenog funkcionalnog monomera. MOPi su dobijeni koristeći MAA i 4VP kao funkcionalne monomere, EDMA kao umreživač, dok je kao porogen korišćen hloroform uz fotoinicijaciju polimerizacije. Sintetisani su i semi-kovalentnim pristupom obeleženi polimeri, gde je kao monomer korišćen holesteril-(4-vinil)fenilkarbonat. Adsorpcioni kapaciteti dobijenih polimera bili su 95, 73 i 65 µmol/g za semi-kovalentni polimer, MOP sa 4VP i MOP sa MAA, respektivno. Polimeri dobijeni sa 4VP kao funkcionalnim monomerom imali su duža retenciona vremena za estradiol i holesterol u odnosu na ostale polimere. Retencioni faktori za holesterol na ovim kolonama bili su u 3,5; 4,0; i 3,1 za semi-kovalentni, 4VP MOP i 4VP MOP respektivno. Selektivnost za razdvajanje holesterola od estradiola, za navedena tri polimera bila je 3,2; 3,0 i 2,9, ukazujući da su mehanizmi razdvajanja na svim polimerima slični (Hwang i Lee, 2002).

Hashim et al. su opisali i primenu semi-kovalentnog pristupa u sintezi MOPa za ergosterol. Kao monomer-templat derivat korišćen je ergosteril-metakrilat, korišćeni umreživač je bio EDMA, porogen hloroform, a polimerizacija je termalno inicirana pomoću AIBN. Nakon polimerizacije, templat je uklonjen hidrolizom u 1 M NaOH u metanolu, tokom 48 sati, nakon toga je ispran razblaženom HCl u metanolu. Ponovno vezivanje templata za polimere ispitano je u heksanu, acetonitrilu i etanolu. Autori navode da hloroform vodi delimičnom rastvaranju polimera, pa su prethodno navedeni rastvarači bili bolji izvor jer u njima nije dolazilo do velikog bubrenja. Najveće

razlike u vezivanju templata za MOP i NOP dobijene su u acetonitrilu. Kapacitet vezivanja je veći u heksanu nego u ACN, ali je razlika između MOP i NOP zanemarljiva. Selektivnost dobijenih polimera ispitana je pri vezivanju ergosterola, holesterola i stigmasterola iz rastvora koncentracije 0,1 mM u acetonitrilu. Kapaciteti MOPa bili su približno 0,7; 0,5 i 0,6 $\mu\text{mol/g}$, a NOPa 0,2; 0,15 i 0,15 $\mu\text{mol/g}$ za vezivanje ergosterola, holesterola i stigmasterola, ukazujući na slabu, ali postojeću selektivnost obeleženih polimera (Hashim et al, 2016).

Hashim et al. su opisali primenu nekovalentnog i semi-kovalentnog pristupa u sintezi MOPa za stigmasterol. Za nekovalentni pristup, MAA i 4VP su korišćeni kao funkcionalni monomeri dok je EDMA korišćen kao umreživač. Polimeri su sintetisani u hloroformu, uz termalnu inicijaciju pomoću AIBN. Za polimer gde je MAA bila funkcionalni monomer, korišćen je molski odnos templata, monomera i umreživača 1:1:5, dok je za 4VP polimer primenjeni odnos bio 1:10:100. Kod semikovalentnog pristupa, korišćeni templat-monomer derivat bio je stigmasteril-metakrilat, uz 10 puta veću količinu EDMA. EDMA homopolimer korišćen je kao NOP, za semi-kovalentno obeleženi polimer, uz prethodnu hidrolizu pri istim uslovima pri kojima je hidrolizovan MOP. Ponovno vezivanje templata za dobijene nekovalentno obeležene polimere ispitano je koristeći 0,1 mM rastvora stigmasterola u etanolu, metanolu, acetonitrilu, hloroformu i heksanu. Za semi-kovalentno obeležene polimere, vezivanje je ispitano u heksanu, etanolu, acetonitrilu i smešama acetonitrila i vode u zapreminskim odnosima 7/3, 8/2 i 9/1, dok je koncentracija rastvora templata, kao i u prethodnom slučaju bila 0,1 mM. Autori tvrde da su primenom nekovalentnog pristupa dobijeni polimeri kod kojih nema efekta obeležavanja, nezavisno od primenjenog funkcionalnog monomera i rastvarača koji je korišćen za ponovno vezivanje. U slučaju polimera sa MAA, navodi se da je potencijalni razlog to što je primenjena stehiometrijska količina MAA. Polimeri sa 4VP imaju veće adsorpcione kapacitete za vezivanje templata u heksanu i hloroformu, u odnosu na MAA polimere, što se objašnjava primenom desetostruke količine monomera pri sintezi i primenom rastvarača koji favorizuju vodonično vezivanje. Navodi se da je potencijalni razlog za neuspešno obeležavanje termalna inicijacija polimerizacije, imajuću u vidu očekivanu malu stabilnost prepolimerizacionog kompleksa. Dodatak vode u ACN prilikom eksperimenata vezivanja imao je za cilj da poveća uticaj hidrofobnih interakcija između nepolarnog steroidnog jezgra i komplementarne 3D šupljine u polimeru (Hashim et al, 2014).

Whitcombe prvi put opisuje metod 'žrtvovanog' spejsera. Kao templat-monomer derivat koristi se 4-vinilfenil karbonatni estar holesterola. Nakon polimerizacije u prisustvu EDMA, vrši se hidroliza, pri čemu dolazi do eliminacije ugljen-dioksida i formira se nekovalentno vezivno mesto. Ovako dobijeni polimer pokazuje samo jednu konstantu disocijacije pri vezivanju holesterola. Kao neobeležni polimer je korišćen EDMA homopolimer, koji ne odgovara u potpunosti za poređenje sa MOPom koji sadrži i aromatični monomer. Ispitivanje vezivanja templata za hidrolizovane polimere izvršeno je koristeći 2 mM rastvor holesterola u heksanu. 20 mg/mL polimera vezuje više od polovine početne koncentracije holesterola. Vezivanje za MOP je testirano i pre hidrolize, pri čemu je koncentracija holesterola nakon vezivanja bila veća od početne. Autori sugerišu da je ovo verovatno usled bubrenja polimera, pri čemu dolazi do ekskluzije holesterola (Whitcombe et al, 1995).

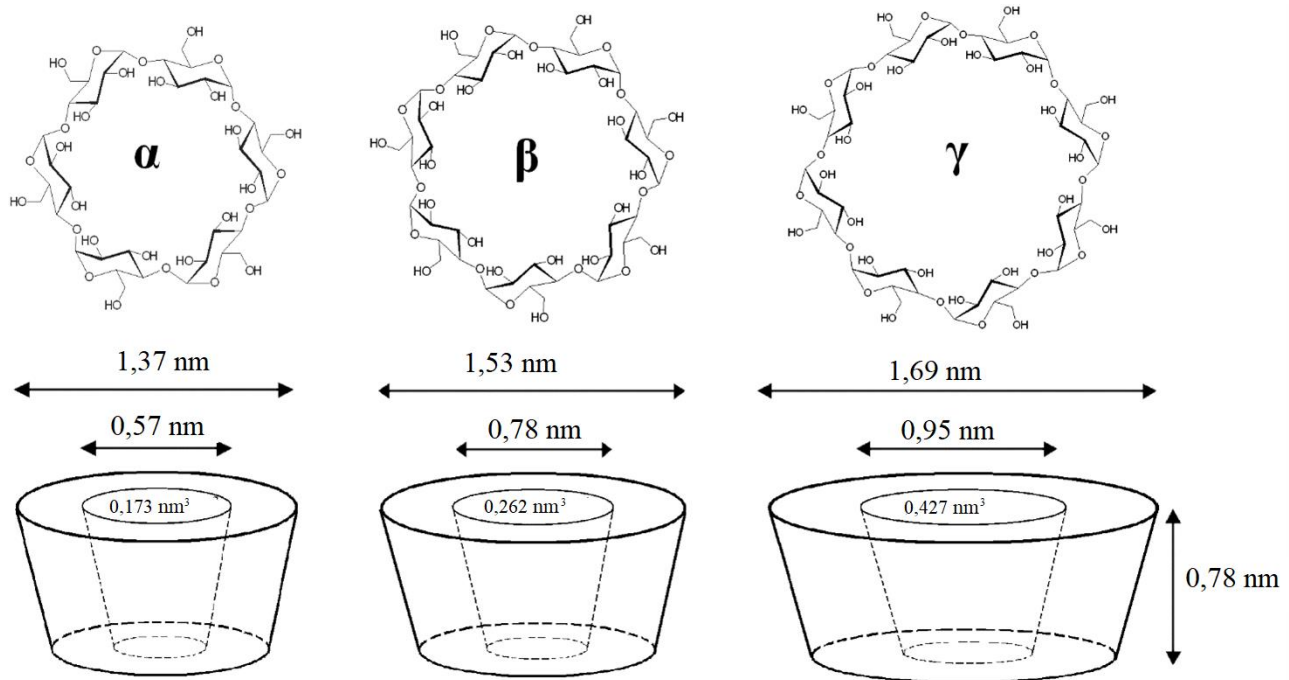
Polimeri su nakon hidrolize modifikovani acetil-hloridom i benzoil-hloridom kako bi se osiguralo da ostaci metakrilne kiseline nastali tokom delimične hidrolize budu zaštićeni u obliku estara. Acilovanje je rezultovalo značajnim smanjenjem vezivanja. Nezavisna potvrda uloge vodoničnog vezivanja u prepoznavanju holesterola dokazana je dodatkom male količine rastvarača koji ima mogućnost za vodonično vezivanje (3% piridina, 1-heksanola ili DMF) pri čemu gotovo izostaje vezivanje holesterola. Holestan i holesteril-acetat praktično se ne vezuju za holesterol-obeleženi polimer. Epiholesterol pokazao je manje vezivanje od holesterola, kao i holest-5-en-3-on, čija se konformacija razlikuje od konformacije holesterola. Pomoću adsorpcionih izoterma određeni su afinitet i kapacitet polimera koji je pokazao najbolja svojstva i iznosili su 0,84 mM i 100 $\mu\text{mol/g}$, respektivno (Whitcombe et al, 1995).

Villar i saradnici su ispitali efekat umreživača (EDMA i DVB) na vezivanje holesterola za obeležene polimere, dobijene prethodno opisanom metodom 'žrtvovanog' spejsera. Selektivnost je ispitana prema holest-5-en-3-onu. Polimeri su sintetisani koristeći 4-vinilfenil karbonatni estar holesterola i različite količine EDMA i DVB, uz dodatak stirena kod nekih polimera. Kao rastvarač je korišćena smeša heksana i toluena u zapreminskom odnosu 9/1. Dodatak DVB do 30% rezultovao je povećanjem adsorpcionog kapaciteta, sa veoma malim uticajem na selektivnost. Međutim, polimeri sintetisani samo sa DVB (bez EDMA) ili sa S-DVB pokazali su obrnutu selektivnost prema holest-5-en-3-onu u odnosu na holesterol, kada je kao rastvor korišćena smeša ova dva jedinjenja (Villar et al, 2007).

Wang i saradnici su opisali semi-kovalentni pristup za dobijanje MOPa za holesterol, koristeći holesteril-2-hidroksietil-metakrilat karbonat kao monomer-templat derivat, uz EDMA, u heksanu. Nakon hidrolize, u polimeru bi trebalo da nastane mesto dostupno za vezivanje holesterola. Ispitan je efekat rastvarača u kome se izvodi ponovno vezivanje templata za polimer, pri čemu je pokazano da je kapacitet vezivanja templata veći u rastvaračima manje polarnosti. Ispitana je i selektivnost MOPa prema holesteril-acetatu, progesteronu i stigmasterolu, iz rastvora u heksanu. Na osnovu rezultata, zaključuje se da se holesteril-acetat uopšte ne vezuje za polimer, dok se progesteron vezuje više od holesterola. Verovatni razlozi za ovakvu selektivnost su manja sklonost holesteril-acetata ka građenju vodoničnih veza, tj. veća sklonost progesterona za građenje vodoničnih veza, u odnosu na holesterol. Vezivanje stigmasterola je bilo slično kao i vezivanje holesterola, što ukazuje na selektivnost zasnovanu na obliku molekula. Na osnovu adsorpcionih izoterma, koristeći *Scatchard*-ov metod, određeni su afinitet i kapacitet dobijenog MOPa, koji iznose, 1,52 mM i 293 $\mu\text{mol/g}$, respektivno (Wang et al, 2005).

II.9 Molekulski obeleženi polimeri na bazi ciklodekstrina

Ciklodekstrini su ciklični oligomeri D-glukopiranoze povezani α -(1,4) vezama, čija je struktura prikazana na **Slici 9**. α , β , γ -ciklodekstrin su najčešće korišćeni i sačinjeni su od 6, 7 i 8 molekula glukoze, respektivno. Postoji mnogo derivata koji su danas takođe u upotrebi, poput hidroksialkilciklodekstrina. Ciklodekstrini su rastvorni u vodi, DMSO, DMF, etilen-glikolu, dok se ne rastvaraju u alkoholima, acetonu, THF. Za ciklodekstrine je karakteristično da je unutrašnjost šupljine hidrofobnija od spoljašnjosti što za posledicu ima da se hidrofobni molekuli mogu smestiti u unutrašnjost ciklodekstrina gradeći sa njim inkluzione tj. domaćin-gost komplekse. Hidrofobnost šupljine molekula ciklodekstrina obezbeđuje termodinamički povoljnije okruženje od vode za hidrofobne molekule ili delove molekula. Nepolarniji organski rastvarači nepovoljno utiču na kompleksiranje, usled slične ili veće hidrofobnosti rastvarača u odnosu na ciklodekstrinsku šupljinu. Polarnost površine ciklodekstrina potiče od slobodnih primarnih hidroksilnih grupa (Jin, 2012; Fourmentin et al, 2018).



Slika 9. Strukture α , β i γ -ciklodekstrina i dimenzije šupljina. Preuzeto iz Cyclodextrin Chemistry, Preparation and Application (Jin, 2012).

Formiranje inkluzionog kompleksa molekula gosta sa ciklodekstrinom u suštini se zasniva na supstituciji molekula vode iz ciklodekstrinske šupljine nepolarnijim gostom. Energetska povoljnost procesa formiranja inkluzionog kompleksa posledica je supstitucije nepovoljnih interakcija između polarnih molekula vode i nepolarne unutrašnjosti ciklodekstrina, povoljnim, nepolarnijim interakcijama molekula gosta i ciklodekstrinske šupljine (Jin, 2012).

Inkluzioni kompleksi raznih molekula sa ciklodekstrinima značajni su i u farmaceutskoj industriji. Naime, pokazano je da se formiranjem kompleksa različitih farmaceutski aktivnih komponenti sa ciklodekstrinima povećava rastvorljivost ovih komponenti, što je od velikog značaja za formulacije slabo rastvornih lekova. Formiranje inkluzionih kompleksa povoljno utiče i na fotostabilnost, a takođe štiti molekul gosta od neželjene oksidacije, utiče povoljno na smanjenje neprijatnog ukusa farmaceutskog sastojka, sprečava druge sporedne reakcije. (Jin, 2012).

Polimeri gde se kao monomer koristi neki od ciklodekstrina, našli su primenu usled mogućnosti manipulisanja fizičko-hemijskim i složenim biološkim mehanizmima, koji utiču na postizanje optimalne biodostupnosti i biodistribucije, putem modifikacije osnovnog ciklodekstrinskog skeleta (Adeoye, Cabral-Marques, 2017).

Formiranje inkluzionih kompleksa templata sa ciklodekstrinima može se iskoristiti u cilju dobijanja MOPa. U pitanju je nekovalentni pristup, gde se kao umreživači često koriste diizocijanati, poput 2,4-toluen-diizocijanata i 1,6-heksametilen-diizocijanata. Nastali polimer predstavlja uretan koji bi trebalo da ima raspored šupljina takav da molekul templata može ući u unutrašnjost te šupljine i nagraditi inkluzioni kompleks sa ciklodekstrinskim motivom. Ciklodekstrinski obeleženi polimeri nazivaju se i ciklodekstrinskim nanosunderima četvrte generacije (Adeoye, Cabral-Marques, 2017; Lay et al, 2016).

Sintezi MOPa na bazi ciklodekstrina može prethoditi ispitivanje kompleksiranja templata sa odabranim ciklodekstrinom u porogenu, što za cilj ima utvrđivanje stehiometrije kompleksa, kao i jačinu interakcija između ciklodekstrina i templata. NMR spektroskopija omogućava utvrđivanje prostorne orijentacije templata unutar ciklodekstrinske šupljine (Asanuma et al, 2004; Trotta et al, 2016).

Drugi način polimerizacije ciklodekstrina jeste, u prvom koraku njihova modifikacija monomerom koji sadrži dvostruku vezu (poput metakrilne kiseline), potom slobodno radikalna polimerizacija u prisustvu odgovarajućeg umreživača. Primeri ovakvih MOPa su napravljeni koristeći benzilparaben i 2,4-dihlorfenol kao templat (Lay et al, 2016; Surikumaran et al, 2014; Liu et al, 2018; Yongfeng et al, 2012).

Ciklodekstrinski obeleženi polimeri nalaze primenu kod nepolarnih templatata poput steroida, kao i u slučajevima kada je potrebno napraviti MOP koji se može primenjivati u vodenoj sredini. Holesterol je primenjen kao templat za dobijanje MOPa na bazi ciklodekstrina pri čemu je kao umreživač korišćen toluen-2,4-diizocijanat, u DMSO kao rastvaraču (Jiang et al, 2011).

Imajući u vidu da su opisani inkluzioni kompleksi nekih organskih UV filtera sa β -ciklodekstrinom (Fenyvesi et al, 2004; Dahabra et al, 2021; Yu et al, 2022; Kundu et al, 2019), očekivano bi bilo da je moguće dobiti MOPe primenom navedenog principa. Do sada u literaturi nisu opisani MOPi za UV filtere na bazi ciklodekstrina.

II.10 UV filteri

UV filteri su supstance koje se koriste za zaštitu kože od štetnih UV zraka. U kozmetičkim preparatima, UV filteri mogu biti prisutni u velikoj koncentraciji, često i do 10-15%. Sve masovnija upotreba proizvoda za zaštitu od Sunčevog zračenja dovodi do dospevanja ovih supstanci u životnu sredinu. Posledice koje UV filteri mogu izazvati u životnoj sredini su brojne: apsorbujući UV zračenje u vodenim masama poput mora, okeana i jezera, sprečavaju prodiranje Sunčevog zračenja u dubine do kojih bi inače doprlo, što nepovoljno utiče na vodene ekosisteme. Sem toga, UV filteri se mogu akumulirati u tkivima životinja koje žive u navedenim ekosistemima, izazivajući endokrine poremećaje (Apel et al, 2018; Langford et al, 2015; Horricks et al, 2019; Ocaña-Rios et al, 2019, Ramos et al, 2019).

Po strukturi, UV filteri mogu biti neorganski i organski. Najčešće korišćeni neorganski UV filteri su cink-oksidi i titanijum-dioksidi. Organski UV filteri mogu se podeliti u više grupa: metoksicinamati, salicilati, benzofenoni, dibenzoilmetani, derivati kamfora, derivati triazina, derivati *p*-aminobenzojeve kiseline, benzotriazoli i benzoimidazoli (Salvador, Chisvert, 2005). Na **Slikama 10-12** prikazane su strukture organskih UV filtera. U **Tabeli 1** sumirani su hemijski i komercijalni nazivi UV filtera (INCI – International nomenclature of cosmetic ingredients), kao i maksimalno dozvoljeni udeo ovih supstanci u kozmetičkim preparatima u Republici Srbiji, prikazani u Prilogu 6 Pravilnika o kozmetičkim proizvodima (Službeni glasnik Republike Srbije, 60/2019-4 i 47/2022-3).

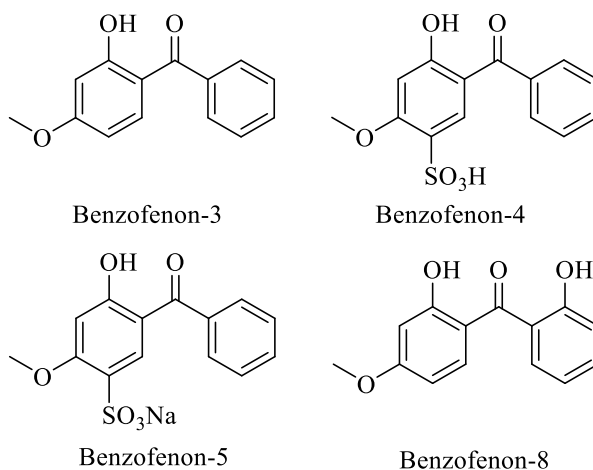
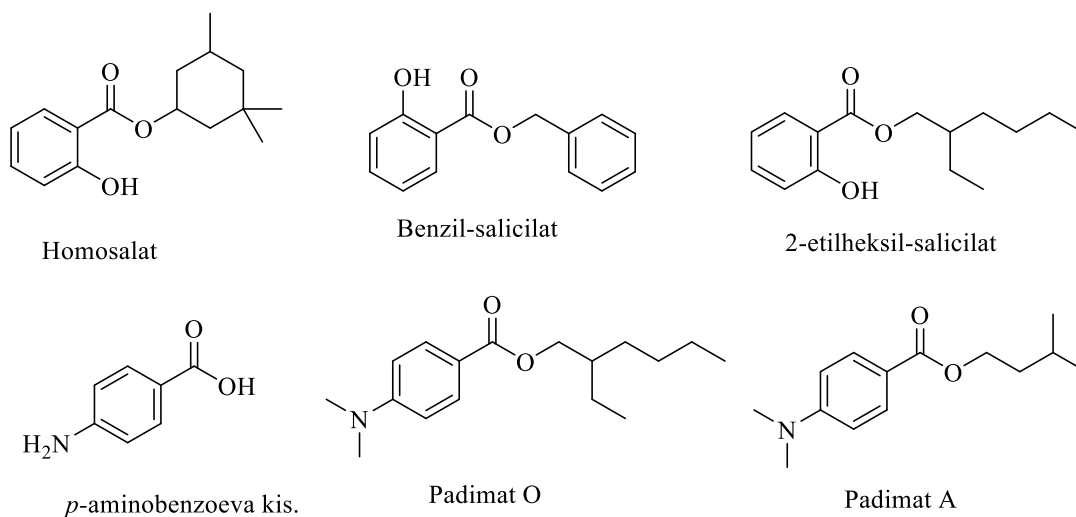
Metode analize UV filtera uglavnom se svode na HPLC uz različite načine detekcije, poput UV Vis i masene spektrometrije. Koncentrovanje uzoraka se često izvodi ekstrakcijom čvrstom fazom (Apel et al, 2018; Langford et al, 2015; Horricks et al, 2019; Ocaña-Rios et al, 2019, Ramos et al, 2019).

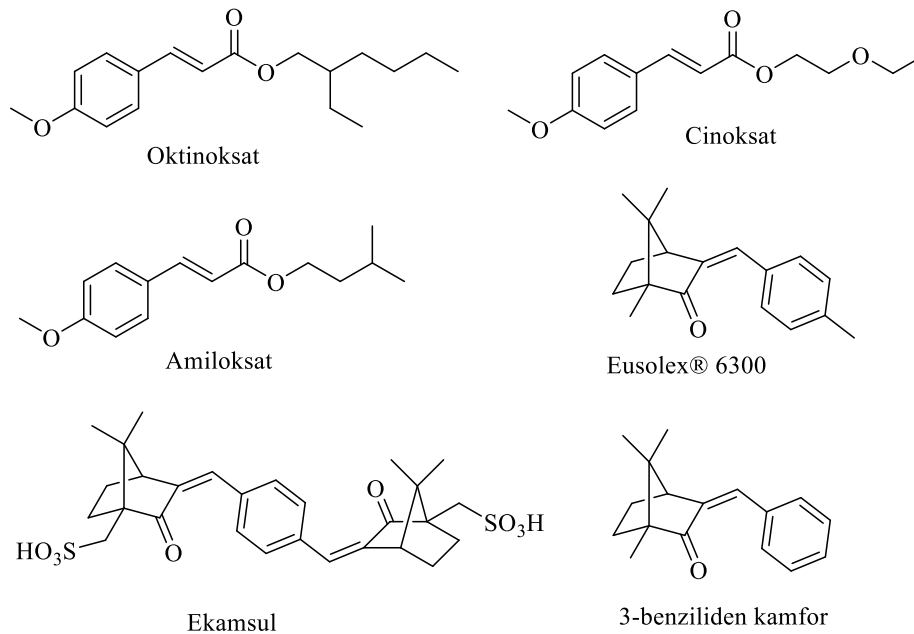
Tabela 1. UV filteri koji su dozvoljeni u Republici Srbiji prema Pravilniku o kozmetičkim preparatima (Sl. glasnik RS 60/2019-4 i 47/2022-3).

	INCI i komercijalni nazivi	Maksimalno dozvoljeni sadržaj (%)
2-hidroksi-4-metoksibenzofenon	Eusolex [®] 4360 Oksibenzon Benzofenon-3	6
2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina	Sulisobenzon Benzofenon-4	5
2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina natrijumova so	Sulisobenzon natrijum Benzofenon-5	5
2,2'-dihidroksi-4-metoksibenzofenon	Dioksibenzon Benzofenon-8	nije definisano
<i>p</i> -(2-etilheksil)-metoksicinamat	Eusolex [®] 2292, Oktil metoksicinamat	10
Izoamil- <i>p</i> -metoksicinamat	Amiloksat	10
(2-etoksietil)- <i>p</i> -metoksicinamat	Cinoksat	nije definisano
4- <i>tert</i> -butil-4'-metoksidibenzoilmetan	Eusolex [®] 9020, Avobenzon	5
2-etilheksil-salicilat	Eusolex [®] OS, Oktisalat	5
3,3,5-trimetilcikloheksil-salicilat	Eusolex [®] HMS Homosalat	10
Polietilenglikol-25 <i>p</i> -aminobenzoeva kiselina	–	10
2-etilheksil-4-dimetilaminobenzoat	Eusolex [®] 6007, Padimat O	8
2-etilheksiltriazon	–	5
Dietilheksil butamido triazon	Iskotrizinol	10
Bis-etilheksiloksifenol metoksifenil triazin	Bemotrizinol Eusolex [®] S Tinosorb S	10
Tris-bifenil triazin	–	10
3-benziliden kamfor	–	nije definisano
4-metilbenzilidenkamfor	Eusolex [®] 6300 Enzacamene	4
Kamfor benzalkonijum metosulfat	–	6
Benziliden kamfor sulfonska kiselina	–	6
Tereftalidendikamfor sulfonska kiselina	Ekamsul Mexoryl SX	10
Poliakrilamidometil benziliden kamfor	–	6
Fenilbenzimidazol sulfonska kiselina	Eusolex [®] 232 Ensulizol	8
Dinatrijum fenil dibenzimidazol tetrasulfonat	Bisdisulizol dinatrijum, Neo Heiopan AP	10

Tabela 1 (nastavak). UV filteri koji su dozvoljeni u Republici Srbiji prema Pravilniku o kozmetičkim preparatima (Sl. glasnik RS 60/2019-4 i 47/2022-3).

	INCI i komercijalni nazivi	Maksimalno dozvoljeni sadržaj (%)
Metilen bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol	Bisoktrizol	10
Drometrizol trisiloksan	Silatrizol, Mexoryl XL	15
Oktokriken	Eusolex® OCR	10
Dietilamino hidroksibenzoil heksil benzoat	–	10
Polisilikon-15	Parsol SLX	10
Titanijum-dioksid	–	25
Cink-oksid	–	25

**Slika 10.** Primeri benzofenonskih UV filtera.**Slika 11.** Salicilatni UV filteri i derivati *p*-aminobenzoeve kiseline.



Slika 12. Primeri cinamatnih i kamforskih UV filtera.

