

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Ana V. Vujačić

Kinetika i mehanizam adsorpcije natrijum
(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil)
benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-
3-ium-3-il)propan-1-sulfonata na koloidne
čestice zlata različitih svojstava i veličine

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Ana V. Vujačić

Kinetics and mechanism of sodium (Z)-3-(5-chloro-2-((5-chloro-3-(3-sulfonatopropyl)benzothiazol-2(3H)-ylidene)methyl)benzothiazol-3-ium-3-yl)propane-1-sulfonate adsorption on gold nanoparticle colloids of different properties and size

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Mentori:

1. dr Sofija Sovilj, redovni profesor, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. dr Vesna Vasić, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča”

Članovi komisije:

1. dr Sofija Sovilj, redovni profesor, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. dr Vesna Vasić, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča”
3. dr Sanja Grgurić-Šipka, vanredni profesor, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. dr Vesna Vodnik, viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča”
5. dr Ljuba Mandić, redovni profesor, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Beograd, 2013

Zahvalnice

Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, pod rukovodstvom dr Vesne Vasić, naučnog savetnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, koja je predložila temu i neposredno rukovodila izradom ovog rada, kako u toku izvođenja eksperimenata tako i u toku obrade i interpretacije eksperimentalnih rezultata. Ovom prilikom joj se najiskrenije zahvaljujem na nesebičnoj pomoći koju mi je pružila u toku doktorskih studija i svih faza izrade ove disertacije, na ukazanom poverenju, korisnim sugestijama u toku rada, savetima za njegovu konačnu verziju, na velikom strpljenju, interesovanju, trudu i na velikoj moralnoj podršci.

Zahvaljujem se mentoru Prof. dr Sofiji Sovilj, red. prof. Hemijskog fakulteta, na korisnim sugestijama u toku izrade ovog rada, koordinaciji sa saradnicima iz Centra za nanomaterijale - Center for Nanoscale Materials, Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois, United States pri izradi dela ovog rada i na savetima za njegovu konačnu verziju.

Srdačno se zahvaljujem dr Vesni Vodnik, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ na pomoći pri izradi dela eksperimenata, interpretaciji rezultata, podršci i savetima za njegovu konačnu verziju.

Zahvaljujem se dr Ljubi Mandić, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta na pokazanom interesovanju, podršci pri pisanju ovog rada i ukazanim sugestijama i savetima za njegovu konačnu verziju.

Zahvaljujem se dr Sanji Grgurić, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta na ukazanim sugestijama i savetima za konačnu verziju ovog rada.

Zahvaljujem se dr Jasmini Hranisavljević iz Centra za nanomaterijale (Assistant Chemist, Center for Nanoscale Materials, Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois, United States) na dragocenim savetima u oblasti ispitivanja J-agregata, kao i Prof. dr Miroslavu Dramićaninu, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke

„Vinča”, dr Slobodanu Milonjiću, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” i dr Nataši Bibić, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” na pomoći pri izradi eksperimentalnog dela ove teze.

Takođe želim da se zahvalim kolegama iz grupe i svim kolegama Laboratorije za fizičku hemiju 050 na podršci, a posebno dr Gordani Joksić i kolegamicama dr Sandri Petrović i dr Andreji Leskovic, na pomoći pri izradi eksperimenata, obradi i interpretaciji rezultata kod ispitivanja biološke aktivnosti nanočestica zlata i na velikoj podršci.

Posebno želim da se zahvalim majci Radmili, ocu Vukašinu i baki Ljubinki na bezgraničnoj podršci, ljubavi, razumevanju i pružanju motivacije tokom izrade teze i supругu Gavru na velikoj inspiraciji i podršci, dragocenim savetima, razumevanju, ljubavi i strpljenju. Zahvaljum se i svim prijateljima koji su me podržavali i bili uz mene.

Kinetika i mehanizam adsorpcije natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil) benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1-sulfonata na koloidne čestice zlata različitih svojstava i veličine

Rezime

Primenom više eksperimentalnih metoda (TEM, UV-Vis spektrofotometrija, fluorescentna spektroskopija, FTIR, DLS, merenja zeta potencijala) ispitane su nanočestice zlata različitih svojstava i veličina sa adsorbovanim boratnim (C6 i C9,5) i citratnim (C17 i C30) jonima na površini, u odsustvu i prisustvu TC boje (natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil)benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1-sulfonata) u vodenoj sredini, i potvrđena je adsorpcija TC na površini ovih nanočestica. Merenje fluorescencije agregata čestica-boja, korigovane za efekat unutrašnjeg filtera, je ukazalo da nanočestice zlata, u zavisnosti od koncentracije, gase fluorescenciju TC boje. Nađeno je da je ovaj proces kvantitativno povezan sa stepenom pokrivenosti površine nanočestica zlata molekulima TC boje. Pritom je efikasnost gašenja rasla sa povećanjem veličine čestica, pri čemu je koncentracija nanočestica zlata u rastvoru održavana konstantnom. Uz pretpostavku da je maksimalno gašenje fluorescencije TC boje ograničeno na potpunu monoslojnu pokrivenost površine nanočestica TC bojom (zavisno od orijentacije boje), eksperimentalno dobijene vrednosti koncentracije nanočestica C17 i C30 potrebne za potpuno gašenje fluorescencije TC boje su bile niže od teorijski izračunatih, dok su za gašenje fluorescencije TC boje pri konstantnoj koncentraciji nanočestica dobijene više eksperimentalne vrednosti u poređenju sa teorijski izračunatim, iz čega je zaključeno da je najverovatnija orijentacija molekula TC boje na površini ovih nanočestica kosa. S druge strane, u slučaju nanočestica C6 i C9,5 teorijski dobijene vrednosti za koncentraciju TC boje potrebnu da pokrije površinu nanočestice i da fluorescencija boje bude potpuno ugašena, u slučaju sve tri orijentacije, su niže u poređenju sa dobijenim eksperimentalnim vrednostima. Koncentracija nanočestica C9,5, potrebna da bi došlo do potpunog gašenja fluorescencije TC boje, po vrednosti najpribližnije odgovara vertikalnoj orijentaciji boje duž kraće

strane, dok je u slučaju C6 eksperimentalno dobijen rezultat dosta niži od teorijski izračunatih vrednosti za sve tri moguće orijentacije boje, iz čega je zaključeno da je na površini ovih nanočestica boja smeštena u više od jednog sloja. Iz eksperimenata u kojima je ispitivano gašenja fluorescencije, izračunate su i konstante ravnoteže za proces adsorpcije TC na površini svih ispitivanih nanočestica.

Ispitano je formiranje J-agregata, dobijenih samo u prisustvu koloida C6, kao i kinetika i mehanizam J-agregacije. Pritom su određeni kinetički i aktivacioni parametri ove reakcije, kao i uticaj jednovalentnih (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+), dvovalentnih (Mg^{2+}) i trovalentnih (Al^{3+}) metalnih jona na reakciju J-agregacije. Kinetička ispitivanja formiranja hibridnih J-agregata boje u prisustvu ovih nanočestica zlata su pokazala da se reakcija odvija kroz dva koraka, brzo inicijalno formiranje površinskog sloja, koje je praćeno sporijim rastom J-agregata na inicijalnom sloju J-agregata. Adsorpcija ove negativno naelektrisane boje na površini negativno naelektrisanih nanočestica zlata je moguća kada su molekuli boje prema površini nanočestica orijentisani preko tiazolnog sumpora, koji nosi parcijalno pozitivno naelektrisanje, što je u skladu sa aktivacionim parametrima određenim iz kinetičkih podataka. J-agregacija je primećena po dodatku metalnih jona u rastvor boje, a nakon dodatka nanočestica u rastvor boje i u prisustvu svih navedenih jona, osim Al^{3+} , takođe je došlo do formiranja J-agregata. Pritom, sa porastom veličine jednovalentnih katjona dolazi do smanjenja vrednosti konstante brzine i brzog i sporijeg procesa J-agregacije. Sa povišenjem temperature, u prisustvu Cs^+ , vrednosti konstanti brzina za oba procesa rastu, pri čemu su izračunate niže vrednosti aktivacionih energija u poređenju sa vrednostima dobijenim bez njihovog prisustva ukazale da je u ovom slučaju smanjena energetska barijera i pospešena reakcija J-agregacije.

Ispitana su citotoksična svojstva još dve različite koloidne disperzije zlata, C15 i C47, sintetizovane sa citratom kao redukcionim sredstvom, korišćenjem dva *in vitro* model sistema humanih ćelija: limfocita i fibroblasta. Dobijeni rezultati su pokazali da u oba slučajaja postoji koncentraciona zavisnost za različite efekte, kao i zavisnost od veličine čestica, ali je u slučaju limfocita dobijena veća osetljivost na nanočestice zlata. Tretiranje kultura limfocita sa nanočesticama zlata je izazvalo citotoksične efekte koji su pokazani

značajnim uvećanjem učestalosti mikronukleusa ali zanemarljivo malim povećanjem ćelijskog proliferativnog potencijala u poređenju sa kontrolom, što ipak ukazuje na poremećaj funkcije kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa. U ćelijskoj liniji fibroblasta, iste koncentracije nanočestica zlata su izazvale nešto veći nivo γ -H2AX fokusa nego što je to u kontroli.

ključne reči: nanočestice zlata, tiocijanska boja, adsorpcija, kinetika, J-agregacija, gašenje fluorescencije, citotoksičnost

naučna oblast: neorganska hemija

uža naučna oblast: Opšta i neorganska hemija

UDK broj:

Kinetics and mechanism of sodium (Z)-3-(5-chloro-2-((5-chloro-3-(3-sulfonatopropyl)benzothiazol-2(3H)-ylidene)methyl)benzothiazol-3-ium-3-yl)propane-1-sulfonate adsorption on gold nanoparticle colloids of different properties and size

Abstract

The borate (C6 and C9,5) and citrate (C17 and C30) capped gold nanoparticles of different average core sizes and properties, were characterized by transmission electron microscopy (TEM), ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), fluorescence spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), dynamic light scattering (DLS) and zeta potential measurements, in the absence and presence of cyanine dye, sodium (Z)-3-(5-chloro-2-((5-chloro-3-(3-sulfonatopropyl)benzothiazol-2(3H)-ylidene)methyl)benzothiazol-3-ium-3-yl)propane-1-sulfonate (TC) in water conditions, and the obtained results confirmed that TC was adsorbed on the surface of these nanoparticles. The measurements of fluorescence of the particle–dye assembly, corrected for inner filter effects, clearly indicated that the fluorescence of TC was quenched by gold nanoparticles on the concentration dependent manner. This process was found to be quantitatively related to the surface coverage of the Au nanoparticle by TC dye molecules. Significant increase of quenching efficiency was noticed when nanoparticle size increased, keeping the concentration of nanoparticles of different size constant. The experimental results of fluorescence quenching were compared with those obtained by theoretical calculations, in which we assumed that the maximum quenching of TC dye fluorescence was restricted to full monolayer coverage of TC on the nanoparticle surface. In case of C17 and C30 nanoparticles, the experimentally obtained values for nanoparticle concentration needed to completely quench TC dye fluorescence were lower than the calculated ones, while higher experimental values in comparison with calculated ones of quenched TC dye at constant nanoparticle concentration were obtained. These findings led to the conclusion that the most probable orientation of TC dye molecules on the surface of these nanoparticle was slanted. On the other hand, in case of C6 and C9,5 nanoparticles, the obtained calculated values for TC concentration

needed to cover the nanoparticle surface and be completely quenched, for all three possible orientations of TC dye, were lower in comparison with the experimental values. The experimentally obtained value of C9,5 concentration needed to completely quench TC dye fluorescence most closely corresponds to vertical TC dye orientation along the short side, while the experimentally obtained results in case of C6 nanoparticles were much lower than theoretically calculated values for all three possible TC dye orientations. These findings indicated that on the surface of C6 nanoparticles the dye was accommodated in more than one layer. In addition, from the fluorescence quenching experiments, the equilibrium constants for the sorption of TC on the surface of all mentioned nanoparticles were calculated.

TC dye J-aggregate formation, obtained only in the presence of C6 colloidal nanoparticles, as well as kinetics and mechanism of this process were investigated. Thereby, the kinetic and activation parameters of this reaction were determined, and the influence of mono- (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+), di- (Mg^{2+}) i trivalent (Al^{3+}) metal cations on TC J-aggregation was estimated. Kinetic studies of this hybrid dye/metal nanoparticle J-aggregate formation have shown a two-step process, a fast initial formation of the surface layer, followed by the slower, growth of J-aggregates on the initial TC layer. The adsorption of this negatively charged dye on the surface of negatively charged gold nanoparticles is only possible if the dye molecules are oriented toward the surface of nanoparticles via thiazole sulfur, which carries partial positive charge. This hypothesis is supported by the activation parameters estimated from kinetic data. The presence of J-aggregates was noticed in the presence of metal ions in TC dye solution, and also after the addition of C6 nanoparticles and in the presence of all mentioned cations except Al^{3+} . The rate constants for faster and slower process of J-aggregate formation decreased with increasing the size of monovalent cations. With increasing temperature, in the presence of Cs^+ ions, the values of rate constants for both processes increased, while the obtained calculated lower values of activation energies in comparison with values obtained without their presence indicated that in this case the energy barrier was reduced and the J-aggregate formation was promoted.

Two more colloidal dispersions of gold nanoparticles prepared by citrate reduction, namely C15 i C47, were sintetized, and their cytotoxic properties were examined using two *in vitro* human cells model systems: proliferating lymphocytes and connective tissue fibroblasts. The obtained results indicated the concentration dependent effects in both cases, as well as size dependence, although lymphocytes turned to be more sensitive to gold nanoparticles. Treatment of lymphocyte cultures with these gold nanoparticles caused cytotoxic effects as revealed by significant enhancement of incidence of micronuclei but non significant increase of cell proliferation potential when compared to the control, still suggesting disturbed function of cell-cycle checkpoints. In a fibroblast cell line, the same doses of gold nanoparticles induced the slightly higher level of γ -H2AX foci than in a control.

Key words: Gold Nanoparticles, Thiocyanine Dye, Adsorption, Kinetics, J-aggregation, Fluorescence Quenching, Citotoxicity

Scientific area: Chemistry

Scientific sub-area: General and Inorganic Chemistry

UDK number:

LISTA SKRAĆENICA

TC – natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil)benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1-sulfonat

TEM – Transmission Electron Microscopy

DLS – Dynamic Light Scattering

UV-Vis – Ultraviolet and Visible Spectroscopy

FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy

ATR – Attenuated Total Reflection

MN – mikronukleusi

BN – binuklearne ćelije

OD – optical density

CBPI – cytokinesis-block proliferation index

CB-MN – citokinezis blok-mikronukleusni test

BCI – binuklearni ćelijski indeks

PSD – particle size distribution

PDI – polydispersity index

RET – Resonance Energy Transfer

FRET – Förster Resonance Energy Transfer

SERS – Surface Enhanced Raman Scattering

OTDM – Optical Time Division Multiplexing

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

RNK – ribonukleinska kiselina

PEG – polietilen-glikol

TOAB – tetraoktilamonijum-bromid $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7]_4\text{NBr}$

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DSBs – double-strand breaks

FITC – fluorescein-izotiocijanat

DAPI – 4',6'-diamidino-2-fenilindol

Sadržaj:

1	Uvod.....	1
2	Opšti deo.....	4
2.1	Nanočestice zlata	4
2.1.1	Koloidne disperzije metala i struktura koloidne čestice.....	4
2.1.2	Optičke karakteristike metalnih nanočestica	9
2.1.3	Sinteza nanočestica zlata	15
2.2	Cijanske boje	19
2.2.1	Struktura i karakteristike cijanskih boja	19
2.2.2	Agregati cijanskih boja u prisustvu metalnih nanočestica.....	25
2.3	Kinetika i mehanizam reakcije nanočestica zlata sa TC bojom.....	28
2.3.1	Kinetika reakcije nanočestica zlata sa TC bojom.....	28
2.3.1.1	Eksponecijalna funkcija drugog reda	28
2.3.1.1 a)	„Stretched“ eksponecijalna i sigmoidna funkcija	32
2.3.2	Efekat unutrašnjeg filtera i mehanizmi gašenja fluorescencije	37
2.3.2.1	Efekat unutrašnjeg filtera	37
2.3.2.2	Procesi apsorpcije i emisije svetlosti - Jablonski dijagram	38
2.3.2.3	Mehanizmi gašenja fluorescencije.....	41
2.4	Citotoksičnost nanočestica zlata.....	45
2.4.1	Uticaj nanočestica zlata na ćeliju.....	45
2.4.1.1	Mikronukleusni test	47
2.4.1.2	γ -H2AX fosforilacioni esej.....	48
2.5	Primena nanočestica zlata i cijanskih boja.....	50
2.5.1	Primena nanočestica zlata <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	50
2.5.2	Primena cijanskih boja	54
2.5.3	Primena nanočestica zlata sa bojom	55
2.6	Cilj rada.....	57
NAŠ RAD	59

3 Eksperimentalni deo..... 60

3.1 Hemikalije.....	60
3.1.1 Ispitivanje citotoksičnih efekata nanočestica zlata	61
3.2 Sinteza nanočestica zlata	61
3.3 Aparature	65
3.3.1 TEM merenja	65
3.3.2 DLS merenja	65
3.3.3 Spektrofluorimetrijska merenja	65
3.3.4 Spektrofotometrijska merenja	66
3.3.5 Kinetička merenja.....	66
3.3.6 FTIR merenja.....	67
3.3.7 Mikroskopska merenja	67
3.4 Metode ispitivanja citotoksičnih efekata nanočestica zlata	68
3.4.1 Citokinezis blok-mikronukleusni (CB-MN) test	68
3.4.2 Tehnika imunocitohemijske fluorescencije (γ -H2AX esej).....	69
3.4.3 Statistička analiza	69

4 Rezultati..... 70

4.1 Karakterizacija koloidnih čestica zlata	70
4.1.1 Apsorpcioni spektri koloidnih rastvora zlata	70
4.1.2 Određivanje veličine i oblika koloidnih čestica TEM merenjima	73
4.1.2.1 TEM karakterizacija koloidnih čestica.....	73
4.1.2.2 TEM karakterizacija koloidnih čestica u prisustvu TC boje.....	76
4.1.3 Određivanje veličine koloidnih čestica DLS metodom.....	79
4.1.3.1 DLS karakterizacija sintetizovanih koloidnih čestica zlata.....	79
4.1.3.2 DLS karakterizacija sintetizovanih koloidnih čestica zlata u prisustvu TC.....	79
4.1.4 Merenja zeta potencijala	85
4.2 Adsorpcija TC boje na površini nanočestica zlata	87

4.2.1	Apsorpcioni i fluorescentni spektri TC boje	87
4.2.2	Ispitivanje interakcije između TC i nanočestica zlata sa adsorbovanim citratnim jonima	91
4.2.2.1	Spektrofotometrijska merenja	91
4.2.2.2	Spektrofluorimetrijska merenja	92
4.2.2.3	FTIR spektri	96
4.2.2.4	Gašenje fluorescencije.....	98
4.2.2.5	Izračunavanje konstante ravnoteže	106
4.2.3	Ispitivanje interakcije između TC i nanočestica zlata sa adsorbovanim boratnim jonima	108
4.2.3.1	Spektrofotometrijska merenja	108
4.2.3.2	Spektrofluorimetrijska merenja	110
4.2.3.3	FTIR spektri	112
4.2.3.4	Gašenje fluorescencije.....	113
4.2.3.5	Izračunavanje konstante ravnoteže	124
4.2.4	Formiranje J-agregata.....	125
4.2.4.1	Spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko ispitivanje interakcije nanočestica C6 sa TC bojom.....	125
4.2.4.2	Formiranje J-agregata u prisustvu nanočestica C6	128
4.2.4.3	Kinetika i mehanizam formiranja J-agregata	131
4.2.4.3 a)	Zavisnost konstanti brzine od koncentracije TC boje	139
4.2.4.3 b)	Zavisnost brzine reakcije od temperature i određivanje termodinamičkih parametara	141
4.2.4.4	Uticaj katjona na formiranje J-agregata	145
4.2.4.4 a)	Kinetika formiranja J-agregata u prisustvu različitih katjona	147
4.2.4.4 b)	Termodinamika reakcije u prisustvu Cs ⁺ jona	149
4.3	Biološka aktivnost nanočestica zlata.....	151
5	Diskusija	158
6	Zaključak.....	164

7 Literatura	167
8 Prilozi.....	203
8.1 DLS grafici.....	203
8.2 Zavisnost I od C_{np} (intenziteta fluorescencije slobodne boje u rastvoru od koncentracije nanočestica), jedn. (23).....	209

1 Uvod

Interesovanje za ispitivanje reakcije tiocijanske boje na površini nanočestica zlata sa adsorbovanim boratnim i citratnim jonima, i sa druge strane poseban interes za proučavanje J-agregata, kao hibridnih struktura karakterističnih svojstava, proizilazi iz velike potencijalne praktične primene ovakvih struktura kod optičkih sistema [1,2] i u oblasti medicine [3-9]. Hibridne nanočestice koje se sastoje od jezgra plemenitog metala funkcionalizovanog omotačem koga čini organska boja su poznate zbog svojih neobičnih optičkih svojstava, uključujući ultrabrze indukovane transparencije, nelinearno ponašanje, Fano rezonancije sa asimetričnim oblikom linije rasejanja i pojačano fotoindukovano razdvajanje naelektrisanja [1,10-15]. Pošto su cijanske boje jako fluorescentne [16], merenje fluorescentnih svojstava agregata čestica-boja može dati važan uvid za razumevanje molekularnih interakcija i reaktivnosti u ovakvim sistemima. Za ovakve hibridne strukture su karakteristični fenomeni kao što su gašenje fluorescencije boje [17], a fluorescentno obeležavanje je u širokoj upotrebi u medicinskoj dijagnostici [7] gde se koristi da bi se lokalizovale nanočestice ili simuliralo otpuštanje lekova. Interakcije sa pojačanim optičkim poljima [1] i nelinearna svojstva [2] ih čine pogodnim i za dizajniranje sistema za konvertovanje solarne energije, za primene u molekularnoj optoelektronici i kod sistema zasnovanih na sensorima. Poznato je da cijanske boje različitih struktura mogu formirati J-agregate u prisustvu molekula proteina, površinski aktivnih jedinjenja, polimera, metalnih jona i nanočestica [18-26]. Ovakvi agregati imaju usku apsorpcionu traku, pomerenu ka crvenoj oblasti i visoke apsorpcije i polarizabilnosti u odnosu na traku monomerne vrste [2], pa zbog svojih ultrabrzih i nelinearnih optičkih svojstava, nalaze primenu u optičkoj opremi u telekomunikacionim mrežama [27,28]. Poznato je da se ovi sistemi koriste i da bi promenili elektrodni potencijal određenih materijala, indukujući elektronski transport i povećavajući osetljivost slojeva na svetlost He-Ne lasera [29]. J-agregati mogu povećati efikasnost fotogalvanske ćelije [30], a veoma je važna i njihova uloga u povećanju spektralne osetljivosti fotografskih emulzija AgCl [31] ili AgBr [32]. Sve je veći interes za ispitivanje samo-organizovanja ovakvih molekula posredstvom nanočestica u smislu njihove nove primene kao hemijskih senzora [33-35], u katalizi [36,37], prenosu lekova

[6], nanoelektronici [38] i medicinskoj dijagnostici [8,9]. Jednostavna sinteza, kao i dobra otpornost ovih nanomaterijala u kombinaciji sa jakom, ultrabrzom prirodom polarizacionog kuplovanja [1], čini ih pogodnim za korišćenje u optičkim uređajima, pri čemu su optičke karakteristike boje na ovaj način modulirane i poboljšane.

Koloidne čestice zlata se mogu vezati za mnoge biološke molekule kao što su antitela, lektini, antigeni, glikani, nukleinske kiseline [39] i receptori. Poznato je korišćenje nanočestica zlata u nanomedicini, u oblasti dijagnostike i terapije [3-5], kao i u biološkim istraživanjima u kojima su koloidno zlato i njegovi različiti derivati među najčešće korišćenim kontrastnim agensima kod elektronske mikroskopije [40-43]. Nanočestice zlata su ispitivane i kao nosioci lekova [44], za detekciju lokacije tumora [45] i kao termalni konvertori bliske infracrvene svetlosti za fototermalno oštećenje tumora [46,47]. Zbog sličnosti nanočestica zlata po veličini sa biološkim materijalom, kao što su ćelijske komponente i proteini, može doći do neželjenog ulaska u ćeliju što može štetno uticati na normalno funkcionisanje ćelije [48]. Efekat direktnog ulaska nanočestica u ćeliju se može potvrditi ispitivanjem limfocita pri izlaganju nanočesticama zlata [49]. S druge strane, pošto je koža prva barijera pri izlaganju faktorima životne sredine koja sadrži nanočestice, od velikog je interesa ispitati genotoksične efekte nanočestica zlata u zavisnosti od njihove veličine, koncentracije i karakteristika površine na humanim dermalnim fibroblastima iz primarnih kultura ćelija. Nanočestice zlata, zbog svoje biokompatibilnosti i ispoljavanja jedinstvenih strukturnih, elektronskih, magnetnih, optičkih i katalitičkih svojstava imaju i važnu analitičku primenu u oblasti genosenzora [50-52], elektrohemijskih imunosenzora [53-58], elektrokatalitičkih senzora [59-67] i enzimskih biosenzora [68-74], a s druge strane poznata je i njihova primena u kozmetici [75].

Zbog svega ovoga, veoma je važno razumeti hemiju interakcije na površini nanočestica zlata različitih veličina, sa negativno naelektrisanom TC bojom (natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil)benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1-sulfonat), koja do sada nije detaljnije ispitivana. Cilj ovog rada je bio da se, uz korišćenje različitih eksperimentalnih tehnika, poređenjem eksperimentalno dobijenih rezultata za procenat gašenja fluorescencije TC boje u prisustvu sintetizovanih koloida zlata sa teorijski izračunatim procentom gašenja fluorescencije TC

za monoslojnu površinsku pokrivenost nanočestice, predvidi najverovatnija moguća orijentacija molekula TC boje na površini nanočestica zlata, kao i određivanje parametara adsorpcije. Iako je u literaturi opisana J-agregacija cijanskih boja različitih struktura na površini nanočestica zlata i srebra [12,76-78] i praćeno formiranje ekscitona kod J-agregata nekih tiocijanskih boja u rastvoru u prisustvu različitih soli [79] kao i porfirinske (cijanske) boje na površini proteina [80], do sada nisu bila izvedena kinetička ispitivanja J-agregacije na sistemima koji se sastoje od hibridne metalne nanočestice i organske boje, pa kinetika i mehanizam u ovakvim sistemima nisu u potpunosti razjašnjeni. Iz tog razloga je cilj našeg rada bio i proučavanje procesa formiranja J-agregata dobijenih samo u slučaju najmanjih sintetizovanih nanočestica zlata, C6, kao i ispitivanje mehanizma i kinetike J-agregacije. Imajući u vidu i činjenicu da uticaj nanočestica zlata na ćeliju još uvek nije dovoljno ispitan, cilj ovog rada je i davanje dodatnih informacija u ovom polju istraživanja, u smislu ispitivanja genotoksičnosti nanočestica zlata različite veličine, karakteristika površine i koncentracije u dva *in vitro* model sistema humanih ćelija, limfocitima i fibroblastima.

2 Opšti deo

2.1 Nanočestice zlata

2.1.1 Koloidne disperzije metala i struktura koloidne čestice

Nanočestice su korišćene još od davnih vremena, kada se slučajno došlo do njihove sinteze. Tako su još od starog veka poznati Damaski čelik (*engl.* Damascus steel) koji sadrži ugljenične nanocevi i koji se koristio za izradu veoma oštarih mačeva, kao i čuvene čaše-pehari (*engl.* Glass Lycurgus Cup) koje sadrže nanočestice zlata i srebra, i imaju jedinstvenu boju [81-83].

Nanočestice zlata predstavljaju idealne model-sisteme za ispitivanje fizičkih svojstava metalnih čestica nanometarskih dimenzija usled čega su i najčešće korišćene strukture u različitim oblastima nanotehnologije. Odlikuju se izuzetnom hemijskom stabilnošću i imaju rezonanciju površinskog plazmona u vidljivoj oblasti elektromagnetnog zračenja.

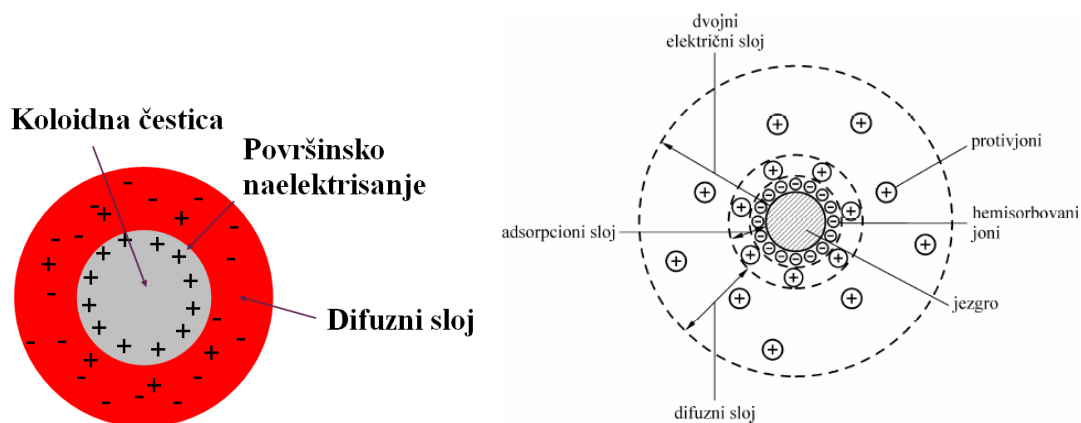
Izraz *koloid* je u hemiju uveo engleski naučnik Thomas Graham, i potiče od grčke reči *kólla* koja znači lepak (tradicionalno je bio *sol*). Nasuprot pravim rastvorima koji su homogeni, koloidi ili koloidne disperzije predstavljaju heterogene sisteme gde je jedna komponenta - disperzna faza, koja može biti gas, tečnost ili čvrsta supstanca, raspršena-dispergovana u drugoj fazi – disperzionom sredstvu, pri čemu je ta faza u višku i takođe može biti u sva tri agregatna stanja. Veličina čestica koje sačinjavaju dispergovanu fazu unutar koloida varira od 1 nm do 100 nm (kada je prečnik <1nm to je pravi rastvor, a suspenzija kada je prečnik >100 nm). Neki primeri koloidno-disperznih sistema su dati u Tabeli 1.

Tabela 1. Podela koloidnih sistema

Koloidno-disperzni sistemi		
Disperzna faza	Disperzno sredstvo	Primer
gas	gas tečnost čvrsta supstanca	nemoguć (homogen sistem) pena vazduh u mineralima
tečnost	gas tečnost čvrsta supstanca	tečni aerosol (magla, kiša) emulzija (mleko, majonez) gel (džem)
čvrsta supstanca	gas tečnost čvrsta supstanca	čvrsti aerosol (dim, prašina) sol (mastilo, krv) koloidno zlato u staklu

Prema obliku dispergovanih čestica disperzni sistemi se mogu podeliti na korpuskularno disperzne sisteme (čestice približno sfernog oblika), laminarno disperzne sisteme (čestice u obliku lamela i tankih listića) i fibrilarno disperzne sisteme (čestice u obliku štapića i vlakana). Prema solvataciji tj. prema afinitetu dispergovanih čestica prema disperznom sredstvu koloidi se mogu podeliti na liofilne (hidrofilne) koji pokazuju afinitet prema disperzionom sredstvu i obavijeni su molekulima rastvarača (vode) i liofobne (hidrofobne) koji ne pokazuju afinitet prema disperzionom sredstvu. Prema strukturi koloidi se mogu podeliti na gelove (koherentni sistemi) i solove (nekoherentni sistemi) u koje se ubrajaju koloidne disperzije, makromolekulski koloidi i makromolekulski asocijati.

Nanočestica se sastoji od elementarnog jezgra okruženog dvostrukim difuznim slojem jona, Slika 1.



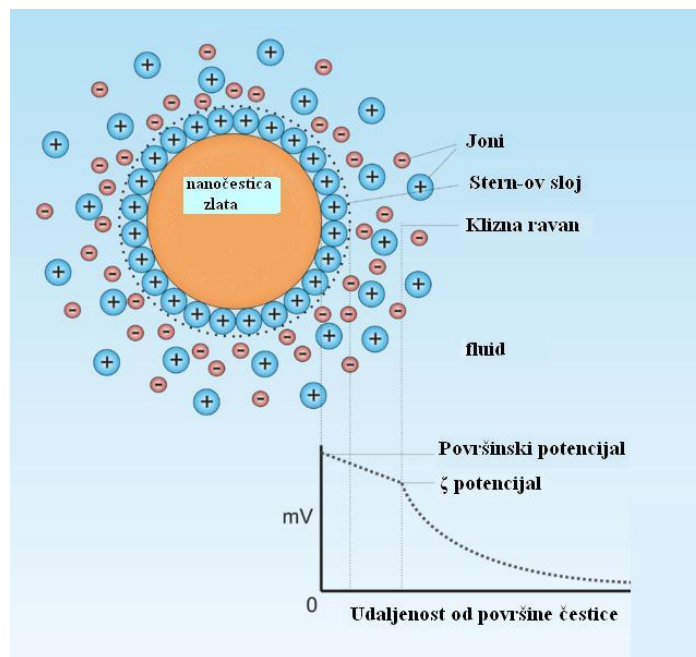
Slika 1. Struktura koloidne čestice (levo) i detaljan prikaz liofobne koloidne čestice (desno)

Kod liofobnih (hidrofobnih) koloidnih sistema karakteristično je da postoji slabo uzajamno delovanje između dispergovane komponente i disperznog sredstva, odnosno između dispergovanih čestica i vode. Dispergovane čestice vezuju molekule disperzne sredine (vode) u veoma malom stepenu. Takvi sistemi su koloidni rastvori metala (npr. Au, Ag, Cu, Fe, i dr.), nemetali (S, P), oksidi i hidroksidi (V_2O_5 , Cr_2O_3 , WO_3 , MoO_3 , SiO_2 , $Fe(OH)_3$, $Al(OH)_3$), sulfidi (As_2S_3 , Sb_2S_3 , CuS , HgS) i soli (AgI , $AgBr$). Pritom, disperzno sredstvo nije rastvarač za dispergovanu komponentu, pa se lako talože i ireverzibilni su. Liofobni koloidi imaju i viskoznost i površinski napon sličan vrednostima disperzne sredine i vide se pod optičkim mikroskopom. Stabilnost ovih solova zavisi od naelektrisanja koloidnih čestica, koje se u električnom polju jednosmerne struje kreću prema odgovarajućoj elektrodi.

Liofobna koloidna čestica (micela - agregacioni koloid, tj. agregat molekula surfaktanta dispergovan u koloidnom rastvoru) sastoji se od jezgra koloidne čestice i dvojnog električnog sloja. Veliki broj molekula ili atoma gradi jezgro kristalne strukture koje je elektroneutralno. Zbog velike površinske energije jezgra, koloidna čestica postiže stabilnost adsorpcijom jona iz rastvora, tj. smanjenjem ove energije. Prvo se adsorbuju ili istoimeni ili izomorfni joni sa jonima jezgra (pravilo rasta kristala). Ovi joni su hemijski adsorbovani (nesolvatisani) i zovu se i specifično adsorbovani joni, a pošto određuju potencijal i znak naelektrisanja koloidne čestice zovu se i potencijalodređujući. Oni dalje

privlače elektrostatičkim silama suprotno naelektrisane jone prisutne u koloidnom rastvoru, koji se fizički adsorbuju preko hemijski adsorbovanih, i delimično su ili potpuno solvatisani. Hemisorbovani joni i prvi sloj fizički adsorbovanih jona čine tzv. adsorpcioni sloj, koji je čvrsto vezan za jezgro (Stern-ov sloj). Pošto se kontra-joni adsorbuju toliko da je koloidna čestica (micela) u celini neutralna ostali kontra-joni se nalaze u difuznom sloju (Gouy-ov sloj, Gouy-Chapman-ov sloj), gde su pokretljiviji i podležu difuziji, a koncentracija im eksponencijalno opada sa porastom rastojanja od jezgra. Njihov broj u adsorpcionom sloju je manji od broja hemisorbovanih jona tako da naelektrisanje u adsorpcionom sloju nije kompenzovano. Adsorpcioni i difuzni sloj čine dvojni električni sloj (Slika 1).

Zbog neravnomerne raspodele jona i dipola rastvarača u dvostrukom dielektričnom sloju postoji određen pad potencijala, jednak zbiru pada potencijala kroz dva navedena sloja, a koji čini potencijal dvojnog električnog sloja. Pad potencijala kroz adsorpcioni sloj je linearan, a kroz difuzni eksponencijalan i vrednosti tih potencijala se ne mogu eksperimentalno određivati. Deo micela koji se sastoji od jezgra i adsorpcionog sloja je granula. Kada se micela nađe u električnom polju dolazi do kretanja granule prema određenoj elektrodi (suprotno naelektrisanjoj od granule), a kontra-jona difuznog sloja prema drugoj elektrodi. Međutim, raslojavanje micela se ne odigrava na granici adsorpcionog sloja već na tzv. hidrodinamičkoj ravni smicanja (klizna ravan). To je zamišljena ravan koja razdvaja granulu i solvatni (hidratni) sloj kontra-jona iz adsorpcionog sloja od preostalog dela difuznog sloja. Pad potencijala na ovoj ravni je elektrokinetički ili zeta-potencijal (ζ), Slika 2, i njegova vrednost se može odrediti eksperimentalno [84,85].



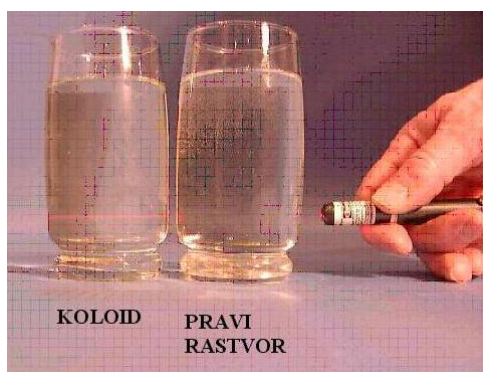
Slika 2. Struktura liofobne koloidne čestice i zeta potencijal (ζ) nanočestice

U liofobnom solu sve čestice (micele) su iste strukture, pa se odbijaju svojim difuznim slojevima što obezbeđuje stabilnost sola. Liofobni koloid je stabilan dok postoji dvojni električni sloj, odnosno kad je $\zeta \neq 0$.

Pri nekoj koncentraciji elektrolita u rastvoru može da dođe do potpunog prelaska svih kontra-jona iz difuznog sloja u adsorpcioni. Difuzni sloj tada prestaje da postoji, granula postaje elektroneutralna, a elektrokinetički potencijal jednak nuli. Ovakvo stanje koloidnih solova je izoelektrično stanje. Koloidni sol je u izoelektričnom stanju nestabilan, pa se jezgra, odnosno granule spajaju u agregate koji se dalje pod dejstvom sile zemljine teže talože (npr. AgI).

2.1.2 Optičke karakteristike metalnih nanočestica

Koloidni sistemi su definisani isključivo veličinom dispergovane faze a ne prirodom (agregatnim stanjem) disperzione sredine i dispergovane faze. Kada se osvetle, koloidni rastvori u kojima je veličina čestice 1-100 nm pokazuju Tyndall-ov efekat, odnosno rasejavaju svetlost, dok pravi rastvori nemaju ova svojstva (Slika 3 (a)).



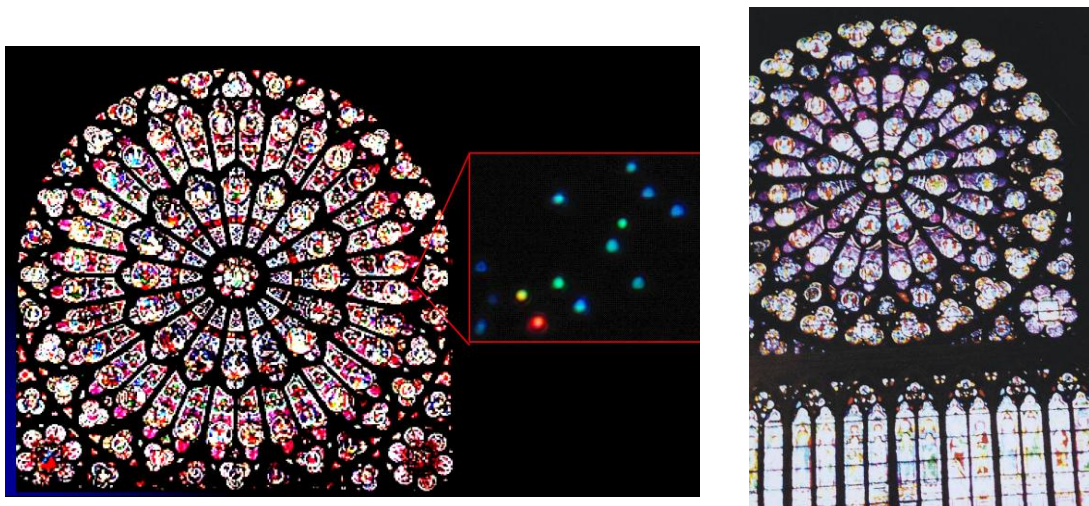
(a)



(b)

Slika 3. Tyndall-ov efekat: poređenje pravog rastvora i koloida (a); primer iz prirode – boja neba (b)

Primer kako se procesom sinteze materijala nanometarskih dimenzija mogu dobiti neka nova svojstva, Rimljani su otkrili još pre više od 2000 godina. Oni su pronašli da se dodavanjem staklu vrlo malih količina zlata u obliku soli, postiže tamno crvena boja, ukoliko se staklo na odgovarajući način termički obradi. Do obojenja dolazi zbog stvaranja nanočestica metala koje apsorbiraju svetlost u vidljivom delu spektra. Prema tome, interesovanje za optička svojstva nanočestica metala datira još iz tog vremena, a neki primeri su prikazani na Slici 4.



Slika 4. Rezonancije plazmona u metalima; vitraži na katedrali Notre Dame u Parizu (desno), koji sadrže nanočestice zlata, veličine 10-100 nm

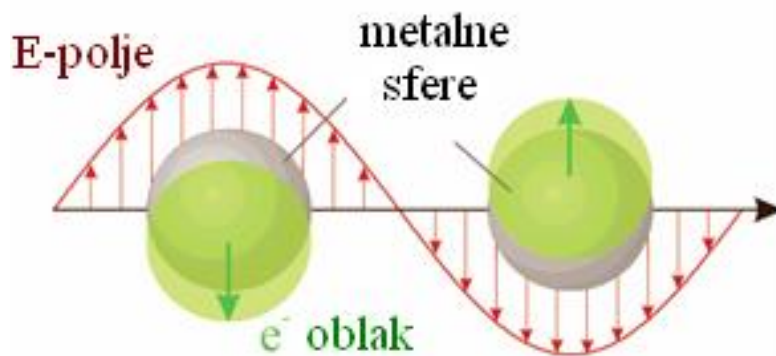
Koloidne čestice sadrže prosečno $10^3 - 10^9$ atoma, a koloidni rastvori čestica nanometraske veličine imaju specifičnu površinu od nekoliko stotina kvadratnih metara. Prisutvo ovako velike površine omogućava da se hemijske reakcije na površinama mogu izučavati u rastvorima. Procesi adsorpcije na koloidnim česticama metala se manifestuju optičkim promenama, pa se za njihovo izučavanje mogu koristiti jednostavne spektrofotometrijske metode. Izučavanje ovih nanometarskih i subnanometarskih veličina čestica u vodenim rastvorima je komplementarno izučavanju klastera u molekulskim snopovima u vakuumu, na čvrstim podlogama i u zamrznutim matricama.

Kod nanočestica, usled njihovih malih veličina, značajan deo ukupnog broja atoma nalazi se na površinama čestica. Površinski atomi, zbog svog položaja, imaju drugačija svojstva od atoma u unutrašnjosti čestice, usled čega nanočestice ispoljavaju drugačija svojstva od makroskopskih kristala. Specifične karakteristike površinskih atoma najčešće su posledica njihove koordinacije manjim brojem susednih atoma nego što je uobičajeno za kristalnu rešetku date supstance. S obzirom da broj površinskih atoma u odnosu na ukupan broj atoma raste sa smanjenjem dimenzija nanočestica, uticaj površine na svojstva nanostrukture biće izraženiji što su čestice manje. Kao posledica velikog broja površinskih atoma, za nanočestice su karakteristične i velike vrednosti površinske energije koja povećava nestabilnost ovih sistema i čestice teže da spajanjem tj.

aglomeracijom, pod dejstvom privlačnih van der Waals-ovih sila, pređu u stabilnije stanje. Agregacija ovih čestica se može zaustaviti dvostrukim električnim slojem koji se formira oko čestica ili upotrebom površinski aktivnih supstanci koje formiraju zaštitni sloj adsorbovan na površini nanočestica.

Veličina nanočestica metala je još jedna važna karakteristika ovih sistema, posebno kada su dimenzije nanočestica duž određenog pravca manje od De Broglie-evih talasnih dužina elektrona [86]. Zbog toga će kretanje naelektrisanja biti ograničeno dimenzijama nanočestica što će dovesti do kvantnih efekata veličine čestica na njihova optička, električna, magnetna i druga svojstva. Naime, pri veličinama čestica manjim od 2 nm svojstva ovih struktura, usled izraženih kvantnih efekata, postaju sličnija karakteristikama atoma ili molekula, dok su pri veličinama čestica većim od 100 nm, svojstva velikog broja materijala ista kao i u slučaju makroskopskih kristala.

Pored ovoga nanočestice metala karakteriše prisustvo velikog broja slobodnih elektrona, koje omogućava njihove kolektivne oscilacije (plazmonske oscilacije) pri interakciji sa elektromagnetnim zračenjem ograničene na površinu čestica. Pobude plazmona iz površine metalnih čestica koje dovode do koherentnog oscilovanja površinskih elektrona su rezonancije površinskog plazmona [87]. Kada se frekvencija elektromagnetnog polja nađe u rezonanciji sa koherentnim kretanjem elektrona, javlja se intenzivna apsorpcija u spektru, odakle potiče intenzivno obojenje koloidnih rastvora. Plazmonske oscilacije sfere i razdvajanje elektronskog oblaka od nukleusa pod dejstvom spoljašnjeg polja [88] shematski su prikazani na Slici 5. Centar naelektrisanja oblaka slobodnih elektrona u metalnoj čestici, pod dejstvom spoljašnjeg polja menja svoj položaj u odnosu na jezgra atoma. U tom slučaju, javlja se Coulomb-ova interakcija između elektrona i jezgra, koja dovodi do oscilovanja elektronskog oblaka u odnosu na osnovni položaj, Slika 5.



Slika 5. Prikaz plazmonskih oscilacija sfere i razdvajanja elektronskog oblaka od nukleusa pod dejstvom spoljašnjeg polja [88]

Zbog ove interakcije, apsorpcioni spektri elektromagnetnog zračenja metalnih nanočestica [87] odlikuju se karakterističnim apsorpcionim trakama čiji broj, položaj i širina zavise od njihovih geometrijskih karakteristika i veličine, koncentracije slobodnih elektrona, distribucije naelektrisanja u kristalu, dielektrične konstante metala i sredine u kojoj se čestice nalaze [89-91]. Kod kompaktnih materijala nije prisutan apsorpcioni pik karakterističan za nanočestice metala.

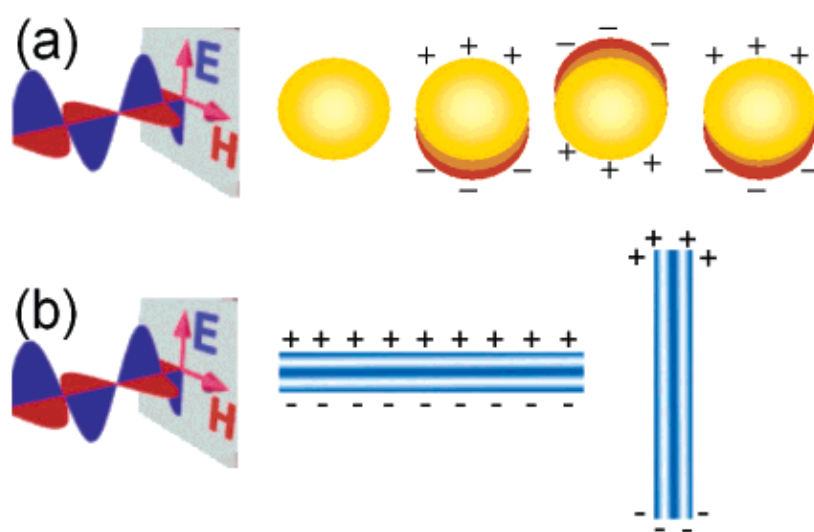
Zavisnost optičkih/elektronskih svojstava od veličine čestica su ispitavali Henglein [92] i Kreibig [93] sa saradnicima. Tako kod sfernih čestica, sa povećanjem veličine čestica raste širina apsorpcionog pika. S druge strane, smanjenje elektronske gustine u metalnim česticama dovodi do širenja i pomeranja apsorpcionog pika ka crvenom delu spektra, dok povećanje gustine slobodnih elektrona, dovodi do sužavanja i pomeranja apsorpcionog pika ka plavom delu spektra kao i povećanja apsorpcionog maksimuma [94]. Do širenja i smanjenja intenziteta plazmonskog pika uz pomeraj ka većim talasnim dužinama dolazi i sa povišenjem temperature, što je opisao Doremus sa saradnicima koristeći nanočestice zlata veličine 12 nm u staklenom matriksu [95], dok su kod većih nanočestica ove promene manje izražene. Pored toga, poznato je i da se električna i optička svojstva nanočestica zlata koriste kod integrisanja sistema zasnovanih na nanočesticama zlata i holesterol oksidazi, koji imaju primenu za detekciju holesterola [96].

Razvoj različitih metoda sinteze je omogućio i kontrolu drugih parametara nanočestica, koji često mnogo više, utiču na optičke karakteristike nego sama veličina čestica [88,97-99]. To su oblik [88], polidisperznost [100], površinska modifikacija [88], promena elektronske gustine [101] i geometrijska uređenost nanočestica [102,103].

Efekat obojenja koloidnih rastvora metala je, sredinom 19. veka podstakao Faraday-a [104] da ispituje njegovo poreklo, dok je ovaj fenomen tek 1908. godine objasnio Mie [105]. Rešavajući Maxwell-ove jednačine apsorpcije i rasejanja elektromagnetnih talasa na sfernim česticama metala, Mie je razvio teoriju prema kojoj fizičko objašnjenje porekla jake apsorpcije svetlosti metalnih nanočestica potiče od koherentnih oscilacija provodnih elektrona usled interakcije sfernih čestica sa elektromagnetnim poljem. Njegova teorija se zasniva na proračunu apsorpcionog spektra čestica poznatih dielektričnih svojstava i veličina manjih od talasne dužine upadne svetlosti u sredini poznate dielektrične konstante. Kompletnije objašnjenje optičkih karakteristika metalnih nanočestica u zavisnosti od njihove veličine i okruženja u kome se nalaze, se može dobiti kombinacijom Mie-teorije [105] apsorpcije metalnih čestica sa Drude-ovim modelom slobodnih elektrona [87,106]. Drude-ov model slobodnih elektrona je najčešće korišćen model koji objašnjava ponašanje provodnih elektrona u metalu. Prema ovom modelu metalnog stanja, provodni elektroni se tretiraju nezavisno od trodimenzionalne rešetke metalnih jona, krećući se slobodno u elektronskom gasu unutar rešetke jona koji predstavljaju centre rasejanja. Tako se kombinacijom ova dva modela, uz određene aproksimacije, može odrediti položaj plazmanskog pika sfernih čestica u zavisnosti od gustine elektrona u česticama i indeksa refrakcije sredine u kojoj se čestice nalaze i izračunati talasna dužina maksimalne apsorpcije sfernih čestica [95]. Kada su metalne nanočestice prekrivene tankim dielektričnim slojem (molekuli surfaktanta), dolazi do pomeranja plazmanskog pika čestica ka nižim frekvencijama, pa se u ovom slučaju može izračunati aproksimativna talasna dužina površinskog plazmona čestica. Pritom, pomeraj plazmanskog pika ka većim talasnim dužinama zavisi od debljine dielektričnog sloja.

Pored veličine čestica i sredine u kojoj se one nalaze i oblik čestica značajno utiče na promene u apsorpcionom spektru. Geometrija nanočestica određuje poziciju, broj i izgled pikova u apsorpcionom spektru [107]. Sa smanjenjem simetrije nanočestica,

uglavnom raste broj plazmonskih pikova u apsorpcionom spektru. Sa povećanjem dimenzije čestice duž jedne od osa plazmonski pik se deli na dva pika [108] i sa daljim porastom veličine čestice, raste energetska razlika između rezonantnih frekvencija ovih pikova [89-91]. Tako na primer, kod nanoštapića [109,110] u apsorpcionom spektru visokoenergetski - transverzalni pik, odgovara oscilacijama elektrona normalno na glavnu osu čestice, dok longitudinalni apsorpcioni pik, niže energije, nastaje usled oscilacija elektrona duž glavne ose, Slika 6.



Slika 6. Prikaz interakcije elektromagnetne radijacije sa metalnom nanosferom, pri čemu se indukuje dipol koji osciluje u fazi sa električnim poljem upadne svetlosti (a); shematski prikaz transverzalnih i longitudinalnih oscilacija elektrona u nanoštapićima [109,110], pod dejstvom spoljašnjeg polja [111] (b)

Pored Drude-ovog modela savremena teorija koristi model valentnih i provodnih traka, po kojem umesto diskretnih energija, kao u slučaju slobodnih atoma, dostupna energetska stanja formiraju trake. Najviša popunjena traka je nazvana valentnom, dok je najniža nepopunjena traka iznad valentne provodna, i samo elektroni koji se nalaze u njoj učestvuju u provodljivosti. Što je veća razlika u energiji između valentne i provodne trake manje je verovatno da će se elektroni naći u provodnoj traci, jer nemaju dovoljno

energije da bi prešli iz valentne u ovu traku. Kod metala, za razliku od poluprovodnika i izolatora nema razlike u energiji između valentne i provodne trake tj. one se preklapaju. Tako se valentni elektroni konstantno nalaze između ove dve trake i oni su delokalizovani, što ih čini odličnim provodnicima. Važan parametar u teoriji traka je Fermi-jev nivo – najviši dostupni energetski nivo elektrona na niskoj temperturi tj. najviša popunjena molekulska orbitala u valentnoj traci na 0 K. Pozicija Fermi-jevog nivoa u odnosu na provodnu traku je ključni faktor u određivanju električnih svojstava. Kod metala je Fermi-jev nivo poslednji popunjen nivo u provodnoj zoni. Na apsolutnoj nuli svi nivoi ispod Fermi-jevog su popunjeni elektronima a svi nivoi iznad njega su slobodni. Koncentracija elektronskog gasa u metalu je po redu veličine jednaka broju stanja u provodnoj zoni, a raspodela elektrona po stanjima se opisuje kvantnom Fermi-Dirac-ovom statistikom. Koncentracija elektrona takvog gasa praktično ne zavisi od temperature.

2.1.3 Sinteza nanočestica zlata

Razlog za široku upotrebu ovih čestica je i veliki broj razvijenih procedura za njihovo dobijanje, a sada je poznato da se pri sintezi metalnih nanočestica u izvesnom stepenu može kontrolisati i njihov oblik [112,113]. Tako se mogu dobiti različite nanostrukture zlata kao što su nanožice [114], nanocevi [115,116], nanoštapići [109,110], nanodiskovi [117], i drugi oblici kao što je račvast [118], planarni trouglast i šestougaoni oblik [119] i prizmatičan [120].

Generalno, nanočestice zlata se dobijaju u rastvoru i to najčešće redukcijom tetrahloroauratne(III) kiseline, HAuCl_4 , ili kalijum-tetrahloroaurata(III), KAuCl_4 . Nakon rastvaranja HAuCl_4 ili KAuCl_4 , u rastvor koji se brzo meša dodaje se redukujući agens pri čemu se Au^{3+} joni redukuju do neutralnih atoma zlata. Najčešće korišćena redukciona sredstva su natrijum-borhidrid, NaBH_4 (ili KBH_4) i citratni joni [121,122], a u literaturi je opisana i sinteza nanočestica zlata u prisustvu različitih aminokiselina [123-129], dok se neke od njih, kao što su triptofan, tirozin i asparaginska kiselina koriste kao redukujući agensi. Pritom se, da bi se sprečila agregacija čestica, u rastvor često dodaje stabilizujući agens [130] koji se adsorbuje na površini nanočestice. Pored toga, poznato je da se

nanočestice zlata mogu dobiti i biosintezom iz gljiva [131]. Nanočestice zlata mogu biti funkcionalizovane različitim organskim ligandima pri čemu se formiraju organsko-neorganski hibridi sa poboljšanom funkcionalnošću [132].

Turkewich-ev metod [133,134] je najjednostavniji metod sinteze nanočestica zlata, predložen 1951. god., koji je kasnije usavršen od strane G. Frens-a 1970. god. [135,136]. Uključuje reakciju male količine zagrejjane tetrahloroauratne(III) kiseline, HAuCl_4 , sa malim količinama rastvora natrijum-citrata. U toku formiranja koloidnog zlata citratni joni imaju ulogu redukcionog sredstva i stabilizatora koji formira zaštitni sloj adsorbovan direktno na površini nanočestica. Ova metoda se uglavnom koristi za dobijanje umereno monodisperznih sfernih nanočestica zlata suspendovanih u vodi, prečnika 10-20 nm. Smanjenjem količine natrijum-citrata se smanjuje i količina citratnih jona koja je dostupna za stabilizaciju čestica, što ima za posledicu agregaciju manjih čestica u veće pa tako i gubitak monodisperznosti i oblika. Rast čestica se nastavlja sve dok celokupna površina svih čestica ne postane dovoljno mala da bi bila prekrivena postojećim citratnim jonima. Otkriveno je i da se kao prelazni (kratkotrajni) intermedijer u Turkewich reakciji formira nanostrukturalna mreža oblika nanožica [114], i upravo su ove nanožice razlog zašto pri sintezi koloida zlata reakcioni rastvor najpre dobije tamno, skoro crno, obojenje a tek onda boja rastvora prelazi u rubin-crvenu [137].

Redukcija Au^{3+} natrijum-borhidridom, kao jakim redukcionim sredstvom, se odigrava brzo i dobijaju se čestice manjih veličina, na čijoj površini su adsorbovani boratni joni koji mogu da hidrolizuju, pa su često ove koloidne disperzije nestabilne. Kada se koristi ovako jako redukciono sredstvo veliki uticaj na krajnju distribuciju veličina čestica ima proces aglomeracije veoma malih čestica formiranih na početku reakcije [138,139]. S druge strane, redukcija trinatrijum-citratom, kao slabijim redukcionim sredstvom, je sporija i dobijaju se čestice većih dimenzija. Pritom citratni jon istovremeno i stabilizuje čestice zlata u toku njihovog formiranja i dobija se široka distribucija veličina čestica. Nakon hemijske redukcije jona zlata, formirani atomi zlata se spajaju dajući klastere. Klasteri reaguju sa zaostalim atomima metala formirajući nukleuse koji rastu do kritične veličine, formirajući stabilne čestice. Prva faza reakcije, kada se formira najveći broj nukleusa, ima odlučujući uticaj na krajnju veličinu čestica. Drugi važni momenat reakcije je, kada se pored rasta već postojećih nukleusa formiraju

novi, doprinoseći većoj polidisperznosti sistema. Polidisperznost sistema se može smanjiti u toku procesa rekristalizacije, tzv. Ostwald-ovog ukрупnjavanja. Korišćenjem ove dve metode redukcije Au³⁺ mogu se sintetizovati čestice širokog opsega veličina, što je veoma pogodno za dalja ispitivanja na njima.

Brust i Schiffrin su početkom devedesetih godina prošlog veka otkrili metodu za sintezu nanočestica zlata u organskim rastvorima koji su nemešljivi sa vodom (npr. toluen), nazvan Brust metod [130]. On uključuje reakciju u toluenu tetrahloroauratne(III) kiseline sa tetraoktilamonijum-bromidom (TOAB, [CH₃(CH₂)₇]₄NBr) kao površinski aktivnom supstancem-surfaktantom i natrijum-borhidridom kao redukujućim agensom. Pritom se dobijaju čestice veličine 5-6 nm [140]. Osim što ima stabilizujuće dejstvo, TOAB se ponaša i kao katalizator faznog transfera. On se ne vezuje jako za nanočestice zlata, tako da se u rastvoru javlja agregacija koja se odvija postepeno tokom dve nedelje. Da bi se ovo sprečilo može se dodati jači vezujućii agens kao što je tiol (alkil-tiol), koji će se vezati za zlato, dajući stabilniji rastvor. Nanočestice zlata zaštićene alkil-tiolima mogu biti staložene i onda ponovo ratvorene. Deo površinski aktivne supstance (reagensa faznog transfera) može ostati vezan za prečišćene čestice, što može da utiče na fizička svojstva kao što je rastvorljivost. Da bi se uklonilo što je više moguće ovog agensa, nanočestice se moraju dalje prečišćavati Soxhlet-ovom ekstrakcijom.

Kod Perrault-ove metode, koju su otkrili Perrault i Chan 2009. god. [141], za redukciju HAuCl₄ u vodenom rastvoru koji sadrži zasejane nanočestice zlata (najčešće dobijene citratnom metodom) se koristi hidrohionon. Ovakav način sinteze je sličan metodi korišćenoj za razvijanje fotografskog filma, u kojem zrna srebra koja se nalaze u samom filmu rastu dodatkom redukovanog srebra na njihovu površinu. Na sličan način, nanočestice zlata u konjukciji sa hidrohiononom mogu katalizovati redukciju jona zlata na njihovoj površini. Prisustvo stabilizatora, kao što je citrat rezultuje u kontrolisanom rastu čestica. Ovaj metod je komplementaran sa Frens metodom [135,136] jer proširuje opseg veličina monodisperznih sfernih čestica koje se mogu dobiti. Dok je Frens-ova metoda idealna za sintezu čestica veličine 12-20 nm, ovom metodom se mogu dobiti čestice u opsegu 30-250 nm.

