



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET  
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**TERMODINAMIČKA STABILNOST  
ODABRANIH MICELARNIH SISTEMA ŽUČNIH SOLI  
ZNAČAJNIH ZA NOVE FARMACEUTSKE FORMULACIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:  
**Prof. dr Mihalj Poša**  
**Doc. dr Ana Pilipović**

Kandidat:  
**Kosta Popović**

Novi Sad, 2017. godine

## **Zahvalnica**

*Zahvaljujem se svojim mentorima, prof. dr Mihalju Poši i doc. dr Ani Pilipović, na nesebičnoj pomoći i požrtvovanom zalaganju koje je bilo presudno za nastanak ove disertacije.*

*Zahvaljujem se prof. dr Mariji Sakač na korisnim sugestijama i izdvojenom vremenu tokom izrade doktorata, kao i doc. dr Milici Atanacković Krstonošić i doc. dr Vesni Tepavčević na pomoći i korisnim savetima. Dugujem zahvalnost prof. dr Veljku Krstonošiću i doc. dr Božani Nikolić na predusretljivosti i razumevanju.*

*Zahvaljujem se prijateljima i kolegama, asistentima dr Ziti Agatić Farkaš i dr Dejanu Ćirinu, na velikom trudu koji su uložili prilikom naše saradnje.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem porodici i roditeljima, Jovanu i Vesni, koji su uvek bili nezamenjiv oslonac i podrška, tokom celog mog života, i posebno tokom izrade ovog rada.*

*Kosta Popović*

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Kosta Popović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Mihalj Poša Doc. dr Ana Pilipović
Naslov rada: NR	Termodinamička stabilnost odabranih micelarnih sistema žučnih soli značajnih za nove farmaceutске formulacije
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	Srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 7 / stranica 119 / slika 52 / referenci 127 / priloga 1)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Farmacija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	površinski aktivne materije; žučne kiseline i soli; micelle; termodinamika; polisorbati; fizička hemija
UDK	661.185:615.011 547.93.03/.04
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Da bi se dobio sistem surfaktanata željenih osobina moguće je hemijski modifikovati već postojeće molekule površinski aktivnih supstanci, a druga mogućnost je konstrukcija binarnih smeša surfaktanata. U farmaceutskoj i prehrambenoj industriji uveliko se primenjuju binarne smeše površinski aktivnih molekula. Ukoliko je binarna mešovita micela termodinamički stabilnija od hipotetičke idealne binarne mešovite micelle, onda je kritična micelarna koncentracija binarne smeše surfaktanata niža čak i od hidrofobnije gradivne jedinice mešovite micelle, što znači da je za isti efekat površinske aktivnosti potrebna manja količina binarne smeše nego čistog surfaktanta. Različite gradivne jedinice binarne micelle u micelarnoj pseudofazi mogu formirati specifične regije koje mogu vezivati lekove određenih strukturnih karakteristika. Pogodno je da jedna gradivna jedinica bude krute konformacije, npr. soli žučnih kiselina, dok je druga gradivna jedinica konformaciono pokretljiva (ugljovodonični nizovi iznad C10). Na taj način se povećava zapremina hidrofobne micelarne faze u odnosu na zapreminu hidrofobne micelarne faze monokomponentne micelle</p>

	<p>konformaciono krutog surfaktanta, što povećava solubilizacioni kapacitet mešovite micela u odnosu na monokomponentnu micelu krutog surfaktanta. Povećanjem dužine ugljovodoničnog niza konformaciono pokretnog surfaktanta povećava se stepen unutrašnje pokretljivosti u hidrofobnom domenu mešovite micela, što takođe povećava verovatnoću prihvatanja molekula gosta. Micelarni sistemi, kako monokomponentnih micela tako i binarnih mešovitih micela dodatno se mogu termodinamički stabilizovati povećanjem jonske jačine rastvora. Za hidrataciju katjona troše se molekuli vode iz sistema, što povećava efekat desolvatizacije hidrofobne površine surfaktanta, pa se zbog toga pospešuje samoasocijacija.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>24.09.2015.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik:  član:  član:  član:  član:</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF MEDICINE**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Kosta Popović
Mentor: MN	PhD Mihalj Poša, associate professor PhD Ana Pilipović, assistant professor
Title: TI	Thermodynamic stability of selected bile salt micellar systems relevant for new pharmaceutical formulations
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng./ srb.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LG	Vojvodina
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Medical Faculty, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	(number of chapters 7 / pages 119 / pictures 52 / references 127 / additions 1)
Scientific field: SF	Medical science
Scientific discipline: SD	Pharmacy
Subject, key words: SKW	Surface-Active Agents; Bile Acids and Salts; Micelles; Thermodynamics; Polysorbates; Chemistry, Physical
UC	661.185:615.011 547.93.03/.04
Holding data: HD	Library of Medical faculty, Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	To obtain the surfactant system with the desired properties it is possible to chemically modify existing molecules of surface active agents. The other possibility is the construction of binary mixtures of surfactants. Binary mixtures of surface active molecules are widely used In the pharmaceutical and food industry. If the binary mixture micelle is more thermodynamically stable than the hypothetical ideal binary mixed micelle, then the critical micellar concentration (CMC) of the binary mixture of surfactants is even lower than the CMC of the more hydrophobic building block of the binary mixture. That means that for the same effect of surface activity less the amount of the binary mixture than the pure surfactants is required. The different building blocks of binary micelles in micelar pseudophase can form specific regions that can bind drugs of certain structural characteristics. It is suitable that one building block is of a rigid conformation, i.e. bile acid salts, while the second building block is of a flexible conformation (above C10 hydrocarbon arrays). In this way the volume of the hydrophobic micellar phase is increased in relation to the

	<p>volume of the hydrophobic micellar phase of the monocomponent micelles of conformationally rigid surfactant, which increases the capacity of solubilisation of the mixed micelles, compared to the mono-component surfactant micelle of the rigid conformation. By increasing the length of the hydrocarbon array of the the conformational flexible surfactant, the degree of internal mobility in the hydrophobic domain of mixed micelles is also increased, which also increases the likelihood of acceptance of guest molecules. Micellar systems, of both monocomponent micelles and mixed micelles can be additionally thermodynamically stabilized by increasing the ionic strength of the solution. The hydration of cations uses the molecules of water from the system, which increases the effect of desolvatisation of the hydrophobic surface of the surfactants, and therefore promotes self-association.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>24<sup>th</sup> September 2015</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president:  member:  member:  member:  member:</p>



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Surfaktanti</b> .....	<b>10</b>
2.1.1. Žučne kiseline i njihove soli.....	11
2.1.2. Polisorbati .....	14
2.1.3. Triton X-100.....	17
<b>2.2 Monokomponentne micelle i faktori koji utiču na micelizaciju</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 Binarne mešovite micelle i faktori koji utiču na micelizaciju</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4 Binarne mešovite micelle i teorija fazne separacije</b> .....	<b>28</b>
<b>2.5 Hofmeister-ov efekat</b> .....	<b>43</b>
<b>3. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>50</b>
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	<b>52</b>
<b>4.1 Materijal</b> .....	<b>52</b>
<b>4.2 Metode</b> .....	<b>52</b>
4.2.1. Spektrofluorimetrija .....	52
4.2.2. Titracija .....	53
4.2.3. Određivanje slobodne količine kontra jona .....	55
4.2.4. Termometrijska titracija .....	55
4.2.5. Nuklearna Overhauser-ova spektroskopija (Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy - NOESY).....	55
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	<b>56</b>
<b>5.1. Binarne mešovite micelle polisorbata (Tween 20 i Tween 60) i žučnih soli (Naholata odnosno Na-hiodeoksiholata): RST i promena pKa vrednosti micelarne žučne kiseline – novi pristup proceni stabilnosti mešovitih micela</b> .....	<b>56</b>
<b>5.2. Binarne mešovite micelle Tritona X-100 i izabranih žučnih soli: termodinamička stabilizacija i pKa vrednosti žučnih kiselina u obliku micelle</b> .....	<b>67</b>
5.2.1. Dodatna Gibbs-ova energija (koeficijent interakcije) binarne mešovite micelle i konformacione razlike između steroidnog skeleta hiodeoksiholne i holne kiseline .....	67
5.2.2. pKa vrednosti žučnih kiselina i termodinamička stabilizacija realnih binarnih mešovitih micela sa Tritonom X-100 .....	82
<b>5.3. Hofmeister-ov efekat</b> .....	<b>87</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>98</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>100</b>
<b>8. PRILOG</b> .....	<b>110</b>

## 1. UVOD

Surfaktanti se ponekad nazivaju površinski aktivne materije, koje sadrže hidrofobnu grupu (ugljovodonični niz) i hidrofilnu grupu (polarna glava) u istom molekulu surfaktanta [1-3]. U vodenim rastvorima, molekuli surfaktanta počinju da se grupišu i formiraju micela u koncentraciji koja se zove kritična micelarna koncentracija (CMC), koja predstavlja jedan od najvažnijih fizičkih parametara surfaktanta. Osobine kao provodljivost, viskoznost, osmotski pritisak, gustina, polarnost, specifična toplota, indeks refrakcije i moć solubilizacije značajno variraju kada je koncentracija surfaktanta veća ili manja od njegove CMC. Studije i industrijske primene surfaktanta zasnovane su uvek na vrednosti CMC. Isto tako, formiranje micela omogućava emulzifikaciju, solubilizaciju i disperziju [4-8].

Da bi se dobio sistem surfaktanta željenih osobina moguće je hemijski modifikovati već postojeće molekule površinski aktivnih supstanci, a druga mogućnost je konstrukcija binarnih smeša surfaktanta [9, 10]. U farmaceutskoj i prehrambenoj industriji uveliko se primenjuju binarne smeše površinski aktivnih molekula. Naime, ukoliko je binarna mešovita micela termodinamički stabilnija od hipotetičke idealne binarne mešovite micela, onda je kritična micelarna koncentracija [11, 12] binarne smeše surfaktanta niža čak i od hidrofobnije gradivne jedinice mešovite micela, što znači da je za isti efekat površinske aktivnosti potrebna manja količina binarne smeše nego čistog surfaktanta [13-18]. Različite gradivne jedinice binarne micela u micelarnoj pseudofazi mogu formirati specifične regije koje mogu vezivati lekove određenih strukturnih karakteristika [19]. Pogodno je da jedna gradivna jedinica bude krute konformacije, npr. soli žučnih kiselina, dok je druga gradivna jedinica konformaciono pokretljiva (ugljovodonični nizovi iznad C10) [9, 20]. Na taj način se povećava zapremina hidrofobne micelarne faze u odnosu na zapreminu hidrofobne micelarne faze monokomponentne micela konformaciono krutog surfaktanta, što povećava solubilizacioni kapacitet mešovite micela u odnosu na monokomponentnu micelu krutog surfaktanta. Povećanjem dužine ugljovodoničnog niza konformaciono pokretnog surfaktanta povećava se stepen unutrašnje pokretljivosti u hidrofobnom domenu mešovite micela, što takođe povećava verovatnoću prihvatanja molekula gosta. Micelarni sistemi, kako monokomponentnih micela, tako i binarnih mešovitih micela, dodatno se mogu

termodinamički stabilizovati povećanjem jonske jačine rastvora. Naime, za hidrataciju katjona troše se molekuli vode iz sistema, što povećava efekat desolvatizacije hidrofobne površine surfaktanata, te se zbog toga pospešuje samoasocijacija.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1 Surfaktanti

Surfaktanti su molekuli koji u svojoj strukturi imaju hidrofobni i hidrofilni deo – amfifilni molekuli. Surfaktanti u vodenom rastvoru iznad određene koncentracije – kritične micelarne koncentracije (CMC), formiraju micelle, agregate sa unutrašnjim hidrofobnim domenom i spoljašnjim hidrofilnim slojem [21-23].

Deterdženti koji se koriste u biomedicinskim laboratorijama su blagi surfaktanti (površinski aktivne materije), koriste se za razgradnju ćelijskih membrana (citoliza) i oslobađanje unutarćelijskih sastojaka u rastvorni oblik. Deterdženti razbijaju asocijacije između proteina i lipida, denaturišu proteine i druge makromolekule, sprečavaju nespecifično vezivanje u imunohemijskim testovima i kristalizaciju proteina [24].

Postoje mnoge vrste deterdženata. Novi deterdženti za posebne namene stalno se razvijaju [25]. Deterdženti su organska jedinjenja koja se sastoje od hidrofobnog ugljovodoničnog ostatka i hidrofilne polarne glave. Kada se rastvore u vodi u određenoj koncentraciji i temperaturi, molekuli deterdženta formiraju micelle, sa hidrofobnim delom u unutrašnjosti micelle i polarnom glavom ka spoljašnjosti micelle. Hidrofobni domen micelle vezuje se za hidrofobne regije molekula proteina. Broj molekula deterdženta u miceli je agregacioni broj, koji predstavlja važan parametar za procenu rastvorljivosti proteina membrane [26].

Stepen hidrofobnosti je direktno proporcionalan dužini hidrofobne regije i konstantan je za svaku grupu deterdženata, dok je naelektrisana polarna glava promenljiva. Na osnovu svojih osobina, najčešće korišćeni deterdženti se dele u tri grupe: jonski (anjonski ili katjonski), cviterjonski i nejonski. Najniža koncentracija deterdženta na kojoj se mogu detektovati micelle (u koncentracijama u kojima ih instrumentalnim metodama možemo detektovati) na određenoj temperaturi naziva se kritična micelarna koncentracija (CMC). Na

koncentracijama nižim od CMC, postoje samo monomeri; na koncentracijama većim od CMC postoje i micelle i monomeri, zajedno sa drugim nemicelarnim fazama koje nisu rastvorljive u vodi. Svi novi dodati monomeri iznad CMC formiraju micelle. Isto tako, najniža temperatura na kojoj se formiraju micelle se zove kritična micelarna temperatura (CMT). I temperatura i koncentracija su važni parametri razdvajanja faza i rastvorljivosti deterdženta. Step en lipofilnosti polarne glave takođe takođe utiče na CMC deterdženta. Najčešće niska lipofilnost ili lipofobnost polarne glave uzrokuje visoku CMC.

Jonski deterdženti se sastoje od hidrofobnog niza i naelektrisane polarne glave, koja može biti anjon ili katjon. Oni najčešće imaju veću CMC vrednost od nejonskih deterdženata. Zbog naelektrisanja polarnih glava, jonski deterdženti ne mogu da se uklone jonoizmenjivačkom hromatografijom.

Nejonski deterdženti imaju nenaelektrisane i hidrofilne glave. Smatraju se blagim površinski aktivnim sredstvima, zato što prekidaju veze između proteina i lipida, međusobne veze lipida, ali ne i međusobne veze proteina. Većina nejonskih deterdženata ne denaturiš e proteine. Stoga, proteini se solubilizuju i izoluju u svom izvornom i aktivnom obliku, zadržavajući proteinske interakcije. Nejonski deterdženti su poželjni za izolaciju membranskih proteina.