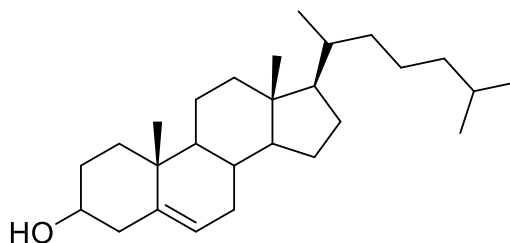
U literaturi je opisano svega nekoliko molekularno obeleženih polimera za benzofenonske UV filtere. Sun i saradnici su opisali MOPe za benzofenonske UV filtere, i to benzofenon-1, benzofenon-2, benzofenon-6 i benzofenon-8 (Sun et al, 2015). Kao templat je korišćen benzofenon-2, funkcionalni monomer bio je 4VP, umreživač EDMA, u acetonitrilu kao porogenu. Dobijeni polimeri su okarakterisani pomoću SEM, fizisorpcijom azota i ispitivanjem adsorpcije navedenih benzofenona. Kapacitet obeleženog polimera za vezivanje benzofenona-2 bio je 27,90 $\mu\text{mol/g}$. MOPi su primenjeni u ekstrakciji čvrstom fazom odabranih benzofenona iz česmenske i rečne vode. Kao eluent je korišćen acetonitril sa 2% trifluorsirćetne kiseline. Analiza je izvršena pomoću HPLC-DAD.

Ayadi i saradnici su opisali MOP na bazi polianilina za benzofenon-4 i korišćenje dobijenog sorbenta za koncentrovanje BP4 iz realnih uzoraka (Ayadi et al, 2019). Polimeri su dobijeni modifikacijom silika čestica najpre *N*-[3-(metoksisilil)propil]anilinom, nakon čega je izvršena sinteza obeleženih polimera. Dobijeni polimeri su karakterisani koristeći SEM, TEM, fizisorpciju azota, termogravimetrijsku analizu, elementalnu analizu, infracrvenu spektroskopiju, NMR čvrstog stanja i adsorpcione eksperimente. Adsorpcioni kapacitet dobijenog polimera bio je 35 $\mu\text{mol/g}$.

III Naši radovi

III.1 Molekulski obeleženi polimeri za holesterol i druge sterioide

Holesterol (**Slika 13**), kao što je već rečeno, predstavlja zahtevan templat za dobijanje MOPa, imajući u vidu da ima veliko ugljovodonično jezgro (28 ugljenikovih atoma), a sadrži samo jednu hidrosilnu grupu i jednu olefinsku vezu. U literaturi postoje opisani MOPi za holesterol čija se sinteza zasniva na semikovalentnom pristupu, zatim ciklodekstrinski polimeri (Jiang et al, 2011), kao i nekovalentno obeleženi polimeri.



Slika 13. Strukturna formula holesterola.

Cilj ovog dela disertacije bio je dobijanje i karakterizacija obeleženog polimera za holesterol novim, veoma jednostavnim nekovalentnim pristupom, koji bi se mogao primeniti na zahtevne nepolarne template poput holesterola. Imajući u vidu strukturu holesterola i interakcije koje može da ostvari, pretpostavljeno je da funkcionalni monomer nije ključan za dobijanje MOPa za holesterol pod navedenim uslovima. Doprinos funkcionalnog monomera poput metakrilne kiseline stabilizaciji prepolymerizacionog kompleksa bio bi zanemarljivo mali.

MOPi sintetisani sa holesterolom kao templatom, sa serijom različitih monomera (akrilamid, alilamin, metil-metakrilat, alil-metakrilamid, metakrilna kiselina), sa EDMA i DVB kao umreživačima, u hloroformu, smeši hloroforma i acetonitrila i smeši acetona i vode kao porogenima, ne pokazuju veliko vezivanje templa za polimere iz hloroforma (Todorov, 2016).

Osnovna ideja ovog dela disertacije bila je korišćenje umreživača poput EDMA kao jedine polimerizabilne komponente MOPa. Pretpostavljeno je da bi templat holesterol tokom polimerizacije usled sopstvene i nepolarosti polimera bio adsorbovan na polimer i tako u polimeru ostavio komplementarnu šupljinu. Očekivano je i da bi ovaj efekat bio izraženiji u koncentrovanim rastvorima holesterola te da će na taj način zbog izraženije adsorpcije efekat obeležavanja biti veći. Sem EDMA, bilo je potrebno ispitati i druge umreživače koji su nepolarniji od EDMA. U ovu svrhu su korišćeni BDMA i HDMA.

III.1.1 Rastvorljivost holesterola u odabranim sistemima

Cilj ispitivanja rastvorljivosti bio je odabir sistema pogodnog za sintezu MOPa za holesterol i rastvarača za ponovno vezivanje. Velika rastvorljivost holesterola u određenom rastvaraču značila bi mogućnost korišćenja veće koncentracije templa tokom sinteze. Imajući u vidu nepolarost umreživača koji se koriste u sintezi MOPa, očekivano je da se u prisustvu umreživača poveća rastvorljivost holesterola, čak i u rastvaračima u kojima je inače mala, poput ACN.

Rastvorljivost u ACN je ispitana imajući u vidu da je ACN jedan od najčešće korišćenih porogena u sintezi MOPa. 2-Propanol (2PrOH) je ispitano kao model protičnog rastvarača umerene polarnosti koji dobro rastvara holesterol. Smeše 2PrOH i vode, ACN i vode, kao i metanola (MeOH)

i vode ispitane su sa dvojakim motivom, prvo, da bi se razmotrila mogućnost njihovog korišćenja kao porogena, gde bi voda imala ulogu da podstakne adsorpciju holesterola na polimer koji nastaje, i, drugo, kao potencijalnih rastvarača za ponovno vezivanje holesterola za polimer, iz istog razloga kao u prvom slučaju. Rastvorljivost u hloroformu nije određena, imajući u vidu da je bila potrebna prevelika količina holesterola da bi se dobio zasićen rastvor. U **Tabeli 2** prikazane su rastvorljivosti holesterola u različitim sistemima.

Tabela 2. Rastvorljivost holesterola u odabranim sistemima na 25°C.

Rastvarač	Rastvorljivost (mM)
EDMA	61,4
ACN	3,8
BDMA	85,3
HDMA	96,8
2PrOH	127,7
2PrOH/voda 9/1	87,9
MeOH	15,6
MeOH/voda 9/1	3,3
MeOH/voda 8/2	0,6
EDMA/ACN 1/1	17,6
BDMA/ACN 1/1	24,0
HDMA/ACN 1/1	30,1
EDMA/ACN 1/2	11,1
BDMA/ACN 1/2	14,6
HDMA/ACN 1/2	16,7
ACN (60°C)	13,4

Na osnovu podataka prikazanih u **Tabeli 2** zaključeno je da je, od prikazanih rastvarača, rastvorljivost holesterola najveća u 2-propanolu, te je on odabran kao porogen. Može se uočiti porast rastvorljivost holesterola u umreživačima od EDMA preko BDMA do HDMA (**Slika 3**), što je i očekivano imajući u vidu da se na isti način povećava nepolarost ovih jedinjenja. Isto se može uočiti za smeše navedenih umreživača sa ACN u zapreminskim odnosima 1:1 i 1:2 (u korist acetonitrila). U smešama acetonitrila sa umreživačima, rastvorljivost holesterola je veća nego u čistom acetonitrilu, ali manja nego u čistim umreživačima, što je, takođe, u skladu sa polarnošću sistema. Rastvorljivost holesterola je najmanja u smešama metanola sa vodom. Stoga bi primena ovih smeša kao sredine u kojoj bi bilo ispitano ponovno vezivanje holesterola za polimere vodila ka tome da se dobiju veći adsorpcioni kapaciteti polimera (polimer je nepolarniji od sredine u kojoj je rastvoren holesterol, te bi se lakše adsorbovao).

III.1.2 Sinteza polimera za steroidna jedinjenja

Sintetisana je serija obeleženih polimera i njihovih neobeleženih analoga (**Tabela 3**), zasnovanih na nekovalentnom pristupu. Kao porogeni su odabrani hloroform i acetonitril, koji se često koriste u hemiji MOPa kao porogeni, ali i 2-propanol, koji se retko koristi. Hloroform je odabran kao porogen zbog toga što formira makroporozni polimer i zbog rastvorljivosti holesterola u njemu. Acetonitril, polarni aprotični rastvarač, iako rastvorljivost holesterola u njemu nije velika, upotrebljen je kao porogen jer favorizuje nekovalentne interakcije i često se koristi u hemiji MOPa. 2PrOH, polarni protični rastvarač, bi trebalo nepovoljno da utiče na stabilnost prepolimerizacionog kompleksa, ali je njegova uloga ovde bila da učini sredinu polarnijom, kako bi holesterol, nakon

inicijalnog nastajanja polimerne mreže, težio da se adsorbuje na nastajući, nepolarniji polimer. AIBN je svuda korišćen kao inicijator.

Količine holesterola primenjene za dobijanje polimera su bile različite (videti Eksperimentalni deo), te je najmanje holesterola upotrebjeno za polimere gde je kao porogen korišćen ACN, dok je za polimere gde je porogen bio 2PrOH upotrebjeno najviše holesterola. Za polimere gde je kao porogen korišćen ACN, korišćeni su zasićeni rastvori holesterola u smeši ACN i umreživača (zapreminski odnos 1:1). Rastvorljivost holesterola u prepolimerizacionoj smeši EDMA i 2PrOH povećana je zagrevanjem na 60 °C do rastvaranja željene količine holesterola.

Za sintezu holesterolom obeleženih polimera upotrebjena su tri umreživača, EDMA, BDMA i HDMA, koji predstavljaju dimetakrilate etilen-glikola, 1,4-butandiola i 1,6-heksandiola, respektivno, i razlikuju se po polarnosti. Cilj upotrebe umreživača istog tipa, ali različite polarnosti jeste optimizacija polarnosti umreživača za sintezu obeleženih polimera za holesterol.

Tabela 3. Sintetisani polimeri za holesterol kao templat (Pešić et al, 2020).

Polimer	Funkcionalni monomer	Umreživač	Templat	Porogen
P1	/	EDMA	/	2PrOH
P2	/	BDMA	/	2PrOH
P3	/	HDMA	/	2PrOH
P4	/	EDMA	Holesterol	2PrOH
P5	/	BDMA	Holesterol	2PrOH
P6	/	HDMA	Holesterol	2PrOH
P7	/	EDMA	/	Hloroform
P8	/	BDMA	/	Hloroform
P9	/	HDMA	/	Hloroform
P10	/	EDMA	Holesterol	Hloroform
P11	/	BDMA	Holesterol	Hloroform
P12	/	HDMA	Holesterol	Hloroform
P13	/	EDMA	/	ACN
P14	/	BDMA	/	ACN
P15	/	HDMA	/	ACN
P16	/	EDMA	Holesterol	ACN
P17	/	BDMA	Holesterol	ACN
P18	/	HDMA	Holesterol	ACN
P19	MAA	EDMA	/	ACN
P20	4VP	EDMA	/	ACN

U svim navedenim slučajevima, došlo je do polimerizacije i dobijeni su monolitni polimeri, koji su usitnjeni u avanu sa tučkom do veličine finog praha, isprani metanolom ili hloroformom (u aparaturi po Soksletu), potom sušeni na 60°C do konstantne mase. Tako dobijeni polimeri su dalje korišćeni za eksperimente vezivanja i karakterizaciju.

III.1.3 Optimizacija rastvarača za ponovno vezivanje holesterola i odabir faznog odnosa polimer:rastvor

U cilju optimizacije rastvarača za ponovno vezivanje holesterola za polimere ispitano je nekoliko različitih rastvarača ili smeša rastvarača, poput ACN, 2PrOH, metanola i njihovih smeša sa vodom u zapreminskim odnosima 9/1 i 8/2. Ispitano je i vezivanje u heksanu, kao primeru nepolarnog rastvarača u kome će vezivanje holesterola biti zasnovano na građenju vodoničnih veza između hidroksilne grupe holesterola i estarskih grupa umreživača tj. polimera. Vezivanje holesterola je ispitano pri različitim faznim odnosima polimera i rastvora za vezivanje. Fazni odnos predstavlja odnos mase polimera (u mg) i zapremine rastvora (u μL) koje su primenjene u eksperimentu vezivanja. U **Tabeli 4** prikazani su rezultati vezivanja holesterola iz rastvora koncentracije 10^{-4} M, pri faznom odnosu 1:10, za odabrane polimere.

Određivanje koncentracije holesterola u supernatantu nakon eksperimenata vezivanja urađeno je pomoću visoko-efikasne tečne hromatografije sa UV detekcijom (HPLC-DAD). Upoređivanjem površine ispod pika holesterola na hromatogramu supernatanta i površine ispod pika holesterola početnog rastvora, određeno je vezivanje u %.

Tabela 4. Vezivanje holesterola (u %) iz rastvora koncentracije 10^{-4} M za polimere P1, P19 i P20, pri faznom odnosu 1:10.

Polimer	Rastvarač		
	2PrOH	ACN	n-heksan
P1	0,3	5,2	36,2
P19	0,4	9,6	83,5
P20	1,8	11,2	75,0

Ako se posmatraju ispitani rastvarači za ponovno vezivanje, uočava se da je vezivanje u n-heksanu najveće i to za polimer P19 gde je kao funkcionalni monomer korišćena MAA (**Tabela 3**), što je i očekivano, imajući u vidu da su vodonične veze najjače u ovom, od tri ispitana polimera.

Kao model polimer za optimizaciju korišćen je MAA-EDMA kopolimer, dobijen u smeši acetonitrila i hloroforma (1:1, zapreminski) kao porogenu (Todorov, 2016). Vezivanje holesterola iz rastvora u acetonitrilu pri faznom odnosu 1:100 (10,0 mg polimera i 1000 μL rastvora), pri koncentraciji 10^{-4} M nije detektovano, zbog čega je vezivanje isprobano iz smeše metanol/voda i acetonitril/voda u zapreminskim odnosima 9/1 i 8/2. Dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 5** (Todorov, 2016).

Tabela 5. Rezultati vezivanja holesterola (u %) iz smeše metanol/voda i acetonitril/voda pri faznom odnosu 1/100.

Polimer	Rastvarač	ACN/H ₂ O	ACN/H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O
		9/1 (V/V)	8/2 (V/V)	9/1 (V/V)	8/2 (V/V)
MAA-EDMA NOP		3,4	10,4	7,7	26,6

Uočava se da % vezivanja raste sa porastom udela vode u sistemu, i kod ACN i kod metanola. Takođe, vezivanje je veće u smešama sa metanolom, što ukazuje da polarnost rastvarača za vezivanje ima ključnu ulogu. Kako u navedenom slučaju sa porastom polarnosti rastvarača raste i vezivanje holesterola za polimer, može se zaključiti da se vezivanje holesterola zasniva na hidrofobnim interakcijama. U **Tabeli 6**, prikazani su rezultati vezivanja holesterola za MAA-EDMA NOP pri faznom odnosu 1/10 (Todorov, 2016).

Tabela 6. Rezultati vezivanja holesterola (u %) iz rastvora koncentracije 10^{-4} M u smešama ACN/voda ili MeOH/voda 8/2 (V/V) pri faznom odnosu 1/10

Polimer	Rastvarač	
	ACN/H ₂ O	MeOH/H ₂ O
MAA-EDMA NOP	41,7	42,8

Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da se ispitivanje vezivanja templata za polimere može izvoditi iz sistema metanol/voda u zapreminskom odnosu 8/2. U nekim slučajevima koji su dalje opisani, za vezivanje je korišćen i odnos 9/1 zbog rastvorljivosti drugih jedinjenja čije je vezivanje ispitivano, a koja nisu rastvorna u sistemu 8/2, poput stigmasterola.

III.1.4 Vezivanje holesterola za neobeležene i obeležene polimere

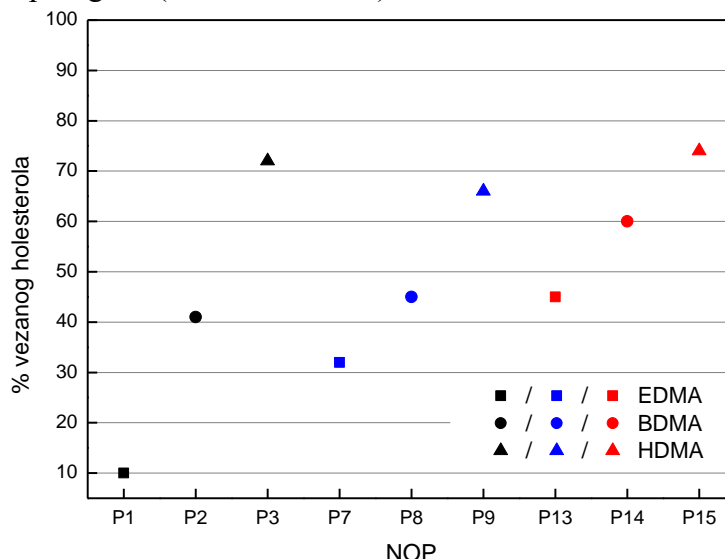
Vezivanje holesterola za dobijene polimere ispitano je 'batch' vezivanjem iz rastvora holesterola u metanol/voda smešama i iz rastvora u n-heksanu. Rezultati vezivanja holesterola za neobeležene polimere prikazani su u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Vezivanje holesterola u % ($c=10^{-4}$ M) za sintetisane polimere iz smeše rastvarača MeOH/H₂O, pri faznom odnosu 1:10.

Polimer	Rastvarač		
	MeOH/H ₂ O 9/1 (V/V)	MeOH/H ₂ O 8/2 (V/V)	n-heksan
P1	10	31	30
P2	41	82	46
P3	72	95	46
P4	17	61	44
P5	50	87	48
P6	79	95	55
P7	32	76	/
P8	45	83	/
P9	66	94	/
P10	34	74	/
P11	49	85	/
P12	71	94	/
P13	45	80	/
P14	60	88	/
P15	74	93	/
P16	40	80	/
P17	55	88	/
P18	68	92	/
P19	26	51	75
P20	30	59	83

Ukoliko se posmatraju rezultati vezivanja za parove obeleženih i neobeleženih polimera (P4/P1, P5/P2, P6/P3) sintetisanih u 2-propanolu, vidi se da je u slučaju sva tri umreživača (EDMA, BDMA, HDMA) došlo do obeležavanja polimera: vezivanje holesterola je veće za obeležene polimere P4-P6, u odnosu na neobeležene analoge P1-P3. Takođe, sa porastom dužine lanca umreživača, smanjuje se razlika u vezivanju holesterola za obeleženi polimer u odnosu na neobeleženi, što može biti posledica veće hidrofobnosti polimera, te većeg nespecifičnog vezivanja.

Na **Slici 14** prikazano je vezivanje holesterola za neobeležene polimere u zavisnosti od primenjenog umreživača i porogena (Pešić et al, 2020).



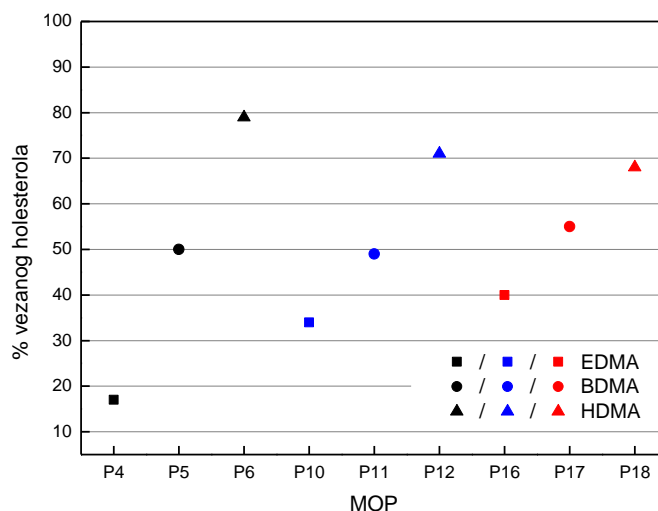
Slika 14. Vezivanje holesterola za NOPE iz rastvora holesterola u MeOH/voda 9/1 (V/V).

Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).

Može se uočiti da vezivanje holesterola za neobeležene polimere raste sa porastom dužine alkil-lanca umreživača (od EDMA ka HDMA) bez obzira na to koji je porogen upotrebljen. Kada se kao porogeni koriste hloroform i acetonitril, promena u vezivanju holesterola sa promenom dužine lanca umreživača je slična, dok se pri korišćenju 2PrOH uočava da je ova promena izraženija nego u hloroformu i ACN.

Sa **Slike 14** se takođe uočava da je za HDMA neobeležene polimere vezivanje holesterola gotovo jednako i nezavisno od primenjenog porogena, dok je kod EDMA neobeležanih polimera uočljiva razlika u vezivanju holesterola u zavisnosti od primenjenog porogena: najveće vezivanje holesterola pokazuje NOP P13 gde je kao porogen korišćen acetonitril, nešto manje vezivanje je za polimer dobijen u hloroformu (P7), a najmanje vezivanje holesterola pokazuje NOP dobijen u 2PrOH (P1). Razlog za ovakvo vezivanje polimera gde je korišćen HDMA kao umreživač verovatno je velika hidrofobnost polimera, pa je izraženo nespecifično vezivanje.

Trendovi koji su zapaženi kod vezivanja holesterola za neobeležene polimere, uočavaju se i kod vezivanja holesterola za obeležene polimere – **Slika 15**. Ponovo, najveće razlike u vezivanju između EDMA, BDMA i HDMA polimera uočavaju se pri korišćenju 2PrOH kao porogena, dok je pri korišćenju hloroforma i acetonitrila ova promena slabije izražena.

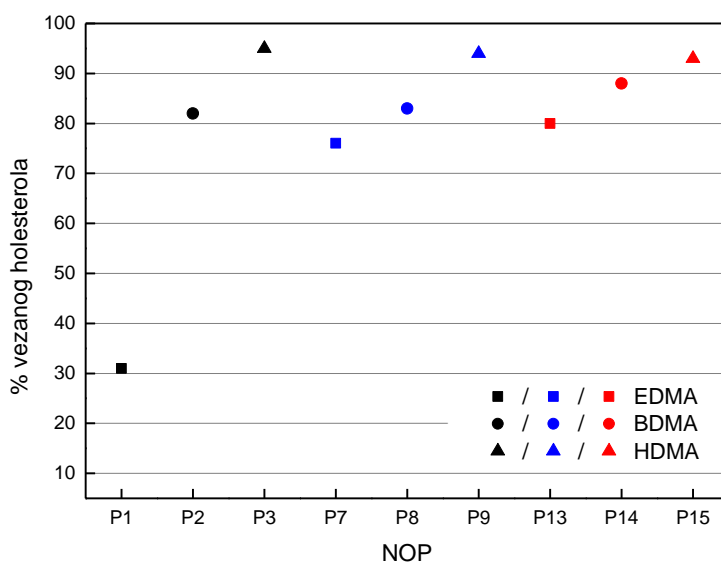


Slika 15. Vezivanje holesterola za MOPe iz rastvora holesterola u MeOH/voda 9/1 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).

Ukoliko se uporedi vezivanje holesterola za neobeležene i obeležene polimere, može se uočiti da je jedino pri korišćenju 2-propanola kao porogena došlo do uočljivog obeležavanja polimera. Korišćenje hloroforma nije rezultovalo uspešnim procesom obeležavanja.

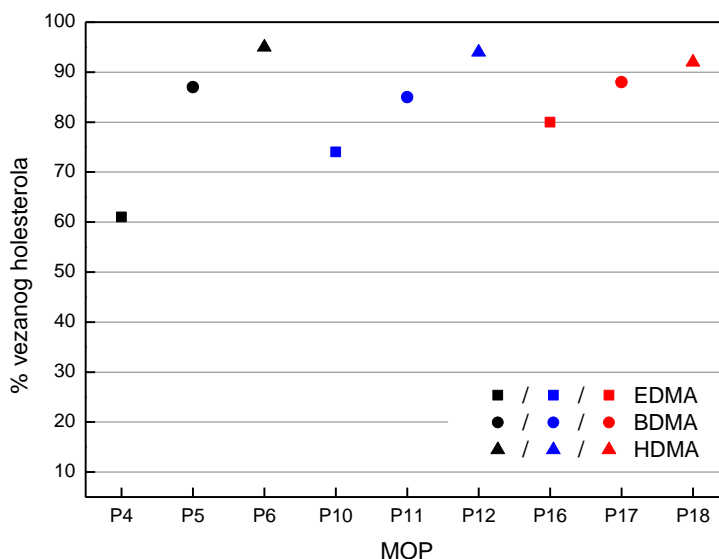
Vezivanje holesterola za BDMA polimere se pokazalo nezavisnim od primenjenog porogena, dok se vezivanje holesterola za HDMA polimere smanjuje u nizu 2PrOH>hloroform>acetonitril.

U sistemu metanol/voda 8/2 (**Slike 16 i 17**), vezivanje holesterola iz rastvora koncentracije 10^{-4} M pri faznom odnosu 1:10 i za NOPE i za MOPe je veće nego u sistemu 9/1. Vezivanje holesterola je najmanje za P1 tj. za EDMA NOP sintetisan u 2PrOH kao porogenu. Vezivanje holesterola za sve ostale polimere je značajno veće, te su samim tim razlike u vezivanju za prikazane polimere manje.



Slika 16. Vezivanje holesterola za NOPE iz rastvora holesterola u MeOH/voda 8/2 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).

Vezivanje holesterola za sintetisane MOPe u sistemu metanol/voda 8/2 (**Slika 17**), iz rastvora koncentracije 10^{-4} M pri faznom odnosu 1:10 prati trend koji je uočen i kod NOPa, s tim što je značajno veće vezivanje holesterola za P4, tj. EDMA MOP sintetisan u 2PrOH. Posmatrajući grafike na **Slikama 16 i 17**, uočava se da je najveća razlika u vezivanju holesterola između NOPa P1 i MOPa P4 u slučaju EDMA polimera sintetisanih u 2PrOH.



Slika 17. Vezivanje holesterola za MOPe iz rastvora holesterola u MeOH/voda 8/2 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).

III.1.5 Faktori obeležavanja

Faktori obeležavanja određeni su kako je prethodno opisano, kao odnos distribucionih faktora pri vezivanju templata za obeleženi i neobeleženi polimer.

Ukoliko se kao porogeni koriste ACN ili hloroform, dobijeni MOPi ne pokazuju bolja svojstva od odgovarajućih NOPa. Faktori obeležavanja za parove MOP/NOP sintetisane u ovim porogenima su bliski 1, kada se vezivanje ispituje iz smeše metanol/voda.

Međutim, u slučaju 2PrOH kao porogena, i EDMA kao umreživača (ali takođe i BDMA i HDMA), do obeležavanja dolazi i faktor obeležavanja za P4/P1 par je 3,4. Kao što se može videti iz **Tabele 8**, faktor obeležavanja zavistan je od dužine lanca umreživača, kao i od sastava rastvarača koji se koristi za ponovno vezivanje. Sa povećanjem udela vode u smeši sa metanolom, raste i faktor obeležavanja, što može biti posledica većeg efekta hidrofobnih interakcija na vezivanje. Ako se posmatra faktor obeležavanja u odnosu na dužinu lanca umreživača, vidi se da IF opada kako raste dužina lanca, od EDMA ka HDMA, što je najverovatnije posledica hidrofobnosti molekula umreživača. Naime, kako raste nepolarnost umreživača, raste i mogućnost za nastajanjem hidrofobnih interakcija između polimera i templata, što NOP i MOP čini nepolarnijim, te se razlike u vezivanju između obeleženog i neobeleženog polimera smanjuju.