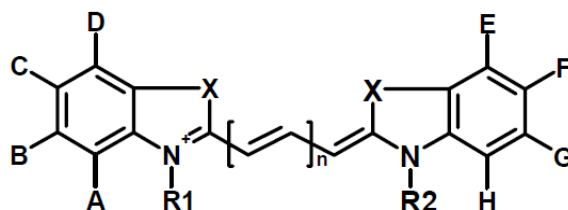
Nanočestice zlata se mogu dobiti i sonolizom, redukcijom izazvanom ultrazvukom [142,143]. Tako npr., pri reakciji vodenog rastvora HAuCl_4 sa glukozom, redukujući agensi su hidroksil-radikali i radikali dobijeni pirolizom šećera, a dobija se oblik nanotraka širine 30-50 nm i dužine nekoliko mikrometara [143]. Ove trake su veoma fleksibilne i mogu se saviti za ugao veći od 90° . Ukoliko se glukoza zameni ciklodekstrinom (oligomer glukoze) dobijaju se samo sferne nanočestice zlata što ukazuje da je glukoza esencijalna u dirigovanju morfologije za dobijanje trakastog oblika.

Poznata je fotohemijaska-laserska sinteza nanočestica zlata redukcijom HAuCl_4 u mikroemulzijama [144], kontrolisanim hemijskim redukcijama [145,146], kombinacijom procesa uklanjanja (depozicije)/taloženja [147] i hemijskom redukcijom u mikroheterogenim sistemima [148].

2.2 Cijanske boje

2.2.1 Struktura i karakteristike cijanskih boja

Cijanske boje su organska jedinjenja koja imaju intenzivnu apsorpciju u vidljivoj oblasti, a u obliku monomera i agregata su jako fluorescentna, i u rastvoru i u uređenoj sredini [16,25,26,149]. Ova jedinjenja, čija je opšta struktura prikazana na Shemi 1, su od velikog interesa, i sa stanovišta nauke i u praktičnom smislu.

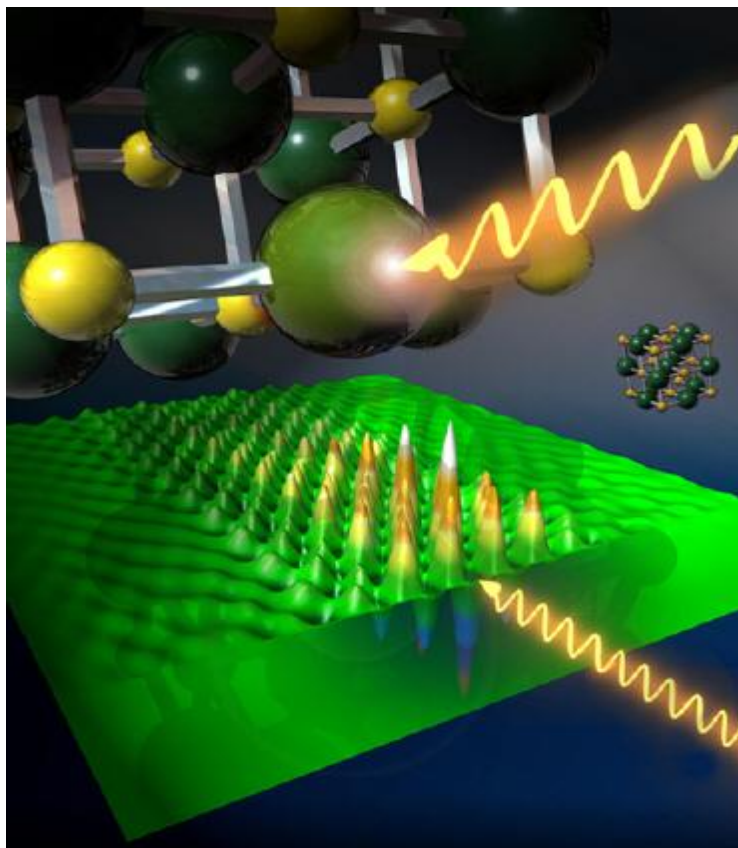


Shema 1. Opšta struktura cijanskih boja; oznake A-H predstavljaju vodonične atome ili funkcionalnu grupu (npr. SO_3H), $\text{X} = \text{S}$ ili $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{O}$, $\text{R} =$ alkil-grupa, $n = 1-3$

Poznato je da se molekuli boje u obliku monomera adsorbuju horizontalno na površinu nanočestice [31], sa maksimalnom interakcijom između boje i površine nanočestica. Ove boje mogu da se same organizuju formirajući agregate kao što su dimeri, H- i J- agregati [2,150], koji se sastoje od nekoliko hiljada monomera boje. Fenomen J-agregacije je 1936. godine otkrio E.E. Jelley [151], pa odatle „J“ iz naziva J-agregat. Nezavisno od njega G. Scheibe je 1937. objavio publikaciju o J-agregatima, pa se nekada ovi agregati po njemu nazivaju i Scheibe agregati [152]. H- i J-agregati su strukture (agregati) molekula boje slični polimerima, sa velikom snagom oscilacija i uskom, intenzivnom ekscitonskom apsorpcionom trakom, koja je u odnosu na karakteristične apsorpcione trake monomera boje pomerena (hipsohromno = H) ka plavoj oblasti (H-agregati) ili (batohromno) ka crvenoj oblasti (J-agregati).

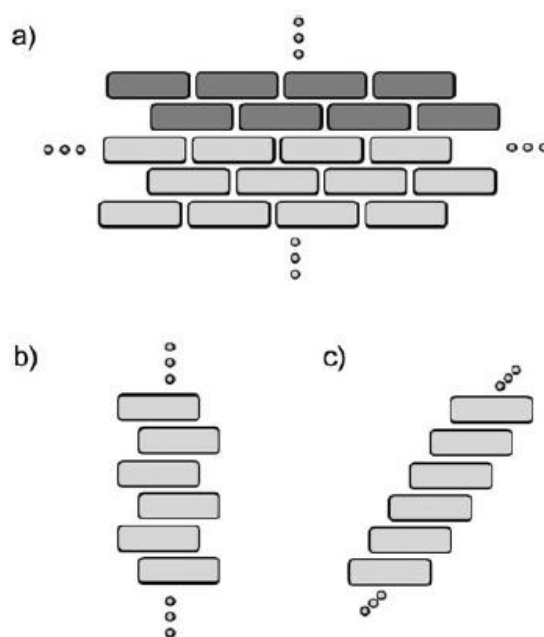
Koncept ekscitona je 1931. godine prvi put postavio Jakov Frenkel [153], kada je opisao ekscitaciju atoma u rešetki izolatora. On je predložio da pobuđeno stanje može da „putuje“ kroz rešetku bez transfera naelektrisanja. Tako, kada poluprovodnik

apsorbuje foton, elektron prelazi iz valentne u provodnu traku. Kao posledica ovoga ostaje pozitivno naelektrisanu šupljina (pojam kojim se opisuje položaj odakle je elektron izmešten), koja Coulomb-ovim silama privlači elektron iz provodne trake, pri čemu eksciton predstavlja vezano stanje elektrona i šupljine koji se privlače Coulomb-ovim silama. Ovo privlačenje omogućava stabilizujući energetski balans. Pritom eksciton ima malo nižu energiju od nevezanog elektrona i šupljine. Elektron i šupljina mogu imati paralelne ili anti-paralelne spinove. Ovi spinovi se kupuju interakcijom izmene, što ekscitonu daje finu strukturu. Mera uticaja električnog polja na sredinu u kojoj se nalazi i obrnuto se opisuje dielektričnom konstantom. Ona praktično predstavlja mogućnost same sredine da se polarizuje pod uticajem polja i tako pojača/smanji ukupno električno polje ili najčešće ostane polarizovana i kada više nije pod uticajem polja. U materijalima sa malom vrednošću dielektrične konstante Coulomb-ova interakcija između elektrona i šupljine može biti jaka i tada ekscitoni teže da budu mali, istog reda veličine kao jedinična ćelija. Molekulski ekscitoni mogu biti potpuno lokalizovani na istom molekulu, kao što je to slučaj kod fulerena. Frenkel-ov eksciton ima energiju vezivanja 0,1-1 eV, a ovi ekscitoni su tipični kod kristalnih halogenida alkalnih metala i aromatičnih organskih molekula. Na Slici 7 je prikazana vremenska zavisnost unutrašnje strukture kod ekscitonskog transfera naelektrisanja u LiF.



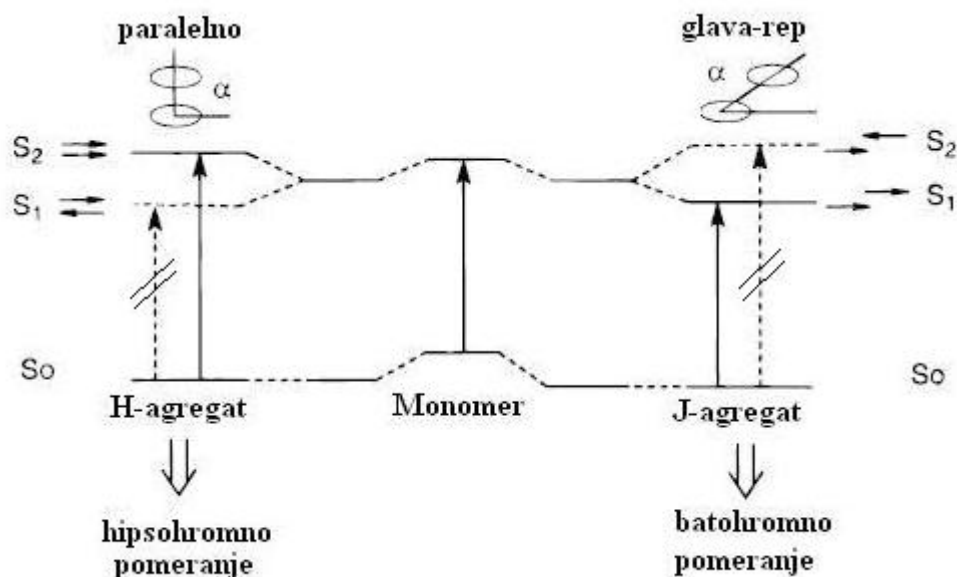
Slika 7. Vremenska zavisnost unutrašnje strukture kod ekscitonskog transfera naelektrisanja u LiF, stvorenog idealizovanim tačkastim izvorom (predstavljeno talasastim linijama). Odsustvo značajnih strukturnih promena ukazuje da je relativno kretanje elektrona i šupljine zamrznuto, što ukazuje da je ovo Frenkel-ov eksciton [154].

Formiranje H- ili J-agregata zavisi od toga da li su molekuli spakovani tj. naslagani paralelno (*engl.* plane to plane stacking) u strukturu sličnu sendviču ili su poredani kao cigle u orijentaciji glava-rep (*engl.* end to end stacking) [2] (Slika 8 (a)).



Slika 8. Prikaz mogućih rasporeda molekula boje u J-agregatima: ciglasta (a), lestvičasta (b) i stepeničasta struktura (c). Svaki pravougaonik predstavlja konturu monomera molekula boje, pri čemu je (a) najverovatniji raspored molekula monomera boje u J-agregatu [155]

Pomeranje ekscitonske apsorpcione trake u plavu (H-agregati) ili crvenu (J-agregati) oblast u odnosu na apsorpcionu traku monomera boje, se objašnjava teorijom kuplovanja molekulskih ekscitona tj. kuplovanjem prelaznih momenata molekula boje koji čine agregat, pa se tako može predvideti položaj pika trake polimera. Franck i Teller [156] su приметili sličnost ovakvih ekscitona sa Frenkel-ovom ekscitacijom predloženom za molekulске kristale. Prema ekscitonskoj teoriji molekul boje se posmatra kao tačkasti dipol i ekscitonsko stanje agregata boje se razdvaja na dva nivoa kroz interakciju sa prelaznim dipolima (Slika 9).



Slika 9. Prikaz odnosa rasporeda energetskih nivoa i prelaza kod hromofore i spektralnog pomeranja, zasnovan na molekularnoj ekscitonskoj teoriji

Da bi prelaz bio dozvoljen, prelazni momenat mora biti veći od nule. Kod H-agregata je karakterističan prelaz iz osnovnog u više stanje (S_2) i tada su prelazni momenti orijentisani paralelno, što vodi ka hipsokromnom pomeranju (Slika 9). Prelaz iz osnovnog u niže stanje (S_1) je karakterističan za J-agregate, pri čemu su prelazni momenti orijentisani pod pravim uglom, što vodi ka batohromnom pomeranju (Slika 9). Važno je napomenuti da ova teorija važi samo u slučaju kada je interakcija između orbitala sastavnih molekula zanemarljiva.

Razliku između J- i H- agregata je opisao Yao H. sa saradnicima [157], pokazavši da strukturne razlike između ovih agregata utiču na njihova različita optička svojstva. Razlike u strukturi potiču od različitih kliznih uglova kod naslaganih molekula tj. uglova između duže ose (linije koja prolazi kroz centar agregata ili paralelno sa njim) i one koja prolazi kroz bilo koji od paralelno naslaganih molekula (ugao α na Slici 9). Kada su molekuli (ili hromofore) složeni paralelno, prema ekscitonskoj teoriji formiraju se dve nove ekscitonske trake, jedna sa višom i jedna sa nižom energijom (na većoj talasnoj dužini) od energetskog nivoa monomera (Slika 9), pri čemu je kod H-agregata niže stanje stabilnije. Prema tome, prelaz sa ekscitovanog na osnovno stanje je veoma brz i većina energije se gubi neradijativnim putem kao što je termalni. Zbog toga H-agregati

imaju veoma malu fluorescenciju, koju je regularnim tehnikama teško meriti, dok je Stokes-ov pomeraj [158] veliki. Kod J-agregata, dozvoljeni su prelazi samo u niža energetska stanja i kao posledica toga, dolazi do malog Stokes-ovog pomeraja, a fluorescencija je izražena u mnogo većoj meri. Iz tog razloga se, za ispitivanje dinamičkih procesa kod J-agregata kao metoda široko koristi fluorescentna mikroskopija. Kod J-agregata radijativno vreme života ekscitona se povećava sa temperaturom [159] i pri visokim temperaturama dostiže vreme života monomera. Ovaj kooperativni emisijski fenomen je karakteristika superradijacije [160,161] (povećani efekat radijacije), pri čemu se simultano sa koherentnom emisijom agregata odigrava i emisija monomera [161]. Iako generalno pokazuju malu fluorescenciju, efekat superradijacije se može uočiti i kod H-agregata molekula boje oblika nano-štapića, što je opisao Meinardi sa saradnicima [162]. Kod nekih boja, kao što je pseudoizocijanska boja koju je ispitivao Yao H. [157], moguće je da se formiraju i H- i J-agregati, pri čemu sa povećanjem koncentracije boje raste udeo J-agregata na račun H- agregata.

J-agregacija je bila predmet brojnih ispitivanja izvedenih sa cijanskim bojama različitih struktura u rastvorima, u prisustvu soli, molekula proteina, površinski aktivnih supstanci (surfaktanata), polimera, metalnih jona i nanočestica [18-20]. Poznato je da J-agregaciju cijanskih boja u prisustvu makromolekula proteina karakteriše kooperativan mehanizam vezivanja, sa velikim brojem vezivnih mesta koja su karakteristična za svaki pojedinačni sistem boja/protein [21,22]. Izvestan broj istraživanja je bio fokusiran na ispitivanja samo-organizovanja cijanskih boja na površini naelektrisanih polimera, pri čemu su bili diskutovani kinetički aspekti procesa agregacije [23,24]. Dobro je poznato da, dodatak metalnih jona u rastvor cijanske boje može rezultovati u formiranju J-agregata [25,26]. Adsorpcija molekula boje na različitim površinama u smislu proučavanja fotofizičkih i fotohemijskih procesa je doprinela razjašnjavanju kinetike adsorpcije i proceni efekata dužine lanca alkil-grupa [163]. Za razliku od velikog broja ispitivanja spektroskopskih karakteristika J-agregata, luminiscentne i nelinearne optičke karakteristike ovih agregata, kao i kinetika u rastvoru su bili predmet mnogo manjeg broja publikacija [164-168].

2.2.2 Agregati cijanskih boja u prisustvu metalnih nanočestica

Nekoliko istraživačkih grupa je ispitivalo formiranje hibrida J-agregata u prisustvu metalnih nanočestica. Formiranje J-agregata na površini koloidnih čestica plemenitih metala (Au i Ag), dobijenih redukcijom metalnih jona u vodenim rastvorima NaAuCl₄ i AgNO₃ sa sveže pripremljenim rastvorom NaBH₄, je prvi put opisao Kometani sa saradnicima, koristeći negativno naelektrisanu tiocijansku boju, TC (5,5'-disulfopropil 3,3'-dihlortiocijanska so natrijuma tj. natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil)benzotiazol-2(3H)iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1 sulfonat, Slika 16) [12]. Druga istraživanja koja su se bavila ispitivanjem mehanizma formiranja ovih hibrida uključuju i rad koji je objavio Zhong sa saradnicima [76], gde je pokazano da pozitivno naelektrisane indolne cijanske boje formiraju J-agregate u prisustvu nanočestica zlata sa adsorbovanim citratnim jonima, a da do formiranja J-agregata ne dolazi u slučaju negativno naelektrisanih i neutralnih boja. Objašnjenje koje je dao Zhong je da su u prvom slučaju elektrostatičke interakcije ključni faktor za formiranje J-agregata, ali je izveden zaključak da i druge molekulske interakcije, kao što su π - π interakcije između susednih molekula boje, doprinose formiranju J-agregata. Menéndez sa saradnicima je [169] ispitujući samo-organizovanje J-agregata pozitivno naelektrisane tiocijanske boje na površini nanočestica zlata sa adsorbovanim citratnim jonima izveo zaključak da π - π interakcije između susednih molekula boje stabilizuju formiranje J-agregata na površini nanočestica ali i da postoji i Au-S interakcija sa sumporom iz -SH grupe. Metalni hibridi nanočestica/boja mogu biti kovalentno vezani, kao što je lizamin vezan za Au tioetarskom grupom [17]. Osim toga, postoji klasa metal/boja hibrida, gde je boja u formi H-agregata vezana elektrostatičkim interakcijama za metalne nanočestice. Kamat i saradnici su izveli ispitivanja katjonskih rodaminskih 6G H-agregata na negativno naelektrisanom metalnom oksidu i na površinama Au koloidnih čestica [170,171]. Čestice Ag sa adsorbovanim rodaminom 6G su takođe dale apsorpcione trake koje su pomerene u plavu oblast i koje su karakteristične za formiranje H-agregata [172].

Ghosh sa saradnicima je opisao uticaj veličine nanočestica na formiranje J-agregata eozina (derivat fluoresceina) na površini fotohemijski pripremljenih nanočestica

Au [173]. Ispitivanja apsorpcije i spektralnih karakteristika nekih cijanskih boja na nanočesticama zlata su otkrila da su manje čestice stimulisale J-agregaciju na površini metalne čestice, dok veće čestice nisu indukovale bilo kakvu vrstu agregacije [12,76,77].

Međutim, uprkos značajnom interesovanju za ove materijale, još uvek nedostaje detaljno razumevanje fizičkih procesa koji određuju samo-organizovanje J-agregata negativno naelektrisane cijanske boje na negativno naelektrisanom površini koloidnih čestica metala. Veruje se da se sposobnost boje da formira agregate na površini ovakvih koloidnih čestica oslanja prvenstveno na elektrostatičko privlačenje između jonskih molekulskih gradivnih blokova agregata i naelektrisanih koloida [76]. Na ovaj način, iako je koncentracija molekula boje u rastvoru previše niska da bi se formirao agregat, koncentracija u blizini površine naelektrisanih koloida je nekoliko redova veličine veća. Osim toga, zbog nedostatka kovalentnog vezivanja između molekula boje i površine metala omogućeno je da molekuli boje na površini nanočestica budu dovoljno pokretni da bi mogli da se pregrupišu i samo-organizuju u strukturu po obliku (kalupu) sličnu ređanju cigli kod zidanja, koja omogućava da dođe do intermolekulskog elektronskog kuplovanja koje je neophodno za formiranje ekscitona J-agregata.

Kada se za pripremanje hibridnih struktura sa TC bojom koriste nanočestice Au sintetizovane sa NaBH_4 kao redukcionim sredstvom [12,77], onda treba uzeti u obzir da se na površini ovih čestica nalaze adsorbovani $\text{B}(\text{OH})_4^-$ joni [174], čineći ih negativno naelektrisanim, što se potvrđuje merenjem zeta potencijala. S druge strane, TC boja je, sama po sebi, takođe negativno naelektrisana jer ima dve sulfo-grupe (Slika 16). Prema tome, da bi tiocijanske boje bile elektrostatički privučene na površinu koloida, najverovatnije je da molekuli boje koriste parcijalno pozitivno naelektrisan sumpor iz tiazolnog prstena, kao što je to opisano na sličnom sistemu u radu koji su objavili Jeunieu i saradnici [78]. Sato i saradnici [10] su objasnili interakciju između negativno naelektrisanih nanodiskova Ag (sintetizovanih fotoindukcijom) i slične tiocijanske boje koja je takođe negativno naelektrisana, elektrostatičkim privlačenjem usled parcijalno pozitivnog naelektrisanja na hromofori.

Ispitan je i model J-agregata TC boje na površinama Ag [1,77] i Au [77] koloida pri čemu je izvedeno detaljno fotofizičko ispitivanje. Prvobitno je bila zapažena pojava ekscitonske trake J-agregata, koja je jako zavisna od vrste-sastava nanočestica. Tako je u

slučaju nanočestica Ag sa adsorbovanom bojom u UV-Vis spektru, bila uočena ekscitonska traka J-agregata traka u formi pika. S druge strane, prisustvo J-agregata TC boje na nanočesticama Au je dalo oštar apsorpcioni *minimum* blizu rezonancije ekscitona [1,12,77]. Razlog za ovakvo ponašanje su razlike u kuplovanju ekscitona J-agregata TC boje i polarizacija na Au i Ag nanočesticama [1]. Preciznije, neradijativna relaksacija se dešava kroz ekscitaciju parova elektron-šupljina, ili unutar provodne trake (*engl.* intraband excitation) ili između *d* trake i provodne trake (*engl.* interband excitation). Na talasnoj dužini od 475 nm polarizaciono kuplovanje sa Ag uključuje samo doprinos „inraband“ prelaza od površinskog plazmona metalnog jezgra, dok polarizaciono kuplovanje sa Au uključuje doprinose polarizacija dobijenih i iz „interband“ (inter) i „inraband“ (intra) prelaza. U slučaju Au, prisustvo dodatnog „interband“ člana vodi ka destruktivnoj interferenciji između ekscitonske i plazmonske polarizacije i ka većoj transparentnosti (kad svetlost prolazi bez difuzije i distorzije, slobodan prolaz elektromagnetne radijacije) na rezonanciji ekscitona. Pošto ovaj minimum nestaje kroz fotoekscitaciju, jedna od mogućih primena za takav sistem je u vidu optičke opreme za ultrabrzo optičko limitiranje [27,28].

Ranije su bila izvedena ispitivanja gde je praćeno formiranje ekscitona kod J-agregata nekih tiocijanskih boja u rastvoru u prisustvu različitih soli [79] kao i porfirinske (cijanske) boje na površini proteina [80]. Međutim, koliko je nama poznato, do sada nisu bila izvedena kinetička ispitivanja J-agregacije na sistemima koji se sastoje od hibridne metalne nanočestice i organske boje. U tom smislu, da bi se nastavilo sa iskorišćavanjem i usavršavanjem neobičnih optičkih karakteristika ovakvih hibridnih sistema neophodna su dalja detaljnija ispitivanja.

2.3 Kinetika i mehanizam reakcije nanočestica zlata sa TC bojom

2.3.1 Kinetika reakcije nanočestica zlata sa TC bojom

2.3.1.1 Eksponencijalna funkcija drugog reda

Poznato je da se složene hemijske reakcije sastoje iz više elementarnih. Iako je broj mogućih kombinacija elementarnih reakcija veoma veliki, složene reakcije se mogu podeliti u nekoliko osnovnih tipova: paralelne, povratne, konsekutivne i lančane. Poznavanje načina odvijanja ovih osnovnih tipova pruža mogućnost analize i razumevanja vremenske evolucije kompleksnijih sistema.

Kod konsekutivnih reakcija proizvod jedne reakcije postaje reaktant druge. Taj prvi proizvod, B, je intermedijer, koji je termodinamički nestabilan. Njegova koncentracija u rastvoru je mala i veoma sporo opada, pa se kao takva često kod daljih matematičkih izračunavanja i aproksimacija uzima da je konstantna, tj. $\frac{d[B]}{dt} = 0$.

Reakcija najjednostavnijeg tipa je u slučaju dve konsekutivne reakcije prvog reda:



Zakoni brzine po komponentama su:

$$\frac{dA}{dt} = -k_1 A \quad (2)$$

$$\frac{dB}{dt} = k_1 A - k_2 B \quad (3)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_2 B \quad (4)$$

Ako su rešene diferencijalne jednačine za A i B, zakon održanja mase, $A_0 = A + B + C$, pruža mogućnost određivanja C.

Iz jednačine prvog reda, za A se lako dobija da je rešenje: $A = A_0 e^{-k_1 t}$.

Kinetička jednačina za B tada postaje:

$$\frac{dB}{dt} = k_1 A_0 e^{-k_1 t} - k_2 B \quad (5)$$

koja je oblika $y' + Py = Q$, gde je $Q = k_1 A_0 e^{-k_1 t}$, $P = k_2$,

Rešenje ove linearne diferencijalne jednačine je:

$$y = e^{-\int P dx} \left(C + \int Q e^{\int P dx} dx \right) \quad (6)$$

Iz početnih uslova za $t=0$, $y=0$ (odnosno intermedijer $B=0$) lako se može dobiti integraciona konstanta, C.

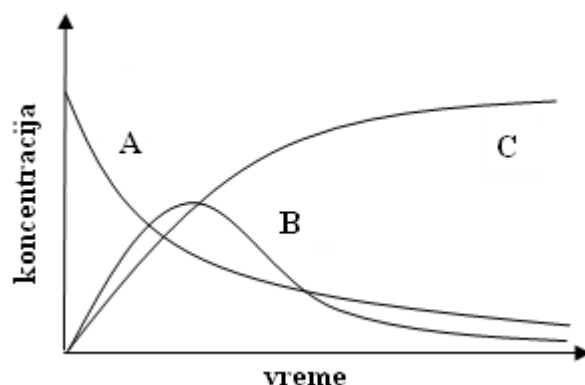
Prema tome rešenje za B (tj. y) je:

$$B = \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (7)$$

odnosno za C:

$$C = A_0 - A - B = A_0 \left(1 + \frac{1}{k_2 - k_1} (k_1 e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \right) \quad (8)$$

Promena koncentracija komponenti kod konsektivnih reakcija sa vremenom, za slučaj kada je $k_1 \gg k_2$, prikazana je na Slici 10.



Slika 10. Promena koncentracija komponenti sa vremenom kod konsektivnih reakcija

Iz prethodnih jednačina dobijamo da je:

$$A = A_0 e^{-k_1 t} + \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) + A_0 \left(1 + \frac{1}{k_2 - k_1} (k_1 e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \right) \quad (9)$$

Tako se jedn. (9) uz odgovarajuće matematičke aproksimacije [175] može predstaviti kao:

$$A = A_0 + A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} \quad (10)$$

Kod konsektivnih reakcija važna karakteristika je da posle određenog vremena reakcije koncentracija intermedijera B dostiže maksimum, koji je za slučaj kad je $k_1 \gg k_2$ (Slika 10) približno jednak početnoj koncentraciji A a zatim opada do nule.

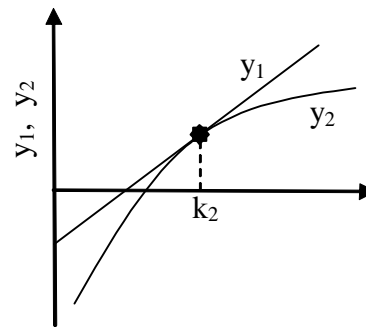
S druge strane, pošto B može biti važan intermedijer bitno je izračunati vreme postizanja maksimalne koncentracije B (odnosno položaj maksimuma). Pošto je u maksimumu funkcije prvi izvod nula, sledi da je:

$$\begin{aligned} \frac{dB}{dt} = 0 &\Rightarrow \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} (k_1 e^{-k_1 t_{\max}} - k_2 e^{-k_2 t_{\max}}) = 0 \Rightarrow (k_1 e^{-k_1 t_{\max}} - k_2 e^{-k_2 t_{\max}}) = 0 \\ &\Rightarrow t_{\max} = \frac{\ln \frac{k_2}{k_1}}{k_2 - k_1} \end{aligned} \quad (11)$$

Ukoliko je unapred poznato da se proces odvija po mehanizmu $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$, drugi deo problema je određivanje konstanti brzina. Za ovu svrhu potrebno je pratiti A i B. Pošto se A menja kao $A = A_0 e^{-k_1 t}$, konstanta brzine k_1 se lako dobija iz zavisnosti $\ln A = f(t)$. Zatim se, iz t_{\max} može odrediti konstanta brzine k_2 .

Iako je ovo funkcija samo od k_2 (k_1 je već određeno), jednačinu je moguće rešiti samo grafički (Slika 11) uvođenjem pomoćnih funkcija $y_1 = f(k_2)$ i $y_2 = f(k_2)$:

$$\underbrace{t_{\max} (k_2 - k_1)}_{y_1 = f(k_2)} = \underbrace{\ln k_2 / k_1}_{y_2 = f(k_2)}$$



Slika 11. Grafički prikaz linearne i logaritamske funkcije od konstante brzine k_2

Pritom je y_1 linearna funkcija od k_2 a y_2 logaritamska. U tački preseka ovih funkcija dobija se k_2 .

U slučaju da se lako mogu meriti komponente B i C primenjuje se alternativni način određivanja konstanti brzina:

$$\frac{dC}{dt} = k_2 B \Rightarrow C_{t_1} - C_0 = k_2 \int_0^{t_1} B dt \quad (12)$$

Pošto $\int_0^{t_1} B dt$ predstavlja površinu ispod krive $B=f(t)$ do momenta t_1 u kome je

takođe određeno i C_{t_1} , onda sledi da je:

$$k_2 = \frac{C_{t1} - C_0}{\int_0^{t1} B dt} \quad (13)$$

Kod kompleksnijih mehanizama koji npr. sadrže veći broj povratnih, konsektivnih i paralelnih reakcija, dobijanje analitičkog matematičkog rešenja može biti veoma komplikovano i tada je zavisnost koncentracija od vremena (odnosno rešavanje diferencijalnih jednačina) moguće dobiti samo numeričkim putem pomoću kompjuterskih metoda [176,177] .

Eksponencijalna funkcija drugog reda ima primenu u teoriji brojeva [178-180], fizici [181], teorijskoj biologiji [182] i kod tumačenja kompleksnih algoritama [183,184]. Pored toga eksponencijalna funkcija drugog reda je korišćena za ispitivanje različitih kinetika, kao što su kinetika heterogene i enzimske katalize [185], adsorpcije [186], interpolimernih kompleksa [187], termo-indukovanih prelaza u micelarnim sistemima [188], fluorescencije kod polimernih koloida [189], kinetika odgovora pH senzora zasnovanog na koloidnom templatu [190] itd.

2.3.1.1 a) „Stretched“ eksponencijalna i sigmoidna funkcija

„Stretched“ eksponencijalnu empirijsku funkciju je uveo Rudolph Kohlrausch (1809–1858), kada je 1854. godine pomoću nje opisao vremensku zavisnost pražnjenja kondenzatora [191], nakon što je zaključio da je jednostavna eksponencijalna vremenska zavisnost u ovom slučaju bila neadekvatna [191]. Iz tog razloga ova funkcija se često naziva i Kohlrausch funkcija [192], jedn. (14).

$$\varphi(t) = e^{-(t/\tau)^\beta} \quad (14)$$

$\varphi(t)$ je linearna funkcija karakteristična za sistem koji se izvodi iz ravnoteže nakon iznenadnog uklanjanja neke perturbacije. Step en odstupanja od eksponencijalne funkcije je opisan sa „stretching“ parametrom β , pri čemu je $0 < \beta \leq 1$. U graničnom slučaju, kada je $\beta = 1$, to je eksponencijalna funkcija sa jednom vremenskom konstantom.

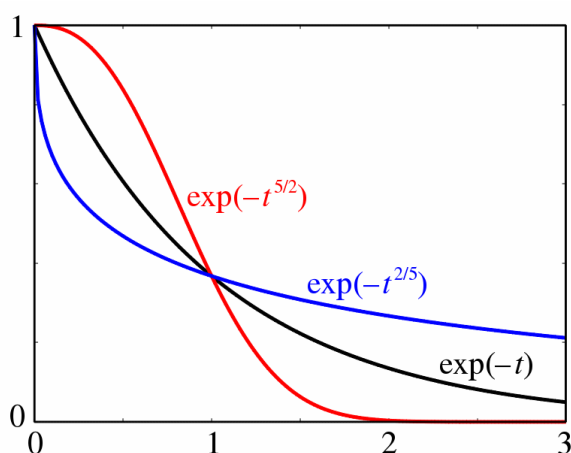
Kada je vrednost $\beta < 1$ šira (veća) je distribucija vremenskih konstanti i tada je grafik zavisnosti $\varphi(t)$ od $\log(t)$ karakteristično rastegnut („stretched“). Kada je β blizu vrednosti 1, to ukazuje na usku distribuciju vremenskih konstanti, tj. kada je $\beta > 1$ tada je eksponencijalna funkcija sužena-komprimovana i ima manji praktični značaj. Izuzetak je kada je $\beta = 2$, čime se dobija normalna distribucija. Parametar t ima vrednost između 0 i $+\infty$, τ je parametar sa dimenzijama vremena, a $1/\tau$ predstavlja brzinu relaksacije.

Iako empirijska, ova funkcija je veoma korisna za opisivanje vremenski zavisnih procesa, koji su eksponencijalni ali se dešavaju u kompleksnim sistemima u kojima distribucija lokalnih okruženja utiče na povećanje distribucije vremenskih konstanti. Rezultat ovakve distribucije vremenskih konstanti je brži odgovor od eksponencijalnog na početku procesa (za vremena pre vremenske konstante τ) i sporiji odgovor od eksponencijalnog za kasniju fazu u procesu (za vremena posle vremenske konstante τ). Tako je u slučaju „stretched“ eksponencijalne funkcije [192], u zavisnosti od vrednosti β potrebno duže vreme za dostizanje ravnoteže nego što je to kod eksponencijalne funkcije. Zschieschang sa saradnicima je poredio eksponencijalnu i „stretched“ eksponencijalnu funkciju za fitovanje vremenski zavisne promene napona kod tranzistora [193].

Za ponovno otkrivanje „stretched“ eksponencijalne relaksacione funkcije bili su zaslužni Williams i Watts, koji su 1970. godine primenili Fourier-ovu transformaciju ove funkcije i uveli je u polje dielektrika [194], pa se u literaturi u ovom kontekstu često i ova dva imena pripisuju uz Kohlrausch-a. Iz tog razloga se ovaj zakon često nalazi kao KWW (Kohlrausch-Williams-Watts) zakon, posebno kada se odnosi na luminiscenciju, mada je u ovom polju „stretched“ eksponencijalna funkcija već dugo bila korišćena kod objašnjavanja energetskog transfera [195].

Kod proučavanja relaksacije kompleksnih sistema, „stretched“ eksponencijalna funkcija, kao čisto empirijski zakon, se često koristi. U oblasti molekulske luminiscencije, jednačina (14) ima čvrste osnove za nekoliko modela gašenja fluorescencije, kao što su kontaktno gašenje fluorescencije kontrolisano difuzijom [196], gde je $\beta = 1/2$, i rezonantni transfer energije bez difuzije, dipol-dipol mehanizmom, sa $\beta = 1/6$, $1/3$ i $1/2$ za jednodimenzionalne, dvodimenzionalne i trodimenzionalne (1D, 2D i 3D) sisteme

[195], redom. Druge racionalne vrednosti za „stretching“ eksponent, β , su dobijene za različite multipolne interakcije, npr. gde je $\beta = 3/8$ i $3/10$ za dipol-kvadrupol i kvadrupol-kvadrupol mehanizme u tri dimenzije [197,198]. U aproksimaciji koju je izveo Huber, transport energije kao mera anizotropije fluorescencije pokazuje istu vremensku zavisnost kao direktni energetski transfer [199-201] i okarakterisan je sa istim vrednostima „stretching“ koeficijenta β . Na Slici 12 je prikazan izgled „stretched“ eksponencijalne funkcije kada je $\beta = 5/2, 2/5$ i 1 .



Slika 12. Prikaz „stretched“ eksponencijalne funkcije kada je $\beta = 5/2, 2/5$ i 1

Gašenje luminiscencije uz rezonantni energetski transfer kao i kinetika luminiscencije su takođe bili objašnjeni sa „stretched“ eksponencijalnom funkcijom [202,203], sa $\beta = d/s$, gde je d frakciona dimenzija, a s zavisi od mehanizma rezonantnog energetskog transfera, i ima vrednosti 6 za dipol-dipol, 8 za dipol-kvadrupol i 10 za kvadrupol-kvadrupol interakcije.

Rezonantni energetski transfer između donorskih i akceptorskih hromofora vezanih za lanac polimera je bio široko korišćen kao sredstvo za proučavanje strukture i dinamike polimera. Prema teoriji [204-211] kinetika gašenja luminiscencije donora i kinetika depolarizacije luminiscencije kod polimera pokazuju „stretched“ eksponencijalnu vremensku zavisnost, gde parametar β iz jedn. (14) zavisi od mehanizma rezonantnog

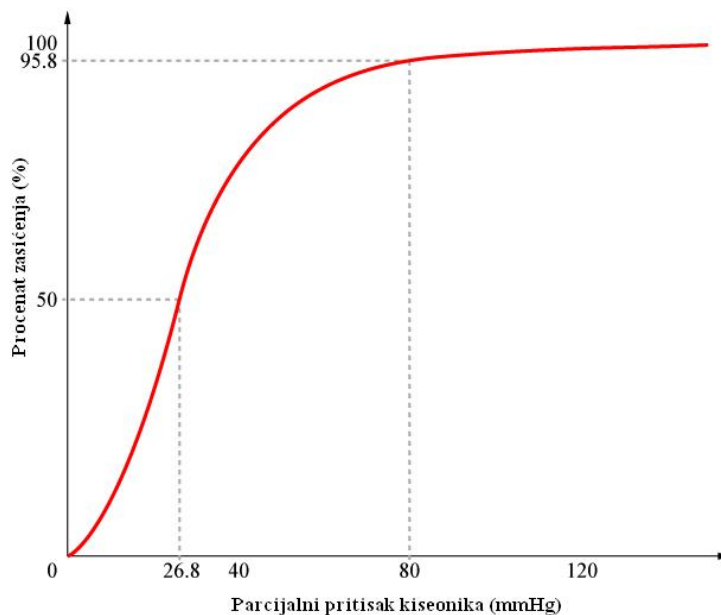
energetskog transfera, vrste vezane hromofore (na krajevima lanca polimera ili nasumice raspoređene duž lanca) i od konformacije posmatranog polimernog lanca.

„Stretched“ eksponencijalna funkcija je takođe bila primenjena i u slučaju luminiscencije koja se odnosi na neuređene [212] i uređene [213] neorganske čvrste sisteme kao i kod poluprovodnih nanoklastera [214]. Ova funkcija je veoma pogodna za fitovanje, čak i u odsustvu modela pod uslovom da je moguće jednostavno merenje devijacija od utvrđene (kanonske) eksponencijalne funkcije prvog reda kroz „stretching“ parametar β . „Stretching“ eksponenti su korišćeni npr. za analizu fluorescencije fluorofora inkorporiranih u sol-gel matrikse [215] i fluorofora kovalentno vezanih za površinu SiO₂ [216] ili Al₂O₃ [217]. „Stretched“ eksponencijalna funkcija je takođe bila korišćena kod analize fluorescencije DNA–EtBr kompleksa dispergovanih u polimeru [218] i kod fluorescentnih analiza u kompleksnim heterogenim biološkim uzorcima kao što su tkiva [219,220].

Iznenadujuće je da se veliki broj mikroskopskih mehanizama može tumačiti korišćenjem „stretched“ eksponencijalne relaksacione funkcije, iako poreklo ovakvog ponašanja nije u potpunosti razjašnjeno. Iz tog razloga su veoma značajna i interesantna tumačenja nekoliko autora [213,221-223] koji su razvili dinamičke modele ove relaksacione funkcije.

Sigmoidna kinetika za proizvod C je kompetitivna sa konsekutivnom reakcijom $A \longrightarrow B \longrightarrow C$. Međutim, u slučaju sigmoidne kinetike reaktant A opada eksponencijalno i u koraku $A \rightarrow B$ nije uključeno indukcijsko vreme (vreme indukcije).

Sigmoidna vremenska zavisnost je karakteristična za autokatalitičke procese kod hlorofila [224,225] i porfirina [166,225]. Jedan od najpoznatijih porfirina je hem, pigment eritrocita, koji je prostetička grupa proteina hemoglobina. Molekul hemoglobina može maksimalno da veže četiri molekula kiseonika i njegova kriva vezivanja ima sigmoidni („S“ oblik) oblik [226], Slika 13.



Slika 13. Sigmoidna kriva vezivanja kod hemoglobina: zavisnost procenta zasićenja (%) od parcijalnog pritiska kiseonika (mmHg)

Sigmoidalna kriva vezivanja može da se podeli u tri dela: pri niskim koncentracijama liganda stepen vezivanja se vrlo malo povećava sa porastom koncentracije liganda, srednji deo počinje u tački u kojoj pri malom porastu koncentracije liganada nastaje veliki porast u stepenu vezivanja, a završava se u tački u kojoj pri daljem povećavanju koncentracije liganada ne dolazi do povećanja stepena zasićenja. Ovakvo ponašanje odgovara kooperativnom ponašanju [226].

Sigmoidan tip zavisnosti je karakterističan za autokatalizu [227], kao i za autokatalitičku agregaciju. Za razliku od hlorofila [224,225] i porfirina [166,225], kod pseudoizocijanskih boja [165,166] nije karakteristično postojanje vremena indukcije. Primer tipične autokatalitičke reakcije opisane sigmoidnom kinetikom je predstavljen u publikaciji koju je objavio Chibisov sa saradnicima [79], gde je J-agregacija indukovana prisustvom soli katjona metala u različitim oksidacionim stanjima.

Veliki broj enzima funkcioniše tako da se njihova svojstva mogu proučavati korišćenjem Michaelis-Menten-ove jednačine [228]. Međutim, kinetika izvesnog broja enzima se ne može opisati ovakvim tipom jednačine i kod njih se brzina reakcije opisuje „S-oblikom“ sigmoidne krive (za razliku od krive tipa hiperbole karakteristične za većinu

enzima). Ovakav profil je karakterističan za enzime koji pokazuju pozitivnu kooperativnost kod vezivanja, gde je stepen kooperativnosti određen Hill-ovom jednačinom [229].

2.3.2 Efekat unutrašnjeg filtera i mehanizmi gašenja fluorescencije

2.3.2.1 Efekat unutrašnjeg filtera

Kada na talasnoj dužini na kojoj fluorofora emituje zračenje drugi molekul ili deo makromolekula apsorbuje svetlost, dolazi do efekta unutrašnjeg filtera (*engl.* inner filter effect). Ovaj efekat se objašnjava reapsorpcijom emisije od strane uzorka, pri čemu se deo fotona ili svi fotoni koji su emitovani od strane fluorofore ponovo apsorbuju. Slično se može desiti i pri visokim koncentracijama apsorbujućih molekula, kao i fluorofore. Rezultat ovog efekta je da intenzitet ekscitovane svetlosti nije konstantan kroz rastvor, tako da samo njen mali procenat dolazi do fluorofora koje su vidljive u sistemu za detekciju. Efekti unutrašnjeg filtera menjaju spektar i intenzitet emitovane svetlosti i prema tome se moraju uzeti u obzir kod analize fluorescentnog emisionog spektra [230,231]. Pošto i kod gašenja fluorescencije i kod efekta unutrašnjeg filtera dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije, treba obratiti posebnu pažnju na uzrok ove pojave da ne bi dolazilo do grešaka.

Smanjenje intenziteta fluorescencije zbog apsorpcije upadne svetlosti ili apsorpcije emitovane svetlosti se nekada zovu primarni i sekundarni efekat unutrašnjeg filtera [232,233]. Za korigovanje apsorpcije uzorka u većini procedura tipično se koriste i druge empirijske korekcije [234-237]. Bez obzira na to koji se „kvenčer“ (*engl.* quencher) – gasilac fluorescencije koristi, važno je utvrditi da li je efekat unutrašnjeg filtera u tom slučaju značajan ili ne. Ako jeste, obavezno je uraditi korekciju intenziteta fluorescencije. Aproksimativno je intenzitet korigovanog intenziteta fluorescencije (F_{corr}) dat jednačinom (15) [231]:

$$F_{corr} = F_{obs} \text{anti log} \left(\frac{OD_{ex} + OD_{em}}{2} \right) \quad (15)$$

gde je F_{obs} intenzitet fluorescencije posmatranog signala a OD (*engl.* optical density) optička gustina rastvora na talasnoj dužini ekscitacije i emisije. Ako se uzme u obzir i geometrija ćelije u kojoj se snima uzorak može se primeniti i drugačiji oblik ove jednačine [238,239].

Lu sa saradnicima je istraživao fluorescentno obeležene nanočestice zlata gde je primećen efekat unutrašnjeg filtera pri čemu je došlo do minimalnog gašenja fluorescencije fluorofore [240]. Poznati su i opisani u literaturi i drugi primeri smanjenja intenziteta fluorescencije fluorofore u prisustvu nanočestica zlata uz primenu korekcije za efekat unutrašnjeg filtera [241-243].

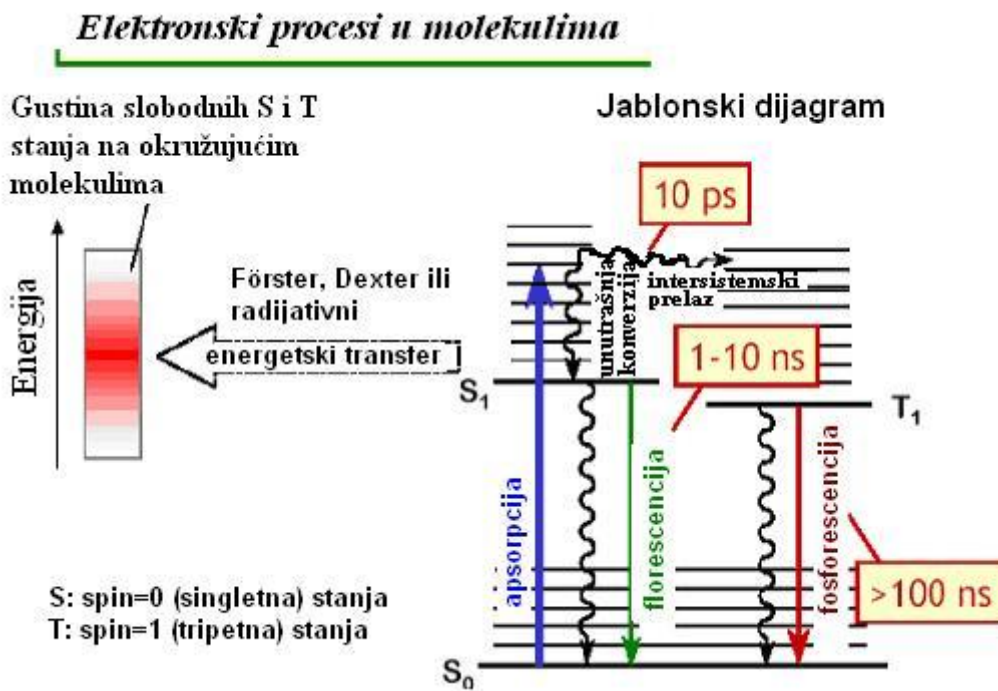
Međutim, u prisustvu nanočestica može doći i do obrnutog efekta tj. povećanja intenziteta fluorescencije fluorofore. To je slučaj kod adsorpcije molekula metil-oranža na površini nanočestica srebra koju je opisao Zhang sa saradnicima [244]. U ovom slučaju, istovremeno sa smanjenjem intenziteta fluorescencije jedne trake dolazi do povećanja intenziteta druge trake, što se objašnjava neradijativnim energetskim transferom. Pritom je apsorpcija slobodne boje, kao i kombinovanog sistema boja/nanočestica bliska Fermi-jevoj energiji čestica srebra, čije se rezonantne trake preklapaju sa trakama donora i akceptora [244]. Postoje i drugi primeri opisani u literaturi, gde je u prisustvu nanočestica srebra [245] ili zlata (uglavnom većih od 20 nm) došlo do povećanja intenziteta fluorescencije [246-248], ili su prisutna oba efekta [244,249].

2.3.2.2 *Procesi apsorpcije i emisije svetlosti - Jablonski dijagram*

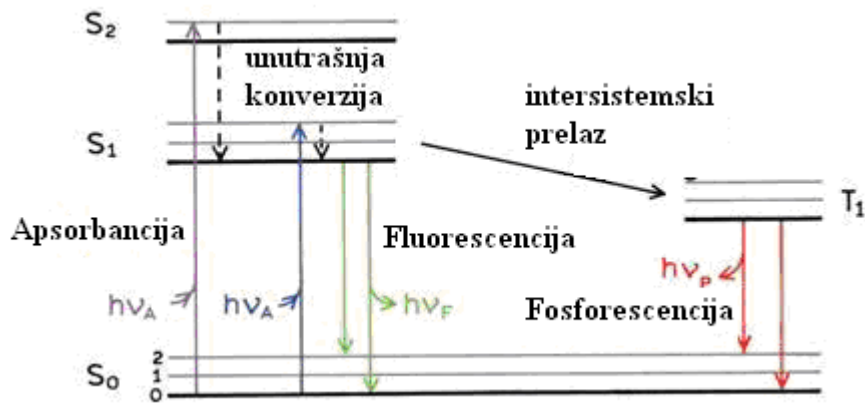
Spektralni podaci dobijeni iz fluorescentnih merenja se predstavljaju u obliku emisionih spektara. Fluorescentni emisioni spektar je grafik zavisnosti intenziteta fluorescencije od talasne dužine (nm) ili talasnog broja (cm^{-1}). Emisioni spektri zavise od hemijske strukture fluorofore i od rastvarača u kojem je rastvorena. Veoma važna karakteristika fluorescencije je visoka osetljivost detekcije.

Procesi koji se dešavaju između apsorpcije i emisije svetlosti se obično predstavljaju Jablonski [250] dijagramom, koji se često koristi kao polazna tačka kada se diskutuje o ovim procesima. Postoji više različitih formi ovog dijagrama, koje se koriste

za ilustraciju različitih molekulskih procesa koji se mogu odigravati u pobuđenim stanjima, Slika 14.



(a)



(b)

Slika 14. Molekulski procesi između apsorpcije i emisije svetlosti u pobuđenim stanjima - oblici dijagrama po Jablonskom: prikaz elektronskih procesa u molekulima (a); jedan od oblika Jablonski dijagrama (b)

Na Slici 14 (b) je predstavljeno osnovno singletno, prvo i drugo elektronsko stanje, S_0 , S_1 i S_2 . U svakom od ovih elektronskih energetskih nivoa, fluorofore se mogu naći u više vibracionih energetskih nivoa, označenih kao 0, 1, 2 itd. Prelazi između stanja su označeni vertikalnim punim linijama. Nakon apsorpcije svetlosti dešava se nekoliko procesa. Fluorofora obično biva pobuđena na neki viši vibracioni nivo stanja S_1 ili S_2 . Sa nekoliko retkih izuzetaka, molekuli u kondenzovanim fazama se brzo relaksiraju do najnižeg vibracionog nivoa S_1 . Ovaj proces je unutrašnja konverzija i obično se dešava za 10^{-12} s ili brže. Pošto je trajanje fluorescencije oko 10^{-8} s, interna (unutrašnja) konverzija je u opštem slučaju završena pre emisije. Prema tome, emisija fluorescencije rezultuje iz termalno uravnoteženog pobuđenog stanja tj. iz najnižeg energetskog vibracionog stanja S_1 . Povratak u osnovno stanje se obično dešava najpre do nekog od viših pobuđenih vibracionih osnovnih stanja nivoa S_1 ili S_2 , pa se onda brzo (10^{-12} s) dostiže termalna ravnoteža (isprekidane linije na Slici 14 (b)). Molekuli u S_1 stanju takođe mogu podleći konverziji spina u prvo tripletno stanje T_1 . Emisija iz T_1 se označava kao fosforescencija, i pomerena je ka većim talasnim dužinama (nižoj energiji) u odnosu na fluorescenciju. Konverzija iz S_1 u T_1 se naziva intersistemski prelaz. Prelaz iz T_1 u osnovno singletno stanje je zabranjen i kao rezultat toga konstante brzine za emisiju iz tripletnog stanja su nekoliko redova veličine manje, od istih kod fluorescencije. Molekuli koji sadrže teške atome, kao što su brom ili jod su često fosforescentna.

Kao što se može videti i sa Slike 14, energija emisije je tipično manja (veća talasna dužina) od energije apsorpcije. Ovaj fenomen je prvi otkrio G.G. Stokes 1852. god. i po njemu je ovo pomeranje nazvano „Stokes“-ovo pomeranje [158]. On je na primeru kinina, čiju fluorescenciju mogu da priguše hloridni joni [251], uočio i efekat unutrašnjeg filtera. Gubici energije između ekscitacije i emisije se obično posmatraju na fluorescentnim molekulima u rastvoru. Jedan od čestih uzroka Stokes-ovog pomeranja je brza relaksacija do najnižeg vibracionog nivoa S_1 . Osim toga, fluorofore se obično relaksiraju do viših vibracionih nivoa S_0 , što rezultira u daljem gubitku energije termalizacijom viška vibracione energije. Kao dodatak ovim efektima, fluorofore mogu ispoljavati dalje Stokes-ovo pomeranje zbog efekta rastvarača, reakcija u pobuđenom stanju, formiranja kompleksa i/ili energetskog transfera.

2.3.2.3 Mehanizmi gašenja fluorescencije

Intenzitet fluorescencije može biti umanjen velikim brojem različitih procesa, kao što su reakcije u pobuđenom stanju, energetski transfer, reakcije formiranja kompleksa i koliziono gašenje fluorescencije. Takva smanjenja u intenzitetu se odnose na gašenje fluorescencije, i ono se može odvijati različitim mehanizmima, i često veoma zavisi od temperature i pritiska. Gašenje fluorescencije, kao i suprotan proces (*engl.* dequenching) do koga dolazi prilikom reakcije sa specifičnim molekulom (fluoroforom) kao biološkom metom koristi se kao osnova za biološki skrining prilikom kojeg se aktivirajućim reagensima stvara optički kontrast [252,253]. Postoji nekoliko različitih mehanizama kojima se transfer energije između donora i akceptora može izvršiti neradijativno (bez apsorpcije ili emisije fotona). To su:

1) dinamičko gašenje fluorescencije, u koje se ubrajaju:

- kolizioni energetski transfer (Dexter-ov elektronski transfer)
- Förster-ov rezonantni energetski transfer
- formiranje kompleksa u pobuđenom stanju (EXCIPLEX, excited state complex) koji se raspada u osnovnom stanju [254-256], i

2) statičko (kontaktno) gašenje fluorescencije.

Za proučavanje dinamike fluorescencije veoma je bitno vreme života koje fluorescentni molekuli provedu u pobuđenom stanju i interaguju sa drugim molekulima u rastvoru.

Koliziono gašenje fluorescencije (Dexter-ov elektronski transfer) se dešava kada se fluorofora u ekscitovanom stanju deaktivira prilikom kontakta sa nekim drugim molekulom u rastvoru, koji se naziva „kvenčer“ (*engl.* quencher) – gasilac fluorescencije. U ovom procesu molekuli ostaju hemijski nepromenjeni. Kod kolizionog gašenja fluorescencije, smanjenje u intenzitetu se opisuje odnosom fluorescencije u odsustvu i prisustvu kvenčera, Stern-Volmer-ovom jednačinom (16) [231]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (16)$$

U ovom izrazu K je Stern-Volmer-ova konstanta, $[Q]$ je koncentracija kvenčera, k_q je bimolekularna konstanta gašenja fluorescencije, a τ_0 je dužina trajanja (vreme) kada nema gašenja fluorescencije. Stern-Volmer-ova konstanta gašenja fluorescencije, K , ukazuje na osetljivost fluorofore za kvenčer. Fluorofora koja se nalazi u unutrašnjosti nekog makromolekula je obično nepristupačna za kvenčere koji su rastvorni u vodi, tako da je u tom slučaju vrednost K mala. Veće vrednosti K se mogu dobiti kad je fluorofora slobodna u rastvoru ili se nalazi na površini biomolekula. Veliki broj različitih molekula može pokazivati svojstva kolizionih kvenčera, npr. kiseonik, halogeni elementi, amini i molekuli koji su elektron-deficitarni, kao što je akrilamid. Ako se fluorofora u pobuđenom stanju sudara sa molekulom kiseonika, onda se fluorofora vraća u osnovno stanje bez emisije fotona (neradijativnim putem). Drugi primeri dinamičkih procesa u rastvoru uključuju interakcije fluorofore sa rastvaračem i rotacionu difuziju [257,258]. Mehanizam gašenja fluorescencije zavisi od para fluorofora-kvenčer. Npr. gašenje fluorescencije halogenima i teškim atomima se dešava zbog kuplovanja spinskog i orbitalnog momenta elektrona (spin-orbitalno sprezanje) i intersistemskog prelaza u tripletno stanje (Jablonski dijagram, Slika 14).

Još jedan važan proces koji se dešava u pobuđenom stanju je rezonantni energetski transfer (eng. RET). Ovaj proces se dešava kad god se fluorescentni spektar fluorofore (donora) preklapa sa apsorpcionim spektrom drugog molekula (akceptora) [259], Slika 15.



Slika 15. Spektralno preklapanje kod fluorescentnog energetskeg transfera

RET nije rezultat emisije donora koja se apsorbuje od strane akceptora niti postoji intermedijerni foton, a akceptor ne mora da bude fluorescentan. Energetski transfer se dešava dok je donor u pobuđenom stanju (zbog čega je ovo dinamički proces). Ovakvi procesi reapsorpcije su zavisni od ukupne koncentracije akceptora i od nemolekularnih faktora, kao što je npr. veličina uzorka. Između donora i akceptora postoje dipol-dipol interakcije, pri čemu RET zavisi i od relativne orijentacije prelaznih dipolnih momenata donora i akceptora.

Stepen energetskeg transfera je određen udaljenošću između donora i akceptora i veličinom spektralnog preklapanja, koja se opisuje Förster-ovom udaljenošću (R_0). Brzina energetskeg transfera, $k_T(r)$, je data jednačinom (17):

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (17)$$

gde je r udaljenost između donora (D) i akceptora (A), a τ_D je vreme života donora u odsustvu energetskeg transfera. Efikasnost energetskeg transfrea za jedan donor-akceptorski par na fiksiranoj udaljenosti je predstavljeno jednačinom (18):

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (18)$$

Förster-ove udaljenosti su uporedive po veličini sa biološkim makromolekulima (30-60 Å), pa imaju primenu u merenju udaljenosti između dva različita mesta na proteinima [260]. Saini sa saradnicima [261] je proučavao brzinu rezonantnog energetskog transfera između fluorescentne boje i nanočestica u zavisnosti od njihove međusobne udaljenosti, gde je pokazano da na većim udaljenostima važi Förster-ov tip zavisnosti [261]. U literetari su opisani još neki primeri zavisnosti FRET-a (*engl.* Förster Resonance Energy Transfer) od udaljenosti fluorofore i površine nanočestice [262,263].

RET teorija je kompleksna i različita je za donore i akceptore koji su kovalentno vezani, slobodni u rastvoru ili su deo rigidnih geometrija ili DNK. Osim toga, u zavisnosti od vremena života donora, difuzija može povećati stepen energetskog transfera.

Dexter-ov energetski transfer je, za razliku od Förster-ovog, fenomen koji se dešava na kraćim udaljenostima i smanjuje se, zavisno od prostornog preklapanja molekulskih orbitala donora i kvenčera, sa zavisnošću tipa e^{-R} . I sa Förster-ovim i sa Dexter-ovim tipom energetskog transfera oblik apsorpcionih i fluorescentnih (emisionih) spektara boje ostaje nepromenjen.

Do statičkog (kontaktnog) gašenja fluorescencije [264,231] dolazi kada fluorofora sa kvenčerom formira kompleks koji nije fluorescentan i koji ima jedinstven apsorpcioni spektar. Ovaj proces se dešava u osnovnom stanju i ne zasniva se na difuzionom procesu niti na sudarima molekula. Može doći do agregacije boje koja se dešava zbog hidrofobnih efekata (molekuli boje se organizuju tako da se minimizira kontakt sa vodom). Formiranje kompleksa u osnovnom stanju može biti narušeno visokim temperaturama i dodatkom surfaktanata (površinski aktivnih jedinjenja).

2.4 Citotoksičnost nanočestica zlata

2.4.1 Uticaj nanočestica zlata na ćeliju

Nova neobična svojstva metalnih nanočestica, koja se razlikuju od svojstava većine drugih materijala, izazvala su dosta pažnje i stimulacije za istraživanja vezana za njihovu sintezu i primenu [265-270]. Metalne nanočestice, posebno nanočestice zlata, su veoma značajne zbog svoje sadašnje ali i buduće primene ne samo kao katalizatora, nego i u polju biologije i medicine [48,271], u dijagnostici [272], oblasti biosenzora [273,274], terapiji [275,276] i prenosu lekova do ciljanog mesta [277-280]. Pored toga, biokompatibilnost ovih nanočestica je korišćena za transport antitumornih agenasa, na mesto gde se nalazi tumor, što je dodatno favorizovano zbog veće propustljivosti i „efekta zadržavanja“ [278] tj. akumulacije nanočestica u tumorskim tkivima u mnogo većem stepenu nego što bi to bilo u normalnim tkivima [281,282]. Ove nanočestice se takođe mogu ponašati i kao sistemi za dostavu gena koji nisu zasnovani na virusima [283-285]. Istraživanje u ovoj oblasti je u velikoj meri motivisano mogućnošću primena nanočestica zlata kod terapije i detekcije kancera [47,286-288].