### **2.1.1. Žučne kiseline i njihove soli**

Žučne soli su steroidni biosurfaktanti. Pošto žučne soli, za razliku od klasičnih surfaktanata (polarna glava – hidrofobni rep), u pogledu hidrofobnosti imaju dve različite površine steroidnog skeleta, nazivaju se biplanarnim amfifilima za koje je poznato da grade relativno male micelle (agregacioni broj od 2 do 15). Žučne soli imaju primenu u farmakologiji i farmaciji (modulatori permeabilnosti, metabolički regulatori, solubilizatori, transportni promotori, itd.). Anjoni žučnih kiselina u svojim monokomponentnim micelima imaju takve strukturne karakteristike koje omogućavaju vezivanje npr. holesterola, steroidnih lekova, morfin-hidrohlorida (depo efekat). Međutim, zbog male veličine micelle imaju slab kapacitet prihvatanja molekula gosta. Stoga je u pogledu njihove primene u farmaceutskoj industriji potrebno povećati hidrofobnu fazu njihovih micela. Ovo se može postići primenom nejonskih surfaktanata klasične strukture [22, 27-37].

Žučne kiseline su steroidna jedinjenja koja kao amfifilni molekuli imaju fiziološku ulogu u micelarnoj solubilizaciji lipida (ovo se može upotrebiti pri solubilizaciji hidrofobnih lekova) u toku varenja i regulaciji biosinteze – homeostaze holesterola, a učestvuju i u velikom broju metaboličkih puteva. Osobine žučnih kiselina u velikoj meri određuje geometrija molekula 5  $\beta$ -holanske kiseline na čijem skeletu se razlikuje konveksna,  $\beta$  strana koja je nepolarna i konkavna,  $\alpha$  površina koja je polarna (Slika 2.1).

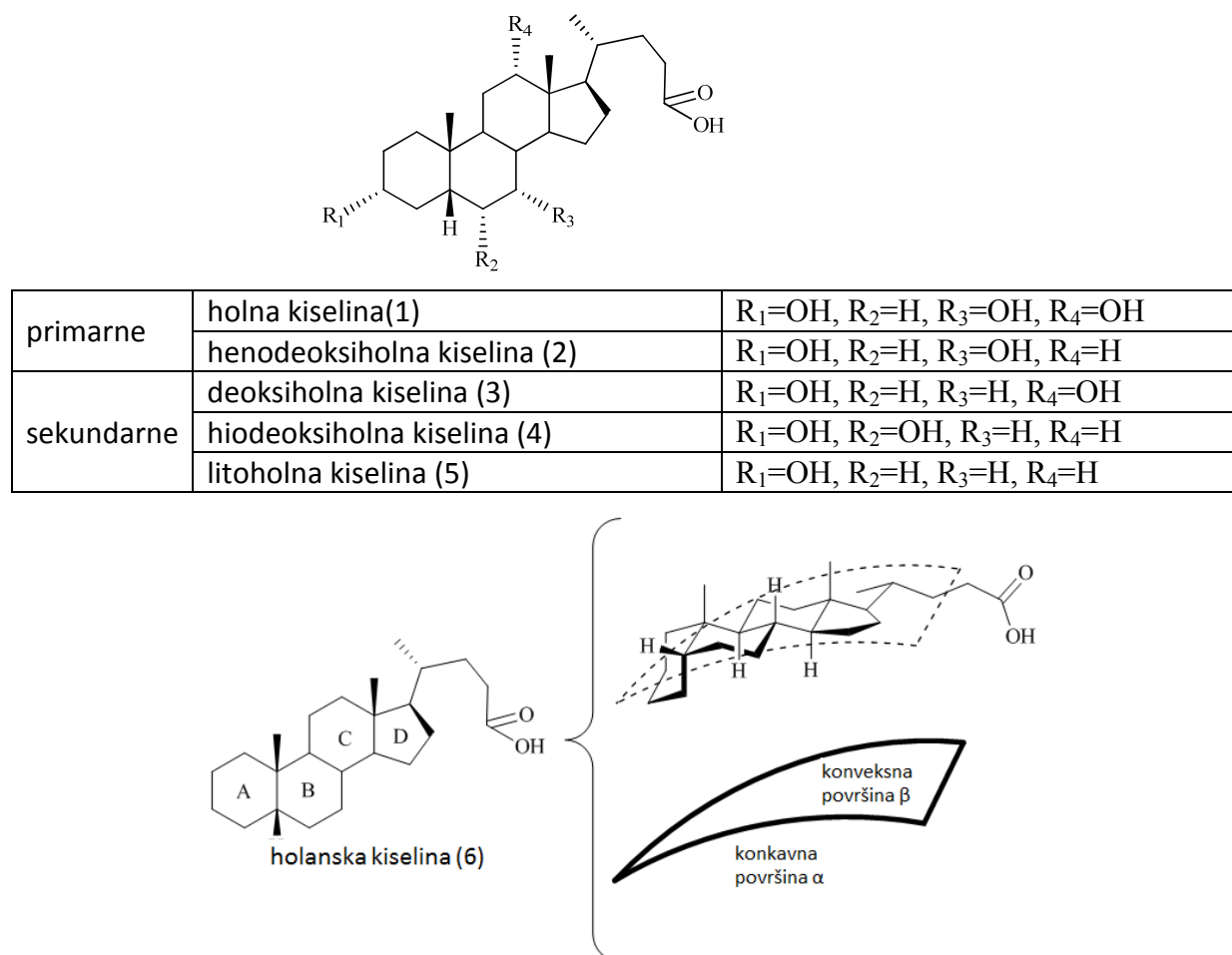
Žučne kiseline imaju sposobnost samoasocijacije. Razlog zbog kog dolazi do njihove uzajamne asocijacije u agregate, poznate kao micide, je to što im je rastvorljivost u vodi ograničena nepogodnim interakcijama njihovih nepolarnih delova sa rastvaračem.

Ispitivanje hidrofobnosti unutrašnjeg domena micela žučnih kiselina može se vršiti micelarnom solubilizacijom probnim molekulom, fenobarbitonom, koji ima tendenciju ulaska u hidrofobnu sredinu.

Žučne kiseline su amfifilni molekuli, spadaju u posebnu grupu amfifilnih jedinjenja jer umesto uobičajene strukture molekula površinski aktivnih materija, u molekulu žučne kiseline ne postoji polarna glava i nepolarni rep, već umesto toga postoji polarna i nepolarna strana molekula. Žučne kiseline, pored dobro poznatih fizioloških uloga kao što je micelarna solubilizacija lipida u toku varenja i regulacije biosinteze (homeostaze) holesterola, učestvuju i u velikom broju metaboličkih puteva kao regulatori (modulatori) nuklearnih receptora (farnesoid X (FXR)); membranskih receptora (G-protein-coupled receptors (GPCRs)); jonskih kanala, itd, što u novije vreme daje sve veću primenu analoga žučnih kiselina kao terapijika u metaboličkim poremećajima (dijabetes tipa 2, gojaznost, hipertenzija itd.) [29, 38-43]. Žučne kiseline su u fiziološkim uslovima jonizovane. Stepem vezivanja žučnih kiselina za receptore, jonske kanale, kao i njihova efikasnost u solubilizaciji lipida (hidrofobnih lekova) značajno zavise od odnosa njihove hidrofobne i hidrofilne površine [30, 44-46]. Membranotoksičnost žučnih kiselina određena je njihovom hidrofobnošću [30, 47]. Okso derivati žučnih kiselina pokazuju manju toksičnost od njihovih hidroksi analoga [30, 31], kao i promotorno delovanje u transportu nekih lekova kroz lipofilne barijere u organizmu (npr. krvna moždana barijera) [32, 48-54].

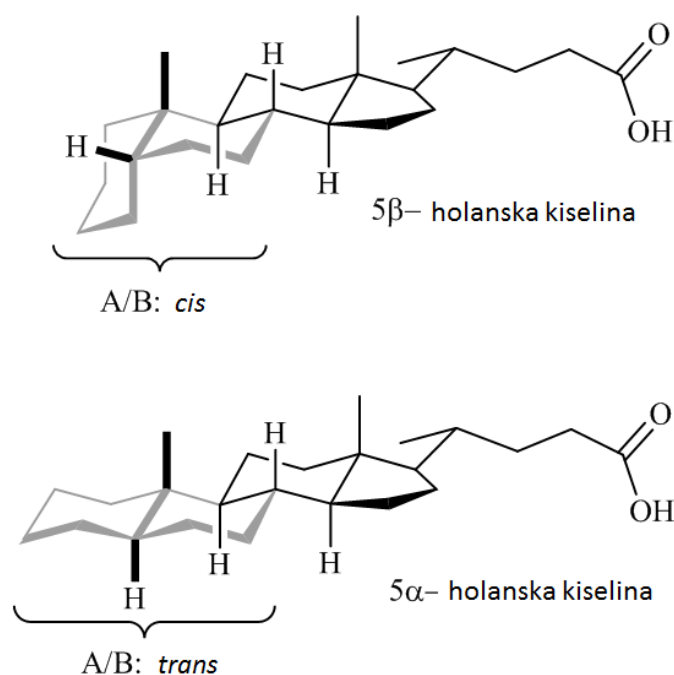
Žučne kiseline poseduju skelet ciklopentanoperhidrofenantrena sa 24 atoma ugljenika. Žučne kiseline enzimski proizvedene u jetri čoveka su primarne žučne kiseline

(holna (1) i henodeoksiholna kiselina (2)) iz kojih se u crevnoj flori kolona bakterijskom transformacijom dobijaju sekundarne žučne kiseline (deoksiholna kiselina (3), hiodeoksiholna kiselina (4) i litholna kiselina (5)). Primarne i sekundarne žučne kiseline su hidroksi derivati 5 $\beta$ -holanske kiseline (6) (Slika 2.1.)[29, 38, 55-57].



Slika 2.1. Struktura primarnih i sekundarnih žučnih kiselina

Prsten A i B holanske kiseline mogu biti cis ili trans povezani (Slika 2.2.). U većini slučajeva, A i B prsten su cis povezani, i tada se radi o 5 $\beta$ -holanskoj kiselini. Kada su A i B prsten trans povezani dobijaju se žučne kiseline koji su OH derivati 5 $\alpha$ -holanske kiseline (alo), diastereoizomera 5 $\beta$ -holanske kiseline, koji su pronađeni kod nekih vrsta guštera [29, 55]. Geometrija molekula 5 $\beta$ -holanske kiseline određuje osobine žučnih kiselina. Na steroidnom skeletu molekula 5 $\beta$ -holanske kiseline razlikuju se konveksna  $\beta$  i konkavna  $\alpha$  površina [44]. Konveksna površina veća je od konkavne površine, što je od značaja pri ispitivanju hidrofobnosti molekula u zavisnosti od orijentacije hidroksilnih i okso grupa [44, 58, 59].



Slika 2.2. 5 $\beta$ -holanska kiselina i njen diastereoizomer 5 $\alpha$ -holanska kiselina

Različita istraživanja pokazala su da je konkavna površina ( $\alpha$ ) steroidnog skeleta žučnih kiselina polarna (hidrofilna), a konveksna površina ( $\beta$ ) nepolarna (hidrofobna). Ovo se objašnjava time što su hidroksilne grupe žučnih kiselina najčešće orijentisane prema  $\alpha$  strani steroidnog skeleta, a pri tom angularne aksijalne metil grupe sa C10 i C13 imaju  $\beta$  orijentaciju. Ove grupe daju konkavnoj površini ( $\alpha$ ) steroidnog skeleta žučnih kiselina njenu polarnost (hidrofilnost), dok je konveksna površina ( $\beta$ ) nepolarna (hidrofobna). Prisustvo i hidrofobne i hidrofilne regije u molekulu žučnih kiselina označava se kao amfifilnost. Karboksilna grupa je pri fiziološkim uslovima jonizovana, pa žučne kiseline u biohemijским sistemima spadaju u jonske amfifile [38, 43, 47, 60, 61].

### 2.1.2. Polisorbati

Polisorbati (komercijalni naziv *Tween*) su klasa nejonskih površinski aktivnih supstanci koje su po strukturi estri masnih kiselina i polietilenglikolovanih sorbitola. Zbog relativne stabilnosti i netoksičnosti imaju široku primenu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, odnosno u industriji hrane [27, 62].

Imaju veoma nizak CMC i najčešće su blagi surfaktanti, oni ne utiču na aktivnost proteina i efikasni su u solubilizaciji. Najčešće se koriste kao agensi za ispiranje u imunologiji, sprečavaju nespecifično vezivanje antitela i otklanjaju nevezane grupe [24].

Polisorbati su nejonski surfaktanti koji za hidrofobni segment imaju ostatke masnih kiselina C12-C18. Produžavanjem i povećanjem broja hidrofobnih segmenata opada njihova kritična micelarna koncentracija i povećava se veličina micela [10]. Polisorbati imaju relativno široku primenu od prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije pa do petrohemijske industrije [62].

Polisorbati su klasa emulgatora koji se koriste u nekim farmaceutskim preparatima i prehrambenim proizvodima. Oni se često koriste u kozmetici da solubilizuju etarska ulja u proizvodima na bazi vode. Polisorbati su uljaste tečnosti izvedene iz sorbitana (derivata sorbitola) i etilen oksida, esterifikovane sa masnim kiselinama. Uobičajeni registrovani nazivi za polisorbate uključuju Scattics, Alkest, Canarcel i Tween [63].

Broj 20 iza naziva "polioksietilen" označava ukupan broj oksietilenskih grupa -  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$  - koje se nalaze u molekulu. Broj koji se nalazi iza naziva "polisorbat" odnosi se na vrstu masne kiseline vezane za polioksietilen sorbitanski deo molekula. Monolaurat se označava sa 20, monopalmitat sa 40, monostearat sa 60, a monooleat sa 80.