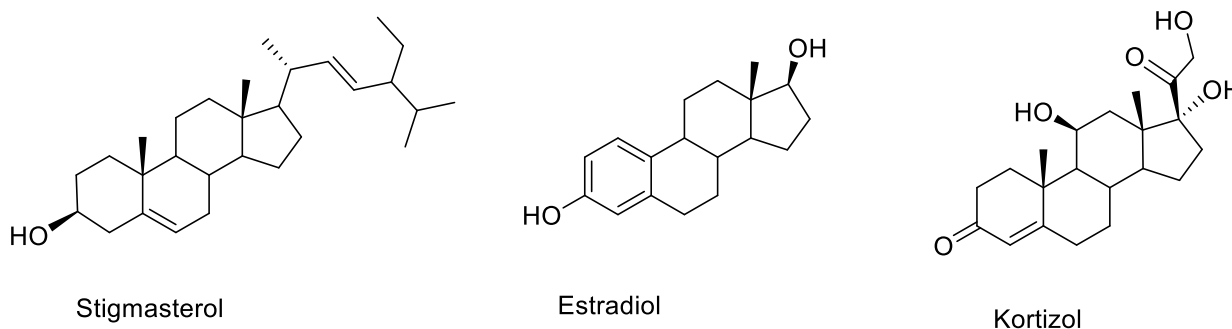
Tabela 8. Faktori obeležavanja za holesterol obeležene polimere u smešama metanola i vode 9/1 i 8/2 (V/V) (Pešić et al, 2020).

MOP/NOP	IF ^{hol}		Umreživač
	MeOH/H ₂ O 9/1	MeOH/H ₂ O 8/2	
P4:P1	1,9	3,4	EDMA
P5:P2	1,4	1,4	BDMA
P6:P3	1,5	1,1	HDMA

Faktori obeležavanja su uporedivi sa literaturnom opisanim: Puoci opisuje MOPE za holesterol sa IF 4,7 (Puoci et al, 2008). Drugim rečima, jednostavnijim pristupom, bez funkcionalnog monomera, dobijeni su obeleženi polimeri sličnih performansi kao literaturno opisani polimeri sa funkcionalnim monomerom.

III.1.6 Selektivnost polimera

Selektivnost dobijenih polimera ispitana je vezivanjem tri steroidna jedinjenja: stigmasterola, estradiola i kortizola (**Slika 18**).



Slika 18. Strukturne formule steroida za koje je ispitana selektivnost dobijenih polimera u odnosu na holesterol.

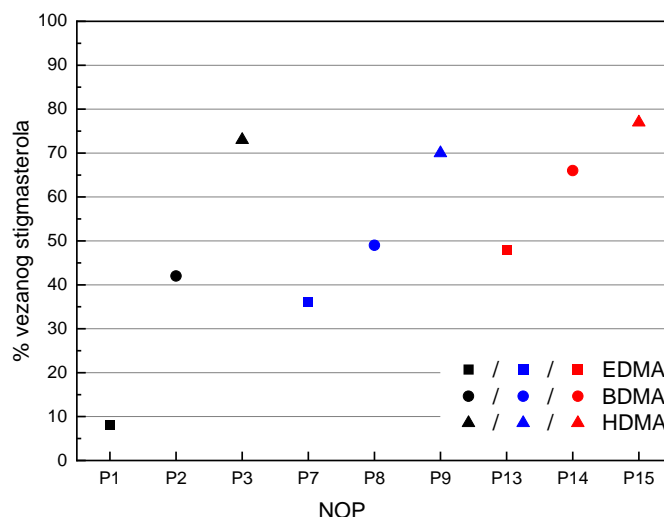
III.1.6.1 Vezivanje stigmasterola

Ispitivanje vezivanja stigmasterola za sintetisane polimere značajno je zbog njegove izrazite strukturne sličnosti sa holesterolom. Rezultati ispitivanja prikazani su u **Tabeli 9**. Kako se stigmasterol u smeši metanola i vode 8/2 (V/V) ne rastvara u koncentraciji 10^{-4} M, ispitivanja su izvedena samo u smeši metanol/voda 9/1 (V/V) i n-heksanu

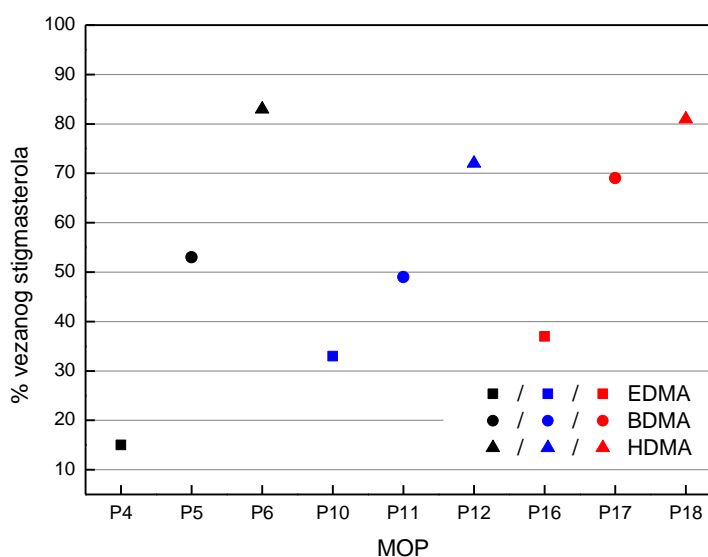
Tabela 9. Vezivanje stigmasterola u % ($c=10^{-4}$ M) za sintetisane polimere iz smeše rastvarača MeOH/H₂O, pri faznom odnosu 1:10.

Polimer	Rastvarač	
	MeOH/H ₂ O 9/1 (V/V)	n-heksan
P1	8	45
P2	42	/
P3	73	/
P4	15	70
P5	53	/
P6	83	/
P7	36	86
P8	49	75
P9	70	75
P10	33	83
P11	49	74
P12	72	66
P13	48	94
P14	66	90
P15	77	68
P16	37	96
P17	69	93
P18	81	70
P19	16	96
P20	25	92

Sa grafika prikazanih na **Slikama 19 i 20** može se uočiti da vezivanje stigmasterola prati iste trendove kao i vezivanje holesterola, što je i očekivano, imajući u vidu njihovu strukturnu sličnost. Za većinu sintetisanih polimera, sem za P1 i P4, vezivanje stigmasterola je nekoliko procenata veće nego vezivanje holesterola pri identičnim uslovima. Razlike uočene kod polimera P1 i P4 za koje se vezuje više holesterola nego stigmasterola jesu male (2%), ali potvrđuju specifičnost EDMA polimera sintetisanih u 2PrOH.

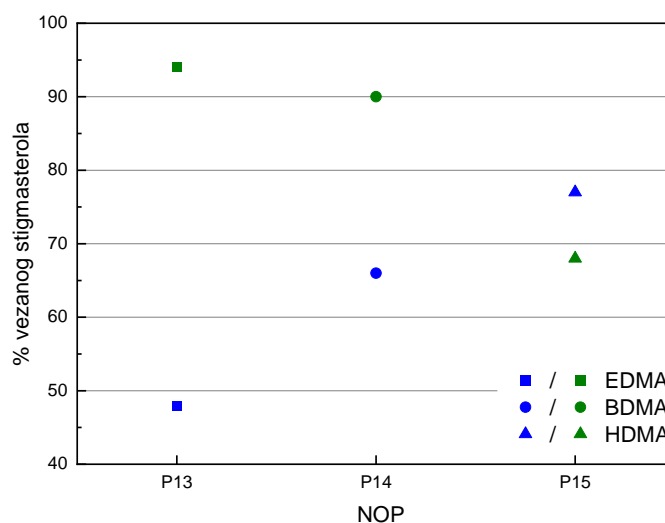


Slika 19. Vezivanje stigmasterola za NOPE iz rastvora stigmasterola u MeOH/voda 9/1 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).



Slika 20. Vezivanje holesterola za MOPE iz rastvora holesterola u MeOH/voda 9/1 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).

Na **Slici 21** prikazano je vezivanje stigmasterola iz MeOH/voda 9/1 (V/V), kao i iz n-heksana, za neobeležene polimere sintetisane u ACN kao porogenu. Uočava se da vezivanje stigmasterola u metanol/voda sistemu raste kako raste dužina lanca umreživača, od EDMA, preko BDMA do HDMA. Međutim, u n-heksanu trend je obrnut. Objašnjenje za ovakav trend vezivanja u n-heksanu jeste da je to posledica vodoničnog vezivanja koje je izraženo u n-heksanu, za razliku od hidrofobnih interakcija u metanol/voda sistemu. Sadržaj estarskih grupa po gramu polimera opada u nizu EDMA>BDMA>HDMA pa tako opada i vezivanje stigmasterola.



Slika 21. Poređenje vezivanja stigmaterola iz n-heksana (zeleni simboli) i MeOH/voda 9/1 (V/V) (plavi simboli) za odabrane polimere; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici) (Pešić et al, 2020).

III.1.6.2 Vezivanje estradiola

Rezultati vezivanja estradiola za sintetisane polimere prikazani su u **Tabeli 10**.

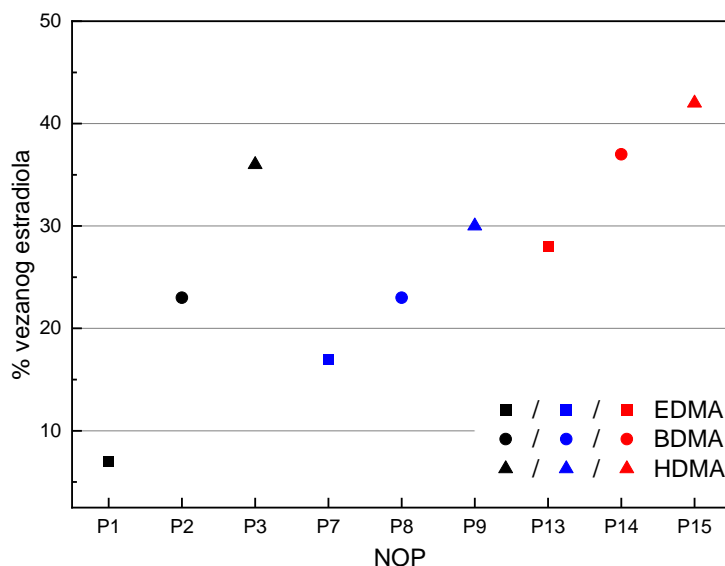
Tabela 10. Vezivanje estradiola u % ($c=10^{-4}$ M) za sintetisane polimere iz smeše rastvarača MeOH/H₂O, pri faznom odnosu 1:10.

Polimer	Rastvarač	
	MeOH/H ₂ O 9/1 (V/V)	MeOH/H ₂ O 8/2 (V/V)
P1	7	11
P2	23	41
P3	36	56
P4	10	19
P5	21	41
P6	33	57
P7	17	30
P8	23	43
P9	30	50
P10	15	30
P11	22	40
P12	27	49
P13	28	44
P14	37	55
P15	42	61
P16	28	43
P17	37	54
P18	42	60
P19	13	24
P20	20	34

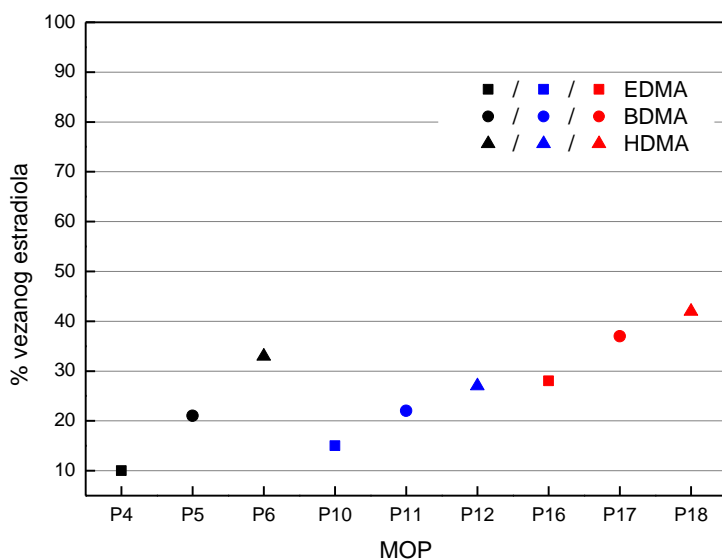
Uočava se da sa porastom dužine niza umreživača raste (P1<P2<P3) i vezivanje estradiola za dobijene polimere, međutim, ne postoji značajna razlika između vezivanja estradiola za neobeležene

i obeležene polimere. Takođe, vezivanje estradiola je značajno manje nego vezivanje holesterola za iste polimere. Ova činjenica ukazuje na dve stvari: prvo, da su dobijeni polimeri selektivni za vezivanje holesterola u odnosu na estradiol, pri istim uslovima vezivanja, i, drugo, da je vezivanje zasnovano na hidrofobnim interakcijama (estradiol je polarniji od holesterola te su hidrofobne interakcije manje izražene u procesu vezivanja za polimer).

Na **Slikama 22 i 23**, prikazani su rezultati vezivanja estradiola iz sistema metanol/voda 9/1 (V/V) za NOPe i MOPe. Može se uočiti da kod svih polimera sa porastom dužine lanca umreživača raste i vezivanje estradiola. Za EDMA polimere (P1<P7<P13), vezivanje estradiola u zavisnosti od porogena prati trend ACN>hloroform>2PrOH (obeleženo kvadratima na graficima).



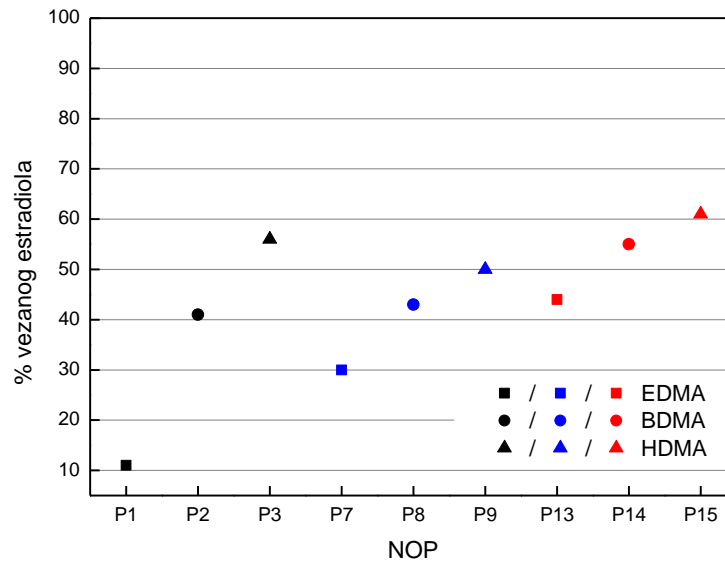
Slika 22. Vezivanje estradiola za NOPe iz rastvora estradiola u MeOH/voda 9/1 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljani su različitim simbolima (legenda je data na slici) (Pešić et al, 2020).



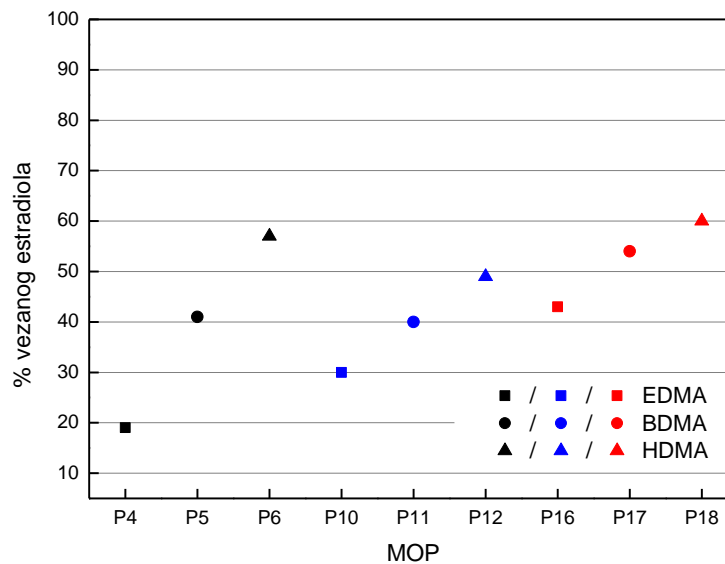
Slika 23. Vezivanje estradiola za MOPe iz rastvora estradiola u MeOH/voda 9/1 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljani su različitim simbolima (legenda je data na slici).

Ako se posmatraju rezultati vezivanja estradiola za sintetisane polimere iz rastvora koncentracije 10^{-4} M u metanol/voda 8/2 (V/V) (**Slike 24 i 25**) može se uočiti da specifično ponašanje

pokazuju polimeri P1 i P4, gde postoji razlika u vezivanju estradiola, dok kod ostalih polimera ta razlika praktično ne postoji ili je beznačajna, imajući u vidu da se % vezivanja estradiola gotovo ne razlikuje.



Slika 24. Vezivanje estradiola za NOPE iz rastvora estradiola u MeOH/voda 8/2 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).



Slika 25. Vezivanje estradiola za MOPe iz rastvora estradiola u MeOH/voda 8/2 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).

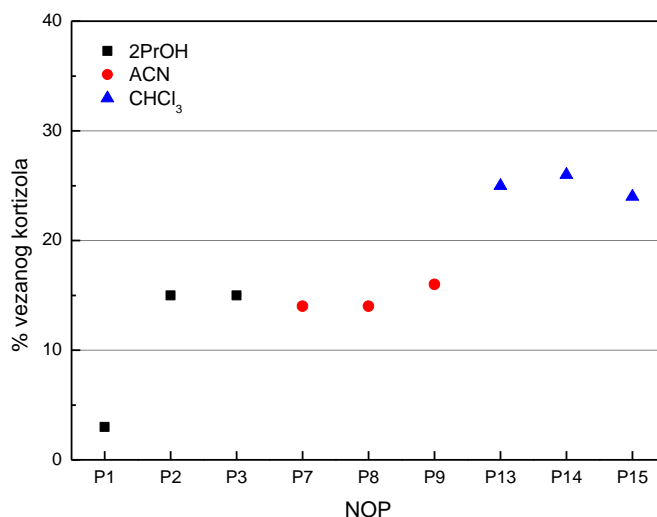
III.1.6.3 Vezivanje kortizola

Kortizol je najpolarniji od ispitanih steroida, te bi bilo očekivano da njegovo vezivanje za sintetisane polimere bude najmanje u sistemima metanol/voda. U **Tabeli 11** prikazani su rezultati vezivanja kortizola iz rastvora koncentracije 10^{-4} M u smešama metanol/voda 9/1 i 8/2 (V/V).

Tabela 11. Vezivanje kortizola u % iz MeOH/voda 9/1 i 8/2 iz rastvora koncentracije 10^{-4} M pri faznom odnosu 1:10.

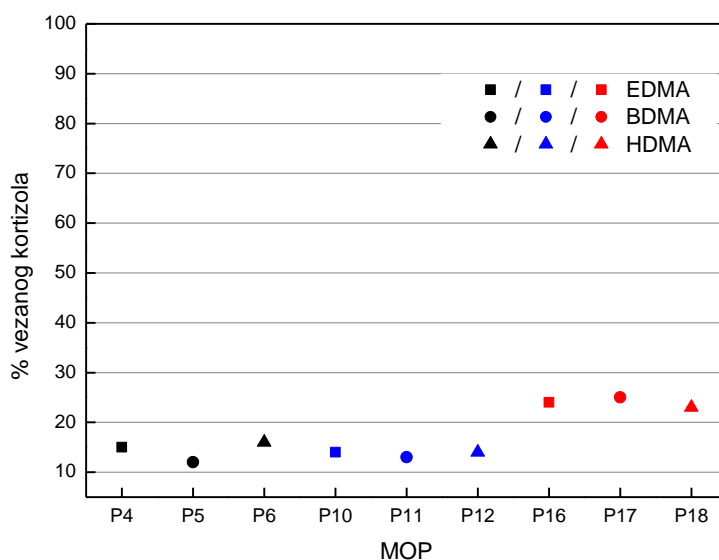
Polimer	Rastvarač	
	MeOH/H ₂ O 9/1 (V/V)	MeOH/H ₂ O 8/2 (V/V)
P1	3	8
P2	15	18
P3	15	25
P4	15	13
P5	12	18
P6	16	25
P7	14	18
P8	14	20
P9	16	21
P10	14	19
P11	13	19
P12	14	21
P13	25	32
P14	26	33
P15	24	30
P16	24	31
P17	25	32
P18	23	30
P19	/	17
P20	/	23

Na **Slici 26** prikazano je vezivanje kortizola koncentracije 10^{-4} M (MeOH/voda 9/1 (V/V)) za NOPe. Može se uočiti da se kortizol najmanje vezuje za EDMA NOP sintetisan u 2PrOH (P1), dok su vezivanja kortizola za preostale polimere sintetisane u 2PrOH i hloroformu slična i nezavisna kako od primenjenog porogena tako i od umreživača. Polimeri sintetisani u ACN pokazuju slično vezivanje kortizola, nezavisno od toga koji umreživač je upotrebljen.



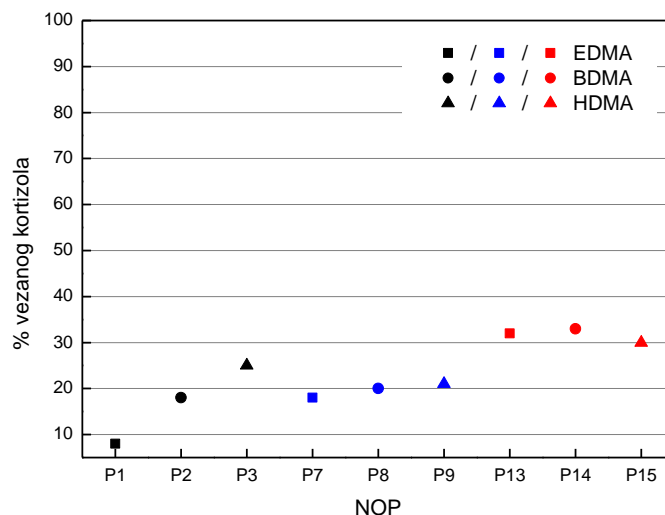
Slika 26. Vezivanje kortizola za NOPE iz rastvora kortizola u MeOH/voda 9/1 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).

Na **Slici 27** prikazani su rezultati vezivanja kortizola za MOPE. Korišćen je rastvor kortizola koncentracije 10^{-4} M, u smeši MeOH/voda 9/1 (V/V). MOPi sintetisani u 2PrOH i hloroformu kao porogenima pokazuju slično vezivanje kortizola, nezavisno od primenjenog umreživača. Polimeri sintetisani u ACN pokazuju nešto veće vezivanje kortizola, ali ponovo nezavisno od upotrebljenog umreživača.

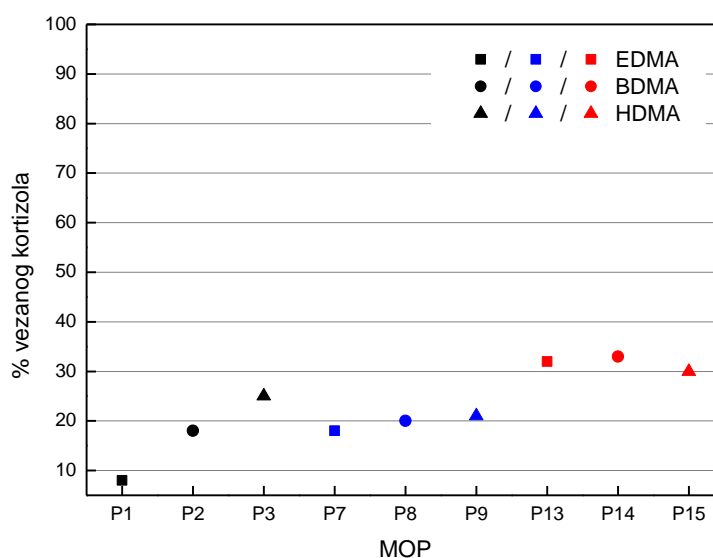


Slika 27. Vezivanje kortizola za MOPE iz rastvora kortizola u MeOH/voda 9/1 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).

Na **Slikama 28 i 29** grafički su prikazani rezultati vezivanja kortizola iz rastvora kortizola u MeOH/voda 8/2 (V/V) za sintetisane NOPE i MOPE. Trendovi koji se mogu zapaziti na ovim graficima slični su prethodno opisanim trendovima. Vezivanje kortizola je nezavisno od primenjenog umreživača, pri čemu polimeri sintetisani u ACN i u ovom slučaju pokazuju najveće vezivanje.



Slika 28. Vezivanje kortizola za NOPE iz rastvora kortizola u MeOH/voda 8/2 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).



Slika 29. Vezivanje kortizola za MOPe iz rastvora kortizola u MeOH/voda 8/2 (V/V). Porogeni su obeleženi različitim bojama: crno – 2PrOH, plavo – hloroform, crveno – ACN; korišćeni umreživači predstavljeni su različitim simbolima (legenda je data na slici).

Selektivnost polimera prema vezivanju drugih jedinjenja u odnosu na templat, izračunata je kao odnos distribucionih faktora. Rezultati za selektivnost P4 polimera su prikazani u **Tabeli 12**.

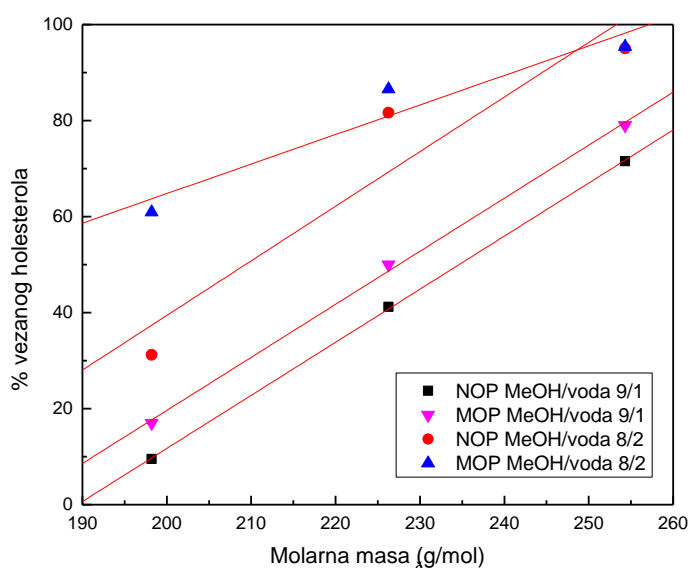
Tabela 12. Selektivnost P4 MOPa prema vezivanju drugih steroidnih jedinjenja u odnosu na holesterol iz sistema MeOH/voda 8/2 (V/V) (kortizol i estradiol) i 9/1 (V/V) (stigmasterol) (Pešić et al, 2020).

Steroid	Selektivnost	Pobošljanje u odnosu na NIP
Stigmasterol	1,1	1,0
Estradiol	6,5	1,7
Kortizol	10,6	2,1

Polimeri su praktično jednako selektivni za vezivanje stigmasterola kao za vezivanje holesterola – selektivnost iznosi 1,1. Selektivnost prema kortizolu i estradiolu je velika, i iznosi 10,6 i 6,5, respektivno. Ukoliko se selektivnost MOPa uporedi sa selektivnošću NOPa, može se izračunati poboljšanje selektivnosti kod MOPa za estradiol i kortizol. Stigmasterol i holesterol se slično vezuju i za neobeležene polimere. Treba imati u vidu da je selektivnost za kortizol i estradiol izračunata na osnovu vezivanja ovih steroida iz rastvora u MeOH/voda 8/2 (V/V), dok je za stigmasterol, zbog nedovoljne rastvorljivosti u ovom sistemu, selektivnost računata na osnovu vezivanja iz sistema 9/1 (V/V).

III.1.7 Veza između hidrofobnosti umreživača i vezivanja holesterola

Ukoliko se grafički prikaže zavisnost vezivanja holesterola za NOPe i MOPe (u MeOH/voda 9/1 (V/V)) od molarne mase umreživača (**Slika 30**), dobijaju se linearne zavisnosti (Pearson-ovi r koeficijenti za dobijene prave prikazani su u **Tabeli 13**), što ukazuje da vezivanje holesterola za prikazane polimere zavisi pre svega od hidrofobnosti umreživača. Slično se može uočiti i ukoliko se posmatra vezivanje u sistemu MeOH/voda 8/2 (V/V).



Slika 30. Zavisnost vezivanja holesterola (u %) iz rastvora koncentracije 10^{-4} M u MeOH/voda 9/1 i 8/2 (V/V) za NOPe i MOPe od molarne mase umreživača.