Sa tačke gledišta korisnika u smislu primene nanomaterijala, moraju se uzeti u obzir i potencijalni dalekosežni efekti na žive organizme. Jasno je, da je za svaku kliničku primenu biokompatibilnost nanočestica prelomna tačka. Oduvek je bila problematična toksičnost nanočestica zlata u biološkom sistemu. Iako toksikološka istraživanja sugerišu da nanočestice mogu izazvati neželjene efekte na zdravlje, ta fundamentalna veza uzrok-posledica nije jasno definisana [289,290]. Prema tome, još uvek nije dovoljno jasan uticaj nanočestica zlata na zdravlje ljudi i na životnu sredinu [291]. Nedavno istraživanje toksičnosti nanočestica zlata je ukazalo da, iako neki prekursori nanočestica mogu biti toksični, nanočestice same po sebi ne moraju biti nužno štetne za ćelijske funkcije [292], pa se smatra da su benigne (netoksične) [292]. S druge strane u literaturi [293,294] su opisivane i kao toksične. Pritom toksičnost nanočestica zlata raste sa smanjenjem veličine čestice pre nego zbog promene njihove hemijske strukture, pošto veoma male čestice (prečnika 1 nm) mogu ulaziti u membrane i ćeliju, i mogu se vezati za DNK [295]. U svakom slučaju, one su po veličini slične biološkom materijalu, kao što su ćelijske

komponente i proteini, i sličnost u veličini može dovesti do neželjenog ulaska u ćeliju što može štetno uticati na normalno funkcionisanje ćelije [48].

Ipak ostaje veliki broj nerazrešenih pitanja vezano za uticaj nanočestica zlata na živu ćeliju. Do sada je dokazano da je endocitoza glavni put ulaska nanočestica zlata u ćeliju [296,297]. Nekoliko istraživanja je pokazalo zavisnost ćelijske apsorpcije nanočestica zlata od veličine i oblika čestice, kao i od karakteristika površine nanočestice [298,293]. Najnovija istraživanja ukazuju na to da nanočestice zlata u živim ćelijama uglavnom ostaju u endozomima - sfernom dvostrukom sloju membranskih lipida [293,298]. Imajući u vidu činjenicu da nije zasigurno poznato šta se dešava sa nanočesticama zlata u ćeliji, ostaje potreba da se jasno razumeju njihova krajnja odredišta i moguće interakcije sa komponentama ćelije.

U novije vreme posebna pažnja je posvećena ispitivanju toksičnosti nanočestica zlata u zavisnosti od veličine, koncentracije i karakteristika površine [299]. Da bi se ovaj proces mogao bolje razjasniti, potrebno je fokusirati se na uticaj nanočestica na pojedinačne vrste živih ćelija. Pošto je koža prva barijera za nanočestice prisutne u životnoj sredini, od velikog je interesa ispitati ove efekte na humanim dermalnim fibroblastima iz primarnih kultura. S druge strane, interesantno je i ispitivanje limfocita pri izlaganju nanočesticama zlata, jer se tako može potvrditi efekat direktnog ulaska nanočestica u ćeliju (direktne intraćelijske penetracije) [49].

Fibroblasti su male ćelije odgovorne za formiranje kolagena, koje predstavljaju najvažnije elemente vezivnog tkiva. One čine skelet intersticijuma tj. prostora između nefrona, tubula, krvnih i limfnih sudova i nerava. Ovaj prostor se sastoji od vezivnog tkiva, i u predelu korteksa je slabo izražen i čini oko 7% ukupnog volumena kore, a u predelu srži bubrega čini i do 20%. Čine ga fibroblasti, miofibroblasti, makrofagi, periciti, histiociti itd. Pored toga fibroblasti imaju i veoma važnu ulogu u produkciji regulatornih supstanci kao što je adenozin [300] i eritroprotein [301].

Limfociti su, pored granulocita (koje čine neutrofil, eozinofil i bazofil) i monocita, vrsta leukocita (belih krvnih zrnaca), koja kod odraslih osoba čini 25-40 % leukocita u krvi. Nastaju u koštanoj srži i to su najmanje ćelije vezivnog tkiva. Imaju odbrambenu ulogu, i u zavisnosti od vrste (B-limfociti, T-limfociti i nulte ćelije tj. ćelije prirodne ubice) proizvode antitela ili na druge načine učestvuju u imunom ćelijskom

odgovoru. B-limfociti, T-limfociti i nulte ćelije se ne razlikuju morfološki, već samo funkcionalno. Tako su B-limfociti odgovorni za humoralni imunitet, T-limfociti učestvuju u ćelijskom (celularnom) imunom odgovoru dok se za nulte ćelije (NK ćelije), o kojima se najmanje zna, smatra da bi mogle biti odgovorne za sprečavanje razmnožavanja abnormalnih, posebno tumorskih ćelija.

Genotoksičnost nanočestica zlata se može ispitati različitim testovima, a neki od njih su citokinezis blok-mikronukleusni (CB-MN) test i γ -H2AX fosforilacioni esej.

2.4.1.1 Mikronukleusni test

In vitro mikronukleusni esej je mutageni testni sistem koji se koristi u toksikološkim ispitivanjima (skriningu) za detekciju potencijalnih genotoksičnih jedinjenja koja indukuju formiranje mikronukleusa u citoplazmi ćelija koje su u interfazi. Ovaj test se zasniva na svojstvu citohalazina B da zaustavlja kretanje aktinskih filamenata citoplazme, blokira razdvajanje ćerki ćelija (citokineza), dok deoba nukleusa teče neometano. Na taj način nastaju binuklearne ćelije sa udvojenim, ali razdvojenim jedrima obavijeni jednom plazma membranom. Deobom ćelija koje sadrže strukturne hromozomske aberacije u citoplazmi ćerki ćelija formiraće se mikronukleusi. Mikronukleusi nastaju od acentričnih hromozomskih fragmenata, a mogu ih činiti i celi hromozomi kod kojih je došlo do oštećenja u centromernoj oblasti. Učestalost mikronukleusa je indirektni pokazatelj učestalosti hromozomskih aberacija. Prednost CB metoda je u tome što se iz jednog uzorka može analizirati više hiljada binuklearnih ćelija čime se dobijaju pouzdani podaci o učestalosti i distribuciji hromozomskih aberacija.

Citokinezis blok-mikronukleusni (CB-MN) test je veoma pouzdan i jednostavan metod za detekciju kako gubitaka, tako i defekata na hromozomu, i istovremeno daje informacije i o progresiji ćelijskog ciklusa i o citotoksičnosti. Klasifikujući ćelije prema broju jedara, ovim esejom se utvrđuje indeks citotoksičnosti (binuklearni ćelijski indeks, BCI) [302] i dobijaju se informacije o kinetici ćelijskog ciklusa (citokinezis-blok proliferativni indeks, CBPI) [303]. Zbog navedenih karakteristika, CB-mikronukleusni test ima široku primenu u proceni genotoksičnih efekata različitih fizičkih i hemijskih agenasa.

2.4.1.2 γ -H2AX fosforilacioni esej

Histoni su bazni proteini (male molekulske mase) koji zajedno sa DNK i RNK izgrađuju hromatin, odnosno hromosome [304,305]. Nukleozom je strukturna jedinica hromatina koja se ponavlja, i predstavlja kompleks histona sa DNK. Razlikuje se pet vrsta histona koji se mogu podeliti u dve grupe. Prvu grupu sačinjavaju nukleozomski histoni H2A, H2B, H3 i H4, pri čemu po dva od svakog čine histonski oktamer oblika diska, oko kojeg se obavlja molekul DNK. Drugu grupu čine histoni koji ne formiraju strukturu u oblika diska, obeleženi kao H1, oko kojih se takođe obavlja molekul DNK i koji služe samo kao veza do sledećeg diska. Histonske vrste se međusobno razlikuju po molekulskoj masi, broju i redosledu aminokiselina. Linearno raspoređeni delovi hromozomske DNK potrebni za sintezu jednog proteina ili jednog molekula RNK su geni. Njihova veličina (broj nukleotida DNK) i raspored na hromozomima su strogo određeni. Građa gena ogleda se u tačno određenom redosledu nukleotida, čija promena, manjak ili višak nukleotida rezultuje u promeni funkcije gena genskim (tačkastim) mutacijama.

H2AX je jedna od izoformi histona H2A [306] kodiranih sa dva različita gena. H2AX može da bude fosforilovan, acetilovan i da se vezuje za ubikvitin u cilju regulisanja ćelijskih procesa [307].

Fosforilacija histona H2AX na serinskom mestu (γ -H2AX) se dešava kao odgovor ćelije na dvolančane prekide DNK (*engl.* DSBs – double-strand breaks). Ovi prekidni mogu biti izazvani različitim uzročnicima: spoljašnjim faktorima (UV radijacijom, x-zracima, γ -zracima, hemijskim agensima i dr.), sudarom replikacione viljuške („replication fork collision“) sa nekim dodatim jedinjenjem npr. alkaloidom, apoptozom (smrt ćelije) i disfunkcionalnim telomerama (kratkim ponovljenim nizovima nukleotida na kraju hromozoma eukariota koji štite hromozom od razgradnje egzonukleazama) [308]. γ -H2AX fosforilacioni esej (imunocitohemijska fluorescencija) je tehnika koja se široko primenjuje za kvantifikaciju broja dvolančanih prekida DNK prouzrokovanih različitim agensima, kao i za praćenje kinetike popravke oštećenja.

Acetilovanje H2AX može biti indukovano agensima kao što je jonizujuće zračenje, dok ubikvitinacija H2AX zahteva prethodno acetilovanje [309]. Ubikvitinacija

je proces posttranslacione modifikacije nekog proteina, koja nastaje njegovim vezivanjem za jedan ili više ubikvitinskih monomera kovalentnim vezama [310]. Ubikvitin je mali regulatorni protein, koji je prisutan u skoro svim tkivima eukariota, a najčešća svrha ubikvitinacije je označavanje proteina za razgradnju. Osim toga, ubikvitinacija kontroliše stabilnost, funkciju i unutrašnji ćelijski položaj velikog broja proteina.

2.5 Primena nanočestica zlata i cijanskih boja

2.5.1 Primena nanočestica zlata *in vitro* i *in vivo*

Zahvaljujući karakterističnoj plazmonskej ekscitaciji u vidljivom delu spektra čestice zlata, kao jedne od najviše proučavanih metalnih čestica u koloidnoj hemiji, našle su široku primenu u optici i mikroelektronici. Karakteristike ovih čestica, kao što su dimenzije, distribucija veličina, oblik, stabilnost, stanje na površini tj. površinsko naelektrisanje sa stanovišta fizike i površinska modifikacija sa stanovišta hemije, su direktno su povezane sa načinom sinteze i imaju važnu ulogu u njihovoj primeni.

Hemijska inertnost nanočestica zlata omogućava i njihovu integraciju u biološke sisteme. U biološkim istraživanjima koloidno zlato i različiti derivati koloidnog zlata su među najčešće korišćenim kontrastnim agensima (markerima) [311] koji se koriste kod elektronske mikroskopije [40-43]. Čestice različitih veličina se na elektronskim mikrografijama lako mogu razlikovati, što omogućava izvođenje eksperimenata sa simultanim multi-obeležavanjem [312]. U literaturi je opisano i korišćenje nanočestica zlata u nanomedicini u oblasti dijagnostike, terapije, a ispitana je i njihova toksičnost *in vitro* i *in vivo* [3].

Poznato je da se auroterapija (krisoterapija) odnosi na terapiju u kojoj se koriste soli zlata i/ili koloidno zlato. Iako se koloidno zlato uspešno koristilo kao terapija za reumatoidni artritis kod pacova [4], kod terapije solima zlata primenjene tokom dužeg vremenskog perioda na ljudima, primećena je značajna nuspojava, koja se manifestovala kao svetlo ljubičasto do tamno sivo obojenje kože pri izlaganju suncu [313]. Preterani unos koloidnog zlata i soli zlata tokom krisoterapije rezultuje kompleksnim redoks procesima. Tada dolazi do zasićenja tkiva kože i organa sa relativno stabilnim jedinjenjima zlata i koloidnim zlatom, a u ekstremnim slučajevim i zuba i tkiva oko očiju. Posledica ovoga je obolelo stanje (*engl.* chrysiasis) kada dolazi do akutnog otkazivanja rada bubrega [314], ozbiljnih poremećaja srčanog rada i hematoloških komplikacija (leukopenija, anemija) [315-317]. Dok se neke od ovih posledica relativno mogu sanirati, pigmenaticaja kože ostaje permanentna.

Ispitana je i terapija lekovima zasnovanim na zlatu za lečenje Alzheimer-ove bolesti. *In vitro* eksperiment je pokazao da se kombinacijom mikrotalasne radijacije i koloidnog zlata mogu uništiti ekstracelularni depoziti beta-amiloidnih fibrila i senilni plakovi, koji su glavne patohistološke promene prisutne kod Alzheimer-ove bolesti. U toku je veliki broj istraživanja ovakve primene nanočestica zlata zasnovane na radijaciji, a Pissuwan D. sa saradnicima [5] je opisao korišćenje plazmonske rezonancije nanočestica zlata u cilju foto-termalne medicinske primene.

Nanočestice zlata ispitivane su i kao nosioci lekova [44] tj. nanovektori za prenos lekova ili biološkog materijala [318,319]. Primena hidrofobnih lekova zahteva inkapsulaciju molekula, pa čestice treba da imaju dovoljno hidrofilne površine i veličine manje od 100 nm, tako da mogu efikasno da izbegnu retikuloendotelijalni sistem (sistem tkivnih makrofaga). Međutim, kod nanočestica postoji veliki odnos površine i zapremine, pa one teže da se nagomilavaju i adsorbuju proteine. U tom slučaju se brzo vrši uklanjanje takvih čestica od strane makrofaga u retikuloendotelijalnom sistemu, pa one ne stižu do ciljanih ćelija. Da bi nanočestice duže cirkulisale u krvi, treba da budu obložene hidrofilnim polimernim omotačem, kao što je PEG (polietilen-glikol) čime se povećava disperznost čestica i eliminiše adsorpcija proteina.

U terapiji kancera, koloidno zlato se može koristiti da se obeleži tumor i tako omogući *in vivo* detekcija, korišćenjem površinski pojačanog Ramanovog rasejanja (*engl.* SERS, Surface Enhanced Raman Scattering) kao tehnike. Pritom se nanočestice zlata inkapsuliraju sa tiol- modifikovanim PEG-om, čime je povećana biokompatibilnost i cirkulacija *in vivo*. Da bi se tumorske ćelije specifično obeležile, PEG-om obložene nanočestice zlata se vezuju za antitelo (ili za fragment antitela) koje npr. inhibira receptor za epidermalni faktor rasta. Ovo je značajno jer je kod nekih tipova kancera povećana proteinska ekspresija humanog epidermalnog faktora rasta. Tako se, koristeći SERS, sa ovim PEG obloženim nanočesticama zlata može detektovati lokacija tumora [45], jer ćelije tumora za razliku od zdravih ćelija imaju svetliji odsjaj.

Nanočestice zlata se koriste i kao emiteri toplote u fototermalnim terapijama [320,321]. Poznato je da se nanosfere zlata, prečnika 35 nm, koje su konjugovane sa antitelom ponašaju kao efikasni i selektivni fototermalni apsorberi za uništavanje ćelija kancera korišćenjem argonskog jonskog lasera u vidljivoj oblasti, bez uticaja na okolne

ćelije koje nisu maligne [322]. Delovanje ovog lasera na talasnoj dužini 514 nm se preklapa sa apsorpcijom površinskog plazmona sfernih nanočestica zlata, koje imaju apsorpcioni maksimum na 520 nm. Ove nanočestice se konjuguju sa monoklonskim antitelima, a to su imunoglobulini koji proizvode ćelijske kulture odabrane da reaguju na antigene koje ćelije kancera specifično ekspimiraju. Ova antitela inhibiraju receptor za epidermalni faktor rasta i specifično ciljaju molekularni marker koji označava ovaj receptor. Zbog povećane ekspresije ovog receptora na površini malignih ćelija, one se mogu uništiti sa manje od polovine energije lasera potrebne za uništavanje normalnih ćelija. Međutim, na ovoj talasnoj dužini prodiranje svetlosti u tkivo je veoma malo [323], pa je ovo korisno samo u slučaju površinskih lezija, jer je za tretiranje kancera *in vivo* potrebno dublje prodiranje svetlosti u tkivo. Bliska infracrvena oblast spektra omogućava maksimalno prodiranje svetlosti zbog relativno malog rasejanja i apsorpcije unutrašnjih hromofora iz tkiva. Pošto se menjanjem oblika ili veličine nanočestice površinska traka plazmona menja, moguće je dizajnirati fototermalne apsorbujuće agense u bliskoj infracrvenoj oblasti. Tako su, za *in vivo* primenu nanočestice zlata kao fototermalnih agenasa veoma dobri kandidati nanočestice zlata štapićastog oblika – nanoštapići (*engl.* gold nanorods) [109,110]. Kod ovakvih nanočestica je rezonantna traka površinskog plazmona pomerena iz vidljivog dela spektra u blisku infracrvenu oblast tj. jako apsorbuju blisko-infracrvenu svetlost i emituju je kao toplotnu energiju. Pošto infracrveni zraci lako prodiru kroz ljudsku kožu i tkivo, nanočestice ovakvog oblika (određene dužine i širine) se mogu koristiti kao komponente koje emitujući toplotu uništavaju ćelije kancera, a mogu se koristiti i za druga ciljana mesta. Iako na rezonanciji plazmona kod nanočestica dolazi i do apsorpcije i do rasejanja svetlosti, nisu isti doprinosi u zavisnosti od veličine čestice. Za čestice sa manjim aksijalnim prečnikom (oko 10 nm) dominira apsorpcija, dok za čestice sa većim aksijalnim prečnikom (> 35 nm) dominira rasejanje. Zbog toga se, kod *in vivo* primene, kao termalni konvertori bliske infracrvene svetlosti koriste čestice sa manjim prečnikom koje fototermalno oštećuju tumor [46,47]. Kada se oblože polimerima, ovakve nanočestice imaju vreme poluživota *in vivo* duže od 15 časova.

Drugi oblici nanočestica zlata, kao što su račvast [118], planarni trouglast i šestougaoni oblik [119] i prizmatičan [120], takođe imaju apsorpciju površinskog plazmona u bliskoj infracrvenoj oblasti.

Nanočestice zlata, zbog svoje biokompatibilnosti, i ispoljavanja jedinstvenih strukturnih, elektronskih, magnetnih, optičkih i katalitičkih svojstava imaju i važnu analitičku primenu u oblasti:

- *genosenzora*, gde nanočestice zlata pojačavaju električni signal elektrohemijskih uređaja (DNK biosenzora) i povećavaju osetljivost bioelektronskih eseja [50-52], što pruža nove mogućnosti za gensku dijagnostiku u budućnosti,

- *elektrohemijskih imunosenzora*, kod kojih nanočestice zlata povećavaju osetljivost elektrohemijske detekcije specifične reakcije vezivanja antitela sa antigenom [53-58],

- *elektrokatalitičkih senzora*, jer nanočestice zlata, zbog svoje velike površine u poređenju sa zapreminom, imaju odličnu katalitičku aktivnost, pa se koriste za dizajn i fabrikaciju nanometarskih elektrokatalizatora i povećanje selektivnosti. Ovakvom modifikacijom površina elektroda se snižava granica elektroanalitičke detekcije i pojačava elektrohemijski odgovor. Poznata je primena nanočestice zlata kod elektrohemijskog ispitivanja ćelija raka i kao elektokatalizatora kod detekcije nekih malih biomeolekula, kao što su glukoza, norepinefrin, dopamin, epinefrin, katehol, askorbinska kiselina i dr., kao i za detekciju nekih toksičnih supstanci (Sb^{3+} i As^{3+}) [59-67]

kao i

- *enzimskih biosenzora*, pri čemu je direktan elektronski transfer sa redoks-proteina (enzima) na elektrodu olakšan modifikacijom površina elektroda nanočesticama zlata [68-74].

U savremenom društvu u kome se sve više razvija i „industrija zdravlja i lepote“, nanočestice zlata takođe imaju svoju primenu u kozmetici [75], u tretmanima protiv

starenja kože. U tom smislu koriste se u preparatima za negu kože lica i tela, u losionima i kremama. One imaju afinitet za kolagena vlakna i utiču na njihovu strukturu, pa tako podstiču proizvodnju kolagena. Sitne čestice zlata reflektuju svetlost, ublažavaju bore, jačaju imunološki sastav kože, a zbog raspršenosti u sitne čestice njihova površina se povećava i dejstvo je bolje. Koloidno zlato ima balansirajuće dejstvo i na telesne električne funkcije.

2.5.2 Primena cijanskih boja

U informacionom dobu, kada obim i brzina prenosa informacija sve više rastu, blagovremeno dobijanje podataka je ključna stvar za funkcionisanje različitih sistema. Da bi se omogućio protok informacija reda veličine tera (10^{12}) bita u sekundi u sistemima zasnovanim na optičkom vremenskom multipleksiranju (OTDM, *optical time division multiplexing*, proces stvaranja kompleksnog signala po principu vremenske raspodele kapaciteta prenosnog medijuma, pri čemu dolazi do kombinovanja višestrukih nezavisnih tokova, prethodno podeljenih prema unapred definisanim sekvencama, u jedan tok podataka), neophodni su fempto-sekundni (10^{-15} s) optički materijali i uređaji. Iz tog razloga su istraživanja rađena i na neorganskim jedinjenjima tipa poluprovodnika i na organskim sistemima kao što su provodni polimeri i J-agregati nekih boja. Za J-agregate nekih boja je ustanovljeno da imaju ultrabrza i nelinearna optička svojstva. Vreme života ekscitovanih stanja kod J-agregata je reda veličine pikosekundi (10^{-12} s), što je mnogo kraće nego kod neorganskih poluprovodnih materijala (reda veličine deset nanosekundi), zbog čega je njihova primena superiornija.

U telekominukacionim mrežama, koriste se talasne dužine za optičke impulse oko 1,3 ili 1,55 μm , zbog velikih brzina prenosa optičkih vlakana u tom opsegu. Iz tog razloga se J-agregati nekih cijanskih boja koriste u optičkoj opremi [27,28].

J-agregati određenih cijanskih boja se mogu koristiti u demultiplekserima (za konvertovanje brzog protoka podataka u veći broj sporijih protoka podataka) [324,325]

J-agregati pokazuju fotoelektričnu osetljivost u oblasti dejstva He-Ne lasera (633 nm) i imaju najveću makroskopsku elektronsku susceptibilnost trećeg reda (χ^3). Ovo svojstvo se može koristiti za promenu elektrodnog potencijala određenih materijala kao

što su polimeri aromatičnih poliimida dodavanjem J-agregata karbocijanske boje. J-agregati boje, indukujući elektronski transport u slojevima polimera, povećavaju osjetljivost ovih slojeva na svetlost He-Ne lasera. Elektroodni potencijal materijala se može selektivno varirati menjanjem sastava boje koja formira J-agregat [29].

Cijanske boje su poznate kao fotogalvanski pojačivači osjetljivosti, zbog svojstva da formiraju J-agregate sa visoko delokalizovanim ekscitonima. Cijanski sloj boje se može ponašati i kao donor i kao akceptor, povećavajući efikasnost fotogalvanske ćelije. Tako, kada se sloj cijanske boje nalazi u „sendviču“ između polimera dicijano-fenilvinilen-trifenilamin-a kao donora i C60 (fuleren) kao akceptora, poboljšava se efikasnost konverzije svetlosne u električnu energiju [30].

Veoma je važna uloga J-agregata u povećanju spektralne osjetljivosti fotografskih emulzija AgCl [31]. Preciznije, fundamentalni korak u procesu slikanja (stvaranja slike) u fotografiji je fotoindukovana energija i elektronski transfer sa adsorbovanih boja na mikrokristal srebra halogenida. Boja omogućava srebru halogenidu da bude osjetljiv na vidljivu svetlost, što je spektralno senzitiviranje tj. povećanje spektralne osjetljivosti. J-agregati cijanskih boja su posebno korisni jer se veoma dobro adsorbuju na mikrokristal AgBr. Svojim jakim i uskim apsorpcionim trakama omogućavaju selektivno senzitiviranje na određenu boju (talasnu dužinu), pa se odabirom odgovarajuće cijanske boje koja se adsorbuje može povećati senzitiviranje mikrokristala AgBr [32].

2.5.3 Primena nanočestica zlata sa bojom

Progres u razvoju nanotehnologija, između ostalog se zasniva i na razvoju materijala za čiju sintezu se koriste koloidne čestice. Modifikacija površine malih metalnih čestica dovodi do promene njihovih elektronskih i optičkih svojstava. Monodisperzne metalne nanočestice su cilj kome se teži, ali specifična svojstva se mogu očekivati i kada to nije u potpunosti ostvareno. Mogućnost kontrolisanog modifikovanja elektronskih karakteristika koloidnih metalnih čestica pruža veću šansu nalaženja njihove primene u nelinearnoj optici.

Hibridne nanočestice koje se sastoje od jezgra plementog metala funkcionalizovanog omotačem, koji čini organska boja, su poznate zbog svojih neobičnih

optičkih svojstava, uključujući ultrabrze indukovane transparencije, nelinearno ponašanje, Fano rezonancije (vrsta fenomena rezonantnog rasejanja pri čemu se dobija asimetričan oblik linije rasejanja, npr. asimetričan oblik linije koja opisuje neelastično rasejanje elektrona helijuma) i pojačano fotoindukovano razdvajanje naelektrisanja [1,10-15].

U poslednje vreme mnoga ispitivanja su fokusirana na ispitivanja molekula boje koji podležu J-agregaciji, koja daje Frenkel-ov eksciton sa apsorpcionom trakom koja je sužena, pomerena ka crvenoj oblasti i ima visoku apsorpciju i polarizabilnost u odnosu na traku monomerne vrste [2]. Ove karakteristike omogućavaju jako i koherentno elektronsko kuplovanje ekscitona boje sa polarizacijama plazmonske nanočestice plemenitih metala [1,326], pa je moguće i moduliranje i poboljšavanje optičkih karakteristika boje. Fenomeni vezani za ovakve hibridne strukture, kao što su gašenje fluorescencije boje [17], interakcije sa pojačanim optičkim poljima [1], i nelinearno ponašanje [2] ih čine potencijalno pogodnim i upotrebljivim u budućnosti za dizajniranje sistema za konvertovanje solarne energije, za primene u molekularnoj optoelektronici i kod senzornih uređaja. Zbog lakoće sinteze i jačine (otpornosti) ovih nanomaterijala, kombinovane sa jakom, ultrabrzom prirodom polarizacionog kuplovanja, u budućnosti bi mogli potencijalno da se koriste za optičke uređaje. Primer su optički limiteri, gde je nelinearna apsorpcija dominantan optički limitirajući mehanizam, pa se nelinearni optički materijali mogu koristiti za manipulaciju optičkih zraka. Tako se neki organski i neorganski limiteri mogu koristiti za zaštitu očiju, dok neke metalne nanočestice pokazuju odlične optički limitirajuće odgovore za nanosekundne laserske pulseve. S druge strane, u oblasti telekomunikacija imaju ulogu kod prenosa signala u optičkim vlaknima ili integrisanim optičkim kolima.

Pošto su cijanske boje jako fluorescentne [16], merenje fluorescentnih svojstava agregata čestica-boja može dati važan uvid za razumevanje interčestičnih molekulskih interakcija i reaktivnosti. Fluorescentno obeležavanje je u širokoj upotrebi u medicinskoj dijagnostici [7], gde se koristi da bi se lokalizovale nanočestice ili simuliralo otpuštanje lekova. U većini istraživanja na nanočesticama koje su modifikovane hromoforom, proučavano je efikasno gašenje fluorescencije hemisorbovanih hromofora [76,242,327,328]. Ovo gašenje fluorescencije se pripisuje povećanoj neradijativnoj relaksaciji pobuđenog stanja zbog transfera energije i/ili elektronskog transfera [323,17].

U nekim skorijim publikacijama je opisan uticaj veličine nanočestica i udaljenosti između hromofora i površine nanočestice na efikasnost gašenja fluorescencije [329,330].

U literaturi je opisana i J-agregacija cijanskih boja različitih struktura na površini nanočestica zlata i srebra [12,76-78]. Sve je veći interes za ispitivanje samo-organizacije ovakvih molekula posredstvom nanočestica u smislu njihove nove primene kao hemijskih senzora [33-35], u katalizi [36,37], prenosu lekova [6], nanoelektronici [38] i medicinskoj dijagnostici [8,9].

2.6 Cilj rada

Cilj istraživanja ovog rada je sinteza i fizičko-hemijska karakterizacija nanočestica zlata različite veličine dobijenih u prisustvu natrijum-borhidrida i trinatrijum-citrata. Proučavaće se reakcija adsorpcije tiocijanske boje (natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil)benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1 sulfonata, TC) na sintetizovanim nanočesticama, gde će različitim metodama biti ispitana i okarakterisana četiri sintetizovana koloida zlata u prisustvu i odsustvu TC boje. Odrediće se konstante ravnoteže procesa adsorpcije, eksperimentalno dobijen procenat gašenja fluorescencije TC boje u prisustvu ova četiri koloida, kao i teorijski izračunat procenat gašenja fluorescencije TC za monoslojnu površinsku pokrivenost nanočestice, a zatim i efikasnost gašenja fluorescencije u zavisnosti od veličine čestica, pri konstantnoj koncentraciji nanočestica. Takođe će se ispitati formiranje J-agregata, dobijenih samo u prisustvu najmanjeg sintetizovanog koloida, ispitaće se kinetika i mehanizam J-agregacije, odrediće se kinetički i aktivacioni parametri, kao i uticaj metalnih katjona u različitim oksidacionim stanjima (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Mg^{2+} i Al^{3+}) na reakciju J-agregacije. Pored toga, u dva *in vitro* model sistema humanih ćelija, limfocitima i fibroblastima, ispitaće se uticaj veličine i koncentracije još dve različite koloidne disperzije zlata sa adsorbovanim citratnim jonima, na citotoksičnost.

Razjašnjavanje mehanizma interakcije negativno naelektrisane površine nanočestice zlata sa negativno naelektrisanom tiocijanskom bojom daje bolji uvid za potencijalnu upotrebu ovih hibridnih struktura u budućnosti za dizajniranje sistema za

konvertovanje svetlosne energije, primenu u molekularnoj optoelektronici i kod senzornih uređaja. Takođe, ispitivanje samo-organizacije ovakvih molekula (tipa cijanske boje) posredstvom nanočestica je važno i zbog mogućnosti njihove primene kao hemijskih senzora, u katalizi, prenosu lekova, nanoelektronici i medicinskoj dijagnostici. Zato je veoma važno razumeti hemiju ove interakcije, koja do sada nije detaljnije ispitivana, a u ovom radu će se naročita pažnja posvetiti i proučavanju procesa formiranja J-agregata na površini nanočestice zlata i ispitivanju kinetike i mehanizma J-agregacije, koja do sada takođe nije potpuno razjašnjena.

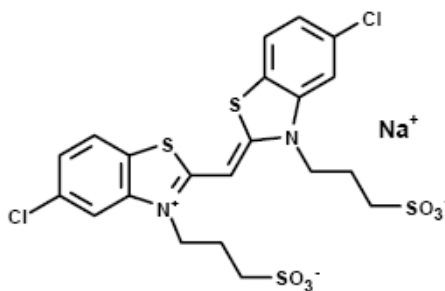
S druge strane, interes za ispitivanje toksičnosti nanočestica zlata u biološkom sistemu, proističe zbog njihove biokompatibilnosti i sličnosti po veličini sa biološkim materijalom, kao što su ćelijske komponente i proteini, što može dovesti do njihovog neželjenog ulaska u ćeliju i štetnog uticaja na normalno funkcionisanje ćelije. Imajući u vidu činjenicu da uticaj nanočestica zlata na ćeliju nije sasvim razjašnjen, ostaje potreba da se jasno razumeju njihova krajnja odredišta i moguće interakcije sa komponentama ćelije, a u ovom radu je cilj ispitivanja i davanje dodatnih informacija u ovom polju istraživanja. U tom smislu bi ispitivanje ćelijskih sistema sa nanočesticama zlata različitih karakteristika površine, koncentracije, veličine i oblika čestice, moglo poslužiti kao odličan model sistem za procenu genotoksičnosti.

NAŠ RAD

3 Eksperimentalni deo

3.1 Hemikalije

Kalijum-tetrahloroaurat(III) (KAuCl_4 , 99%), zlato(III)-hlorid trihidrat ($\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$), natrijum-borhidrid (NaBH_4 , 99%), kalijum-hlorid (KCl), trinatrijum-citrat dihidrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 99%) i jednovalentni katjoni hlorida (KCl , NaCl , LiCl , CsCl) su od Aldrich-a, i kao i svi drugi korišćeni reagensi su komercijalni proizvodi najveće čistoće. Tiocijanska boja (TC), čija je struktura predstavljena na Slici 16, je od Hayashibara Biohemijjskih Laboratorija, Okayama, Japan. Standardni rastvor TC boje, koncentracije 5×10^{-5} M, je sadržavao i 1×10^{-3} M KCl , a pripremljen je rastvaranjem čvrste TC boje u vodi. Zbog teškog rastvaranja boje u vodi, rastvor se sonificira u ultrazvučnom kupatilu pola sata. Radni rastvori TC boje (koncentracija 1×10^{-8} – $1,67 \times 10^{-5}$ M) su pripremljeni odgovarajućim razblaživanjem 5×10^{-5} M standardnog rastvora TC boje, neposredno pre merenja. Rastvor boje može da stoji neograničeno dugo na sobnoj temperaturi. Za pripremanje svih rastvora je korišćena dejonizovana voda prečišćena sa Millipore Milli-Q sistemom za vodu.



Slika 16. Struktura TC boje (natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil)benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1-sulfonat).

3.1.1. Ispitivanje citotoksičnih efekata nanočestica zlata

Za ispitivanje citotoksičnih efekata su korišćeni: PB-max medijum (Invitrogen-Gibco) za gajenje kultura limfocita periferne krvi, DMEM medijum (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen-Gibco) i teleći serum (FBS, Invitrogen-Gibco) za gajenje kulture fibroblasta kože; citohalazin B (Sigma, Aldrich), Gimza (Merck) za analizu mikronukleusa; formaldehid, 0,2% triton X-100, primarno anti-fosfo H2AX (Ser 139) monoklonsko antitelo, sekundarno antitelo obeleženo fluorescein-izotiocijanatom - FITC (Sigma, Aldrich) i DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) (Vector Laboratories) za imunocitohemijsku fluorescenciju.

3.2 Sinteza nanočestica zlata

Nanočestice zlata su pripremljene redukcijom $\text{KAuCl}_4/\text{HAuCl}_4$ u vodenom rastvoru, sa sveže pripremljenim rastvorom natrijum-borhidrida ili trinatrijum-citrata. Sve koloidne disperzije su čuvane na sobnoj temperaturi do sedam dana.

Sinteza koloida zlata putem redukcije Au(III) sa NaBH_4 izvedena je prema ranije opisanoj proceduri [121]. U 30 mL dejonizovane vode ohlađene u frižideru (4°C), je na magnetnoj mešalici uz energično mešanje, dodato 330 μL sveže pripremljenog rastvora 0,1 M NaBH_4 i 10 mL 1 mM KAuCl_4 , pri čemu je dobijena koloidna disperzija vino-crvene boje, označena kao C6. U drugom slučaju, redukcijom 100 mL 0,2 mM vodenog rastvora KAuCl_4 sa NaBH_4 , čija je finalna koncentracija u rastvoru bila 5,3 mM, na sobnoj temperaturi dobijena je koloidna disperzija rubin-crvene boje, označena kao C9,5.

Sinteza koloida zlata putem redukcije Au(III) sa trinatrijum-citratom izvedena je prema modifikovanoj proceduri koju su dali K.C. Grabar i saradnici [122]. Uzorak od 200 mL 1 mM HAuCl_4 je zagrejan do ključanja uz energično mešanje u balonu sa okruglim dnom na koji je postavljen refluks kondenzator. Nakon toga je, u rastvor brzo dodato, u jednom slučaju 20 mL a u drugom 10 mL 38,8 mM rastvora trinatrijum-citrata. Rastvori su ostavljeni da ključaju još 15 minuta, a zatim su ohlađeni do sobne temperature uz konstantno mešanje. Obe sinteze su ponovljene po dva puta i dobijene su

koloidne disperzije sfernih čestica zlata različitih srednjih veličina (određenih TEM-om), i to u prvom slučaju 15 i 17 nm koje su označene kao C15 i C17 i u drugom slučaju 30 i 47 nm, označene kao C30 i C47. Trinatrijum-citrat ima dvostruku ulogu, redukuje jone Au^{3+} i stabilizuje formirane nanočestice zlata adsorbujući se na njihovoj površini. Variranjem odnosa citrat/zlato kontroliše se veličina dobijenih nanočestica zlata, odnosno upotrebom manje količine citrata dobijaju se veće nanočestice. Međutim, čak i kada se ponovi ista procedura za sintezu koloida, mogu se dobiti čestice različitih srednjih veličina, kao što je to dobijeno i u slučaju C15 i C17 s jedne strane i C30 i C47 s druge strane.

Koncentracija nanočestica zlata je određena na osnovu dve metode:

- iz molarnog apsorpcionog koeficijenta, ε_λ , za odgovarajuću srednju veličinu nanočestica zlata (određenu TEM merenjima) i apsorpcije na maksimumu talasne dužine, prema Lambert-Beer-ovom zakonu i
- iz koncentracije zlata u koloidnoj disperziji, uzimajući u obzir prečnik nanočestice i gustinu zlata (jedn. (19)).

Vrednost molarnog apsorpcionog koeficijenta za nanočestice zlata veličine 5-6 nm određena u vodenoj disperziji na apsorpcionom maksimumu ($\lambda=520$ nm) iznosi $1,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [331], pa prema tome izračunata koncentracija nanočestica C6 u osnovnoj disperziji iznosi $7,4 \times 10^{-8} \text{ M}$. Koncentracija nanočestica zlata C9,5 u osnovnoj disperziji je određena iz apsorpcije na maksimumu površinskog plazmona ($\lambda=518$ nm) i molarnog apsorpcionog koeficijenta za nanočestice zlata veličine 9,5 nm, dobijene iz literaturnih podataka [332], $\varepsilon_\lambda = 2,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, i iznosi $0,28 \times 10^{-8} \text{ M}$. Za nanočestice zlata veličine 17 nm i 30 nm (C17 i C30), literaturni podatak za molarni apsorpcioni koeficijent, ε_λ , iznosi $6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [333] i $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [334], pa su iz apsorpcije na maksimumu površinskog plazmona (524 nm i 527 nm) određene koncentracije nanočestica u osnovnim disperzijama, koje iznose $0,74 \times 10^{-8} \text{ M}$ i $0,18 \times 10^{-8} \text{ M}$.

U slučaju nanočestica C15 i C47, uzimajući da su nanočestice zlata sfernog oblika, izračunata je koncentracija nanočestica (C_{NPs}) korišćenjem sledeće formule: $C_{\text{NPs}} = C/n$, pri čemu je C koncentraciji koloida zlata a n agregacioni broj, definisan kao:

$$n = \frac{\pi \cdot \rho \cdot N_A \cdot d^3}{6 \cdot M} \quad (19)$$

gde je ρ gustina zlata (19,3 g/cm³), d je prečnik čestice, N_A je Avogadrov broj čestica i M predstavlja atomsku masu zlata (196,97 g/mol). Izračunate vrednosti koncentracije nanočestica zlata su bile $1,1 \times 10^{-8}$ M za C15 i $3,7 \times 10^{-10}$ M za C47, uz pretpostavku da je redukcija Au(III) do atoma zlata 100% završena.

U Tabeli 2 su prikazane oznake za sve sintetizovane koloidne disperzije, odgovarajući redukcionni agensi i vrsta anjona u naelektrisanom sloju nakon redukcije Au(III), uslovi sinteze, talasna dužina na maksimumu apsorpcije, vrednosti molarnog apsorpcionog koeficijenta (ϵ_λ), koncentracije zlata i koncentracije originalno sintetizovanih nanočestica zlata. Potrebno je dodati da oznake koloida sadrže numeričku vrednost veličine čestice određene TEM merenjima.

Tabela 2. Karakterizacija nanočestica C6, C9,5, C17, C30, C15 i C47

Oznaka koloid. disperz.	Reduk. sredstvo	Vrsta anjona u naelektr. sloju	Uslovi sinteze	λ max [nm]	ε_{λ} [M ⁻¹ cm ⁻¹] ref. [331-336]	Konc. zlata [M]	Konc. nanočestica [M]
C6	natrijum-borhidrid	boratni	4° C	517	1,1×10 ⁷	1×10 ⁻³	7,4×10 ⁻⁸
C9,5	natrijum-borhidrid	boratni	sobna temperatura (20° C)	518	2,4×10 ⁸	2×10 ⁻⁴	0,28×10 ⁻⁸
C17	trinatrijum-citrat	citratni	ključanje (100° C)	524	6×10 ⁸	1×10 ⁻³	0,74×10 ⁻⁸
C30	trinatrijum-citrat	citratni	ključanje (100° C)	527	3×10 ⁹	1×10 ⁻³	0,18×10 ⁻⁸
C15	trinatrijum - citrat	citratni	ključanje (100° C)	523	2,7×10 ⁸	1×10 ⁻³	1,1×10 ⁻⁸
C47	trinatrijum - citrat	citratni	ključanje (100° C)	543	1,6×10 ¹⁰	1×10 ⁻³	3,7×10 ⁻¹⁰

Pri mešanju koloidnih disperzija zlata sa TC bojom je u svim slučajevima zapreminski odnos bio 2:1.

3.3 Aparature

3.3.1 TEM merenja

Za proučavanje morfologije i veličine nanočestica Au korišćena je transmisiona elektronska mikroskopija (TEM). TEM merenja uzoraka koloida zlata sa i bez TC boje su izvedena na Hitachi H-7000 i JEOL 100CX mikroskopu uz radni napon od 100 kV. Uzorci su pripremljeni stavljanjem kapi rastvora na mikroskopsku mrežicu prekrivenu tankim slojem ugljenika. Nakon sušenja uzorci su ispitivani TEM-om. Da bi se dobila srednja veličina čestice, za svaki uzorak je merena veličina više od 200 nanočestica.

3.3.2 DLS merenja

DLS merenja, kao merenja dinamičkog rasejanja svetlosti su izvedena na instrumentu Zeta-sizer Nano, ZS sa 633 nm He-Ne laserom, opremljenim sa MPT-2 Autotitratorom, Malvern, UK, na 25° C. Ovim instrumentom se mogu meriti čestice veličine od 0,6 nm do 6 µm. Dati instrument je korišćen za određivanje zeta potencijala Au nanočestica i Au/TC hibrida (agregata čestica-boja). Eksperimentalni podaci predstavljeni u ovom radu su srednja vrednost od najmanje osam uzastopnih merenja, pri čemu svaka kriva/merenje predstavlja srednji rezultat od 14 merenja (i svaka kriva, od ukupno 10, pripada posebnom merenju).

3.3.3 Spektrofluorimetrijska merenja

Emisija fotoluminiscencije je merena korišćenjem Fluorolog-3 Model FL3-221 spektrofluorimetra (HORIBA Jobin-Yvon). Ekscitacioni i emisijski monohromatori sa dve rešetke i disperzijom 2,1 nm/mm (1200 brazdi/mm) su podešeni na 330 nm (ili 406 nm) za ekscitaciju i 500 nm (420-600 nm) za emisiju. Za ekscitaciju je korišćena

ksenonska lampa a za merenja emisije je korišćen brzi TBX detektor sa odgovarajućom ugaonom konfiguracijom uz kivetu sa svetlosnim putem od 1 cm.

Potrebno je naglasiti da, pri spektrofluorimetrijskim merenjima, brojne vrednosti intenziteta fluorescencije pri različitim merenjima istih uzoraka nisu bile konstantne, kao i da se na različitim tipovima spektrofluorimetara dobijaju različite merene vrednosti istih uzoraka. Time nije umanjena tačnost merenja, jer se pri obradi rezultata koriste i poredbe vrednosti u odnosu na maksimalnu vrednost intenziteta fluorescencije u određenom sistemu ili se, jednostavnosti radi, izvrši normalizovanje intenziteta u odnosu na maksimalnu vrednost intenziteta fluorescencije u datom - merenom sistemu.

3.3.4 Spektrofotometrijska merenja

Za merenje apsorpcionih spektara je korišćen Perkin Elmer Lambda 35 UV-Vis spektrofotometar, pri čemu je korišćena kvarčna kiveta sa dužinom svetlosnog puta (optička dužina puta) 1 cm.

3.3.5 Kinetička merenja

Za merenja brzine reakcije je korišćen stopped-flow dodatak spektrofotometru za brzu kinetiku, HIGH-TECH model SFA 12, koji se sastoji od dva šprica, povezana sa termostatiranom kvarcnom kivetom od 25 μl ($0,25 \text{ cm}^3$) i sa dužinom svetlosnog puta 1 cm. Mrtvo vreme aparature (tj. vreme za koje smeša dva rastvora stigne do kivete u spektrofotometru) iznosi 20 ms. Zapreminski odnos za mešanje TC boje i Au koloida C6 je bio 1:2. Brzina reakcije je određena iz promene apsorpcije na 475 nm – talasna dužina rezonancije ekscitona i fluorescencije na 490 nm. Sva kinetička merenja su bila reproduktivna u okviru granica greške od $\pm 5\%$, a izračunate vrednosti konstanti brzina predstavljaju srednju vrednost od najmanje 5 merenja pod identičnim eksperimentalnim uslovima. Termostat sa granicom greške $\pm 0,1^\circ \text{ C}$ je korišćen za merenja na različitim temperaturama, u intervalu od 289 do 303 K.

3.3.6 FTIR merenja

Interakcija nanočestica zlata sa TC bojom u vodenom rastvoru ispitivana je metodom transmisiona spektroskopije infracrvenog zračenja (FTIR). Infracrveni spektri snimljeni su u modu atenuirane totalne refleksije (FTIR-ATR). Rezultati ove metode dobijeni su pomoću Thermo Electron Corporation Nicolet 380 spektrofotometra u opsegu talasnih brojeva od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} usrednjavanjem skupa podataka od 200 članova.

3.3.7 Mikroskopska merenja

Ćelije sa mikronukleusima su analizirane AxioImager A1 mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Germany) sa uvećanjem od 400 ili 1000 puta. Za analizu ćelija sa γ -H2AX fokusima korišćen je epifluorescentni mikroskop AxioImager A1 (Carl Zeiss) i Image J program.

3.4 Metode ispitivanja citotoksičnih efekata nanočestica zlata

Analiza MN (mikronukleusi) i CBPI (citokinezis-blok proliferativni indeks) urađena je na uzorcima krvi koji su dobijeni od tri zdrava donora, u skladu sa zdravstvenim i etičkim propisima Republike Srbije [337].

3.4.1 Citokinezis blok-mikronukleusni (CB-MN) test

Za analizu mikronukleusa (MN), alikvoti (0,5 mL) heparinizirane pune krvi ispitanika zasejani su u 4,5 mL PBmax medijuma (Invitrogen-Gibco). Postavljen je odgovarajući broj ćelijskih kultura koje su tretirane rastućim koncentracijama koloida zlata C15 i C47. Analiza mikronukleusa rađena je citokinezis blok-mikronukleusnim (CB-MN) testom [338]. Kulture limfocita su gajene 72 sata na 37° C, od čega poslednja 24 sata u prisustvu citohalazina B (Sigma, Aldrich) finalne koncentracije 4 µg/mL. Nakon toga ćelije su isprane blagim hipotoničnim rastvorom (0,56 % KCl : 0,9 % NaCl, 1:1), a zatim fiksirane u McCarnoy fiksativu (metanol : glacijalna sirćetna kiselina, 3:1) 3 - 4 puta. Preparati su pravljani nakapavanjem ćelijske suspenzije na mikroskopska predmetna stakla. Na vazduhu osušeni preparati su obojeni 2 %-tnim rastvorom alkalne Gimze (Merck). Analizirano je najmanje 1000 ćelija po uzorku upotrebom AxioImager A1 mikroskopa (Carl Zeiss) na uveličanju 400x ili 1000x. Sve analize su rađene u triplikatu.

Proliferacija ćelija *in vitro* je procenjena određivanjem broja ćelija sa 1-4 jedra na istim mikroskopskim predmetnim staklima. Rezultati ovih analiza su predstavljeni kao citokinezis-blok proliferativni indeks (CBPI, cytokinesis-block proliferation index). CBPI je računat po formuli: $CBPI = MI + 2MII + 3[MIII+MIV]/N$, gde MI-MIV predstavlja broj ćelija sa 1-4 jedra, a N je ukupni broj analiziranih ćelija [339].

3.4.2 Tehnika imunocitohemijske fluorescencije (γ -H2AX esej)

Za analizu γ -H2AX fokusa, korišćena je humana ćelijska linija fibroblasta kože (normal human dermal fibroblasts, PromoCell). Fibroblasti su gajeni pod standardnim uslovima za kulture tkiva u DMEM medijumu (Dulbecco's Modified Eagle Medium), obogaćenim sa 10% telećeg seruma, na 37° C.

Za tehniku imunocitohemijske fluorescencije, eksponencijalno rastuće fibroblastne ćelije zasejane su na odgovarajući broj polilizinskih pločica (Sigma-Aldrich) koje su inkubirane 24 h u sterilnim, vlažnim plastičnim petri šoljama, na 37° C. Nakon toga ćelije na polilizinskim pločicama tretirane su rastućim dozama koloidnih nanočestica zlata C15 i C47. Dvadesetčetiri sata nakon tretmana polilizinske pločice sa ćelijama su fiksirane u 4% formaldehidu, permeabilizovane sa 0,2% triton X-100, a zatim obeležene sa primarnim anti-fosfo H2AX (Ser 139) monoklonskim antitelom i sekundarnim antitelom obeleženim fluorescein-izotiocianatom - FITC (Sigma, Aldrich). Pločice su zatim obojene sa DAPI/Antifade (4',6'-diamidino-2-fenilindol) (Vector Laboratories), pokrivene pokrovnim pločicama i zalepljene lakom. Ćelije sa γ -H2AX fokusima analizirane su pomoću epifluorescentnog mikroskopa Axiomager A1 (Carl Zeiss) i Image J programa.

3.4.3 Statistička analiza

Statistička analiza vrednosti analiziranih parametara urađena je korišćenjem Student-ovog T-testa i Product-Moment i parcijalnih korelacija statističkog paketa „Statistika 6.0“ za Microsoft Windows. Vrednosti $p < 0,05$ su smatrane značajnim.

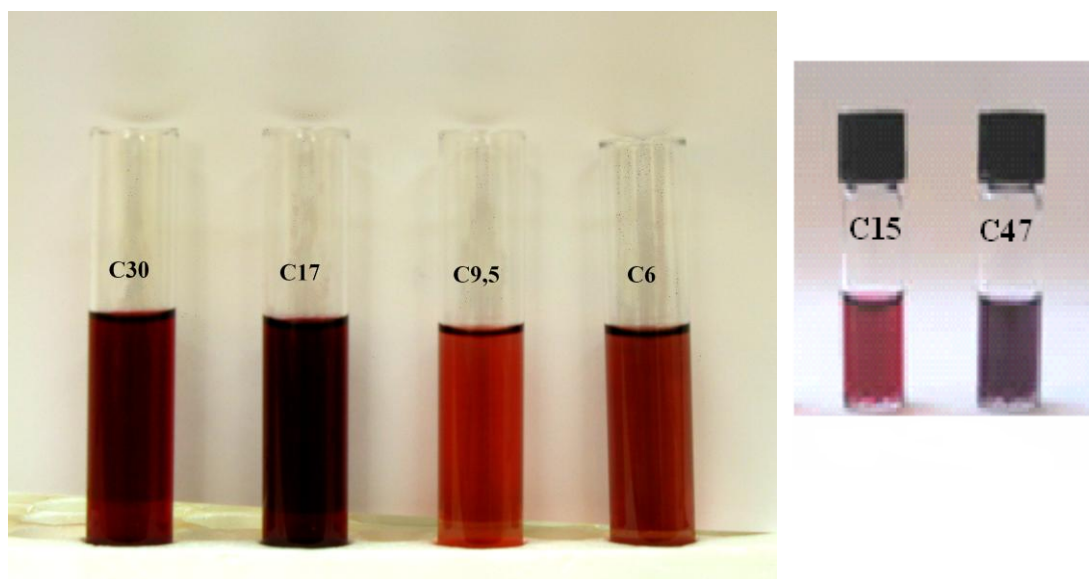
4 Rezultati

4.1 Karakterizacija koloidnih čestica zlata

Karakterizacija svih sintetizovanih koloidnih disperzija zlata, C6, C9,5, C15, C17, C30 i C47, izvršena je snimanjem apsorpcionih spektara, TEM i DLS merenjima, pri čemu je određena i raspodela čestica po veličini, kao i merenjem zeta potencijala.

4.1.1 Apsorpcioni spektri koloidnih rastvora zlata

Fotografije svih sintetizovanih koloidnih disperzija zlata sa različitim veličinama čestica, označenih kao C6, C9,5, C17, C30, C15 i C47 su prikazane na Slici 17.

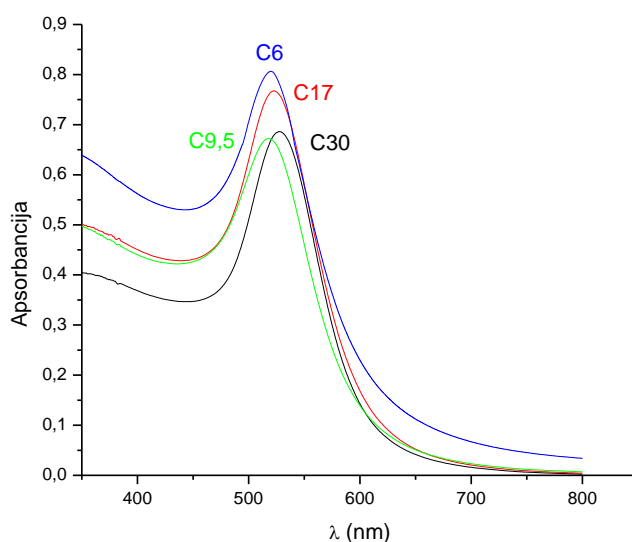


Slika 17. Fotografije koloidnih disperzija C30, C17, C9,5, C6, C15 i C47

Vidi se da se, sa povećanjem veličine (prečnika) nanočestica u koloidnim disperzijama, boja rastvora menja od vino-crvene boje (C6) do ljubičaste (C47). Intenzivna apsorpcija nanočestica zlata potiče od kolektivnih oscilacija slobodnih elektrona u provodnoj traci pod dejstvom spoljašnjeg elektromagnetnog polja. Obojenost ovih rastvora potiče od lokalizovane rezonancije površinskih plazmona u vidljivoj oblasti.

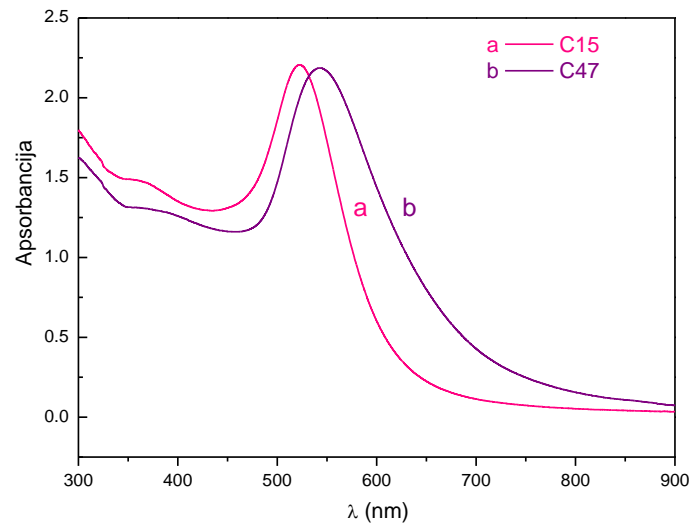
Pritom se sa povećanjem prečnika nanočestice, apsorpcioni maksimum pomera ka crvenoj oblasti tj. većim talasnim dužinama (Slika 17), što ima za posledicu različito obojenje rastvora pa je boja sve tamnija. Talasna dužina na kojoj će se javiti traka plazmona kao i apsorpcija zavise od procedure sinteze tj. od veličine i oblika nanočestica, rastojanja između čestica i dielektričnih konstanti sredine u kojoj se one nalaze [340-343].

Na Slici 18 su prikazani apsorpcioni spektri koloidnih disperzija zlata C6 ($7,4 \times 10^{-8}$ M), C9,5 ($2,8 \times 10^{-9}$ M), C17 ($1,3 \times 10^{-9}$ M) i C30 (3×10^{-10} M), koji su okarakterisani apsorpcionim maksimumima na 517 nm, 518 nm, 524 nm i 527 nm (Tabela 2) koji potiču od rezonancije površinskih plazmona.



Slika 18. Apsorpcioni spektri sintetizovanih koloidnih disperzija zlata C6 ($7,4 \times 10^{-8}$ M), C9,5 ($2,8 \times 10^{-9}$ M), C17 ($1,3 \times 10^{-9}$ M) i C30 (3×10^{-10} M)

Na Slici 19 prikazani su UV-Vis apsorpcioni spektri koloidnih disperzija C15 i C47, koncentracija $1,1 \times 10^{-8}$ M i $3,7 \times 10^{-10}$ M, koji su okarakterisani apsorpcionim maksimumima na 523 i 543 nm (Tabela 2).



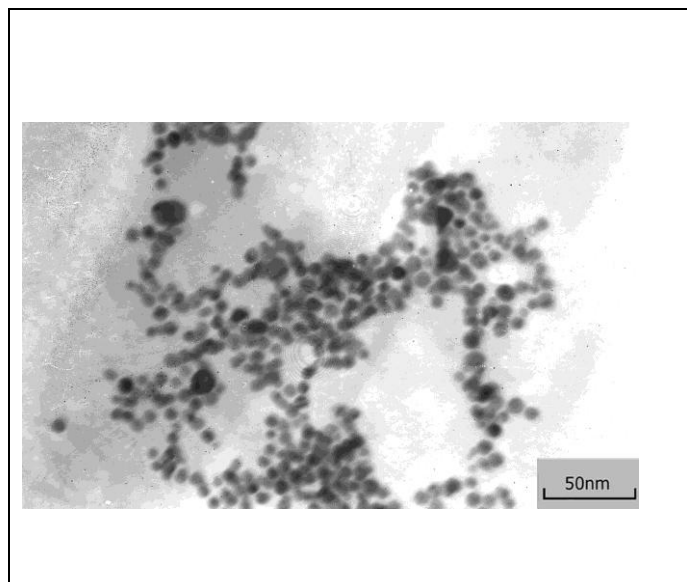
Slika 19. Apsorpcijski spektri sintetizovanih koloidnih disperzija zlata C15 ($1,1 \times 10^{-8}$ M) (a) i C47 ($3,7 \times 10^{-10}$ M) (b); boja krive odgovara boji rastvora

4.1.2 Određivanje veličine i oblika koloidnih čestica TEM merenjima

TEM merenjima je određena veličina, oblik i distribucija svih sintetizovanih nanočestica zlata i karakterizacija koloidnih disperzija C6, C9,5, C17 i C30 u prisustvu TC boje.

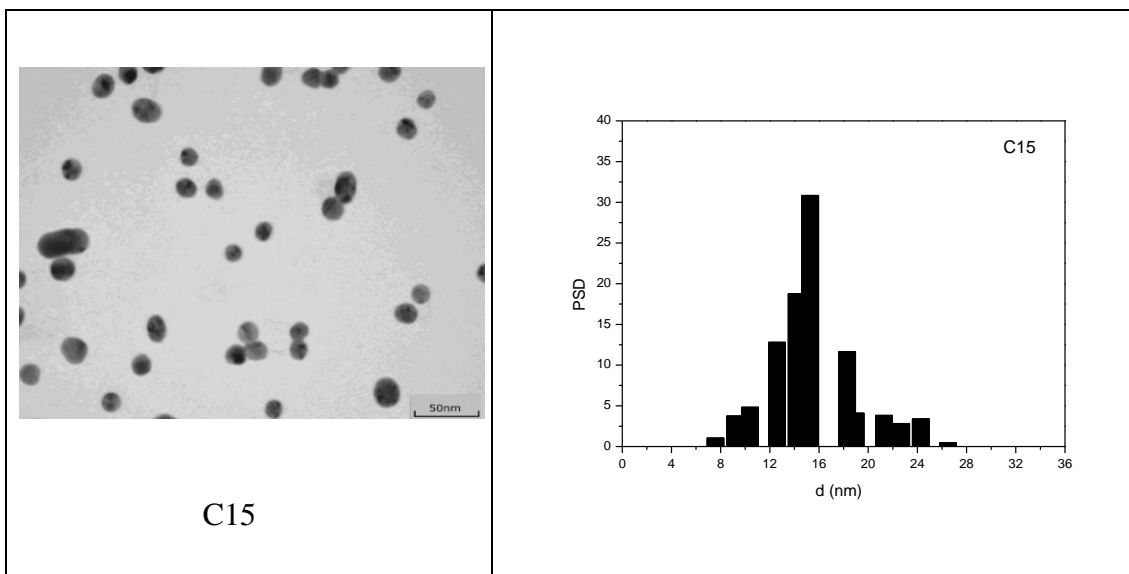
4.1.2.1 TEM karakterizacija koloidnih čestica

Veličine (prečnik, d) i oblik (morfologija) nanočestica zlata su ispitani TEM-om. Na Slici 20 je prikazana mikrografija sintetizovane koloidne disperzije C6.