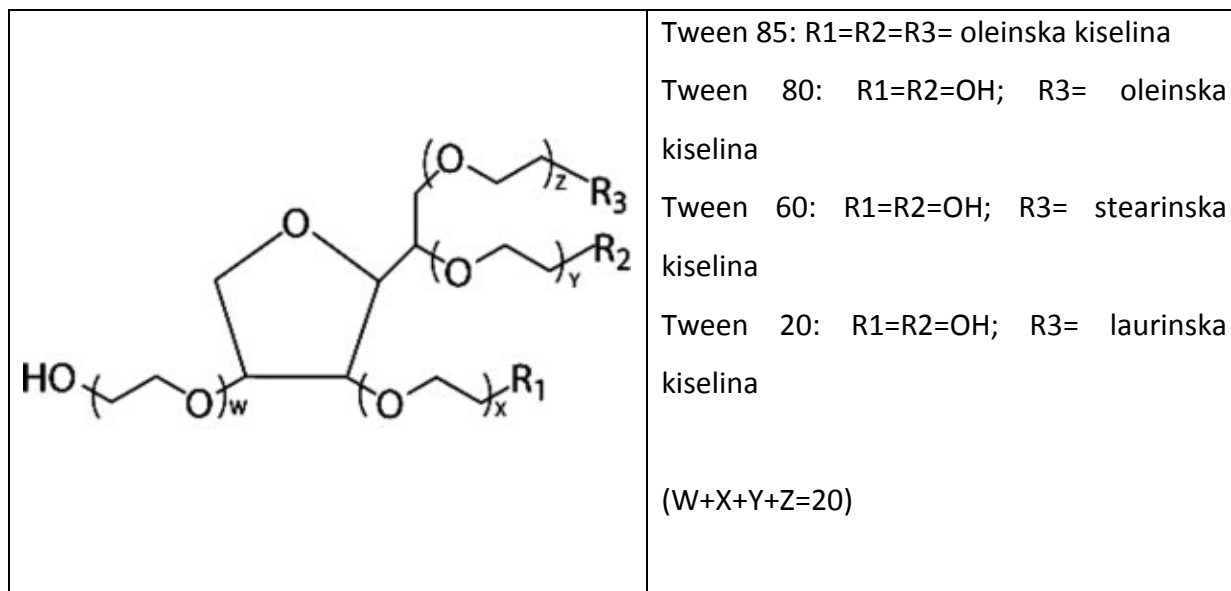
Polisorbati 20 i 80 (Tween 20 i Tween 80) koriste se u formulaciji bioterapeutskih proizvoda, za prevenciju površinske adsorpcije i kao stabilizatori koji sprečavaju agregaciju proteina. Polisorbati su amfipatički, nejonski surfaktanti sastavljeni od estara masnih kiselina i polioksietilen sorbitana. Polisorbat 20 predstavlja polioksietilen sorbitan monolaurat, a polisorbat 80 predstavlja polioksietilen sorbitan monooleat. Polisorbati koji se koriste u formulaciji biofarmaceutika su smeše različitih estara masnih kiselina sa udelom frakcije monolaurata (polisorbat 20) od 40 do 60%, dok frakcija monooleata (polisorbat 80) čini više od 58% smeše [64].

Razvijene su analitičke metode za određivanje polisorbata 60 (Tween 60) u raznim prehrambenim proizvodima. Većina ovih metoda podrazumeva ekstrakciju polisorbata 60 iz uzorka pomoću odgovarajućeg rastvarača gravimetrijskom metodom. Sve ove metode su dizajnirane tako da se eliminiše interferencija sa drugim sastojcima u hrani, tako da su slepe probe nepotrebne [65].

Polioksietilen sorbitan estri masnih kiselina (polisorbati ili Tween-ovi) su nejonski surfaktanti koji se često koriste kao deterdženti i emulgatori. Međutim, Tween-ovi se takođe



koriste u citolizi ćelija, izolaciji nukleinskih kiselina i frakcionisanju ćelija. Ovi surfaktanti su netoksični i poseduju veoma kompatibilan skup fizičkih osobina koje omogućavaju široku primenu zajedno sa drugim surfaktantima. Na primer, Tween-ovi se koriste sa proteinima za stabilizaciju pene u prehrambenoj industriji [66-71]. Hemijski nazivi i hemijske formule niza Tween surfaktanata dati su u Tabeli 2.1., i njihove strukture prikazane su na Slici 2.3. [72-75].



Slika 2.3. Strukturna formula Tween niza surfaktanata

Tabela 2.1. Struktura Tween niza surfaktanata (Izvor: [76])

Surfaktant	Hemijski naziv	Hemijska formula (R)	n	w+x+y+z
Tween 20	Polioksietilen (20) Sorbitanmono-laurat	$C_nH_{2n+1}$	11	20
Tween 21	Polioksietilen (4) Sorbitanmono-laurat	$C_nH_{2n+1}$	11	4
Tween 40	Polioksietilen (20) Sorbitanmono-palmitat	$C_nH_{2n+1}$	15	20
Tween 60	Polioksietilen (20) Sorbitanmono-stearat	$C_nH_{2n+1}$	17	20
Tween 80	Polioksietilen (20) Sorbitanmono-oleat	$C_nH_{2n+1}$	17	20

### 2.1.3. Triton X-100

Triton X-100 je takođe nejonski surfaktant sa 4- (1,1,3,3-tetrametilbutil) -fenilnom grupom kao hidrofobnim segmentom i polioksietilenskom grupom kao hidrofilnim segmentom. Triton je uobičajni surfaktant u biohemijskim laboratorijama, a naročito je pogodan u biološkim sistemima pošto ne denaturizuje proteine [10, 27, 77].

Triton X-100 ( $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ ) je nejonski surfaktant koji ima hidrofilni polietilen-oksadni lanac (u proseku ima 9,5 etilen oksidnih jedinica) i jednu aromatičnu ugljovodoničnu lipofilnu ili hidrofobnu grupu. Ugljovodonična grupa je 4- (1,1,3,3-tetrametilbutil) -fenil grupa.

Nerazblažen Triton X-100 je bistra viskozna tečnost zahvaljujući vodoničnim vezama njegovih hidrofilnih polietilen oksidnih grupa.

Triton X-100 se najčešće primenjuje kao sastojak vakcine protiv gripe, za poboljšavanje permeabilnosti membrana eukariotskih ćelija [78], za solubilizaciju proteina membrane u njihovom prirodnom stanju, kao deo pufera koji se koristi za citolizu u DNK ekstrakciji, za smanjenje površinskog napona vodenih rastvora tokom imunološkog bojenja, u mikrobiologiji, za decelularizaciju tkiva životinjskog porekla, itd.

Izuzev laboratorijske upotrebe, Triton X-100 se može koristiti kao komponenta smeša za čišćenje.

Triton je uobičajni surfaktant u biohemijskim laboratorijama, a naročito je pogodan u biološkim sistemima, pošto ne denaturizuje proteine [77].

Triton X-100 je tipičan nejonski surfaktant i surfaktant izbora za većinu imunotaložnih reakcija. Ova grupa jedinjenja obuhvata Triton X-100, Triton X114, Nonidet P40, Igepal® CA-630. Ova jedinjenja su veoma slična i razlikuju se samo u prosečnom broju ( $n$ ) monomera po miceli (9.6, 8.0, 9.0, i 9.5, pojedinačno) i raspodeli veličine PEG polarnih glava [24, 77]. Pošto mu je niska CMC vrednost, teško se uklanja iz rastvora dijalizom.

## 2.2 Monokomponentne micelle i faktori koji utiču na micelizaciju

Prilikom formiranja monokomponentne micelle određenog oblika i veličine iz monomernog surfaktanta, može se primeniti sledeći asocijacioni model:



$$dG = dn_M \mu_M - dn_i \mu_i \quad (2.2)$$

gde su:

$\mathbf{M}\{g_i\}$  - monokomponentna micela;

$g_i$  - agregacioni broj;

$dG$  - promena slobodne entalpije;

$dn_M$  i  $dn_i$  - promene količine monomernog surfaktanta i micelle u sistemu;

$\mu_i$  i  $\mu_M$  - hemijski potencijali surfaktanta i micelle.

Ukoliko proces asocijacije (2.1) napreduje za diferencijalnu vrednost reakcione koordinate ( $d\xi$ ), onda izraz (2.2) dobija oblik:

$$dG = \mu_M d\xi - g_i \mu_i d\xi$$

$$\left( \frac{\partial G}{\partial \xi} \right)_p = \mu_M - g_i \mu_i$$

$$\left( \frac{\partial G}{\partial \xi} \right)_p = \mu_M^\bullet - g_i \mu_i^\bullet + RT \ln x_M^b - g_i RT \ln x_i^b \quad (2.3)$$

gde su:

$\mu^\bullet$  - standardni hemijski potencijal micle, odnosno surfaktanta, prema Henrijevom zakonu (molarna Gibbs-ova energija pri beskonačno razblaženom stanju);

$x^b$  - molske frakcije surfaktanta i micle u rastvoru.

Slobodna entalpija sistema se više ne menja kada se uspostavi stanje ravnoteže:

$$0 = \mu_M^\bullet - g_i \mu_i^\bullet + RT \ln x_M^b - g_i RT \ln x_i^b$$

$$\Delta G_M^\bullet = \mu_M^\bullet - g_i \mu_i^\bullet = -RT \ln x_M^b + g_i RT \ln x_i^b \quad (2.4)$$

$\Delta G_M^\bullet$  - standardna promena slobodne entalpije formiranja monokomponentne micle, tj. promena Gibbs-ove energije pri prelasku  $g$  mola (molekula) monomernog surfaktanta iz vodenog rastvora u micelu.

Na osnovu jednačine (2.4) izvodi se funkcija raspodele micela po agregacionim brojevima u zavisnosti od promene standardne Gibbs-ove energije formiranja micle:

$$\ln x_M^b = \ln (x_i^b)^{g_i} - \frac{(\mu_M^\bullet - g_i \mu_i^\bullet)}{RT}$$

$$x_M^b(\mathbf{M}\{g_i\}) = (x_i^b)^{g_i} \exp \left[ -\frac{(\mu_M^\bullet - g_i \mu_i^\bullet)}{RT} \right] \quad (2.5)$$

Deljenjem leve i desne strane jednačine (2.4) agregacionim brojem  $g_i$  može se dobiti zavisnost standardne slobodne entalpije formiranja micela po molekulu surfaktanta ( $\Delta \bar{G}_M^\bullet$ ) od kritične micelarne koncentracije:

$$\Delta G_M^\bullet = \mu_M^\bullet - g_i \mu_i^\bullet = -RT \ln x_M^b + g_i RT \ln x_i^b \left| \frac{1}{g_i} \right.$$

$$\frac{\Delta G_M^\bullet}{g_i} = \Delta \bar{G}_M^\bullet = \frac{\mu_M^\bullet - g_i \mu_i^\bullet}{g_i} = -RT \ln (x_M^b)^{\frac{1}{g_i}} + RT \ln x_i^b$$

Kada agregacioni broj  $g_i$  teži beskonačnosti, dobija se:

$$\lim_{g_i \rightarrow \infty} \ln (x_M^b)^{\frac{1}{g_i}} = 0$$

$$\Delta \bar{G}_M^\bullet = \frac{\mu_M^\bullet - g_i \mu_i^\bullet}{g_i} = RT \ln cmc_i \quad (2.6)$$

gde su:

$\Delta \bar{G}_M^\bullet$  - standardna slobodna entalpija formiranja micela po molekulu surfaktanta.

$cmc_i = x_i^b$  - kritična micelarna koncentracija surfaktanta.

$\Delta \bar{G}_M^\bullet$  predstavlja zbir sledećih doprinosa [27, 79] (Slika 2.4.):

$$\Delta \bar{G}_M^\bullet = \Delta G_{L/V}^\bullet + \underbrace{\Delta H_{ord}^\bullet}_{\Delta G^*(ord)} - RT \ln \frac{\Omega_M}{\Omega_L} - \gamma(a - a_0) - RT \ln \left( 1 - \frac{a_p}{a} \right) \quad (2.7)$$

gde su:

$\Delta G_{L/V}^\bullet$  - promena standardne molarne slobodne entalpije (po molekulu monomera) prilikom prelaza jednog mola ugljovodoničnog niza (hidrofobnog segmenta) surfaktanta iz vodenog rastvora u tečnu lipidnu fazu (prvi član u izrazu (2.7), Slika 2.4. I).

$\Delta G^*(ord)$  - molarna standardna promena slobodne entalpije (po molekulu monomera) usled uređenja micelarne hidrofobne faze u odnosu na slobodu hidrofobnu fazu (drugi i treći član sa desne strane jednačine (2.7), Slika 2.4. II);

$\Omega_M$  - broj konfiguracija u micelarnoj hidrofobnoj fazi;

$\Omega_L$  - broj konfiguracija u tečnoj hidrofobnoj (lipidnoj fazi);

$\Delta H_{ord}^*$  - standardna molarna promena entalpije usled konfiguracionog uređenja ugljovodoničnog niza u micelarnoj hidrofobnoj fazi u odnosu na tečnu lipidnu fazu.

$\gamma$  - makroskopski koeficijent površinskog napona za graničnu površinu voda-ugljovodonična faza

$a$  - površina hidrofobnog jezgra micide po molu monomera

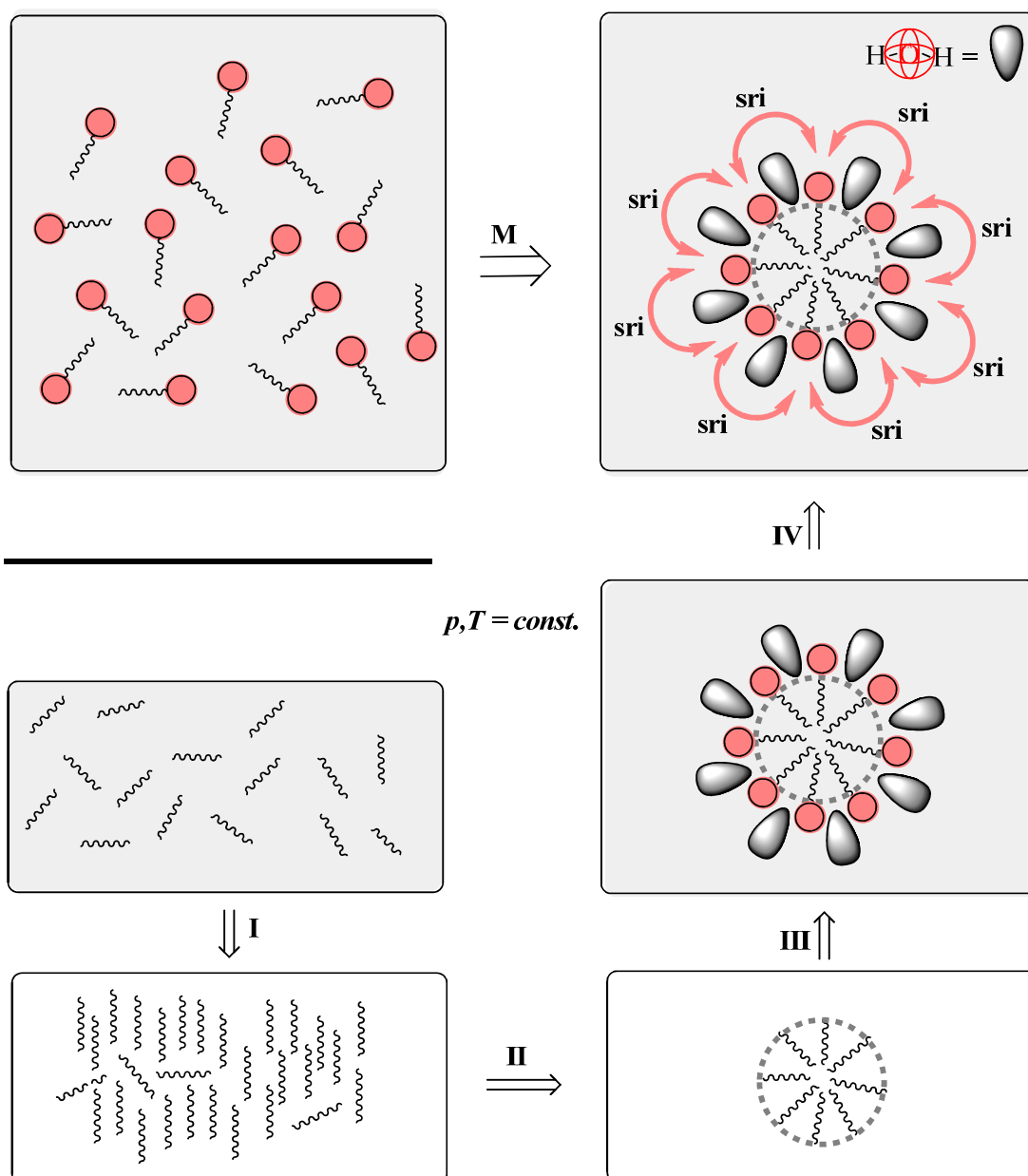
$a_0$  - površina hidrofobnog jezgra koja je ekranirana sa polarnom glavom surfaktanta (po molu monomera).