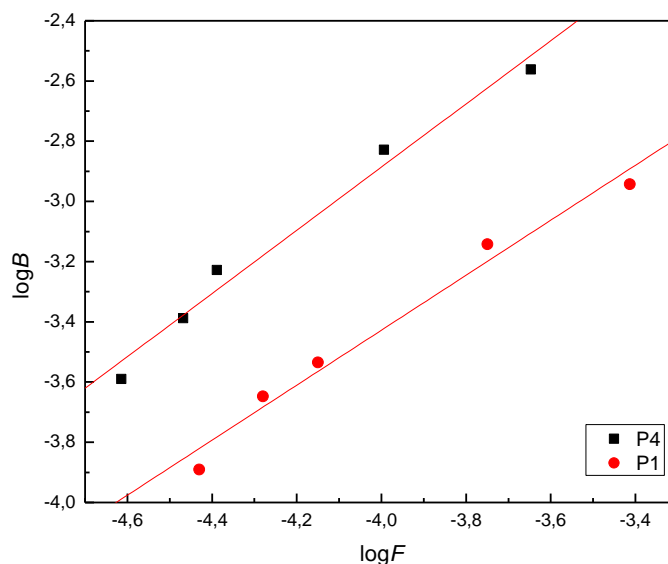
Tabela 13. Pearson-ovi r koeficijenti za prave zavisnosti % vezivanja holesterola od molarne mase umreživača.

Polimeri i rastvarač	Pearson-ov r koeficijent
NOP MeOH/voda 9/1 (V/V)	0,99992
MOP MeOH/voda 9/1 (V/V)	0,99931
NOP MeOH/voda 8/2 (V/V)	0,94822
MOP MeOH/voda 8/2 (V/V)	0,96291

III.1.8 Adsorpcione izoterme

Uobičajeno je da se adsorpcione izoterme konstruišu na osnovu vezivanja određenog jedinjenja za polimer u širokom opsegu koncentracija, npr. 10^{-4} do 10^{-2} M. Međutim, u ovom ispitivanom sistemu, zbog nedovoljne rastvorljivosti holesterola u sistemu metanol voda ovaj opseg koncentracija nije bio moguć. Stoga su izoterme konstruisane na osnovu eksperimenata vezivanja u opsegu koncentracija 0,05-0,5 mM.

Na **Slici 31** prikazane su logaritamske izoterme za polimere NOP P1 i MOP P4. Parametri jednačina prave dati su u **Tabeli 14**.



Slika 31. Adsorpcione logaritamske izoterme za polimere NOP P1 i MOP P4.

Tabela 14. Parametri jednačina pravih za polimere NOP P1 i MOP P4.

Polimer	Nagib	Odsečak	Pearson-ov koeficijent
P1	0,9133	0,2258	0,98899
P4	1,0498	1,3133	0,99099

Na osnovu prikazanih izoterma, može se zaključiti da, pošto su koeficijenti pravca pravih bliski jedinici, ispitani polimeri sadrže mesta homogena po afinitetu za vezivanje templata. Ovo nije uobičajen slučaj u hemiji MOPa, međutim, razlog za ovakav rezultat može biti opseg koncentracija rastvora holesterola koji je u relativno uskom opsegu.

III.1.9 Ponovljivost sinteze polimera

U cilju ispitivanja ponovljivosti sinteze polimera, sinteza polimera P1 i P4 izvedena je više puta. Rezultati prikazani u **Tabeli 15** pokazuju da je sinteza ponovljiva – dobijeni polimeri pokazuju slično vezivanje holesterola iz rastvora koncentracije 10^{-4} M u sistemu metanol/voda 8/2 (V/V).

Tabela 15. Vezivanje holesterola (u %) iz rastvora koncentracije 10^{-4} M u metanol/voda 8/2 (V/V) za ponovo sintetisane polimere.

	Sinteza 1	Sinteza 2	Sinteza 3	Sinteza 4	Sinteza 5
P1	31	32	/	/	/
P4	62	61	62	65	59

III.1.10 Sinteza MOPa za holesterol sa različitim sadržajem templata

U cilju optimizacije količine templata pri sintezi polimera, sintetisani su polimeri P21-P23 (**Tabela 16**), sa različitim sadržajem templata u prepolimerizacionoj smeši. Količina templata prikazana je po masi dobijenog polimera.

Tabela 16. Polimeri sintetisani sa različitim količinama templata (holesterola) tokom polimerizacije (porogen 2PrOH).

Polimer	Količina holesterola (mol/kg polimera)
P21	0,13
P22	0,25
P23	0,49
P4	1,22

Sintetisani su neobeleženi i obeleženi polimer gde je kao porogen korišćena smeša 2-propanola i vode u zapreminskom odnosu 5:1, sa ciljem da se prepolimerizaciona smeša učini polarnijom, što bi doprinelo boljoj adsorpciji holesterola na nepolarnom polimeru. Rezultati vezivanja holesterola za ove polimere prikazani su u **Tabeli 17** i ukazuju da je razlika u vezivanju holesterola minimalna.

Tabela 17. Vezivanje holesterola u % iz rastvora koncentracije 10^{-4} M u MeOH/voda 8/2 (V/V) pri faznom odnosu 1:10.

Polimer	% vezanog holesterola
P1	32
P21	40
P22	48
P23	25
P4	62

Pri vezivanju holesterola za dobijene polimere uočava se da polimer P1 najbolje vezuje holesterol i da vezivanje holesterola za ove polimere raste sa porastom količine holesterola u polimerizacionoj smeši. Polimer P23 odstupa od uočenog obrasca, međutim, naknadnim ispitivanjem je utvrđeno da polimer P23 nije dobro ispran od templata, te da je curenje holesterola sa polimera u rastvor značajno.

III.1.11 Karakterizacija polimera sa najboljim svojstvima

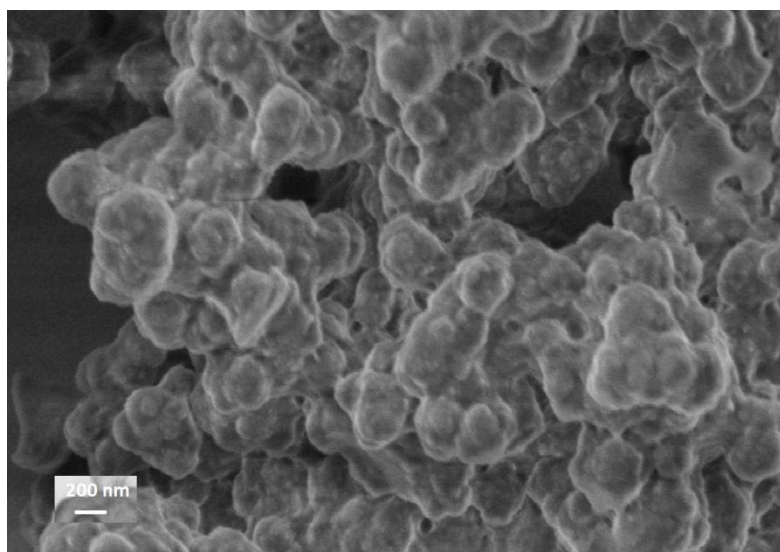
Fizisorpcijom azota na 77 K i pomoću SEM, okarakterisani su polimeri P1 i P4 koji su pokazali najbolja svojstva za vezivanje holesterola.

Rezultati fizisorpcije azota na 77 K prikazani su u **Tabeli 18**. Na osnovu prikazanih rezultata može se uočiti da su specifične površine (BET), kao i drugi teksturalni parametri poput zapremine pora za NOP P1 i MOP P4 veoma slični, što je značajno, jer ukazuje da razlika u vezivanju templata za ove polimere ne potiče samo od razlike u specifičnoj površini, već na to da površina MOPa ima veću sposobnost vezivanja holesterola, iako je specifična površina slična kao za NOP.

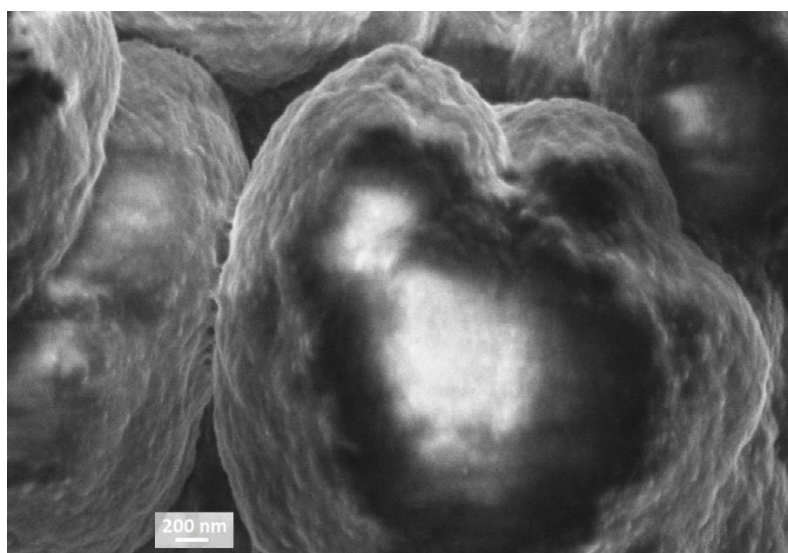
Tabela 18. Rezultati fizisorpcije azota na 77 K za polimere P1 i P4 (Pešić et al, 2020).

Polimer	S_{BET} m ² /g	$V_{0,96}$ cm ³ /g	V_{tot} cm ³ /g	W_0 cm ³ /g
P1	205	0,147	0,167	0,089
P4	223	0,155	0,161	0,093

Rezultati SEM analize za MOP P4 i NOP P1 prikazani su na **Slikama 32 i 33** pri uvećanju od 50000 puta. Oblik, veličina i struktura pojedinačnih čestica se razlikuju za ova dva polimera, što ukazuje da je prisustvo holesterola tokom sinteze polimera ostavilo posledice na strukturu polimera, tj. da je došlo do procesa obeležavanja. MOP P4 (**Slika 33**) ima slojevitu strukturu, pa je moguće da se vezivanje holesterola dešava i između ovih slojeva, koji se ne uočavaju kod NOPa (**Slika 32**). Kod MOPa se može uočiti i da postoje strukture nalik filamentima, što se kod NOPa ne uočava.



Slika 32. SEM slika NOPa P1 pri uvećanju od 50000 puta (Pešić et al, 2020).

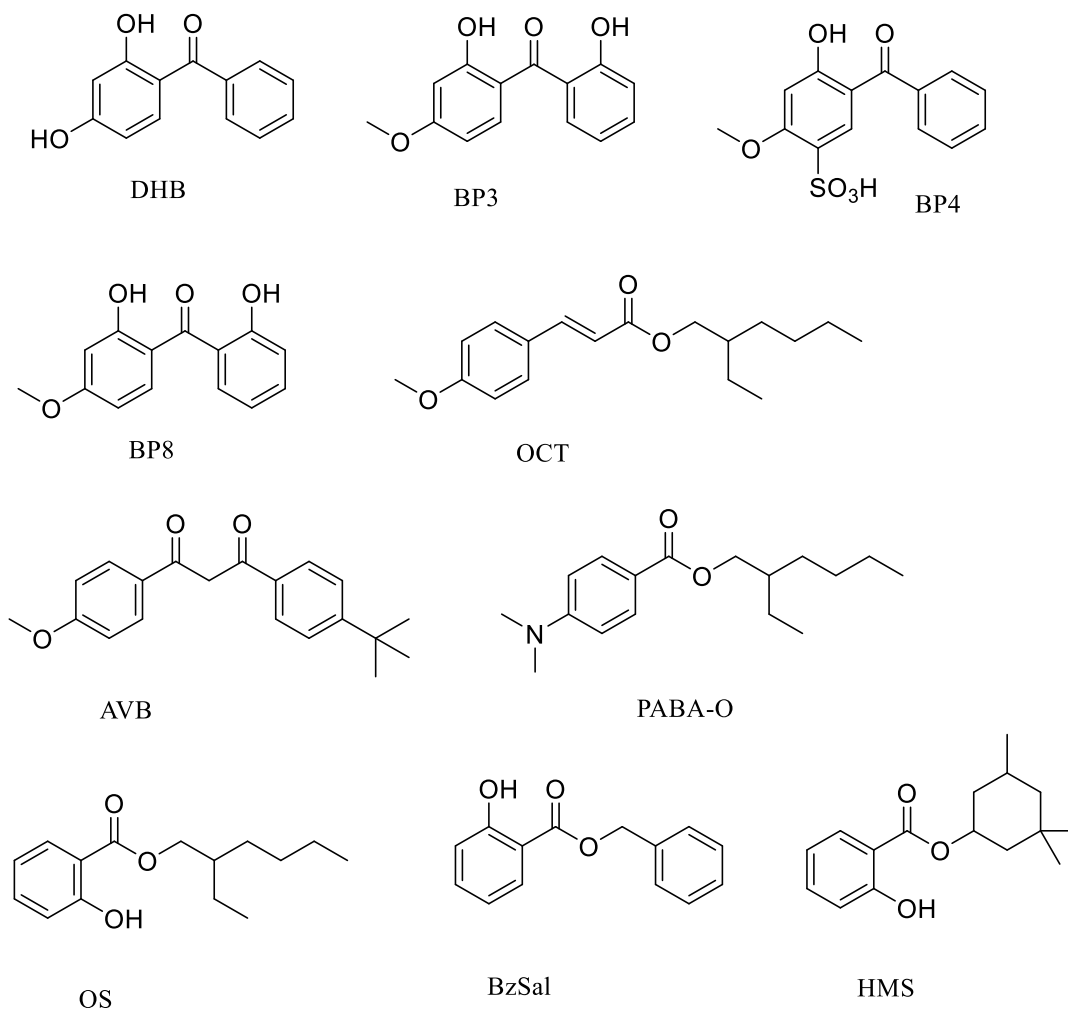


Slika 33. SEM slika MOPa P4 pri uvećanju od 50000 puta (Pešić et al, 2020).

III.2 Molekulski obeleženi polimeri za UV filtere

Na značaj razvoja MOPa za UV filtere ukazano je u Opštem delu. Sintezi MOPa za UV filtere u ovoj disertaciji pristupljeno je na nekoliko načina: prvo, pokušana je sinteza MOPa po istom principu kao u slučaju holesterola; zatim, pokušana je sinteza MOPa na bazi ciklodekstrina; na kraju, sintetisani su MOPi za benzofenon-4 pristupom koji se razlikuje od dva prethodno opisana. U našim prethodnim radovima opisana je sinteza MOPa za UV filtere klasičnim nekovalentnim pristupom, u prisustvu funkcionalnog monomera (Aksić, 2018; Radojičić 2020).

Na **Slici 34** su prikazane strukture UV filtera koji su korišćeni u ovoj disertaciji. U **Tabeli 19** prikazane su skraćenice korišćene za UV filtere u daljem tekstu disertacije.



Slika 34. Strukture UV filtera korišćenih u ovoj disertaciji.

Može se uočiti da je UV filter OCT nepolaran, za njim slede po polarnosti OS i HMS. Najpolarniji UV filter od prikazanih je BP4 koji sadrži sulfonsku kiselinu.

Tabela 19. Korišćeni UV filteri i njihove skraćenice.

Naziv	Skraćenica
2,4-dihidroksibenzofenon	DHB
Benzofenon-3	BP3
Benzofenon-4	BP4
Benzofenon-8	BP8
2-etilheksil-metoksicinamat	OCT
Butilmetoksidibenzoilmetan	AVB
Padimat O	PABA-O
2-etilheksil-salicilat	OS
Benzil-salicilat	BzSal
Homosalat	HMS

III.2.1 Molekulski obeleženi polimeri bez funkcionalnog monomera

III.2.1.1 Sinteza polimera

Sintetisana je serija polimera prikazanih u **Tabeli 20** po ugledu na prethodno opisane MOPE za holesterol. Pretpostavljeno je da će, ukoliko se polimerizacija vrši pri istim uslovima, u 2PrOH i samo u prisustvu umreživača, biti favorizovana adsorpcija templata na nastajući polimer. Ovakva očekivanja zasnovana su na nepolarosti polimera, a polarosti sredine u kojoj se izvodi polimerizacija. Kao templati su upotrebljeni 2-etilheksil-salicilat i 2,4-dihidroksibenzofenon.

Tabela 20. Sintetisani MOPi i NOPi bez funkcionalnog monomera.

Oznaka	Umreživač	Templat	Inicijator	Porogen
A1	EDMA	DHB	AIBN	2PrOH
A2	BDMA	DHB	AIBN	2PrOH
A3	HDMA	DHB	AIBN	2PrOH
A4	TEGDMA	DHB	AIBN	2PrOH
A5	EDMA	OS	AIBN	2PrOH
A6	BDMA	OS	AIBN	2PrOH
A7	HDMA	OS	AIBN	2PrOH
A8	TEGDMA	OS	AIBN	2PrOH
A9	TEGDMA	/	AIBN	2PrOH
A10	BDMA	/	AIBN	2PrOH
A11	HDMA	/	AIBN	2PrOH
A12	EDMA	/	AIBN	2PrOH
A14	TRIM	/	AIBN	2PrOH

III.2.1.2 Vezivanje UV filtera za sintetisane polimere

Ispitano je vezivanje nekoliko UV filtera za sintetisane polimere. Rezultati vezivanja su prikazani u **Tabeli 21**. Vezivanje je izvedeno iz rastvora UV filtera u sistemu metanol/voda 8/2 (V/V) pri faznom odnosu polimer:rastvor 1/10 (30,0 mg polimera i 300 μ L rastvora UV filtera). Rezultati su prikazani kao % vezanog UV filtera, pri čemu je koncentracija analita u rastvoru određena pomoću HPLC-DAD pre i nakon eksperimenta vezivanja.

Tabela 21. Rezultati vezivanja (u %) odabranih UV filtera za sintetisane polimere.

Polimer	DHB	PABA-O	OCT	OS	AVB
A1	69	64	75	71	89
A2	69	67	80	76	93
A3	70	71	87	84	95
A4	70	76	38	40	66
A5	70	82	71	70	86
A6	55	56	77	77	91
A7	42	31	88	86	96
A8	47	45	41	41	68
A9	43	27	34	41	67

Na osnovu prikazanih rezultata, uočeno je da vezivanje DHB za sintetisane MOPE gde je DHB korišćen kao templat ne zavisi od primenjenog umreživača. Vezivanje DHB je isto za EDMA MOPE gde je kao templat korišćen OS, kao i za DHB EDMA MOP. Polimeri gde je TEGDMA korišćen kao umreživač pokazali su najmanje vezivanje svih ispitanih UV filtera. Vezivanje OCT i AVB je jednako ili veće za sve sintetisane polimere nego vezivanje templat. Zaključeno je da isprobani pristup sintezi MOPa samo sa umreživačem, bez drugog monomera, ne daje zadovoljavajuće rezultate kada se kao templat koriste ispitani UV filteri. Razlika u vezivanju templat za NOPE i MOPE je svega nekoliko procenata ili čak NOP pokazuje bolje vezivanje od MOPa, pri čemu selektivnost dobijenih polimera nije zadovoljavajuća, jer se druga jedinjenja vezuju za MOPE više od templat.

III.2.2 Molekulski obeleženi polimeri zasnovani na ciklodekstrinima

III.2.2.1 Sinteza ciklodekstrinskih polimera

Već je rečeno da ciklodekstrini (CD) sa drugim molekulima (gosta) grade inkluzione komplekse, što može biti iskorišćeno u sintezi MOPa zasnovanih na ciklodekstrinima. U okviru ove doktorske disertacije pokušana je sinteza CD MOPa sa β -ciklodekstrinom (**Slika 9**), u prisustvu dva umreživača, heksameten-diizocijanata (HMDI, **Slika 3**) i toluen-2,4-diizocijanata (TDI, **Slika 3**) u prisustvu katalizatora dibutylkalaj-dilaurata (DBTDLA), u DMSO kao porogenu. Pregled sintetisanih polimera dat je u **Tabeli 22**. Polimeri NCD1, MCD1-MCD3 sintetisani su sa komercijalnim β -CD, dok su polimeri NCD2, NCD3 i MCD4-MCD9 sintetisani koristeći β -CD koji je prethodno sušen pod vakuumom do konstante mase, uz zagrevanje na 60 °C. Ovom prilikom, masa β -CD je smanjena za 14% u odnosu na početnu masu. Polimeri su nakon sinteze ispirani vrućim etanolom, vodom i acetonom i korišćeni u eksperimentima vezivanja.

Tabela 22. Sintetisani MOPi i NOPi zasnovani na β -ciklodekstrinu kao funkcionalnom monomeru

Oznaka polimera	Funkcionalni monomer	Umreživač	Templat	Porogeni rastvarač
NCD1	β -ciklodekstrin	HMDI	/	DMSO
MCD1	β -ciklodekstrin	HMDI	AVB	DMSO
MCD2	β -ciklodekstrin	HMDI	OCT	DMSO
MCD3	β -ciklodekstrin	HMDI	PABA-O	DMSO
NCD2	β -ciklodekstrin	HMDI	/	DMSO
MCD4	β -ciklodekstrin	HMDI	AVB	DMSO
MCD5	β -ciklodekstrin	HMDI	OCT	DMSO
MCD6	β -ciklodekstrin	HMDI	PABA-O	DMSO
NCD3	β -ciklodekstrin	TDI	/	DMSO
MCD7	β -ciklodekstrin	TDI	AVB	DMSO
MCD8	β -ciklodekstrin	TDI	OCT	DMSO
MCD9	β -ciklodekstrin	TDI	PABA-O	DMSO

III.2.2.2 Vezivanje templatata za CD polimere

Vezivanje UV filtera za sintetisane polimere ispitano je iz rastvora pojedinačnih UV filtera u metanolu. Fazni odnos polimer:rastvor iznosio je 1:10 (30,0 mg polimera i 300 μ L rastvora 10^{-4} M). U **Tabeli 23** prikazano je vezivanje UV filtera za NOP NCD1 (**Tabela 22**). Vezivanje je izračunato na osnovu razlike površine ispod pika za dato jedinjenje, pre i nakon vezivanja za polimer (u supernatantu). Svi rastvori su analizirani pomoću HPLC-DAD kako je to opisano u Eksperimentalnom delu. Prikazane su srednje vrednosti vezivanja za dve probe.

Tabela 23. Vezivanje UV filtera za polimer NCD1.

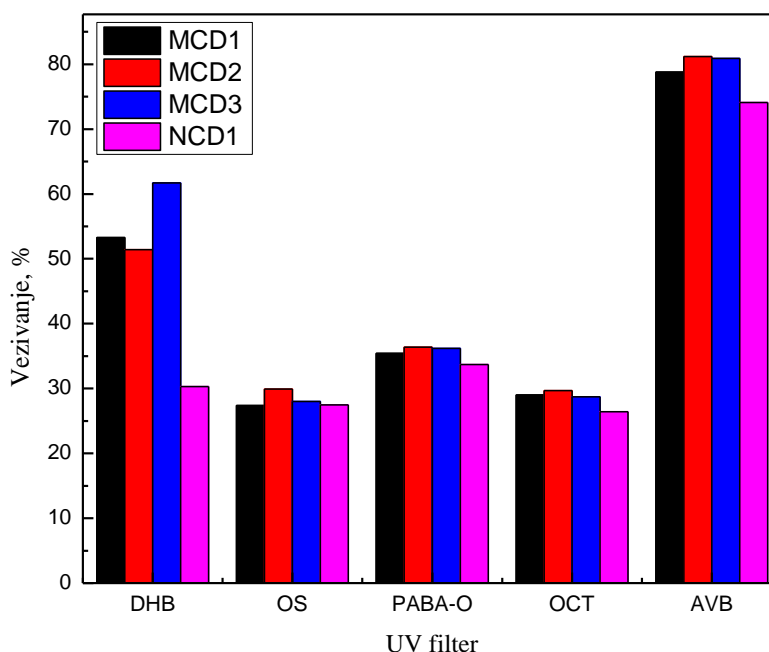
Jedinjenje	Vezivanje, %
DHB	30,3
OS	27,5
PABA-O	33,7
OCT	26,4
AVB	74,1

Rezultati vezivanja UV filtera za NCD1 ukazuju da i sintetisani NOP pokazuje selektivnost za vezivanje AVB, dok se ostali ispitani UV filteri vezuju u sličnom procentu za NCD1.

U **Tabeli 24** prikazani su rezultati vezivanja UV filtera za CD MOPe MCD1-MCD3. Na **Slici 35** grafički su prikazani rezultati vezivanja.

Tabela 24. Vezivanje UV filtera (u %) iz rastvora 10^{-4} M u metanolu za CD MOPE, pri faznom odnosu 1:10.

Jedinjenje	MCD1	MCD2	MCD3
DHB	53,3	51,4	61,7
OS	27,4	29,9	28,0
PABA-O	35,4	36,4	36,2
OCT	29,0	29,7	28,7
AVB	78,8	81,2	80,9

**Slika 35.** Rezultati vezivanja UV filtera za NCD1 i MCD1-MCD3.

Na osnovu rezultata vezivanja UV filtera za MOPE, može se zaključiti da do obeležavanja polimera pri primenjenim uslovima nije došlo. Vezivanje OS za NCD1 i MCD1-MCD3 je slično (27,4-29,9%) što ukazuje da MOPi vezuju OS jednako kao NOP. Isti je slučaj sa PABA-O gde je vezivanje u opsegu 33,7-36,4%, kao i za OCT (26,4-29,7%). Za sve ispitane polimere najbolje se vezuje AVB, mada vezivanje za NOP (74,1%) nije bitno drugačije u odnosu na vezivanje za MOPE (78,8-81,2%). Sintetisani MOPi su pokazali značajno bolje vezivanje jedino za DHB, gde NOP vezuje 30,3%, a MOPi 51,4-61,7%.

Ispitivanjem vezivanja odabranih UV filtera za polimere NCD2, NCD3, MCD7 i MCD8 koje je urađeno iz rastvora UV filtera u sistemima MeOH/voda 8/2 (V/V) i THF/voda 1/1 (V/V) zaključeno je da ne postoje značajne razlike u vezivanju UV filtera, te da čak NOP vezuje više od MOPa u nekim slučajevima, te rad na ovom tipu polimera nije nastavljen. Odabrani rezultati su prikazani u **Tabeli 25**.

Tabela 25. Vezivanje UV filtera za odabrane CD polimere pri faznom odnosu 1:10 i koncentraciji templata 10^{-4} M.

Polimer				
Jedinjenje	NCD2	NCD3	MCD7	MCD8
PABA-O (MeOH/voda 9/1)	10,2	25,6	27,3	29,5
OCT (THF/voda 9/1)	20,5	33,7	25,3	35,0
AVB (THF/voda 9/1)	2,7	21,8	5,6	24,1

III.2.3 Molekulski obeleženi polimeri za benzofenon-4

Benzofenon-4 (**Slika 34**) ima dve jonizabilne grupe, sulfonsku kiselinu ($-\text{SO}_3\text{H}$) i fenolnu $-\text{OH}$ grupu. Imajući u vidu da je sulfonska kiselina jaka kiselina, BP4 sa baznim funkcionalnim monomerima poput 4VP i DMAEM (**Slika 2**) formira jonske parove. Fenolna OH grupa predstavlja slabu kiselinu i može formirati vodonične veze sa 4VP i DMAEM, međutim, kako je u BP4 OH grupa u *orto* položaju u odnosu na keto grupu, ove dve grupe mogu formirati pseudo-šestočlani prsten. Stoga, fenolna OH grupa verovatno ne učestvuje značajno u stabilizaciji prepolimerizacionog kompleksa sa baznim funkcionalnim monomerima. BP4 sadrži i metoksi grupu koja se ponaša kao akceptor vodonične veze. Za sintezu MOPa za BP4 odabrani su prethodno navedeni bazni funkcionalni monomeri, 4VP i DMAEM, zbog mogućnosti nastajanja jonskih parova, ali, u slučaju 4VP i zbog $\pi-\pi$ interakcija. Umreživači poput DVB takođe mogu ostvariti $\pi-\pi$ interakcije što bi trebalo da doprinese stabilnosti prepolimerizacionog kompleksa.