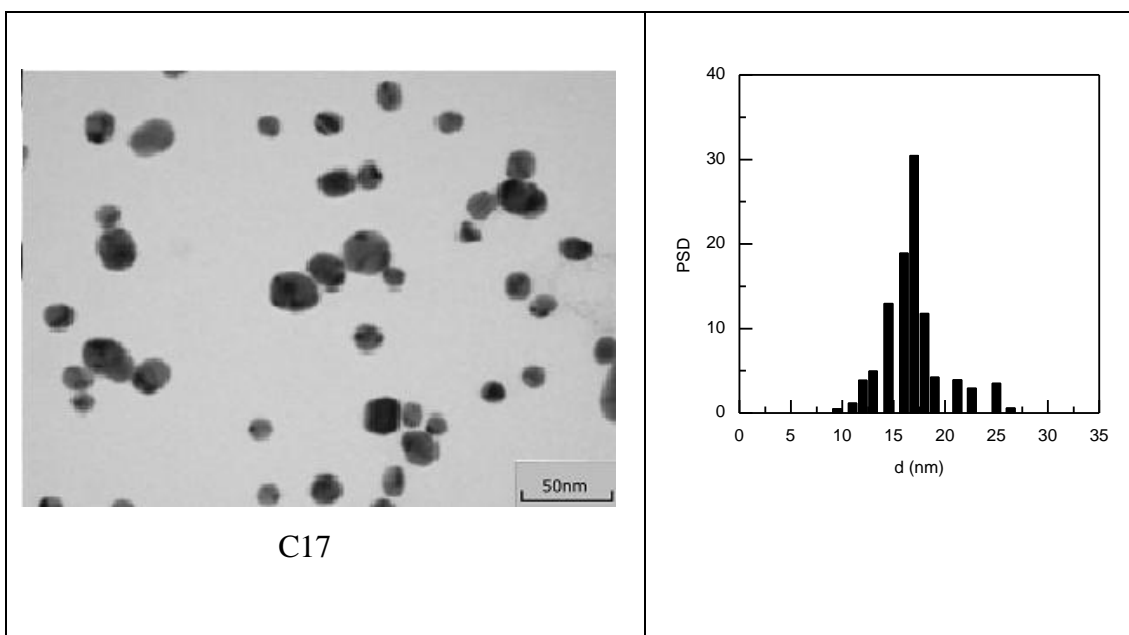


Slika 20. TEM mikrografija nanočestica C6 sa adsorbovanim boratnim jonima

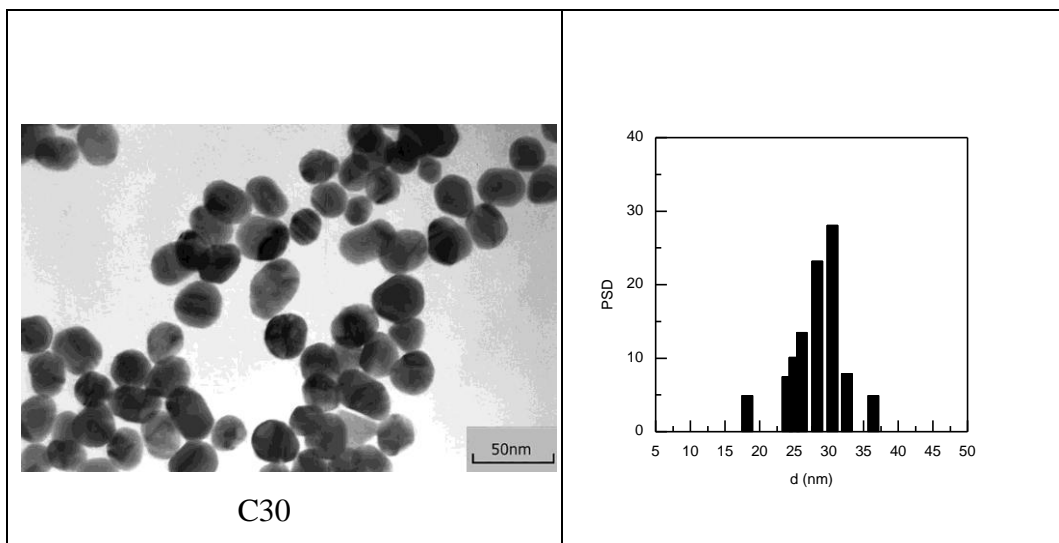
Kao primer, od Slike 21 do Slike 24 su prikazane mikrografije svih ostalih sintetizovanih koloidnih disperzija zlata sa adsorbovanim citratnim jonima (C15, C17, C30 i C47) uporedno sa odgovarajućim histogramima raspodele veličine čestica (PSD).



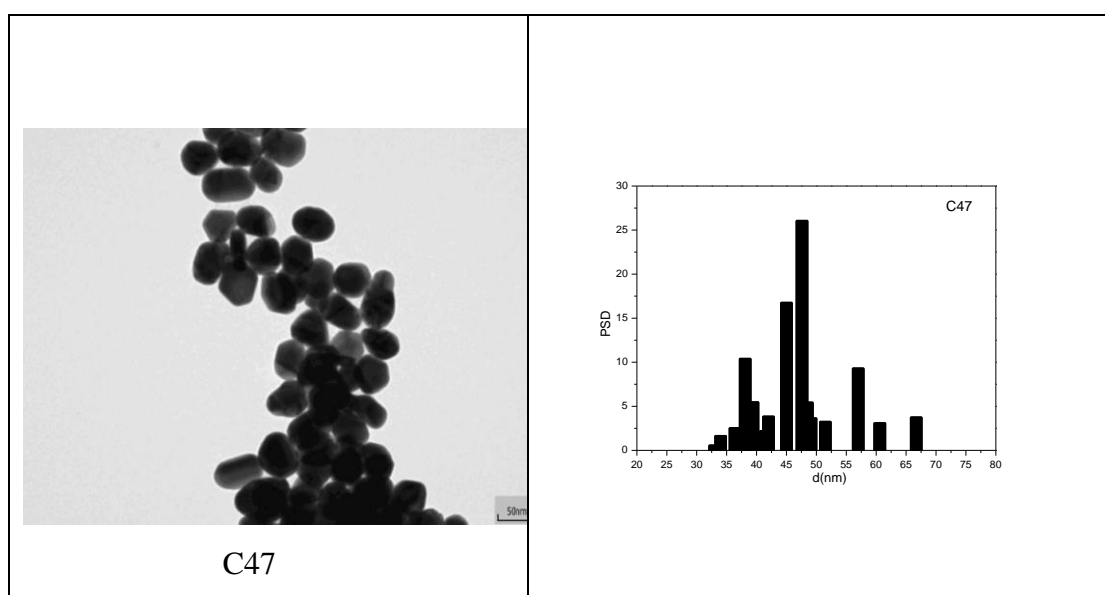
Slika 21. TEM mikrografija nanočestica C15 sa adsorbovanim citratnim jonima (levo) i odgovarajući histogram raspodele čestica (desno)



Slika 22. TEM mikrografija nanočestica C17 sa adsorbovanim citratnim jonima (levo) i odgovarajući histogram raspodele čestica (desno)



Slika 23. TEM mikrografija nanočestica C30 sa adsorbovanim citratnim jonima (levo) i odgovarajući histogram raspodele čestica (desno)

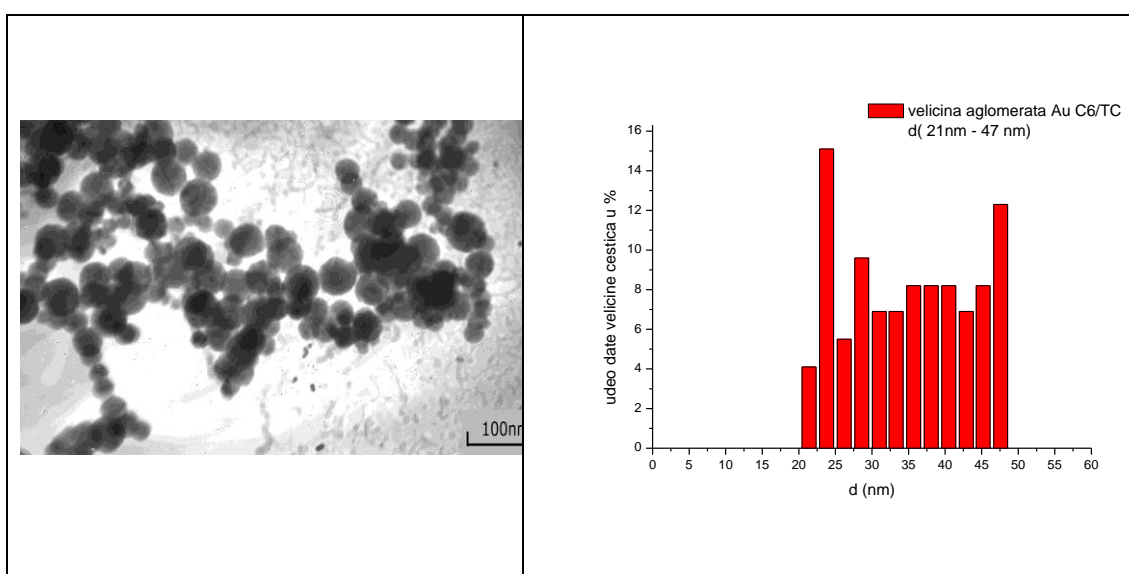


Slika 24. TEM mikrografija nanočestica C47 sa adsorbovanim citratnim jonima (levo) i odgovarajući histogram raspodele čestica (desno)

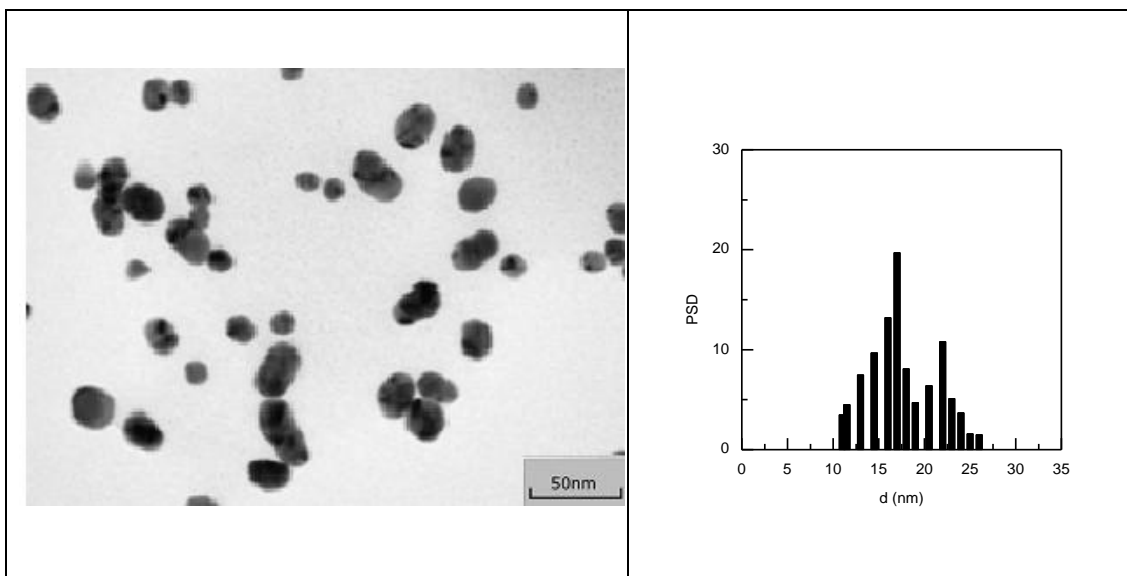
Na osnovu TEM merenja, ustanovljeno je da su sve sintetizovane nanočestice zlata približno sfernog oblika sa relativno uskom distribucijom veličina. Dobijeni srednji prečnici (d), za sve sintetizovane nanočestice zlata su predstavljeni u Tabeli 3.

4.1.2.2 TEM karakterizacija koloidnih čestica u prisustvu TC boje

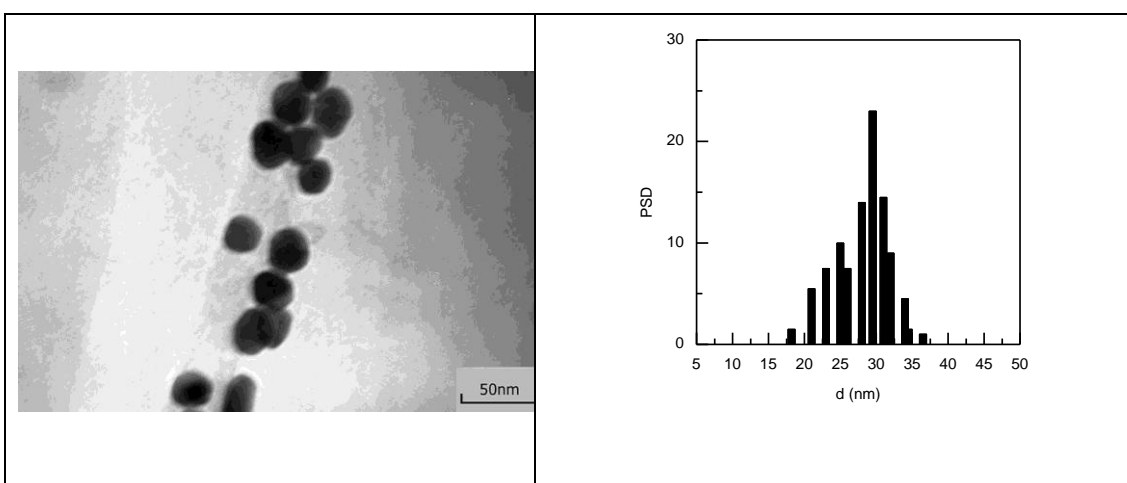
TEM merenjima je ispitana i interferencija sintetizovanih koloidnih disperzija C6, C9,5, C17 i C30 sa TC bojom. Pritom je, u svim slučajevima, zapreminski odnos kod mešanja koloidnih disperzija i TC boje bio 2:1, a finalna koncentracija TC $1,67 \times 10^{-5}$ M. Kao primer, od Slike 25 do Slike 27 su prikazane mikrografije koloidnih disperzija C6, C17 i C30 u prisustvu TC boje uporedno sa odgovarajućim histogramima raspodele veličine čestica (PSD).



Slika 25. TEM mikrografija nanočestica C6 u prisustvu TC boje (levo) i odgovarajući histogram raspodele čestica (desno)

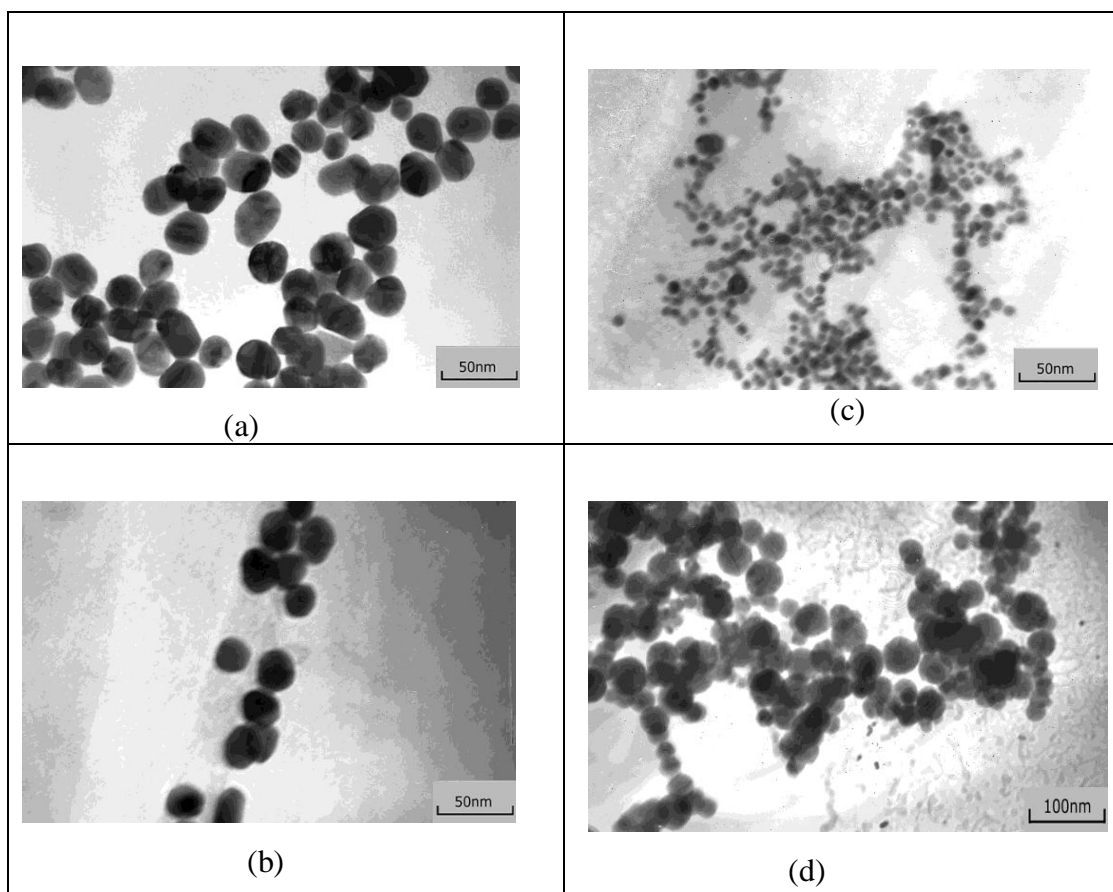


Slika 26. TEM mikrografija nanočestica C17 u prisustvu TC boje (levo) i odgovarajući histogram raspodele čestica (desno)



Slika 27. TEM mikrografija nanočestica C30 u prisustvu TC boje (levo) i odgovarajući histogram raspodele čestica (desno)

Upoređivane su individualne reakcije koloidnih disperzija sa TC bojom, a na Slici 28 su kao primer prikazane tipične TEM mikrografije koloidnih disperzija C30 i C6 pre i nakon dodatka TC boje radi poređenja.



Slika 28. TEM analiza: Au nanočestice (C30) u odsustvu TC boje (a); Au nanočestice C30 u prisustvu TC boje (b); Au nanočestice (C6) u odsustvu TC boje (c); Au nanočestice C6 u prisustvu TC boje (d)

Sa Slike 28 se može videti da se svojstva ovih čestica značajno razlikuju u prisustvu TC boje. Za razliku od čestica C30, prisustvo TC boje izaziva aglomeraciju nanočestica C6, pri čemu je izmerena veličina ovih Au/TC hibridnih čestica u opsegu 21-47 nm (Slika 28 (d)). Do aglomeracije je došlo usled narušavanja stabilnosti čestica malih dimenzija i velike površinske energije u prisustvu TC boje koja je formirala J-agregate. Pored toga, ovakav rezultat jasno ukazuje da dolazi do smanjenja odbojnih sila difuzionog sloja između negativno naelektrisanih nanočestica C6 nakon adsorpcije TC boje, na taj način olakšavajući agregaciju. Ovo ukazuje na to da prisustvo TC boje u ovom rastvoru koloida utiče na rast nanočestica.

I u slučaju koloida C30 (veće Au nanočestice, Slika 23 i 28 (a)) i C17 (Slika 22) TC boja je adsorbovana na površini nanočestica Au, što se može videti iz promene

kontrasta na TEM mikrografiji (Slika 27 i 28 (b) i Slika 26). Međutim, adsorpcija TC boje na ovim nanočesticama Au nema značajnog uticaja na veličinu čestice i ne izaziva aglomeraciju, već izvesno uređenje čestica.

4.1.3 Određivanje veličine koloidnih čestica DLS metodom

4.1.3.1 DLS karakterizacija sintetizovanih koloidnih čestica zlata

Veličine čestica svih sintetizovanih koloidnih disperzija, kao i raspodela veličina čestica po intenzitetu i zapremini, je određena i metodom dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS metoda). Za razliku od TEM merenja, vrednost srednjeg prečnika nanočestica koja se dobija DLS merenjima, d , predstavlja hidrodinamički prečnik sfere (tj. prečnik čestice sa hidratacionim omotačem) koja ima istu zapreminu kao čestica i predstavlja srednju vrednost prečnika svih merenih čestica (Tabela 3).

Poređenje rezultata dobijenih TEM i DLS merenjima (Tabela 3) je pokazalo da su veličine čestica dobijene TEM merenjima bile manje od istih dobijenih DLS merenjima, pošto se kod merenja veličine čestice DLS metodom uzima u obzir i dodati rastvarač ili stabilizator koji se kreće zajedno sa česticom. Pritom, može se primetiti da je razlika u vrednosti prečnika dobijenog TEM i DLS metodom, u prisustvu TC boje značajna samo u slučaju najmanjih sintetizovanih čestica, C6. Osim toga, potrebno je naglasiti da DLS metodom dobijamo informacije koje se odnose na veličinu agregata pre nego na prečnik individualne nanočestice, dok se kod TEM-a meri vrednost zasnovana na distribuciji veličine čestica samo na osnovu fizičke veličine (u fizičkom smislu).

4.1.3.2 DLS karakterizacija sintetizovanih koloidnih čestica zlata u prisustvu TC

Da bi se ispitaio uticaj TC boje na svojstva koloidnih disperzija C6, C9,5, C17 i C30, izvršena su DLS merenja i u prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje.

Srednje vrednosti prečnika sintetizovanih nanočestica zlata (d), dobijene TEM i DLS merenjima (PSD po zapremini i intenzitetu), zajedno sa vrednostima indeksa polidisperznosti (PDI) u odsustvu i prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC, date su u Tabeli 3.

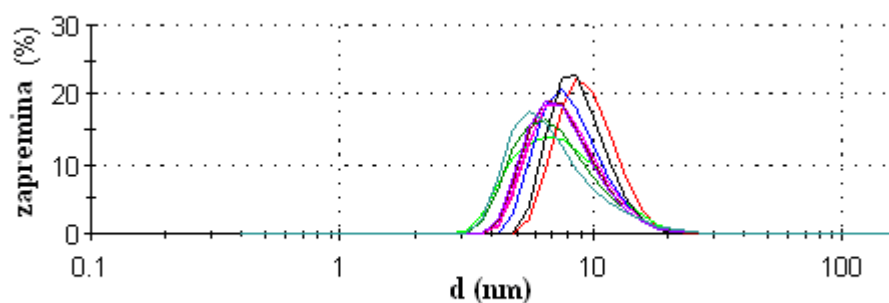
Tabela 3. Srednje vrednosti prečnika nanočestica zlata dobijene TEM i DLS merenjima i indeks polidisperznosti u odsustvu i prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC

Oznaka koloida	Srednja vrednost prečnika, d, (nm)					PDI (indeks polidisperz.)
	TEM merenja	DLS metoda				
		PSD (po zapremini)	PSD (po intenzitetu)			
			Pik 1: z, nm (Int %)*	Pik 2: z, nm (Int %)*	Pik 3: z, nm (Int %)*	
C6	6±0,5	10±1	10,94 (80,4%)	36,19 (14,5%)	104,1 (5,13%)	0,548±0,050
C6 +TC	21-47	35±1	35,5 (96,7%)	103,3 (3,3%)	–	0,455±0,025
C9,5	9,5±0,5	11±1	10,9 (97%)	85,2 (3%)	–	0,554±0,030
C9,5 +TC	9,5±1	11±3	11,1 (95,9%)	83,3 (4,1%)	–	0,506±0,171
C15	15±2	17,93±0,34	–	–	–	0,300±0,030
C17	17±0,5	19±1	20,2 (98,5%)	102 (1,5%)	–	0,300±0,003
C17 +TC	17±1	19±2	19,2 (80%)	30,1 (20%)	–	0,340±0,068
C30	30±0,5	33±1	33,1 (85%)	45 (15%)	–	0,334±0,062
C30 +TC	30±1	33±3	33,2 (98%)	102 (2%)	–	0,364±0,005
C47	47±2	49,44±2,76	–	–	–	0,334±0,062

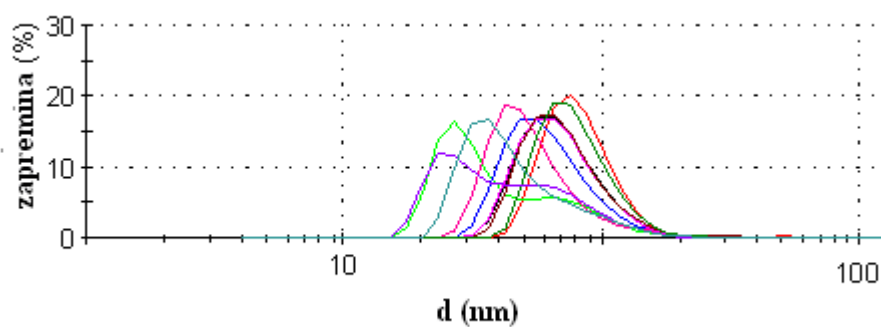
* procentni udeo čestice koje imaju datu veličinu

Za ilustraciju su kao primer dati DLS grafici raspodele veličine čestica (PSD), zasnovana na merenju rasejanja svetlosti po zapremini i intenzitetu. Merenja su izvedena korišćenjem 5×10^{-8} M rastvora nanočestica C6, u odsustvu i prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje. Sva merenja su rađena na temperaturi od 25°C , pri čemu je indeks refrakcije bio 1.

Na Slici 29 (a) i (b) je predstavljena raspodela veličina čestica po zapremini DLS metodom za koloidnu disperziju C6 bez i u prisustvu TC boje, dok je raspodela veličina čestica po intenzitetu data na Slici 30 (a) i (b).

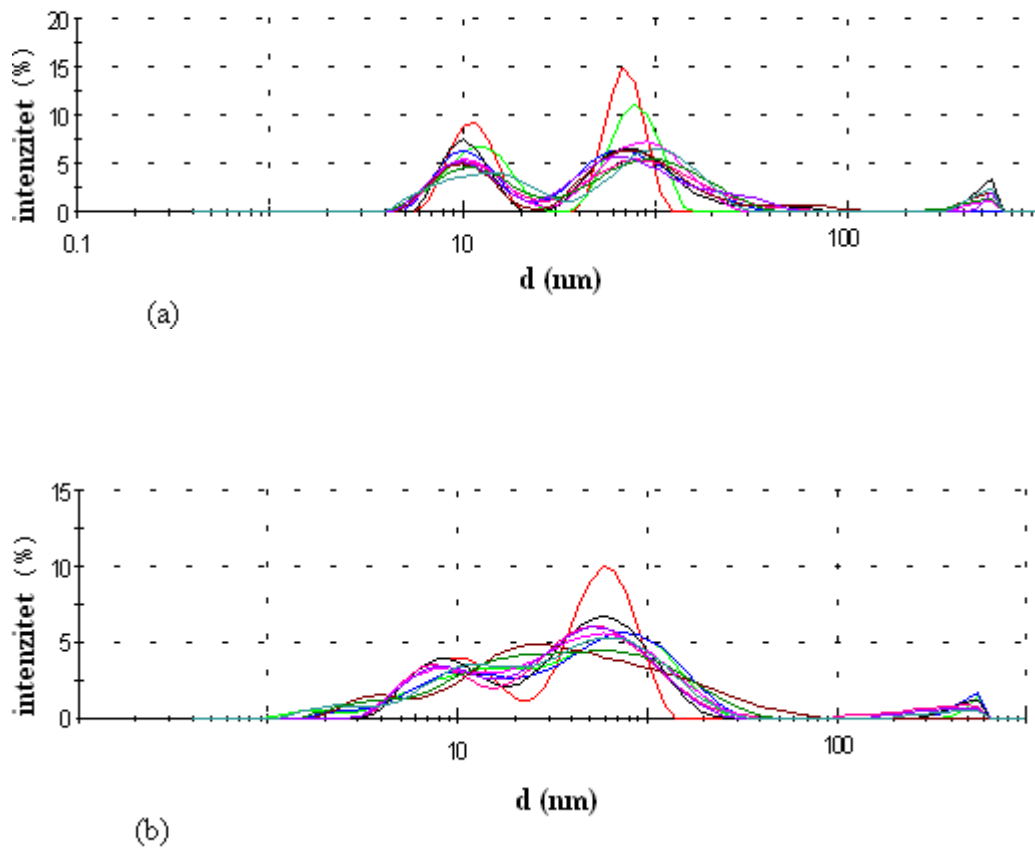


(a)



(b)

Slika 29. PSD po zapremini za Au solove C6 (a) i C6+TC (b)



Slika 30. PSD po intenzitetu za Au solove C6 (a) i C6+TC (b)

U Tabeli 4 i 5 su date odgovarajuće vrednosti prečnika čestice, indeks polidisperznosti, intenziteti pikova i površina ispod pikova u procentima (%) za 10 pojedinačnih merenja, kao i njihove srednje vrednosti za nanočestice C6 u odsustvu i prisustvu TC.

Tabela 4. Srednje vrednosti prečnika nanočestice C6, d, PDI i srednji intenziteti pikova

Br. snimanja	d (nm)	PDI	Pik 1 srednji intenz. d (nm)	Pik 2 srednji intenz. d (nm)	Pik 3 srednji intenz. d (nm)	Pik 1 površina intenz. (%)	Pik 2 površina intenz. (%)	Pik 3 površina intenz. (%)
1	8,5	0,134	10,2	26,2	105,3	64,7	17,4	6,1
2	10,3	0,747	10,5	55,8	100,9	69,3	16,3	4,6
3	11,7	0,763	10,6	28,3	101,2	77,9	12,9	4,9
4	11,9	0,527	10,4	26,7	97,9	82,3	14,7	5,5
5	12,2	0,677	11,9	28,6	107,8	88,2	18,1	6,9
6	9,7	0,560	10,7	35,4	99,7	71,9	13,3	4,5
7	10,8	0,521	11,4	51,3	103,1	89,7	12,5	3,9
8	9,7	0,529	10,9	57,8	104,8	88,6	14,7	5,7
9	13,0	0,512	11,2	29,5	102,9	84,1	12,8	4,4
10	10,8	0,511	11,6	22,3	117,4	87,4	11,9	4,8
srednja vrednost	10,9	0,548	10,94	36,19	104,1	80,41	14,46	5,13

Ovo npr. znači da Pik 1 pokazuje da 80,41 % čestica ima veličinu 10,94 nm, Pik 2 da je 14,46 % čestica veličine 36,19 nm i Pik 3 da je 5,13 % čestica veličine 104,1 nm. Pritom je srednja vrednost veličine čestice $d = 10,9 \pm 1,00$ i $PDI = 0,548 \pm 0,05$.

Tabela 5. Srednje vrednosti prečnika nanočestice C6+TC, d, PDI i srednji intenziteti pikova

Br. snimanja	d (nm)	PDI	Pik 1 srednji intenz. d (nm)	Pik 2 srednji intenz. d (nm)	Pik 3 srednji intenz. d (nm)	Pik 1 površina intenz. (%)	Pik 2 površina intenz. (%)	Pik 3 površina intenz. (%)
1	39,7	0,243	40,5	106,4	–	70,5	3,2	–
2	26,8	0,216	15,1	116,2	–	79,9	4,1	–
3	41,3	0,217	30,4	104,4	–	90,4	3,4	–
4	41,1	0,389	40,7	96,7	–	90,7	3,1	–
5	32,9	0,627	60,1	106,8	–	115	3,2	–
6	29,7	0,549	30,2	106,7	–	95,0	3,5	–
7	34,4	0,639	20,8	83,7	–	95,9	2,4	–
8	27,5	0,771	40,6	109,8	–	111	2,6	–
9	46,3	0,326	25,9	110,3	–	110	3,4	–
10	35,5	0,570	50,8	91,9	–	109	3,6	–
srednja vrednost	35,5	0,455	35,5	103,3	–	96,74	3,2	–

Pik 1 pokazuje da 96,74 % čestica ima veličinu 35,5 nm, a Pik 2 da je 3,2 % čestica veličine 103,3 nm. Pritom je srednja vrednost veličine čestice $d = 35,5 \pm 1,00$ i $PDI = 0,455 \pm 0,025$.

Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da su veličine nanočestica zlata na kojima je adsorbovana TC boja, dobijenih DLS metodom, u svim slučajevima neznatno veće od veličina nanočestica zlata bez TC boje, osim u slučaju najmanjih sintetizovanih nanočestica C6, gde je ova razlika dosta veća. Ovo je u skladu sa očekivanjima, jer se pri adsorpciji molekula TC boje na nanočesticu zlata uvećava hidrodinamički prečnik ovih nanočestica. Pomeranje vrha (maksimuma) krivih ka nižim vrednostima prečnika ukazuje na polidisperznost ovih solova (Tabela 3).

4.1.4 Merenja zeta potencijala

Poznato je da se nanočestice zlata sintetizovane po metodama opisanim u poglavlju 3.2 sastoje od elementarnog jezgra zlata okruženog dvostrukim slojem negativno naelektrisanih jona [136]. Ova naelektrisanja su određena merenjem zeta potencijala čestice u svakom pojedinačnom sistemu. Naime, za sve osnovne koloidne disperzije zlata meren je pH i zeta potencijal, a u slučaju koloidnih disperzija C6, C9,5, C17 i C30 merenja zeta potencijala i provodljivosti su izvedena i u prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje (Tabela 6).

Tabela 6. pH, zeta potencijal i provodljivost sintetizovanih koloidnih disperzija zlata u odsustvu i prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje

Koloid	Koncentracija (M)	pH	Zeta potencijal (mV)		Provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	
			bez TC	sa TC	bez TC	sa TC
C6	$7,4 \times 10^{-8}$	6,54	$-36,0 \pm 2,0$	$-32,0 \pm 0,5$	221 ± 9	286 ± 8
C9,5	$0,28 \times 10^{-8}$	9,18	$-37,3 \pm 0,7$	$-34,1 \pm 0,8$	479 ± 1	383 ± 9
C15	$1,1 \times 10^{-8}$	8,5	$-44,9 \pm 1,3$	–	–	–
C17	$0,74 \times 10^{-8}$	5,59	$-43,9 \pm 1,3$	$-41,8 \pm 0,9$	1060 ± 14	768 ± 9
C30	$0,18 \times 10^{-8}$	3,81	$-38,0 \pm 0,8$	$-35,8 \pm 0,9$	649 ± 2	498 ± 4
C47	$3,7 \times 10^{-10}$	8,5	$-38,0 \pm 0,8$	–	–	–

Može se primetiti da, sa povećanjem količine negativno naelektrisanih citratnih odnosno boratnih jona adsorbovanih na površini sintetizovanih nanočestica Au raste i apsolutna vrednost zeta potencijala. Pored toga, sa dodatkom TC boje u koloidne disperzije C6, C9,5, C17 i C30 nije došlo do promene pH vrednosti, ali se može primetiti blago smanjenje vrednosti zeta potencijala. Uzrok ovog smanjenja zeta potencijala bi mogao biti u slabim elektrostatičkim interakcijama između citratnih/boratnih anjona adsorbovanih na površini nanočestice i pozitivno naelektrisane tiazolne vrste TC boje. Rezultat ovakve interakcije je delimična neutralizacija zeta potencijala ovih nanočestica zlata.

Poznato je da dodavanje organskih jedinjenja, koja ne disosuju u vodenom rastvoru, ima za posledicu smanjenje provodljivosti. Slični rezultati su dobijeni i nakon dodatka TC boje u koloidne disperzije C30, C17 i C9,5 (Tabela 6). Međutim, u slučaju

koloida C6 je nakon dodatka TC boje došlo do porasta provodljivosti usled formiranja J-agregata boje [344,345].

Ovim rezultatima je potvrđeno da su sve sintetizovane nanočestice Au negativno naelektrisane na površini, kao i Au/TC hibridne čestice C6, C9,5, C17 i C30.

4.2 Adsorpcija TC boje na površini nanočestica zlata

Za ispitivanje adsorpcije TC boje na površini nanočestica zlata korišćene su koloidne disperzije C6, C9,5, C17 i C30. U tom cilju su snimani apsorpcioni i fluorescentni spektri TC boje (poglavlje 4.2.1), a potom je posebno ispitivana reakcija boje sa:

a) koloidnim disperzijama sa adsorbovanim citratnim jonima (C17 i C30), poglavlje 4.2.2

b) koloidnim disperzijama sa adsorbovanim boratnim jonima (C6 i C9,5), poglavlje 4.2.3 i

c) formiranje J-agregata TC boje u prisustvu koloida C6, poglavlje 4.2.4.

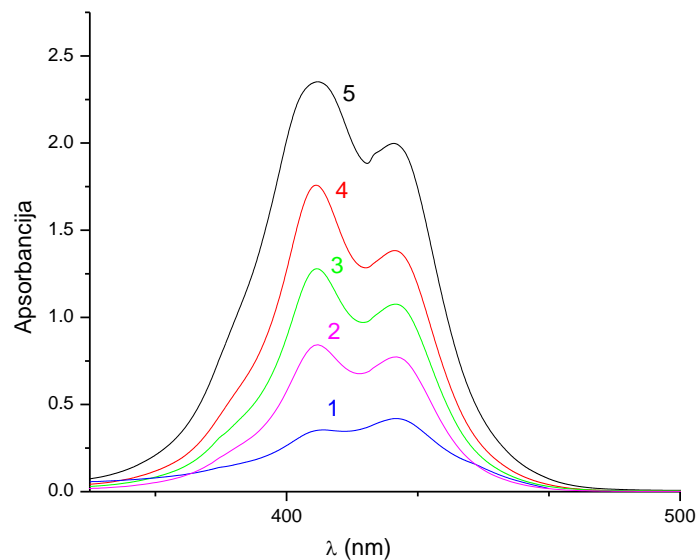
Pritom su izračunate konstante ravnoteže za proces adsorpcije (poglavlje 4.2.2.5 i 4.2.3.5), a posebno je ispitana kinetika i mehanizam formiranja J-agregata dobijenih na površini samo jednog od koloida zlata - C6 i utvrđeni su aktivacioni parametri za ovu reakciju (poglavlje 4.2.4.3 b). Osim toga, ispitan je i uticaj metalnih katjona u različitim oksidacionim stanjima na reakciju J-agregacije (poglavlje 4.2.4.4).

4.2.1 Apsorpcioni i fluorescentni spektri TC boje

Apsorpcioni spektar TC boje (Slika 31) u vodenom rastvoru pokazuje dva karakteristična maksimuma. Maksimum na nižoj talasnoj dužini (409 nm) se označava kao D-traka i pripisuje se dimeru TC boje (TC_2^{2-}), dok se maksimum na višoj talasnoj dužini (429 nm) označava kao M-traka i pripisuje se monomeru TC boje (TC^-) [12]. Boja je u vodenom rastvoru najverovatnije prisutna u obliku uravnotežene smeše monomera i dimera, slično drugim tiocijanskim bojama koje je proučavao Chibisov sa saradnicima [79].

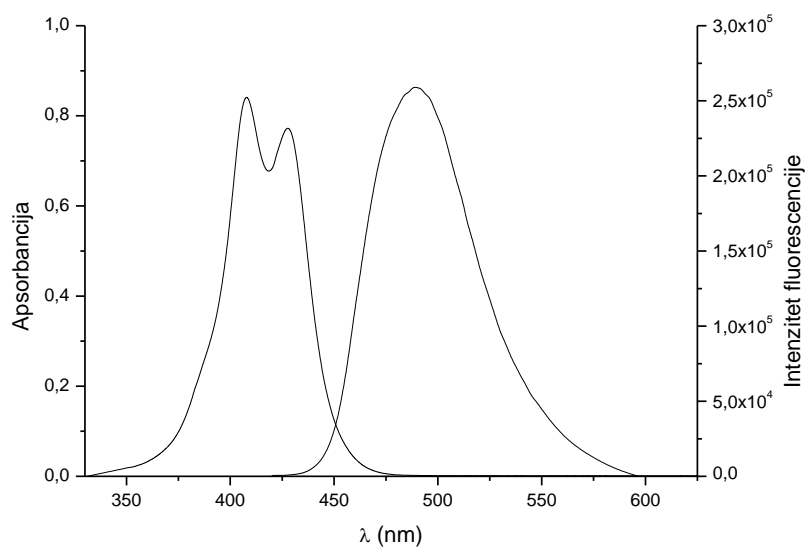
Praćenjem spektralnih promena TC boje u zavisnosti od njene koncentracije u rastvoru, predstavljenih na Slici 31, uočava se da sa povećanjem koncentracije TC dolazi do povećanja intenziteta apsorpcije dimera u poređenju sa monomerom. Ova činjenica

ukazuje da u oblasti niskih koncentracija TC dominira monomerni oblik, dok pri većim koncentracijama boje raste koncentracija dimera.



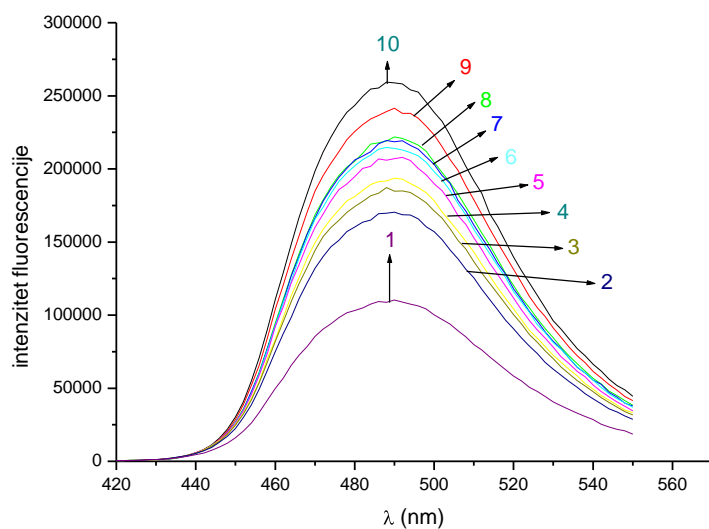
Slika 31. Apsorpcioni spektri TC boje koncentracija $0,7 \times 10^{-5}$ M (1); $1,67 \times 10^{-5}$ M (2); $2,6 \times 10^{-5}$ M (3); $3,5 \times 10^{-5}$ M (4); 5×10^{-5} M (5)

Na Slici 32 je prikazan apsorpcioni spektar $1,67 \times 10^{-5}$ M TC zajedno sa fluorescentnim spektrom boje, koji je skladu sa literturnim podacima [346,347].



Slika 32. Apsorpcioni i fluorescentni spektar $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje

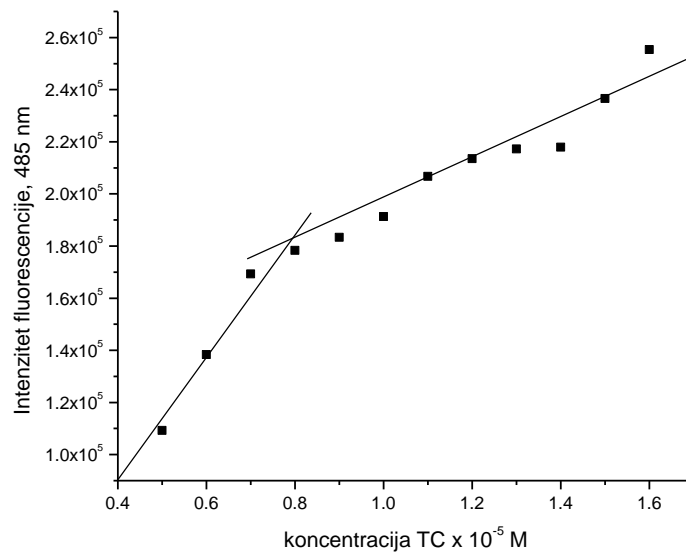
Sa Slike 32 se može uočiti da je fluorescentni spektar boje okarakterisan maksimumom fluorescencije na 485 nm, koji potiče od monomera TC boje. Da bi se ispitaio uticaj koncentracije boje u rastvoru na intenzitet fluorescencije, snimljeni su i fluorescentni spektri TC boje nižih koncentracija ($0,5 \times 10^{-5}$ - $1,67 \times 10^{-5}$ M) i prikazani na Slici 33.



Slika 33. Fluorescentni spektri TC boje koncentracija $0,5 \times 10^{-5}$ M (1); $0,7 \times 10^{-5}$ M (2); $0,9 \times 10^{-5}$ M (3); $1,0 \times 10^{-5}$ M (4); $1,1 \times 10^{-5}$ M (5); $1,2 \times 10^{-5}$ M (6); $1,3 \times 10^{-5}$ M (7); $1,4 \times 10^{-5}$ M (8); $1,5 \times 10^{-5}$ M (9); $1,67 \times 10^{-5}$ M (10)

Sa Slike 33 se može videti da sa povećavanjem koncentracije boje u rastvoru intenzitet fluorescencije raste.

Izvedena zavisnost intenziteta fluorescencije od koncentracije TC predstavljena je na Slici 34.



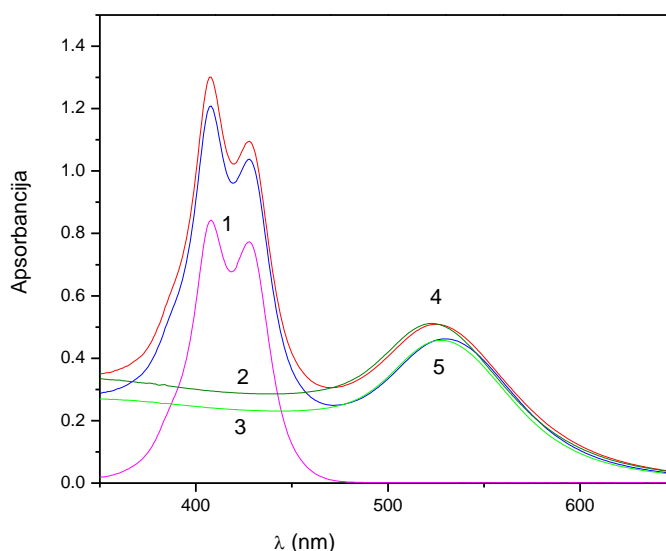
Slika 34. Zavisnost intenziteta fluorescencije TC na 485 nm od koncentracije TC

Sa slike 34 se može uočiti da zavisnost intenziteta fluorescencije od koncentracije TC podleže Lambert-Beer-ovom zakonu. Dobijena su dva opsega linearnosti, jedan u slučaju koncentracija nižih od $\sim 0,7 \times 10^{-5}$ M gde pravolinijska zavisnost ima manji nagib i drugi pri koncentracijama većim od $\sim 0,7 \times 10^{-5}$ M gde je veći nagib. Ovakva razlika bi mogla da ukazuje da se pri višim koncentracijama boje pojačavaju interakcije među molekulima boje, pa je veća mogućnost za različite vidove agregacije kao i na prisutnost efekta unutrašnjeg filtera pri čemu dolazi do reapsorpcije fotona od strane boje.

4.2.2 Ispitivanje interakcije između TC i nanočestica zlata sa adsorbovanim citratnim jonima

4.2.2.1 Spektrofotometrijska merenja

Da bi se ispitala reakcija koloidnih disperzija C17 i C30 sa TC bojom snimani su apsorpcioni spektri rastvora koji sadrže $1,67 \times 10^{-5}$ M TC i koloidne disperzije C17 ($8,7 \times 10^{-10}$ M) i C30 (2×10^{-10} M), na sobnoj temperaturi (20° C). Na Slici 35 su prikazani apsorpcioni spektri koloidnih disperzija C17 i C30 u odsustvu (krive 2,3) i prisustvu boje (krive 4,5).



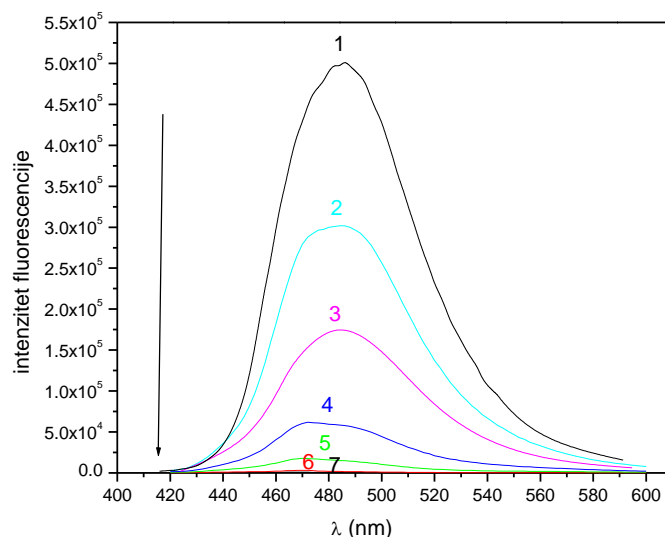
Slika 35. Apsorpcioni spektri $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje (1), $8,7 \times 10^{-10}$ M koloida C17 (2) i 2×10^{-10} M koloida C30 (3) pre i posle mešanja boje i koloida C17 i C30 (4,5)

Sa Slike 35 se može videti da su apsorpcioni spektri koloida C30 i C17 nakon dodatka TC boje (krive 4 i 5) okarakterisani pikovima koji potiču od monomera i dimera boje i pomeranjem plazmonskog pika za 3 nm ka crvenoj oblasti (sa 523 nm na 526 nm za C17 i 527 nm na 530 nm za C30). Do promene položaja plazmonskog pika došlo je zbog promene indeksa refrakcije okruženja nanočestica zlata u prisustvu TC boje. Ova

činjenica ukazuje na dobru stabilnost ovih čestica usled adsorpcije citratnih jona na njihovoj površini, a što je u skladu i sa TEM merenjima (poglavlje 4.1.2.2), gde se na mikrografijama (Slike 26 i 27 (28b)) može videti da adsorpcija TC boje na ovim nanočesticama Au nema značajnog uticaja na veličinu čestice i ne izaziva aglomeraciju, već izvesno uređenje čestica. Pored toga, u ovom slučaju do adsorpcije TC boje dolazi pretežno zbog slabe interakcije između TC boje i jona adsorbovanih na površini čestica. Pritom su rastvori ostali bistri (transparentni) bez znakova taloženja čestica.

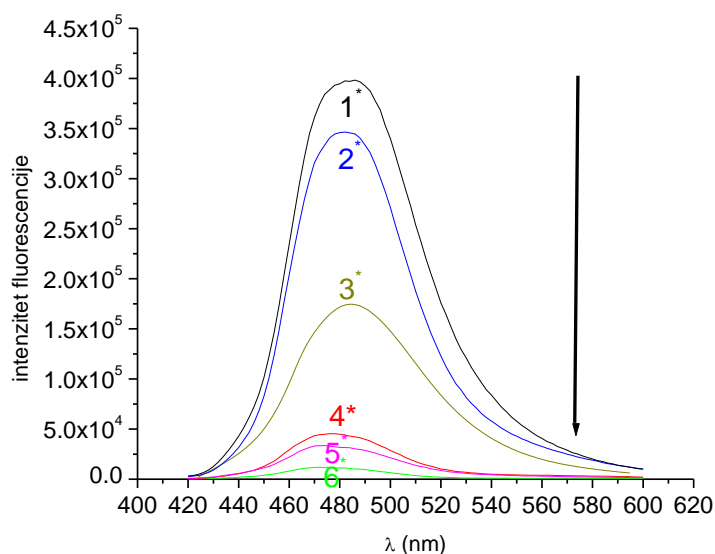
4.2.2.2 Spektrofluorimetrijska merenja

U cilju daljeg ispitivanja interakcija nanočestica zlata C17 i C30 sa TC bojom, praćene su promene intenziteta fluorescencije boje nakon dodatka ovih koloidnih disperzija. Kao što je spomenuto u poglavlju 4.2.1, vodeni rastvor TC boje ima jaku fluorescenciju sa emisionim maksimumom na 485 nm, pri čemu je talasna dužina ekscitacije, λ_{ex} , bila 406 nm. U ovakvim eksperimentalnim uslovima nanočestice Au nemaju fluorescenciju. Na Slici 36 su prikazani fluorescentni spektri $1,0 \times 10^{-6}$ M rastvora TC boje pre (kriva 1) i nakon dodatka koloidne disperzije C17 (krive 2-7).



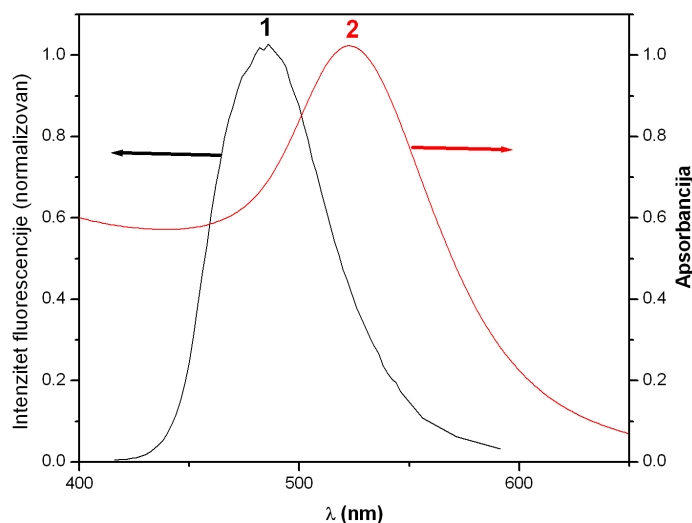
Slika 36. Promena fluorescentnih spektara $1,0 \times 10^{-6}$ M TC (1) nakon dodatka koloida C17 u zavisnosti od koncentracije nanočestica Au: $4,9 \times 10^{-10}$ M (2); $9,85 \times 10^{-10}$ M (3); $1,48 \times 10^{-9}$ M (4); $2,47 \times 10^{-9}$ M (5); $3,45 \times 10^{-9}$ M (6); $4,44 \times 10^{-9}$ M (7)

Slični rezultati su takođe dobijeni i za koloid C30, Slika 37.



Slika 37. Uticaj koloida C30 na fluorescentni spektar $1,0 \times 10^{-6}$ M TC boje. Koncentracije nanočestica: $4,76 \times 10^{-11}$ M (1); $1,3 \times 10^{-10}$ M (2); $1,95 \times 10^{-10}$ M (3); $4,62 \times 10^{-10}$ M (4); $6,46 \times 10^{-10}$ M (5); $7,7 \times 10^{-10}$ M (6)

Može se primetiti da sa povećanjem koncentracije nanočestica C17 i C30 u rastvoru boje dolazi do slabljenja intenziteta fluorescencije boje, što ukazuje na gašenje fluorescencije boje nakon adsorpcije na nanočesticama zlata. U literaturi [1,17,77,240,244,346,347] je opisano mnogo primera gde se gašenje (*engl.* quenching) pobuđenog stanja hromofore pripisuje prenosu energije ka površini metalne čestice. Međutim, u slučaju hibridnih struktura sa metalnom nanočesticom kao jezgrom, prenos energije zavisi od veličine i oblika nanočestice, udaljenosti između boje i površine nanočestice, orijentacije molekulskog dipola boje u odnosu na osu boja-nanočestica i preklapanja emisije boje sa apsorpcijom nanočestice [17,348]. U ovom slučaju, kao što je to prikazano na Slici 38, normalizovan fluorescentni spektar TC boje se delimično preklapa sa apsorpcionim spektrom nanočestica Au, na osnovu čega se može očekivati prenos energije sa pobuđenog molekula TC na površinu nanočestice Au.

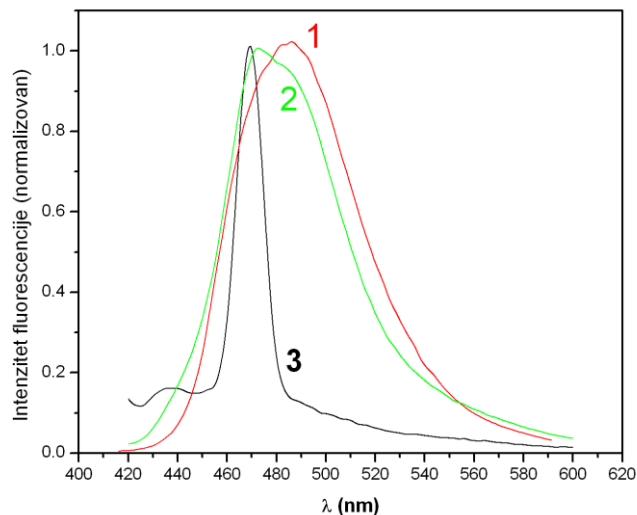


Slika 38. Normalizovan fluorescentni spektar TC boje (1) i apSORPCIONI spektar C17 (2)

Ranije je opisano u literaturi [349] da površinski plazmon ima svojstva efikasnog akceptora energije na rastojanju od 1 nm između boje i površine nanočestice Au. Važno je naglasiti da je kod ispitivanih koloida C17 i C30, citratni sloj na površini nanočestica Au dovoljno tanak ($<0,6$ nm) [350], što omogućava pojačane interakcije između radijacija elektromagnetnog polja boje i površine nanočestice. Uzimajući u obzir veličinu molekula TC boje, $2,5 \text{ nm} \times 1,5 \text{ nm} \times 0,5 \text{ nm}$ [76], očekuje se relativno mala udaljenost između molekula boje i nanočestice Au, čime je omogućeno gašenje fluorescencije boje. Emisija koja potiče od hromofora koje se nalaze u blizini površine metalne nanočestice na udaljenosti manjoj od 5 nm, se gasi uglavnom zbog prenosa energije ekscitacije ili prenosa naelektrisanja na plazmon metalne nanočestice [17]. Zbog simetrije nanočestice, prenos energije na sferne nanočestice Au se može ostvariti za bilo koju orijentaciju dipolnog momenta (električni dipolni momenat koji se odnosi na prelaz između dva stanja) boje u odnosu na površinu nanočestice, što nije slučaj kod sistema boja-boja [261].

Ovde je važno naglasiti i da, pošto su svi uzorci snimani u vodenom rastvoru, spektri predstavljeni na Slici 36 i 37 sadrže i doprinos Ramanovog rasejanja vode (za ekscitaciju na 406 nm Ramanov pik rasejanja vode se dobija na 470,6 nm). To se može

videti na Slici 39, gde je prikazana oštra Ramanova traka vode zajedno sa normalizovanim fluorescentnim spektrom TC u prisustvu i odsustvu koloida C17.

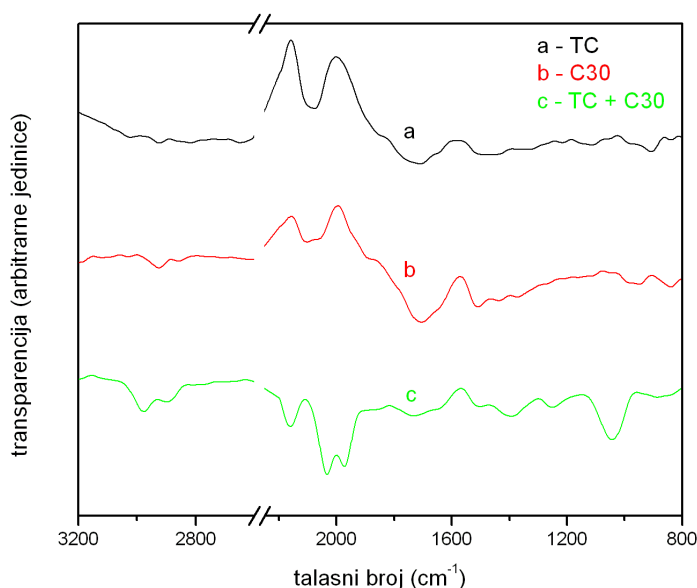


Slika 39. Poređenje normalizovanog fluorescentnog spektra TC boje u odsustvu (1) i prisustvu C17 (2) sa Ramanovom trakom vode (3)

Sa povećanjem koncentracije C17 u rastvoru TC boje, intenzitet fluorescencije se smanjuje zbog prisustva nanočestica koje gase fluorescenciju. Doprinos Ramanovog rasejanja vode nije zanemarljiv kod uzoraka sa manjom emisijom fluorescencije (uzorci 4-7, Slika 36) i utiče na oblik spektra i njegov mali pomeraj ka plavoj oblasti (ka manjim talasnim dužinama). Prema tome, može se izvesti zaključak da su spektri predstavljeni na Slici 36 i 37 rezultat emisije fotona (tj. radijativnog procesa, kao načina prenosa energije) slobodnih molekula boje u rastvoru, koji predstavljaju jedinu emitujuću vrstu u rastvoru.

4.2.2.3 FTIR spektri

Da bi se bolje razumela interakcija između TC boje i koloida zlata, snimani su i FTIR spektri koloida zlata u prisustvu TC boje i upoređivani sa istim za samu TC boju i sam koloid. Na Slici 40 su, i u oblasti niskih i visokih frekvencija, predstavljeni odgovarajući spektri u slučaju koloida C30. Slični rezultati su dobijeni i za koloid C17.



Slika 40. FTIR spektri TC boje (a), nanočestica Au (koloid C30) sa adsorbovanim citratnim jonima (b) Au koloid C30 u prisustvu TC boje (c)

Karakteristične trake u FTIR spektru TC boje, Slika 40 (a), se javljaju na oko 3023 cm^{-1} (CH istežuće vibracije koje se odnose na dvostruke veze), 2923 cm^{-1} (alifatične CH istežuće vibracije), 2100 cm^{-1} (istežuće vibracije –SCN grupe), 1510 cm^{-1} (slaba traka koja odgovara istežućim vibracijama C=N grupe u tiazolnom prstenu), 1380 cm^{-1} i 1480 cm^{-1} (istežuće vibracije prstena) i set pikova u opsegu $900\text{-}780\text{ cm}^{-1}$ koji potiču od vibracija u aromatičnoj strukturi.

U FTIR spektru nanočestica zlata sa adsorbovanim citratnim jonima, Slika 40 (b), se uočavaju pikovi u opsegu $2927\text{-}2857\text{ cm}^{-1}$ koji potiču od istežućih vibracija CH_2 grupe

iz citrata, dok trake na 1520 cm^{-1} i 1480 cm^{-1} odgovaraju asimetričnim i simetričnim istežućim vibracijama karboksilne grupe.

U FTIR spektru Au nanočestica sa adsorbovanom bojom, Slika 40 (c), uočavaju se karakteristične trake koje potiču od same boje i Au nanočestica kao i sledeće promene:

(1) u poređenju sa spektrom Au nanočestica sa adsorbovanim citratnim jonima dolazi do širenja i pomeranja trake na 2898 cm^{-1} usled istežućih vibracija CH_2 grupe,

(2) dolazi do pomeranja trake na 2977 cm^{-1} , koja potiče od same TC boje usled istežućih CH vibracija u aromatičnom prstenu, ka nižim frekvencijama,

(3) dolazi do pomeranja pika na 2100 cm^{-1} (Slika 40 (b)), koji potiče od istežućih vibracija $-\text{SCN}$ grupe na 2163 cm^{-1} i do pojave dve dodatne trake na 2036 i 1972 cm^{-1} ,

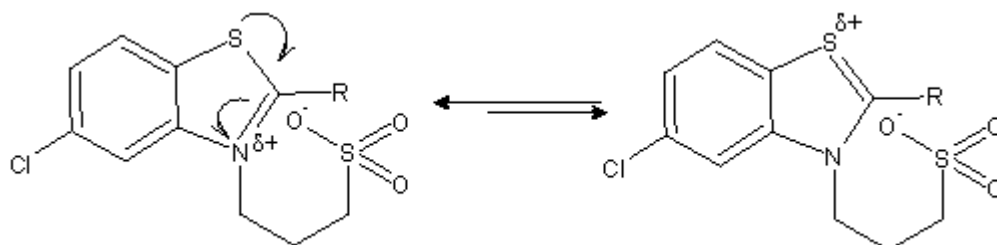
(4) primećeno je pomeranje i povećanje intenziteta trake na 1392 cm^{-1} koja potiče od istežućih vibracija prstena i trake na 1255 cm^{-1} koja potiče od C-O vibracija,

(5) javlja se dodatna traka na 1043 cm^{-1} , koja se pripisuje kombinaciji frekvencija koje potiču od (C-O + S=O) vibracija.