$a - a_0$  - površina hidrofobnog domena micide koja je hidratizirana sa molekulima vode iz unutrašnjosti rastvora.

$a_p$  - površina poprečnog preseka polarne glave surfaktanta (po molu monomera).

Na graničnoj površini micelarne hidrofobne faze i vodene faze nalaze se polarne grupe (glave) surfaktanata, za koje su vezani ugljovodonični segmenti surfaktanata u hidrofobnom domenu micide. Ugljovodonični niz je jednim krajem fiksiran za položaj na graničnoj površini micide, dok je terminalni kraj relativno slobodan, odnosno formalno može da zauzme bilo koji položaj u hidrofobnom domenu micide. Međutim, oba kraja ugljovodoničnog lanca formalno mogu zauzeti bilo koji položaj u tečnoj hidrofobnoj fazi. Iz toga proizilazi da se u tečnoj hidrofobnoj i micelarnoj fazi razlikuje broj mogućih konformacija (konfiguracija lanca) ugljovodoničnog niza, i zbog toga postoji razlika u molarnoj konfiguracionoj entropiji:  $R \ln(\Omega_M / \Omega_L)$ .

$\Delta G(ord)$  se određuje na osnovu  $R \ln(\Omega_M / \Omega_L)$  i  $\Delta H_{ord}^*$  u skladu sa opštom jednačinom  $G = H - TS$ .



Slika 2.4. Formiranje monokomponentne nejonske micelle (**M**) formalno se može predstaviti kao zbir sledećih procesa: transfer ugljovodoničnih segmenata iz vodene u lipidnu fazu (**I**); formiranje micelarne hidrofobne faze (**II**); hidratisanje slobodne hidrofobne površine micelle (**III**) i uključivanje sterne repulzivne interakcije (**sri**) između polarnih grupa (glava) surfaktanata (**IV**) [27]

Standardna molarna Gibbs-ova energija formiranja granične površine između hidrofobnog jezgra micelle i vodene faze predstavljena je četvrtim članom izraza (2.7) i odgovara slici (Slika 2.4. III). Poslednji član u jednačini (2.7) odgovara standardnoj slobodnoj

molarnoj entalpiji sterne repulzivne interakcije između polarnih grupa surfaktanata (Slika 2.4. IV).

Elektrostatičke interakcije polarnih grupa surfaktanata na graničnoj površini hidrofobnog jezgra micle utiču na vrednost  $\Delta\bar{G}_M^\bullet$ , pored članova iz jednačine (2.7), kod jonskih surfaktanata.  $(\Delta\bar{G}_M^\bullet)_{elstat}$  se dobija iz Debye-Hückel-ovog zakona [27, 80]:

$$(\Delta\bar{G}_M^\bullet)_{elstat} = \frac{g_{jon}^2 F^2 \Xi}{2\epsilon RTr} \left( \frac{1 + \kappa a_i}{1 + \kappa a_i + \kappa r} \right) \quad (2.8)$$

gde su:

$(\Delta\bar{G}_M^\bullet)_{elstat}$  - rad na dopremanju naelektrisanja jezgra jonske micle sa jonizovanim grupama  $g_{jon}F$  (koja se sastoji od jonskih surfaktanata i aproksimirana je sferom radijusa  $r$ ) sa beskonačne udaljenosti na mesto u rastvoru, koje je okruženo kontrajonima. Ovaj rad se odnosi na mol jezgara jonske micle, gde je  $g_{jon}$  ukupan broj jonskih grupa na površini micle ( $g_{jon} = g_i$ ).

$r$  - radijus sfere kojom je aproksimirano micelarno jezgro,

$F$  - Faradejeva konstanta (mol naelektrisanja),

$\epsilon$  - dielektrična konstanta vode,

$\kappa$  - recipročna vrednost Debye-eve dužine,

$a_i$  - radijus kontrajona koji se vezuje za micelu,

$\Xi$  - empirijska konstanta za korekciju elektostatičke interakcije u Debye-Hückel-ovoj aproksimaciji.



### 2.3 Binarne mešovite micelle i faktori koji utiču na micelizaciju

Formiranje binarne mešovite micelle  $\mathbf{mM}\{g, x_i^{mM}, x_j^{mM}\}$  iz surfaktanata  $\mathbf{i}$  i  $\mathbf{j}$  u vodenom rastvoru može se predstaviti na sledeći način:



gde su:

$g$  - agregacioni broj mešovite micelle;

$x_i^{mM}$  i  $x_j^{mM}$  - molski udeli surfaktanata  $\mathbf{i}$  i  $\mathbf{j}$  u mešovitoj miceli.

Henrijev zakon može se primeniti na hemijski potencijal surfaktanata, odnosno binarnih mešovitih micela. Standardno stanje se odnosi na beskonačno (idealno) razblaženi rastvor. Ukoliko proces asocijacije napreduje za diferencijalnu vrednost reakcione koordinate ( $d\xi$ ), jednačina (2.9) u uslovima ravnoteže ( $p, T$ ) dobija oblik:

$$\left(\frac{\partial G}{\partial \xi}\right)_{p,T} = 0 = (\mu_{mM}^\bullet - g_i \mu_i^\bullet - g_j \mu_j^\bullet) + RT(\ln x_{mM}^b - g_i \ln x_i^b - g_j \ln x_j^b) \quad (2.10)$$

gde su:

$dG$  - promena slobodne entalpije;

$\mu_{mM}^\bullet$  - standardni hemijski potencijal mešovite micelle u vodenom rastvoru;

$\mu_i^\bullet$  i  $\mu_j^\bullet$  - standardni hemijski potencijali surfaktanata (monomera) u vodenom rastvoru;

$x_{mM}^b, x_i^b$  i  $x_j^b$  - molski udeli mešovite micelle i surfaktanata ( $\mathbf{i}, \mathbf{j}$ ) u vodenom rastvoru.

Standardna slobodna entalpija formiranja mešovite micelle određuje molski udeo mešovite micelle određene veličine, koja je definisana agregacionim brojem, odnosno

standardna Gibbs-ova energija formiranja mešovite micela ( $\Delta G_{mM}^\bullet$ ) određuje funkciju raspodele mešovite micela, pa se na osnovu jednačine (2.10) dobija:

$$\begin{aligned}
 -(\mu_{mM}^\bullet - g_i \mu_i^\bullet - g_j \mu_j^\bullet) &= -\Delta G_{mM}^\bullet = RT \left( \ln x_{mM}^b - \ln (x_i^b)^{g_i} - \ln (x_j^b)^{g_j} \right) \\
 \ln \frac{x_{mM}^b}{(x_i^b)^{g_i} (x_j^b)^{g_j}} &= \frac{-(\mu_{mM}^\bullet - g_i \mu_i^\bullet - g_j \mu_j^\bullet)}{RT} \\
 x_{mM}^b \left( \mathbf{mM} \{ g, x_i^{mM}, x_j^{mM} \} \right) &= (x_i^b)^{g_i} (x_j^b)^{g_j} \exp \left[ \frac{-(\mu_{mM}^\bullet - g_i \mu_i^\bullet - g_j \mu_j^\bullet)}{RT} \right] \quad (2.11)
 \end{aligned}$$

Množenjem leve i desne strane jednačine (2.10) recipročnom vrednošću agregacionog broja binarne mešovite micela ( $g$ ), dobija se:

$$\begin{aligned}
 \left( \frac{\partial G}{\partial \xi} \right)_{p,T} = 0 &= (\mu_{mM}^\bullet - g_i \mu_i^\bullet - g_j \mu_j^\bullet) + RT (\ln x_{mM}^b - g_i \ln x_i^b - g_j \ln x_j^b) \left| \frac{1}{g} \right. \\
 \frac{-(\mu_{mM}^\bullet - g_i \mu_i^\bullet - g_j \mu_j^\bullet)}{g} &= RT \left( \ln (x_{mM}^b)^{\frac{1}{g}} - \frac{g_i}{g} \ln x_i^b - \frac{g_j}{g} \ln x_j^b \right) \quad (2.12)
 \end{aligned}$$

gde su  $(g_i/g) = x_i^{mM}$  i  $(g_j/g) = x_j^{mM}$  molni udeli surfaktanata ( $i, j$ ) u binarnoj mešovitoj miceli. U graničnom slučaju, uz dovoljno veliku vrednost agregacionog broja  $g$ , koristi se aproksimacija

$$\begin{aligned}
 \lim_{g \rightarrow \infty} \ln (x_{mM}^b)^{\frac{1}{g}} &= 0, \text{ pa jednačina (2.12) dobija oblik:} \\
 \frac{-(\mu_{mM}^\bullet - g_i \mu_i^\bullet - g_j \mu_j^\bullet)}{g} &= -RT (x_i^{mM} \ln x_i^b + x_j^{mM} \ln x_j^b) \\
 \Delta \bar{G}_{mM}^\bullet &= RT (x_i^{mM} \ln x_i^b + x_j^{mM} \ln x_j^b) \quad (2.13)
 \end{aligned}$$

$\Delta \bar{G}_{mM}^\bullet$  predstavlja molarnu Gibbs-ovu energiju prelaska  $g_i$  mola surfaktanta  $i$  i  $g_j$  mola surfaktanta  $j$  iz vodenog rastvora (faze) u micelarnu pseudofazu, odnosno  $\Delta \bar{G}_{mM}^\bullet$  predstavlja

standardnu (molarnu) Gibbs-ovu energiju formiranja binarne mešovite micela izraženu po molekulu monomera.

Poput jednačine (2.7), moguće je razložiti  $\Delta\bar{G}_{mM}^{\bullet}$  na sledeći način [27, 79]:

$$\begin{aligned}\Delta\bar{G}_{mM}^{\bullet} &= -\left(\frac{\mu_{mM}^{\bullet}}{g} - \frac{g_i\mu_i^{\bullet}}{g} - \frac{g_j\mu_j^{\bullet}}{g}\right) = -\left(\frac{\mu_{mM}^{\bullet}}{g} - x_i^{mM}\mu_i^{\bullet} - x_j^{mM}\mu_j^{\bullet}\right) = \\ &= x_i^{mM}\left(\Delta G_{L/V}^{\bullet} + \Delta H_{ord}^{\bullet} - RT \ln \frac{\Omega_M}{\Omega_L}\right)_i + \\ &+ x_j^{mM}\left(\Delta G_{L/V}^{\bullet} + \Delta H_{ord}^{\bullet} - RT \ln \frac{\Omega_M}{\Omega_L}\right)_j + \\ &+ \gamma\left(a - x_i^{mM}a_{0i} - x_j^{mM}a_{0j}\right) - RT \ln\left(1 - x_i^{mM}\frac{a_{pi}}{a} - x_j^{mM}\frac{a_{pj}}{a}\right) + \\ &+ RT\left(x_i^{mM} \ln x_i^{mM} + x_j^{mM} \ln x_j^{mM}\right)\end{aligned}\tag{2.14}$$

$\Omega_M$  - broj konfiguracija u micelarnoj hidrofobnoj fazi;

$\Omega_L$  - broj konfiguracija u tečnoj hidrofobnoj (lipidnoj fazi);

$\Delta H_{ord}^{\bullet}$  - standardna molarna promena entalpije usled konfiguracionog uređenja ugljovodoničnog niza u micelarnoj hidrofobnoj fazi u odnosu na tečnu lipidnu fazu.

$\gamma$  - makroskopski koeficijent površinskog napona za graničnu površinu voda-ugljovodonična faza

$a$  - površina hidrofobnog jezgra micela po molu monomera

$a_{0i}, a_{0j}$  - površina hidrofobnog jezgra koja je ekranirana sa polarnom glavom surfaktanta  $i, j$  (po molu monomera).

$a - x_i^{mM}a_{0i} - x_j^{mM}a_{0j}$  - površina hidrofobnog domena micela koja je hidratizovana sa molekulima vode iz unutrašnjosti rastvora.

$a_{pi}, a_{pj}$  - površina poprečnog preseka polarne glave surfaktanta  $i, j$  (po molu monomera).

Izraz (2.14) se samo u poslednjem članu  $RT(x_i^{mM} \ln x_i^{mM} + x_j^{mM} \ln x_j^{mM})$  razlikuje od izraza kojim je predstavljeno razlaganje  $\Delta\bar{G}_{mM}^\bullet$ . Taj član predstavlja standardnu idealnu molarnu Gibbs-ovu energiju mešanja.

Ako su jedna ili obe vrste gradivnih jedinica binarnih mešovutih micela jonski surfaktanti, u razlaganju standardne slobodne entalpije formiranja mešovite micelle postoji i član  $(\Delta\bar{G}_{mM}^\bullet)_{elstat}$  koji označava rad na dopremanju naelektrisanja jezgra jonske micelle sa jonizovanim grupama  $g_{jon}F$  (koja sadrži jonske surfaktante i aproksimirana je sferom radijusa  $r$ ) sa beskonačne udaljenosti na mesto u rastvoru, koje je okruženo kontrajonima. Ovaj rad se odnosi na mol jezgara jonske micelle.

$$(\Delta\bar{G}_{mM}^\bullet)_{elstat} = \frac{g_{jon}^2 F^2 \Xi}{2\varepsilon RT r} \left( \frac{1 + \kappa a_i}{1 + \kappa a_i + \kappa r} \right) \quad (15)$$

gde su:

$r$  - radijus sfere kojom je aproksimirano micelarno jezgro,

$F$  - Faradejeva konstanta (mol naelektrisanja),

$\varepsilon$  - dielektrična konstanta vode,

$\kappa$  - recipročna vrednost Debye-eve dužine,

$a_i$  - radijus kontrajona koji se vezuje za micelu,

$\Xi$  - empirijska konstanta za korekciju precenjene elektostatičke interakcije u Debye-Hückel-ovoj aproksimaciji,

$g_{jon}$  - ukupan broj jonskih grupa na površini micelle.

Ako su obe gradivne jedinice katjonski ili anjonski surfaktanti, onda je:  $g_{jon} = g_i + g_j$ .

Međutim, ako je jedna gradivna jedinica katjonski, a druga anjonski surfaktant, važi:

$g_{jon} = g_i - g_j$ , i ukoliko je jedna gradivna jedinica jonski surfaktant ( $j$ ), a druga nejonski, onda  $g_{jon} = g_j$ .