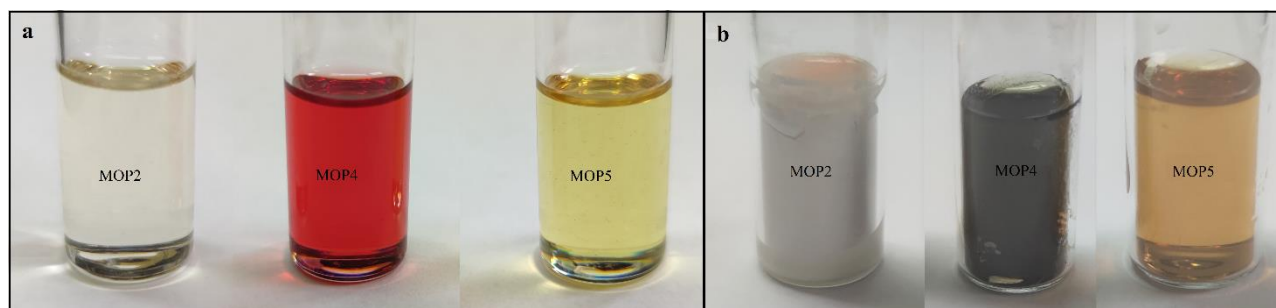
III.2.3.1 Sinteza MOPa obeleženih benzofenonom-4

Sintetisani su polimeri gde je kao templat korišćen BP4, kao i njihovi neobeleženi analozi prikazani u **Tabeli 26**. Polimeri gde je kao funkcionalni monomer korišćen DMAEM sintetisani su u ACN koji se uobičajeno koristi u sintezi MOPa jer favorizuje nekovalentne interakcije templata sa monomerom. Međutim, kada je kao monomer korišćen 4VP, pokazalo se da prepolimerizacioni kompleks nije rastvoran u ACN (kako čistom ACN, tako ni u prisustvu umreživača). Kako pomenuti kompleks nije rastvoran ni u ACN/toluen smešama, ni u acetonu, kao porogen je korišćen suvi DMSO, iako predstavlja polaran rastvarač. Pretpostavljeno je da, ukoliko dolazi do građenja jonskih parova, oni ne bi trebalo da budu narušeni čak ni u rastvaračima poput DMSO.

Tabela 26. Sintetisani MOPi za BP4 i odgovarajući NOPi (Pešić et al, 2022).

Polimer	Templat	Monomer	Umreživač	Porogen
NOP1	/	DMAEM	EDMA	ACN
MOP1	BP4 1 ekv	DMAEM 4 ekv	EDMA 20 ekv	ACN
NOP2	/	DMAEM	DVB	ACN
MOP2	BP4 1 ekv	DMAEM 4 ekv	DVB 20 ekv	ACN
NOP3	/	4VP	EDMA	DMSO
MOP3	BP4 1 ekv	4VP 4 ekv	EDMA 20 ekv	DMSO
NOP4	/	4VP	DVB	DMSO
MOP4	BP4 1 ekv	4VP 4 ekv	DVB 20 ekv	DMSO
NOP5	/	4VP	DVB	DMSO
MOP5	BP4 1 ekv	4VP 1 ekv	DVB 10 ekv	DMSO

Prilikom sinteze polimera, primećeno je da su prepolimerizacione smeše različito obojene (**Slika 36**). Dok je prepolimerizaciona smeša za MOP2 bledožuta, za MOP4 je crveno obojeno, a za MOP5 žuto obojena. BP4 je čvrsta žuta supstanca koja u rastvoru DMSO i ACN daje gotovo bezbojne rastvore u koncentracijama manjim od 0,01 M. Nakon sinteze, a pre ispiranja, polimer MOP2 je bele boje, MOP4 je tamnosiv, a MOP5 bledoroze boje, gotovo proziran. Po ispiranju templata, MOP4 i MOP5 su bili bledožute boje. Formiranje crveno obojenog prepolimerizacionog kompleksa primećeno je ukoliko se direktno pomešaju templat i 4VP. Kada se templat rastvori u porogenu, a potom doda 4VP, crveno obojenje nastaje tek stajanjem preko noći.



Slika 36. a) Prepolimerizacione smeše za MOP2, MOP4 i MOP5 i b) sintetisani polimeri MOP2, MOP4 i MOP5 (Pešić et al, 2022).

III.2.3.2 Faktori obeležavanja

Faktori obeležavanja su izračunati kao odnos distribucionih faktora za MOP i odgovarajući NOP, kako je opisano u Opštem delu. U **Tabeli 27** prikazani su faktori obeležavanja za sintetisane polimere, dobijeni na osnovu eksperimenata vezivanja templata iz rastvora koncentracije 10,0 mM, kako u ACN, tako i u smešama ACN/voda u zapreminskom odnosu 1/4, za polimere pri faznom odnosu 1:200.

Tabela 27. Faktori obeležavanja za MOP/NOP parove u ACN i 20% ACN u vodi (10,0 mM BP4, fazni odnos 1:200) (Pešić et al, 2022).

Polimeri	IF _{ACN}	IF _{ACN-voda} (20 % ACN, V/V)	Poboljšanje IF (IF _{ACN-voda} /IF _{ACN})
MOP:NOP1	1,05	1,14	1,10
MOP2:NOP2	2,53	2,64	1,04
MOP3:NOP3	1,40	1,75	1,25
MOP4:NOP4	2,60	3,17	1,22
MOP5:NOP5	2,10	3,43	1,63

Uočljivo je da je kod svih parova polimera došlo do obeležavanja, imajući u vidu da su faktori obeležavanja veći od 1. Obeležavanje u slučaju MOP1/NOP1 para je veoma skromno i iznosi svega 1,05. Međutim, za par MOP4/NOP4 faktor obeležavanja je 2,60, a sličan je i za par MOP2/NOP2 gde iznosi 2,53. Faktori obeležavanja izračunati su i kada je rastvarač za ponovno vezivanje bila smeša ACN/voda u zapreminskom odnosu 1/4, imajući u vidu da bi polimeri imali primenu pri

ekstrakciji čvrstom fazom u vodenim sredinama. Kod svih parova polimera, faktori obeležavanja su veći u prisustvu vode, nego u čistom ACN. Potencijalni razlog za ovakvo ponašanje polimera jeste da je voda narušila templat-monomer(polimer) interakcije, ali kako bi kod MOPa trebalo da postoje obeležena mesta većeg afiniteta nego kod NOPa, interakcije su bile jače, te je smanjenje vezivanja usled narušavanja interakcija bilo manje. Verovatno je dodatak vode smanjio vezivanje templata za mesta nižeg afiniteta u MOPu. U **Tabeli 27** je prikazano i poboljšanje faktora obeležavanja u prisustvu vode, na osnovu čega se može zaključiti da je ovaj efekat najznačajniji kod para MOP5/NOP5. Ovakav rezultat se može objasniti na osnovu sastava polimera.

Naime, pri sintezi MOP5 korišćen je 1 ekvivalent funkcionalnog monomera, u odnosu na templat. Imajući u vidu već rečeno da između templata i funkcionalnog monomera najverovatnije nastaju jonski parovi, bilo bi očekivano da kod MOP5 celokupna količina templata i funkcionalnog monomera nagradi prepolimerizacioni kompleks. Ukoliko je izneta pretpostavka tačna, to bi značilo da se u MOP5 svaki funkcionalni monomer nalazi u mestu visokog afiniteta, tj. obeleženom mestu, te da dodatak vode ne narušava interakcije dovoljno da spreči vezivanje templata u potpunosti. Još jedna potvrda ovakvog tumačenja jeste da je dodatkom vode pri vezivanju, vezivanje templata za MOP5 beznačajno smanjeno (sa 29,5 na 29,1%) dok je kod MOP4 ova razlika značajna (sa 55,4 na 38,2%). U **Tabeli 28** prikazani su rezultati vezivanja BP4 za sintetisane polimere, u ACN i ACN/voda 1/4.

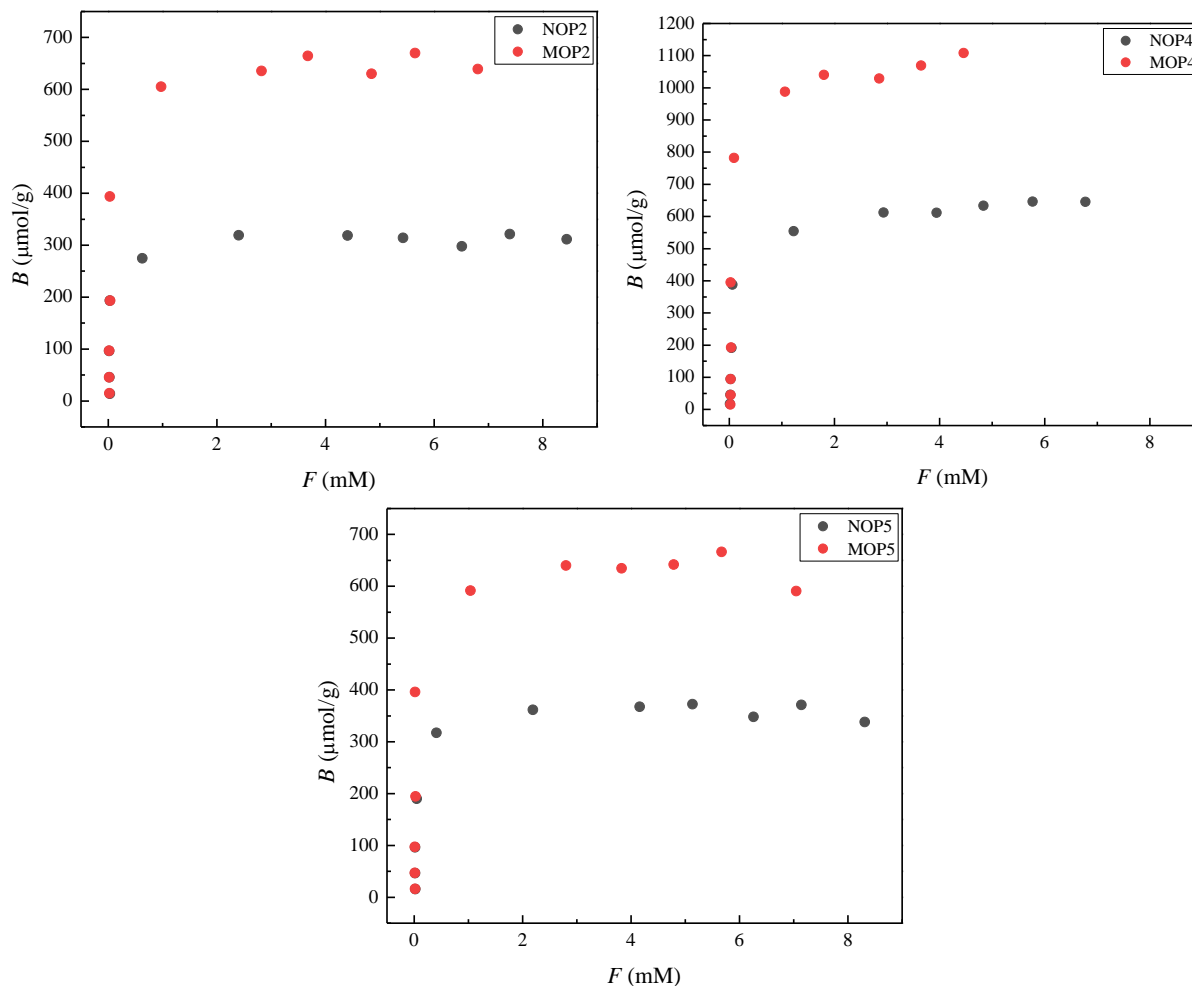
Tabela 28. Vezivanje BP4 za polimere iz ACN i 20% ACN u vodi (10,0 mM BP4, fazni odnos 1:200) (Pešić et al, 2022).

Polimer	% vezanog BP4 (ACN)	% vezanog BP4 (20% ACN, V/V)
NOP1	29,5	26,6
MOP1	30,5	29,4
NOP2	15,6	11,0
MOP2	31,9	24,7
NOP3	30,9	18,9
MOP3	38,6	29,0
NOP4	32,2	16,3
MOP4	55,4	38,2
NOP5	16,9	10,7
MOP5	29,5	29,1

III.2.3.3 Adsorpcione izoterme

Adsorpcione izoterme konstruisane su na osnovu vezivanja templata za NOPE i MOPE, iz rastvora ACN. Koncentracije rastvora templata bile su u opsegu od 10^{-4} do 10^{-2} M. Primenjeni fazni odnos bio je 1:200. Podaci na osnovu kojih su konstruisane izoterme prikazani su u Prilogu (Tabele P1-P6).

Na Slici 37 prikazane su adsorpcione izoterme za sintetisane NOPE i MOPE, prikazane kao zavisnost vezane količine templata (B $\mu\text{mol/g}$) od slobodne koncentracije templata u rastvoru (F mM).



Slika 37. Adsorpcione izoterme za odabrane polimere.

Na osnovu izgleda prikazanih adsorpcionih izoterma, može se uočiti da je vezivanje templata za svaki od sintetisanih MOPa veće nego za odgovarajući NOP, te da je obeležavanje uspešno izvedeno. Uočljivo je da polimeri NOP2 i NOP5 imaju izoterme sličnih karakteristika. Takođe, slične su izoterme za polimere MOP2, NOP4 i MOP5. Jedino izoterma za MOP4 odstupa, ukazujući na jako veliki adsorpcioni kapacitet za vezivanje BP4.

III.2.3.4 Elementalna analiza

Rezultati elementalne analize odabranih polimera prikazani su u **Tabeli 29**.

Tabela 29. Rezultati elementalne analize odabranih polimera (Pešić et al, 2022).

Polimer	Element	%C	%H	%N
NOP2		84,05	8,47	2,04
MOP2		83,11	8,59	1,96
NOP4		88,14	8,13	1,96
MOP4		79,26	7,26	1,64
NOP5		85,78	7,80	1,00
MOP5		89,74	8,01	1,00

Sadržaj azota u polimerima merilo je sadržaja monomera, pošto jedino monomer sadrži azot, od svih prisutnih komponenti. Sadržaj azota u polimerima MOP2 i NOP2 se ne razlikuje značajno, kao ni sadržaj vodonika i ugljenika. Kod para MOP5/NOP5 sadržaj azota je identičan, sadržaj vodonika približan, dok se sadržaj ugljenika razlikuje za nekoliko procenata. Jedino MOP4 ima sastav koji se razlikuje od NOP4, najviše po sadržaju ugljenika, potom vodonika, a donekle i po sadržaju azota. U **Tabeli 30** su prikazani izračunati sadržaj azota na osnovu upotrebljenih komponenti i sadržaj azota određen elementalnom analizom.

Tabela 30. Poređenje izračunatog i određenog sadržaja azota (u %) u odabranim polimerima.

Polimer	Izračunat %N	Određen %N
NOP2	1,73	2,04
MOP2	1,73	1,96
NOP4	1,83	1,96
MOP4	1,83	1,64
NOP5	1,00	1,00
MOP5	1,00	1,00

Izračunati i određeni sadržaj azota se u potpunosti poklapaju za polimere NOP5/MOP5, dok za preostale polimere postoji dobra saglasnost. Ovi rezultati ukazuju na uspešnost ugradnje funkcionalnog monomera u polimer. Dalje su poređeni adsorpcioni kapaciteti polimera na osnovu određenog sadržaja azota sa drugim metodama.

III.2.3.5 Adsorpcioni kapaciteti

Adsorpcioni kapaciteti odabranih polimera analizirani su poredeći podatke dobijene na nekoliko različitih načina. Na osnovu sastava komponenti može se izračunati maksimalni teorijski kapacitet polimera za vezivanje templata. Iz rezultata dobijenih elementalnom analizom, na osnovu sadržaja azota, izračunat je maksimalni adsorpcioni kapacitet. Konduktometrijskom titracijom polimera standardnim rastvorom hlorovodonične kiseline određen je sadržaj baznih grupa u polimeru. Na kraju, na osnovu adsorpcionih izoterma, pri vezivanju BP4 iz rastvora 10,0 mM u ACN, adsorpcioni kapacitet je i eksperimentalno određen. Dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 31** i na **Slici 38**.

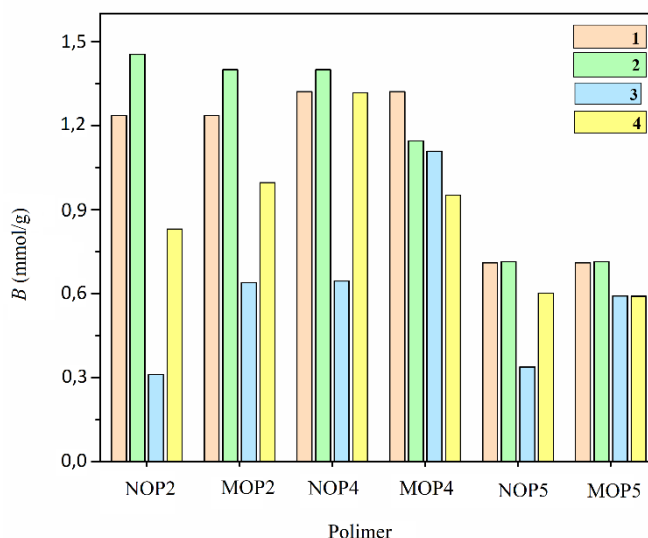
Tabela 31. Poređenje adsorpcionih kapaciteta dobijenih različitim metodama (Pešić et al, 2022).

Polimer	Izračunato N (mmol/g)	Mikroanaliza N (mmol/g)	Adsorpcione izoterme (mmol/g)	Konduktometrija (mmol/g)
NOP2	1,236	1,454	0,311	0,830
MOP2	1,236	1,400	0,639	0,996
NOP4	1,321	1,400	0,645	1,317
MOP4	1,321	1,145	1,108	0,952
NOP5	0,710	0,714	0,338	0,601
MOP5	0,710	0,714	0,591	0,590

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su za MOP5 i NOP5 rezultati dobijeni elementarnom analizom u potpunoj saglasnosti sa izračunatim kapacitetom na osnovu sastava komponenti koje su stupile u reakciju polimerizacije. Vrednosti za parove NOP2/MOP2 i NOP4/MOP4 su u dobroj saglasnosti sa teorijskim.

Konduktometrijski određeni kapaciteti su nešto niži od izračunatih na osnovu sastava monomera i sadržaja azota dobijenog mikroanalizom. Imajući u vidu da je hidronijum jon ima mali jonski radijus i da bi trebalo da protonuje sve prisutne azote u polimeru, ovakva razlika može se objasniti dužim vremenom koje je potrebno za uspostavljanje ravnoteže pri titraciji.

Na osnovu izotermi, utvrđeno je da najveći adsorpcioni kapacitet ima polimer MOP4 (1,108 mmol/g). Uočljiva je razlika između polimera MOP2/NOP2 i polimera MOP5/NOP5. Naime, ako se pogleda grafički prikaz kapaciteta (**Slika 38**), uočava se da iako ovi polimeri imaju slične kapacitete određene na osnovu izotermi, očekivano bi bilo da se kapaciteti određeni na osnovu izotermi značajno razlikuju od onih određenim drugim metodama. Polimeri MOP4 i MOP5 dostižu gotovo teorijske vrednosti za vezivanje templata.

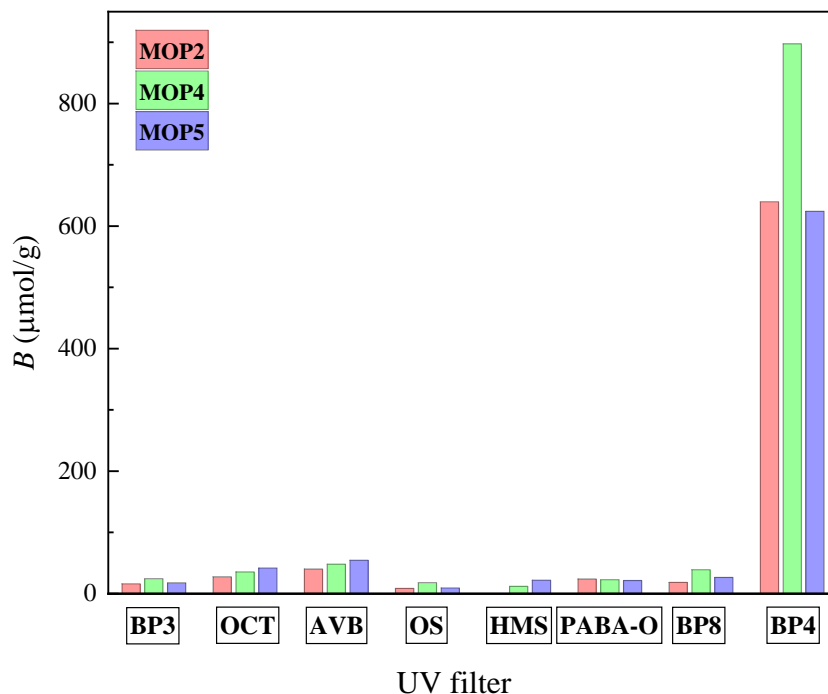


Slika 38. Adsorpcioni kapaciteti polimera: **1:** izračunato, na osnovu sastava monomera; **2:** na osnovu sadržaja azota određenog mikroanalizom; **3:** na osnovu adsorpcionih izotermi; **4:** konduktometrijski, na osnovu potrošnje HCl (Pešić et al, 2022).

Određeni adsorpcioni kapaciteti koji su u opsegu 0,591-1,108 mmol/g, dok su u literaturi opisani mnogo manji kapaciteti za vezivanje benzofenonskih UV filtera – 27,90 $\mu\text{mol/g}$ do 96,06 $\mu\text{mol/g}$ (Ayadi et al, 2019).

III.2.3.6 Selektivnost polimera

Selektivnost dobijenih polimera ispitana je poredeći vezivanje BP4 i drugih UV filtera iz rastvora koncentracije 5,0 mM u ACN, pri faznom odnosu 1:200 (5,0 mg polimera i 2000 μ L rastvora). BP4 se ubedljivo najviše vezuje za polimere od svih ispitanih UV filtera. Imajući u vidu strukturu BP4 i drugih ispitanih UV filtera, ova činjenica se lako može objasniti razlikom u kiselosti BP4 u odnosu na ostale UV filtere. Jedino je BP4 izrazito kiseo, zbog prisustva sulfonske grupe (**Slika 34**). Na **Slici 39** su prikazani adsorpcijski kapaciteti za BP4 i druge UV filtere. Vezivanje drugih ispitanih UV filtera je <5,5 %, dok je vezivanje BP4 55,4% pri istim uslovima. Jonski parovi koji nastaju između sulfonske grupe i piridinskog jezgra, kao što je već rečeno, razlog su za ovako izraženo vezivanje. Preostali ispitani UV filteri mogu se za polimer vezati vodoničnim vezivanjem ili π - π interakcijama koje su znatno slabije od interakcija u jonskim parovima.



Slika 39. Selektivnost MOPa prema UV filterima izražena kao adsorpcijski kapacitet (μ mol/g) (Pešić et al, 2022).

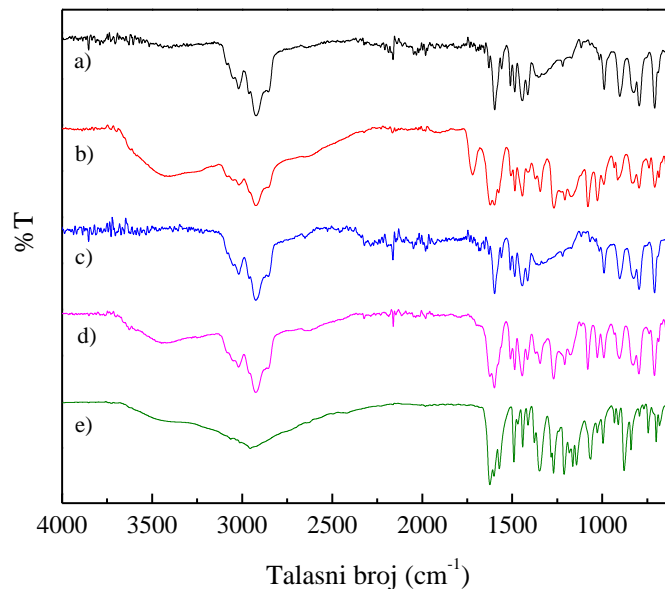
III.2.3.7 Ekstrakcija čvrstom fazom

S obzirom na odlične pokazane karakteristike vezivanja i selektivnosti, MOP4 je iskorišćen kao sorbent za ekstrakciju čvrstom fazom BP4 iz vodenih rastvora. Prilikom propuštanja 50,0 mL rastvora BP4 koncentracije 5 mg/L, adsorbovano je 95% prisutnog BP4, a ponovnim propuštanjem jednom propuštenog rastvora adsorbovano je ukupno 98,5% početne količine BP4. Može se zaključiti da je adsorpcija BP4 na MOP4 veoma efikasna, čak i iz vodenih rastvora što olakšava primenu MOPa i veoma je značajno u analizi realnih uzoraka.

III.2.3.8 Infracrvena spektroskopija

Na **Slici 40** prikazani su infracrveni spektri NOP4, MOP4, BP4 i BP4 vezanog za NOP4 i MOP4 dobijeni tehnikom ATR-FTIR. Spektri NOP4 i MOP4 izgledaju identično, na osnovu čega se može zaključiti da je sinteza polimera protekla na identičan način nezavisno od prisustva templata, kao i da u obeleženom polimeru MOP4, nakon ispiranja, nije zaostalo templata, odnosno da je uspešnost ispiranja maksimalna. Razlike u spektrima polimera bez i sa templatom u oblasti 1500-1700 cm^{-1} ukazuju da je templat vezan za polimere, imajući u vidu da su identične trake

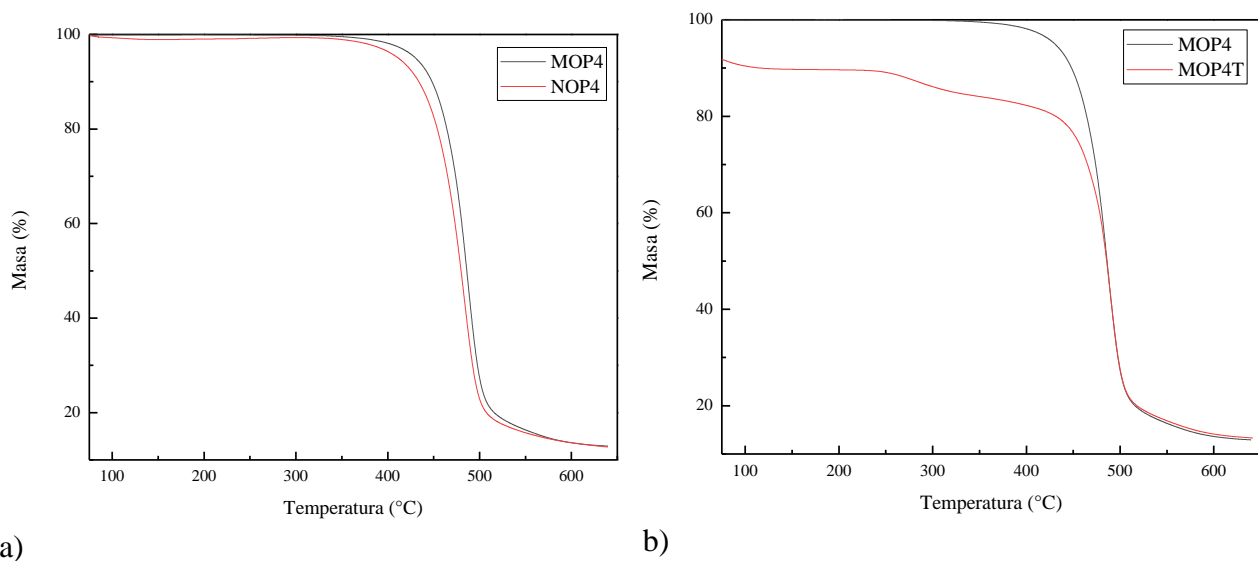
prisutne i u spektru BP4. Imajući u vidu da je tokom rada sa BP4 primećeno da je njegova težnja ka sorpciji vode velika (čak i komercijalna supstanca sadrži 10-15% vode), prisustvo traka u regionu vodoničnog vezivanja ($3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) najverovatnije potiče od vezane vlage.