Povećanje intenziteta traka na 1255 i 1043 cm^{-1} ukazuje na interakciju karbonilne grupe citratnog jona sa molekulima TC boje. Pored toga, u sva tri FTIR spektra se javlja široka traka u oblasti $1620\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$, najverovatnije usled prisustva vode u svim merenim uzorcima. Poređenjem spektra TC boje (Slika 40 (a)) i nanočestica Au sa adsorbovanim citratnim jonima (Slika 40 (b)), može se primetiti da je došlo do povećanja intenziteta ove trake usled istežućih vibracija ($\gamma(\text{COOH})$) karboksilne grupe. U spektru koloida zlata sa adsorbovanom TC bojom (Slika 40 (c)) dolazi do smanjenja intenziteta ove trake i njenog nestajanja. Iz ovih rezultata se može izvesti zaključak da je adsorpcija TC boje na negativno naelektrisanj površini nanočestica (sa adsorbovanim karboksilatnim jonima), moguća samo ako su molekuli boje orijentisani na taj način, da je tiazolni prsten koji nosi parcijalno pozitivno naelektrisanje okrenut ka površini nanočestice zlata.

Važno je napomenuti da se tiazolni prsten karakteriše velikom π -elektronskom delokalizacijom i da pozitivno naelektrisanje sumpora raste u prisustvu pozitivnog azota [78]. Međutim, zbog sternog uticaja, propilsulfonatna grupa boje može zauzeti stabilnu

konformaciju u kojoj su atomi sumpora i azota bliže jedno drugom. Ovaj efekat dovodi do većeg razdvajanja naelektrisanja pri čemu pozitivno naelektrisanje na azotu raste dok sumpor postaje manje pozitivan (Shema 2).



Shema 2. Shematski prikaz pomeranja elektronske gustine u tiazolnom prstenu TC boje

Iz ovoga se može izvesti zaključak da interakcija između nanočestica zlata i boje nije jaka i odigrava se kombinacijom π - π interakcija i elektrostatičkih interakcija između pozitivno naelektrisanih tiocijanskih grupa boje i negativno naelektrisanih karboksilnih grupa na površini nanočestice. Lim i saradnici [76] su dobili slične rezultate kod ispitivanja interakcije pozitivno naelektrisane amonijumske vrste cijanske boje i karboksilata koji se nalaze na površini nanočestica zlata. Važno je naglasiti da su dobijeni rezultati u skladu sa UV-Vis merenjima, koja pokazuju da u prisustvu TC boje nema značajnih pomeranja apsorpcionog maksimuma koji potiče od rezonancije površinskih plazmona nanočestica, koja bi ukazala na jaču međusobnu interakciju.

4.2.2.4 Gašenje fluorescencije

Za ispitivanje uticaja nanočestica zlata na fluorescenciju TC boje, urađene su dve serije merenja mešanjem TC boje i koloidnih disperzija C17 i C30. U prvom eksperimentu je ispitivana zavisnost intenziteta fluorescencije TC na 485 nm od koncentracije nanočestica pri konstantnoj koncentraciji TC, a u drugom od koncentracije boje pri konstantnoj koncentraciji nanočestica.

Kao što je ranije objašnjeno u poglavlju 2.3.2.1 još jedan važan efekat može dovesti do smanjenja intenziteta fluorescencije i mora se uzeti u obzir. To je efekat unutrašnjeg filtera, pri kojem dolazi do reapsorpcije fotona od strane smeše

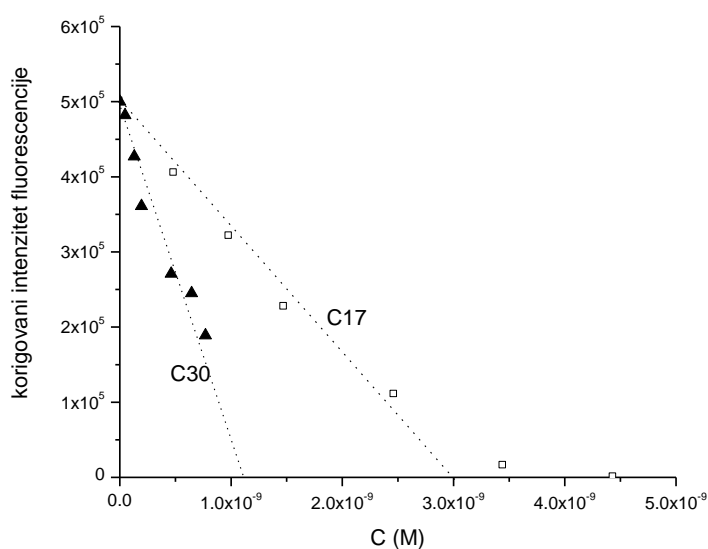
komponentata. Da bi se uzeo u obzir ovaj efekat, opisan u literaturi od strane Lakowicz-a [231], za izračunavanja kod merenih fluorescentnih spektara primenjen je jednostavan korekcionni faktor prema jednačini (20):

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} 10^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})/2} \quad (20)$$

gde F_x predstavlja intenzitete fluorescencije za korigovane i posmatrane signale, a A_{ex} i A_{em} su apsorbcije rastvora na talasnim dužinama ekscitacije i emisije.

U prvom setu merenja finalna koncentracija TC boje u rastvoru je bila $1,0 \times 10^{-6}$ M, dok su koncentracije C17 i C30 varirane u opsegu od $4,76 \times 10^{-11}$ M do $4,44 \times 10^{-9}$ M. Pri ovoj koncentraciji boje postignuto je potpuno gašenje fluorescencije boje u slučaju koloida C17.

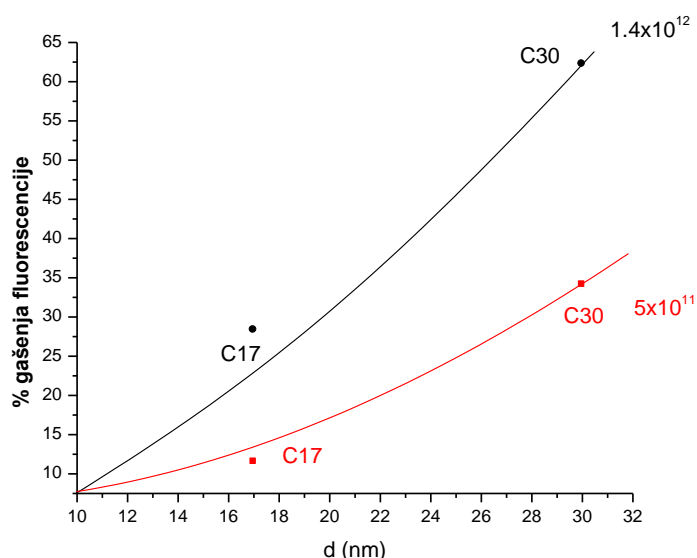
Zavisnost intenziteta fluorescencije $1,0 \times 10^{-6}$ M TC boje na 485 nm, korigovane za efekat unutrašnjeg filtera, od koncentracije nanočestica C17 i C30 je prikazana na Slici 41.



Slika 41. Zavisnost korigovanog intenziteta fluorescencije (na 485 nm) rastvora koji sadrži 1×10^{-6} M TC i nanočestice Au, C17 i C30, od koncentracije nanočestica

Da bi se dobile krajnje tačke titracije, urađena je ekstrapolacija pravim linijama do nule. Dobijene su finalne koncentracije nanočestica u koloidnim disperzijama koje su potrebne da bi se dostigle krajnje tačke titracije tj. da bi došlo do potpunog gašenja fluorescencije 1×10^{-6} M TC boje, i iznosile su približno $3,0 \times 10^{-9}$ M for C17 i $1,1 \times 10^{-9}$ M za C30.

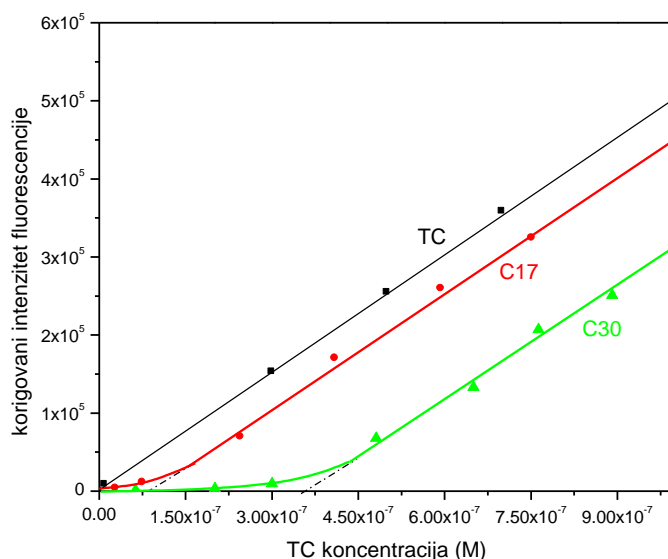
Ispitan je uticaj veličine čestica C17 i C30 na efikasnost gašenja fluorescencije u prisustvu $1,4 \times 10^{12}$ i 5×10^{11} nanočestica, i rezultati su prikazani na Slici 42.



Slika 42. Uticaj veličine čestica na efikasnost gašenja fluorescencije u prisustvu $1,4 \times 10^{12}$ i 5×10^{11} nanočestica Au u 3 mL (koncentracije C17 i C30 su $7,7 \times 10^{-10}$ M i $2,8 \times 10^{-10}$ M); d je prečnik čestice

Sa Slike 42 se može videti da procenat eksperimentalno dobijenog gašenja fluorescencije raste sa povećanjem prečnika nanočestice.

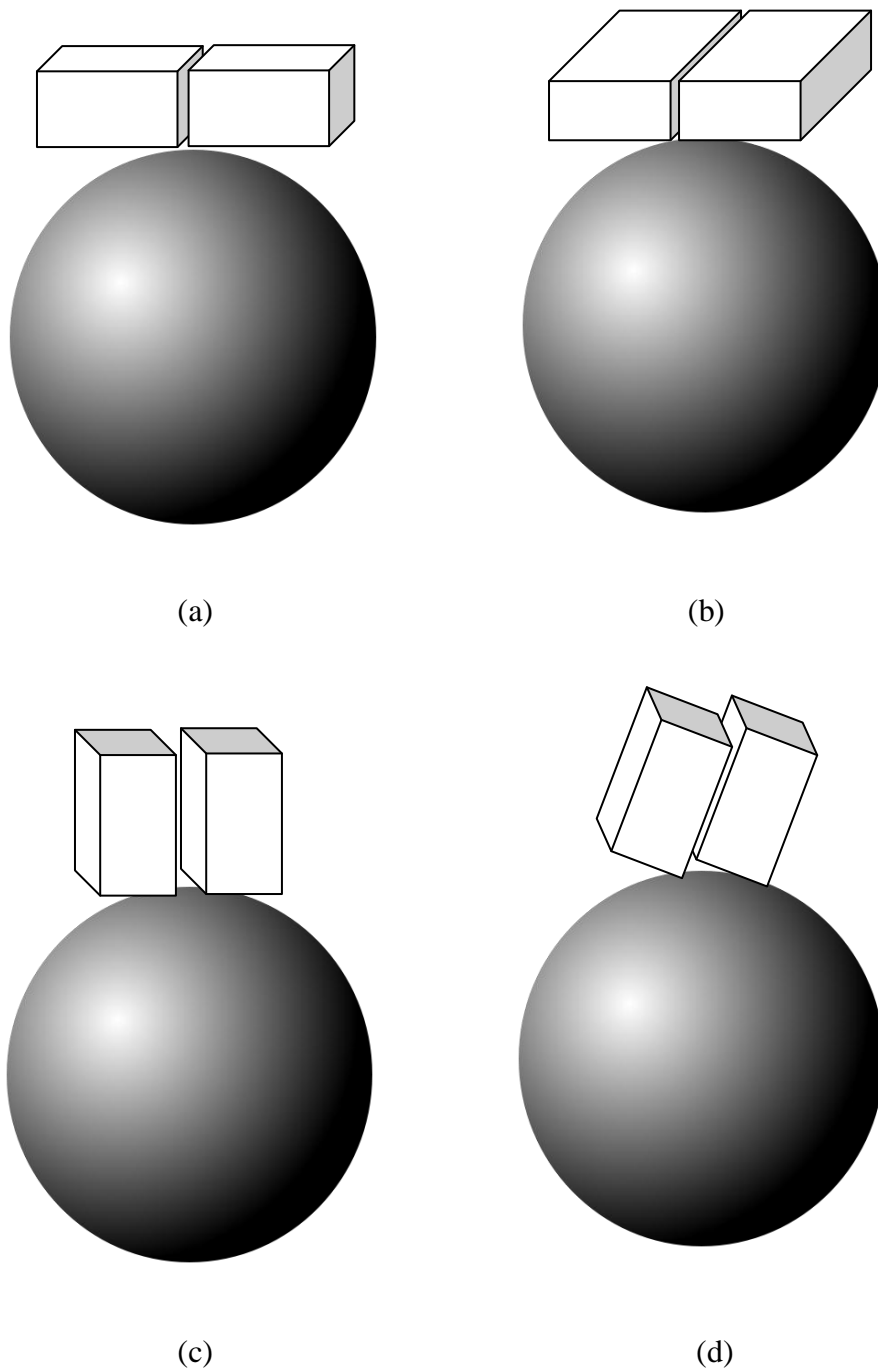
U drugom eksperimentu praćena je promena intenziteta fluorescencije TC boje, pri konstantnoj koncentraciji nanočestica ($2,8 \times 10^{-10}$ M ili 5×10^{11} nanočestica u 3 mL). Koncentracija TC je varirana u opsegu od 1×10^{-8} do 1×10^{-6} M. Zavisnost intenziteta fluorescencije korigovane za efekat unutrašnjeg filtera na 485 nm od koncentracije TC je predstavljena na Slici 43.



Slika 43. Zavisnost korigovanog intenziteta fluorescencije na 485 nm od koncentracije TC za koloide C17 i C30, u prisustvu 5×10^{11} nanočestica

Sa Slike 43 se, iz preseka pravih linija ekstrapoliranih do nultog intenziteta fluorescencije, može videti da za koncentraciju TC koja je bila niža od $0,9 \times 10^{-7}$ M za C17 i $3,6 \times 10^{-7}$ M za C30, nije došlo do fluorescencije, i ovo su koncentracije boje pri kojima je površina nanočestica Au zasićena molekulima TC. Dalji dodatak TC boje u koloidne disperzije je vodio ka povećanju intenziteta emisije zbog fluorescencije koja potiče od TC dianjona u rastvoru, bez ikakvih indikacija o agregaciji boje. Poređenja radi, na Slici 43 je takođe predstavljena i fluorescencija same TC boje u zavisnosti od koncentracije.

Uzimajući u obzir da do gašenja fluorescencije dolazi samo u slučaju TC molekula koji imaju direktnu interakciju sa površinom nanočestica Au, onda se maksimalno gašenje fluorescencije TC boje dešava u slučaju potpune monoslojne površinske pokrivenosti nanočestice TC molekulima, koja zavisi od orijentacije adsorbovane TC boje. Ako se uzme da se boja može aproksimirano predstaviti kao kutija sa dimenzijama $2,5 \text{ nm} \times 1,5 \text{ nm} \times 0,5 \text{ nm}$ [76], onda se na površini nanočestice zlata mogu razmatrati tri moguće orijentacije boje: horizontalna i vertikalna orijentacija duž kraće i duže strane (Shema 3). Pored toga moguća je i kosa orijentacija TC boje na površini nanočestica (Shema 3).



Shema 3. Prikaz mogućih orijentacija TC boje na površini nanočestica zlata duž: vertikalne duže strane (a), horizontalne strane (b), vertikalne kraće strane (c) i kosa orijentacija (d)

U skladu sa tim, i znajući odgovarajuće prečnike nanočestica, izračunat je broj molekula TC boje koji je potreban da bi se pokrila površina nanočestica C17 i C30 i ovi

rezultati su, zajedno sa brojem molova TC po kvadratnom centimetru (mol/cm^2) za sve tri moguće orijentacije boje, predstavljeni u Tabeli 7. Tako je dobijena donja granica pokrivenosti u slučaju horizontalne orijentacije TC boje adsorbovane na površini, dok je nađeno da je gornja granica u slučaju vertikalne orijentacije boje duž kraće strane.

Tabela 7. Izračunat broj molekula TC adsorbovanih na površini nanočestica C17 i C30

koloid	SAnp (nm^2)	Broj molekula TC boje potreban da bi se prekrila površina naočestice za tri različite orijentacije boje				Γ_0 (mol/cm^2)		
		horizontalno	vertikalno duž duže strane	vertikalno duž kraće strane	srednja vrednost	horizontalno	vertikalno duž duže strane	vertikalno duž kraće strane
C17	907	241	698	1163	701	$4,44 \times 10^{-11}$	$1,28 \times 10^{-10}$	$2,14 \times 10^{-10}$
C30	2826	753	2173	3623	2183			

Koristeći vrednosti iz Tabele 7, gde SAnp predstavlja površinu sferne nanočestice, sa prečnikom dobijenim iz TEM merenja, a Γ_0 je maksimalna monoslojna površinska pokrivenost (mol/cm^2), izračunata je koncentraciju nanočestica koja može potpuno da ugasi fluorescenciju 1×10^{-6} M TC boje za prvi set merenja. Dobijene su vrednosti $4,1 \times 10^{-9}$ M za C17 i $1,3 \times 10^{-9}$ za C30. U ovom izračunavanju pretpostavljeno je da su molekuli TC boje smešteni na površini nanočestice u horizontalnoj orijentaciji. Eksperimentalno dobijeni rezultati u prvom setu merenja (koncentracija nanočestica potrebna da bi došlo do potpunog gašenja fluorescencije TC boje) su bili oko 20% niži od izračunatih vrednosti koncentracije nanočestica potrebne da bi se dostigle krajnje tačke titracije.

Pored toga, izračunata je koncentracija TC boje potrebna da pokrije površinu nanočestice u horizontalnoj orijentaciji i da fluorescencija boje bude potpuno ugašena, u drugom setu eksperimenata. Dobile su vrednosti $6,6 \times 10^{-8}$ M za C17 i $2,1 \times 10^{-7}$ M za C30, koje su oko 30% niže od odgovarajućih vrednosti dobijenih eksperimentalno (Slika 43).

Nakon toga je kvantitativno analiziran set podataka, dobijen iz eksperimenata gašenja fluorescencije kao funkcije koncentracije nanočestica C17 i C30. Uzimajući da jedna nanočestica može adsorbovati određen broj molekula boje koji je dat u Tabeli 7 u slučaju horizontalne orijentacije, izračunat je procenat (%) boje, čija je fluorescencija ugašena u prisustvu nanočestica C17 i C30. Na osnovu promene intenziteta fluorescencije po dodatku različitih količina nanočestica C17 i C30, poređene su efikasnosti gašenja fluorescencije 1×10^{-6} M TC boje ovim koloidima, između izračunatih i eksperimentanih rezultata (Slika 41). Ovi rezultati su predstavljeni u Tabeli 8.

Tabela 8. Gašenje fluorescencije (na 485 nm) 1×10^{-6} M rastvora TC boje ($1,8 \times 10^{15}$ molekula TC) nanočesticama zlata C17 i C30, dobijenih redukcijom Au(III) citratnim jonima

	C17				C30			
	broj nanočestica Au $\times 10^{12}$	Korigovani intenzitet fluorescencije (485 nm) $\times 10^5$	% fluorescencije TC boje ugašene u prisustvu nanočestica C17		broj nanočestica Au $\times 10^{11}$	Korigovani intenzitet fluorescencije (485 nm) $\times 10^5$	% fluorescencije TC boje ugašene u prisustvu nanočestica C30	
			eksperimentalno	izrač.-horiz.orient.			eksperimentalno	izrač.-horiz.orient.
1	0	5,00	0	0	0	5,00	0	0
2	0,88	4,05	19,0	11,9	0,86	4,82	3,6	3,6
3	1,78	3,21	35,8	23,8	2,35	4,27	14,6	9,8
4	2,67	2,26	54,8	35,7	3,52	3,61	27,8	14,7
5	4,46	1,10	78,0	59,7	8,35	2,71	45,8	34,9
6	6,23	0,15	97,0	83,4	11,70	2,45	51,0	48,9
7	8,02	0	>100	>100	14,00	1,89	62,2	58,6

Eksperimentalno dobijeni rezultati su ukazali da je ugašena fluorescencija većeg broja molekula boje od broja (TC molekula) potrebnog za potpuno pokrivanje površine nanočestice u horizontalnoj orijentaciji TC. Na primer, u slučaju koloida C17, nakon dodavanja $1,78 \times 10^{12}$ nanočestica Au u rastvor boje koji sadrži $1,8 \times 10^{15}$ molekula TC boje očekivana vrednost procenta gašenja fluorescencije boje, teorijski računato za horizontalnu orijentaciju iznosi 23,8%. S druge strane, eksperimentalno dobijena promena intenziteta fluorescencije je pokazala vrednost efikasnosti gašenja fluorescencije od 35,8%. Na osnovu rezultata dobijenih iz oba seta eksperimenata i njihovog poređenja sa izračunatim rezultatima moglo je da se pretpostavi da su molekuli TC najverovatnije smešteni na površini nanočestice u orijentaciji koja je najpribližnija horizontalnoj tj. u kosoj orijentaciji. Ovakav rezultat je u skladu sa ranijim ispitivanjima, kojima je

pokazano da je mera (količina) fluorescencije molekula boje funkcija udaljenosti između boje i površine metala, i da je u direktnom kontaktu sa metalom fluorescencija boje potpuno ugašena [76,242,327]. Pored toga, rezultati ovde predstavljenih FTIR merenja (poglavlje 4.2.2.3) potvrđuju da se interakcija TC boje sa nanočesticama odigrava kroz $\pi - \pi$ i elektrostatičke interakcije između pozitivno naelektrisanih tiocijanskih grupa boje i negativno naelektrisanih citratnih jona na površini nanočestice, što je u skladu sa kosom orijentacijom molekula TC.

Međutim, treba naglasiti i da u ovde predstavljenim teorijskim izračunavanjima nije uzeta u obzir hrapavost tj. neravnine površine same nanočestice. Taj faktor bi mogao značajno uticati na molekul boje, u smislu povećanja efektivne površine nanočestice, što znači da bi se veći broj molekula boje mogao smestiti na površini nanočestice, čime bi se u teorijskom proračunu dobio veći broj molekula boje čija je fluorescencija ugašena. Međutim, to u ovom slučaju nije bilo moguće uzeti u obzir zbog kompleksnosti izračunavanja.

4.2.2.5 Izračunavanje konstante ravnoteže

Da bi se dalje razjasnio uticaj nanočestica C17 i C30 na fluorescenciju TC boje, analizirana je i zavisnost intenziteta fluorescencije korigovanog za efekat unutrašnjeg filtera od koncentracije nanočestica u rastvoru, predstavljena na Slici 41.

Na osnovu prethodno predstavljenih eksperimentalnih rezultata, adsorpcija TC boje na površini nanočestice Au se može opisati jednačinom (21), slično kao što su to ranije pokazali Zhong i saradnici [76]:



Ravnoteža u sistemu Au/TC (jednačina (21)) se može objasniti Langmuir-ovom izotermom (jednačina (22)):

$$K = \frac{\theta_1}{(1 - \theta_1) \cdot C_1} \quad (22)$$

gde K predstavlja konstantu ravnoteže, C_1 koncentraciju TC boje u rastvoru i θ_1 delimičnu površinsku pokrivenost TC na negativno naelektrisanim nanočesticama Au. Kao što je to ranije pokazano [76], $\theta_1 = \Gamma_1 / \Gamma_0$, pri čemu Γ_1 predstavlja površinsku pokrivenost (mol / cm^2) TC a Γ_0 je maksimalna monoslojna površinska pokrivenost (Tabela 7). C_0 predstavlja početnu koncentraciju TC ($C_1 = C_0 - C_{ads}$).

Lako se može pokazati da je intenzitet fluorescencije slobodne boje u rastvoru linearna funkcija koncentracije nanočestica i da se prema tome može izvesti sledeća jednačina (Prilog 8.2), kao što je ranije i prikazano u literaturi [76]

$$I = (-k' \cdot b \cdot N_0 \cdot \Gamma_0 \cdot SA_{NP}) \cdot C_{NP} + k' \cdot b \cdot (C_0 - \frac{1}{K}) \quad (23)$$

gde je $I = k' b C_1$, b je dužina puta kroz ćeliju, k' je konstanta koja je proporcionalna kvantnom polju, snazi upadne svetlosti i molarnom apsorpcionom koeficijentu boje [231,351]. Vrednosti konstante ravnoteže K (jednačina (23)) za koloidne disperzije C17 i C30 su dobijene iz nagiba i odsečka iz jednačine (23), i date su u Tabeli 9.

Tabela 9. Konstante ravnoteže za proces adsorpcije TC boje na nanočestice C17 i C30

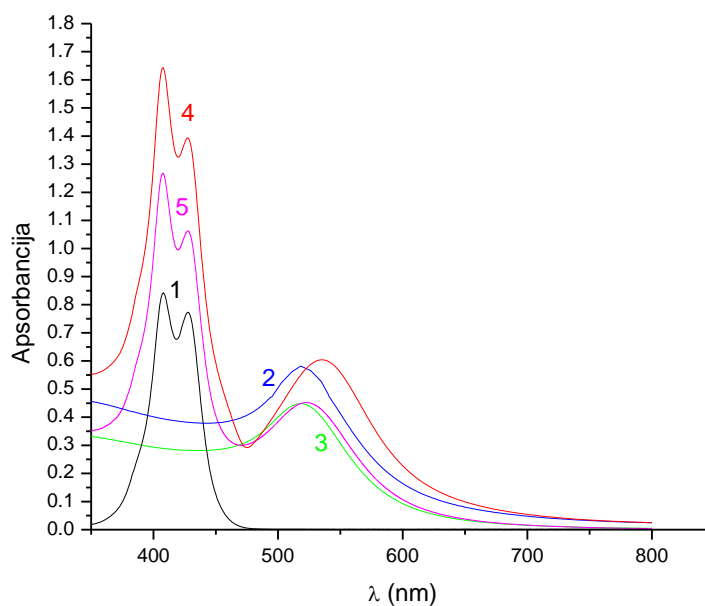
Koloid	Odsečak $\times 10^5$	Nagib $\times 10^{14}$	$K [M^{-1}]$
C17	$5 \pm 0,05$	$-1,67 \pm 0,05$	$3,67 \times 10^6$
C30	$5 \pm 0,05$	$-4,54 \pm 0,1$	$5,93 \times 10^6$

Iz Tabele 9 se može videti da su za obe koloidne disperzije, C17 i C30, dobijene slične vrednosti konstante ravnoteže, K , koje su u skladu i sa vrednostima za adsorpciju sličnih cijanskih boja na nanočesticama Au sa adsorbovanim citratnim anjonima, ranije opisanim u literaturi koje je dobio Lim sa saradnicima [76].

4.2.3 Ispitivanje interakcije između TC i nanočestica zlata sa adsorbovanim boratnim jonima

4.2.3.1 Spektrofotometrijska merenja

Da bi se ispitala reakcija koloidnih disperzija C6 i C9,5 sa TC bojom snimani su apsorpcioni spektri rastvora koji sadrže TC boju koncentracije $1,67 \times 10^{-5}$ M u prisustvu koloidnih disperzija C6 (5×10^{-8} M) i C9,5 ($1,87 \times 10^{-9}$ M), na sobnoj temperaturi (20° C). Na Slici 44 su prikazani apsorpcioni spektri koloidnih disperzija C6 i C9,5 u odsustvu (linije 2,3) i prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje (linije 4,5).



Slika 44. Apsorpcioni spektri $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje (1) i koloida: 5×10^{-8} M C6 (2); $1,87 \times 10^{-9}$ M C9,5 (3) pre (2,3) i posle dodatka TC boje (4,5)

Sa Slike 44 se može videti da u apsorpcionom spektru koloida C9,5 nakon dodatka TC boje (kriva 5), dolazi do malog pomeranja plazmonske trake za 3 nm ka većim talasnim dužinama, slično kao i u slučaju C17 i C30 (poglavlje 4.2.2.1). U prisustvu viška borhidrida dolazi do izražaja drugi stabilizacioni faktor a to je efekat

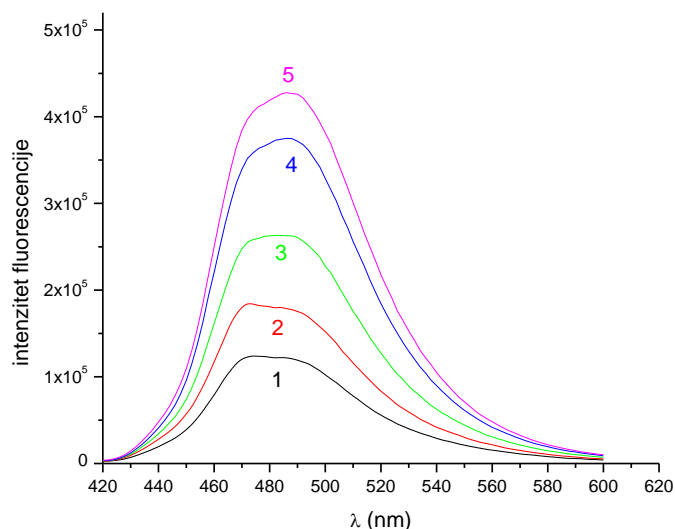
naelektrisanja [352], odakle potiče i veća stabilnost ovih čestica. Poznato je da su proizvodi hidrolize natrijum-borhidrida boratne vrste koje se adsorbuju na površini čestica, čineći ih negativno naelektrisanim [353].

S druge strane, u apsorpcionom spektru koloida C6 nakon dodatka $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje (Slika 44, kriva 4) može se videti da dolazi do formiranja oštrog apsorpcionog *minimuma* („dip“) na 475 nm [1,77], koji je praćen pomeranjem trake plazmona ka crvenoj oblasti. U literaturi se ovaj karakteristični apsorpcioni *minimum* na 475 nm pripisuje formiranju tzv. J-trake J-agregata TC boje na površini nanočestica Au sfernog oblika i veličine od 5-10 nm [1,12]. Prisustvo *minimuma* u apsorpcionom spektru se objašnjava kuplovanjem molekuskog ekscitona J-agregata i površinskog plazmona metalnih nanočestica [1,12]. Kao rezultat, dolazi do pomeranja apsorpcionog maksimuma koji potiče od rezonancije površinskog plazmona ka crvenoj oblasti, sa 517 nm na 535 nm.

Prema tome, iz ovih rezultata se vidi da je dodatak TC boje samo u slučaju koloida C6 doveo do destabilizacije i agregacije čestica, što se može videti i na TEM mikrografiji ovog uzorka (Slika 28 (d)), kao i formiranja J-agregata. Promene vidljive na TEM mikrografiji su u saglasnosti i sa UV-Vis spektrima predstavljenim na Slici 44, na kojima se vidi da je u slučaju koloida C6 po dodatku TC boje došlo do većeg pomeranja apsorpcionog maksimuma ka crvenoj oblasti, u odnosu na koloidne čestice C9,5, C17 i C30. Prilaz boje većim nanočesticama zlata (C9,5, C17 i C30) s jedne strane, i adsorbovani citratni/boratni joni na površini čestica, s druge strane, doprinose da se adsorpcija TC boje na površini ovih čestica odigrava prevashodno slabim interakcijama između boje i jona adsorbovanih na površini čestica, onemogućavajući spontano formiranje J-agregata boje. U slučaju najmanjih sinetizovanih nanočestica zlata, C6 (koje imaju pogodnu površinu i veličinu), molekuli boje narušavaju kompaktni dvostruki difuzni sloj jona, istiskujući slabo vezane boratne jone sa površine i narušavajući stabilnost čestica. Time je olakšan prilaz boje površini čestice i omogućeno formiranje J-agregata.

4.2.3.2 Spektrofluorimetrijska merenja

Fluorescentne spektralne promene ispitivane su nakon dodatka ovih koloidnih disperzija u rastvor TC boje. Treba naglasiti da u ovim eksperimentalnim uslovima nanočestice Au C6 i C9,5 nemaju fluorescenciju. Na Slici 45 su prikazani fluorescentni spektri $1,0 \times 10^{-6}$ M rastvora TC boje nakon dodatka koloidne disperzije C9,5 (linije 1-5).

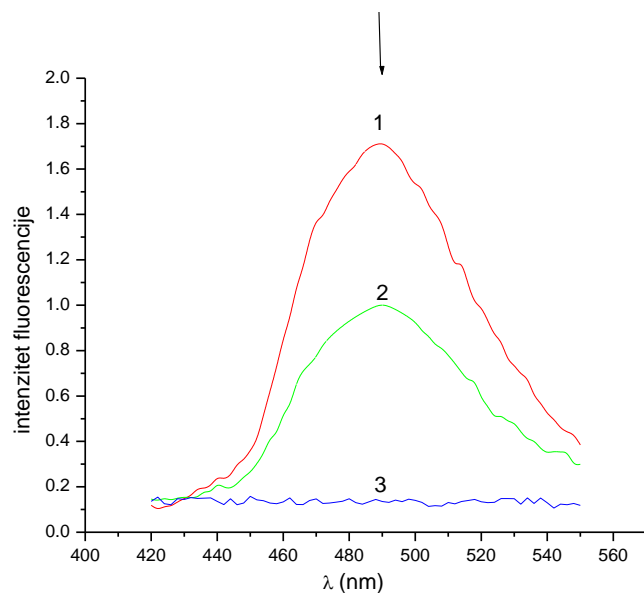


Slika 45. Fluorescentni spektri 1×10^{-6} M TC boje u prisustvu nanočestica C9,5 koncentracija: $1,68 \times 10^{-9}$ M (1); $1,40 \times 10^{-9}$ M (2); $0,93 \times 10^{-9}$ M (3); $0,56 \times 10^{-9}$ M (4); $0,19 \times 10^{-9}$ M (5)

Može se primetiti da sa povećanjem koncentracije nanočestica zlata C9,5 dolazi do slabljenja intenziteta - gašenja fluorescencije boje, slično kao i u slučaju nanočestica C17 i C30.

S druge strane, zbog razlike u svojstvima koloida C6 u reakciji sa ispitivanom TC bojom, u odnosu na ostale koloidne disperzije, C9,5, C17 i C30, dalji eksperimenti sa ovim koloidom su posebno bili usmereni na ispitivanje J-agregacije. Iz tog razloga su fluorescentne spektralne promene praćene za rastvor koji sadrži $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boju, jer se sa nižim koncentracijama boje nije mogao dobiti tako jasno izražen *minimum* (poglavlje 4.2.3.1). Na Slici 46 su prikazani fluorescentni spektri rastvora koji sadrži

$1,67 \times 10^{-5}$ M TC boju pre i nakon dodavanja $7,4 \times 10^{-8}$ M koloidne disperzije C6 (finalna koncentracija u rastvoru je 5×10^{-8} M), pri čemu je podešeno da koncentracija TC bude identična u oba rastvora.

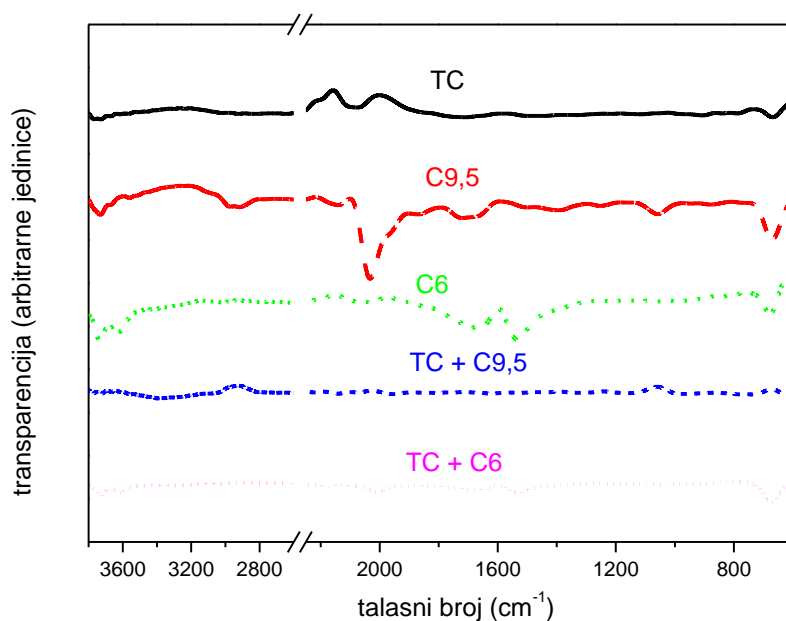


Slika 46. Fluorescentni spektri $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje (1), 5×10^{-8} M nanočestica C6 (3) i smeše koja sadrži $1,67 \times 10^{-5}$ M TC i 5×10^{-8} M C6 (2)

Sa Slike 46 se može videti da i u ovom slučaju, u prisustvu nanočestica C6 dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije tj. do gašenja fluorescencije TC boje (koja potiče od monomera TC boje (kriva 1, Slika 46)). Slične karakteristike pokazuju i nanočestice Ag, u čijem prisustvu dolazi do gašenja fluorescencije različitih hromofora [77,354].

4.2.3.3 FTIR spektri

Da bi se dalje objasnila interakcija između TC boje i koloidnih čestica C6 i C9,5 snimani su FTIR spektri ovih koloida zlata u prisustvu TC boje i upoređivani sa spektrom boje i koloidnih rastvora, Slika 47.



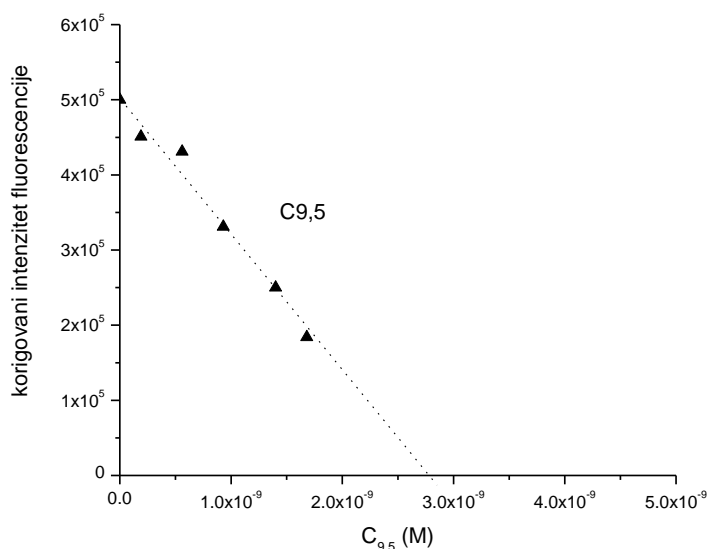
Slika 47. FTIR spektri TC boje, nanočestica C6, nanočestica C6 u prisustvu TC boje, nanočestica C9,5 i nanočestica C9,5 u prisustvu TC boje

U FTIR spektru nanočestica C6 i C9,5 sa adsorbovanom bojom, Slika 47, se može uočiti da je došlo do širenja i smanjenja intenziteta traka karakterističnih za samu TC boju i nanočestice zlata. Međutim, u oblasti nižih frekvencija je došlo do iščezavanja intenzivnih traka na 2100 cm⁻¹ i 2034 cm⁻¹, koje potiču od vibracija –SCN grupe prstena boje i OH grupe iz $B(OH)_4^-$. Pored toga, došlo je i do pomeranja jake trake na 1050 cm⁻¹, koja potiče od vibracija BO_3^{3-} grupe, na 1062 cm⁻¹, što je ukazalo na interakciju pozitivno naelektrisanog sumpora iz tiazolnog prstena TC boje i negativno naelektrisanih boratnih anjona adsorbovanih na površini nanočestica.

4.2.3.4 Gašenje fluorescencije

Za ispitivanje uticaja nanočestica zlata na fluorescenciju TC boje, izvedene su dve serije merenja mešanjem TC boje i koloidnih disperzija C6 i C9,5.

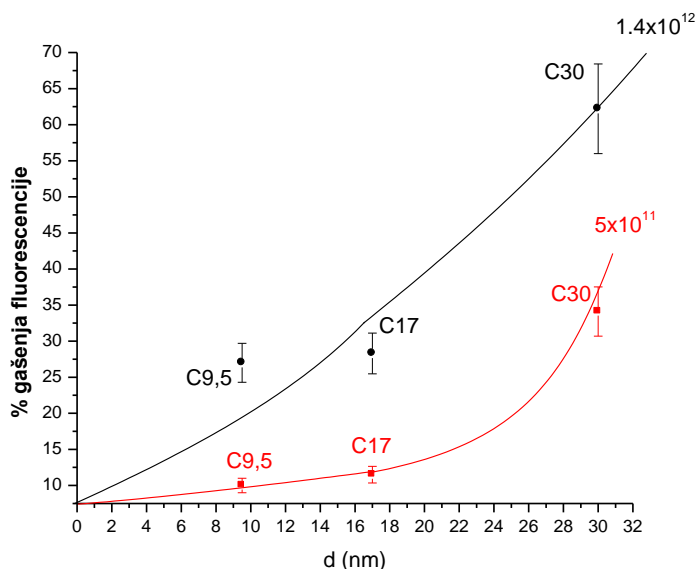
Za koloidnu disperziju C9,5 je u prvom setu merenja finalna koncentracija TC boje u rastvoru bila $1,0 \times 10^{-6}$ M, dok je koncentracija nanočestica varirana u opsegu od $1,9 \times 10^{-10}$ M do $1,68 \times 10^{-9}$ M. I u ovom slučaju je rađena korekcija intenziteta fluorescencije za efekat unutrašnjeg filtera, i zavisnost korigovanog intenziteta fluorescencije $1,0 \times 10^{-6}$ M TC boje na 485 nm od koncentracije nanočestica C9,5 je prikazana na Slici 48.



Slika 48. Zavisnost korigovanog intenziteta fluorescencije (na 485 nm) rastvora koji sadrži 1×10^{-6} M TC i nanočestice C9,5 od koncentracije nanočestica

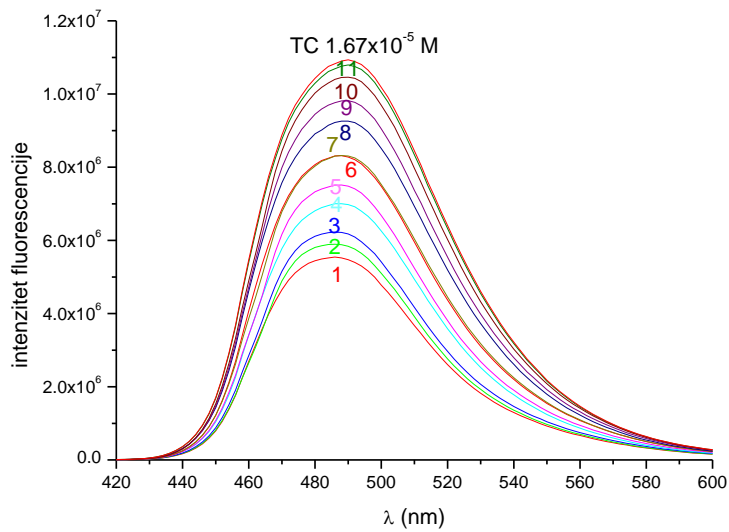
Da bi se dobila krajnja tačka titracije, urađena je ekstrapolacija pravom linijom do nule. Dobijena finalna koncentracija nanočestica u koloidnoj disperziji C9,5 potrebna da bi došlo do potpunog gašenja fluorescencije 1×10^{-6} M TC boje iznosila je približno $2,78 \times 10^{-9}$ M ($5,02 \times 10^{12}$). Pored toga, na Slici 49 se može videti da procenat eksperimentalno dobijenog gašenja fluorescencije za C9,5 ima nižu vrednost u odnosu na

koloidne disperzije C17 i C30, što nam je dalje potvrdilo trend porasta procenta gašenja fluorescencije sa povećanjem prečnika nanočestice.



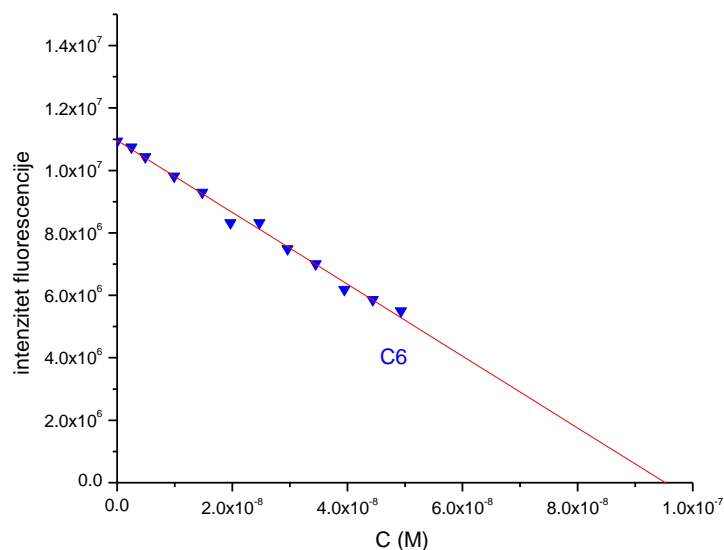
Slika 49. Uticaj veličine čestica C9,5, u poređenju sa C17 i C30, na efikasnost gašenja fluorescencije u prisustvu $1,4 \times 10^{12}$ i 5×10^{11} nanočestica Au u 3 mL (tj. koncentracije su $7,7 \times 10^{-10}$ M i $2,8 \times 10^{-10}$ M) i 1×10^{-6} M TC; d je prečnik čestica

U prvom setu merenja za koloidnu disperziju C6, finalna koncentracija TC boje, prisutne u velikom višku u rastvoru, je iznosila je $1,67 \times 10^{-5}$ M, dok je koncentracija nanočestica varirana u opsegu od $2,50 \times 10^{-9}$ M do $4,93 \times 10^{-8}$ M. Na Slici 50 su prikazani odgovarajući fluorescentni spektri.



Slika 50. Fluorescentni spektri TC boje $1,67 \times 10^{-5}$ M u prisustvu nanočestica C6 koncentracija $4,93 \times 10^{-8}$ M (1); $4,44 \times 10^{-8}$ M (2); $3,95 \times 10^{-8}$ M (3); $3,45 \times 10^{-8}$ M (4); $2,96 \times 10^{-8}$ M (5); $2,47 \times 10^{-8}$ M (6); $1,97 \times 10^{-8}$ M (7); $1,48 \times 10^{-8}$ M (8); $9,9 \times 10^{-9}$ M (9); $4,9 \times 10^{-9}$ M (10); $2,5 \times 10^{-9}$ M (11)

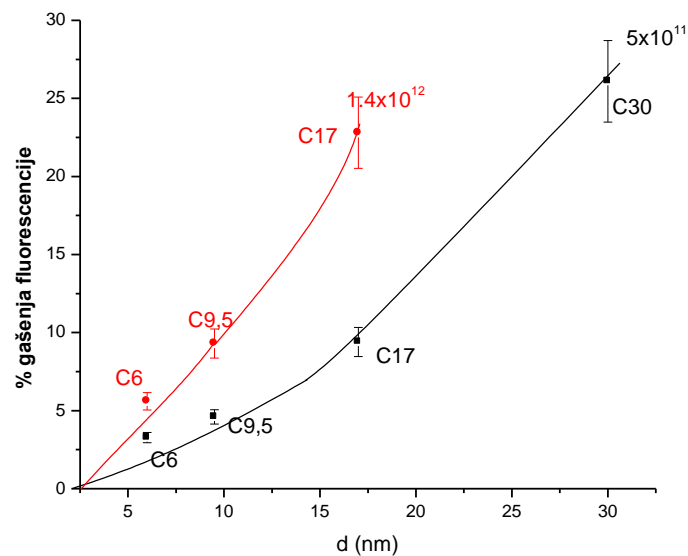
Iz rezultata predstavljenih na Slici 50 izvedene su promene intenziteta fluorescencije $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje u zavisnosti od koncentracije koloida C6 na 485 nm i odgovarajuća zavisnost je prikazana na Slici 51.



Slika 51. Zavisnost intenziteta fluorescencije rastvora koji sadrži $1,67 \times 10^{-5}$ M TC i koloid C6 od koncentracije nanočestica na 485 nm

I u ovom slučaju krajnja tačka titracije je dobijena ekstrapolacijom prave linije do nultog intenziteta fluorescencije. Finalna koncentracija nanočestica C6, potrebna za dostizanje krajnje tačke titracije iznosila je $9,5 \times 10^{-8}$ M ($1,72 \times 10^{14}$).

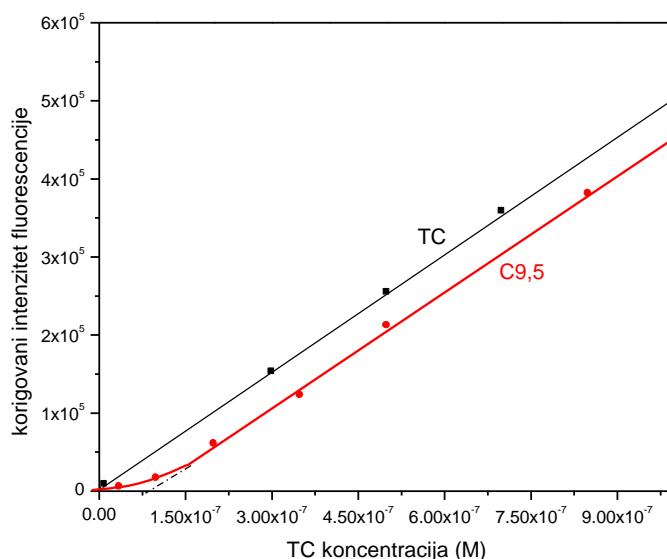
Ovde treba naglasiti i korelaciju između efikasnosti gašenja fluorescencije i veličine nanočestice, koja je poređenja radi urađena i prikazana za četiri koloidne disperzije, C6, C9,5, C17 i C30, u prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje. Na Slici 52 je prikazan uticaj prečnika nanočestice na procenat eksperimentalno dobijenog gašenja fluorescencije, u prisustvu $1,4 \times 10^{12}$ i 5×10^{11} nanočestica.



Slika 52. Uticaj veličine čestice na efikasnost gašenja fluorescencije u prisustvu $1,4 \times 10^{12}$ i 5×10^{11} nanočestica i $1,67 \times 10^{-5}$ M TC

Ovi rezultati su pokazali da je sa povećanjem prečnika nanočestice došlo do povećanja procenta gašenja fluorescencije u slučaju sva četiri koloida.

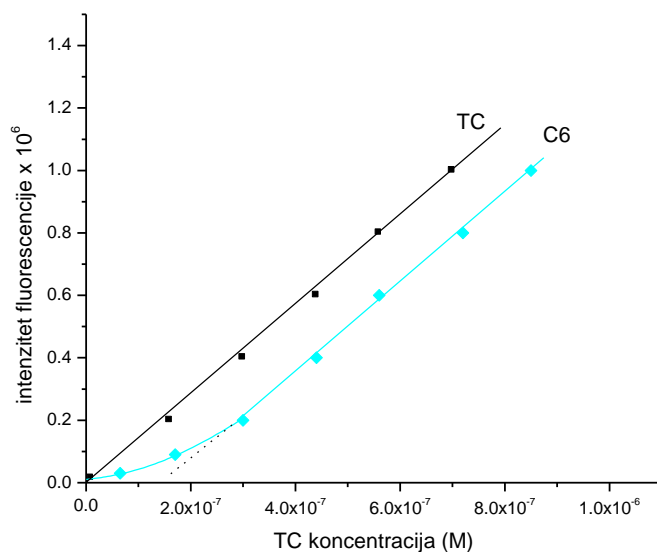
U drugoj seriji eksperimenata meren je intenzitet fluorescencije TC boje, pri čemu je koncentracija nanočestica, $2,8 \times 10^{-10}$ M, održavana konstantnom (5×10^{11} nanočestica u 3 mL), dok je koncentracija TC varirana u opsegu od 1×10^{-8} do 1×10^{-6} M. Zavisnost intenziteta fluorescencije koloidne disperzije C9,5 u prisustvu TC boje korigovane za efekat unutrašnjeg filtera na 485 nm od koncentracije TC je predstavljena na Slici 53.



Slika 53. Zavisnost korigovanog intenziteta fluorescencije na 485 nm od koncentracije TC za koloid C9,5, u prisustvu 5×10^{11} nanočestica

Sa Slike 53 se, iz preseka prave linije ekstrapolisane do nultog intenziteta fluorescencije, može videti da za koncentraciju TC koja je bila niža od $0,8 \times 10^{-7}$ M, nije došlo do fluorescencije, i ovo je koncentracija boje pri kojoj je površina nanočestice C9,5 zasićena molekulima TC. Slično kao i u slučaju koloidnih disperzija C17 i C30, dalji dodatak TC boje u ovu koloidnu disperziju je vodio ka povećanju intenziteta emisije zbog fluorescencije koja potiče od TC dianjona u rastvoru, bez ikakvih indicacija o agregaciji boje. Na Slici 53 je, zbog poređenja, predstavljena i fluorescencija same TC boje u zavisnosti od koncentracije.

U drugoj seriji eksperimenata sa koloidnom disperzijom C6, meren je intenzitet fluorescencije TC boje, pri čemu je koncentracija nanočestica ($2,8 \times 10^{-10}$ M, tj. 5×10^{11} nanočestica u 3 mL), održavana konstantnom, dok je koncentracija TC varirana u opsegu od 1×10^{-8} do $8,5 \times 10^{-7}$ M. Zavisnost intenziteta fluorescencije na 485 nm koloidne disperzije C6 u prisustvu TC boje od koncentracije TC, zajedno sa fluorescencijom same boje u funkciji koncentracije, je predstavljena na Slici 54.



Slika 54. Zavisnost intenziteta fluorescencije na 485 nm od koncentracije TC za koloid C6, u prisustvu 5×10^{11} nanočestica

Sa Slike 54 se, iz preseka prave linije ekstrapolisane do nultog intenziteta fluorescencije, može videti da za koncentraciju TC koja je bila niža od $1,3 \times 10^{-7}$ M, nije došlo do fluorescencije, i ovo je koncentracija boje pri kojoj je površina nanočestice C6 zasićena molekulima TC. Dalji dodatak TC boje u ovu koloidnu disperziju je takođe vodio ka povećanju intenziteta emisije.

Na isti način i uz iste početne pretpostavke kao i kod koloidnih disperzija C17 i C30 (poglavlje 4.2.2.4), izračunat je broj molekula TC potreban da bi se pokrila površina nanočestica C9,5 i C6. Ovi rezultati su, zajedno sa brojem molova TC po kvadratnom centimetru (mol/cm^2) za sve tri moguće orijentacije boje, predstavljeni u Tabeli 10. Tako je donja granica pokrivenosti u slučaju horizontalne orijentacije TC boje adsorbovane na površini, dok je gornja granica u slučaju vertikalne orijentacije boje duž kraće strane.

Tabela 10. Izračunat broj molekula TC adsorbovanih na površini nanočestice C9,5 i C6

koloid	SAnp (nm ²)	Broj molekula TC boje potreban da bi se prekrila površina naočestice za tri različite orijentacije boje				Γ_0 (mol/cm ²)		
		horizontalno	vertikalno duž duže strane	vertikalno duž kraće strane	srednja vrednost	horizontalno	vertikalno duž duže strane	vertikalno duž kraće strane
C9,5	283	75	217	362	218	$4,44 \times 10^{-11}$	$1,28 \times 10^{-10}$	$2,14 \times 10^{-10}$
C6	113	30	87	145	87			

Za prvi set merenja sa koloidima C9,5 i C6, koristeći vrednosti iz Tabele 10 (gde je SAnp površina sferne nanočestice sa prečnikom dobijenim iz TEM merenja), izračunata je koncentracija nanočestica koja može potpuno da ugasi fluorescenciju 1×10^{-6} M TC i $1,67 \times 10^{-5}$ M TC, za sve tri moguće orijentacije boje na površini nanočestice. U slučaju C9,5 dobijene su vrednosti $1,3 \times 10^{-8}$ M u slučaju horizontalne orijentacije, $2,7 \times 10^{-9}$ M kod vertikalne orijentacije duž kraće strane i $4,6 \times 10^{-9}$ M kod vertikalne orijentacije duž duže strane. Eksperimentalno dobijen rezultat u prvom setu merenja, $2,78 \times 10^{-9}$ M, koji predstavlja koncentraciju nanočestica potrebnu da bi došlo do potpunog gašenja fluorescencije TC boje, po vrednosti najpribližnije odgovara vertikalnoj orijentaciji boje duž kraće strane. Poređenjem položaja molekula TC boje na površini nanočestica zlata sa asorbovanim boratnim i ctratnim jonima uočava se da postoji razlika. S druge strane, za koloid C6 su dobijene vrednosti $5,53 \times 10^{-7}$ M u slučaju horizontalne orijentacije, $1,15 \times 10^{-7}$ M kod vertikalne orijentacije duž kraće strane i $1,91 \times 10^{-7}$ M kod vertikalne orijentacije duž duže strane. Eksperimentalno dobijen rezultat koncentracije nanočestica C6 potrebne da bi došlo do potpunog gašenja fluorescencije $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje je $9,5 \times 10^{-8}$ M, što je dosta niža vrednost od teorijski izračunatih za sve tri moguće

orijentacije. Iz ove činjenice je zaključeno da se, u slučaju koloidne disperzije C6, boja na površini nanočestice smešta u više od jednog sloja.

Za drugi set merenja sa koloidima C9,5 i C6 izračunata je koncentracija TC boje potrebna da pokrije površinu nanočestice (u slučaju monoslojne površinske pokrivenosti nanočestice) i da fluorescencija boje bude potpuno ugašena, za sve tri moguće orijentacije boje na površini nanočestice. Dobijene vrednosti za koloid C9,5 su $2,1 \times 10^{-8}$ M za horizontalnu orijentaciju, 1×10^{-7} M za vertikalnu orijentaciju duž kraće strane i 6×10^{-8} M za vertikalnu orijentaciju duž duže strane. Prema tome, eksperimentalno dobijena vrednost od 8×10^{-8} (Slika 53) ukazuje da je orijentacija TC boje na površini nanočestica C9,5 između vertikalne orijentacije duž kraće i duž duže strane. Dobijene vrednosti za koloid C6 su $8,3 \times 10^{-9}$ M TC za horizontalnu orijentaciju, 4×10^{-8} M za vertikalnu orijentaciju duž kraće strane i $2,4 \times 10^{-8}$ M za vertikalnu orijentaciju duž duže strane, koje imaju niže vrednosti od eksperimentalno dobijene vrednosti, $1,3 \times 10^{-7}$ M TC (Slika 54). Ovo ukazuje na to da se florescencija većeg broja molekula TC boje gasi, nego što je teorijski izračunato za monoslojnu površinsku pokrivenost nanočestice, a to opet govori o više slojeva TC od jednog na površini nanočestice C6, smeštenih najverovatnije u kosoj orijentaciji.

Kao i u slučaju koloida C17 i C30, kvantitativno je analiziran set podataka dobijen iz eksperimenata gašenja fluorescencije kao funkcije koncentracije nanočestica C9,5 i C6, u prisustvu 1×10^{-6} M i $1,67 \times 10^{-5}$ M TC. Uzimajući da jedna nanočestica može adsorbovati određen broj molekula boje koji je dat u Tabeli 10, izračunat je, u slučaju sve tri moguće orijentacije TC, procenat (%) boje čija je fluorescencija ugašena ovim nanočesticama.

Na osnovu promene intenziteta fluorescencije po dodatku različitih količina koloida C9,5, poređene su efikasnosti gašenja fluorescencije 1×10^{-6} M TC boje ovim koloidom, između izračunatih i eksperimentanih rezultata (Slika 48). Ovi rezultati su predstavljeni u Tabeli 11.

Tabela 11. Gašenje fluorescencije (na 485 nm) 1×10^{-6} M rastvora TC boje ($1,8 \times 10^{15}$ molekula TC) nanočesticama zlata C9,5, dobijenih redukcijom Au(III) borhidridnim jonima

Koloid C9,5					
broj nanočestica Au $\times 10^{12}$	korigovan intenzitet fluorescencije (485 nm) $\times 10^5$	% fluorescencije TC boje ugašene u prisustvu nanočestica C9,5			
		<i>eksperimentalno</i>	<i>izračunato</i>		
			horizontalno	Vertikalno duž kraće strane	Vertikalno duž duže strane
0	5,00	0	0	0	0
0,34	4,51	9,8	1,4	6,9	4,1
1,01	4,31	13,8	4,2	20,3	12,2
1,68	3,31	33,8	7,0	33,8	20,2
2,53	2,50	50,0	10,5	50,9	30,5
3,03	1,84	63,2	12,6	60,9	36,5

Iz podataka u Tabeli 11 se može zaključiti da su eksperimentalno dobijeni rezultati ukazali da je ugašena fluorescencija većeg broja molekula TC od broja molekula boje potrebnog za potpuno pokrivanje površine nanočestice u horizontalnoj i vertikalnoj orijentaciji TC duž duže strane. Na osnovu rezultata dobijenih iz oba seta eksperimenata i njihovog poređenja sa izračunatim rezultatima moglo je da se pretpostavi da su molekuli TC boje na površini nanočestica C9,5 smešteni u verikalnoj orijentaciji duž kraće strane.

Na osnovu promene intenziteta fluorescencije po dodatku različitih količina koloida C6, poređene su efikasnosti gašenja fluorescencije $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje ovim koloidom, između izračunatih i eksperimentalnih rezultata (Slika 51). Ovi rezultati su predstavljeni u Tabeli 12.

Tabela 12. Gašenje fluorescencije (na 485 nm) $1,67 \times 10^{-5}$ M rastvora TC boje (3×10^{16} molekula TC) nanočesticama zlata C6, dobijenih redukcijom Au(III) borhidridnim jonima

Koloid C6					
broj nanočestica Au $\times 10^{13}$	intenzitet fluorescencije (485 nm) $\times 10^6$	% fluorescencije TC boje ugašene u prisustvu nanočestica C6			
		eksperimentalno	izračunato		
			horizontalno	Vertikalno duž kraće strane	Vertikalno duž duže strane
0	10,94	0	0	0	0
0,45	10,75	1,7	0,45	2,18	1,31
0,89	10,44	4,6	0,89	4,28	2,57
1,79	9,82	10,2	1,79	8,64	5,18
2,67	9,30	14,9	2,67	12,92	7,75
3,56	8,33	23,9	3,56	17,19	10,32
4,44	8,33	23,9	4,44	21,47	12,88
5,35	7,49	31,5	5,35	25,83	15,50
6,23	7,01	35,9	6,23	30,11	18,07
7,14	6,19	43,4	7,14	34,47	20,68
8,02	5,86	46,4	8,02	38,75	23,25
8,91	5,50	49,7	8,91	43,03	25,82

Iz podataka u Tabeli 12 se može videti da su eksperimentalno dobijeni rezultati ukazali da je ugašena fluorescencija većeg broja molekula TC od broja molekula boje potrebnog za potpuno monoslojno pokrivanje površine nanočestice C6, i to za sve tri moguće orijentacije TC. Na osnovu rezultata dobijenih iz oba seta eksperimenata i njihovog poređenja sa izračunatim vrednostima moglo je da se zaključi da su molekuli TC na površini nanočestica C6 smešteni u više slojeva, najverovatnije u kosoj orijentaciji.