## 2.4 Binarne mešovite micelle i teorija fazne separacije

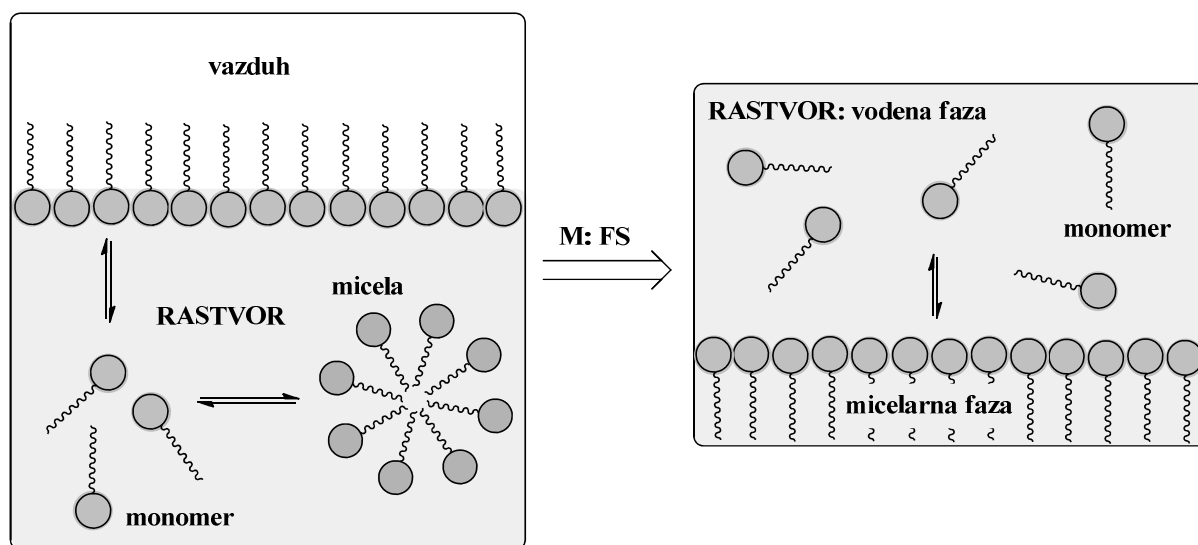
Hemijski potencijal molekula surfaktanta  $i$  u razblaženom vodenom rastvoru (ako se posmatra nejonski surfaktant), uz uslov da važi Henrijev zakon, iznosi:

$$\mu_i^b = \mu_i^\bullet + RT \ln c_i^b \quad (2.16)$$

gde su:

$\mu_i^\bullet$  - standardni hemijski potencijal pri  $(c_i^b)^\bullet = 1 \text{ mol dm}^{-3}$  uz hipotetičko idealno stanje koje važi u beskonačno razblaženom rastvoru.

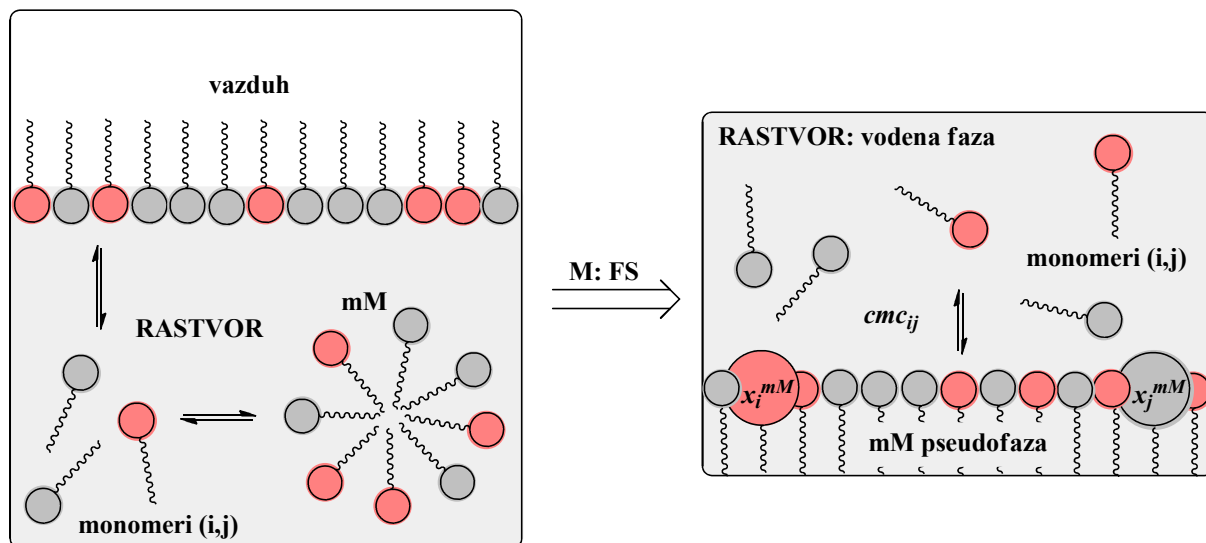
$c_i^b = cmc_i$  - ukoliko pri posmatranoj koncentraciji surfaktanta upravo dolazi do formiranja micela, gde  $cmc_i$  označava kritičnu micelarnu koncentraciju surfaktanta  $i$ .



Slika 2.5. Model fazne separacije kod monokomponentne micelle [27]

Pseudofaza predstavlja aproksimaciju u teoriji fazne separacije, gde se formirana micela u vodenom rastvoru posmatra kao posebna faza (Slika 2.5.). Hemijski potencijal surfaktanta  $i$  u micelarnoj pseudofazi ( $\mu_i^M$ ) i hemijski potencijal monomera  $i$  iz vodenog rastvora ( $\mu_i^b$ ) su jednaki ako je sistem u stanju ravnoteže:

$$\mu_i^M = \mu_i^b = \mu_i^\bullet + RT \ln cmc_i \quad (2.17)$$



Slika 2.6. Model fazne separacije kod binarne mešovite micela [27]

Kritična micelarna koncentracija za binarnu smešu surfaktanata ( $cmc_{ij}$ ) može se definisati za slučaj kada vodeni rastvor sadrži binarnu smešu surfaktanata ( $i, j$ : okarakterisanu molskim udelom  $\alpha_i$ ). Kada se mešovita micela sastoji od binarne smeše surfaktanata, koja se aproksimira pseudofazom tečne smeše (Slika 2.6.), hemijski potencijal surfaktanta  $i$  ( $\mu_i^{mM}$ ), ili druge gradivne jedinice  $j$  ( $\mu_j^{mM}$ ), može se izraziti jednačinom (2.18):

$$\mu_i^{mM} = \mu_i^M + RT \ln x_i^{mM} f_i^{mM} = \underbrace{\mu_i^M + RT \ln x_i^{mM}}_{(\mu_i^{mM})_{id}} + \underbrace{RT \ln f_i^{mM}}_{\mu_i^E} \quad (2.18)$$

gde su:

$\mu_i^{mM}$  - hemijski potencijal surfaktanta  $i$  u mešovitoj miceli kao pseudofazi;

$\mu_i^M$  - hemijski potencijal micelarne pseudofaze u čistom stanju (16);

$x_i^{mM}$  - molski udeo molekula  $i$  u binarnoj mešovitoj miceli;

$f_i^{mM}$  - koeficijent aktivnosti surfaktanta  $i$  u mešovitoj miceli;

$\mu_i^E$  - dodatni hemijski potencijal surfaktanta  $i$ , koji je direktno srazmeran sa  $f_i^{mM}$

$(\mu_i^{mM})_{id}$  - hemijski potencijal u idealnom stanju.

Ako se međusobno razlikuju prosečne energije međumolekulskih interakcija jednokomponentnih (čistih) i binarnih mešovitih micela (koje su sastavljene od različitih surfaktanata  $i, j$ ), onda se hemijski potencijal surfaktanata  $i, j$  u binarnoj mešovitoj miceli razlikuje od idealnog  $(\mu_i^{mM})_{id}$ . Hemijski potencijal  $i$  (odnosno  $j$ ) iz binarne micelarne pseudofaze jednak je hemijskom potencijalu surfaktanta  $i$  iz vodenog rastvora (2.16) u stanju ravnoteže

$$(\mu_i^{mM} = \mu_i^b, \mu_j^{mM} = \mu_j^b):$$

$$\mu_i^M + RT \ln x_i^{mM} f_i^{mM} = \mu_i^b + RT \ln c_i^b \quad (2.19)$$

Ako se vrednost  $\mu_i^M$  zameni izrazom koji se nalazi na desnoj strani jedničine (2.17), dobija se:

$$\mu_i^b + RT \ln cmc_i + RT \ln x_i^{mM} f_i^{mM} = \mu_i^b + RT \ln c_i^b$$

$$RT \ln cmc_i + RT \ln x_i^{mM} f_i^{mM} = RT \ln c_i^b \quad (2.20)$$

Pseudofaza kao posebna faza se koristi za opisivanje binarne mešovite micelle u mnogim radovima [13, 14, 17, 81, 82] u kojima je prisutan izraz (2.20).

Ravnotežna koncentracija surfaktanta  $i$  iz vodene faze može se izraziti pomoću kritične micelarne koncentracije mešovite micelle i njegovog molskog udela u smeši ( $\alpha_i$ ) u slučaju ravnoteže (2.20), kada upravo počinje formiranje binarne mešovite micelle. Tada je ukupna koncentracija surfaktanta  $c_T$  jednaka  $c_T = cmc_{ij}$ , i važi:

$$RT \ln cmc_i + RT \ln x_i^{mM} f_i^{mM} = RT \ln \alpha_i cmc_{ij} \quad (2.21)$$

Molski udeo surfaktanta  $i$  u mešovitoj miceli iznosi:

$$x_i^{mM} = \frac{\alpha_i c m c_{ij}}{f_i^{mM} c m c_i} \quad (2.22)$$

Zbir molskih udela  $x_i^{mM}$  i  $x_j^{mM}$  jednak je 1 u binarnoj micelarnoj fazi, pa se na osnovu izraza (2.22) dobija:

$$1 = \frac{\alpha_i c m c_{ij}}{f_i^{mM} c m c_i} + \frac{(1 - \alpha_i) c m c_{ij}}{f_j^{mM} c m c_j} \quad (2.23)$$

Recipročna vrednost kritične micelarne koncentracije binarne smeše surfaktanta može se izraziti iz jednačine (2.23):

$$\frac{1}{c m c_{ij}} = \frac{\alpha_i}{f_i^{mM} c m c_i} + \frac{1 - \alpha_i}{f_j^{mM} c m c_j} \quad (2.24)$$

Clint-ova jednačina [18] dobija se pod uslovom da se binarna micelarna pseudofaza ponaša kao idealna binarna tečna smeša, odnosno, uzimajući u obzir  $f_i^{mM} = f_j^{mM} = 1$ , dobija se:

$$\frac{1}{c m c_{ij}} = \frac{\alpha_i}{c m c_i} + \frac{1 - \alpha_i}{c m c_j} \quad (2.25)$$

U radu [13], za određivanje koeficijenta aktivnosti realnih binarnih mešovitih micela (2.24), predložena je primena Teorije regularnih rastvora (Regular Solution Theory - RST) koja se koristi za opisivanje realnih tečnih smeša.

Promena entalpije mešanja je nula za idelne tečne smeše ( $\Delta_{mix} H_{ij}^{id} = 0$ ), što ukazuje na entropijsku prirodu Gibbs-ove energije mešanja:  $\Delta_{mix} G_{ij}^{id} = -T \Delta_{mix} S_{ij}^{id}$ . Prema Teoriji regularnih rastvora (RST), dodatna slobodna entalpija ( $G_{ij}^E$ ), koja predstavlja odstupanje Gibbs-ove energije mešanja realne od idealne tečne smeše, je entalpijskog porekla:  $G_{ij}^E = H_{ij}^E$ , dok je  $S_{ij}^E = 0$ , tj. komponente su međusobno nasumično pomešane u slučaju realnih tečnih smeša. RST povezuje koeficijent aktivnosti  $f_i^{mM}$  sa molskim udelom komponente iz binarne micelarne faze  $i$  sa koeficijentom interakcije ( $\beta_{ij}$ ) na sledeći način:



$$\ln f_i^{mM} = \beta_{ij} (1 - x_i^{mM})^2 \quad (2.26)$$

$$\ln f_j^{mM} = \beta_{ij} (1 - x_j^{mM})^2 \quad (2.27)$$

Koeficijent interakcije  $\beta_{ij}$  definisan je izrazom (2.28):

$$\beta_{ij} = \frac{z}{RT} \left( E_{ij} - \frac{(E_{ii} + E_{jj})}{2} \right) \quad (2.28)$$

gde su:

$E_{ij}$  - prosečna molarna energija međumolekulske interakcije dveju različitih gradivnih jedinica ( $i, j$ )

$E_{ii}, E_{jj}$  - prosečna molarna energija međumolekulskih interakcija parova istih molekula.

Koeficijent aktivnosti  $f_i^{mM}$  se na osnovu jednačine (2.22) može izraziti na sledeći način:

$$f_j^{mM} = \frac{\alpha_j cmc_{ij}}{cmc_j x_j^{mM}} \quad \text{i} \quad f_i^{mM} = \frac{\alpha_i cmc_{ij}}{cmc_i x_i^{mM}} \quad (2.22a)$$

Na osnovu jednačina (2.22a), (2.26) i (2.27) dobija se:

$$\ln \frac{\alpha_i cmc_{ij}}{cmc_i x_i^{mM}} = \beta_{ij} (1 - x_i^{mM})^2 \Rightarrow \beta_{ij} = \frac{1}{(1 - x_i^{mM})^2} \ln \frac{\alpha_i cmc_{ij}}{cmc_i x_i^{mM}} \quad (2.29)$$

$$\ln \frac{\alpha_j cmc_{ij}}{cmc_j x_j^{mM}} = \beta_{ij} (1 - x_j^{mM})^2 \Rightarrow \beta_{ij} = \frac{1}{(1 - x_j^{mM})^2} \ln \frac{\alpha_j cmc_{ij}}{cmc_j x_j^{mM}} \quad (2.30)$$

Molski udeo surfaktanta  $i$  u binarnoj micelarnoj pseudofazi može se odrediti na osnovu izraza (2.29) i (2.30), tako što se prvo leva strana jednačine (2.29) podeli levom stranom jednačine (2.30) i desna strana jednačine (2.29) podeli desnom stranom jednačine (2.30):

$$\beta_{ij} = \frac{\frac{1}{(1 - x_i^{mM})^2} \ln \frac{\alpha_i cmc_{ij}}{cmc_i x_i^{mM}}}{\frac{1}{(1 - x_j^{mM})^2} \ln \frac{\alpha_j cmc_{ij}}{cmc_j x_j^{mM}}}$$

Posle skraćivanja razlomka na levoj stani prethodne jednačine i sređivanja dvojnog razlomka na desnoj strani, dobija se:

$$1 = \frac{(1 - x_j^{mM})^2 \ln \frac{\alpha_i \text{cmc}_{ij}}{\text{cmc}_i x_i^{mM}}}{(1 - x_i^{mM})^2 \ln \frac{\alpha_j \text{cmc}_{ij}}{\text{cmc}_j x_j^{mM}}} \quad (2.31)$$

Kako za binarnu micelarnu fazu važi:  $x_i^{mM} + x_j^{mM} = 1$ , u brojiocu na desnoj strani jednačine (2.31) može se pisati  $x_i^{mM}$  umesto izraza  $(1 - x_j^{mM})$ , jer važi  $x_i^{mM} = 1 - x_j^{mM}$ . Shodno tome, u imeniocu na desnoj strani jednačine (2.31) može se pisati izraz  $(1 - x_i^{mM})$  umesto  $x_j^{mM}$ , jer važi  $x_j^{mM} = 1 - x_i^{mM}$ . Takođe, treba uvrstiti smenu  $\alpha_j = 1 - \alpha_i$ . Tako se dobija izraz (2.32):

$$1 = \frac{(x_i^{mM})^2 \ln(\alpha_i \text{cmc}_{ij} / \text{cmc}_i x_i^{mM})}{(1 - x_i^{mM})^2 \ln((1 - \alpha_i) \text{cmc}_{ij} / \text{cmc}_j (1 - x_i^{mM}))} \quad (2.32)$$

Molski udeo surfaktanta  $i$  u mešovitoj miceli  $(x_i^{mM})$  može se dobiti iz jednačine (2.32) iterativnim postupkom, budući da su poznate eksperimentalno određene vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija  $\text{cmc}_{ij}$ ,  $\text{cmc}_i$  i  $\text{cmc}_j$ . Na isti način, iterativnim postupkom može se odrediti i molski udeo surfaktanta  $j$  u mešovitoj miceli  $(x_j^{mM})$ .