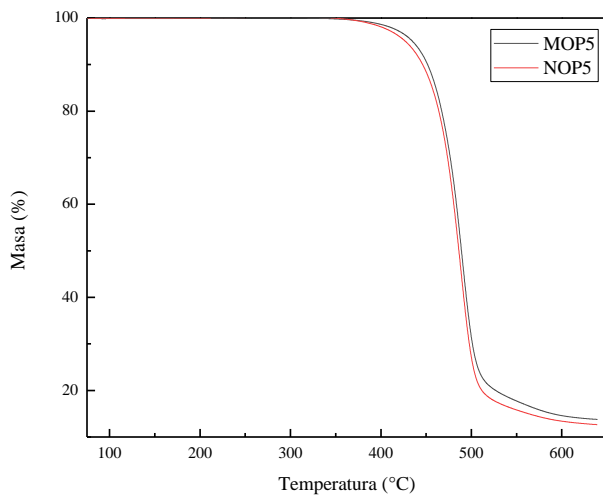
Slika 40. FTIR spektri: a) MOP4; b) MOP4 sa vezanim BP4; c) NOP4; d) NOP4 sa vezanim BP4; e) BP4 (Pešić et al, 2022).

III.2.3.9 Termogravimetrijska analiza

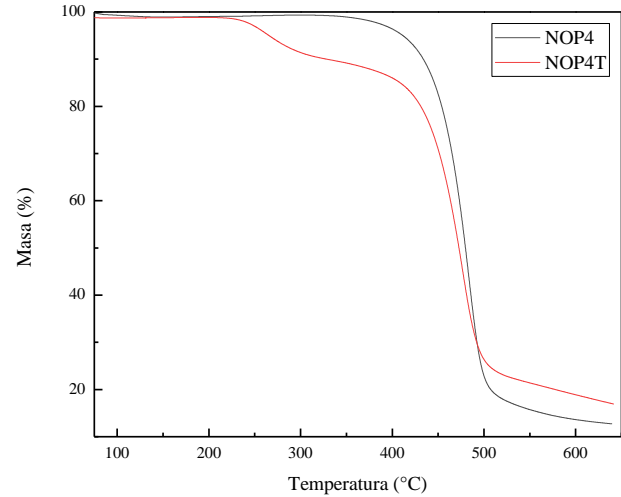
Termička stabilnost polimera NOP4, MOP4, NOP5, MOP5, kao i polimera NOP4 i MOP4 sa vezanim templatom ispitana je termogravimetrijskom analizom (TGA) u opsegu $75\text{-}625^\circ\text{C}$. Rezultati TGA analize prikazani su na **Slici 41**.



Slika 41. TGA termogrami ispitivanih polimera.



c)



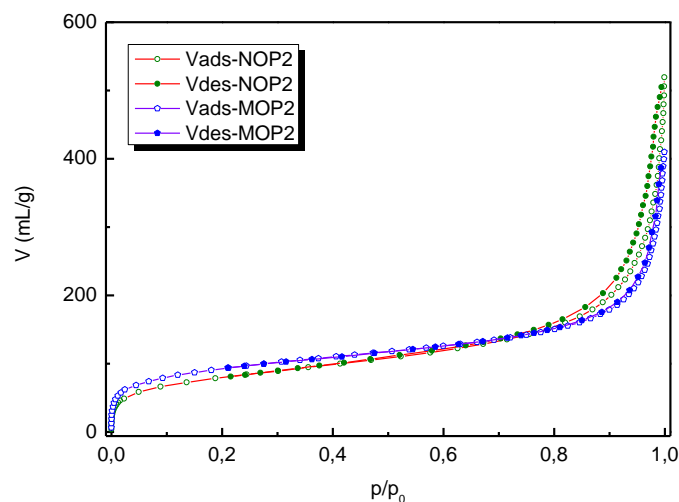
d)

Slika 41 (nastavak). TGA termogrami ispitivanih polimera.

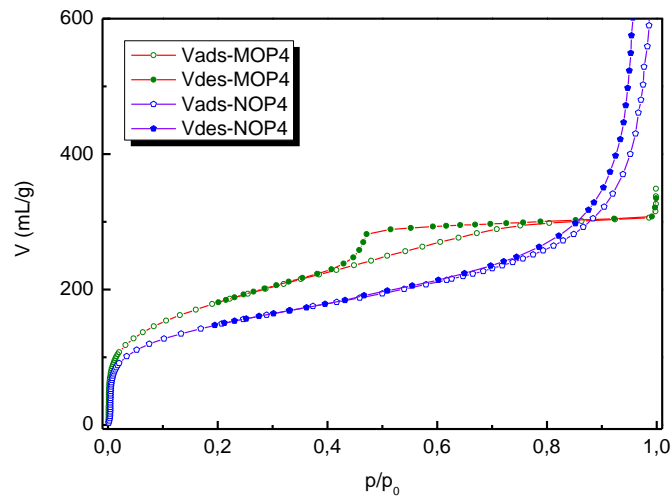
Sa **Slike 41 a)** može se uočiti da su polimeri NOP4/MOP4 stabilni do 350°C kada počinje dekompozicija polimera, pri čemu iznad 500°C dolazi do potpune degradacije polimera. MOP4 je nešto stabilniji termički od NOP4, što se može videti po tome da je temperatura dekompozicije pomerenka ka višim vrednostima u odnosu na NOP4. Isti obrazac sledi i polimerni par MOP5/NOP5 (**c**). Kada se posmatra termičko ponašanje polimera bez i sa vezanim templatom (**b** i **d**), uočava se da razgradnja templata počinje na oko 250°C. U slučaju polimera MOP4 sa vezanim templatom, uočava se gubitak mase već na 75-100°C koji najverovatnije potiče od vezane vlage, što je posledica higroskopsnosti BP4 vezanog za polimer.

III.2.3.10 Fizisorpcija azota na 77 K

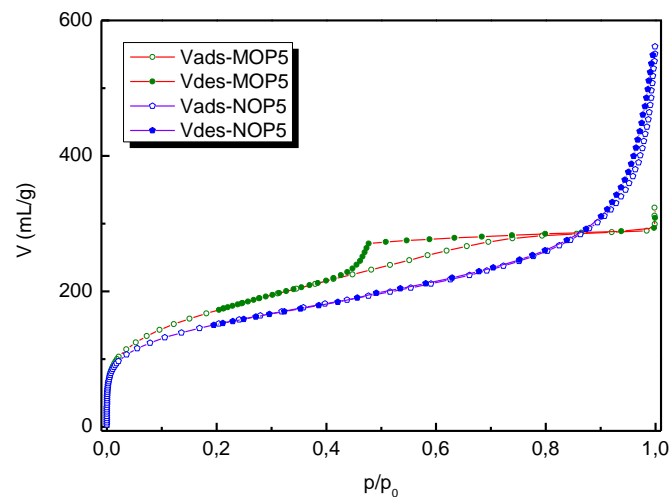
U cilju određivanja specifične površine sintetisanih polimera i određivanja teksturalnih karakteristika, izvedena je fizisorpcija azota na 77 K. Na **Slikama 42-44** prikazane su adsorpciono-desorpcione izoterme.



Slika 42. Adsorpciono-desorpcione izoterme za polimere NOP2/MOP2.



Slika 43. Adsorpciono-desorpcione izoterme za polimere NOP4/MOP4.



Slika 44. Adsorpciono-desorpcione izoterme za polimere NOP5/MOP5.

Na osnovu izgleda izotermi za MOP2/NOP2, može se zaključiti da se izoterme za oba polimera ne razlikuju značajno. Izoterme fizisorpcije azota za MOP4 i MOP5 razlikuju se od izotermi za neobeležene analoge NOP4 i NOP5. Ova razlika u izotermama MOP4 i MOP5 može biti posledica razlike u sastavu polimera, imajući u vidu da su korišćeni drugi umreživač i funkcionalni monomer pri sintezi polimera. Različit sastav polimera rezultovao je i različitom poroznošću dobijenih polimera, te su polimeri (na osnovu specifičnih površina) NOP2/MOP2 mezoporozni (specifične površine ispod $500 \text{ m}^2/\text{g}$), dok su polimeri NOP4, MOP4, NOP5 i MOP5 mikroporozni (specifične površine iznad $500 \text{ m}^2/\text{g}$). Razlika u izotermama za MOP4 i MOP5 u odnosu na neobeležene analoge NOP4 i MOP4 posledica je procesa obeležavanja. U **Tabeli 32** prikazane su BET površine za prikazane polimere i adsorpcioni kapaciteti za vezivanje templata, na osnovu adsorpcionih izotermi.

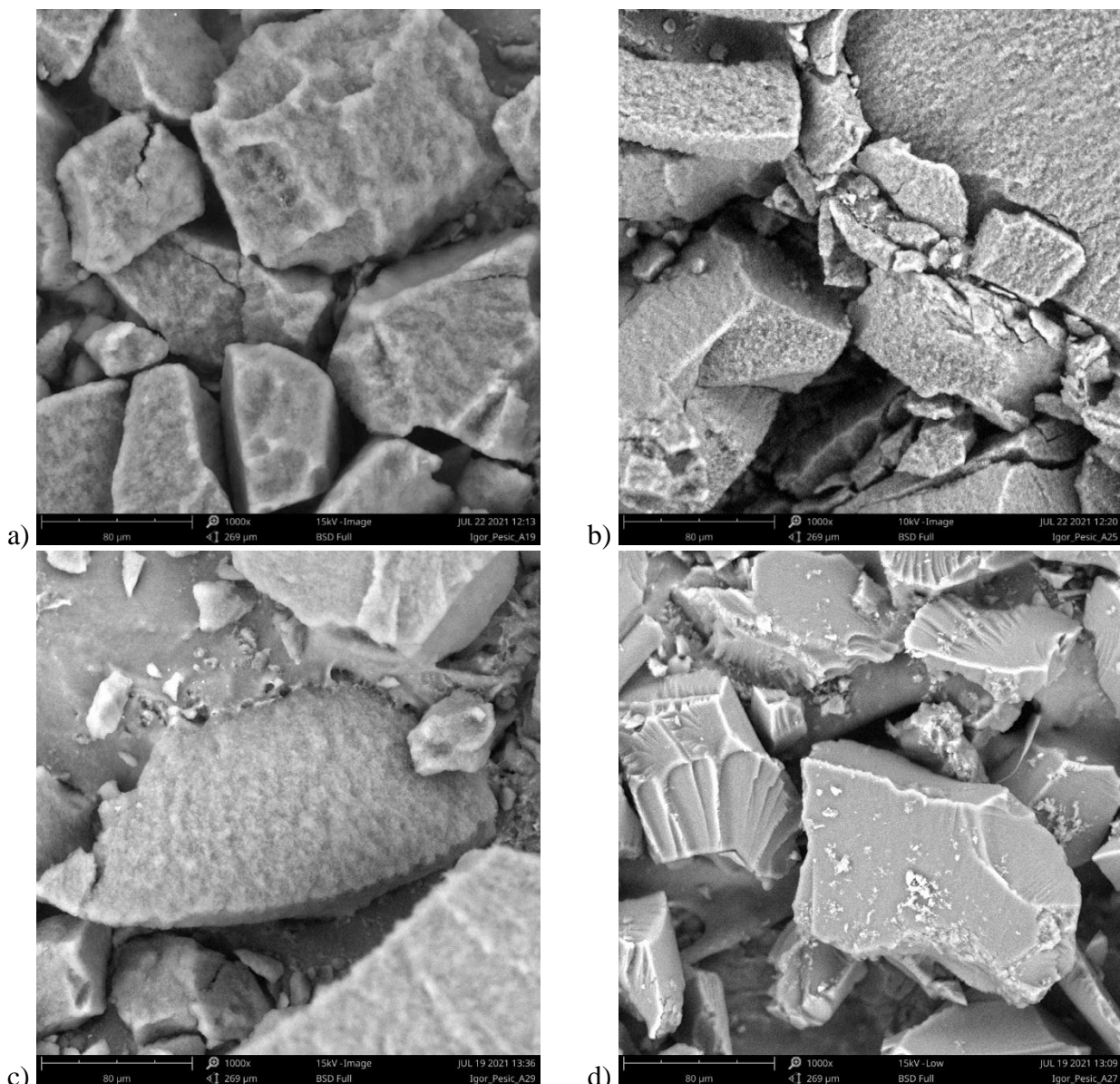
Tabela 32. Specifične (BET) površine i adsorpcioni kapaciteti polimera (Pešić et al, 2022).

Polimer	Specifična površina (BET) (m^2/g)	Adsorpcioni kapacitet (mmol/g)
NOP2	290	0,311
MOP2	339	0,639
NOP4	539	0,645
MOP4	663	1,108
NOP5	551	0,338
MOP5	634	0,591

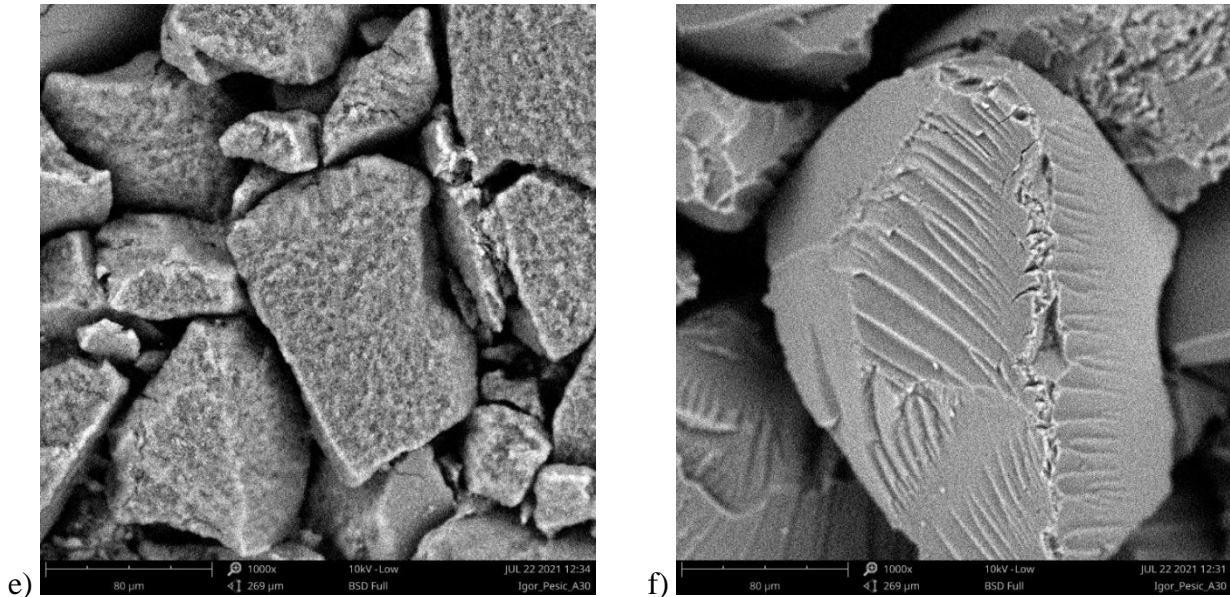
Može se uočiti da, iako se MOP4 i MOP5 značajno razlikuju po adsorpcionom kapacitetu, BET površine su slične. Takođe, NOP2/MOP2 imaju slične BET površine kao NOP5/MOP5, ali adsorpcioni kapaciteti se značajno razlikuju. Na kraju, iako svi NOPi imaju veće BET površine od odgovarajućih MOPa, ova razlika nije proporcionalna u poređenju sa adsorpcionim kapacitetima. Sve navedeno ukazuje da specifične površine određene fizisorpcijom azota nisu u direktnoj vezi sa adsorpcionim kapacitetima, te da postoji efekat obeležavanja kod svih obeleženih polimera koji se ne ogleda isključivo u većoj specifičnoj površini. U Prilogu (**Tabela P10**) su dati svi teksturalni parametri dobijeni fizisorpcijom azota na 77 K.

III.2.3.11 Skenirajuća elektronska mikroskopija

SEM analiza je urađena sa ciljem analize veličine polimernih čestica koje su korišćene u eksperimentima. Na **Slici 45** prikazane su SEM slike dobijenih polimera pri uvećanju 1000 puta. Može se uočiti da su čestice nepravilnog oblika, uglavnom veličine nekoliko desetina mikrometara. Pri datom uvećanju ne mogu se uočiti reljefne razlike između neobeleženih i obeleženih polimera.



Slika 45. SEM slike sintetisanih polimera pri uvećanju 1000 puta: a) NOP2, b) MOP2, c) NOP4, d) MOP4, e) NOP5, f) MOP5



Slika 45 (nastavak). SEM slike sintetisanih polimera pri uvećanju 1000 puta: a) NOP2, b) MOP2, c) NOP4, d) MOP4, e) NOP5, f) MOP5

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom poglavlju, zaključuje se da je uspešno izvedeno obeležavanje polimera holesterolom i benzofenonom-4. Sintetisani MOPi bolje vezuju templat od odgovarajućih NOPa, ali takođe i od drugih, sličnih molekula. Karakterizacija dobijenih polimera različitim metodama potvrđuje da je u oba slučaja došlo do obeležavanja polimera, te da različito vezivanje nije posledica samo drugih faktora, poput specifične površine polimera. MOPi pokazuju slične ili bolje karakteristike od literaturno opisanih polimera. Ostaju otvorene nove mogućnosti za buduće radove, poput razvoja MOPa samo sa umreživačem, bez funkcionalnog monomera, kako je to urađeno u ovoj disertaciji za holesterol kao templat. Takođe, treba pokušati sintezu polimera za druge UV filtere, uzimajući u obzir rezultate prikazane u ovoj disertaciji.

IV Eksperimentalni deo

IV.1 Reagensi

Sve korišćene hemikalije bile su p.a. kvaliteta i korišćene su bez prečišćavanja, sem ukoliko nije drugačije naglašeno. Holesterol, stigmasterol, estradiol, kortizol, metakrilna kiselina, 4-vinilpiridin, etilenglikol-dimetakrilat, 1,4-butandiol-dimetakrilat, 1,6-heksandiol-dimetakrilat, divinilbenzen, benzofenon-4, benzofenon-3, etilheksil-salicilat, etilheksil-*p*-dimetilaminobenzoat, dimetilaminoetil-metakrilat, azobisisobutironitril, heksametilen-diizocijanat, toluen-2,4-diizocijanat, dibutilkalaj-dilaurat kupljeni su od Sigma Aldrich. Benzofenon-8 kupljen je od Tokyo Chemical Industry. Metanol, acetonitril, 2-propanol za HPLC kupljeni su od Merck i Fisher Scientific. Avobenzon i homosalat kupljeni su od Merck. Hloroform je kupljen od Macron. β -ciklodekstrin je kupljen od Acros Organics. Za pripremu svih rastvora korišćeni su rastvarači HPLC čistoće.

Iz svih monomera i umreživača, pre korišćenja, uklonjeni su inhibitori polimerizacije, koristeći komercijalno sredstvo (smolu) za uklanjanje inhibitora (Sigma Aldrich) tako što je 5 mL monomera odnosno umreživača propušteno kroz 250 mg smole. Iz DVB su inhibitori uklonjeni korišćenjem aktiviranog aluminijum-oksida (250 mg na 5 mL). Benzofenon-4 i β -ciklodekstrin su sušeni pod vakuumom na 60°C do konstantne mase.

IV.2 Instrumenti

Korišćen je HPLC Agilent Technologies 1200 Infinity Series sa DAD detekcijom. Za mućkanje uzoraka korišćen je Multi Bio RS-24 rotator. Korišćena je Eppendorf Minispin centrifuga, kao i Biosan Microspin 12. Za ispitivanje rastvorljivosti holesterola korišćen je Biosan TS-100 Thermo Shaker. Za konduktometrijske titracije korišćen je konduktometar WTWCond330i sa konduktometrijskom ćelijom TetraCon325. Infracrveni spektri snimljeni su na instrumentu ATR-FTIR Nicolet 6700 (Thermo Scientific). Za ekstrakciju čvrstom fazom korišćen je Chromabond vacuum manifold (Macherey-Nagel). Elementalna analiza urađena je na instrumentu Vario EL III C, H, N, S/O elementalni analizator (Elementar Analysensysteme, GmbH, Hanau, Germany).

IV.3 Sinteza polimera za holesterol

Svi polimeri su sintetisani tehnikom polimerizacije u masi.

Opšta procedura sinteze NOPa: monomer/umreživač pomešan je u staklenoj bočici sa inicijatorom. Kroz prepolimerizacionu smešu je produvavan argon tokom 5 minuta, bočica je potom zatvorena i uronjena u vodeno kupatilo na 60°C tokom 24 sata. Nakon polimerizacije, bočica je slomljena, polimer usitnjen u avanu sa tučkom do veličine finog praha, ispran metanolom kako bi se uklonili tragovi neizreagovanih monomera i osušen do suva na 60°C.

Opšta procedura sinteze MOPa: MOPi su sintetisani slično kao NOPi, s tim što je nakon dodatka templata u smešu umreživača i porogena, prepolimerizaciona smeša zagrejana na 60°C kako bi se holesterol rastvorio, potom je produvan argon tokom 5 minuta, dodat inicijator, bočica je zatvorena i uronjena u vodeno kupatilo na 60°C tokom 24 sata. Nakon polimerizacije, bočica je slomljena, polimer usitnjen u avanu sa tučkom do veličine finog praha, ispiran koristeći Soksletovu aparaturu za kontinualnu ekstrakciju tokom nekoliko dana (obično 4-5 dana) sve dok je templat detektovan u ekstrakcionom delu aparature.

Polimeri u acetonitrilu su sintetisani na sobnoj temperaturi (25°C), koristeći UV inicijaciju ($\lambda=366$ nm) tokom 24 sata.

Detaljan sastav sintetisanih polimera prikazan je u **Tabeli 33**.

Tabela 33. Sastav sintetisanih polimera (svuda je korišćeno 50,0 mg AIBN kao inicijatora).

Polimer	Funkcionalni monomer	Umreživač	Templat	Porogen
P1	/	EDMA 2,000 mL	/	2-propanol 4,000 mL
P2	/	BDMA 2,000 mL	/	2-propanol 4,000 mL
P3	/	HDMA 2,000 mL	/	2-propanol 4,000 mL
P4	/	EDMA 2,000 mL	Holesterol 1,0000 g	2-propanol 4,000 mL
P5	/	BDMA 2,000 mL	Holesterol 1,0000 g	2-propanol 4,000 mL
P6	/	HDMA 2,000 mL	Holesterol 1,0000 g	2-propanol 4,000 mL
P7	/	EDMA 2,000 mL	/	Hloroform 4,000 mL
P8	/	BDMA 2,000 mL	/	Hloroform 4,000 mL
P9	/	HDMA 2,000 mL	/	Hloroform 4,000 mL
P10	/	EDMA 2,000 mL	Holesterol 1,0000 g	Hloroform 4,000 mL
P11	/	BDMA 2,000 mL	Holesterol 1,0000 g	Hloroform 4,000 mL
P12	/	HDMA 2,000 mL	Holesterol 1,0000 g	Hloroform 4,000 mL
P13	/	EDMA 2,000 mL	/	Acetonitril 2,000 mL
P14	/	BDMA 2,000 mL	/	Acetonitril 2,000 mL

Tabela 33 (nastavak). Sastav sintetisanih polimera (svuda je korišćeno 50,0 mg AIBN kao inicijatora).

Polimer	Funkcionalni monomer	Umreživač	Templat	Porogen
P15	/	HDMA 2,000 mL	/	Acetonitril 2,000 mL
P16	/	EDMA 2,000 mL	Holesterol (zasićen)	Acetonitril 2,000 mL
P17	/	BDMA 2,000 mL	Holesterol (zasićen)	Acetonitril 2,000 mL
P18	/	HDMA 2,000 mL	Holesterol (zasićen)	Acetonitril 2,000 mL
P19	MAA 168,8 μ L	EDMA 1,905 mL	/	Acetonitril 2,695 mL
P20	4VP 213 μ L	EDMA 1,905 mL	/	Acetonitril 2,755 mL

IV.3.1 Vezivanje templata i drugih steroida za sintetisane polimere

Svi eksperimenti vezivanja templata i drugih steroida za sintetisane polimere izvedeni su pri faznom odnosu polimer:rastvor 1:10, sem ukoliko nije drugačije naglašeno.

30,0 \pm 0,1 mg polimera odmereno je u mikrotubu od 1,5 mL i dodato je 300 μ L 0,1 mM rastvora steroida. Mikrotuba je mučkana na rotatoru 2 sata, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 13400 rpm (rpm = obrtaja u minuti). Supernatant je prebačen u mikrotubu zapremine 0,5 mL i ponovo centrifugiran pri istim uslovima. Koncentracija steroida u supernatantu je određena pomoću HPLC-DAD. Ukoliko je vezivanje izvođeno u n-heksanu, nakon prethodno opisane obrade uzorka, 100,0 μ L supernatanta je upareno do suva, rekonstituisano u 100,0 μ L metanola i koncentracija steroida određena pomoću HPLC-DAD.

IV.3.2 HPLC metode za steroide

Metoda za kolesterol i stigmasterol: kao mobilna faza je korišćena smeša metanola i 2-propanola 65/35 (V/V), protok je bio 0,6 mL/min. Temperatura kolone bila je 25°C, injekciona zapremina 10 μ L, talasna dužina detekcije $\lambda=205$ nm. Retenciono vreme za kolesterol bilo je $t_r=2,3$ min, a za stigmasterol $t_r=2,5$ min. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 \times 4,6 mm, sa česticama veličine 1,8 μ m (Agilent Technologies).

Metoda za određivanje estradiola: kao mobilna faza je korišćena smeša metanola i vode 50/50 (V/V), protok je bio 0,75 mL/min, dok je temperatura kolone bila 25°C. Injekciona zapremina bila je 10 μ L, talasna dužina detekcije $\lambda=280$ nm. Retenciono vreme iznosilo je $t_r=6,7$ min na koloni Hypersil GOLD, 50 \times 3 mm, 5 μ m (Thermo Scientific).

Metoda za određivanje kortizola: mobilna faza korišćena za određivanje kortizola bila je smeša metanola i vode 50/50 (V/V), protok je bio 0,5 mL/min, dok je temperatura kolone bila 25°C.

Injekciona zapremina bila je 10 μL , talasna dužina detekcije $\lambda=242$ nm. Retenciono vreme iznosilo je $t_r=2,9$ min na koloni Hypersil GOLD, 50 \times 3 mm, 5 μm (Thermo Scientific).

IV.3.3 Određivanje rastvorljivosti holesterola

Rastvorljivost holesterola određena je u različitim sistemima. Opšti postupak određivanja rastvorljivosti: u mikrotubu zapremine 2,0 mL odmeren je 1,000 mL odgovarajućeg rastvora ili rastvarača i dodato je 50,0 mg holesterola. Mikrotuba je mućkana na 25°C 2 sata. Potom je dodavano po 50,0 mg holesterola i nastavljeno mućkanje naredna 2 sata. Postupak je ponavljan sve dok nije dobijen zasićen rastvor. Nakon sedimentacije, supernatant je razblažen i metodom kalibracione prave određena je koncentracija tj. rastvorljivost holesterola koristeći HPLC-DAD.

IV.3.4 Fizisorpcija azota na 77 K

Adsorpcija/desorpcija azota na 77 K izvedena je korišćenjem Nova2000e (Quantachrome) instrumenta. Obrada podataka urađena je pomoću programa QuantachromeASi Qwin (verzija 3,0). Specifične površine izračunate su koristeći Brunauer–Emmett–Teller (BET) model. Zapremina mikropora (W_0) određena je pomoću Dubinin–Radushkevich modela.