Kao i u slučaju koloidnih disperzija C17 i C30, i u slučaju koloida C9,5 i C6, u teorijskim izračunavanjima nije uzeta u obzir hrapavost površine same nanočestice.

4.2.3.5 Izračunavanje konstante ravnoteže

Na isti način kao i u slučaju koloidnih disperzija C17 i C30 (poglavlje 4.2.2.5), analizirana je zavisnost intenziteta fluorescencije korigovanog za efekat unutrašnjeg filtera od koncentracije nanočestica C9,5 (Slika 48) i zavisnost intenziteta fluorescencije od koncentracije nanočestica C6 (Slika 51).

U Tabeli 13 su date vrednosti konstante ravnoteže K (jednačina (23)) za koloidne disperzije C9,5 i C6, dobijene iz nagiba i odsečka iz jednačine (23) izračunate za orijentaciju TC duž horizontalne, vertikalne orijentacije duž duže strane i vertikalne orijentacije duž kraće strane (rezultat dobijen za konstantu ravnoteže računatu za vertikalnu orijentaciju TC duž kraće strane na površini nanočestica C9,5 je bio negativan).

Tabela 13. Konstante ravnoteže za proces adsorpcije TC boje na nanočestice C6 i C9,5

Koloid	Odsečak $\times 10^6$	Nagib $\times 10^{14}$	$K [M^{-1}]$		
			horizont.	vertikalno duž duže strane	vertikalno duž kraće strane
C6	$10,94 \pm 0,07$	$-1,15 \pm 0,1$	$7,24 \times 10^4$	$1,19 \times 10^5$	$3,45 \times 10^5$
C9,5	$0,50 \pm 0,05$	$-1,79 \pm 0,05$	$1,27 \times 10^6$	$2,54 \times 10^6$	–

Iz Tabele 13 se može videti da su, u slučaju nanočestica C9,5 dobijene malo niže vrednosti konstanti ravnoteže, K , u poređenju sa vrednostima dobijenim za koloidne disperzije, C17 i C30.

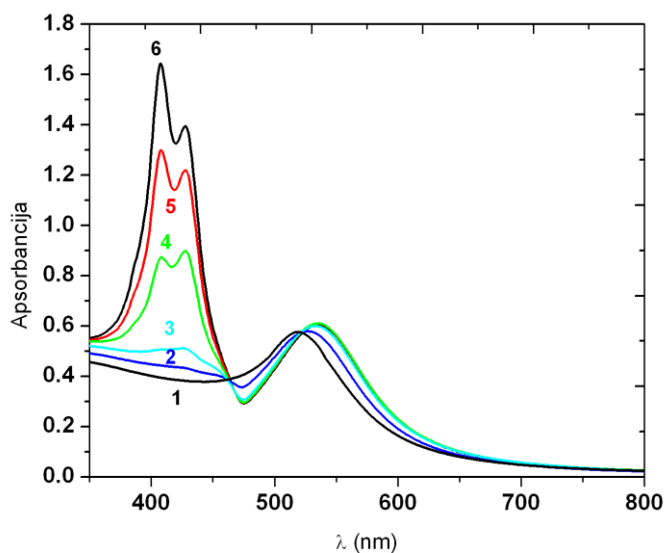
Kod koloidne disperzije C6, konstante ravnoteže su računate za koncentraciju TC $1,67 \times 10^{-5}$ M, pri kojoj je u apsorpcionim spektrima (Slika 44 i 55) najizraženiji formirani *minimum* na 475 nm, karakterističan za stvaranje J-agregata TC boje. Intenzitet fluorescencije u ovom slučaju nije korigovan za efekat unutrašnjeg filtera, pa se vrednosti ovih konstanti ne mogu uporediti sa vrednostima dobijenih konstanti za C9,5, C17 i C30.

4.2.4 Formiranje J-agregata

4.2.4.1 Spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko ispitivanje interakcije nanočestica C6 sa TC bojom

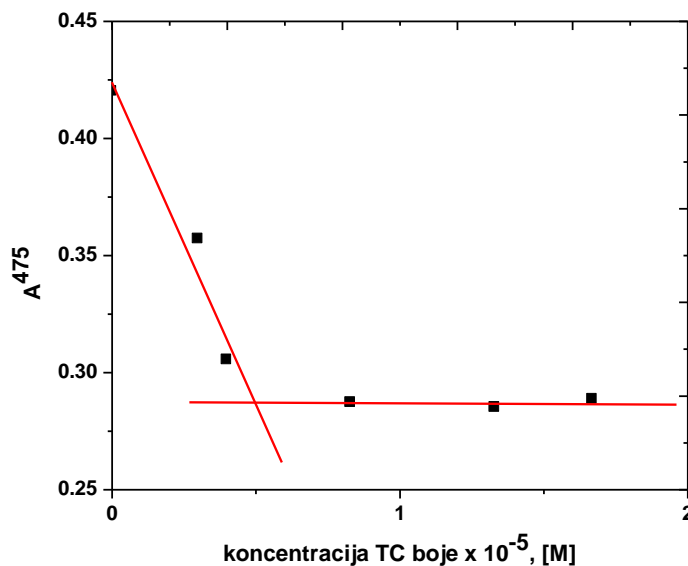
Kao što je ranije rečeno (poglavlje 4.2.3.1, Slika 44), jedino u prisustvu koloidnih čestica C6 dolazi do organizovanja boje tj. formiranja J-agregata. Karakterističan apsorpcioni *minimum* na 475 nm ukazuje na formiranje J-agregata TC boje na površini nanočestica [1,12]. Ovaj *minimum* predstavlja glavnu spektrofotometrijsku karakteristiku hibrida nanočestica C6/TC boja, pa je dalje posebna pažnja posvećena ispitivanju ovog fenomena.

Na Slici 55 su prikazani apsorpcioni spektri 5×10^{-8} M koloidne disperzije C6, pre i nakon dodavanja TC boje u koncentracionom opsegu $0,167 \times 10^{-5}$ M – $1,67 \times 10^{-5}$ M, snimljeni u prisustvu 0,1 M KCl. Prisustvo KCl je neophodno da potpomogne J-agregaciju TC boje na površini čestica.



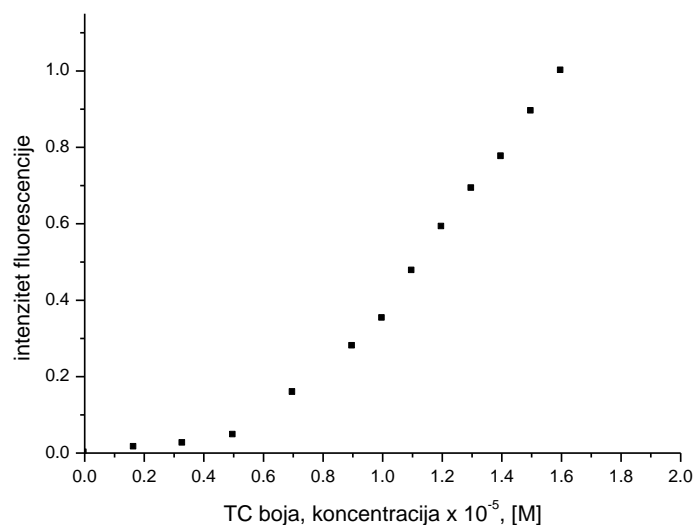
Slika 55. Promena apsorpcionih spektara koloidne disperzije C6 ($C_{Au} : 5 \times 10^{-8}$ M) u zavisnosti od koncentracije TC: 0 M (1); $0,167 \times 10^{-5}$ M (2); $0,33 \times 10^{-5}$ M (3); $0,83 \times 10^{-5}$ M (4); $1,33 \times 10^{-5}$ M (5); $1,67 \times 10^{-5}$ M (6)

Promena apsorbancije koloidne disperzije C6 (koncentracija nanočestica 5×10^{-8} M) na 475 nm u zavisnosti od koncentracije TC boje, predstavljena je na Slici 56.



Slika 56. Zavisnost apsorbancije na 475 nm (A^{475}) 5×10^{-8} M koloidne disperzije C6 od koncentracije TC boje

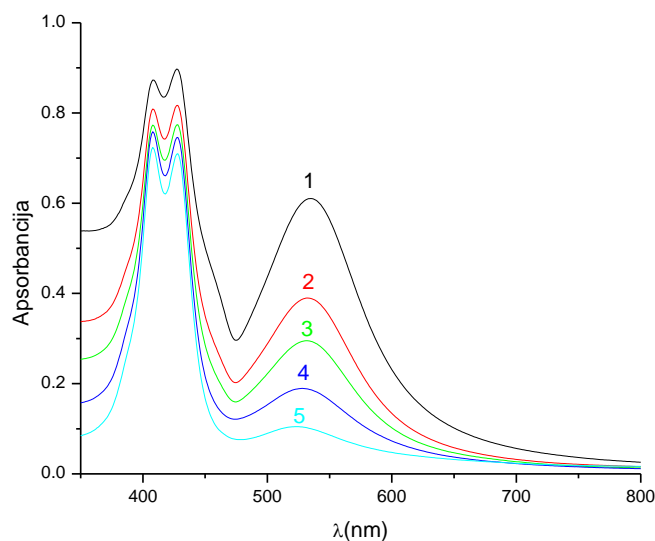
U narednom eksperimentu je ispitana zavisnost intenziteta fluorescencije (tj. gašenja fluorescencije) na ~ 485 nm od koncentracije TC boje pri konstantnoj koncentraciji nanočestica C6. Ova zavisnost je prikazana na Slici 57, pri čemu je koncentracija nanočestica bila 5×10^{-8} M dok je koncentracija boje varirana u opsegu $0,167 \times 10^{-5}$ M do $1,67 \times 10^{-5}$ M.



Slika 57. Zavisnost intenziteta fluorescencije 5×10^{-8} M koloidne disperzije C6 od koncentracije TC boje na 490 nm

U ovom slučaju može se videti značajna promena u fluorescentnom signalu iznad koncentracije TC $0,5 \times 10^{-5}$ M. Najverovatnije je da ova vrednost koncentracije označava zasićenje površine nanočestice C6, i da iznad ove koncentracije dodatni molekuli TC ostaju slobodni u rastvoru i doprinose povećanju fluorescentnog signala. Iz ovih rezultata se može izvesti zaključak da na jednakoj vrednosti granične koncentracije TC boje, $0,5 \times 10^{-5}$ M, dolazi do značajnih promena i u slučaju apsorpcionih i fluorescentnih merenja (Slika 56 i Slika 57).

Bilo je od interesa ispitati da li formiranje J-agregata zavisi od koncentracije nanočestica za datu koncentraciju boje. Zbog toga je ispitana zavisnost intenziteta spektralnih promena od različitih koncentracija nanočestica C6, dok je koncentracija TC održavana konstantnom, $0,83 \times 10^{-5}$ M, u prisustvu 1 mM KCl. Rezultati su prikazani na Slici 58.



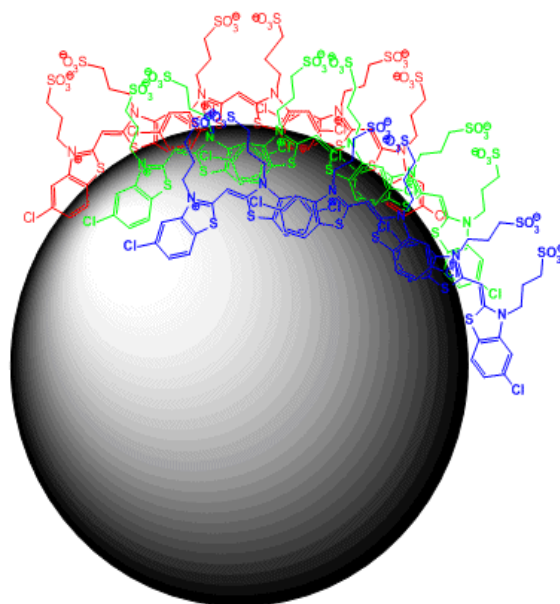
Slika 58. Apsorpcioni spektri kooidne disperzije C6 u prisustvu TC boje. C_{TC} : $0,83 \times 10^{-5}$ M, C_{Au} : 5×10^{-8} M (1); $4,7 \times 10^{-8}$ M (2); $3,5 \times 10^{-8}$ M (3); $2,3 \times 10^{-8}$ M (4); $1,2 \times 10^{-8}$ M (5)

Sa Slike 58 se može videti, da je, i u ovom slučaju, iznad određene granične koncentracije nanočestica C6, koja je iznosila $3,5 \times 10^{-8}$ M, došlo do pomeranja trake plazmona ka crvenoj oblasti i do formiranja apsorpcionog minimuma na 475 nm (kriva 3, Slika 58), karakterističnog za formiranje J-agregata TC boje na površini nanočestica zlata [1, 3, 11].

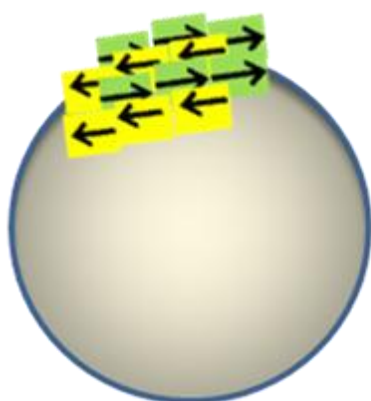
4.2.4.2 Formiranje J-agregata u prisustvu nanočestica C6

Eksperimentalni rezultati dobijeni u prethodnom poglavlju omogućili su izračunavanje broja slojeva boje koji učestvuju u formiranju J-agregata. Sa Slike 55 i 56 se može uočiti da intenzitet ekscitona odnosno veličina *minimuma* raste sa povećanjem koncentracije TC boje do određene granične koncentracije koja približno iznosi $0,5 \times 10^{-5}$ M. Sa daljim povećavanjem koncentracije TC boje ne dolazi do daljeg porasta intenziteta ekscitona tj. do povećanja veličine *minimuma* na 475 nm. Da bi se izračunao broj slojeva boje koji učestvuje u formiranju J-agregata, najpre je izračunat broj nanočestica C6 po dm^3 rastvora za 5×10^{-8} M koncentraciju nanočestica C6, množenjem sa Avogadrovim brojem ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) i on iznosi 3×10^{16} . Na isti način je dobijeno i da broj TC

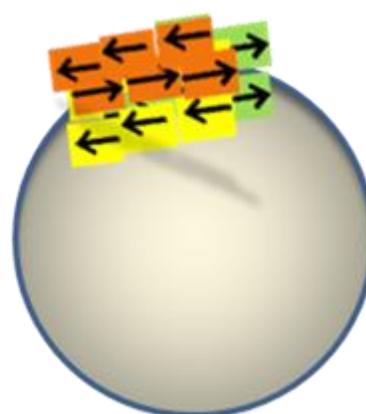
molekula po dm^3 rastvora koji odgovara graničnoj koncentraciji TC od 5×10^{-6} M iznosi 3×10^{18} . Prema tome, pri ovoj graničnoj koncentraciji TC boje i koncentraciji nanočestica Au 5×10^{-8} M, broj molekula TC adsorbovan na jednoj nanočestici zlata iznosi približno 100. Kada se uzme da srednja vrednost prečnika nanočestica zlata iznosi 6 nm (vrednost dobijena iz TEM merenja), dobijamo da je površina jedne nanočestice zlata 113 nm^2 (Tabela 10). Kao što je već spomenuto (poglavlje 4.2.2.4), u publikaciji koju su objavili Lim i saradnici [76] cijanska boja slične strukture kao TC (boja strukture indola) ima dimenzije su $2,5 \text{ nm} \times 1,5 \text{ nm} \times 0,5 \text{ nm}$. U ovom proračunu uzeta je početna pretpostavka da je orijentacija TC horizontalna, pa prema tome jedan tiocijanski molekul boje ima površinu otprilike $3,75 \text{ nm}^2$ (tj. naleže na površinu nanočestice sa tom površinom). Prema tome, ako se uzme da u graničnom slučaju molekuli TC boje u prvom sloju koji okružuje nanočesticu zlata leže u horizontalnom ili kosom položaju na površini nanočestice, dobija se da je broj molekula boje u prvom sloju približno 30. Ukoliko bi ovo bio slučaj, optimalna dubina *minimuma* ekscitona na 475 nm bi bila dostignuta kada bi 3 sloja molekula TC boje bila naslagana jedan na drugom na površini nanočestice zlata C6, jer na jednu nanočesticu zlata dolazi 100 molekula boje. Uzimajući u obzir elektrostatičke sile, odnosno odbojne interakcije između negativno naelektrisanih površina nanočestica i negativno naelektrisanih terminalnih sulfo-grupa TC boje, malo je verovatno da molekuli TC leže horizontalno na površini nanočestice. Iz ovoga se može zaključiti (ovim je omogućeno) da više od 30 molekula boje može da se spakuje u prvi – površinski sloj, i da se optimalni signal ekscitona najverovatnije dostigne sa 2 sloja J-agregata TC boje koji pokrivaju površinu nanočestice. Na Slici 59 je prikazana ova najverovatnija - kosa konfiguracija.



(a)



(b)

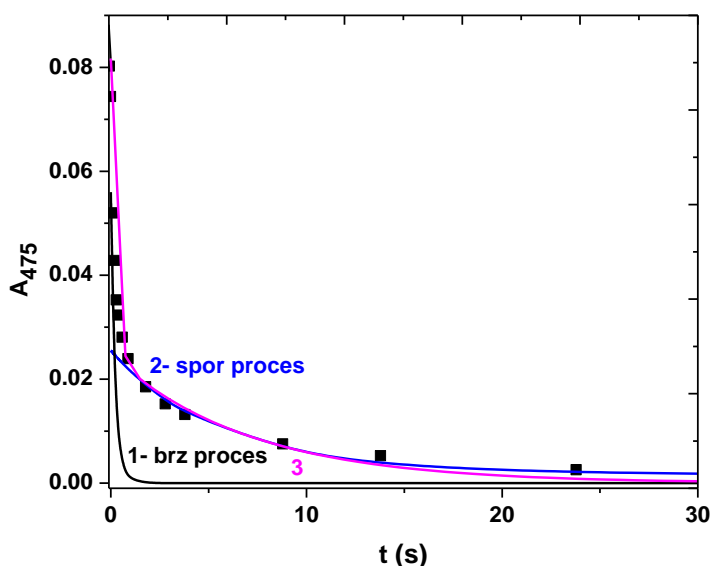


(c)

Slika 59. Ilustracija položaja molekula boje na površini nanočestice zlata (a); prvi sloj: dipoli konsektivnih redova TC boje su orijentisani u suprotnim smerovima, što je predstavljeno žutim i zelenim blokovima (b); drugi sloj (narandžasti blokovi) na površini tj. iznad prvog sloja (c)

4.2.4.3 Kinetika i mehanizam formiranja J-agregata

Kinetika formiranja J-agregata je praćena u zavisnosti od vremena na dva naćina: praćenjem promene apsorbancije na 475 nm i fluorescencije na ~485 nm. U slućaju obe metode dobijene su veoma slićne kinetićke krive. Na Slici 60 (kriva 3) je predstavljena tipićna kinetićka kriva dobijena iz spektrofotometrijskog merenja brzine reakcije za disperzioni sistem koji je sadržavao TC ($1,67 \times 10^{-5}$ M) i nanoćestice C6 (5×10^{-8} M).



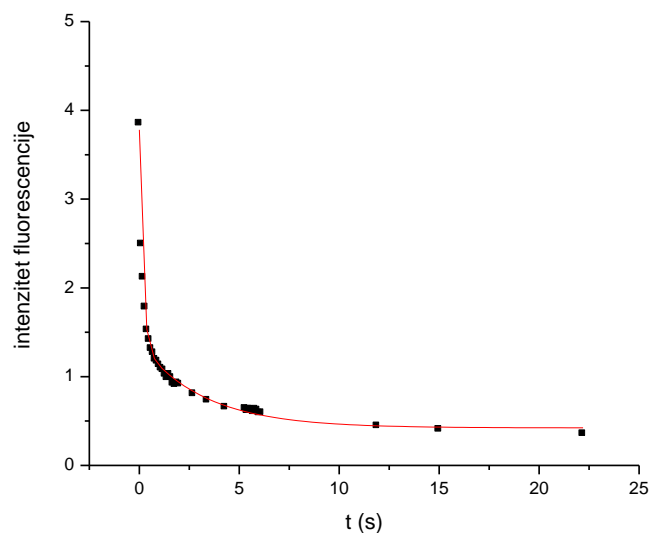
Slika 60. Promena apsorbancije (A_{475}) u zavisnosti od vremena za disperzioni sistem koji sadrži $1,67 \times 10^{-5}$ M TC i 5×10^{-8} M nanoćestice Au na 28° C. Kvadratići- eksperimentalne taćke; kriva (1) – brz proces; kriva (2) – spor proces i kriva (3) – fitovanje eksperimentalno dobijenih rezultata sa jednaćinom (24)

Eksperimentalno dobijene taćke predstavljene na Slici 60 su se najbolje mogle fitovati jednaćinom (24), koja predstavlja aproksimiranu formu jednaćine koja opisuje dve konsekutivne reakcije prvog reda [175]:

$$A = A_0 + A_1 \exp(-k_{\text{obs1}}t) + A_2 \exp(k_{\text{obs2}}t) \quad (24)$$

gde su A_1 , A_2 i A_0 konstante. Konstante brzine prvog reda za brži i sporiji proces su $k_{1\text{obs}}$ i $k_{2\text{obs}}$. Fitovanjem eksperimentalno dobijenih rezultata na Slici 60 sa jednačinom (24) dobijene su vrednosti za $k_{1\text{obs}} = (4,514 \pm 0,445) \text{ s}^{-1}$, $k_{2\text{obs}} = (1,81 \pm 0,45) \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, $A_1 = (5,6 \pm 0,2) \times 10^{-2}$, $A_2 = (2,4 \pm 0,2) \times 10^{-2}$ i $A_0 = (1,56 \pm 0,33) \times 10^{-3}$. Vrednosti za poluvremena reakcija koja odgovaraju bržem i sporijem procesu su $t_1^{1/2} = 0,221 \pm 0,022 \text{ s}$ i $t_2^{1/2} = 5,524 \pm 0,136 \text{ s}$.

Na Slici 61 je predstavljena kinetička kriva za fluorescenciju dobijena iz fluorescentnih merenja brzine reakcije za disperzioni sistem koji je sadržavao $1,67 \times 10^{-5} \text{ M TC}$ i $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ nanočestica C6. I u ovom slučaju eksperimentalno dobijeni podaci su se najbolje mogli fitovati sa jednačinom (24). Dobijene vrednosti za poluvremena reakcija koja odgovaraju bržem i sporijem procesu su $t_1^{1/2} = 0,171 \pm 0,009 \text{ s}$ i $t_2^{1/2} = 3,225 \pm 0,389 \text{ s}$. Fitovanjem eksperimentalno dobijenih podataka na Slici 61 sa jednačinom (24) dobijene su i vrednosti za $k_{1\text{obs}} = (5,85 \pm 0,33) \text{ s}^{-1}$, $k_{2\text{obs}} = (3,00 \pm 0,45) \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, $A_1 = (2,4 \pm 0,06)$, $A_2 = (0,94 \pm 0,04)$ i $A_0 = (0,42 \pm 0,03)$. Ove vrednosti se, u granicama eksperimentalne greške, slažu sa vrednostima konstanti brzina reakcije dobijenim iz spektrofotometrijskih merenja.

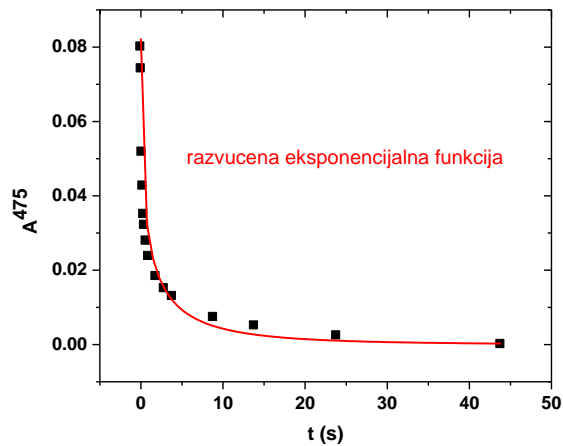


Slika 61. Zavisnost intenziteta fluorescencije na $\sim 485 \text{ nm}$ od vremena za disperziju koja sadrži $1,67 \times 10^{-5} \text{ M TC}$ i $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ koncentraciju nanočestica Au na 28° C . Kvadratići –

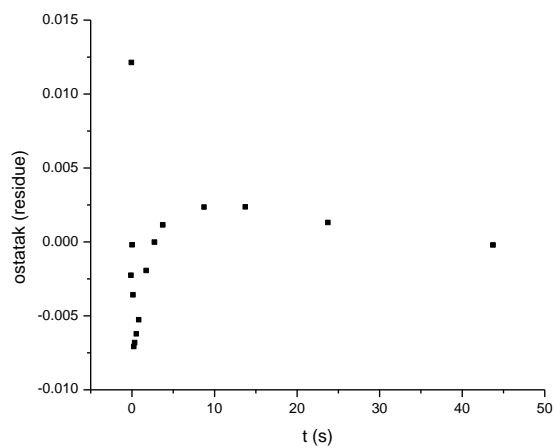
eksperimentalne tačke; kriva – fitovanje eksperimentalno dobijenih rezultata sa jednačinom (24)

Rezultati pokazuju da se u slučaju formiranja J-agregata radi o dva procesa, iz čega je, u skladu sa datim kinetičkim podacima, pretpostavljen najverovatniji mehanizam reakcije, prema kojem je brži proces moguće pripisati adsorpciji TC na površini koloidne čestice, a sporiji pregrupisanju TC i formiranju J-agregata.

Da bi se stekao bolji uvid u kinetiku ovog procesa, kinetički podaci su fitovani i sa rastegnutom eksponencijalnom funkcijom (*engl.* stretched-exponential function) [192] tj. formom eksponencijalne funkcije sa dodatnim „stretching“ eksponentom, pošto je u literaturi potvrđeno da se u nekim slučajevima adsorpcija fluorofore na površinama bolje fituje ovakvom funkcijom. Na Slikama 62 - 65 su prikazani rezultati fitovanja eksperimentalnih podataka dobijenih iz spektrofotometrijskih i fluorescentnih kinetičkih merenja sa obe eksponencijalne funkcije, zajedno sa odgovarajućim rezidualnim graficima (*engl.* residual plots).



(a)



(b)

Slika 62. Zavisnost experimentalno dobijenih spektrofotometrijskih kinetičkih podataka „rastegnutom“ eksponencijalnom funkcijom (a) i odgovarajući rezidualni grafik (b)

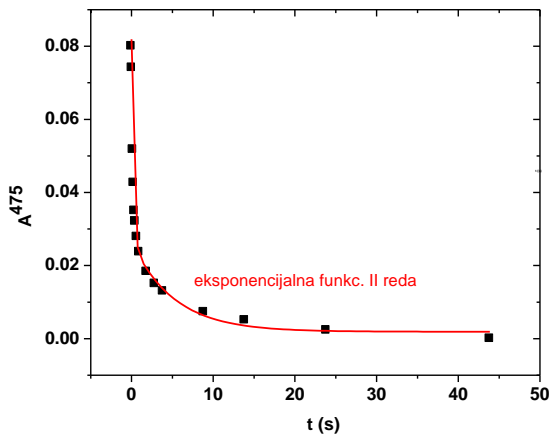
Rezidualni grafik predstavlja razliku između pravih eksperimentalnih podataka (tačaka) i teorijske funkcije kojom se fituje, pri čemu je na vertikalnoj (y) osi predstavljena ta razlika (residual) a na horizontalnoj (x) osi je nezavisna varijabla, u ovom slučaju vreme.

Za „rastegnutu“ eksponencijalnu funkciju korišćena je sledeća jednačina (25):

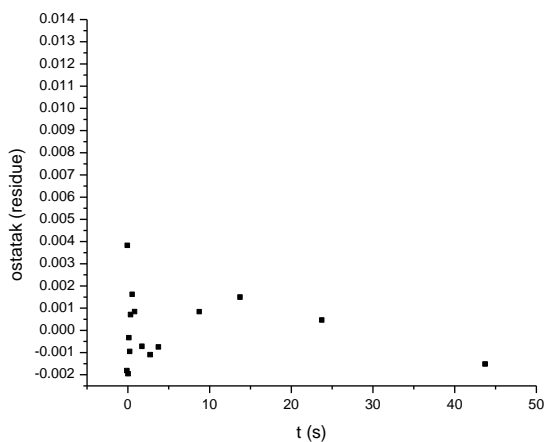
$$y = P1 \times e^{-(P2 \times x)^{P3}} \quad (25)$$

gde je parametar β „stretching“ eksponent (poglavlje 2.3.1.1a)).

i fitovanjem eksperimentalnih spektrofotometrijskih kinetičkih podataka jednačinom (25) dobijeni su sledeći parametri: $P1 = 0,082 \pm 0,005$, $P2 = 1,156 \pm 0,253$, $P3 = 0,443 \pm 0,062$.

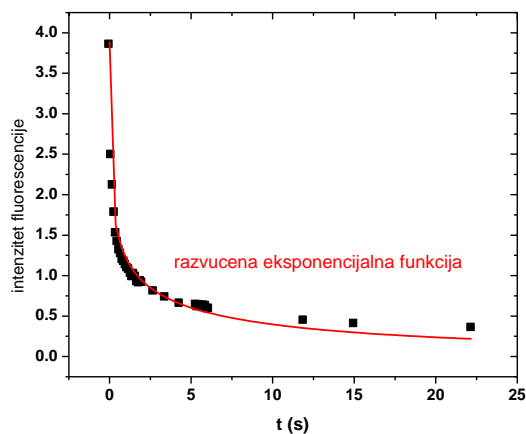


(a)

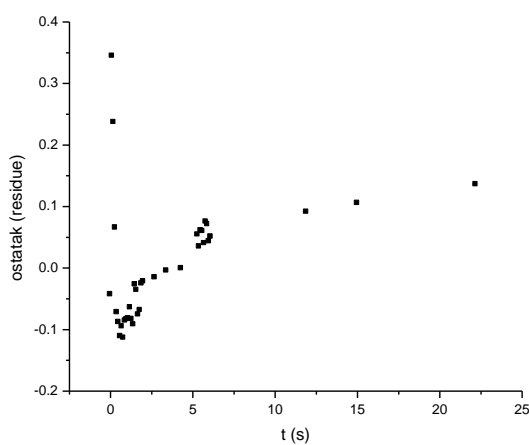


(b)

Slika 63. Fitovanje eksperimentalno dobijenih spektrofotometrijskih podataka sa opadajućom ekponencijalnom funkcijom drugog reda (jedn. (24) (a) i odgovarajući rezidualni grafik (b)



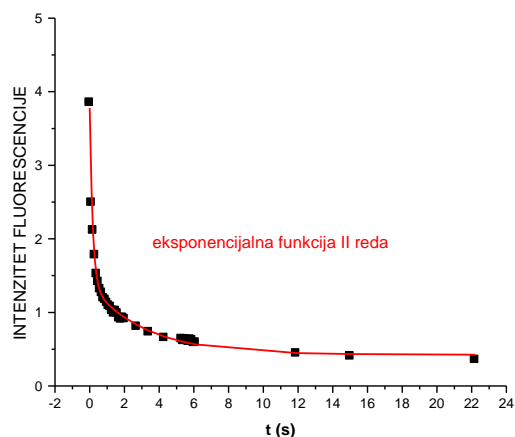
(a)



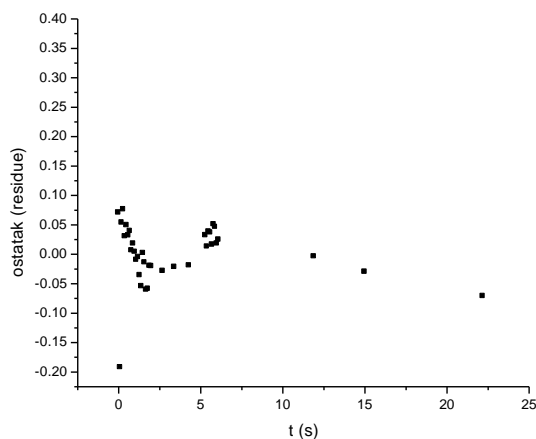
(b)

Slika 64. Fitovanje esperimentalno dobijenih fluorescentnih kinetičkih podataka „rastegnutom“ eksponencijalnom funkcijom (a) i odgovarajući rezidualni grafik (b)

Rezultati su, kao i u slučaju Slike 62, dobijeni fitovanjem esperimentalno dobijenih fluorescentnih kinetičkih podataka jednačinom (25) i pritom su dobijene sledeće vrednosti parametara: $P1 = 3,895 \pm 0,102$, $P2 = 1,692 \pm 0,188$, $P3 = 0,292 \pm 0,014$.



(a)



(b)

Slika 65. Fitovanje eksperimentalno dobijenih fluorescentnih podataka sa opadajućom ekponencijalnom funkcijom drugog reda (jedn. (24)) (a) i odgovarajući rezidualni grafik (b)

Poređenjem sa odgovarajućim rezidualnim graficima, očigledno je da se eksperimentalni podaci, kako iz spektrofotometrijskih tako i iz fluorescentnih merenja, bolje slažu sa opadajućom ekponencijalnom funkcijom drugog reda (jednačina (24)). Na osnovu ovoga zaključeno je da se predstavljeni kinetički model sastoji od dva konsektivna koraka, od kojih je prvi brži za faktor 20.

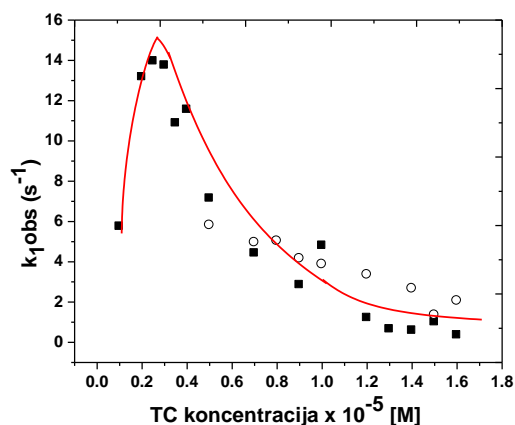
Na osnovu pretpostavljenog mehanizma, prema kojem prvi proces odgovara brzom direktnoj adsorpciji TC boje na nanočestice zlata C6, najverovatnije je da ovaj proces uključuje formiranje J-agregata adsorbovane TC boje preko π - π interakcija sve dok se ne dostigne dovoljna (granična) površinska pokrivenost, što se, u pomenutim uslovima, dešava pri koncentraciji TC boje od $\approx 0,5 \times 10^{-5}$ M (Slike 56 i 57) [2,150]. Ova pretpostavka je u skladu sa činjenicom da obe kinetičke krive, jedna koja je dobijena iz apsorpcije na 475 nm (Slika 60) i druga izvedena iz fluorescencije na ~ 485 nm (Slika 61) pokazuju da postoji ovaj brzi proces. Karakterističan apsorpcioni *minimum* („dip“) na 475 nm koji se može videti u apsorpcionom spektru predstavlja direktan dokaz da dolazi do formiranja J-agregata na površini nanočestice C6. U pretpostavljenom mehanizmu, drugi, sporiji proces, koji se takođe može prepoznati u slučaju obe kinetičke krive, pripisan je rastu J-agregata na početnom (inicijalnom) TC sloju. S druge strane, nasuprot ovom jednostavnom dvostepenom mehanizmu, kinetika formiranja tiocijanskih J-agregata u odsustvu metalnih nanočestica može da se odvija preko kompleksnog autokatalitičkog procesa, koji uključuje ravnotežu između monomera i dimera boje, kao što na to ukazuje i sigmoidni oblik kinetičke krive [79]. Međutim, i u merenjima predstavljenim u ovom radu, sličan ravnotežni proces između monomernog i dimernog oblika boje u rastvoru, koji se dešava paralelno sa J-agregacijom, bi mogao da doprinese uklanjanju (nestajanju) monomernog oblika boje iz rastvora. Pri izvođenju eksperimenata, formiranje J-agregata je praćeno snimanjem promene apsorpcije preko stvaranja minimuma na 475 nm, dok je kod fluorescentnih merenja praćeno gašenje fluorescencije monomera na ~ 485 nm, pa se time može objasniti razlika u dobijenim vrednostima za poluvremena reakcije. Ovakav proces je takođe očigledan i iz promene odnosa apsorpcija dimera i monomera na 409 i 428 nm, što se može videti i sa Slike 55.

4.2.4.3 a) Zavisnost konstanti brzine od koncentracije TC boje

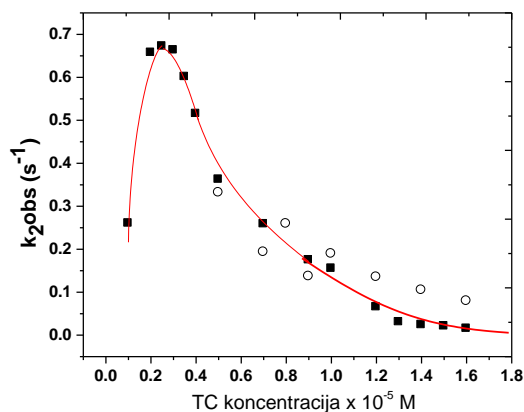
Fluorescentnim i spektrofotometrijskim merenjima brzine reakcije, ispitan je uticaj koncentracije TC boje na kinetiku reakcije bržeg i sporijeg procesa J-agregacije. Brzina reakcije praćena je u rastvoru koloidne disperzije C6, koncentracije nanočestica 5×10^{-8} M u prisustvu TC boje u opsegu koncentracija $0,167 \times 10^{-5}$ M – $1,67 \times 10^{-5}$ M. Rastvor je sadržavao 0,1 M KCl, a merenja su vršena na 16° C.

Kod spektrofotometrijskih merenja, koncentracije TC koje su bile niže od $0,5 \times 10^{-5}$ M nisu pokazale da postoje dovoljne promene u apsolutnoj vrednosti apsorpcije da bi se odredile vrednosti za $k_{1\text{obs}}$ i $k_{2\text{obs}}$, pa su iz tog razloga na Slici 66 (a) i (b) predstavljena merenja samo u opsegu koncentracija $0,5 \times 10^{-5}$ - $1,67 \times 10^{-5}$ M. S druge strane, fluorescentna merenja su se pokazala kao osetljivija, pa su u ovom slučaju konstante brzine $k_{1\text{obs}}$ i $k_{2\text{obs}}$ prikazane za pun opseg koncentracija TC, $0,167 \times 10^{-5}$ M – $1,67 \times 10^{-5}$ M. Vrednosti $k_{1\text{obs}}$ i $k_{2\text{obs}}$ su dobijene fitovanjem kinetičkih krivih sa jednačinom (24) i u svim slučajevima je dobijena vrednost za $k_{1\text{obs}}$ bila veća od vrednosti $k_{2\text{obs}}$.

Na Slici 66 (a) je prikazana zavisnost $k_{1\text{obs}}$ od koncentracije TC, dobijena iz fluorescentnih i spektrofotometrijskih merenja, i vidi se da je ona nelinearna.



(a)



(b)

Slika 66. Zavisnost konstante brzine ($k_{1,obs}$) brzog procesa od koncentracije TC dobijena iz fluorescentnih (kvadratići) i spektrofotometrijskih (kružići) merenja na 16°C (a); zavisnost konstante brzine ($k_{2,obs}$) sporog procesa od koncentracije TC dobijena iz fluorescentnih (kvadratići) i spektrofotometrijskih (kružići) merenja na 16°C (b)

Konstanta brzine $k_{1,obs}$ se može pripisati direktnoj adsorpciji TC boje na nanočesticu C6 i formiranju J-agregata. Slika 66 (a) pokazuje da se sa povećanjem koncentracije TC boje povećava i vrednost $k_{1,obs}$ i da ta vrednost dostiže maksimum pri koncentraciji TC od oko $0,25 \times 10^{-5}\text{ M}$. Sa daljim povećanjem koncentracije TC dolazi do smanjenja vrednosti ove konstante brzine. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim iz spektrofotometrijskih i fluorescentnih merenja (Slika 56 i 57) koji su ukazali na to da je iznad koncentracije TC boje $\sim 0,5 \times 10^{-5}\text{ M}$ površina koloida Au već zasićena TC bojom.

Isti – zvonasti oblik zavisnosti konstante brzine $k_{2\text{obs}}$ od koncentracije TC boje (Slika 66 (b)) je dobijen kako iz fluorescentnih tako i iz spektrofotometrijskih merenja. Konstanta brzine $k_{2\text{obs}}$ se može pripisati daljem rastu J-agregata. Najverovatnije je da, kada se jednom dostigne zasićenje površine nanočestica Au, dalji višak boje se javlja u obliku uravnotežene smeše monomera i dimera u rastvoru. Iako zavisnosti konstanti brzina $k_{1\text{obs}}$ and $k_{2\text{obs}}$ imaju istu funkcionalnu formu, one se razlikuju po vrednosti za faktor 20. Najverovatniji razlog ovome je to što se i brzi i sporiji proces odigravaju adsorpcijom boje na zakrivljenoj površini ali u drugom procesu dolazeći molekuli TC boje takođe moraju da savladaju i sternu zaštićenost sulfo-grupama boje, orijentisanih ka rastvoru.

4.2.4.3 b) Zavisnost brzine reakcije od temperature i određivanje termodinamičkih parametara

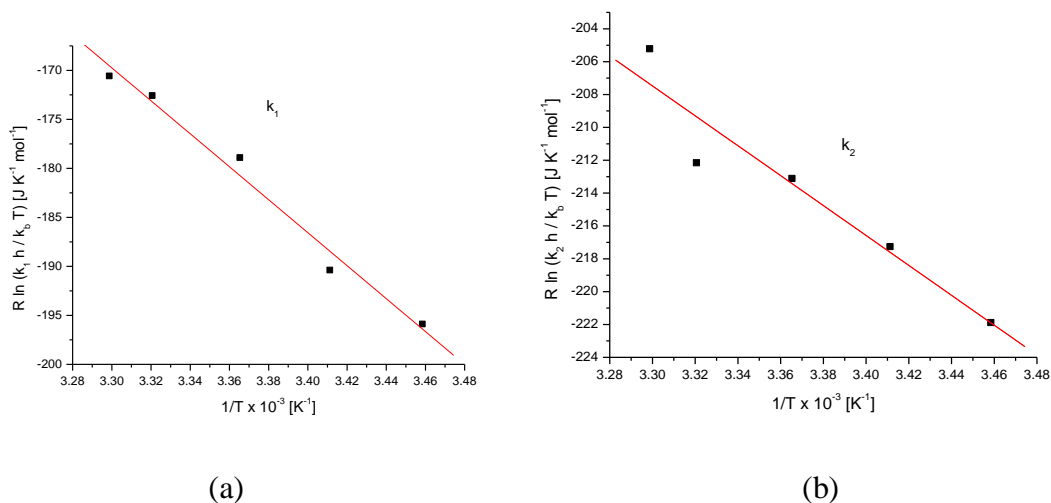
Termodinamički parametri reakcije formiranja J-agregata određeni su praćenjem brzine reakcije oba procesa na osnovu promene fluorescencije, u zavisnosti od vremena na različitim temperaturama. Dobijeni rezultati su pokazali da brzina J-agregacije zavisi od temperature disperznog sistema koji sadrži TC boju i koloid C6, i to da sa povišenjem temperature dolazi do povećanja vrednosti konstanti brzine. Eksperimenti su izvedeni na 16° C, 20° C, 24° C, 28° C i 30° C, u prisustvu 5×10^{-8} M nanočestica zlata C6 i $1,67 \times 10^{-5}$ M TC.

Da bi se detaljnije opisali brz i spor proces J-agregacije, određeni su kinetički parametri korišćenjem Arrhenius-ove jednačine za kinetički izraz reakcije $k = Z \exp(-E_a/RT)$, gde je Z = pre-eksponencijalni faktor, E_a = aktivaciona energija, T = temperatura (K), R = gasna konstanta, $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Odgovarajuće vrednosti za aktivacione energije (izračunate iz grafika zavisnosti $\ln k_{1\text{obs}}$ i $\ln k_{2\text{obs}}$ od $1/T$ direktno iz nagiba) i pre-eksponencijalne faktore (izračunate iz odsečaka na graficima zavisnosti $\ln k_{1\text{obs}}$ i $\ln k_{2\text{obs}}$ od $1/T$) su date u Tabeli 14.

Tabela 14. Termodinamički i aktivacioni parametri J-agregacije TC boje u prisustvu nanočestica C6

	Brz proces	Spor proces
Energija aktivacije, Ea [kJ/mol]	170,7	93,5
Pre-eksponencijalni faktor, Z [s⁻¹]	$2,28 \times 10^{30}$	$1,21 \times 10^{15}$
Entalpija aktivacije, ΔH^\ddagger [kJ/mol]	168,2	91,06
Entropija aktivacije, ΔS^\ddagger [J/mol K]	385,33	93,01

Aktivacioni parametri ΔH^\ddagger i ΔS^\ddagger , koji se odnose na konstante brzina $k_{1\text{obs}}$ i $k_{2\text{obs}}$, su izračunati iz odsečka i nagiba na Slici 67 (a) i (b), korišćenjem Eyring-ove jednačine (brzina reakcije = $k_b T/h \exp(\Delta S^\ddagger/R) \exp(-\Delta H^\ddagger/RT)$), gde k_b predstavlja Boltzmann-ovu konstantu, i dobijene vrednosti parametara su prikazane u Tabeli 14.



Slika 67. Zavisnost $R \ln(k_1 h / k_b T)$ [J K⁻¹ mol⁻¹] od $1/T$ (a) i $R \ln(k_2 h / k_b T)$ [J K⁻¹ mol⁻¹] od $1/T$ (b)

Očekivana razlika između prvog i drugog reakcionog koraka se odrazila i kao nejednakost u doprinosima entalpije u prvom brzom ($\Delta H^\ddagger = 168,2 \text{ kJ mol}^{-1}$) i u drugom sporijem ($\Delta H^\ddagger = 91,06 \text{ kJ mol}^{-1}$) reakcionom koraku. Razlika u vrednostima aktivacionih parametara odražava složenost brzog formiranja J-agregata na površini nanočestica C6 praćenog sporim procesom koji se pripisuje rastu J-agregata na inicijalnom sloju J-agregata. Prvi, brži proces se karakteriše višom aktivacionom barijerom u odnosu na drugi proces (170,7 kJ/mol u odnosu na 93,5 kJ/mol) što je u skladu tj. kompenzuje se sa značajnom razlikom u vrednostima pre-eksponencijalnih faktora, $2,28 \times 10^{30} \text{ s}^{-1}$ u poređenju sa $1,21 \times 10^{15} \text{ s}^{-1}$, a što rezultuje da se vrednosti za brzine reakcije razlikuju za faktor ~ 25 (npr. iz promene apsorbancije na 475 nm u zavisnosti od vremena, na 28° C , $t_1^{1/2} = 0,221 \text{ s}$ i $t_2^{1/2} = 5,524 \text{ s}$). Najverovatnije je da tako visoka vrednost pre-eksponencijalnog faktora za brži proces ukazuje na elektrostatičke interakcije između suprotno naelektrisanih vrsta, za koje su inače i karakteristične visoke vrednosti pre-eksponencijalnih faktora i pozitivnih vrednosti za entropiju [355], kao što su one dobijene ovde. U ovom konkretnom slučaju, ovakve interakcije bi jedino bile moguće ako bi boja prišla negativno naelektrisanj površini nanočestica zlata preko tiazolnog sumpora koji nosi pozitivno naelektrisanje [76]. Ovo objašnjenje je dalje potvrđeno dobijenom visokom vrednošću aktivacione energije za inicijalnu apsorpciju, što ukazuje na to da je potrebno da boja bude odgovarajuće orijentisana da bi došlo do elektrostatičke interakcije. Na početku je uzeta pretpostavka da je drugi proces isključivo kontrolisan difuzijom, ali kada bi to bilo tačno, aktivaciona energija za ovaj proces bi bila slična aktivacionoj energiji za viskozitet vode. Međutim, ova vrednost aktivacione energije, od 93,5 kJ/mol je značajno veća od aktivacione energije za viskozitet vode koja iznosi $\approx 20 \text{ kJ/mol}$ [356,357]. Najverovatnije je da sterna efekat sulfo-grupa, koje su isturene ka rastvoru, doprinosi višoj vrednosti aktivacione barijere u drugom koraku. Prema tome, dobijeni kinetički parametri su u skladu sa predloženim mehanizmom i reakcionim putevima.

U poređenju sa nanočesticama zlata C6 i C9,5, nanočestice C17 i C30, osim što su većih dimenzija, imaju i veću količinu negativnog naelektrisanja adsorbovanog na površini tj. veću apsolutnu vrednost zeta potencijala (poglavlje 4.1.4, Tabela 6). Takođe, za razliku od boratnih jona, citratni joni su jače vezani za površinu nanočestica, pri čemu

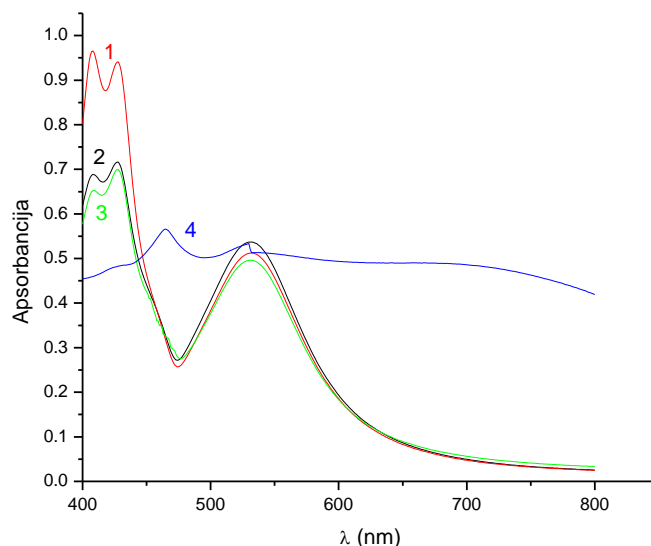
su karboksilne grupe okrenute ka rastvoru i otežavaju prilaz TC boje površini čestice a samim tim i formiranje J-agregata.

S druge strane, kod nanočestica sa adsorbovanim boratnim jonima na površini, najmanje nanočestice C6 sadrže veći broj površinski aktivnih atoma zlata nego veće nanočestice C9,5, kao i manje adsorbovanog negativnog naelektrisanja na površini (Tabela 6). Time se smanjuju elektrostatičke odbojne sile između čestica i boje, koja je takođe negativno naelektrisana zbog prisustva negativnih sulfonskih grupa na krajevima molekula. Ovim je olakšan prilaz molekulima boje površini nanočestica zlata C6 i omogućeno formiranje J-agregata. Pored toga, na formiranje ovih agregata verovatno utiče i orijentacija TC boje na površini čestica zlata, pri čemu je kod nanočestica zlata C9,5 dobijena orijentacija - vertikalna duž kraće strane, a kod nanočestica zlata C6 kosa, čime je omogućeno da se veći broj molekula boje smesti na površini ovih nanočestica, i to u više slojeva.

4.2.4.4 Uticaj katjona na formiranje J-agregata

Poznato je da jednovalentni, dvovalentni i trovalentni metalni joni mogu uticati na formiranje J-agregata cijanskih boja [79]. Iz tog razloga ispitan je i uticaj vrste i koncentracije metalnih katjona u različitim oksidacionim stanjima (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Al^{3+}) na J-agregaciju TC boje, u odsustvu i prisustvu koloida C6. Pritom su snimani apsorpcioni spektri TC boje u prisustvu hlorida K^+ , Mg^{2+} i Al^{3+} , koloida C6 sa TC bojom u prisustvu hlorida K^+ , Cs^+ , Mg^{2+} i Al^{3+} , ispitan je uticaj različitih jednovalentnih katjona (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+) na brzinu reakcije J-agregacije, kao i zavisnost brzine reakcije od temperature u prisustvu jona Cs^+ . Ovde je još važno naglasiti da je, u svim rastvorima, za ispitivanje uticaja katjona korišćen originalni rastvor TC boje (poglavlje 3.1), u kojem je već bila prisutna 1×10^{-3} M KCl, u koju su potom dodavani rastvori različitih katjona.

Na Slici 68 su predstavljeni apsorpcioni spektri 5×10^{-8} M koloida C6 i $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje u prisustvu 5×10^{-5} M KCl, 1×10^{-3} M CsCl, 1×10^{-3} M MgCl₂ i 1×10^{-3} M AlCl₃.

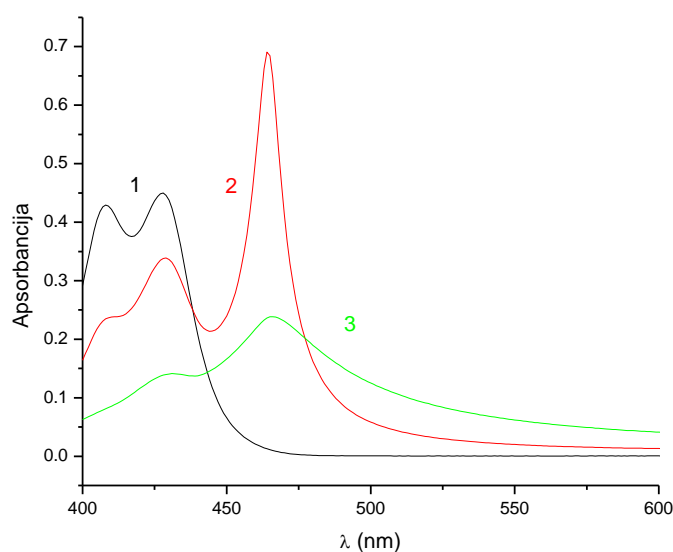


Slika 68. Apsorpcioni spektri koloida 5×10^{-8} M C6 sa $1,67 \times 10^{-5}$ M TC bojom u prisustvu jona: 5×10^{-5} M K^+ (1); 1×10^{-3} M Cs^+ (2); 1×10^{-3} M Mg^{2+} (3) i 1×10^{-3} M Al^{3+} (4)

Sa Slike 68 se može videti da je u svim slučajevima došlo do formiranja J-agregata, sa karakterističnim oštrim apsorpcionim *minimumom* na 475 nm, osim u slučaju kada je u rastvor TC boje dodat rastvor soli Al^{3+} .

U radu koji je objavio Chibisov sa saradnicima [79], pokazano je da je sa cijanskom bojom slične strukture kao TC, u prisustvu hlorida jednovalentnih katjona, kao i nitrata dvo- i trovalentnih katjona došlo do formiranja J-agregata. Primećeno je i da brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije boje, kao i katjona, i da je najveća za trovalentne metalne katjone, najmanja za jednovalentne, a za dvovalentne katjone je između tih vrednosti, dok je nezavisna od tipa anjona [79]. S druge strane, za razliku od ovde opisanog dvostepenog mehanizma (poglavlje 4.2.4.3) kinetika i mehanizam ove reakcije su objašnjeni autokatalitičkim procesom [79].

Iz tog razloga, da bi se proverilo da li dolazi do formiranja J-agregata kada su u rastvoru TC boje prisutni joni K^+ , Mg^{2+} i Al^{3+} bez dodatka nanočestica snimani su apsorpcioni spektri, prikazani na Slici 69.



Slika 69. Apсорpcioni spektri $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje u prisustvu jona: 1×10^{-3} M K^+ (1); 1×10^{-3} Mg^{2+} (2); 1×10^{-3} Al^{3+} (3)

Sa Slike 69 se može videti da je u prisustvu 1×10^{-3} M jona Mg^{2+} i Al^{3+} došlo do formiranja novog pika na ~ 460 nm, što je ukazalo na formiranje J-agregata TC boje [79], dok u prisustvu iste koncentracije jona K^+ nije primećeno formiranje J-agregata.

Poređenjem Slike 68 (u prisustvu C6) sa Slikom 69 (bez C6) vidi se da metalni joni, osim Al^{3+} ne utiču na promene spektra plazmona, dobijene u prisustvu C6. Pored toga, primećuje se i da se u prisustvu jona formira apsorpcioni pik, dok se u prisustvu nanočestica C6 obrazuje apsorpcioni *minimum* („dip“), što se može objasniti kuplovanjem površinskog plazmona C6 i molekuskog ekscitona J-agregata [1,12] u drugom slučaju, dok u prisustvu jona nema prenosa energije, već samo apsorpcije fotona.

4.2.4.4. a) Kinetika formiranja J-agregata u prisustvu različitih katjona

S obzirom na rezultate dobijene u prethodnom poglavlju, brzine reakcija su praćene u zavisnosti od vrste jednovalentnih katjona. Pritom je koncentracija TC boje održavana konstantnom ($1,67 \times 10^{-5}$ M) uz prisustvo 1×10^{-3} M soli Li^+ , Na^+ , K^+ i Cs^+ . Dobijeni rezultati su predstavljeni u Tabeli 15.

Tabela 15. Uticaj $1,0 \times 10^{-3}$ M katjona Li^+ , Na^+ , K^+ i Cs^+ na brzinu reakcije prvog i drugog procesa. $T = 16^\circ \text{C}$, $\text{TC} = 1,67 \times 10^{-5}$ M

Vrsta katjona	C (M)	t_1 (s)	k_1 (s^{-1})	t_2 (s)	k_2 (s^{-1})
Li	$1,0 \times 10^{-3}$	$0,240 \pm 0,004$	4,16	$4,31 \pm 0,10$	0,23
Na	$1,0 \times 10^{-3}$	$0,347 \pm 0,008$	2,88	$8,59 \pm 0,15$	0,16
K	$1,0 \times 10^{-3}$	$0,380 \pm 0,001$	2,63	$7,28 \pm 0,15$	0,14
Cs	$1,0 \times 10^{-3}$	$0,935 \pm 0,200$	1,07	$7,45 \pm 2,43$	0,13

Iz rezultata predstavljenih u Tabeli 15 se može videti da u zavisnosti od vrste dodatog jednovalentnog katjona postoji razlika u konstantama brzine. Preciznije, sa porastom veličine katjona ($\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Cs}^+$) korišćenog za „podsticanje“ J-agregacije menja se vrednost konstante brzine, i u slučaju bržeg i sporijeg procesa. Pritom, ako posmatramo niz od Li^+ do Cs^+ , konstanta brzine prvog - brzog procesa opada za faktor 4, a drugog - sporijeg procesa za faktor 2.

Da bi se ispitaio uticaj jonske jačine, detaljno je ispitan i uticaj koncentracije KCl na brzinu reakcije prvog i drugog procesa pri konstantnoj koncentraciji TC boje ($1,67 \times 10^{-5}$ M). Rezultati su predstavljeni u Tabeli 16.

Tabela 16. Uticaj koncentracije KCl na brzinu reakcije prvog i drugog procesa na 10° C i pri konstantnoj koncentraciji TC = $1,67 \times 10^{-5}$ M

$C_{KCl}(M)$	$t_1(s)$	$k_1(s^{-1})$	$t_2(s)$	$k_2(s^{-1})$
$0,5 \times 10^{-3}$	$0,22 \pm 0,002$	4,55	$3,62 \pm 0,06$	0,27
$1,0 \times 10^{-3}$	$0,25 \pm 0,02$	4,00	$6,97 \pm 0,10$	0,14
$2,0 \times 10^{-3}$	$0,21 \pm 0,013$	4,76	$3,13 \pm 0,42$	0,32
$3,5 \times 10^{-3}$	$0,205 \pm 0,008$	4,88	$5,54 \pm 0,53$	0,18
$5,0 \times 10^{-3}$	$0,209 \pm 0,013$	4,78	$4,83 \pm 0,44$	0,21
$6,0 \times 10^{-3}$	$0,18 \pm 0,013$	5,56	$5,79 \pm 0,74$	0,17
$1,0 \times 10^{-2}$	$0,18 \pm 0,001$	5,56	$4,75 \pm 0,35$	0,21

Iz rezultata predstavljenih u Tabeli 16 se može videti da ne postoji jasno definisana pravilnost, i stoga se pretpostavlja da su, dobijene male razlike u konstantama brzine u granicama greške merenja.

Ispitan je i uticaj koncentracije CsCl na konstante brzine brzog (k_1) i sporijeg (k_2) procesa, na 16° C i u prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC, i rezultati su predstavljeni u Tabeli 17.

Tabela 17. Uticaj koncentracije CsCl na konstante brzine brzog (k_1) i sporijeg (k_2) procesa, na 16° C

C CsCl (M)	t_1 (s)	k_1 (s ⁻¹)	t_2 (s)	k_2 (s ⁻¹)
$0,5 \times 10^{-3}$	$0,37 \pm 0,01$	2,76	$10,13 \pm 0,17$	0,098
$1,0 \times 10^{-3}$	$0,489 \pm 0,01$	2,04	$10,61 \pm 0,16$	0,100
$3,0 \times 10^{-3}$	$0,45 \pm 0,01$	2,25	$15,28 \pm 0,23$	0,065

Iz rezultata prikazanih u Tabeli 17 se može zaključiti da, u zavisnosti od koncentracije Cs⁺, nema značajne razlike u konstantama brzina za oba procesa, slično kao i u slučaju KCl.

4.2.4.4 b) Termodinamika reakcije u prisustvu Cs⁺ jona

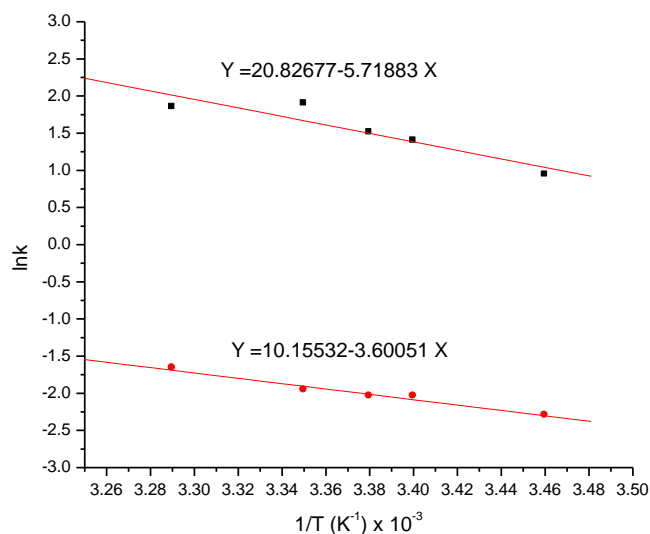
Da bi se ispitala zavisnost brzine reakcije od temperature određeni su i termodinamički parametri reakcije u prisustvu 1×10^{-3} M Cs⁺ i $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje, nakon dodatka koloida C6, i rezultati su predstavljeni u Tabeli 18.