Koeficijent interakcije  $\beta_{ij}$  može se izračunati na osnovu jednačine (2.29) kada je poznata vrednost  $x_i^{mM}$ , ili na osnovu jednačine (2.30) kada je poznata vrednost  $x_j^{mM}$ . Pošto su na ovaj način određene sve potrebne vrednosti, lako se izračunava vrednost koeficijenta aktivnosti za micelarnu pseudofazu  $f_i^{mM}$  na osnovu izraza (2.26), odnosno  $f_j^{mM}$  na osnovu izraza (2.27).

U radu [14] prikazan je izraz za promenu molarne Gibbs-ove energije mešanja za slučaj kada se formiranje mešovite micelarne pseudofaze posmatra kao formiranje realne smeše iz čistih micelarnih pseudofaza njegovih surfaktanata:

$$\begin{aligned} \Delta_{mix} G_{ij} = & RT \underbrace{\left( x_i^{mM} \ln x_i^{mM} + x_j^{mM} \ln x_j^{mM} \right)}_{\Delta_{mix} G_{ij}^{id}} + \\ & + RT \underbrace{\left( x_i^{mM} \ln f_i^{mM} + x_j^{mM} \ln f_j^{mM} \right)}_{G_{ij}^E} \end{aligned} \quad (2.33)$$

Izraz (2.33) ne zavisi od modela.

Priroda idealne Gibbs-ove energija mešanja monokomponentnih micelarnih pseudofaza ( $\Delta_{mix} G_{ij}^{id}$ ) isključivo je entropijska:

$$\left( \partial \left( \Delta_{mix} G_{ij}^{id} \right) / \partial T \right)_p = -\Delta_{mix} S_{ij}^{id}$$

Ukoliko se surfaktanti aproksimiraju sa krutim objektima,  $\Delta_{mix} S_{ij}^{id}$  označava molarnu konfiguracionu entropiju ( $S_c$ ):

$$\Delta_{mix} S_{ij}^{id} = S_c = R \ln \Omega$$

$\Omega$  predstavlja broj mikrostanja sa konstantom energijom  $x_i^{mM}$  mola surfaktanta  $i$  i  $x_j^{mM}$  mola surfaktanta  $j$  u binarnoj mešovitoj miceli. Broj različitih načina raspodele  $\Omega$  određuje se kao broj permutacija sa ponavljanjem, gde je ukupan broj elementa  $x_i^{mM} + x_j^{mM} = 1$ .

U teoriji kombinatorike, u skupu od ukupno  $n$  elemenata, u kojem su  $m_1, m_2, \dots, m_k$  brojevi istih elemenata različite vrste, pri čemu je  $m_1 + m_2 + \dots + m_k = n$ , ukupan broja permutacija sa ponavljanjem se izračunava na osnovu formule:

$$P(n, m_1, m_2, m_3, \dots, m_k) = \frac{n!}{m_1! m_2! m_3! \dots m_k!}$$

gde je  $n!$  po definiciji faktorijel:

$$n! = n \cdot (n-1) \cdot (n-2) \cdot (n-3) \cdot \dots \cdot 3 \cdot 2 \cdot 1, \quad n \text{ je prirodan broj i usvaja se da je } 0! = 1$$

odnosno važi

$$n! = n (n-1)!$$

Na osnovu toga sledi:

$$\Omega = \frac{1}{x_i^{mM} ! x_j^{mM} !}$$

Zamenom prethodnog izraza, dalje se izvodi izraz za molarnu promenu idealne entropije mešanja  $\Delta_{mix} S_{ij}^{id}$  na sledeći način:

$$\Delta_{mix} S_{ij}^{id} = R \ln \frac{1}{x_i^{mM} ! x_j^{mM} !} = R \ln 1 - R (\ln x_i^{mM} ! + \ln x_j^{mM} !)$$

$$\Delta_{mix} S_{ij}^{id} = R \ln \frac{1}{x_i^{mM} ! x_j^{mM} !} = k \ln 1 - k (\ln x_i^{mM} ! + \ln x_j^{mM} !)$$

Uz korišćenje Stirling-ove aproksimacije  $\ln(n!) = n \ln(n) - n$ , dobija se:

$$\Delta_{mix} S_{ij}^{id} = -R (x_i^{mM} \ln x_i^{mM} - x_i^{mM} + x_j^{mM} \ln x_j^{mM} - x_j^{mM})$$

$$\Delta_{mix} S_{ij}^{id} = R \left( -x_i^{mM} \ln x_i^{mM} - x_j^{mM} \ln x_j^{mM} + \underbrace{x_i^{mM} + x_j^{mM}}_1 \right)$$

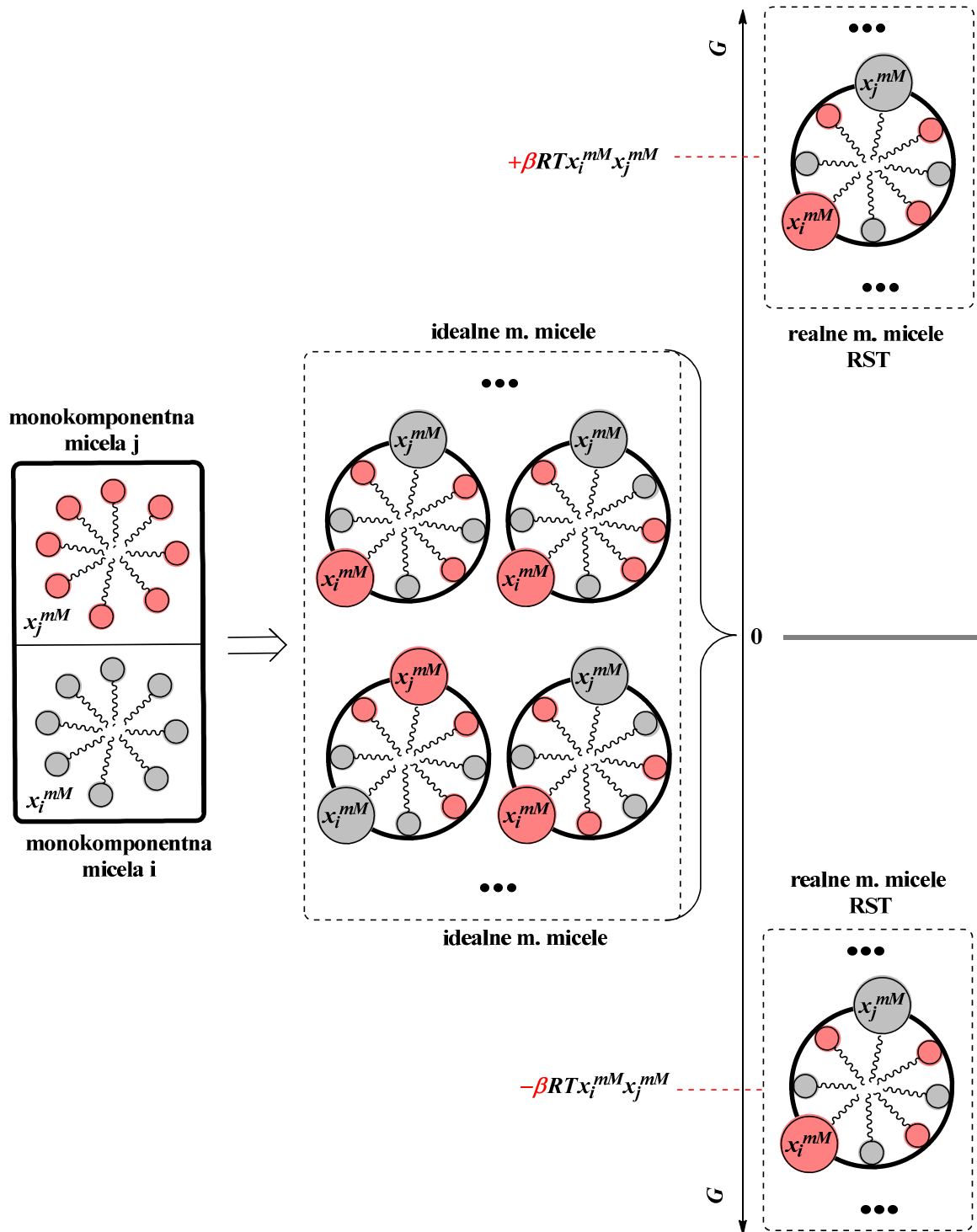
$$\Delta_{mix} S_{ij}^{id} = -R (x_i^{mM} \ln x_i^{mM} + x_j^{mM} \ln x_j^{mM})$$

Ukoliko se koeficijenti aktivnosti zamene RST jednačinama (2.26) i (2.27), za dodatnu Gibbs-ovu energiju mešanja micelarnih pseudofaza ( $G_{ij}^E$ ) iz jednačine (2.33) dobija se izraz koji je simetričan u odnosu na  $x_i^{mM} = 0,5$ :

$$G_{ij}^E = RT \beta_{ij} (x_i^{mM} - (x_i^{mM})^2) \quad (2.34)$$

Realna mešovita micela (mešovita pseudofaza) je termodinamički stabilnija od idealne mešovite micelle (pseudofaze) ako je dodatna Gibbs-ova energija mešanja negativna ( $G_{ij}^E < 0$ ,  $\Delta_{mix} G_{ij}^{id} > \Delta_{mix} G_{ij}$ ). Sinergističke (privlačne) interakcije između različitih gradivnih jedinica mešovite micelle označavaju se koeficijentom interakcije  $\beta_{ij}$ , a iz jednačine (2.34) za

negativnu dodatnu Gibbs-ovu energiju sledi da on ima negativnu vrednost ( $\beta_{ij} < 0$ ). Ako je prema jednačini (2.33)  $\Delta_{mix} G_{ij}^{id} < \Delta_{mix} G_{ij}$ , dobija se suprotan slučaj  $G_{ij}^E > 0$  u kojem je binarna mešovita micela manje termodinamički stabilna od idealne mešovite micela. U ovom slučaju, između različitih gradivnih jedinica postoje antagonističke (repulzivne) interakcije (Slika 2.7.), okarakterisane pozitivnom vrednošću koeficijenta interakcije  $\beta_{ij} > 0$ . Na osnovu ovih jednačina može se predvideti postojanje takve binarne smeše surfaktanata za koju važi  $cmc_{ij} < cmc_i \wedge cmc_{ij} < cmc_j$ , kod koje negativna vrednost koeficijenta interakcije  $\beta_{ij}$  uslovljava da koeficijenti aktivnosti  $f_i^{mM}$  teže nuli, što je poželjno u industrijskoj primeni mešovitih micela. Ovakve mešovite micela su termodinamički stabilnije od monokomponentnih i zahtevaju manju potrošnju surfaktanata.



Slika 2.7. Formiranje idealne binarne mešovite micela i realne binarne mešovite micela iz monokomponentnih micela, kod idealnih mešovitih micela postoji veći broj mikrostanja identičnih energija ( $\Delta_{mix} S_{ij}^{id} = S_c = R \ln \Omega$ ) nego kod realnih micela za koje ne važi RST [27].

RST na osnovu jednačine (2.28) predviđa konstantnu vrednost koeficijenta interakcije  $\beta_{ij}$  koja ne zavisi od promene odnosa surfaktanata u binarnoj smeši ( $\alpha_i, \alpha_j$ ), odnosno  $\beta_{ij}$  bi trebalo da bude konstantan u određenim intervalima ( $\alpha_i, \alpha_j$ ) [82-84]. Na granicama intervala  $\alpha_i$ , na kojima je  $\beta_{ij} = const.$  predviđa se promena međusobne orijentacije različitih gradivnih jedinica, tj. stepen konformacione slobode (izdužena ili sklopčana konformacija) gradivnih jedinica, pa onda više ne važi uslov  $S_{ij}^E = 0$ . Za slučaj kada je  $S_{ij}^E \neq 0$ , RST se ne može primeniti. Poređenjem jednačine RST (2.34) sa jednačinom (2.35) koja se navodi u literaturi [17, 85] dobija se:

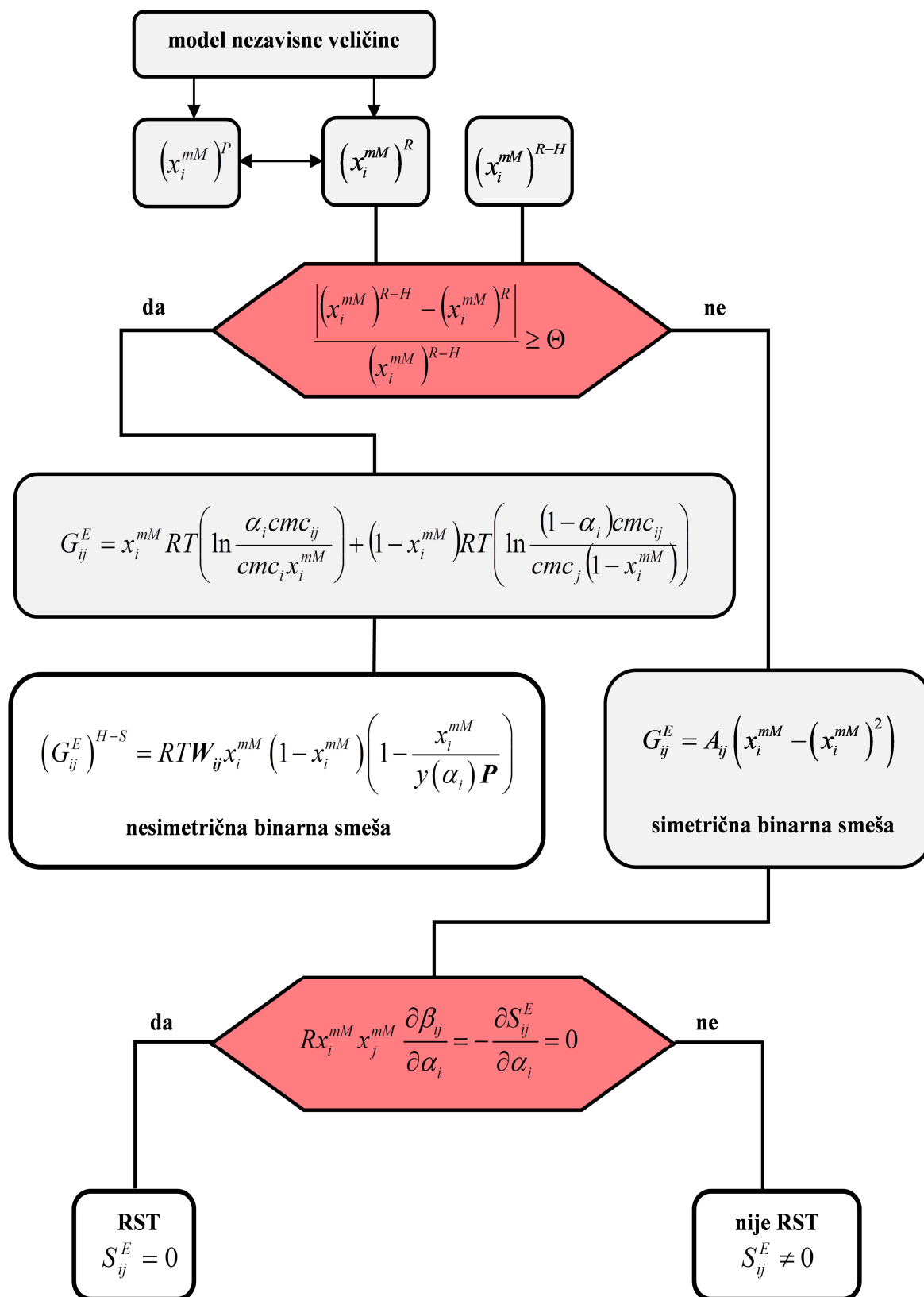
$$G_{ij}^E = A_{ij} \left( x_i^{mM} - (x_i^{mM})^2 \right) \quad (2.35)$$

koja je nezavisna od modela (ne postoji uslov  $S_{ij}^E = 0$ ), dobija se da važi  $RT\beta_{ij} = A_{ij}$ . Iz ovoga sledi da se RST jednačine mogu primenjivati bez obzira da li je  $S_{ij}^E = 0$  ili  $S_{ij}^E \neq 0$ , uz uslov da je dodatna Gibbs-ova energija opisana simetričnom funkcijom u odnosu na  $x_i^{mM} = 0,5$  (jednačine (2.34), (2.35)).

Na osnovu prethodno izloženog na Slici 2.8. prikazan je algoritam za ispitivanje binarnih mešoviti smeša surfaktanata [9]. Pod uslovom da važi:

$$\frac{\left| (x_i^{mM})^{R-H} - (x_i^{mM})^R \right|}{(x_i^{mM})^{R-H}} \geq \Theta \quad (2.36)$$

binarna smeša surfaktanata nije simetrična u odnosu na dodatnu Gibbs-ovu energiju. Parametar praga primenljivosti RST ( $\Theta$ ) procenjuje se na osnovu greške fitovanja funkcije  $\ln cmc_{ij} = f(\alpha_i)$ , odnosno na osnovu greške određivanja kritične micelarne koncentracije.

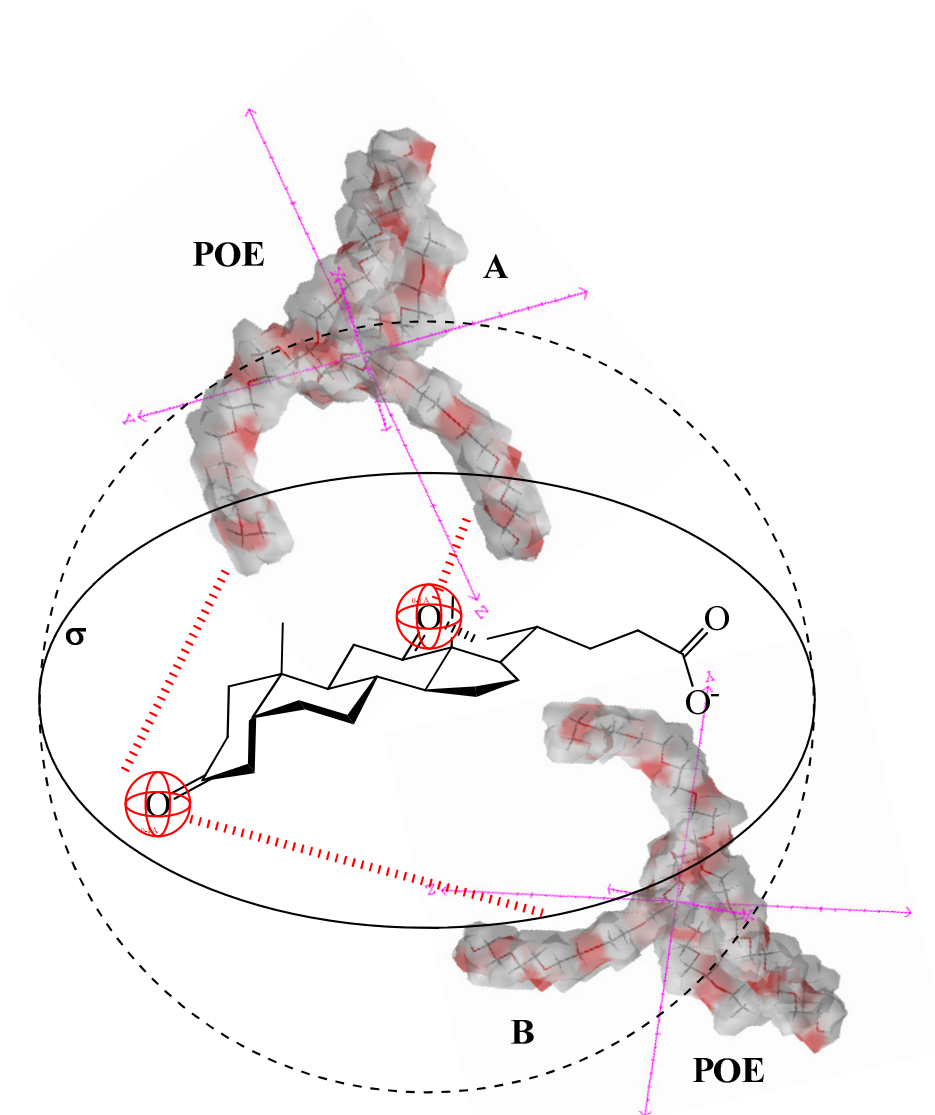


Slika 2.8. Algoritam za ispitivanje binarnih smeša surfaktanata sa nesimetričnom molekulskom strukturom [27]



Ako je ispitivana binarna smeša surfaktanata simetrična po dodatnoj slobodnoj entalpiji, odnosno za slučaj prve desne grane algoritma kada je odgovor „ne“ (Slika 2.8.), pretpostavka  $S_{ij}^E = 0$  nije prihvatljiva kod mešovutih micela sa nesimetričnim gradivnim jedinicama kada je ispunjen uslov:

$$\frac{\left| (x_i^{mM})^{R-H} - (x_i^{mM})^R \right|}{(x_i^{mM})^{R-H}} < \Theta$$



Slika 2.9. Steroidni skelet kao nesimetrični molekularni element surfaktanta: vrednost  $E_{ij}$  zavisi od orijentacije (A) ili (B) polioksietilenske grupe (POE) [27]

Ako je mali interval  $\alpha_i$  (molski udeo u smeši) u kojem se posmatra promena koeficijenta interakcije  $\beta_{ij}$  i ukoliko je barem jedna gradivna jedinica binarne mešovite micelle nesimetričan molekul, onda važi  $S_{ij}^E \neq 0$ . Koordinacioni broj ( $z$  – broj interakcija između odabranog molekula i prvog suseda) može se smatrati konstantim (2.28) u posmatranom intervalu  $\alpha_i$ . Vrednosti  $E_{ij}$  su promenljive u zavisnosti od različite međusobne orijentacije gradivnih jedinica (Slika 2.9.). Iz ovoga se zaključuje da prostorna raspodela surfaktanata u binarnoj miceli nije nasumična, tj.  $E_{ij}$  (prosečna molarna energija međumolekulske interakcije dveju različitih gradivnih jedinica  $i, j$ ) nije konstantna u odnosu na  $\alpha_i$ . Takođe,  $E_{ij}$  ne zavisi od sastava binarne smeše surfaktanata sa simetričnom strukturom. Za svako stanje sa različitim koordinacionim brojem  $z$  može se odrediti maksimalna konfiguraciona entropija. Promena koeficijenta interakcije  $\beta_{ij}$  u zavisnosti od  $\alpha_i$  predstavlja posledicu promene koordinacionog broja  $z$ . Da bi se proverila ispunjenost uslova za korišćenje RST jednačina kod mešoviti micela sa simetričnim surfaktantima, ispituje se zavisnost koeficijenta interakcije  $\beta_{ij}$  od temperature.

Kada se diferencira izraz (2.34) za dodatnu Gibbs-ovu energiju po  $\alpha_i$  dobija se:

$$\left( \frac{\partial G_{ij}^E}{\partial \alpha_i} \right)_{p,T} = RT \left( \beta_{ij} \frac{\partial x_i^{mM} x_j^{mM}}{\partial \alpha_i} + x_i^{mM} x_j^{mM} \frac{\partial \beta_{ij}}{\partial \alpha_i} \right) \quad (2.37)$$

U jednačini (2.37) član  $x_i^{mM} x_j^{mM} \partial \beta_{ij} / \partial \alpha_i$  je jednak nuli, pod uslovom da važi RST (nesimetrični molekuli surfaktanata). U tom slučaju se dobija:  $\partial H_{ij}^E / \partial \alpha_i = \beta_{ij} \partial x_i^{mM} x_j^{mM} / \partial \alpha_i$ . Kada se diferencira opšta jednačina za dodatnu Gibbs-ovu slobodnu energiju ( $G=H-TS$ ) po  $\alpha_i$  dobija se:

$$\left( \partial G_{ij}^E / \partial \alpha_i \right)_{p,T} = \left( \partial H_{ij}^E / \partial \alpha_i \right)_{p,T} - T \left( \partial S_{ij}^E / \partial \alpha_i \right)_{p,T}$$

Upoređivanjem prethodne jednačine sa (2.37), pod uslovom da RST ne važi (nesimetrični molekuli surfaktanata), dobija se:

$$R x_i^{mM} x_j^{mM} \frac{\partial \beta_{ij}}{\partial \alpha_i} = - \frac{\partial S_{ij}^E}{\partial \alpha_i} \quad (2.38)$$

Vrednost razlike  $(x_i^{mM})^{R-H} - (x_i^{mM})^R$  može se odrediti i proveriti i na drugi način, ukoliko se  $(x_i^{mM})^R$  odredi drugom model nezavisnom metodom (Slika 2.8). U radovima [83, 84] prikazan je postupak za određivanje molskog udela surfaktanta  $i$  u mešovitoj miceli  $(x_i^{mM})$ , uz uslov ravnoteže dat jednačinom (2.20), u kojem se miclele posmatraju kao pseudofaze, ali se i u vodenom rastvoru uzimaju u obzir koeficijenti aktivnosti surfaktanata  $(f_i^b)$ . U tom slučaju, aktivnost surfaktanta  $i$   $(a_i^{mM})$  u micelarnoj pseudofazi određena je izrazom:

$$a_i^{mM} = x_i^{mM} f_i^{mM} = \frac{a_i^b}{(a_i^b)^0} = \frac{c_i f_i^b}{cmc_i (f_i^b)^0} \approx \frac{c_i}{cmc_i} = \frac{\alpha_i cmc_{ij}}{cmc_i} \quad (2.39)$$

Koeficijenti aktivnosti u vodenom rastvoru mogu se zanemariti kod nejonskih surfaktanta. Za binarnu pseudofazu, koja sadrži  $n_i^{mM}$  mola surfaktanta  $i$ , odnosno  $n_j^{mM}$  mola surfaktanta  $j$ , važi Gibbs–Duham-ova jednačina:

$$\begin{aligned} n_i^{mM} d\mu_i^{mM} + n_j^{mM} d\mu_j^{mM} &= n_i^{mM} d \ln a_i^{mM} + n_j^{mM} d \ln a_j^{mM} = 0 \\ d \ln a_i^{mM} &= -\frac{n_j^{mM}}{n_i^{mM}} d \ln a_j^{mM} = -\frac{1-x_i^{mM}}{x_i^{mM}} d \ln a_j^{mM} \\ \frac{d \ln a_i^{mM}}{d \ln a_j^{mM}} &= -\frac{a_j^{mM}}{a_i^{mM}} \frac{da_i^{mM}}{da_j^{mM}} = -\frac{a_j^{mM}}{a_i^{mM}} \tan \alpha_{a_i^{mM}=f(a_j^{mM})} = \frac{1-x_i^{mM}}{x_i^{mM}} \end{aligned} \quad (2.40)$$

Određivanjem vrednosti  $a_i^{mM}$  u zavisnosti od  $a_j^{mM}$ , odnosno određivanjem vrednosti funkcije  $a_i^{mM} = f(a_j^{mM})$  kada se aktivnosti određuju jednačinom (39), može se dobiti nagib:  $\tan \alpha_{a_i^{mM}=f(a_j^{mM})}$ , i odrediti molski udeo surfaktanta u binarnoj micelarnoj pseudofazi  $(x_i^{mM})^P$  na osnovu izraza (2.40).

## 2.5 Hofmeister-ov efekat

Hofmeister serija ili liotropna serija je klasifikacija jona, poređanih po jačini njihove sposobnosti isoljavanja proteina. Rastvorljivost proteina je kompleksna funkcija fizičko-hemijske prirode proteina, pH vrednosti, temperature i koncentracije korišćene soli. Takođe, ova pojava zavisi i od toga da li je so kosmotropska ili haotropna. U teorijama o strukturi vode navodi se da neki joni (kosmotropi) stabilizuju strukturu okolnih jona i pojačavaju hidrofobni efekat, čime se stabilizuju molekuli proteina, a za razliku od njih postoje joni (haotropi) koji će poremetiti strukturu vode i destabilizovati molekule proteina [86].

Kosmotropi stabilizuju vodenu strukturu i imaju jake interakcije sa molekulima vode, dok haotropi destabilizuju strukturu vode i imaju slabiju interakciju sa molekulima vode nego što je interakcija između samih molekula vode. Efekte ovih promena je prvi put otkrio Franz Hofmeister, koji je proučavao uticaj katjona i anjona na rastvorljivost proteina [87].

Hofmeister je otkrio niz soli koje imaju karakteristične efekte na rastvorljivost proteina i, kako je kasnije otkriveno, na stabilnost njihove sekundarne i terciarne strukture. Anjoni imaju veći efekat od katjona [88], koji zavisi od rednog (atomskeg) broja, odnosno od prečnika jona.