IV.3.5 Skenirajuća elektronska mikroskopija

10 μL 1% (m/V) suspenzije polimera u metanolu nakapano je na zlatni čip prethodno očišćen etanolom. Nakon uparavanja metanola, čip je čuvan pod inertnom atmosferom do merenja. Korišćen je instrument Zeiss LEO 1540 XB Crossbeam Scanning Electron Microscope sa otvorom 20,00 μm . Electron high tension (EHT) iznosio je 1,5 kV, pri vakuumu komore od 7×10^{-7} mBar i vakuumu pištolja od $2,2\times 10^{-10}$ mBar.

IV.4 Sinteza polimera za UV filtere

IV.4.1 HPLC metode

Sve koncentracije pojedinanačnih UV filtera određene su pomoću HPLC-DAD.

BP4 je analiziran na Purospher Star RP18e 55-4 koloni, veličina čestica 3 μm , protok mobilne faze od 1 mL/min, rastvarač A (1 % AcOH u vodi), rastvarač B (ACN), u odnosu 80:20. Injekciona zapremina iznosila je 1,0 μL , temperatura kolone 25°C, talasna dužina detekcije $\lambda=286$ nm, retenciono vreme $t_r=3,3$ min. Ukupno vreme trajanja metode – 4 min.

BP3 i BP8 analizirani su korišćenjem Waters Symmetry C18 kolone, 3 \times 100 mm, veličina čestica 5 μm . Protok mobilne faze iznosio je 0,6 mL/min, rastvarač A (voda), rastvarač B (ACN), u odnosu 30:70. Injekciona zapremina iznosila je 1,0 μL , temperatura kolone 25°C, ukupno vreme trajanja metode – 4 min. Retenciono vreme za BP3 i BP8: $t_r=2,27$ i $t_r=1,46$ min, respektivno. Za druge UV filtere, talasne dužine detekcije bile su: $\lambda=310$ nm (OCT i PABA-O), $\lambda=360$ nm (AVB), $\lambda=238$ nm (OS i HMS). Retenciona vreme bila su OCT: $t_r=2,25$ min; AVB – $t_r=2,09$ min; OS: $t_r=2,64$ min, HMS: $t_r=2,85$ min i PABA-O: $t_r=2,32$ min.

IV.4.2 Molekulski obeleženi polimeri bez funkcionalnog monomera

Opšti postupak sinteze polimera: MOPi su sintetisani tako što je rastvoren templat u porogenu, dodat umreživač i inicijator, potom je produvan argon tokom 5 minuta, bočica je zatvorena i uronjena u uljano kupatilo na 60°C 24 sata. Nakon polimerizacije, bočica je slomljena, polimer usitnjen u avanu sa tučkom do veličine finog praha, ispiran metanolom, potom rastvorom 10%

sirćetne kiseline u metanolu sve dok je u supernatantu detektovan templat, zatim ponovo metanolom. Dobijeni polimeri su sušeni u sušnici na 60°C do konstantne mase. NOPi su sintetisani kao i MOPI samo bez prisustva templata. U **Tabeli 34** prikazane su komponente prepolimerizacione smeše za sintetisane polimere.

Tabela 34. Sastav sintetisanih polimera.

Oznaka polimera	Funkcionalni monomer	Umreživač	Templat	Inicijator	Porogen
A1	/	EDMA 1,250 mL	DHB 1,500 g	AIBN 25 mg	2PrOH 2,500 mL
A2	/	BDMA 1,250 mL	DHB 1,500 g	AIBN 25 mg	2PrOH 2,500 mL
A3	/	HDMA 1,250 mL	DHB 1,500 g	AIBN 25 mg	2PrOH 2,500 mL
A4	/	TEGDMA 1,250 mL	DHB 1,500 g	AIBN 25 mg	2PrOH 2,500 mL
A5	/	EDMA 1,000 mL	Oktisalat 1,500 mL	AIBN 25 mg	2PrOH 2,000 mL
A6	/	BDMA 1,000 mL	Oktisalat 1,500 mL	AIBN 25 mg	2PrOH 2,000 mL
A7	/	HDMA 1,000 mL	Oktisalat 1,500 mL	AIBN 25 mg	2PrOH 2,000 mL
A8	/	TEGDMA 1,000 mL	Oktisalat 1,500 mL	AIBN 25 mg	2PrOH 2,000 mL
A9	/	TEGDMA 4,000 mL	/	AIBN 100 mg	2PrOH 8,000 mL
A10	/	BDMA 4,000 mL	/	AIBN 100 mg	2PrOH 8,000 mL
A11	/	HDMA 4,000 mL	/	AIBN 100 mg	2PrOH 8,000 mL
A12	/	EDMA 2,000 mL	/	AIBN 50 mg	iPrOH 100 mL
A13	/	TRIM 1,000 mL	/	AIBN 25 mg	iPrOH 2,000 mL

IV.4.2.1 Vezivanje UV filtera za polimere

30,0±0,1 mg polimera odmereno je u mikrotubu od 1,5 mL i dodato je 300 µL 0,1 mM rastvora UV filtera. Mikrotuba je mućkana na rotatoru 2 sata, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 13400 rpm. Koncentracija UV filtera u supernatantu je određena pomoću HPLC-DAD.

IV.5 Molekulski obeleženi polimeri na bazi ciklodekstrina

IV.5.1 Sinteza polimera na bazi CD

Templat je odmeren u staklenu bočicu, dodat je suvi DMSO, pod vakuumom osušen β-ciklodekstrin i rastvoren uz mućkanje na ultrazvučnom kupatilu. Dodat je umreživač, katalizator, bočica je zatvorena i smeša zagrevana na uljanom kupatilu na 65-70°C 18 sati. Polimeri su isprani vrućim etanolom na sinterovanom levku, potom toplom vodom i acetonom. Obeleženi polimeri su dodatno ispirani toplim etanolom pa 2% sirćetnom kiselinom u metanolu, sve dok je u supernatantu detektovan templat. Nakon ispiranja, polimer je osušen do konstantne mase na 60°C i korišćen za eksperimente vezivanja.

Sastav sintetisanih polimera prikazan je u **Tabeli 35**. Vezivanje templata je izvedeno kao što je opisano u prethodnom odeljku.

Tabela 35. Sintetisani polimeri na bazi ciklodekstrina.

Oznaka polimera	Funkcionalni monomer	Umreživač	Templat	Katalizator	Porogen
NCD1	β -ciklodekstrin 2270 mg	HMDI 1,280 mL	/	/	DMSO 15 mL
MCD1	β -ciklodekstrin 2270 mg	HMDI 1,280 mL	AVB 310 mg	/	DMSO 15 mL
MCD2	β -ciklodekstrin 2270 mg	HMDI 1,280 mL	OCT 290 mg	/	DMSO 15 mL
MCD3	β -ciklodekstrin 2270 mg	HMDI 1,280 mL	PABA-O 277 mg	/	DMSO 15 mL
NCD2	β -ciklodekstrin 1135 mg	HMDI 0,640 mL	/	DBTDLA 20 μ L	DMSO 7,5 mL
MCD4	β -ciklodekstrin 1135 mg	HMDI 0,640 mL	AVB 155 mg	DBTDLA 20 μ L	DMSO 7,5 mL
MCD5	β -ciklodekstrin 1135 mg	HMDI 0,640 mL	OCT 145 mg	DBTDLA 20 μ L	DMSO 7,5 mL
MCD6	β -ciklodekstrin 1135 mg	HMDI 0,640 mL	PABA-O 139 mg	DBTDLA 20 μ L	DMSO 7,5 mL
NCD3	β -ciklodekstrin 1135 mg	TDI 0,576 mL	/	DBTDLA 20 μ L	DMSO 7,5 mL
MCD7	β -ciklodekstrin 1135 mg	TDI 0,576 mL	AVB 155 mg	DBTDLA 20 μ L	DMSO 7,5 mL
MCD8	β -ciklodekstrin 1135 mg	TDI 0,576 mL	OCT 145 mg	DBTDLA 20 μ L	DMSO 7,5 mL
MCD9	β -ciklodekstrin 1135 mg	TDI 0,576 mL	PABA-O 139 mg	DBTDLA 20 μ L	DMSO 7,5 mL

IV.6 Sinteza polimera za benzofenon-4

Obeleženi polimeri pripremljeni su korišćenjem polimerizacije u masi: templat, monomer, umreživač, porogen i inicijator polimerizacije stavljeni su u staklenu bočicu. Nakon rastvaranja, argon je prođivan kroz smešu pre polimerizacije 5 minuta. AIBN je korišćen kao inicijator (30 mg). Bočice su čvrsto zatvorene i ostavljene u uljanom kupatilu na 60°C 24 sata. Nakon završetka polimerizacije, staklene bočice su polomljene, a polimer je usitnjen u avanu sa tučkom. Neobeleženi polimeri su pripremljeni na isti način kao i obeleženi, izostavljajući templat. Sastav pripremljenih polimera prikazan je u **Tabeli 36**.

Templat je uklonjen iscrpnim ispiranjem 2% rastvorom amonijaka u smeši metanol/voda 1/1 (V/V) (ispiranje je praćeno HPLC analizom supernatanta). Polimeri su zatim isprani nekoliko puta metanolom i sušeni u sušnici na 60°C.

Tabela 36. Sastav sintetisanih polimera za BP4.

Polimer	Templat mg (mmol)	Monomer μL (mmol)	Umreživač mL	Porogen mL
NOP1	/	DMAEM 337 (2,0)	EDMA 1,888	ACN 2,730
MOP1	154,0 (0,5)	DMAEM 337 (2,0)	EDMA 1,888	ACN 2,730
NOP2	/	DMAEM 337 (2,0)	DVB 1,424	ACN 2,730
MOP2	154,0 (0,5)	DMAEM 337 (2,0)	DVB 1,424	ACN 2,730
NOP3	/	4VP 213 (2,0)	EDMA 1,888	DMSO 2,730
MOP3	154,0 (0,5)	4VP 213 (2,0)	EDMA 1,888	DMSO 2,730
NOP4	/	4VP 213 (2,0)	DVB 1,424	DMSO 2,130
MOP4	154,0 (0,5)	4VP 213 (2,0)	DVB 1,424	DMSO 2,130
NOP5	/	4VP 106,4 (1,0)	DVB 1,424	DMSO 2,000
MOP5	308,3 (1,0)	4VP 106,4 (1,0)	DVB 1,424	DMSO 2,000

IV.6.1 Ispitivanje vezivanja i adsorpcione izoterme

Eksperimenti vezivanja su izvedeni na sledeći način: polimer $10,0 \pm 0,2$ mg je izmeren u mikrotubi i dodato je 2,000 mL rastvora templata u acetonitrilu. Koncentracije rastvora templata iznosile su 0,1-10 mM (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 i 10,0). Mikrotube su mućkane na rotatoru 60 min, centrifugirane (10 min, 14 500 rpm) i koncentracija templata u supernatantu određena pomoću HPLC-DAD kako je prethodno opisano.

IV.6.2 Ispitivanje selektivnosti

$10,0 \pm 0,2$ mg obeleženog polimera je odmereno u mikrotubu i dodato je 2,000 mL 5,0 mM rastvora odgovarajućeg UV filtera. Nakon 1 sata mućkanja, polimer je ukonjen centrifugiranjem, i koncentracija UV filtera u supernatantu je određena HPLC analizom.

IV.6.3 Ekstrakcija čvrstom fazom

100,0 mg MIP4 je stavljeno u prazan kertridž za SPE sa fritom na dnu, dok je PTFE filter ($0,45 \mu\text{m}$) postavljen na vrh polimera. Sorbent je ispran sa 1,000 mL ACN, zatim 3 puta vodom za HPLC ($3 \times 0,500$ mL). 50,0 mL rastvora BP4 (5,00 mg/L) je propušteno kroz SPE kertridž, pri protoku ~ 1 mL/min. Sorpcija je ponovljena korišćenjem istog rastvora (koji je već propušten). Koncentracija BP4 je određena u filtratu HPLC analizom.

IV.6.4 Konduktometrijske titracije

30-50 mg polimera je stavljeno u titracionu ćeliju, dodato je 20,0 mL ACN, suspenzija je mešana na magnetnoj mešalici i titrovana 0,1024 M rastvorom HCl na temperaturi $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Sadržaj baznih monomera određen je na osnovu zapremine HCl utrošene do završne tačke titracije.

IV.6.5 Priprema uzoraka za FTIR i TGA

Uzorci polimera sa vezanim templatom dobijeni su tako što je 100,0 mg polimera mućkano na rotatoru sat vremena sa 5,00 mL rastvora BP4 koncentracije 10,0 mM u acetonitrilu. Nakon mućkanja, polimer je odvojen centrifugiranjem, ispran minimalnom zapreminom ACN i sušen na 60°C , pri atmosferskom pritisku tokom 24 sata.

IV.6.6 TGA analiza

Termogravimetrijska analiza izvedena je na instrumentu TGA Q50 thermogravimetric analyzer (TA instruments, DE, USA). Uzorci polimera bez i sa vezanim templatom zagrevani su u atmosferi azota brzinom zagrevanja $20^\circ\text{C}/\text{min}$ u opsegu $65 - 625^\circ\text{C}$.

IV.6.7 Fizisorpcija azota

Fizisorpcija azota na 77 K urađena je na instrumentu Sorptomatic 1990 Thermo Finnigan analyzer. Uzorci su pre fizisorpcije degazirani 1 sat na sobnoj temperaturi, potom 24 sata na 50°C pod vakuumom.

IV.6.8 SEM

SEM analiza urađena je na instrumentu SEM-EDX PhenomProX – Phenom World.

V Zaključak

U okviru ove doktorske disertacije, sintetisane su i okarakterisane 4 serije molekulski obeleženih polimera i njihovih neobeleženih analoga. Sintetisani su molekulski obeleženi polimeri za holesterol, kao i za nekoliko UV filtera.

Značaj opisane sinteze molekulski obeleženih polimera za holesterol ogleda se u jednostavnosti i predstavlja prvi primer obeleženih polimera za holesterol gde je korišćena samo jedna polimerizabilna komponenta – umreživač.

Ispitana je rastvorljivost holesterola u različitim sredinama sa ciljem odabira pogodnog rastvarača za polimerizaciju i ponovno vezivanje templata.

Molekulski obeleženi polimeri za holesterol sintetisani su bez funkcionalnog monomera, koristeći samo dimetakrilatni umreživač: etilenglikol-dimetakrilat, 1,4-butandiol-dimetakrilat i 1,6-heksandiol-dimetakrilat, u različitim porogenima: acetonitrilu, hloroformu i 2-propanolu. Ispitano je vezivanje holesterola, kao i drugih steroida za sintetisane polimere (stigmasterola, estradiola, kortizola). Rezultati ponovnog vezivanja steroida iz smeše metanol/voda 9/1 i 8/2 ukazuju da se ispitana jedinjenja vezuju za polimere hidrofobnim interakcijama. Faktor obeležavanja je najveći u slučaju polimera sa etilenglikol-dimetakrilatom u 2-propanolu kao porogenu i iznosi 3,4 pri faznom odnosu polimer:rastvor 1:10 ukoliko se vezivanje izvodi iz rastvora koncentracije 10^{-4} M u sistemu metanol/voda 8/2 (V/V). Vezivanje holesterola za sintetisane polimere, kako u slučaju neobeleženih, tako i u slučaju obeleženih polimera, raste kako raste molarna masa primenjenog umreživača.

Selektivnost holesterolom obeleženih polimera prema drugim steroidima iznosi 1,1 (stigmasterol), 6,5 (estradiol) i 10,6 (kortizol), pri faznom odnosu 1:10, kada se vezivanje izvodi iz sistema metanol/voda 9/1. Ukoliko se uporedi selektivnost obeleženih i neobeleženih polimera, zaključuje se da su obeleženi polimeri selektivniji od neobeleženih analoga u slučaju estradiola i kortizola.

Na osnovu adsorpcionih izoterma, može se zaključiti da neobeleženi i obeleženi polimeri gde je kao umreživač korišćen etilenglikol-dimetakrilat imaju homogena mesta za vezivanje holesterola. Ponavljanjem sinteze ovih polimera, na osnovu ispitivanja ponovnog vezivanja holesterola, zaključuje se da je sinteza polimera ponovljiva.

Vezivanje holesterola za obeležene polimere je zavisno od količine templata prisutnog tokom sinteze, što je veća količina templata prisutna tokom sinteze polimera, veće je ponovno vezivanje templata.

Specifične površine (BET) para obeleženog i neobeleženog polimera koji je pokazao najbolja svojstva ukazuju da razlika u vezivanju holesterola između neobeleženog i obeleženog polimera nije direktna posledica razlike u specifičnoj površini.

Na osnovu analize izvedene skenirajućom elektronskom mikroskopijom, uočeno je da se oblik, veličina i struktura pojedinačnih čestica razlikuju za obeleženi i neobeleženi polimer, što ukazuje na to da je prisustvo holesterola tokom sinteze polimera ostavilo posledice na strukturu polimera, tj. da je došlo do procesa obeležavanja. Molekulski obeleženi polimer ima slojevit strukturu, pa je moguće da se vezivanje holesterola dešava i između ovih slojeva, koji se ne uočavaju kod neobeleženog polimera.

U cilju dobijanja molekulski obeleženih polimera za UV filtere, sintetisane su 3 serije polimera: polimeri bez funkcionalnog monomera, polimeri zasnovani na ciklodekstrinima, kao i polimeri za specifičan UV filter – benzofenon-4.

Polimeri sintetisani bez funkcionalnog monomera, samo sa umreživačem, nisu uspešno obeleženi. Ovakav rezultat može se objasniti nepolarnošću korišćenih templata, te nemogućnošću da se uspostave dovoljno jake interakcije templata sa monomerom, što bi rezultovalo uspešnim obeležavanjem polimera. Takođe, sinteza molekulski obeleženih polimera zasnovanih na ciklodekstrinima za UV filtere nije bila uspešna. Ciklodekstrinski polimeri bi mogli biti dodatno

optimizovani variranjem udela katalizatora, porogena, kao i odnosom templata i ciklodekstrina u prepolymerizacionoj smeši.

Sintetisano je 5 parova polimera gde je kao templat korišćen benzofenon-4. Kao funkcionalni monomeri korišćeni su N,N-dimetilaminoetil-metakrilat i 4-vinilpiridin, dok su korišćeni umreživači divinilbenzen i etilenglikol-dimetakrilat. Porogeni rastvarači bili su dimetil-sulfoksid i acetonitril. Vezivanje templata za dobijene polimere ukazuje da je proces obeležavanja uspešno izveden. Faktori obeležavanja su u opsegu 1,05 do 2,60, kada se vezivanje izvodi iz 10,0 mM rastvora benzofenona-4 u acetonitrilu, pri faznom odnosu polimer:rastvor 1:200. Ukoliko se vezivanje izvodi iz rastvora benzofenona-4 iste koncentracije u 20% acetonitrila u vodi (V%), pri istom faznom odnosu, faktori obeležavanja rastu i iznose 1,14-3,43 na osnovu čega se zaključuje da se polimer može uspešno primeniti i u vodenoj sredini, što je od posebnog značaja za primenu u analizi realnih uzoraka. Polimeri gde je divinilbenzen korišćen kao umreživač pokazali su veće faktore obeležavanja.

Na osnovu adsorpcionih izoterma, zaključuje se da je kapacitet obleženih polimera za vezivanje templata veliki i iznosi 0,591-1,108 mmol/g.

Dobijeni polimeri za benzofenon-4 karakterisani su infracrvenom spektroskopijom, skenirajućom elektronskom mikroskopijom, elementalnom analizom, fizisorpcijom azota na 77 K i termogravimetrijskom analizom.

Skenirajuća elektronska mikroskopija pokazala je da su dobijene čestice veličine nekoliko desetina mikrometara, bez jasne razlike između neobeleženih i obeleženih polimera. Infracrvenom spektroskopijom pokazano je da su neobeleženi i obeleženi polimeri istog sastava, što ukazuje na jednaku inkorporaciju korišćenih monomera u polimer. Na osnovu specifičnih površina polimera dobijenih fizisorpcijom azota na 77 K zaključuje se da razlike u vezivanju između neobeleženih i obeleženih polimera nisu direktna posledica razlika u specifičnoj površini.

Na osnovu primene polimera obeleženog benzofenonom-4 za ekstrakciju čvrstom fazom, zaključeno je da je vezivanje templata za polimer pri ispitanim uslovima 98,5%, čime se zaključuje da se dobijeni polimer potencijalno može primeniti u analizi realnih uzoraka.

Na kraju, neophodno je istaći važnost dobijenih rezultata: MOPi za holesterol, sintetisani tokom izrade ove disertacije značajni su zbog toga što su homopolimeri dimetakrilata, te je njihova sinteza veoma jednostavna. MOPi za benzofenon-4 jedni su od prvih u literaturi opisanih MOPa za UV filtere, velike zagađivače životne sredine.

VI Reference

- Adeoye, O., & Cabral-Marques, H. (2017). Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery: A mini review. *International Journal of Pharmaceutics*, 531(2), 521–531.
- Aksić, N. (2018) Proučavanje vezivanja UV filtera za molekularno obeležene polimere. Završni rad. Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet.
- Ali, W.H., Derrien, D., Alix, F., Perollier, C., Lepine, O., Bayouduh, S., Chapuis-Hugon, F., Pichon, V. (2010) Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1217(43), 6668.
- Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. (2013). Handbook of Molecularly Imprinted Polymers. Smithers Rapra, Shawbury, United Kingdom. ISBN 978-1-84735-959-9.
- Anderson, L. I., O'Shannessy, D. J., & Mosbach, K. (1990). Molecular recognition in synthetic polymers: preparation of chiral stationary phases by molecular imprinting of amino acid amides. *Journal of Chromatography A*, 513, 167–179.
- Ansell, T.J., Kuah, K.L. (2005) Imprinted polymers for chiral resolution of (+/-)-ephedrine: Understanding the pre-polymerization equilibrium and the action of different mobile modifiers. *Analyst*, 130, 179.
- Apel, C., Tang, J., & Ebinghaus, R. (2018). Environmental occurrence and distribution of organic UV stabilizers and UV filters in the sediment of Chinese Bohai and Yellow Seas. *Environmental Pollution*, 235, 85–94.
- Asanuma, H., Hishiya, T., & Komiyama, M. (2004). Efficient Separation of Hydrophobic Molecules by Molecularly Imprinted Cyclodextrin Polymers. *Journal Of Inclusion Phenomena*, 50(1–2), 51–55.
- Ayadi, C., Anene, A., Kalfat, R., Chevalier, Y., Hbaieb, S. (2019) Molecularly imprinted polyaniline on silica support for the selective adsorption of benzophenone-4 from aqueous media. *Colloids and Surfaces A*, 567, 32.
- Beckereki, G., Horvai, G., Toth, B. (2021) The Selectivity of Molecularly Imprinted Polymers. *Polymers*, 13(11), 1781.
- Caro, E., Marce, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C. (2006) Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(2), 143.
- Caro, E., Marce, R.M., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., Borrull, F. (2005) Selective enrichment of anti-inflammatory drugs from river water samples by solid-phase extraction with a molecularly imprinted polymer. *Journal of Separation Science*, 28(16), 2080.
- Cheong, S.H., McNiven, S., Rachkov, A., Levi, R., Yano, K., Karube, I. (1997) Testosterone Receptor Binding Mimic Constructed Using Molecular Imprinting. *Macromolecules*, 30, 1317.
- Cowie, J.M.G., Arrighi, V. (2007) *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials*. Taylor&Francis Group, Boca Raton. ISBN 9780849398131.
- Dahabra, L., Broadberry, G., Le Gresley, A., Najlah, M., Khoder, M. (2021) Sunscreens Containing Cyclodextrin Inclusion Complexes for Enhanced Efficiency: A Strategy for Skin Cancer Prevention. *Molecules*, 26(6), 1698.
- Del Sole, R., Lazzoi, M.R., Arnone, M., Della Sala, F., Cannoletta, D., Vasapolio, G. (2009) Experimental and Computational Studies on Non-Covalent Imprinted Microspheres as Recognition System for Nicotinamide Molecules. *Molecules*, 14(7), 2632.
- Djozan, D., Farajzadeh, M.A., Sorouraddin, S.M., Baheri, T. (2012) Molecularly imprinted-solid phase extraction combined with simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction for selective extraction and preconcentration of methamphetamine and ecstasy from urine followed by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1248, 24.
- Dorko, Z., Szakolczai, A., Verbić, T., Horvai, G. (2015) Binding capacity of molecularly imprinted polymers and their nonimprinted analogs. *Journal of Separation Science*, 38, 4240.

- Dorko, Z., Tamas, B., Horvai, G. (2017). Isotherm charts for material selection and method development with molecularly imprinted polymers and other sorbents. *Talanta*, 162, 167.
- Dorko, Z., Tamas, B., Horvai, G. (2017). Relationship between Individual and Competitive Adsorption Isotherms on Molecularly Imprinted Polymers. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 61, 33.
- Fenyvesi, E., Otta, K., Kolbe, I., Novak, Cs., Szejtli, J. (2004) Cyclodextrin Complexes of UV filters. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 48, 117.
- Fischer, L., Mueller, R., Ekberg, B., & Mosbach, K. (1991). Direct enantioseparation of .beta.-adrenergic blockers using a chiral stationary phase prepared by molecular imprinting. *Journal of the American Chemical Society*, 113(24), 9358–9360.
- Fourmentin, S., Crini, G., Lichtfouse, E. (2018) Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis. Springer International Publishing AG part of Springer Nature, Cham, Switzerland. ISBN 978-3-319-76158-9.
- Fu, X., Yang, Q., Zhou, Q., Lin, Q., Wang, C. (2015) Template-Monomer Interaction in Molecular Imprinting: Is the Strongest the Best? *Open Journal of Organic Polymer Materials*, 5, 58.
- Hasanah, A.N., Safitri, N., Zulfa, A., Neli, N., Rahayu, D. (2021). Factors Affecting Preparation of Molecularly Imprinted Polymer and Methods on Finding Template-Monomer Interaction as the Key of Selective Properties of the Materials. *Molecules*, 26, 5612.
- Hasanah, A.N., Yulianti, A.B., Rahayu, D. (2019) Selective atenolol determination in blood using molecular imprinted polymer with itaconic acid as functional monomer. *International Journal Molecular Sciences*, 11, 136.
- Hashim, S.N.N.S., Boysen, R.I., Schwarz, L.J., Danylec, B., Hearn, M.T.W. (2014) A comparison of covalent and non-covalent imprinting strategies for the synthesis of stigmasterol imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1359, 35.