Tabela 18. Zavisnost brzine reakcije od temperature, u prisustvu 1×10^{-3} M Cs⁺ i $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje, nakon dodatka koloida C6 (5×10^{-8} M)

T (°C)	T (K)	1/T (K) $\times 10^{-3}$	t_1 (s)	k_1 (s ⁻¹)	t_2 (s)	k_2 (s ⁻¹)
16	289	3,46	$0,489 \pm 0,01$	2,04	$9,89 \pm 0,02$	0,10
21-22	295	3,40	$0,250 \pm 0,01$	4,00	$7,95 \pm 0,01$	0,13
25	298	3,35	$0,148 \pm 0,02$	4,55	$3,65 \pm 0,10$	0,14
31	304	3,29	$0,157 \pm 0,01$	6,55	$5,19 \pm 0,13$	0,19

Iz Tabele 18 se može videti da, za oba procesa sa povišenjem temperature, poluvreme reakcije opada tj. konstanta brzine raste.

Na Slici 70 je prikazana zavisnost lnk od 1/T u prisustvu 1×10^{-3} M CsCl i $1,67 \times 10^{-5}$ M TC nakon dodatka 5×10^{-8} M koloida C6.



Slika 70. Zavisnost $\ln k_1$ i $\ln k_2$ od temperature u prisustvu 1×10^{-3} M CsCl i $1,67 \times 10^{-5}$ M TC nakon dodatka 5×10^{-8} M koloida C6.

Iz grafika zavisnosti $\ln k$ od $1/T$ (Slika 70), iz nagiba su izračunate odgovarajuće vrednosti za aktivacione energije, $E_{act1} = 47,55$ kJ/mol a $E_{act2} = 29,93$ kJ/mol, dok su odsecci na graficima vezani za pre-eksponencijalne faktore, $Z1 = 1,11 \times 10^9$ s⁻¹ a $Z2 = 2,57 \times 10^4$ s⁻¹. Može se primetiti da su u prisustvu jona Cs⁺ dobijene niže vrednosti aktivacionih energija u poređenju sa vrednostima dobijenim bez njihovog prisustva ($E_{a1} = 170,7$ kJ/mol i $E_{a2} = 93,5$ kJ/mol, poglavlje 4.2.4.3 b), što znači da je u ovom slučaju smanjena energetska barijera i pospešena reakcija J-agregacije.

Da bi se detaljnije ispitala reakcije u prisustvu jona neophodna su dalja ispitivanja, u kojima ćemo koristiti i fluorescentna merenja, ali ono što je očekivano na osnovu dosadašnjih ispitivanja je da bi se fluorescencija boje u prisustvu soli povećala [79].

4.3 Biološka aktivnost nanočestica zlata

Na osnovu preliminarnih rezultata dobijenih ispitivanjem citotoksičnih efekata nanočestica C6, C9,5, C15 i C47 primećeno je da su u slučaju koloida sa adsorbovanim citratnim jonima, C15 i C47, dobijeni značajniji efekti. Iz tog razloga dalje je analizirana zavisnost citotoksičnih efekata ovih nanočestica od njihove koncentracije i veličine, korišćenjem dva *in vitro* model-sistema humanih ćelija: limfocita i fibroblasta. Citotoksični efekti ispitani su primenom CB-mikronukleusnog testa na limfocitima periferne krvi i γ -H2AX eseja na fibroblastima kože.

Kulture limfocita su tretirane različitim dozama koloidnih disperzija C15 i C47, gde su, u finalnoj zapremini za medijum ćelijske kulture, koncentracije zlata bile u opsegu od 1 do 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 19).

Tabela 19. Učestalost mikronukleusa i CBPI u kulturama limfocita tretiranim koloidima zlata C15 i C47 (rezultati analize prikazani su kao srednja vrednost tri merenja)

Koncentracija zlata ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Učestalost MN/1000 BN*	Raspodela MN Broj BN sa MN					CBPI*	
		0	1	2	3	4		5
Netretirana kontrola	24,46	1080	21	3			1,75	
C47 (47 nm)								
1,8	45,62	1050	44		2		1,80	
3,6	49,38	1710	56	16			1,84	
11,1	51,65	1386	57	9			1,85	
14,5	88,89	1248	86	14	2		1,87	
16,5	85,71	1044	64	8		4	1,97	
18,2	83,74	1146	54	6	12		1,93	
C15 (15 nm)								
1,8	73,73	1015	60	10			1,82	
3,6	77,70	1098	82	2	2		1,84	
11,1	79,66	1320	64	20		2	1,99	
14,5	90,09	1634	128	10	4		1,93	
16,5	102,76	1474	94	20	4	2	2	1,90
18,2	65,10	1089	51	12				1,85

*MN – mikronukleusi; BN – binuklearne ćelije; CBPI – citokinezis-blok proliferativni indeks

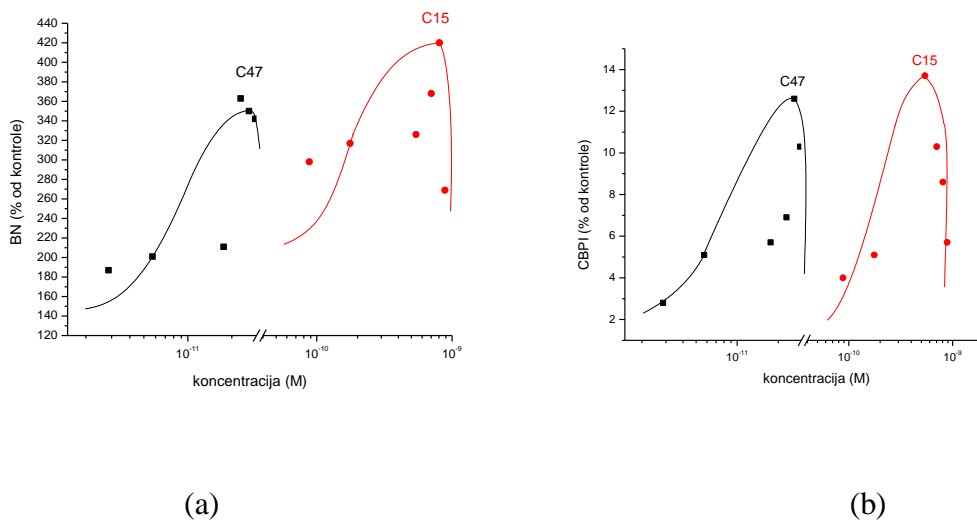
Student-ovim T-testom utvrđeno je da je tretman kultura limfocita koloidima zlata C15 i C47 izazvao citotoksične efekte što je pokazano statistički značajnim ($p < 0,05$) povećanjem učestalosti mikronukleusa (br. MN/1000 BN) i blagim povećanjem ćelijskog proliferativnog potencijala u poređenju sa kontrolom.

Nanočestice zlata C47 su u limfocitima indukovale povećanje učestalosti MN do 350% iznad kontrolne vrednosti, dok su C15 čestice povećale učestalost MN i do 420% u poređenju sa kontrolnim, netretiranim uzorkom. Važno je napomenuti da je u prisustvu iste količine zlata, efekat manjih nanočestica (koloid C15) bio znatno jači. Na primer, kada je koncentracija nanočestica C15 i C47 ista i iznosi $1,8 \mu\text{g/mL}$, učestalost mikronukleusa indukovanih od strane C15 iznosi 73,73 dok u slučaju C47 iznosi 45,62 (Tabela 19). Moguće objašnjenje ove pojave je da ista količina zlata sadrži različit broj nanočestica, koji u slučaju C15 iznosi $5,3 \times 10^{13}$, dok kod C47 iznosi $1,7 \times 10^{12}$ (koncentracija zlata u koloidnoj disperziji je $1,8 \mu\text{g/mL} = 9,14 \times 10^{-6} \text{ M}$, pa je dalje koncentracija nanočestica C15 i C47 izračunata koristeći agregacioni broj n (jednačina (19)) a iz toga pomoću Avogadrovog broja i broj nanočestica), što znači da ima više nanočestica koloida C15 koje mogu ispoljiti jači uticaj u odnosu na C47. Ova činjenica, zajedno sa mogućim razlikama u apsorpciji ova dva koloida od strane ćelija, bi mogla biti razlog razlike u njihovoj toksičnosti.

Dobijeni rezultati dalje pokazuju da je povećanje učestalosti mikronukleusa indukovanih nanočesticama zlata praćeno povećanjem proliferativnog potencijala ćelija. Učestalost mikronukleusa i CBPI korelišu pozitivno, na granici statističkog značaja ($p = 0,06$). U poređenju sa kontrolnim, netretiranim uzorkom utvrđeno je da se, sa povećanjem koncentracije zlata, vrednost CBPI statistički značajno ($p < 0,05$) povećavala, dok nije dostignuta maksimalna vrednost (CBPI = 1,97 za $2,62 \times 10^{-11} \text{ M}$ koncentraciju nanočestica C47 (koncentracija zlata je $16,5 \mu\text{g/mL}$) i CBPI = 1,99 za $5,42 \times 10^{-10} \text{ M}$ koncentraciju nanočestica C15 (koncentracija zlata je $11,1 \mu\text{g/mL}$)), nakon čega je opadala.

Generalno, tretman kultura limfocita sa koloidom C15 je izazvao jače citotoksične efekte od onih dobijenih tretiranjem sa koloidom C47.

Dalje je od interesa bilo predstaviti dobijene rezultate kao funkciju veličine i koncentracije nanočestica, izračunate prema jednačini (19). Zavisnost učestalosti MN i CBPI od koncentracije nanočestica je predstavljena na Slici 71.



Slika 71. Zavisnost učestalosti mikronukleusa (a) i proliferacionog indeksa (b) (predstavljeno kao % od kontrole) od koncentracije nanočestica C15 i C47 u kulturama limfocita tretiranim ovim koloidima zlata

Predstavljeni rezultati su jasno ukazali da povećanje učestalosti mikronukleusa i proliferacionog indeksa zavise ne samo od koncentracije već i od veličine nanočestica. Nanočestice sa većim prečnikom (47 nm) su povećale učestalosti MN i CBPI pri nižim koncentracijama u odnosu na manje nanočestice (15 nm).

Rezultati analize učestalosti γ -H2AX fokusa u fibroblastima pokazuju da tretman nanočesticama C15 i C47 dovodi do pojave dvolančanih prekida DNK u zavisnosti od doze tj. koncentracije nanočestica (Tabela 20). Međutim, učestalosti γ -H2AX fokusa su blago povećane u poređenju sa netretiranom kontrolom, bez statističkog značaja ($p > 0,05$).

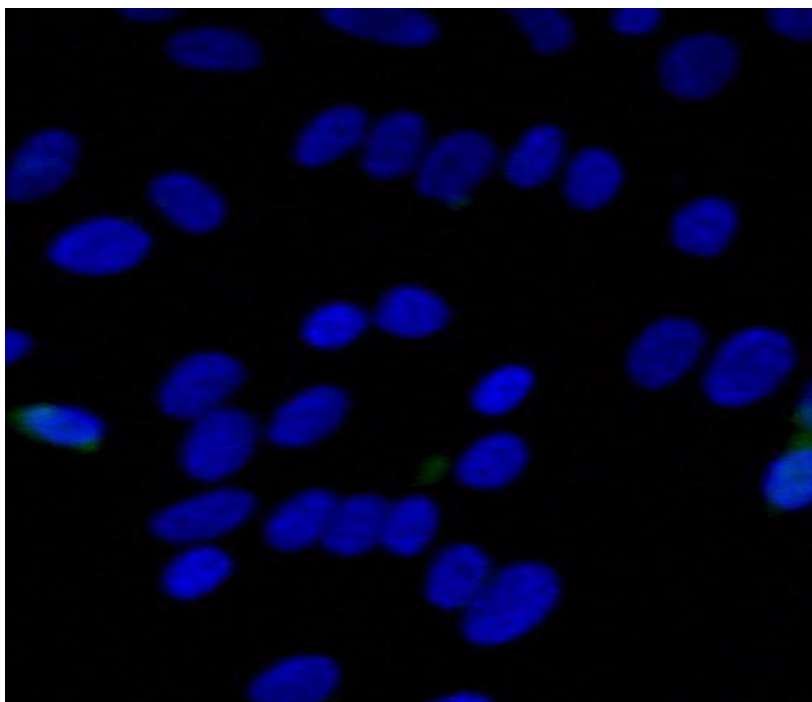
Tabela 20. Uticaj koncentracije zlata u koloidnim disperzijama C15 i C47 na učestalost γ -H2AX fokusa u humanoj ćelijskoj liniji fibroblasta

Koncentracija zlata ($\mu\text{g/mL}$)	Broj analiziranih ćelija	Učestalost γ -H2AX fokusa po ćeliji
Netretirana kontrola	340	3,56
C47 (47 nm)		
1,8	335	3,60
3,6	341	3,64
11,1	338	3,62
14,5	300	3,77
16,5	324	3,81
18,2	280	3,88
C15 (15 nm)		
1,8	328	3,77
3,6	330	3,91
11,1	335	3,87
14,5	318	3,90
16,5	294	4,11
18,2	275	4,08

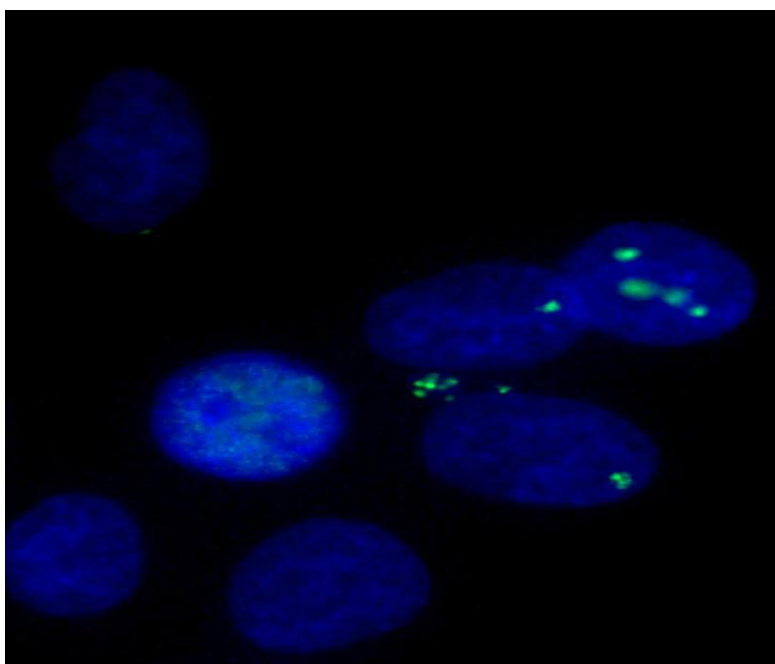
Može se primetiti da su za oba proučavana ćelijska sistema dobijeni slični rezultati. Neznatno povećanje DSBs (*engl.* DSBs – double-strand breaks, poglavlje 2.4.1.2) u fibroblastima tretiranim koloidima zlata ukazuje na to da mikronukleusi u limfocitima potiču pretežno od gubitka celih hromozoma, a u manjoj meri od hromozomskih fragmenata, što ukazuje da nanočestice zlata C15 i C47 ne ispoljavaju klastogeni način delovanja. Povećanje ćelijske proliferacije u prisustvu nanočestica zlata, koje je praćeno povećanjem učestalosti mikronukleusa, ukazuje da ove nanočestice izazivaju poremećaje kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, omogućavajući nekontrolisanu proliferaciju i ulazak u mitozu sa nepopravljenim genomskim oštećenjima, tipičnim za fenomen mitotičke katastrofe.

Kontrolne tačke (Chk1 i Chk2) ćelijskog ciklusa imaju fiziološku ulogu da provere da li su procesi u svakoj fazi ćelijskog ciklusa adekvatno završeni pre progresije u narednu fazu. Njihova funkcija je da izvrše procenu oštećenja DNK, koja se detektuju senzornim mehanizmima. Najosetljivija metoda za ispitivanje oštećenja DNK je γ -H2AX

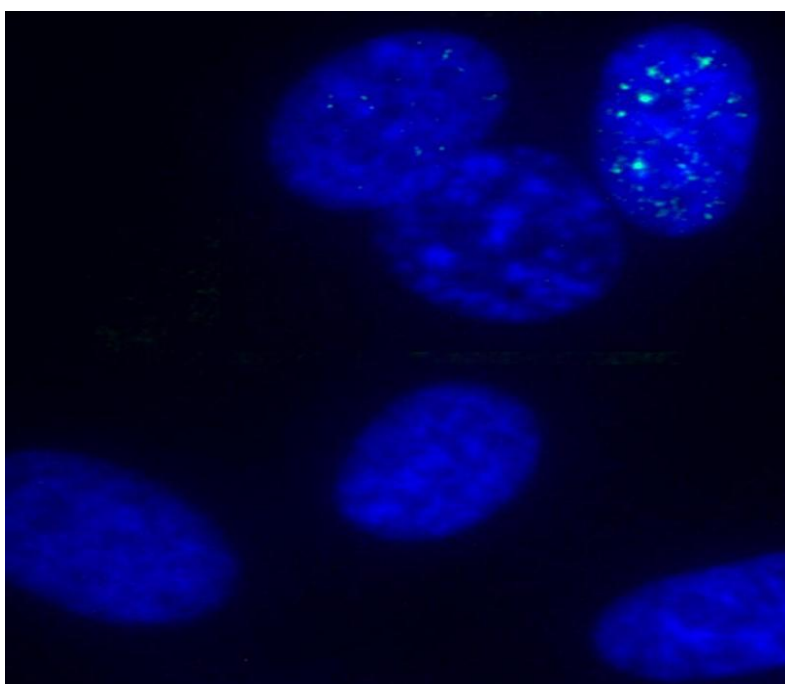
esej [358], koji je pokazao da tokom tretmana sa nanočesticama C15 i C47 skoro da nema indukcije DSBs (Slika 73).



Slika 72. Mikrografija fibroblastnih ćelija bez γ -H2AX fokusa



(a)



(b)

Slika 73. Mikrografije fibroblastnih ćelija sa γ -H2AX fokusima, koji su indukovani tretmanom nanočesticama zlata C15 (a) i C47 (b) (zeleni signali)

Sa druge strane, na limfocitnom ćelijskom sistemu, gde su ćelije brže rasle, nađena je velika količina nepopravljenih oštećenja koja su rezultovala pojavom MN, ukazujući na to da ćelije nemaju mogućnost da zaustave ćelijski ciklus dok se popravke ne završe. Progresija ćelijskog ciklusa je strogo regulisana ciklinima, kinazama zavisnim od ciklina (CDKs), inhibitorima kinaza zavisnih od ciklina (CKIs) i tumor-supresorskim proteinima kao što su p53 i retinoblastoma protein (pRb) [38]. Iako su potrebna dalja istraživanja molekulskih mehanizama koji omogućavaju progresiju ćelijskog ciklusa, možemo pretpostaviti da nanočestice zlata stimulišu proliferaciju limfocita menjanjem ekspresije i/ili funkcije gore pomenutih proteina.

Važno je istaći da interakcija nanočestica sa ćelijama zavisi i od naelektrisanja nanočestica [359]. Veličina i naelektrisanje nanočestica mogu uticati na *in vitro* ćelijsku apsorpciju. Pošto su nanočestice zlata negativno naelektrisane (slične vrednosti negativnog zeta potencijala su dobijene za oba koloida), one imaju jaku težnju za oblaganjem sa suprotno naelektrisanim pozitivnim vrstama u rastvoru kroz elektrostatičke interakcije, pa njihova genotoksična svojstva u nekom stepenu mogu biti pripisana njihovim elektrohemijskim svojstvima.

Na osnovu predstavljenih rezultata se može zaključiti da su genotoksična svojstva nanočestica zlata posmatrana u ovom ispitivanju jedinstvena i zahtevaju opsežnije istraživanje kako bi se dobile važne informacije o budućoj primeni i dizajniranju biokompatibilnih nanomaterijala.

5 Diskusija

Primenom više eksperimentalnih tehnika (TEM, UV-Vis spektrofotometrija, fluorescentna spektroskopija, FTIR, DLS, merenja zeta potencijala), dobijeni su rezultati koji pokazuju da dolazi do adsorpcije TC boje (natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil)benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1-sulfonata) na nanočestice zlata različitih veličina koje na svojoj površini imaju adsorbovane boratne odnosno citratne jone. Ova interakcija se može objasniti slabim elektrostatičkim privlačenjem između negativno naelektrisanih karboksilatnih ili boratnih anjona na površini nanočestica zlata i pozitivno naelektrisanog dela tiazolnog prstena TC boje, što je u skladu sa ispitivanjem koje su Jeunieu i saradnici izveli na sličnom sistemu [78]. Pored toga, Sato i saradnici [10] su ispitivali elektrostatičku interakciju između negativno naelektrisane površine srebra i negativno naelektrisane slične tiocijanske boje koja ima parcijalno pozitivno naelektrisanje na hromofori. Hibridne nanočestice koje se sastoje od jezgra plementog metala funkcionalizovanog omotačem koga čini organska boja su poznate zbog svojih neobičnih optičkih svojstava, uključujući ultrabrze indukovane transparentije, nelinearno ponašanje, Fano rezonancije (vrsta fenomena rezonantnog rasejanja pri čemu se dobija asimetričan oblik linije rasejanja) i pojačano fotoindukovano razdvajanje naelektrisanja [1,10-15]. Razjašnjavanje mehanizma i kinetike interakcije negativno naelektrisane površine nanočestice zlata sa negativno naelektrisanom tiocijanskom bojom daje bolji uvid za potencijalnu upotrebu ovih hibridnih struktura u budućnosti za dizajniranje sistema za konvertovanje svetlosne energije, primenu u molekularnoj optoelektronici i kod senzornih uređaja, u katalizi, prenosu lekova, nanoelektronici i medicinskoj dijagnostici. Zato je neophodno razumeti hemiju interakcija nanočestica zlata sa tiocijanskom bojom. U ovom radu je posebna pažnja posvećena detaljnom ispitivanju adsorpcije i gašenja fluorescencije nakon adsorpcije TC boje na nanočestice zlata različitih veličina, 6-30 nm, sa adsorbovanim citratnim ili boratnim anjonima, jer ovo može dati bolji uvid za dalja ispitivanja interakcija na sličnim sistemima.

Interesovanje za proučavanje interakcija TC boje sa koloidima zlata proističe iz njihovog značaja posebno u oblasti medicine i optike, pošto se fluorescentno obeležene nanočestice mogu koristiti u dijagnostici za simulirano otpuštanje lekova [7] i za moduliranje i poboljšavanje optičkih karakteristika boje [2,31,32]. Ispitivanja reakcija nanočestica zlata sa različitim tiocijanskim bojama su pokazala da dolazi do procesa adsorpcije boje na površini koloida uz moguće formiranje specifičnih agregata cijanske boje tzv. J-agregata [1,12,76,77]. Do sada nisu bila izvedena kinetička ispitivanja J-agregacije na sistemima koji se sastoje od hibridne metalne nanočestice i organske boje, ali je poznato da je praćeno formiranje ekscitona kod J-agregata nekih tiocijanskih boja u rastvoru, u prisustvu različitih soli [79] kao i porfirinske (cijanske) boje na površini proteina [80]. Ispitivanjem reakcije u rastvoru, u ovom radu je pokazano da je adsorpcija ove negativno naelektrisane boje na površini negativno naelektrisanih nanočestica zlata moguća kada su molekuli boje orijentisani prema površini nanočestica preko tiazolnog prstena koji nosi parcijalno pozitivno naelektrisanje, i da se, u jednom slučaju primećeno formiranje J-agregata TC boje, odvija kroz dva koraka, brzo inicijalno formiranje površinskog sloja, koje je praćeno sporijim rastom J-agregata na inicijalnom sloju J-agregata.

Eksperimentalni rezultati predstavljeni u ovom radu su u skladu sa literaturnim podacima gde su, na nanočesticama koje su modifikovane hromoforom, opisani primeri efikasnog gašenja fluorescencije hemisorbovanih hromofora [76,242,327,328]. Merenje fluorescencije u našem sistemu čestica-boja, korigovane za efekat unutrašnjeg filtera, je jasno ukazalo da je fluorescencija TC boje bila prigušena u zavisnosti od koncentracije prisutnih nanočestica zlata i da je ovaj proces kvantitativno povezan sa stepenom pokrivenosti površine nanočestica molekulima boje. Ovo gašenje fluorescencije se generalno pripisuje povećanoj neradijativnoj relaksaciji pobuđenog stanja usled prenosa energije i/ili prenosa elektrona [323,17]. U literaturi su opisani primeri gde je u slučaju fluorescentno obeleženih nanočestica zlata došlo do gašenja fluorescencije fluorofore iako je primećen i efekat unutrašnjeg filtera [240-243]. Međutim, za razliku od rezultata predstavljenih u ovom radu, u prisustvu nanočestica može doći i do obrnutog efekta tj. povećanja intenziteta fluorescencije fluorofore, što je takođe opisano u literaturi [244,246-248], a poznato je da mogu biti prisutna i oba efekta [244,249]. Pošto su

cijanske boje jako fluorescentne [16], merenje fluorescentnih svojstava agregata čestica-boja može dati važan uvid za razumevanje molekularnih interakcija i reaktivnosti u ovakvim sistemima. Fluorescentno obeležavanje je u širokoj upotrebi u medicinskoj dijagnostici [7] da bi se simuliralo otpuštanje lekova ili da bi se lokalizovale nanočestice.

Izveden je zaključak i da efikasnost gašenja fluorescencije raste sa povećanjem veličine nanočestice, pri konstantnoj koncentraciji nanočestica u rastvoru. Poznati su i neki primeri u literaturi gde je opisan uticaj veličine nanočestica i udaljenosti između hromofora i nanočestica na efikasnost gašenja fluorescencije [329,330]. Uzevši da se gašenje fluorescencije dešava samo u slučaju molekula boje koji imaju direktan kontakt sa površinom nanočestice zlata, i da su molekuli TC boje orijentisani horizontalno na površini nanočestice, eksperimentalni rezultati su pokazali da je gašenje fluorescencije TC boje pri konstantnoj koncentraciji nanočestica Au sa adsorbovanim citratnim jonima na površini, C17 i C30, veće od izračunatih vrednosti. Pritom je pokazano da su eksperimentalno dobijene vrednosti koncentracije nanočestica potrebne za potpuno gašenje fluorescencije TC boje bile niže od izračunatih. Iz ovoga je zaključeno da je najverovatnija orijentacija molekula TC boje na površini nanočestica C17 i C30 kosa. Ovo je takođe podržano uzimajući u obzir i odbojne interakcije između terminalnih sulfogrupa boje i negativno naelektrisane površine nanočestica, čime je boji omogućeno da priđe površini nanočestice jedino sa strane parcijalno pozitivno naelektrisanog tiazolnog prstena i da se tako na površini nanočestice smesti i veći broj molekula TC. Ovakav rezultat je u skladu sa ranijim ispitivanjima, kojima je pokazano da je mera fluorescencije molekula boje funkcija udaljenosti između boje i površine metala, i da je u direktnom kontaktu sa metalom fluorescencija boje potpuno ugašena [77,242,323]. Pored toga, rezultati naših FTIR merenja su potvrdili da se interakcija TC boje sa nanočesticama zlata odvija preko slabe elektrostatičke interakcije između pozitivno naelektrisane tiocijanske grupe boje i negativno naelektrisanih citratnih/boratnih jona na površini nanočestice, kao i kroz $\pi - \pi$ interakcije, što je u skladu sa kosom orijentacijom molekula TC. Ovakvo razmatranje je u skladu sa ranijim FTIR merenjima [76] gde je potvrđeno da se reakcija odigrava između pozitivno naelektrisane amonijumske vrste cijanske boje i karboksilata koji se nalaze na površini nanočestica zlata. U slučaju nanočestica zlata sa adsorbovanim boratnim jonima na površini, C9,5 i C6, teorijski dobijene vrednosti za koncentraciju TC

boje (uz pretpostavku da je boja u obliku kvadra) potrebnu da pokrije površinu nanočestice i da fluorescencija boje bude potpuno ugašena, u slučaju tri moguće orijentacije (horizontalne, vertikalne orijentacije duž kraće strane i vertikalne orijentacije duž duže strane), su niže u poređenju sa dobijenom eksperimentalnom vrednošću. S druge strane, u slučaju koloida C9,5, koncentracija nanočestica potrebna da bi došlo do potpunog gašenja fluorescencije TC boje, po vrednosti najpribližnije odgovara vertikalnoj orijentaciji boje duž kraće strane, dok je u slučaju C6 eksperimentalno dobijen rezultat dosta niži od teorijski izračunatih vrednosti za sve tri moguće orijentacije boje, iz čega je zaključeno da je na površini ovih nanočestica boja smeštena u više od jednog sloja, najverovatnije u kosoj orijentaciji. Ovi podaci su ukazali na razlike u položaju molekula TC boje adsorbovane na površini nanočestica zlata sa adsorbovanim boratnim u poređenju sa nanočesticama zlata sa adsorbovanim citratnim jonima. Pored toga su, iz eksperimenata u kojima je ispitivano gašenje fluorescencije, izračunate i konstante ravnoteže za proces adsorpcije TC na površini nanočestica C6, C9,5, C17 i C30. Za koloidne disperzije C17 i C30 su dobijene vrednosti konstante ravnoteže, koje se dobro slažu sa ranije izračunatim vrednostima za adsorpciju sličnih cijanskih boja na nanočesticama Au sa adsorbovanim citratnim anjonima koje je ispitivao Lim sa saradnicima [76].

Rezultati ispitivanja kinetike i mehanizma formiranja J-agregata, dobijenih samo u prisustvu koloida C6, pokazali su da se ova reakcija odvija kroz dva koraka, brzo formiranje inicijalnog sloja boje, koga prati, za red veličine, sporiji proces rasta konsektivnih slojeva. Pretpostavka da je TC boja na površini negativno naelektrisanih nanočestica orijentisana sa strane parcijalno pozitivno naelektrisanog prstena, je podržana i aktivacionim parametrima određenim iz kinetičkih podataka dobijenih iz fluorescentnih merenja. Time je razjašnjena priroda elektrostatičkih sila odgovornih za formiranje J-agregata, a to je prvi i neophodni korak u nalaženju uslova za postizanje kompletne ili skoro kompletne transparentije na talasnoj dužini ekscitona, za korišćenje u optičkoj opremi. Poznato je da su ranije bila izvedena ispitivanja gde je praćeno formiranje ekscitona kod J-agregata nekih tiocijanskih boja u rastvoru u prisustvu različitih soli [79] kao i porfirinske (cijanske) boje na površini proteina [80]. Međutim, koliko je nama poznato, do sada nisu bila izvedena kinetička ispitivanja J-agregacije na

sistemima koji se sastoje od hibridne metalne nanočestice i organske boje. Stoga, da bi se moglo nastaviti sa iskorišćavanjem i usavršavanjem neobičnih optičkih karakteristika ovakvih hibridnih sistema neophodna su dalja detaljnija ispitivanja.

J-agregacija je primećena po dodatku metalnih jona Mg^{2+} i Al^{3+} u rastvor boje pri čemu je došlo do formiranja novog pika na oko 460 nm. Nakon dodatka nanočestica C6 u rastvor boje i u prisustvu jona K^+ , Cs^+ i Mg^{2+} , ali ne i Al^{3+} , takođe je došlo do formiranja J-agregata i pojave apsorpcionog *minimuma* na 475 nm. Kinetičkim merenjima na sniženoj temperaturi je pokazano da sa porastom veličine jednovalentnih katjona ($Li^+ < Na^+ < K^+ < Cs^+$) dolazi do smanjenja vrednosti konstante brzine i brzog i sporijeg procesa. Sa povišenjem temperature, u prisustvu jona Cs^+ rastu vrednosti konstanti brzina za oba procesa, pri čemu niže vrednosti aktivacionih energija u poređenju sa vrednostima dobijenim bez njihovog prisustva ukazuju da je u ovom slučaju smanjena energetska barijera i pospešena reakcija J-agregacije. U literaturi [79] je opisano formiranje J-agregata na primeru cijanske boje slične strukture kao TC, u prisustvu hlorida jednovalentnih katjona, kao i nitrata dvo- i trovalentnih katjona, pri čemu brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije boje, kao i katjona, i da je najveća za trovalentne metalne katjone, srednja za dvovalentne, a najmanja za jednovalentne katjone, dok je nezavisna od tipa anjona [79]. Za razliku od našeg slučaja gde je potvrđen dvostepeni mehanizam, kinetika i mehanizam ove reakcije su objašnjeni autokatalitičkim procesom [79]. Da bi se detaljnije ispitala reakcija u prisustvu jona neophodna su dalja ispitivanja, u kojima ćemo koristiti i fluorescentna merenja, ali ono što je očekivano na osnovu dosadašnjih ispitivanja je da bi se fluorescencija boje u prisustvu soli povećala [79].

Dobijeni rezultati ispitivanja citotoksičnih efekata sintetizovanih nanočestica C15 i C47 na dva *in vitro* model sistema humanih ćelija: limfocitima i fibroblastima su pokazali zavisnost od koncentracije i veličine nanočestica, s tim što je u slučaju limfocita dobijena veća osetljivost na nanočestice zlata. Tretiranje kultura limfocita ovim koloidima je izazvalo citotoksične efekte, koji su se odrazili kao značajno povećanje učestalosti mikronukleusa, ali je povećanje proliferacionog potencijala ćelije u poređenju sa kontrolom bilo zanemarljivo, što ipak ukazuje na poremećaj funkcije kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa. U ćelijskoj liniji fibroblasta, iste koncentracije nanočestica zlata su

izazvale nešto veći nivo γ -H2AX fokusa u odnosu na kontrolu. Metalne nanočestice, posebno nanočestice zlata, su veoma značajne zbog svoje sadašnje ali i buduće primene ne samo kao katalizatori, nego i u polju biologije i medicine [48,271]. Tako je poznata njihova primena u oblasti biosenzora [273,274], a istraživanja su u velikoj meri motivisana mogućnošću primena nanočestica zlata u dijagnostici [272], za detekciju kancera i u terapiji [47,275,276,286-288], kao i za prenos i ciljanu dostavu lekova do specifičnog mesta [277-280]. Pored toga biokompatibilnost ovih nanočestica je korišćena za transport antitumornih agenasa na mesto gde se nalazi tumor što je olakšano zbog veće propustljivosti i efekta zadržavanja (čuvanja) [278], a takođe se ponašaju i kao sistemi za dostavu gena koji nisu zasnovani na virusima [283-285]. Ipak nije zasigurno poznato šta se dešava sa nanočesticama zlata nakon njihovog ulaska u živu ćeliju. Do sada je smatrano da je endocitoza glavni put ulaska nanočestica zlata u ćeliju [296,297], a najnovija istraživanja ukazuju na to da nanočestice zlata u živim ćelijama uglavnom ostaju u endozomima, sfernom dvostrukom sloju membranskih lipida [293,298]. Postoji i nekoliko istraživanja koja pokazuju zavisnost ćeliske apsorpcije nanočestica zlata od veličine i oblika čestice, kao i od karakteristika površine nanočestice [293,298]. Imajući u vidu činjenicu da nije potpuno razjašnjeno šta se dešava sa nanočesticama zlata nakon njihovog ulaska u ćeliju, ostaje potreba da se jasno razumeju njihova krajnja odredišta i moguće interakcije sa komponentama ćelije, a naš cilj je bio davanje dodatnih informacija u ovom polju istraživanja. U tom smislu, ispitivanja ćelijskih sistema sa nanočesticama zlata različitih koncentracija, veličine i karakteristika površine, predstavljena u ovom radu, bi mogla poslužiti kao odlični model-sistemi za procenu genotoksičnosti.

6 Zaključak

(1) Potvrđena je adsorpcija TC boje na površini koloidnih čestica veličina 6 nm, 9,5 nm, 17 nm i 30 nm, označenih kao C6, C9,5, C17 i C30, u vodenoj sredini. TEM merenjima je pokazano da samo u slučaju najmanjih sintetizovanih nanočestica, C6, prisustvo TC boje izaziva aglomeraciju nanočestica, pri čemu je primećena značajna razlika u veličini C6 i C6/TC hibridnih čestica. Merenjem zeta potencijala je potvrđeno negativno naelektrisanje na površini svih ispitivanih nanočestica, pri čemu se ova vrednost nakon dodatka TC boje smanjuje, ukazujući na moguće slabe elektrostatičke interakcije između citratnih/boratnih anjona i pozitivno naelektrisanog tiazolnog dela TC boje, što je potvrđeno i FTIR merenjima.

(2) Merenje fluorescencije agregata čestica-boja, korigovane za efekat unutrašnjeg filtera, je ukazalo da nanočestice zlata, u zavisnosti od koncentracije, gase fluorescenciju TC boje. Nađeno je da ovaj proces kvantitativno zavisi od pokrivenosti površine nanočestica zlata molekulima TC boje. Sa povećanjem veličine čestica, pri konstantnoj koncentraciji nanočestica različitih veličina, efikasnost gašenje fluorescencije je rasla.

(3) Uz pretpostavku da je maksimalno gašenje fluorescencije TC boje ograničeno na potpunu monoslojnu pokrivenost površine nanočestica TC bojom, i da su molekuli TC boje orijentisani horizontalno na površini nanočestice eksperimentalno dobijene vrednosti koncentracije nanočestica C17 i C30 potrebne za potpuno gašenje fluorescencije TC boje su bile niže od teorijski izračunatih, dok su za gašenje fluorescencije TC boje pri konstantnoj koncentraciji nanočestica dobijene više eksperimentalne vrednosti u poređenju sa teorijski izračunatim. Iz ovih podataka je zaključeno da je najverovatnija kosa orijentacija molekula TC boje na površini ovih nanočestica.

(4) U slučaju nanočestica C6 i C9,5 teorijski dobijene vrednosti za koncentraciju TC boje potrebnu da pokrije površinu nanočestice i da fluorescencija boje bude potpuno ugašena, u slučaju sve tri orijentacije, su bile niže u poređenju sa dobijenom eksperimentalnom

vrednošću. Koncentracija nanočestica C9,5, potrebna da bi došlo do potpunog gašenja fluorescencije TC boje, po vrednosti najpribližnije odgovara vertikalnoj orijentaciji boje duž kraće strane, dok je u slučaju C6 eksperimentalno dobijen rezultat dosta niži od teorijski izračunatih vrednosti za sve tri moguće orijentacije boje, iz čega je zaključeno da je na površini ovih nanočestica boja smeštena u više od jednog sloja. Iz eksperimenata u kojima je ispitivano gašenje fluorescencije, izračunate i konstante ravnoteže za proces adsorpcije TC na površini nanočestica C6, C9,5 kao i C17 i C30.

(5) U apsorpcionom spektru koloida C6 u prisustvu TC boje (zapreminski odnos 2:1), oštar apsorpcioni *minimum* na 475 nm je ukazao na formiranje J-agregata TC boje na površini ovog koloida. Veličina ovog *minimuma* je rasla sa povećanjem koncentracije TC do granične koncentracije TC $\sim 0,5 \times 10^{-5}$ M a sa daljim povećavanjem koncentracije boje nije primećen dalji porast intenziteta ekscitona. Određeno je da broj molekula TC adsorbovan na jednoj nanočestici zlata iznosi približno 100, i da su ovi molekuli raspoređeni kao 3 sloja boje.

(6) Kinetička ispitivanja formiranja ovih agregata u prisustvu nanočestica C6 su pokazala da se reakcija odvija kroz dva koraka. U skladu sa kinetičkim podacima pretpostavljen je mehanizam u kojem je prvi korak brzo inicijalno formiranje površinskog sloja praćeno sporijim rastom J-agregata na inicijalnom sloju J-agregata. Određene su vrednosti konstanti brzina ovih procesa iz merenja apsorpcije na 475 nm i iz fluorescentnih meranja. Iz zavisnosti brzine reakcije od temperature na 16° C, 20° C, 24° C, 28° C i 30° C određeni su i aktivacioni parametri entalpije i entropije aktivacije ($E_{a1} = 170.7$ kJ/mol, $\Delta H^{\ddagger}_1 = 168.2$ kJ mol⁻¹, $\Delta S^{\ddagger}_1 = 385.33$ J mol⁻¹K⁻¹ and $E_{a2} = 93.5$ kJ/mol, $\Delta H^{\ddagger}_2 = 91.06$ kJ mol⁻¹, $\Delta S^{\ddagger}_2 = 93.01$ J mol⁻¹K⁻¹).

(7) U prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje i 1×10^{-3} M jona Mg²⁺ ili 1×10^{-3} M jona Al³⁺ došlo je do formiranja novog apsorpcionog pika na ~ 460 nm koji je ukazao na formiranje J-agregata boje, dok se nakon dodatka nanočestica C6 u rastvor boje i u prisustvu jona K⁺, Cs⁺, Mg²⁺, ali ne i Al³⁺, formirao apsorpcioni *minimum* na 475 nm, takođe ukazujući da je došlo do formiranja J-agregata usled kuplovanja površinskog plazmona C6 i

molekulskog ekscitona J-agregata. Ispitivanjem kinetike J-agregacije, u odsustvu koloida C6, u zavisnosti od vrste jednovalentnih katjona utvrđeno je da sa porastom njihove veličine dolazi do smanjenja vrednosti konstante brzine i bržeg i sporijeg procesa. Sa povišenjem temperature, u prisustvu $1,67 \times 10^{-5}$ M TC boje, 5×10^{-8} M nanočestica C6 i 1×10^{-3} M jona Cs^+ vrednosti konstanti brzina za oba procesa su porasle, pri čemu su niže vrednosti aktivacionih energija ($E_{\text{act1}} = 47,55$ kJ/mol a $E_{\text{act2}} = 29,93$ kJ/mol) u poređenju sa vrednostima dobijenim bez njihovog prisustva ukazale da je u ovom slučaju smanjena energetska barijera i pospešena reakcija J-agregacije.

(8) Tretiranje kultura limfocita nanočesticama zlata veličine 15 nm i 47 nm, označenim kao C15 i C47 je izazvalo citotoksične efekte koji su pokazani značajnim povećanjem učestalosti mikronukleusa i CBPI ali zanemarljivo malim povećanjem ćelijskog proliferativnog potencijala, u poređenju sa kontrolom, što je ipak ukazalo na poremećaj funkcije kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, i identifikovane su dve glavne kontrolne tačke Chk1 i Chk2. U ćelijskoj liniji fibroblasta, iste koncentracije nanočestica zlata su izazvale nešto veći nivo γ -H2AX fokusa nego što je to u kontroli. Potvrđeno je i da postoji zavisnost citotoksičnih efekata pomenutih nanočestica u ovim model sistemima humanih ćelija od koncentracije i veličine čestica, ali je u slučaju limfocita dobijena veća osetljivost na nanočestice zlata. U kulturi limfocita, u prisustvu iste količine zlata, efekat je bio dosta jači za manje nanočestice (koloid C15), a sa povećanjem koncentracije C15 i C47 učestalost mikronukleusa se smanjila. Osim toga, veće nanočestice (C47) su povećale učestalost MN i CBPI pri nižim koncentracijama od manjih nanočestica (C15).

7 LITERATURA

1. Wiederrecht GP, Wurtz GA, Hranisavljevic J (2004) Coherent coupling of molecular excitons to electronic polarizations of noble metal nanoparticles. *Nano Lett* 4 (11):2121-2125
2. Kobayashi T (1996) Ed. *J-Aggregates* World Scientific Publishing: Singapore
3. Boisselier E, Astruc D (2009) Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev* 38 (6):1759-1782
4. Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, Chen YH, Cheng PC, Chang MY, Chen DH, Chou CH, Wang CR, Wu CL (2007) Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum* 56 (2):544-554
5. Pissuwan D, Valenzuela SM, Cortie MB (2006) Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *Trends Biotechnol* 24 (2):62-67
6. Hong R, Han G, Fernandez JM, Kim BJ, Forbes NS, Rotello VM (2006) Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J Am Chem Soc* 128 (4):1078-1079
7. Challa RK (2007) *Nanomaterials for medical diagnosis and therapy*. Wiley-VCH
8. Zheng WX, Maye MM, Leibowitz FL, Zhong CJ (1999) An infrared reflectance spectroscopic study of a pH-tunable network of nanoparticles linked by hydrogen bonding. *Analyst* 125 (1):17-20
9. Taton TA, Mucic RC, Mirkin CA, Letsinger RL (2000) The DNA-mediated formation of supramolecular mono- and multilayered nanoparticle structures. *J Am Chem Soc* 122 (26):6305-6306

10. Sato T, Omura A, Kobayashi Y (2010) Preparation and spectroscopic properties of silver nanodisks covered with J-aggregate of cyanine dye. *Bull Chem Soc Jpn* 83 (9):1052-1054
11. Fofang NT, Park TH, Neumann O, Mirin NA, Nordlander P, Halas NJ (2008) Plexcitonic nanoparticles: plasmon-exciton coupling in nanoshell-J-aggregate complexes. *Nano Lett* 8 (10):3481-3487
12. Kometani N, Tsubonishi M, Fujita T, Asami K, Yonezawa Y (2001) Preparation and optical absorption spectra of dye-coated Au, Ag, and Au/Ag colloidal nanoparticles in aqueous solutions and in alternate assemblies. *Langmuir* 17 (3):578-580
13. Lekeufack DD, Brioude A, Coleman AW, Miele P, Bellessa J, Zeng LD, Stadelmann P (2010) Core-shell gold J-aggregate nanoparticles for highly efficient strong coupling applications. *Appl Phys Lett* 96:253107-253101-253107-253103
14. Yoshida A, Uchida N, Kometani N (2009) Synthesis and spectroscopic studies of composite gold nanorods with a double-shell structure composed of spacer and cyanine dye J-aggregate layers. *Langmuir* 25 (19):11802-11807
15. Özçelik S, Özçelik I, Akins DL (1998) Superradiant lasing from J-aggregated molecules adsorbed onto colloidal silver. *Appl Phys Lett* 73 (14):1949-1951
16. Benson RC, Kues HA (1977) Absorption and fluorescence properties of cyanine dyes. *J Chem Eng Data* 22 (4):379-383
17. Dulkeith E, Morteani AC, Niedereichholz T, Klar TA, Feldmann J, Levi SA, van Veggel FC, Reinhoudt DN, Moller M, Gittins DI (2002) Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles: radiative and nonradiative effects. *Phys Rev Lett* 89 (20):203002-203001-203002-203004
18. Mishra A, Behera RK, Behera PK, Mishra BK, Behera GB (2000) Cyanines during the 1990s: A review. *Chem Rev* 100 (6):1973-2012

19. Tatikolov AS, Costa SMB (2001) Effects of normal and reverse micellar environment on the spectral properties, isomerization and aggregation of a hydrophilic cyanine dye. *Chem Phys Lett* 346:233-240
20. Zakharova GV, Kombaev AP, Chibisov AK (2004) J aggregation of *meso*-ethylsubstituted carbocyanine dyes in polymer films. *High Energy Chem* 38 (3):180-183
21. Lin XC, Guo LQ, Lin YX, Xie ZH (2007) Spectrofluorometric detection of protein with a novel hydrophilic cyanine dye. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 27 (9):1775-1779
22. Volkova KD, Kovalska VB, Balanda AO, Vermeij RJ, Subramaniam V, Slominskii YL, Yarmoluk SM (2007) Cyanine dye-protein interactions: looking for fluorescent probes for amyloid structures. *J Biochem Biophys Met* 70 (5):727-733
23. Kaga K, Okamoto K, Echizen T, Karthaus O, Nakajima K (2003) Hierarchic structure of cyanine dyes J-Aggregate in polymer microdomes. *Japanese J Polym Sci Tech* 60 (12):752-761
24. Tillmann W, Samha H (2004) J-Aggregates of cyanine dyes in aqueous solution of polymers: a quantitative study. *Am J Undergrad Res* 3 (3):1-6
25. Slavnova TD, Chibisov AK, Görner H (2005) Kinetics of salt-induced J-aggregation of cyanine dyes. *J Phys Chem A* 109 (21):4758-4765
26. Chibisov AK, Slavnova TD, Görner H (2008) Self-assembly of polymethine dye molecules in solutions: kinetic aspects of aggregation. *Nanotechnology in Russia* 3:19-34
27. Petermann R, Tian M, Tatsuura S, Furuki M (2003) Synthesis of new squaraine dyes for optical switches. *Dyes Pigm* 57 (1):43-54
28. Furuki M, Tian M, Sato Y, Pu LS, Tatsuura S, Kawashima H, Sasaki F, Kobayashi S, Tani T (2002) Ultrafast nonlinearoptical response of squarylium dye J-aggregates and fabrication of their LB-films. *Colloid Surface Physicochem Eng Aspect* 198-200:651-656

29. Grishina AD, Pereshivko LY, Tameev AR, Krivenko TV, Savelyev VV, Vannikov AV, Rychwalski RW (2004) Fast photorefractive polymer composites based on nanocrystalline J-aggregates of the cyanine dyes. *Synth Met* 144 (2):113-120
30. Meng F, Chen K, Tian H, Zuppiroli L, Nuesch F (2003) Cyanine dye acting both as donor and acceptor in heterojunction photovoltaic devices. *Appl Phys Lett* 82 (21):3788-3790
31. James TH (1977) *The Theory of the Photographic Processes*, fourth ed., Macmillan, New York.
32. Oh JW, Kumazaki S, Rubtsov IV, Suzumoto T, Tani T, Yoshihara K (2002) Ultrafast energy transfer in J-aggregate on AgBr microcrystals: its dependence on dye coverage. *Chem Phys Lett* 352:357-362
33. Zheng WX, Maye MM, Leibowitz FL, Zhong CJ (2000) Imparting biomimetic ion-gating recognition properties to electrodes with a hydrogen-bonding structured core-shell nanoparticle network. *Anal Chem* 72 (10):2190-2199
34. Han L, Daniel DR, Maye MM, Zhong CJ (2001) Core-shell nanostructured nanoparticle films as chemically sensitive interfaces. *Anal Chem* 73 (18):4441-4449
35. Zamborini FP, Leopold MC, Hicks JF, Kulesza PJ, Malik MA, Murray RW (2002) Electron hopping conductivity and vapor sensing properties of flexible network polymer films of metal nanoparticles. *J Am Chem Soc* 124 (30):8958-8964
36. Narayanan R, El-Sayed MA (2004) Changing catalytic activity during colloidal platinum nanocatalysis due to shape changes: electron-transfer reaction. *J Am Chem Soc* 126 (23):7194-7195
37. Zhong CJ, Maye MM (2001) Core-shell assembled nanoparticles as catalysts. *Adv Mater* 13 (19):1507-1511
38. Hicks JF, Zamborini FP, Osisek A, Murray RW (2001) The dynamics of electron self-exchange between nanoparticles. *J Am Chem Soc* 123 (29):7048-7053

39. Fetni R, Drouin R, Lemieux N, Messier PE, Richer CL (1991) Simultaneous visualization of chromosome bands and hybridization signal using colloidal-gold labeling in electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (23):10916-10920
40. Horisberger M, Rosset J (1977) Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 25 (4):295-305
41. Bozzola JJ (1998) *Electron microscopy*. 2nd edition, Jones & Bartlett publishers; 2 sub edition
42. Kuo J (2007) *Electron microscopy: methods and protocols (methods in molecular biology)*. Humana Press; 2nd edition
43. Romanoa EL, Romanoa M (1977) Staphylococcal protein a bound to colloidal gold: a useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy. *Immunochemistry* 14 (9-10):711-715
44. Gibson JD, Khanal BP, Zubarev ER (2007) Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles *J Am Chem Soc* 129:11653-11661
45. Qian X, Peng XH, Ansari DO, Yin-Goen Q, Chen GZ, Shin DM, Yang L, Young AN, Wang MD, Nie S (2008) In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nat Biotechnol* 26 (1):83-90
46. Choi WI, Sahu A, Kim YH, Tae G (2012) Photothermal cancer therapy and imaging based on gold nanorods. *Ann Biomed Eng* 40 (2):534-546
47. Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA (2006) Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J Am Chem Soc* 128 (6):2115-2120
48. Chen PC, Mwakwari SC, Oyelere AK (2008) Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing. *Nanotech Sci Appl* 1 (1):45-66

49. Wiwanitkit V, Sereemasapun A, Rojanathanes R (2009) Identification of gold nanoparticle in lymphocytes: a confirmation of direct intracellular penetration effect. *Turk J Hematol* 26:29-30
50. Castañeda MT, Alegret S, Merkoçi A (2007) Electrochemical sensing of DNA using gold nanoparticles. *Electroanalysis* 19 (7-8):743-753
51. Wang J, Xu D, Kawde AN, Polsky R (2001) Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization. *Anal Chem* 73 (22):5576-5581
52. Authier L, Grossiord C, Brossier P, Limoges B (2001) Gold nanoparticle-based quantitative electrochemical detection of amplified human cytomegalovirus DNA using disposable microband electrodes. *Anal Chem* 73 (18):4450-4456
53. Tang DP, Yuan R, Chai YQ, Zhong X, Liu Y, Dai JY, Zhang LY (2004) Novel potentiometric immunosensor for hepatitis B surface antigen using a gold nanoparticle-based biomolecular immobilization method. *Anal Biochem* 333 (2):345-350
54. Dequaire M, Degrand C, Limoges B (2000) An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label. *Anal Chem* 72 (22):5521-5528
55. Liao KT, Huang HJ (2005) Femtomolar immunoassay based on coupling gold nanoparticle enlargement with square wave stripping voltammetry. *Anal Chim Acta* 538 (1-2):159-164
56. Chen J, Tang J, Yan F, Ju H (2006) A gold nanoparticles/sol-gel composite architecture for encapsulation of immunoconjugate for reagentless electrochemical immunoassay. *Biomaterials* 27 (10):2313-2321
57. Tang H, Chen J, Nie L, Kuang Y, Yao S (2007) A label-free electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA) based on gold nanoparticles (AuNPs) and nonconductive polymer film. *Biosensors Bioelectron* 22 (6):1061-1067

58. Das J, Aziz MA, Yang HA (2006) Nanocatalyst-based assay for proteins: DNA-free ultrasensitive electrochemical detection using catalytic reduction of p-nitrophenol by gold-nanoparticle labels. *J Am Chem Soc* 128 (50):16022-16023
59. Tian RH, Zhi JF (2007) Fabrication and electrochemical properties of boron-doped diamond film-gold nanoparticle array hybrid electrode. *Electrochem Comm* 9 (5):1120-1126
60. Ding L, Hao C, Xue Y, Ju HA (2007) Bio-inspired support of gold nanoparticles-chitosan nanocomposites gel for immobilization and electrochemical study of K562 leukemia cells. *Biomacromolecules* 8 (4):1341-1346
61. Tominaga M, Shimazoe T, Nagashima M, Taniguchi I (2005) Electrocatalytic oxidation of glucose at gold nanoparticle-modified carbon electrodes in alkaline and neutral solutions. *Electrochem Comm* 7 (2):189-193
62. Lu LP, Wang SQ, Lin XQ (2004) Fabrication of layer-by-layer deposited multilayer films containing DNA and gold nanoparticle for norepinephrine biosensor. *Anal Chim Acta* 519 (2):161-166
63. Raj CR, Okajima T, Ohsaka T (2003) Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine. *J Electroanal Chem* 543 (2):127-133
64. Wang L, Bai J, Huang P, Wang H, Zhang L, Zhao Y (2006) Self-assembly of gold nanoparticles for the voltammetric sensing of epinephrine. *Electrochem Comm* 8 (6):1035-1040
65. Wang J, Wang F, Zou X, Xu Z, Dong S (2007) Surface plasmon resonance and electrochemistry for detection of small molecules using catalyzed deposition of metal ions on gold substrate. *Electrochem Comm* 9 (2):343-347
66. Yu A, Liang Z, Cho J, Caruso F (2003) Nanostructured electrochemical sensor based on dense gold nanoparticle films. *Nano Lett* 3 (9):1203-1207

67. Maye MM, Lou YB, Zhong CJ (2000) Core-shell gold nanoparticle assembly as novel electrocatalyst of CO oxidation. *Langmuir* 16 (19):7520-7523
68. Mena ML, Yanez-Sedeno P, Pingarron JM (2005) A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes. *Anal Biochem* 336 (1):20-27
69. Brown KR, Fox AP, Natan MJ (1996) Morphology-dependent electrochemistry of cytochrome c at Au colloid-modified SnO₂ electrodes. *J Am Chem Soc* 118 (5):1154-1157
70. Wang L, Wang E (2004) Direct electron transfer between cytochrome c and a gold nanoparticles modified electrode. *Electrochem Comm* 6 (1):49-54
71. Gu HY, Yu AM, Chen HY (2001) Direct electron transfer and characterization of hemoglobin immobilized on a Au colloid-cysteamine-modified gold electrode. *J Electroanal Chem* 516 (1-2):119-126
72. Liu S, Ju H (2003) Electrocatalysis via direct electrochemistry of myoglobin immobilized on colloidal gold nanoparticles. *Electroanalysis* 15 (18):1488-1493
73. Shumyantseva VV, Carrara S, Bavastrello V, Jason Riley D, Bulko TV, Skryabin KG, Archakov AI, Nicolini C (2005) Direct electron transfer between cytochrome P450_{scc} and gold nanoparticles on screen-printed rhodium-graphite electrodes. *Biosens Bioelectron* 21 (1):217-222
74. Yang W, Wang J, Zhao S, Sun Y, Sun C (2006) Multilayered construction of glucose oxidase and gold nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment. *Electrochem Comm* 8 (4):665-672
75. Tettey CO, Nagajyothi PC, Lee SE, Ocloo A, Minh An TN, Sreekanth TVM, Lee KD (2011) Anti-melanoma, tyrosinase inhibitory and anti-microbial activities of gold nanoparticles synthesized from aqueous leaf extracts of *Teraxacum officinale*. *Int J Cosmet Sci*

76. Lim IIS, Goroleski F, Mott D, Kariuki N, Ip W, Luo J, Zhong CJ (2006) Adsorption of cyanine dyes on gold nanoparticles and formation of J-aggregates in the nanoparticle assembly. *J Phys Chem B* 110 (13):6673-6682
77. Hranisavljević J, Dimitrijević NM, Wurtz GA, Wiederrecht GP (2002) Photoinduced charge separation reactions of J-aggregates coated on silver nanoparticles. *J Am Chem Soc* 124 (17):4536-4537
78. Jeunieu L, Alin V, Nagy JB (2000) Adsorption of thiacyanine dyes on silver halide nanoparticles: Study of the adsorption site. *Langmuir* 16 (2):597-606
79. Chibisov AK, Görner H, Slavnova TD (2004) Kinetics of salt-induced J-aggregation of an anionic thiocarbocyanine dye in aqueous solution. *Chem Phys Lett* 390 (1-3):240-245
80. Andrade SM, Costa SMB (2002) Aggregation kinetics of meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphine in the presence of proteins: temperature and ionic strength effects. *J Fluoresc* 12 (1):77-81
81. Liz-Marzan LM (2004) Nanometals: formation and color. *Mater Today* 7 (2):26-31
82. Roco MC (1999) Nanoparticles and nanotechnology research. *J Nanoparticle Res* 1 (1):1-6
83. Reibold M, Paufler P, Levin AA, Kochmann W, Patzke N, Meyer DC (2006) Materials: carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature* 444 (7117):286
84. O'Brien RW, White LR (1978) Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J Chem Soc, Faraday Trans 2* 74:1607-1626
85. Knecht V, Risselada HJ, Mark AE, Marrink SJ (2008) Electrophoretic mobility does not always reflect the charge on an oil droplet. *J Colloid Interface Sci* 318 (2):477-486
86. Parak WJ, Manna L, Simmel FC, Gerion D, Alivisatos P (2004) Quantum dots, in nanoparticles: from theory to application. G Schmid, Wiley-VCH, Weinheim

87. Kreibig U, Vollmer M (1995) Optical properties of metal clusters. Berlin: Springer
88. Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC (2003) The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *J Phys Chem B* 107:668-677
89. Kerker M (1969) The scattering of light and other electromagnetic radiation. New York: Academic press
90. Bohren CF, Huffman DR (1983) Absorption and scattering of light by small particles. New York: John Wiley & Sons, Inc:362
91. Papavassiliou GC (1979) Optical properties of small inorganic and organic metal particles. *Prog Solid State Chem* 12:185-271
92. Henglein A (1989) Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles. *Chem Rev* 89:1861-1873
93. Kreibig U (1986) Systems of small metal particles: Optical properties and their structure dependences. *Z Phys D Atoms, Molecules and Clusters* 3:239-249
94. Zhang Z, Wu Y (2010) Investigation of the NaBH₄-induced aggregation of Au nanoparticles. *Langmuir* 26 (12):9214-9223
95. Doremus RH (1964) Optical properties of small gold particles. *J Chem Phys* 40:2389-2396
96. Saxena U, Goswami P (2012) Electrical and optical properties of gold nanoparticles: applications in gold nanoparticles-cholesterol oxidase integrated systems for cholesterol sensing. *J Nanopart Res* 14 (4):1-11
97. Huang HH, Ni XP, Loy GL, Chew CH, Tan KL, Loh FC, Deng JF, Xu GQ (1996) Photochemical formation of silver nanoparticles in poly (N-vinylpyrrolidone). *Langmuir* 12:909-912

98. Leopold N, Lendl B (2003) A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *J Phys Chem B* 107:5723-5727
99. Rodriguez-Sanchez L, Blanco MC, Lopez-Quintela MA (2000) Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *J Phys Chem B* 104:9683-9688
100. Manna A, Imae T, Iida M, Hisamatsu N (2001) Formation of silver nanoparticles from a N-hexadecylethylenediamine silver nitrate complex. *Langmuir* 17:6000-6004
101. Mulvaney P (1996) Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir* 12:788-800
102. Haes AJ, Zou S, Schatz GC, Van Duyne RP (2004) A nanoscale optical biosensor: the long range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles. *J Phys Chem B* 108:109-116
103. Haynes CL, McFarland AD, Zhao LL, Van Duyne RP, Schatz GC (2003) Nanoparticle optics: the importance of radiative dipole coupling in two-dimensional nanoparticle arrays. *J Phys Chem B* 107: 7337–7342
104. Faraday M (1857) The Bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos Trans R Soc Lond* 147:145-181
105. Mie G (1908) Contributions to the optics of turbid media, especially colloidal metal suspensions. *Annal Phys* 25:376-445
106. Ashcroft NW, Mermin ND (1976) Solid state physics. Philadelphia: Saunders College
107. Wiley BJ, Im SH, Li ZY, McLellan J, Siekkinen A, Xia Y (2006) Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis. *J Phys Chem B* 110 (32):15666-15675

108. Sun Y, Xia Y (2003) Gold and silver nanoparticles: a class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm. *Analyst* 128 (6):686-691
109. Murphy CJ, Jana NR (2002) Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires. *Adv Mater* 14:80-82
110. Nikoobakht B, El-Sayed MA (2001) Evidence for bilayer assembly of cationic surfactants on the surface of gold nanorods. *Langmuir* 17 (20):6368-6374
111. Liz-Marzan LM (2006) Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir* 22 (1):32-41
112. Narayanan R, El-Sayed MA (2005) Catalysis with transition metal nanoparticles in colloidal solution: nanoparticle shape dependence and stability. *J Phys Chem B* 109 (26):12663-12676
113. Sun Y, Xia Y (2002) Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science* 298 (5601):2176-2179
114. Rao CNR, Govindaraj A (2001) Nanotubes and nanowires. *Proc Indian Acad Sci (Chem Sci)* 113:375–392
115. Pyo M, Joo J, Jung YS (2007) Simultaneous control of Au nanotube lengths and pore sizes with a single kind of polycarbonate membrane via interfacial deposition at the air/water interface. *Bull Korean Chem Soc* 28 (8):1285-1288
116. Senger RT, Dağ S, Çiraci S (2005) Magic gold nanotubes. *Turk J Phys* 29:269-276
117. Witlicki EH, Andersen SS, Hansen SW, Jeppesen JO, Wong EW, Jensen L, Flood AH (2010) Turning on resonant SERRS using the chromophore–plasmon coupling created by host–guest complexation at a plasmonic nanoarray. *J Am Chem Soc* 132 (17):6099–6107
118. Hao E, Bailey RC, Schatz GC, Hupp JT, Li S (2004) Synthesis and optical properties of "branched" gold nanocrystals. *Nano Lett* 4:327-330

119. Malikova N, Pastoriza-Santos I, Schierhorn M, Kotov NA, Liz-Marzán LM (2002) Layer-by-layer assembly of mixed spherical and planar gold nanoparticles: control of interparticle interactions *Langmuir* 18:3694-3697
120. Huang W, Qian W, El-Sayed MA (2004) Coherent vibrational oscillation in gold prismatic monolayer periodic nanoparticle arrays. *Nano Lett* 4 (9):1741-1747
121. Creighton JA, Blatchford CG, Albrecht MG (1979) Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J Chem Soc, Faraday Trans 2* 75:790-798
122. Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, Natan MJ (1995) Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Anal Chem* 67 (4):735-743
123. Selvakannan P, Mandal S, Phadtare S, Gole A, Pasricha R, Adyanthaya SD, Sastry M (2004) Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. *J Colloid Interface Sci* 269:97-102
124. Selvakannan P, Swami A, Srisathiyannarayanan D, Shirude PS, Pasricha R, Mandale AB, Sastry M (2004) Synthesis of aqueous Au core-Ag shell nanoparticles using tyrosine as a pH-dependent reducing agent and assembling phase-transferred silver nanoparticles at the air-water interface. *Langmuir* 20:7825-7836
125. Mandal S, Selvakannan P, Phadtare S, Pasricha R, Sastry M (2002) Synthesis of a stable gold hydrosol by the reduction of chloroaurate ions by the amino acid, aspartic acid. *Proc Indian Acad Sci* 114:513-520
126. Selvakannan P, Mandal S, Phadtare S, Pasricha R, Sastry M (2003) Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible. *Langmuir* 19:3545-3549
127. Shao Y, Jin Y, Dong S (2004) Synthesis of gold nanoplates by aspartate reduction of gold chloride. *Chem Comm* 9:1104-1105

128. Kasture M, Sastry M, Prasad BLV (2010) Halide ion controlled shape dependent gold nanoparticle synthesis with tryptophan as reducing agent: enhanced fluorescent properties and white light emission. *Chem Phys Lett* 484:271-275
129. Bhargava SK, Booth JM, Agrawal S, Coloe P, Kar G (2005) Gold nanoparticle formation during bromoaurate reduction by amino acids. *Langmuir* 21:5949-5956
130. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R (1994) Synthesis of thiol derivatised gold nanoparticles in a two phase liquid/liquid system. *J Chem Soc, Chem Commun* 7:801-802
131. Du L, Xian L, Feng J-X (2011) Rapid extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by the fungus *Penicillium* sp. *J Nanopart Res* 13:921-930
132. Reddy VR (2006) Gold nanoparticles: synthesis and applications. *Synlett* 11:1791-1792
133. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc* 11:55-75
134. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A (2006) Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B* 110:15700-15707
135. Frens G (1972) Particle size and sol stability in metal colloids. *Colloid & Polymer Sci* 250:736-741
136. Frens G (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys Sci* 241:20-22
137. Pong BK, Elim HI, Chong JX, Ji W, Trout BL, Lee JY (2007) New insights on the nanoparticle growth mechanism in the citrate reduction of gold(III) salt: formation of the Au nanowire intermediate and its nonlinear optical properties. *J Phys Chem C* 111 (17):6281-6287
138. Van Hyning DL, Zukoski CF (1998) Formation mechanisms and aggregation behavior of borohydride reduced silver particles. *Langmuir* 14:7034-7046

139. Van Hying DL, Klemperer WG, Zukoski CF (2001) Characterization of colloidal stability during precipitation reactions. *Langmuir* 17:3120-3127
140. Manna A, Chen P, Akiyama H, Wei T, Tamada K, Knoll W (2003) Optimized photoisomerization on gold nanoparticles capped by unsymmetrical azobenzene disulfides. *Chem Mater* 15 (1):20-28
141. Perrault SD, Chan WCW (2009) Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50-200 nm. *J Am Chem Soc* 131 (47):17042-17043
142. Chen W, Cai W, Zhang L, Wang G, Zhang L (2001) Sonochemical processes and formation of gold nanoparticles within pores of mesoporous silica. *J Colloid Interf Sci* 238 (2):291-295
143. Zhang J, Du J, Han B, Liu Z, Jiang T, Zhang Z (2006) Sonochemical formation of single-crystalline gold nanobelts. *Angew Chem Int Ed* 45 (7):1116-1119
144. Kurihara K, Kizling J, Stenius P, Fendler JH (1983) Laser and pulse radiolytically induced colloidal gold formation in water and in water-in-oil microemulsions. *J Am Chem Soc* 105 (9):2574-2579
145. Bronstein L, Kramer E, Berton B, Burger C, Forster S, Antonietti M (1999) Successive use of amphiphilic block copolymers as nanoreactors and templates: preparation of porous silica with metal nanoparticles. *Chem Mater* 11 (6):1402-1405
146. Sato S, Toda K, Oniki S (1999) Kinetic study on the formation of colloidal gold in the presence of acetylenic glycol nonionic surfactant. *J Colloid Interf Sci* 218 (2):504-510
147. Zanella R, Giorgio S, Shin C-H, Henry CR, Louis C (2004) Characterization and reactivity in CO oxidation of gold nanoparticles supported on TiO₂ prepared by deposition-precipitation with NaOH and urea. *J Catal* 222 (2):357-367

148. Chiang C-L (2001) Controlled growth of gold nanoparticles in AOT/C₁₂E₄/isooctane mixed reverse micelles. *J Colloid Interf Sci* 239 (2):334-341
149. Su J-J, Wang L-Y, Zhang X-H, Fu Y-L, Huang Y, Wei Y-S (2011) Synthesis, absorption and fluorescence spectral characteristics of trinucleus dimethine cyanine dyes as fluorescent probes for DNA detection. *J Braz Chem Soc* 22 (1):73-79
150. Hannah KC, Armitage BA (2004) DNA-templated assembly of helical cyanine dye aggregates: A supramolecular chain polymerization. *Acc Chem Res* 37 (11):845-853
151. Jelley EE (1936) Spectral absorption and fluorescence of dyes in the molecular state. *Nature* 138:1009-1010
152. Scheibe G (1937) Über die veränderlichkeit der absorptionsspektren in lösungen und die nebenvalenzen als ihre ursache. *Ange Chem* 50 (11):212-219
153. Frenkel J (1931) On the transformation of light into heat in solids. I. *Phys Rev* 37:17-44
154. Wolverson M (2008) Nailing down the exciton in LiF. Argonne National Laboratory US Department of Energy Office of Science, Abbamonte Research Group, University of Illinois
155. Bücher H, Kuhn H (1970) Scheibe aggregate formation of cyanine dyes in monolayers. *Chem Phys Lett* 6 (3):183-185
156. Franck J, Teller E (1938) Migration and photochemical action of excitation energy in crystals. *J Chem Phys* 6:861- 872
157. Yao H, Domoto K, Isohashi T, Kimura K (2005) In situ detection of birefringent mesoscopic H and J aggregates of thiacyanin dye in solution. *Langmuir* 21:1067-1073
158. Stokes GG (1852) On the change of refrangibility of light. *Phil Trans R Soc (London)* 142:463-562

159. De Boer S, Wiersma DA (1990) Dephasing-induced damping of superradiant emission in J-aggregates. *Chem Phys Lett* 165 (1):45-53
160. Dicke RH (1954) Coherence in spontaneous radiation processes. *Phys Rev* 93 (1):99-110
161. Özçelik S, Akins DL (1999) Superradiance of aggregated thiocarbocyanine molecules. *J Phys Chem B* 103 (42):8926–8929
162. Meinardi F, Cerminara M, Sassella A, Bonifacio R, Tubino R (2003) Superradiance in molecular H aggregates. *Phys Rev Lett* 91 (24):247401-2474014
163. Behera GB, Behera PK, Mishra BK (2007) Cyanine dyes: self aggregation and behaviour in surfactants. *J Surf Sci Technol* 23 (1-2):1-31
164. Struganova IA, Hazell M, Gaitor J, McNally-Carr D, Zivanovic S (2003) Influence of inorganic salts and bases on the J-band in the absorption spectra of water solutions of 1,1'-diethyl-2,2'-cyanine iodide. *J Phys Chem A* 107 (15):2650-2656
165. Struganova I (2000) Dynamics of formation of 1,1'-diethyl-2,2'-cyanine iodide J-aggregates in solution. *J Phys Chem A* 104 (43):9670-9674
166. Pasternack RF, Fleming C, Herring S, Collings PJ, dePaula J, DeCastro G, Gibbs EJ (2000) Aggregation kinetics of extended porphyrin and cyanine dye assemblies. *Biophys J* 79 (1):550-560
167. Mal'tsev I, Lypenko DA, Shapiro BI, Brusentseva MA, Milburn GHW, Wright J, Hendriksen A, Berendyaev VI, Kotov BV, Vannikov AV (1999) Electroluminescence of polymer/J-aggregate composites. *Appl Phys Lett* 75:1896-1898
168. Scheblykin G, Lepnev LS, Vitukhnovsky AG, Van der Auweraer M (2001) Electroluminescence and optical properties of poly(phenylenevinylene)/J-aggregate composites. *J Lumin* 94/95:461-464
169. Menéndez GO, Cortés E, Grumelli D, Méndez De Leo LP, Williams FJ, Tognalli NG, Fainstein A, Vela ME, Jares-Erijman EA, Salvarezza RC (2012) Self-assembly of

thiolated cyanine aggregates on Au(111) and Au nanoparticle surfaces. *Nanoscale* 4 (2):531-540

170. Chandrasekharan N, Kamat PV, Hu J, Jones G (2000) Dye-capped gold nanoclusters: photoinduced morphological changes in gold/rhodamine 6G nanoassemblies. *J Phys Chem B* 104 (47):11103-11109

171. Nasr C, Liu D, Hotchandani S, Kamat PV (1996) Dye capped semiconductor nanoclusters. Excited state and photosensitization aspects of rhodamine 6G H-aggregates bound to SiO₂ and SnO₂ colloids. *J Phys Chem* 100 (26):11054-11061

172. Kerker MJ (1985) The optics of colloidal silver: something old and something new. *J Colloid Interface Sci* 105 (2):297-314

173. Ghosh SK, Pal A, Nath S, Kundu S, Panigrahi S, Pal T (2005) Dimerization of eosin on nanostructured gold surfaces: Size regime dependence of the small metallic particles. *Chem Phys Lett* 412 (1-3):5-11

174. Vodnik VV, Nedeljkovic JM (1998) Adsorption of boron containing molecules on silver nanoparticles. *J Serb Chem Soc* 63:995-1000

175. Lewis ES (1974) Investigation of rates and mechanisms of reactions. Part I, Third Edition, Wiley-Interscience, New York:758

176. Gear CW (1971) Numerical initial value problems in ordinary differential equations Prentice-Hall (Englewood Cliffs, NJ)

177. Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP (1992) Numerical recipes in [C or Fortran]. 2nd edition, Cambridge University Press (NY)

178. Nielsen PP (2003) An upper bound for odd perfect numbers. *Electronic J Comb Numb Theor* 3:A14

179. Pikhurko O (2001) Lattice points in lattice polytopes. *Mathematika* 48:15-24

180. Miller JCP, Wheeler DJ (1951) Large prime numbers. *Nature* 168:838

181. Kouznetsov D, Bisson J-F, Li J, Ueda K (2007) Self-pulsing laser as oscillator Toda: Approximation through elementary functions. *J Phys A* 40 (9):1-18
182. Varfolomeyev SD, Gurevich KG (2001) The hyperexponential growth of the human population on a macrohistorical scale. *J Theor Biol* 212 (3):367-372
183. Kapur D, Narendran P (1992) Double-exponential complexity of computing a complete set of AC-unifiers. *Proc 7th IEEE symp Logic in computer science* 11-21
184. Johannse J, Lange M (2003) CTL+ is complete for double exponential time. *Lect Notes Comput Sc* 2719:190
185. Xu W, Kong JS, Chen P (2009) Single-molecule kinetic theory of heterogeneous and enzyme catalysis. *J Phys Chem C* 113 (6):2393-2404
186. Chiron N, Guilet R, Deydier E (2003) Adsorption of Cu(II) and Pb(II) onto a grafted silica: isotherms and kinetic models. *Water Res* 37:3079-3086
187. Luo S, Liu S, Xu J, Liu H, Zhu Z, Jiang M, Wu C (2006) A stopped-flow kinetic study of the assembly of interpolymer complexes via hydrogen-bonding interactions. *Macromolecules* 39:4517-4525
188. Zhang J, Liu S (2011) Kinetics of thermo-induced micelle-to-vesicle transitions in a cationic surfactant system investigated by stopped-flow temperature jump. *Phys Chem Chem Phys* 13 (27):12545-12553
189. Jardine RS, Bartlett P (2002) Synthesis of non-aqueous fluorescent hard-sphere polymer colloids. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 211:127-132
190. Shin J, Braun PV, Lee W (2010) Fast response photonic crystal pH sensor based on templated photo-polymerized hydrogel inverse opal. *Sensor Actuat B-Chem* 150:183-190
191. Kohlrausch R (1854) Theorie des elektrischen rückstandes in der leidner flasche II. *Ann Phys Chem (Poggendorff)* 91:56-82, 179-213

192. Berberan-Santos MN, Bodunov EN, Valeur B (2005) Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions 1. Kohlrausch decay function (stretched exponential). *Chem Phys* 315:171-182
193. Zschieschang U, Weitz RT, Kern K, Klauk H (2009) Bias stress effect in low-voltage organic thin-film transistors. *Appl Phys A* 95:139-145
194. Williams G, Watt DC (1970) Non-symmetrical dielectric relaxation behaviour arising from a simple empirical decay function. *Trans Faraday Soc* 66:80-85
195. Förster T (1949) Experimentelle und theoretische untersuchung des zwischenmolekularen uebergangs von electronenanregungsenergie. *Z Naturforsch* 4a:321-327
196. Rice SA (1985) Diffusion-limited reactions, comprehensive chemical kinetics. Ed Bamford, CH, Tipper, CFH and Compton, RG (Elsevier, Amsterdam) 25
197. Sveshnikov BY, Shirokov VI (1962) Change in the mean life-time and yield of luminescence in the process of quenching as a function of the law of molecular interaction. *Opt Spectrosc* 12:576-581
198. Inokuti M, Hirayama F (1965) Influence of energy transfer by echange mechanism on donor luminescence. *J Chem Phys* 43:1978-1989
199. Bodunov EN, Berberan-Santos MN, Nunes Pereira EJ, Martinho JMG (2000) Eigenvalue spectrum of the survival probability of excitation in nonradiative energy transport. *Chem Phys* 259:49-61
200. Huber DL, Hamilton DS, Barnett B (1977) Time-dependent effects in fluorescent line narrowing. *Phys Rev B* 16:4642-4650
201. Huber DL (1981) Dynamics of incoherent transfer. *Top Appl Phys* 49:83-111
202. Berberan-Santos MN, Bodunov EN, Martinho JMG (1996) Luminescence quenching in fractal media accelerated by migration. *Opt Spectrosc* 81:217-221

203. Berberan-Santos MN, Bodunov EN, Martinho JMG (1999) Kinetics of luminescence of porous media: The effective fractal dimensionality and penetration depth of chromophores. *Opt Spectrosc* 87:66-69
204. Berberan-Santos MN, Bodunov EN, Martinho JMG (2000) Luminescence kinetics of chromophores attached to the ends of a flexible polymer chain. *Opt Spectrosc* 89:876-883
205. Bodunov EN, Berberan-Santos MN, Martinho JMG (2001) Luminescence kinetics of linear polymer molecules with chromophores randomly distributed along the chain. *Opt Spectrosc* 91:694-703
206. Bodunov EN, Berberan-Santos MN, Martinho JMG (2001) Electronic energy transfer in linear polymers randomly labelled with chromophores. *Chem Phys* 274:243-253
207. Bodunov EN, Berberan-Santos MN, Martinho JMG (2002) Electronic energy transfer in polymers labeled at both ends with fluorescent groups. *J Luminesc* 96:269-278
208. Bodunov EN, Berberan-Santos MN, Martinho JMG (2002) Electronic energy transfer in linear polymer chains. *High Energy Chem* 36:245-249
209. Peterson KA, Fayer MD (1986) Electronic excitation transport on isolated, flexible polymer chains in the amorphous solid state randomly tagged or end tagged with chromophores. *J Chem Phys* 85:4702-4711
210. Roy AK, Blumen A (1989) On the direct energy transfer from donors to acceptors in chainlike polymer systems. *J Chem Phys* 91:4353-4359
211. Fredrickson GH, Andersen HC, Frank CW (1985) Macromolecular pair correlation functions from fluorescence depolarization experiments. *J Polym Sci: Polym Phys Ed* 23:591-599

212. Linnros J, Lalic N, Galeckas A, Grivickas V (1999) Analysis of the stretched exponential photoluminescence decay from nanometer-sized silicon crystals in SiO₂. *J Appl Phys* 86:6128-6134
213. Chen R (2003) Apparent stretched-exponential luminescence decay in crystalline solids. *J Luminesc* 102-103:510-518
214. Soloviev VN, Eichhofer A, Fenske D, Banin U (2001) Size-dependent optical spectroscopy of a homologous series of CdSe cluster molecules. *J Am Chem Soc* 123 (10):2354-2364
215. Hof M, Schleicher J, Schneider FW (1989) Time resolved fluorescence in doped aerogels and organosilicate glasses. *Ber Bunsen Phys Chem* 93:1377-1381
216. Wong AL, Harris JM, Marshall DB (1990) Measurements of energy dispersion at liquid–solid interfaces: fluorescence quenching of pyrene bound to fumed silica. *Can J Phys* 68
217. Métivier R, Leray I, Lefèvre J-P, Roy-Auberger M, Zaner-Szydłowski N, Valeur B (2003) Characterization of alumina surfaces by fluorescence spectroscopy Part 2. Photophysics of a bound pyrene derivative as a probe of the spatial distribution of reactive hydroxyl groups. *Phys Chem Chem Phys* 5:758-766
218. Lee J, Lee J, Lee M, Lee K-J-B, Ko D-S (2004) Scanning confocal fluorescence microscopy of single DNA–EtBr complexes dispersed in polymer. *Chem Phys Lett* 394:49-53
219. Siegel J, Elson DS, Webb SE, Lee KC, Vlandas A, Gambaruto GL, Leveque-Fort S, Lever MJ, Tadrous PJ, Stamp GW, Wallace AL, Sandison A, Watson TF, Alvarez F, French PM (2003) Studying biological tissue with fluorescence lifetime imaging: microscopy, endoscopy, and complex decay profiles. *Appl Opt* 42 (16):2995-3004
220. Lee KC, Siegel J, Webb SE, Leveque-Fort S, Cole MJ, Jones R, Dowling K, Lever MJ, French PM (2001) Application of the stretched exponential function to fluorescence lifetime imaging. *Biophys J* 81 (3):1265-1274

221. Huber DL (2000) Two-state model for sub-exponential fluorescence. *J Luminesc* 86:95-99
222. García-Adeva AJ, Huber DL (2000) Two state model for sub-exponential fluorescence revisited. *J Luminesc* 92:65-72
223. Jurlewicz A, Weron K (1999) A general probabilistic approach to the universal relaxation response of complex systems. *Cell Mol Biol Lett* 4:55-86
224. Balaban TS, Leitich J, Holzwarth AR, Schaffner K (2000) Autocatalyzed self-aggregation of (3^1R)-[Et,Et] bacteriochlorophyll c_F molecules in nonpolar solvents. Analysis of the kinetics. *J Phys Chem B* 104:1362-1372
225. Pasternack RF, Gibbs EJ, Collings PJ, dePaula JC, Turzo LC, Terracina A (1998) A nonconventional approach to supramolecular formation dynamics. The kinetics of assembly of DNA-bound porphyrins. *J Am Chem Soc* 120:5873-5878
226. Cowan JA (1993) *Inorganic Biochemistry*, VCH, New York.
227. Schmidt R, Sapunov VN (1982) *Non-formal kinetics: in search for chemical reaction pathways*. Verlag Chemie, Weinheim
228. Menten L, Michaelis MI (1913) Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem Z* 49:333-369
229. Hill AV (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol* 40:i-vii
230. Sharma A, Schulman SG (1999) *Introduction to fluorescence spectroscopy*. Wiley interscience
231. Lakowicz JR (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd edition, Kluwer Academic/Plenum Press: New York
232. Kubista M, Sjöback R, Eriksson S, Albinsson B (1994) Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra. *Analyst* 119:417-419

233. Yappert MC, Ingle JD (1989) Correction of polychromatic luminescence signals for inner-filter effects. *Appl Spectros* 43 (5):759-767
234. Wiechelman KJ (1986) Empirical correction equation for the fluorescence inner filter effect. *Am Lab* 18:49-53
235. Puchalski MM, Morra MJ, von Wandruszka R (1991) Assessment of inner filter effect corrections in fluorimetry. *Fresenius J Anal Chem* 340:341-344
236. Kao S, Asanov AN, Oldham PB (1998) A comparison of fluorescence inner-filter effects for different cell configurations. *Instrum Sci Technol* 26 (4):375-387
237. Fanget B, Devos O (2003) Correction of inner filter effect in mirror coating cells for trace level fluorescence measurements. *Anal Chem* 75:2790-2795
238. Parker CA (1968) *Photoluminescence of solutions* Elsevier: New York:220-232
239. Gauthier TD, Shane EC, Guerln WF, Seltz WR, Grant CL (1986) Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environ Sci Technol* 20:1162-1166
240. Lu Y, Dasog M, Leontowich AFG, Scott RWJ, Paige MF (2010) Fluorescently labeled gold nanoparticles with minimal fluorescence quenching. *J Phys Chem C* 114:17446-17454
241. Uznański P, Kurjata J, Bryszewska E (2009) Modification of gold nanoparticle surfaces with pyrenedisulfide in ligand-protected exchange reactions. *Mater Sci-Poland* 27 (3):659-670
242. Nerambourg N, Werts MH, Charlot M, Blanchard-Desce M (2007) Quenching of molecular fluorescence on the surface of monolayer-protected gold nanoparticles investigated using place exchange equilibria. *Langmuir* 23 (10):5563-5570
243. Yang Y, Lai EP (2011) Optimization of molecularly imprinted polymer method for rapid screening of 17beta-estradiol in water by fluorescence quenching. *Int J Anal Chem*. doi:10.1155/2011/214747

244. Zhang A, Fang Y, Shao H (2006) Studies of quenching and enhancement of fluorescence of methyl orange adsorbed on silver colloid. *J Colloid Interface Sci* 298 (2):769-772
245. Sokolov K, Chumanov G, Cotton TM (1998) Enhancement of molecular fluorescence near the surface of colloidal metal films. *Anal Chem* 70:3898-3905
246. Xie F, Baker MS, Goldys EM (2008) Enhanced fluorescence detection on homogeneous gold colloid self-assembled monolayer substrates. *Chem Mater* 20:1788-1797
247. Zhu J, Zhu K, Huang L (2008) Using gold colloid nanoparticles to modulate the surface enhanced fluorescence of rhodamine B. *Phys Lett A* 372:3283–3288
248. Zhang J, Lakowicz JR (2007) Metal-enhanced fluorescence of an organic fluorophore using gold particles. *Optics Express* 15 (5):2598-2606
249. Anger P, Bharadwaj P, Novotny L (2006) Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence. *Phys Rev Lett* 96:113002
250. Jablonski A (1935) Über den mechanism des photolumineszenz von farbstoffphosphoren. *Z Phys* 94:38-46
251. O'Reilly J (1975) Fluorescence experiments with quinine. *J Chem Educ* 52 (9):610-612
252. Blum G, Weimer RM, Edgington LE, Adams W, Bogyo M (2009) Comparative assessment of substrates and activity based probes as tools for non- invasive optical imaging of cysteine protease activity. *PLoS ONE* 4 (7):6374
253. Weissleder R, Tung CH, Mahmood U, Bogdanov A (1999) In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol* 17 (4):375-378
254. Caldwell RA, Creed D, Ohta H (1975) Exciplex quenching. Geometric and electronic requirements. *J Am Chem Soc* 97 (11):3246-3247

255. McMillin DR, Kirchoff JR, Goodwin KV (1985) Exciplex quenching of photo-excited copper complexes. *Coord Chem Rev* 64:83-92
256. Kuzmin MG (1993) Exciplex mechanism of the fluorescence quenching in polar media. *Pure Appl Chem* 65 (8):1653-1658
257. Perrin F (1934) Mouvement brownien d'un ellipsoïde (I). Dispersion diélectrique pour des molécules ellipsoïdales. *J Physique* 7 (5):497-511
258. Perrin F (1936) Mouvement brownien d'un ellipsoïde (II). Rotation libre et dépolariation des fluorescences: translation et diffusion de molécules ellipsoïdales. *J Physique* 7 (7):1-11
259. Förster T (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence (Transl RS Knox). *Ann Phys (Leipzig)* 2:55-75
260. Stryer L (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* 47:819-846
261. Saini S, Bhowmick S, Shenoy VB, Bagchi B (2007) Rate of excitation energy transfer between fluorescent dyes and nanoparticles. *J Photochem Photobiol A: Chem* 190 (2-3):335-341
262. Yun CS, Javier A, Jennings T, Fisher M, Hira S, Peterson S, Hopkins B, Reich NO, Strouse GF (2005) Nanometal surface energy transfer in optical rulers, breaking the FRET barrier. *J Am Chem Soc* 127 (9):3115-3119
263. Seelig J, Leslie K, Renn A, Kühn S, Jacobsen V, van de Corput M, Wyman C, Sandoghdar V (2007) Nanoparticle-induced fluorescence lifetime modification as nanoscopic ruler: demonstration at the single molecule level. *Nano Lett* 7 (3):685-689
264. Sung J, Shin KJ, Lee S (1992) Theory of diffusion-influenced fluorescence quenching. Effects of static quenching on the Stern–Volmer curve. *Chem Phys* 167:17-36

265. Daniel MC, Astruc D (2004) Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev* 104 (1):293-346. doi:10.1021/cr030698+
266. El-Sayed MA (2001) Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Acc Chem Res* 34 (4):257-264
267. Sun S, Murray CB (1999) Synthesis of monodisperse cobalt nanocrystals and their assembly into magnetic superlattices (invited). *J Appl Phys* 85 (8):4325-4330
268. Underwood S, Mulvaney P (1994) Effect of the solution refractive index on the color of gold colloids. *Langmuir* 10 (10):3427-3430
269. Wang W, Efrima S, Regev O (1998) Directing oleate stabilized nanosized silver colloids into organic phases. *Langmuir* 14 (3):602-610
270. Brust M, Kiely CJ (2002) Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 202 (2-3):175-186
271. Pranjali C, Debasmita D, Adel AA (2010) Gold nanoparticles in molecular diagnostics and therapeutics. *Dig J Nanomater Bios* 5 (2):363-367
272. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ (2007) The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 3 (1):20-31
273. Li Y, Schluesener HJ, Xu S (2010) Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bull* 43 (1):29-41
274. Olofsson L, Rindzevicius T, Pfeiffer I, Käll M, Höök F (2003) Surface-based gold-nanoparticle sensor for specific and quantitative DNA hybridization detection. *Langmuir* 19 (24):10414-10419
275. Leander DM, Thaxton CS, Luthi AJ (2010) Mixed monolayer gold nanoparticles for cancer therapeutics. *Nanoscape* 7 (1):11-14

276. Powell AC, Paciotti GF, Libutti SK (2010) Colloidal gold: a novel nanoparticle for targeted cancer therapeutics. *Methods Mol Biol* 624:375-384
277. De Jong WH, Borm PJ (2008) Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomed* 3 (2):133-149
278. Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, Tamarkin L (2004) Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv* 11 (3):169-183
279. Kim D, Park S, Lee JH, Jeong YY, Jon S (2007) Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *J Am Chem Soc* 129 (24):7661-7665
280. Sonavane G, Tomoda K, Makino K (2008) Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 66 (2):274-280
281. Matsumura Y, Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46 (12 Pt 1):6387-6392
282. Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R, Thomson AH, Murray LS, Hilditch TE, Murray T, Burtles S, Fraier D, Frigerio E, Cassidy J (1999) Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. *Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. Clin Cancer Res* 5 (1):83-94
283. Thomas M, Klivanov AM (2002) Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 99 (23):14640-14645
284. Panyam J, Labhasetwar V (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 55 (3):329-347

285. Yang P-H, Sun X, Chiu J-F, Sun H, He Q-Y (2005) Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjug Chem* 16 (3):494-496
286. Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA (2007) Au nanoparticles target cancer. *Nano Today* 2 (1):18-29
287. Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM (2004) The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol* 49:N309-N315
288. Loo C, Lin A, Hirsch L, Lee MH, Barton J, Halas N, West J, Drezek R (2004) Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. *Tech Canc Res Treat* 3 (1):33-40
289. Murphy CJ, Gole AM, Stone JW, Sisco PN, Alkilany AM, Goldsmith EC, Baxter SC (2008) Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *Acc Chem Res* 41 (12):1721-1730
290. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnen-Dechent W (2007) Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3 (11):1941-1949
291. Alkilany AM, Murphy CJ (2010) Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res* 12 (7):2313-2333
292. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD (2005) Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1 (3):325-327
293. Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM (2004) Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem* 15 (4):897-900
294. Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, Ulman A, Rafailovich M (2006) Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small* 2 (6):766-773

295. Tsoi M, Kuhn H, Brandau W, Esche H, Schmid G (2005) Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small* 1 (8-9):841-844
296. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M (2005) Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir* 21 (23):10644-10654
297. Andreu EJ, Martin de Llano JJ, Moreno I, Knecht E (1998) A rapid procedure suitable to assess quantitatively the endocytosis of colloidal gold and its conjugates in cultured cells. *J Histochem Cytochem* 46 (10):1199-1201
298. Hoffmann S, Utke I, Moser B, Michler J, Christiansen SH, Schmidt V, Senz S, Werner P, Gösele U, Ballif C (2006) Measurement of the bending strength of vapor-liquid-solid grown silicon nanowires. *Nano Lett* 6 (4):622-625
299. Vecchio G, Galeone A, Brunetti V, Maiorano G, Sabella S, Cingolani R, Pompa PP (2012) Concentration-dependent, size-independent toxicity of citrate capped AuNPs in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 7 (1):e29980
300. Le Hir M, Kaissling B (1993) Distribution and regulation of renal ecto-5'-nucleotidase: implications for physiological functions of adenosine. *Am J Physiol* 264 (3 Pt 2):F377-F387
301. Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU (1993) Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem* 41:335-341
302. Fenech M (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect* 101 Suppl 3:101-107
303. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surralles J, Vanhauwaert A, Wakata A (2003) Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* 540 (2):153-163

304. Youngson RM (2006) Collins dictionary of human biology. Glasgow: Harper Collins
305. Nelson DL, Cox MM (2005) Principles of Biochemistry. 4th edition, New York: W H Freeman
306. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12 (2):162-169
307. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273 (10):5858-5868
308. Rothkamm K, Lobrich M (1999) Misrejoining of DNA double-strand breaks in primary and transformed human and rodent cells: a comparison between the HPRT region and other genomic locations. *Mutat Res* 433 (3):193-205
309. Ikura T, Tashiro S, Kakino A, Shima H, Jacob N, Amunugama R, Yoder K, Izumi S, Kuraoka I, Tanaka K, Kimura H, Ikura M, Nishikubo S, Ito T, Muto A, Miyagawa K, Takeda S, Fishel R, Igarashi K, Kamiya K (2007) DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol* 27 (20):7028-7040
310. Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:159-180
311. Kannan R, Rahing V, Cutler C, Pandrapragada R, Katti KK, Kattumuri V, Robertson JD, Casteel SJ, Jurisson S, Smith C, Boote E, Katti KV (2006) Nanocompatible chemistry toward fabrication of target-specific gold nanoparticles. *J Am Chem Soc* 128 (35):11342-11343
312. Kasamatsu H, Lin W, Edens J, Revel JP (1983) Visualization of antigens attached to cytoskeletal framework in animal cells: colocalization of simian virus 40 Vp1 polypeptide and actin in TC7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4339-4343

313. Ahmed SV, Sajjan R (2009) Chrysiasis: a gold “curse”! *BMJ Case Reports* doi:10.1136/bcr.07.2008.0417
314. Beck RK (2002). Drug reference for EMS providers (auranofin and aurothioglucose side effects & overdose):164-165
315. Auranofin complete list of warnings, precautions and reactions and various inflammations. <http://www.drugs.com/pro/ridaura.html>
316. Aurothioglucose suspension adverse effects. <http://www.healthdigest.org/topics/category/979-aurothioglucose-suspension-dosage-interactions-side-effects-how-to-use>
317. Gold sodium thiomalate: adverse effects including allergy to gold, tolerance to gold decreasing with age, skin and renal complications. http://websquedom.com/med-lib/MED_CD/E_CDs/Focus%20on%20Nursing%20Pharmacology%202000/mg/gold_sodium_thiomalate_%28gold%29.htm
318. Bhumkar DR, Joshi HM, Sastry M, Pokharkar VB (2007) Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharm Res* 24 (8):1415-1426
319. Zhou X, Zhang X, Yu X, Zha X, Fu Q, Liu B, Wang X, Chen Y, Shan Y, Jin Y, Wu Y, Liu J, Kong W, Shen J (2008) The effect of conjugation to gold nanoparticles on the ability of low molecular weight chitosan to transfer DNA vaccine. *Biomaterials* 29 (1):111-117
320. Loo C, Lowery A, Halas N, West J, Drezek R (2005) Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Lett* 5 (4):709-711
321. Liu X, Chen HJ, Chen X, Parinia C, Wen D (2012) Low frequency heating of gold nanoparticle dispersions for non-invasive thermal therapies. *Nanoscale*. doi:10.1039/C2NR30166K

322. El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA (2006) Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett* 239 (1):129-135
323. Weissleder R (2001) A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 19 (4):316-317
324. Pu LS (2001) Ultrafast nonlinear optical response of squarylium dye J-aggregates spincoated films and an application to T bps demultiplexer. *Curr Appl Phys* 1 (4-5):367-370
325. Pu LS (2003) Femtosecond optical switches by squarylium dye J-aggregates films. *Opt Mater* 21 (1-3):489-493
326. Shapiro BI, Kol'tsova ES, Vitukhnovskii AG, Chubich DA, Tolmachev AI, Slominskii YL (2011) Interaction between gold nanoparticle plasmons and aggregates of polymethine dyes: "Invisible" nanoparticles. *Nanotechnologies in Russia* 6 (7-8):456-462
327. Dulkeith E, Ringler M, Klar TA, Feldmann J, Munoz Javier A, Parak WJ (2005) Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression. *Nano Lett* 5 (4):585-589
328. Jennings TL, Singh MP, Strouse GF (2006) Fluorescent lifetime quenching near $d = 1.5$ nm gold nanoparticles: probing NSET validity. *J Am Chem Soc* 128 (16):5462-5467
329. Imahori H, Kashiwagi Y, Endo Y, Hanada T, Nishimura Y, Yamazaki I, Araki Y, Ito O, Fukuzumi S (2004) Structure and photophysical properties of porphyrin-modified metal nanoclusters with different chain lengths. *Langmuir* 20:73-81
330. Gueroui Z, Libchaber A (2004) Single-molecule measurements of gold-quenched quantum dots. *Phys Rev Lett* 93 (16):166108/I-166108/IV
331. Maye MM, Han L, Kariuki NN, Ly NK, Chan WB, Luo J, Zhong CJ (2003) Gold and alloy nanoparticles in solution and thin film assembly: spectrophotometric determination of molar absorptivity. *Anal Chim Acta* 496 (1-2):17-27

332. Kim JY, Lee DH, Kim SJ, Jang DJ (2008) Preferentially linear connection of gold nanoparticles in derivatization with phosphorothioate oligonucleotides. *J Colloid Interface Sci* 326 (2):387-391
333. Nerambourg N, Praho R, Werts MH (2008) Hydrophilic monolayer-protected gold nanoparticles and their functionalisation with fluorescent chromophores. *Int J Nanotechnol* 5:722-740
334. Butron AS, Mirkin CA, Stoeva SI, Lee JS (2007) DNA-functionalized gold nanoparticles as probes in biomolecule detection assays. *Nanoscape* 4 (1):3-9
335. Liu Y, Liu Y, Mernaugh RL, Zeng X (2009) Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay. *Biosens Bioelectron* 24 (9):2853-2857
336. Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q (2007) Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf B Biointerfaces* 58 (1):3-7
337. Law on health care. Official gazette of the Republic of Serbia (2005). Parliament of the Republic of Serbia 107:112-161
338. Fenech M (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 285 (1):35-44
339. Surralles J, Xamena N, Creus A, Marcos R (1995) The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat Res* 342 (1-2):43-59
340. Maye MM, Lim IIS, Luo J, Rab Z, Rabinovich D, Liu TB, Zhong CJ (2005) Mediator-template assembly of nanoparticles. *J Am Chem Soc* 127 (5):1519-1529

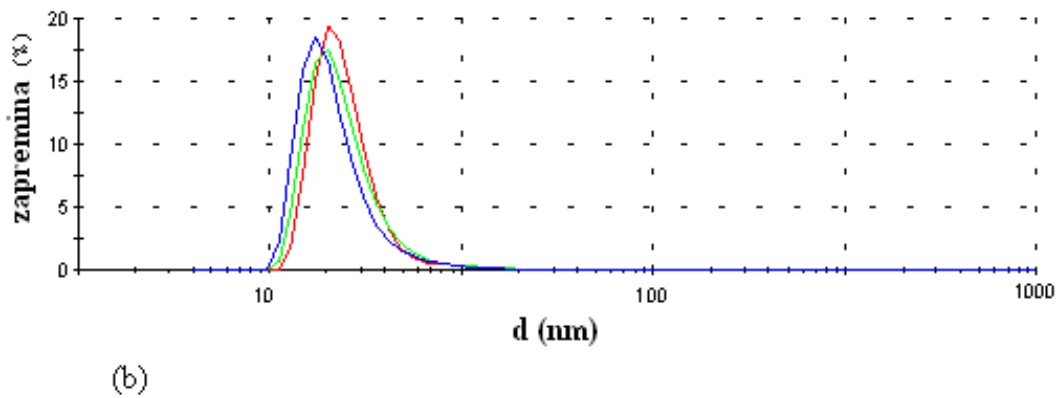
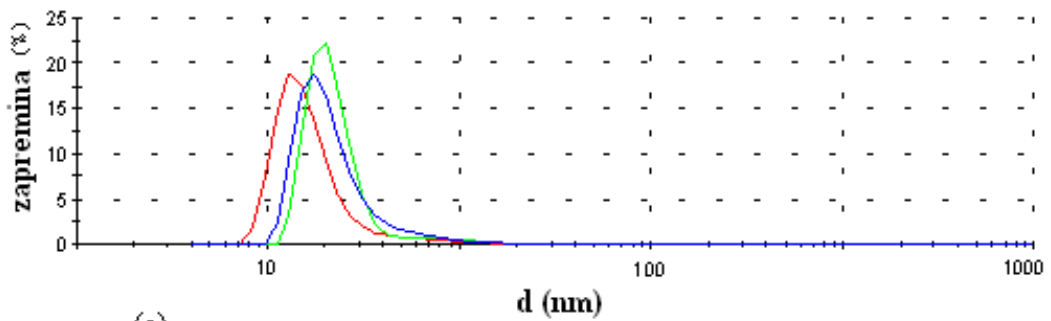
341. Lim IIS, Maye MM, Luo J, Zhong CJ (2005) Kinetic and thermodynamic assessments of the mediator-template assembly of nanoparticles. *J Phys Chem B* 109 (7):2578-2583
342. Link S, El-Sayed MA (1999) Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *J Phys Chem B* 103:4212-4217
343. Zhang FX, Han L, Israel LB, Daras JG, Maye MM, Ly NK, Zhong CJ (2002) Colorimetric detection of thiol-containing amino acids using gold nanoparticles. *Analyst* 127 (4):462-465
344. Sugi M, Lizima S (1980) Anisotropic photoconduction in dye-sensitized Langmuir films. *Thin Solid Films* 68 (1):199-204
345. Iriyama K, Mizutani F, Yoshiura M (1980) Enhancement of photocurrent at a merocyanine-coated electrode due to chromophore aggregation. *Chem Lett* 9 (11):1399-1402
346. Dai Z, Dähne L, Donath E, Möhwald H (2002) Mimicking photosynthetic two-step energy transfer in cyanine triads assembled into capsules. *Langmuir* 18:4553-4555
347. Tani K, Ito C, Hanawa Y, Uchida M, Otaguro K, Horiuchi H, Hiratsuka H (2008) Photophysical property and photostability of J-aggregate thin films of thiacyanine dyes prepared by the spin-coating method. *J Phys Chem B* 112 (3):836-844
348. Achyuthan KE, Achyuthan AM, Brozik SM, Dirk SM, Lujan TR, Romero JM, Harper JC (2012) Plasmonic fluorescent nanocomposites of cyanines self-assembled upon gold nanoparticle scaffolds. *Anal Sci* 28:433-438
349. Inacker O, Kuhn H (1974) Energy transfer from dye to specific singlet or triplet energy acceptors in monolayer assemblies. *Chem Phys Lett* 27 (3):317-321
350. Giersig M, Mulvaney P (1993) Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition. *Langmuir* 9 (12):3408-3413

351. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA (1998) Principles of instrumental analysis. 5th edition, Saunders College Publishing: Philadelphia, PA
352. Everett DH (1988) Basic principles of colloid science. Royal Society of Chemistry: Cambridge, London:45
353. Vodnik VV, Nedeljkovic JM (2000) Influence of negative charge on the optical properties of a silver sol. J Serb Chem Soc 65 (3):195-200
354. Saito K (1999) Quenching of excited J aggregates on metals by surface plasmon excitations. J Phys Chem B 103 (31):6579-6583
355. Ladler KJ (1987) Chemical Kinetics. Harper Collins Publishers, New York
356. Kampmeyer PM (1952) The temperature dependence of viscosity for water and mercury. J Appl Phys 23
357. Korson L, Drost-Hansen W, Millero FJ (1969) Viscosity of water at various temperatures. J Phys Chem 73
358. Watters GP, Smart DJ, Harvey JS, Austin CA (2009) H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 679 (1-2):50-58
359. Liu L, Xu K, Wang H, Tan PKJ, Fan W, Venkatraman SS, Li L, Yang Y-Y (2009) Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent. Nat Nanotechnol 4 (7):457-463

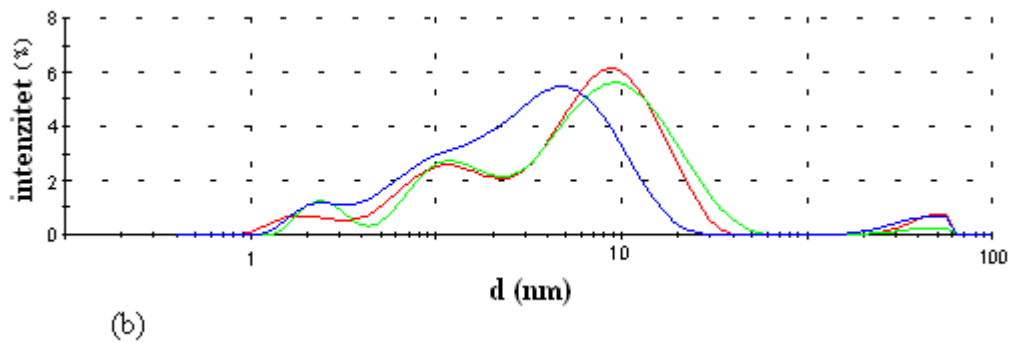
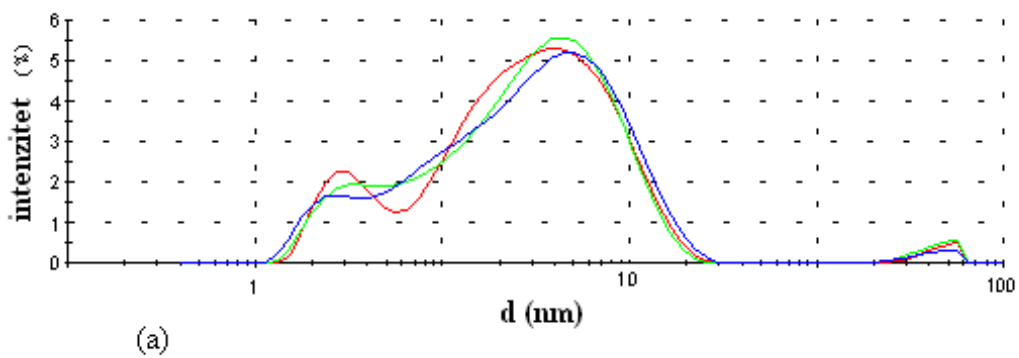
8 Prilozi

8.1 DLS grafici

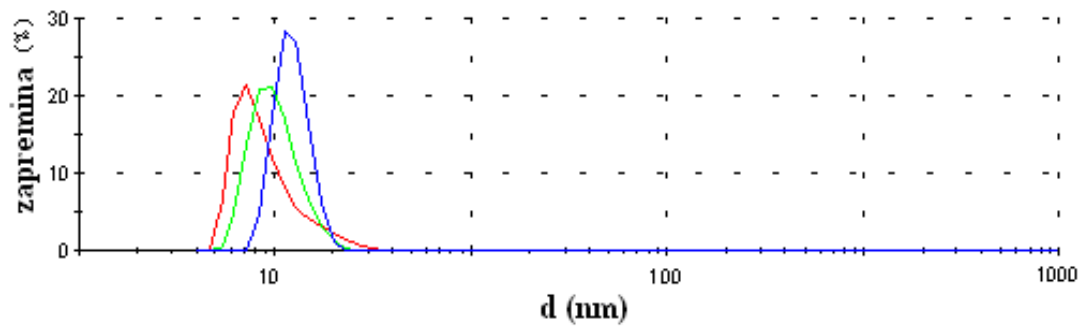
DLS grafici raspodele veličine čestica po zapremini i intenzitetu koloidnih disperzija C9,5, C17 i C30 u odsustvu i prisustvu TC boje.



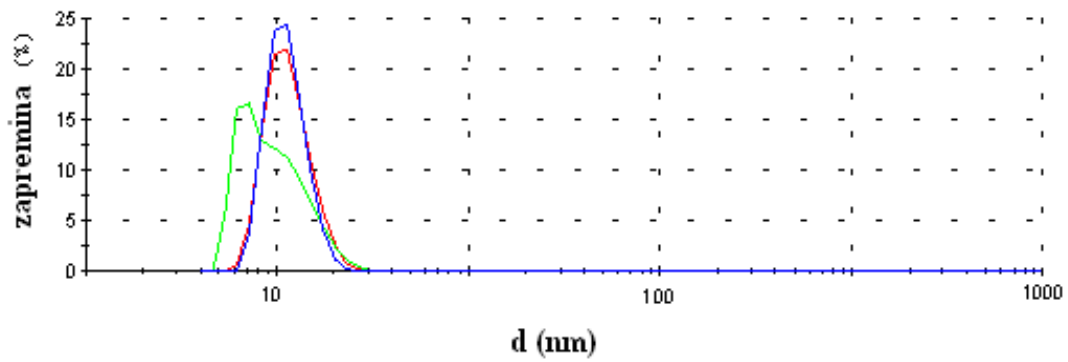
Slika 74. Koloidna disperzija zlata C9,5 (a) i C9,5 sa TC bojom (b), raspodela veličina čestica prema zapremini



Slika 75. Koloidna disperzija zlata C9,5 (a) i C9,5 sa TC bojom (b), raspodela veličina čestica prema intenzitetu

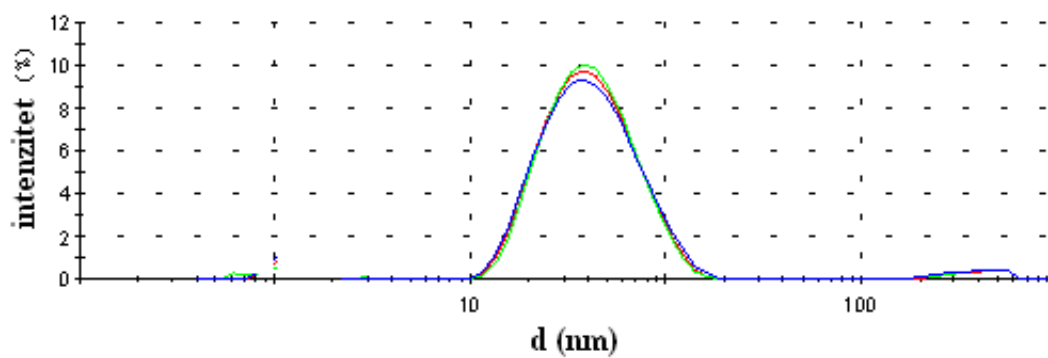


(a)

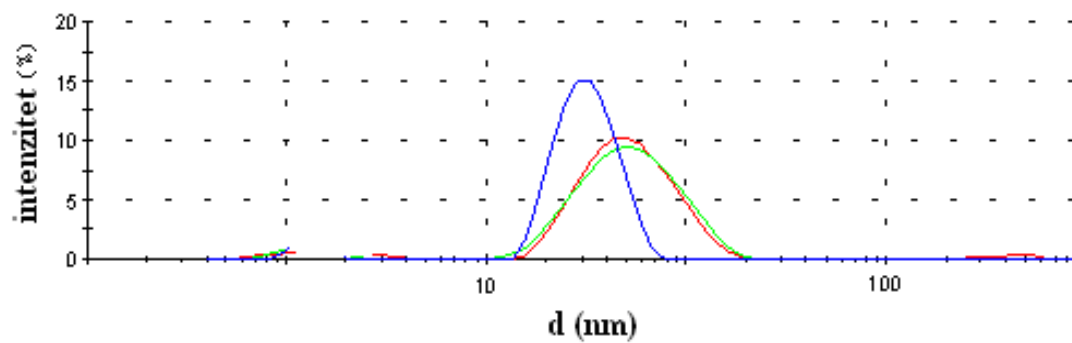


(b)

Slika 76. Koloidna disperzija zlata C17 (a) i C17 sa TC bojom (b), raspodela veličina čestica prema zapremini

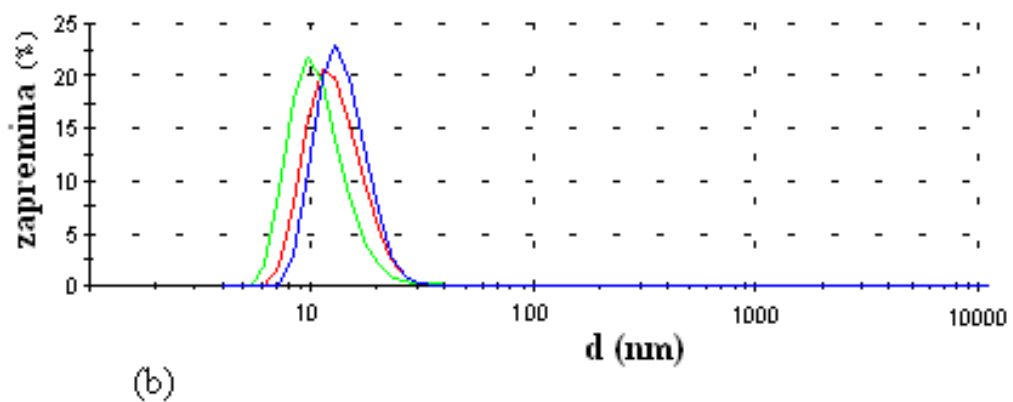
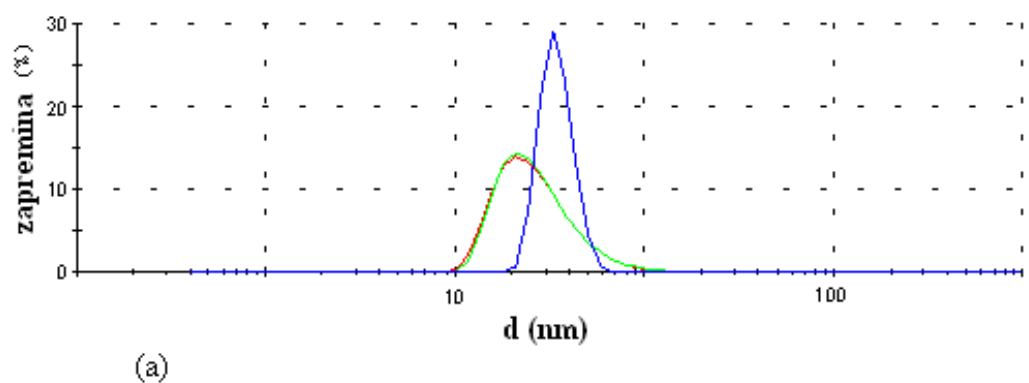


(a)

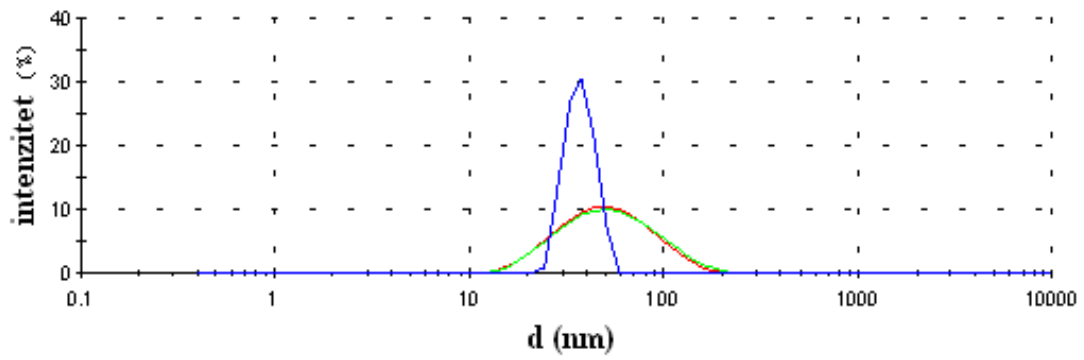


(b)

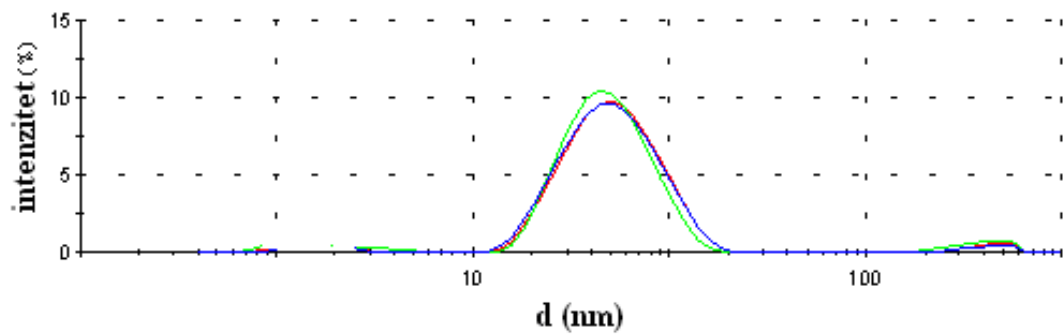
Slika 77. Koloidna disperzija zlata C17 (a) i C17 sa TC bojom (b), raspodela veličina čestica prema intenzitetu



Slika 78. Koloidna disperzija zlata C30 (a) i C30 sa TC bojom (b), raspodela veličina čestica prema zapremini



(a)



(b)

Slika 79. Koloidna disperzija zlata C30 (a) i C30 sa TC bojom (b), raspodela veličina čestica prema intenzitetu

8.2 Zavisnost I od C_{np} (intenziteta fluorescencije slobodne boje u rastvoru od koncentracije nanočestica), jedn. (23)

Iz jednačine (26):

$$K = \frac{\theta_1}{(1-\theta_1) \cdot C_1} \quad (26)$$

sledi da je

$$\theta_1 = \frac{K \cdot C_1}{1 + K \cdot C_1} \quad (27)$$

Ako C_0 predstavlja početnu koncentraciju TC boje, C_1 koncentraciju TC boje u rastvoru a C_{ads} koncentraciju adsorbovane TC boje, onda je $C_1 = C_0 - C_{ads}$.

S obzirom na odnos između koncentracije boje u rastvoru i one adsorbovane na površini nanočestica Au, gde je ukupna korišćena površina nanočestica = (broj nanočestica Au) \times (površina jedne nanočestice) = $(N_0 \cdot C_{NP} \cdot V) \cdot (SA_{NP})$, dobija se da je $N_0 \cdot V \cdot (C_0 - C_1) = N_0 \cdot \theta_1 \cdot \Gamma_0 \cdot (N_0 \cdot C_{NP} \cdot V) \cdot SA_{NP}$, gde je N_0 Avogadrov broj ($6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), V je ukupna zapremina rastvora, a C_{NP} je koncentracija Au. Prema tome, dobija se da je:

$$\theta_1 = \frac{C_0 - C_1}{\Gamma_0 \cdot C_{NP} \cdot N_0 \cdot SA_{NP}} \quad (28)$$

Ako je: $A = \Gamma_0 \cdot C_{NP} \cdot N_0 \cdot SA_{NP}$

$$\theta_1 = \frac{C_0 - C_1}{A}$$

pa je:

$$\frac{C_0 - C_1}{A} = \frac{K \cdot C_1}{1 + K \cdot C_1} \quad (29)$$

Iz jedn. (29) sledi da je:

$$-K \cdot C_1^2 + K \cdot C_1 \cdot (C_0 - A - \frac{1}{K}) + C_0 = 0$$

i deljenjem sa $-K$ se dobija da je:

$$C_1^2 - C_1 \cdot (C_0 - A - \frac{1}{K}) - \frac{C_0}{K} = 0$$

K je veoma veliki broj, pa je $\frac{C_0}{K} \cong 0$

$$C_1^2 - C_1 \cdot (C_0 - A - \frac{1}{K}) = 0 \quad (30)$$

$$C_1 = C_0 - A - \frac{1}{K} = C_0 - \Gamma_0 \cdot C_{NP} \cdot N_0 \cdot SA_{NP} - \frac{1}{K}$$

$$C_1 = -C_{NP} \cdot (\Gamma_0 \cdot SA_{NP} \cdot N_0) + (C_0 - \frac{1}{K}) \quad (31)$$

Ovim je pokazano da je koncentracija boje u rastvoru linearna funkcija koncentracije nanočestica. Kada se dalje uzme u razmatranje zavisnost merenog intenziteta fluorescencije boje od koncentracije, $I = k' \cdot b \cdot C_1$, gde je $k' = 2.3\Phi \cdot P_0 \cdot \varepsilon$, b dužina svetlosnog puta kroz rastvor, ϕ kvantno polje, P_0 snaga upadne svetlosti, i ε molarna apsorptivnost boje, lako se može izvesti jednačina (23):

$$I = (-k' \cdot b \cdot N_0 \cdot \Gamma_0 \cdot SA_{NP}) \cdot C_{NP} + k' \cdot b \cdot (C_0 - \frac{1}{K}) \quad (23)$$

čime je pokazano da je intenzitet fluorescencije slobodne boje u rastvoru linearna funkcija koncentracije nanočestica.

BIOGRAFIJA

Ana Vujačić je rođena 30.03.1980. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i XIII beogradsku gimnaziju. Školske 1999/00. godine upisala je Hemijski fakultet i diplomirala 16.03.2005. godine, na smeru neorganska hemija. Od januara 2006. godine zaposlena je kao istraživač u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“ a školske 2005/06. godine upisala je poslediplomske studije na Hemijskom fakultetu, odsek neorganska hemija. U julu 2006. godine u okviru studijskog boravka u Sloveniji, Mariboru bila je učesnik letnje škole - SENARC (Slovenian European Natural Research Centre) Summer School. U julu 2008. godine boravila je, u okviru projektnih zadataka, na Institutu za medicinsku fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Lajpcigu, Nemačka, gde se obučavala za rad na savremenim uređajima (MALDI-TOF MS, zeta sizer, FTIR). Jula 2009. stekla je zvanje magistra hemijskih nauka, odbranivši tezu pod naslovom „Reakcije kompleksnog jona $[\text{AuCl}_4]^-$ sa L-metioninom i analognim biomolekulima: mehanizam supstitucije i redukcije“. Školske 2009/10. godine upisala je doktorske studije na Hemijskom fakultetu, odsek neorganska hemija. Rezultati dela ove doktorske teze su publikovani kao dva rada u vodećim časopisima međunarodnog značaja (The Journal of Physical Chemistry C i Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures) i saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampanog u izvodu (1), kao i na skupu nacionalnog značaja štampanog u izvodu (1).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Vujačić Ana

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Kinetika i mehanizam adsorpcije natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil)benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1-sulfonata na koloidne čestice zlata različitih svojstava i veličine

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.07.2012

Vujačić Ana

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ana Vujačić

Број уписа _____

Студијски програм opšta i neorganska hemija

Наслов рада Kinetika i mehanizam adsorpcije natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil) benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1-sulfonata na koloidne čestice zlata različitih svojstava i veličine

Ментор Prof. dr Sofija Sovilj i dr Vesna Vasić

Потписани Vujačić Ana

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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.

Потпис докторанда

У Београду, 09.07.2012.

Vujačić Ana

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Kinetika i mehanizam adsorpcije natrijum-(Z)-3-(5-hlor-2-((5-hlor-3-(3-sulfonatopropil) benzotiazol-2(3H)-iliden)metil)benzotiazol-3-ium-3-il)propan-1-sulfonata na koloidne čestice zlata različitih svojstava i veličine

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 09.07.2012.

Потпис докторанда

Вујковић Ана