- Hashim, S.N.N.S., Schwarz, L.J., Danylec, B., Mitri, K., Yang, Y., Boysen, R.I., Hearn, M.T.W. (2016) Recovery of ergosterol from the medicinal mushroom, *Ganoderma tsugae* var. *Janniae*, with a molecularly imprinted polymer derived from a cleavable monomer-template composite. *Journal of Chromatography A*, 1468, 1.
- Haupt, K. (2012). *Molecular Imprinting*. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. ISBN 978-3-642-28420-5.
- He, C., Long, Y., Pan, J., Kean, L., Feng, L. (2007). Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 133.
- He, J., Zhu, Q., & Deng, Q. (2007). Investigation of imprinting parameters and their recognition nature for quinine-molecularly imprinted polymers. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(5), 1297–1305.
- He, J.-X., Pan, H.-Y., Xu, L., Tang, R.-Y. (2021) Application of molecularly imprinted polymers for the separation and detection of aflatoxin. *Journal of Chemical Research*, 400.
- Hebert, B., Meador, D. S., & Spivak, D. A. (2015). Scalemic and racemic imprinting with a chiral crosslinker. *Analytica Chimica Acta*, 890, 157–164.
- Horricks, R. A., Tabin, S. K., Edwards, J. J., Lumsden, J. S., & Marancik, D. P. (2019). Organic ultraviolet filters in nearshore waters and in the invasive lionfish (*Pterois volitans*) in Grenada, West Indies. *PLOS ONE*, 14(7), e0220280.
- <http://mipdatabase.com>, pristupljeno 15.3.2022.
- <http://www.sigmaaldrich.com> pristupljeno 11.2.2022.
- Hwang, C.-C., Lee, W.-C. (2002) Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods. *Journal of Chromatography A*, 962, 69.
- Iturralde, I., Paulis, M., & Leiza, J. R. (2014). The effect of the crosslinking agent on the performance of propranolol imprinted polymers. *European Polymer Journal*, 53, 282–291.
- Jiang, H., Zhang, S., Shi, Q. (2011). Removal of Cholesterol by beta-Cyclodextrin. *Asian Journal of Chemistry*. 23(9), 3783.
- Jin, Z.-Y. (2013) *Cyclodextrin chemistry. Preparation and Application*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore. ISBN 978-981-4436-79-3.
- Karim, K., Breton, F., Rouillon, R., Piletska, E., Guerreiro, A., Chianella, I., & Piletsky, S. (2005). How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(12), 1795–1808.
- Khorrami, A.R., Rashidpur, A. (2009) Design of a new cartridge for selective solid phase extraction using molecularly imprinted polymers: Selective extraction of theophylline from human serum samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(3), 647.
- Kundu, M., Rahaman, H., Nath Roy, M. (2019). Physicochemical investigations on non-covalent interactions between Padimate O and cyclodextrin receptors in both solution and solid states. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 218, 9.
- Kutner, W., Sharma, P.S. (2018) *Molecularly Imprinted Polymers for Analytical Chemistry Applications*. Royal Society of Chemistry, Croydon, United Kingdom. ISBN 978-1-78262-647-3.
- Langford, K. H., Reid, M. J., Fjeld, E., Øxnevad, S., & Thomas, K. v. (2015). Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environment International*, 80, 1–7.
- Lay, S., Ni, X., Yu, H., Shen, S. (2016) State-of-the-art applications of cyclodextrins as functional monomers in molecular imprinting techniques: a review. *Journal of Separation Science*, 29, 2321.
- Li, L., Lin, Z., Chen, X., Zhang, H., Lin, Y., Lai, Z., & Huang, Z. (2015). Molecularly imprinted polymers for extraction of malachite green from fish samples prior to its determination by HPLC. *Microchimica Acta*, 182(9–10), 1791–1796.

- Li, S., Cao, S., Piletsky, S., Turner, A.P.F. (2016) *Molecularly Imprinted Catalysts. Principles, Synthesis, and Applications*. Elsevier Inc. ISBN 978-0-12-801301-4.
- Liu, W., Holdsworth, C., Ye, L. (2020) Synthesis of molecularly imprinted polymers using a functionalized initiator for chiral-selective recognition of propranolol. *Chirality*, 32, 370.
- Liu, Y., Liu, Y., Liu, Z., Hu, X., & Xu, Z. (2018). β -Cyclodextrin molecularly imprinted solid-phase microextraction coatings for selective recognition of polychlorophenols in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(2), 509–519.
- Liu, Z., Huang, Y., Yang, Y. (2021) *Molecularly Imprinted Polymers as Advanced Drug Delivery Systems*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. ISBN 978-981-16-0226-9.
- Lorenzo, R.A., Carro, A.M., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. (2011) To Remove or Not to Remove? The Challenge of Extracting the Template to Make the Cavities Available in Molecularly Imprinted Polymers (MIPs). *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 4327.
- Lowell, S., Shields, J.E., Thomas, M.A. (2004) *Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density*. Springer Dordrecht, ISBN 978-1-4020-2302-6.
- Lucci, P., Nunez, O., Galceran, M.T. (2012) Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for selective extraction of natural and synthetic estrogens from aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 30, 4828.
- Martinez Saavedra, L.N., Goncalves Penido, R., de Azevedo Santos, L., Ramalho, T.C., Lobo Baeta, B.E., Pereira, M.C., da Silva, A.C. (2018) Molecularly imprinted polymers for selective adsorption of quinoline: theoretical and experimental studies. *RSC Advances*, 8, 28775.
- Marušić, U. (2021) Molekulski obeleženi polimeri za teofilin i donepezil. Završni rad. Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet.
- Mattiasson, B., Ye, L. (2015) *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology*. Springer Int. Publishing Switzerland, ISBN 978-3-319-20729-5.
- Meador, D. S., & Spivak, D. A. (2014). Absolute Configuration Determination Using Enantiomeric Pairs of Molecularly Imprinted Polymers. *Organic Letters*, 16(5), 1402–1405.
- Meng, Z., Zhou, L., Wang, J., Wang, Q., Zhu, D. (1999) Molecule imprinting chiral stationary phase. *Biomedical Chromatography*, 3, 389.
- Mhaka, B., Cukrowska, E., Bui, B.T.S., Ramstrom, O., Haupt, K., Tutu, H., Chimuka, L. (2009) Selective extraction of triazine herbicides from food samples based on a combination of a liquid membrane and molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1216(40), 6796.
- Nagy-Szakolczai, A., Dorko, Z., Toth, B., Horvai, G. (2018) New Methods to Study the Behavior of Molecularly Imprinted Polymers in Aprotic Solvents. *Polymers*, 10, 1015.
- Nunez, L., Turriel, E., Martin-Esteban, A., Tadeo, J.L. (2010) Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Talanta*, 80(5), 1782.
- Ocaña-Rios, I., Peña-Alvarez, A., Zuñiga-Perez, I., & Loeza-Fuentes, E. (2019). Trace analysis of UV filters and musks in living fish by in vivo SPME-GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(14), 3209–3218.
- O'Mahony, J., Molinelli, A., Nolan, K., Smyth, M.R., Mizaikoff, B. (2015) Towards the rational development of molecularly imprinted polymers: ¹H NMR studies on hydrophobicity and ion-pair interactions as driving forces for selectivity. *Biosensors & Bioelectronics*, 20(9), 1884.
- Panahi, R., Vasheghani-Farahani, E., Shojasadati, S.A. (2008) Determination of Adsorption Isotherm for L-Lysine Imprinted Polymer. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 5(4), 49.
- Pešić, M. P., Todorov, M. D., Becskereki, G., Horvai, G., Verbić, T. Ž., & Tóth, B. (2020). A novel method of molecular imprinting applied to the template cholesterol. *Talanta*, 217, 121075.

- Pešić, M.P., Krstić, J.B., Verbić, T.Ž. (2022) Highly selective water-compatible molecularly imprinted polymers for benzophenone-4. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 87(0), 1.
- Piletsky, S., Turner, A. (2006) *Molecular Imprinting of Polymers*. Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA. ISBN 1-58706-219-4.
- Pratiwi, R., Megantara, S., Rahayu, D., Pitaloka, I., Hasanah, A.N. (2019) Comparison of Bulk and Precipitation Polymerization Method of Synthesis Molecularly Imprinted solid Phase Extraction for Atenolol using Methacrylic Acid. *Journal of Young Pharmacists*, 11(1), 12.
- Pravilnik o kozmetičkim preparatima (Službeni glasnik Republike Srbije 60/2019-4 i 47/2022-3)
- Radojičić, Đ. (2020) Dobijanje molekularno obeleženih polimera za odabrane UV filtere. Završni rad. Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet.
- Ramos, S., Homem, V., & Santos, L. (2019). Simultaneous determination of synthetic musks and UV-filters in water matrices by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography tandem mass-spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1590, 47–57.
- Sajini, T., Mathew, B. (2021) A brief overview of molecularly imprinted polymers: Highlighting computational design nano and photo-responsive imprinting. *Talanta Open*, 4, 100072.
- Salvador, A., Chisvert, A. (2005) A critical survey on UV filters determination. *Analytica Chimica Acta*, 537, 1.
- Salvidar Guerra, E., Vivaldo Lima, E. (2013) *Handbook of Polymer Synthesis, Characterization and Processing*. John Wiley&Sons, New Jersey, USA. ISBN 978-0-470-63032-7.
- Sanchez-Gonzalez, J., Pena-Gallego, A., Sanmartin, J., Bermejo, A.M., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Pineiro, A. (2019) NMR spectroscopy for assessing cocaine-functional monomer interactions preparing molecularly imprinted polymers. *Microchemical Journal*, 147, 813.
- Sarhan, A., Ali, M.M., Abdelaal, M.Y. (1989) Racemic resolution of mandelic acid on polymers with chiral cavities. 3. Co-operative binding over phenylboronic acid groups and N-bases. *Reactive Polymers*, 11, 57.
- Sellergren, B. (1989). Molecular imprinting by noncovalent interactions: Tailor-made chiral stationary phases of high selectivity and sample load capacity. *Chirality*, 1(1), 63–68.
- Sellergren, B. (2001). *Molecularly Imprinted Polymers - Man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry*. Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands, ISBN 0-444-82837-0.
- Sellergren, B., & Shea, K. J. (1993). Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers. *Journal of Chromatography A*, 635(1), 31–49.
- Serrano, M., Bartolomé, M., Gallego-Picó, A., Garcinuño, R. M., Bravo, J. C., & Fernández, P. (2015). Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the isolation of 1-hydroxypyrene in human urine. *Talanta*, 143, 71–76.
- Shi, Y., Zhang, J-H., Shi, D., Jiang, M., Zhu, Y-X., Mei, S-R., Zhou, Y-K., Dai, K., Lu, B. (2006) Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 549.
- Shoravi, S., Olsson, G.D., Karlsson, B.C.G., Nicholls, I.A. (2014) On the Influence of Crosslinker on Template Complexation in Molecularly Imprinted Polymers: A Computational Study of Prepolymerization Mixture Events with Correlations to Template-Polymer Recognition Behaviour and NMR spectroscopic Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 10622.

- Sibrian-Vazquez, M., & Spivak, D. A. (2004). Molecular Imprinting Made Easy. *Journal of the American Chemical Society*, 126(25), 7827–7833.
- Sibrian-Vazquez, M., Spivak, D.A. (2003) Enhanced Enantioselectivity of Molecularly Imprinted Polymers Formulated with Novel Cross-Linking Monomers. *Macromolecules*, 36, 14, 5105.
- Sing, K.S.W., Everett, D.H., Haul, R.A.W., Moscou, L., Pierotti, R.A., Rouquerol, J., Siemieniewska, T. (1985) Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure & Applied Chemistry*, 57(4), 603.
- Sun, H., Li, Y., Huang, C., Peng, J., Yang, J., Sun, X., Zang, S., Chen, S., Yhang, X. (2015) Solid-phase extraction based on a molecularly imprinted polymer for the selective determination of four benzophenones in tap and river water. *Journal of Separation Science*, 38, 3412.
- Surikumaran, H., Mohamad, S., & Sarih, N. (2014). Molecular Imprinted Polymer of Methacrylic Acid Functionalised β -Cyclodextrin for Selective Removal of 2,4-Dichlorophenol. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 6111–6136.
- Todorov, M. (2016). Molekulski obeleženi polimeri za holesterol. Završni rad. Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet.
- Torres, J. J., Gsponer, N., Ramírez, C. L., Vera, D. M. A., Montejano, H. A., & Chesta, C. A. (2012). Experimental and theoretical studies on the enantioselectivity of molecularly imprinted polymers prepared with a chiral functional monomer. *Journal of Chromatography A*, 1266, 24–33.
- Trotta, F., Caldera, F., Cavalli, R., Soster, M., Riedo, C., Biasizzo, M., Balzano, F., Brunella, V. (2016) Molecularly imprinted cyclodextrin nanosponges for the controlled delivery of L-DOPA: perspectives for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(12), 1671.
- Villar, P., Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N. (2007). Matrix effect on the selectivity of a cholesterol-imprinted polymer. *Polymer*, 48, 1483.
- Wang, S., Xu, J., Tong, Y., Wang, L., He, C. (2005). Cholesterol-imprinted polymer receptor prepared by a hybrid imprinting method. *Polymers International*, 54, 1268.
- Wei, S., Jakusch, M., Mizaikoff, B. (2007). Investigating the mechanisms of 17 β -estradiol imprinting by computational prediction and spectroscopic analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 423.
- Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E., Villar, P., Vulfson, E. (1995). A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptor for Cholesterol. *Journal of American Chemical Society*, 117, 7105.
- Yan, M., Ramstrom, O. (2005) Molecularly Imprinted Materials. Science and Technology. Marcel Dekker, New York, USA. ISBN 0-8247-5353-4.
- Yang, J., Li, Y., Wang, J., Sun, X., Cao, R., Sun, H., Huang, C., Chen, J. (2015) Molecularly imprinted polymer microspheres prepared by Pickering emulsion polymerization for selective solid-phase extraction of eight bisphenols from human urine samples. *Analytica Chimica Acta*, 872, 35.
- Yongfeng, K., Wuping, D., Yan, L., Junxia, K., & Jing, X. (2012). Molecularly imprinted polymers of allyl- β -cyclodextrin and methacrylic acid for the solid-phase extraction of phthalate. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 459–464.
- Yoshimatsu, K., Yamazaki, T., Chronakis, I. S., & Ye, L. (2012). Influence of template/functional monomer/cross-linking monomer ratio on particle size and binding properties of molecularly imprinted nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 124(2), 1249–1255.

Yu, H., Di, S., Su, X., Wang, J., Ning, T., Yang, H., Zhu, S. (2022) Preparation of beta-cyclodextrin based nanocomposite for magnetic solid-phase extraction of organic ultraviolet filters. *Journal of Chromatography A*, 1663, 462765.

VII Prilog

Podaci za konstruisanje adsorpcionih izoterma.

Tabela P1. Podaci za konstruisanje adsorpcione izoterme za NOP2.

C_0 (mM)	0,10	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00
F (mM)	0,03	0,02	0,02	0,03	0,63	2,41	4,41	5,43	6,51	7,39	8,44
B ($\mu\text{mol/g}$)	13,93	45,58	96,12	193,29	274,39	318,78	318,60	314,03	297,59	321,21	311,38

Tabela P2. Podaci za konstruisanje adsorpcione izoterme za MOP2.

C_0 (mM)	0,10	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00
F (mM)	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	0,98	2,82	3,68	4,85	5,65	6,81
B ($\mu\text{mol/g}$)	14,86	45,73	96,51	192,98	393,87	604,90	635,30	664,65	629,83	669,76	638,89

Tabela P3. Podaci za konstruisanje adsorpcione izoterme za NOP4.

C_0 (mM)	0,10	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00
F (mM)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	1,23	2,94	3,94	4,83	5,77	6,77
B ($\mu\text{mol/g}$)	17,09	45,55	94,65	191,36	387,67	554,28	612,31	611,27	633,01	646,06	645,06

Tabela P4. Podaci za konstruisanje adsorpcione izoterme za MOP4.

C_0 (mM)	0,10	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00
F (mM)	0,02	0,03	0,03	0,04	0,03	0,09	1,06	1,80	2,85	3,65	4,46
B ($\mu\text{mol/g}$)	15,11	44,66	94,65	192,72	394,69	781,84	987,70	1039,79	1029,14	1069,46	1108,14

Tabela P5. Podaci za konstruisanje adsorpcione izoterme za NOP5.

C_0 (mM)	0,10	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00
F (mM)	0,02	0,02	0,02	0,05	0,41	2,19	4,16	5,14	6,26	7,14	8,31
B ($\mu\text{mol/g}$)	15,55	46,42	96,29	190,11	317,22	361,49	367,37	372,58	347,90	371,22	337,98

Tabela P6. Podaci za konstruisanje adsorpcione izoterme za MOP5.

C_0 (mM)	0,10	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00
F (mM)	0,02	0,02	0,01	0,03	0,02	1,04	2,80	3,83	4,79	5,67	7,05
B ($\mu\text{mol/g}$)	15,88	46,85	97,16	194,67	395,85	591,76	639,79	634,64	641,82	666,08	590,73

C_0 – početna koncentracija BP4, F – koncentracija slobodnog BP4 u supernatantu nakon vezivanja, B – vezana količina BP4 po masi polimera (adsorpcioni kapacitet)

Tabela P7. Selektivnost MOP2 prema vezivanju drugih UV filtera.

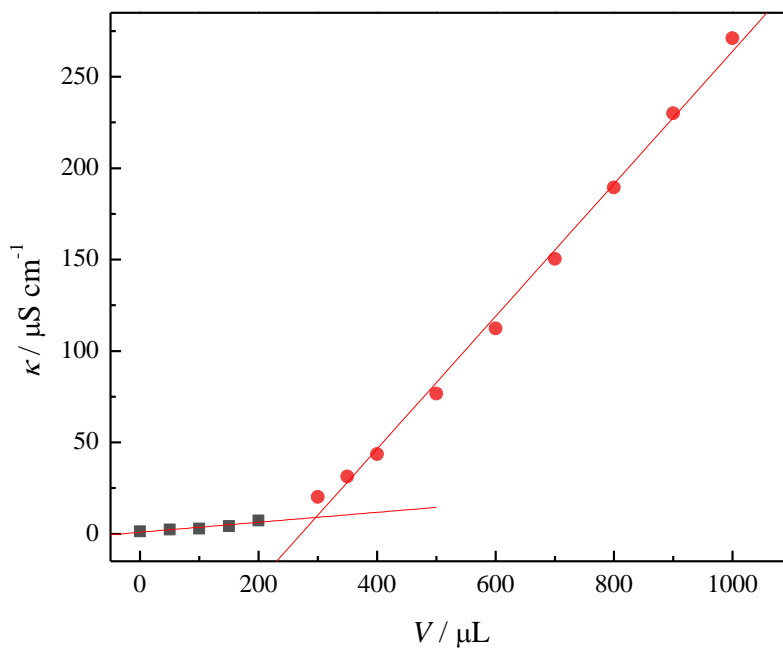
Compound	BP3	OCT	AVB	OS	HMS	PABA-O	BP8	BP4
C_0 (mM)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
F (mM)	4,92	4,86	4,80	4,96	0,00	4,88	4,91	1,80
B ($\mu\text{mol/g}$)	15,90	27,51	40,14	8,40	0,00	23,80	18,19	639,80

Tabela P8. Selektivnost MOP4 prema vezivanju drugih UV filtera.

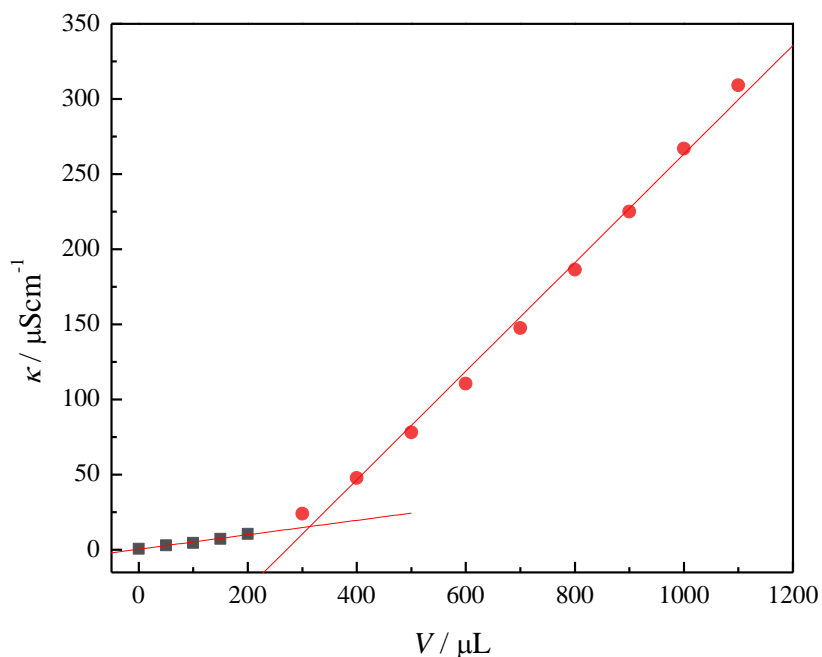
Compound	BP3	OCT	AVB	OS	HMS	PABA-O	BP8	BP4
C_0 (mM)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
F (mM)	4,88	4,82	4,76	4,91	4,94	4,89	4,81	0,51
B ($\mu\text{mol/g}$)	24,41	35,31	47,82	18,04	11,82	22,64	38,86	897,53

Tabela P9. Selektivnost MOP5 prema vezivanju drugih UV filtera.

Compound	BP3	OCT	AVB	OS	HMS	PABA-O	BP8	BP4
C_0 (mM)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
F (mM)	4,91	4,79	4,73	4,95	4,89	4,89	4,87	1,88
B ($\mu\text{mol/g}$)	17,60	41,72	54,54	9,22	21,84	21,24	26,35	624,16



Slika P1. Primer titracione krive konduktometrijske titracije uzorka MOP5 sa HCl. Uzorak polimera mase 52,6 mg stavljen je u konduktometrijsku ćeliju, dodato je 20,0 mL ACN, i uz mešanje na magnetnoj mešalici titrovan sa HCl (0,1024 M) na $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.



Slika P2. Primer titracione krive konduktometrijske titracije uzorka NOP5 sa HCl. Uzorak polimera mase 50,2 mg stavljen je u konduktometrijsku ćeliju, dodato je 20,0 mL ACN, i uz mešanje na magnetnoj mešalici titrovan sa HCl (0,1024 M) na $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Tabela P10. Teksturalni parametri uzoraka polimera NOP2, MOP2, NOP4, MOP4, NOP5 i MOP5 određenih metodom fizisorpcije N₂ na 77 K.

Mereni veličina		Oznaka uzorka					
		NOP2	MOP2	MOP4	NOP4	MOP5	NOP5
Zapremina pora (Gurvich) na p/p ₀ , cm ³ /g	0,95	0,392	0,335	0,471	0,611	0,446	0,551
	0,98	0,524	0,433	0,472	0,835	0,447	0,659
	0,998	0,743	0,609	0,493	1,171	0,479	0,732
Specifična površina (BET)	C	103	113	79.9	105	74.6	112
	S, m ² /g	290	339	663	539	634	551
Mezopore (B.J.H.)	Dmedian, nm	18,3	14,2	3,5	32,9	3,5	15,9
	Dmax, nm	2,3	2,1	3,5	2,1	3,6	2,0
	Zbirna zapremina pora, cm ³ /g	0,463	0,284	0,341 ^{26,8 nm}	0,858	0,341 ^{32,2 nm}	0,484
	Korigovana vrednost	200	153,6	418	333	390	303
Mikropore (Dubinin and Raduskevich)	Zapremina mikropora, cm ³ /g	0,094	0,118	0,256	0,227	0,198	0,190
Kaganer	Specifična površina, m ² /g	263	332	721	639	558	536
t-Plot sa standardnom izotermom	Ukupna spec. površina, m ² /g	261	329	557	529	543	527
	Zapremina mikropora, cm ³ /g	0,147	0,169	0,458	0,275	0,434	0,322
	Površina mezopora, m ² /g	124	83.8	5.3	168	5.2	115
αS-Plot (Sing) sa standardnom izotermom	Ukupna spec. površina, m ² g ⁻¹	287	360	628	551	596	581
	Zapremina mikropora, cm ³ /g	0,152	0,171	0,454	0,281	0,434	0,330
	Površina mezopora, m ² /g	133	90,6	9,9	182	5,7	123

*A.Lecloux, J.P.Pirard, J. Colloid Interface Sci. 70,(2) 197

Biografija

Miloš P. Pešić rođen 7.2.1988. u Pančevu, SFR Jugoslavija. Osnovnu školu „Goce Delčev” završio je u Jabuci, kao nosilac Vukove diplome i učenik generacije. Tehničku školu „23.maj” u Pančevu, smer hemijski laborant završio je 2007. godine kao nosilac Vukove diplome i učenik generacije. Osnovne akademske studije na studijskom programu „Hemija” završio je 2012. godine na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu sa prosekom 9,29 pri Katedri za organsku hemiju (mentor diplomskog rada akademik Bogdan Šolaja). Na istom fakultetu, 2013. godine završio je master akademske studije sa prosekom 9,25, pri Katedri za organsku hemiju (mentor akademik Radomir Saičić). Doktorske studije upisao je 2013. godine pri Katedri za analitičku hemiju (mentor van.prof. Tatjana Verbić). Bio je zaposlen u Istraživačkoj stanici Petnica kao koordinator hemijske laboratorije i asistent rukovodioca programa hemije u periodu 2015-2020. Od septembra 2020. godine zaposlen je na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu u zvanju asistenta pri Katedri za analitičku hemiju. Član je Srpskog hemijskog društva i Međunarodne asocijacije fizikohemičara. Govori srpski i engleski jezik. Deo istraživanja, obuhvaćenih ovom disertacijom, objavljen je u 2 rada u međunarodnim časopisima (M21 i M23), u okviru jednog saopštenja na konferenciji međunarodnog značaja (M34) i tri saopštenja na konferencijama nacionalnog značaja (M64).

Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

Miloš P. Pešić, Miljana D. Todorov, Gergely Becskereki, George Horvai, Tatjana Ž. Verbić, Blanka Tóth, A novel method of molecular imprinting applied to the template cholesterol. *Talanta*, (2020) 217, 121075.

ISSN: 0039-9140, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121075>.

IF₂₀₂₀ 6,057 (Analytical Chemistry 12/87)

Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima (M23)

Miloš P. Pešić, Jugoslav B. Krstić, Tatjana Ž. Verbić, Highly selective water-compatible molecularly imprinted polymers for benzophenone-4. *Journal of Serbian Chemical Society*, (2022) 87(0), 1.

ISSN: 0352-5139, DOI: <https://doi.org/10.2298/JSC22032540P>.

IF₂₀₂₁ 1,100 (Chemistry, Multidisciplinary 153/180)

Saopštenja sa skupova međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

Gergely Becskereki, **Miloš Pešić**, Miljana Todorov, George Horvai, Tatjana Verbić, Blanka Toth, A Novel Method for Production of Molecularly Imprinted Polymers with Cholesterol and Other Biologically Important Molecules, *12th International Conference on Instrumental Methods of Analysis (IMA-2021), September 20-23, 2021, Thessaloniki and Athens, Greece (Virtual event)* Appl. Sci, 2021, 11, 11767 (page 65).

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

1. **Miloš P. Pešić**, Miljana D. Todorov, Nikola D. Obradović, Tatjana Ž. Verbić, Molecularly imprinted polymers for cholesterol, *Fourth Conference of Young Chemists of Serbia, November 5, 2016, Belgrade, Serbia*, Book of Abstracts, P6. ISBN:978-86-7132-064-1.

2. Zsanett Dorko, **Miloš P. Pešić**, Anett Szakolczai, Miljana D. Todorov, Tatjana Ž. Verbić, George Horvai, Molecularly imprinted polymers – preparation and characterization of selective sorbents - *53rd Meeting of the Serbian Chemical Society, June 10-11, 2016, Kragujevac, Serbia*, Book of Abstracts, 11. ISBN 978-86-7132-056-6.

3. Zsanett Dorkó, **Miloš P. Pešić**, Tatjana Ž. Verbić, George Horvai, Selectivity of molecularly imprinted polymers, *51st Meeting of the Serbian Chemical Society, Jun 5-7, 2014, Niš, Serbia*, Book of Abstracts, 21. ISBN 978-86-7132-054-2.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Милош П. Пешић**

Број индекса **ДХ08/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Добијање и карактеризација нових сорбената на бази молекулски обележених полимера
за одабране стероиде и УВ филтере**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 29.8.2022.

Потпис аутора


**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског
рада**

Име и презиме аутора	Милош Пешић
Број индекса	ДХ08/2013
Студијски програм	Хемија
Наслов рада	Добијање и карактеризација нових сорбената на бази молекулски обележених полимера за одабране стероиде и УВ филтере
Ментор	др Татјана Ж. Вербић

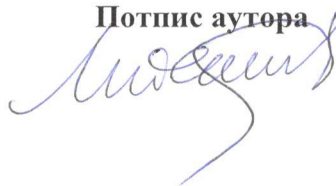
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 29.8.2022.

Потпис аутора



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Добијање и карактеризација нових сорбената на бази молекулски обележених полимера за одабране стероиде и УВ филтере

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

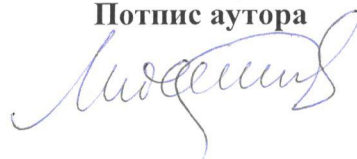
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 29.8.2022.

Потпис аутора



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.