Pokazalo se da joni prisutni u rastvoru proteina utiču na njihovu rastvorljivost. Isto tako, ovaj efekat značajno utiče na njihove fizičke osobine i stabilnost, i promovise hidrofobne asocijacije. Ovaj fenomen (Hofmeister-ov efekat) zavisi od konkretnih jona koji su prisutni u rastvoru i prvi put je proučen rangiranjem različitih jona prema njihovoj sposobnosti da istalože proteine iz belanca kokošijeg jajeta.

Hofmeister-ov niz se prikazuje kao serija katjona i anjona, poređanih po jačini njihove sposobnosti da istalože proteine. Anjoni imaju jače izražen Hofmeister-ov efekat od katjona [88].

Sledi prikaz nekih referentnih anjona i katjona poređanih po opadajućoj jačini Hofmeister-ovog efekta.

Anjoni:  $F^- \approx SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > NO_3^- > Br^- > ClO_3^- > I^- > ClO_4^- > SCN^-$

Katjoni:  $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$

Jedno objašnjenje mehanizma Hofmeister-ovog efekta zasniva se na specifičnim interakcijama između jona i molekula vode koja sadrži proteine [89].

Hofmeister-ov efekat nekog jona označava deo serije koja prikazuje raspored jona u odnosu na relativan uticaj koji oni imaju na fizička svojstva mnogih procesa koji se odigravaju u vodenoj sredini, od uticaja na formiranje koloidnih rastvora, do uticaja na formiranje različitih konfiguracija proteinskih makromolekula [89].

Neka istraživanja ukazuju na to da joni narušavaju prirodnu mrežu vodoničnih veza molekula vode, pa time ispoljavaju slično dejstvo kao povišenje pritiska ili temperature [90].

Tumačenje Hofmeister-ove serije uveliko zavisi od koncentracije soli koja je u rastvoru, jer pri malim koncentracijama efekat je prekriven očekivanim ponašanjem molekula vode, dok pri velikim koncentracijama fine razlike u uticaju koje su potrebne da bi se uspostavio redosled (serija) jona postaju nevidljive. Joni kod kojih je prisutna velika hidratacija značajno menjaju kapacitet molekula vode za formiranje međusobnih vodoničnih veza, što uzrokuje lokalna narušavanja tetraedarske mreže vodoničnih veza molekula vode [91]. Očekuje se da uticaj jona prividno smanjuje raspoloživu količinu molekula vode koja bi inače stupala u interakciju sa makromolekulom. Ako se posmatraju soli žučnih kiselina, koje su amfifilni bipolarni površinski aktivni molekuli, može se očekivati da će joni svojim prisustvom u određenoj koncentraciji uzrokovati raniju pojavu kritične micelarne koncentracije u vodenom rastvoru soli žučnih kiselina. Ako razmotrimo katjone I-a grupe periodnog sistema elemenata, iako su nosioci iste količine pozitivnog naelektrisanja, zbog različite gustine tog naelektrisanja očekuje se da manji katjoni pokazuju veći uticaj od masivnijih katjona, pa je moguće raspoređivanje ovih jona u Hofmeister-ovu seriju u odnosu na to kako utiču na formiranje micela soli žučnih kiselina.

Mnogi naučni radovi u dostupnoj literaturi izučavaju različite aspekte Hofmeister-ovog efekta.

Radovi o molekulskim modelima jedinjenja pokazuju kako jonske interakcije vezane za Hofmeister-ov efekat utiču na stabilnost proteina. U mnogim radovima kao najčešći

indikator koristi se konstanta izoljavanja, koja se može koristiti kao pokazatelj kako jonske interakcije utiču na stabilnost proteina. Nulta tačka u Hofmeister seriji, koji deli proteinske denaturante od stabilizatora, proizilazi iz suprotnih interakcija sa različitim klasama grupa: Hofmeister-ovi joni izoljavaju nepolarne grupe i povećavaju solubilizaciju u peptidnoj grupi. Rad [92] objašnjava mehanizme ove dve klase jonskih interakcija.

Debye-Hückel-ova teorija predviđa da je logaritam rastvorljivosti proteina srazmeran kvadratnom korenu jonske jačine [93].

U radu [94], gde je ispitivan uticaj NaCl na hidrofobnost odabranih žučnih kiselina kao mera hidrofobnosti uzeti su reticioni faktor,  $k$  (HPLC) i CMC vrednost žučne kiseline, odnosno poređen je uticaj NaCl dobijenog hromatografskom metodom sa eksperimentom korišćenim za dobijanje CMC vrednosti.

Ako se pretpostavi da kontrajon utiče samo na vrednost naelektrisanja micela, onda bi njegov uticaj bio isti za sve žučne kiseline. U ranijoj literaturi i u samom radu [94] dokazano je da uticaj elektrolita zavisi od same žučne kiseline.

Poša i saradnici [94] ukazuju na značaj nestabilizovanih molekula rastvarača u ovom procesu. To su molekuli rastvarača koji okružuju hidrofobnu površinu žučne kiseline. Broj stabilizovanih molekula rastvarača (molekuli rastvarača koji okružuju hidrofilnu površinu žučne kiseline) u solvacionom omotaču raste sa porastom broja okso grupa u molekulu žučne kiseline, iz sternih razloga. Na taj način broj nestabilizovanih molekula rastvarača opada. Pokazano je da je efekat desolvatacija hidrofobne površine žučne kiseline jači sa povećanjem koncentracije NaCl. Ako se gleda uticaj na same žučne kiseline, povećanje koncentracije NaCl dovodi do smanjenja CMC vrednosti, jer je povećana desolvatacija hidrofobne površine žučne kiseline, tj. smanjen je broj nestabilizovanih molekula vode i povećana je  $\beta$  površina molekula preko kojih se žučne kiseline i povezuju prilikom samoasocijacije u micela. Ovo povećanje je veće ukoliko je žučna kiselina hidrofobnija.

U radu [94] je zato formalno izjednačena standardna slobodna energija formiranja micela sa standardnom slobodnom energijom desolvatacije hidrofobne površine žučne

kiseline i dobijen je izraz koji povezuje vrednost kritične micelarne koncentracije sa brojem nestabilizovanih molekula vode.

U ispitivanjima uticaja Hofmajsterovog efekta na micelizaciju uveden je pojam specifične adsorpcione energije,  $u_0$ , za čije kompjutersko generisanje nisu uključeni prilagodljivi parametri. Vrednost  $u_0$ , jon specifična adsorpciona energija, jednaka je Van der Waals-ovoj adsorpcionoj energiji jona na površini između dve faze. Pokazalo se da je nezavisna od vrste surfaktanta, što joj daje široku primenu. Vrednosti adsorpcionih energija jona su izračunate na osnovu njihovih osnovnih veličina: prečnika slobodnog i hidratisanog jona, moguće deformacije hidratacione ljuske na granici faza, polarizabilnosti i jonizacionog potencijala jona i granične faze, i u skladu su sa Hofmajsterovom serijom kojom je on razvrstao jone na osnovu njihove aktivnosti. Dalje, predstavljen je model koji predstavlja zavisnost CMC vrednosti od date adsorpcione energije jona i ovi rezultati su i potvrđeni na eksperimentalnim podacima [95].

Na osnovu radova [94] i [95], može se zaključiti da, za istu vrednost koncentracije elektrolita, vrednosti snižene CMC nakon dodatka elektrolita za različite žučne kiseline zavise zapravo samo od početne CMC vrednosti same žučne kiseline. Vrednosti za CMC proučavanih žučnih kiselina se razlikuju u zavisnosti od njihove hidrofobnosti. Hidrofobnije žučne kiseline, sa više nestabilizovanih molekula vode imaju niže CMC vrednosti. Ovo potvrđuje prvu teoriju da uticaj jona zavisi od broja nestabilizovanih molekula vode

Da bi se pravilno uporedila relativna efikasnost jona u nekom procesu, eksperimenti koji se bave efektima karakterističnim za određeni jon (npr. Hofmeister) treba da sadrže informacije o tome koji se protein posmatra, koji su kontra-joni prisutni u rastvoru, da li postoje neki specifični uticaji na jone, jačina pH i temperatura [96].

Taloženje proteina pokazuje visok stepen korelacije sa količinom jona prisutnih u vodi. Snažno hidratirani anjoni uklanjaju slobodne molekule vode iz solvatacione ljuske proteina i dehidriraju površinu (isoljavanje proteina) [97, 98].

Isoljavanje ili taloženje proteina (kristalizacija proteina) se koristi kao metoda za razdvajanje proteina. Ovaj proces se takođe koristi da bi se koncentrovali razblaženi rastvori proteina. So se može ukloniti iz rastvora pomoću dijalize. Koncentracija soli koja je potrebna

da bi se protein istaložio iz rastvora razlikuje se od proteina do proteina. U strukturi proteina prisutne su hidrofobne i hidrofilne aminokiseline. Ako je dovoljan deo površine proteina hidrofilan, protein će biti rastvoren u vodi. Kada se koncentracija soli povećava, joni soli privlače deo molekula vode, što smanjuje broj slobodnih molekula vode koji mogu da stupaju u interakciju sa naelektrisanim delom proteina. Zbog smanjenja broja molekula solventa, pojačavaju se interakcije između samih proteina i postaju jače od interakcija proteina sa vodom, što izaziva koagulaciju proteina koji međusobno stupaju u interakciju sa hidrofobnim delovima molekula, i ovaj proces se naziva isoljavanje proteina [99].

Pojava isoljavanja odvija se u skladu sa Hofmeister-ovim nizom za veliki broj proteina iznad izoelektrične tačke [100].

Mnogi nerastvorni proteini mogu se rastvoriti u vodi ukoliko pH vrednost nije u blizini izoelektrične tačke [101], jer se naelektrisani molekuli proteina međusobno odbijaju hidrofobnim regijama koje su prekrivene solvatacionom ljuskom veoma male gustine, čime se izbegava direktna interakcija dva molekula proteina. U ovom slučaju, dodavanjem jona smanjuju se odbojne interakcije i solvataciona ljuska vode organizaciju tako dovodi do taloženja proteina [101].

Hofmeister-ov efekat je relevantan za široku oblast proučavanja enzimske aktivnosti [102-104], stabilnosti proteina, međusobnih interakcija proteina, kristalizacije proteina, optičke rotacije šećera i aminokiselina, kao i rasta bakterija [105].

Enzimi, kao i svi proteini, sadrže veliki broj kiselih i baznih funkcionalnih grupa lociranih uglavnom na spoljašnjoj površini molekula. Površinsko naelektrisanje molekula enzima koji se nalazi u vodenom rastvoru, može se promeniti kao rezultat promena pH vrednosti rastvora koje utiču na ravnotežu disocijacije kiselih i baznih grupa prisutnih u enzimu. Kao posledica toga, enzimska aktivnost, strukturne karakteristike i rastvorljivost enzima mogu se značajno promeniti. Promene u pH vrednosti rastvora mogu uticati na odnos količine supstrata i proizvoda enzimske reakcije. Promene u naelektrisanju molekula enzima će se ogledati u promenama sposobnosti vezivanja supstrata i efikasnosti katalize. Preovladava mišljenje da se uticaj pH vrednosti rastvora na enzimsku reakciju može objasniti uz pretpostavku da samo jedan od mogućih jonizovanih oblika molekula enzima dovodi do



najizraženijeg katalitičkog delovanja. Drugim rečima, postoji optimalna pH vrednost koja favorizuje nastanak maksimalne koncentracije kompleksa enzim-supstrat [106].

Jonska jačina je još jedan od parametara koji može uticati na katalitičku aktivnost. Pri visokoj vrednosti jonske jačine, može dovesti do smanjenja vrednosti  $pK_a$  karboksilne kiseline, verovatno zbog konkurencije katjona sa vodonikovim jonom u karboksilnoj grupi, u rastvoru neutralne pH vrednosti. Uticaj na ukupno naelektrisanje molekula enzima nije značajan, izuzev ukoliko se promena naelektrisanja pojavljuje na aktivnom mestu molekula [106].

Iako se smatra da su jonska jačina i pH vrednost značajni faktori koji utiču na aktivnost enzima, efekti specifičnih jona nisu objašnjeni klasičnim teorijama elektrostatike u fizičkoj hemiji. Konformaciona struktura enzima, stabilnost i aktivnost su rezultat ne samo elektrostatičkih sila, nego i složenog uzajamnog dejstva raznih drugih faktora. Ovi faktori se kategorizuju kao: elektrostatički, efekti dipola, Van der Valsove sile, vodonične veze, solvatacija i efekti polarizacije, ravnoteža disocijacije naelektrisanih grupa. Ovi faktori, koji imaju svoje poreklo u teorijama o interakciji između molekula i rastvarača, predstavljaju pojednostavljeno tumačenje mnogo komplikovanijih odnosa prisutnih u rastvoru, između kojih nema jasnih granica [106].

U radu [107] prikazan je Hofmeister-ov efekat u zavisnosti od različitih anjona koji imaju specifične interakcije sa površinom enzimskih molekula.

Istraživanja pokazuju veliki uticaj neorganskih soli i jona na pH pufera i aktivnost i stabilnost alkalne fosfataze. Sva tri aspekta su kontrolisana direktno ili indirektno Hofmeister-ovim efektom. Preovlađuje stav da jak elektrolit može da utiče na pH rastvora pufera samo preko elektrostatičke interakcije. Istraživanja pokazuju da pH pufera može da se značajno menja dodavanjem soli i da je ova promena jonski specifična u skladu sa Hofmeister-ovim nizom. I enzimaska aktivnost i stabilnost su u korelaciji sa Hofmeister-ovim nizom. Kombinacija opštih elektrostatičkih interakcija i specifičnih jonskih sila disperzije doprinose toj pojavi. Prisutan je mehanizam koji se zasniva na sposobnosti jona da utiče na solvatacionu ljusku oko molekula enzima i površinu enzima sa unutrašnjom strukturom. Anjoni imaju veći uticaj na stabilnost enzima od katjona. Na promenu aktivnosti enzima dodavanjem različitih soli utiču i anjoni i katjoni, promena aktivnosti razlikuje se od enzima

do enzima, jer je mehanizam promene aktivnosti vezan za uticaj oba ova jona na površinski pH, aktivno mesto, i katalitički mehanizam svakog specifičnog enzima. Sve ovo može se objasniti uz pomoć Hofmeister-ovog niza. Studija stabilnosti alkalne fosfataze pokazuje još jedan primer kako kosmotropski anjoni i haotropski katjoni omogućavaju veću enzimsku aktivnost. Aktivnost alkalne fosfataze je optimalna u vodenom rastvoru u kojem je prisutna so poput  $\text{KNO}_3$ , čiji katjon i anjon imaju sličnu jačinu kosmotropskih i haotropskih svojstava [108].

### 3. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su sledeći:

1. Ispitivanje primene promene kiselinske konstante ( $pK_a$ ) micelarno vezane žučne kiseline u odnosu na slobodnu žučnu kiselinu za opisivanje stepena termodinamičke stabilizacije binarne mešovite micela.

Cilj rada je termodinamička karakterizacija binarne smeše surfaktanata: natrijum-hiodeoksiholata (HD) i polisorbata Tween 20 (T-20), Tween 60 (T-60), pošto do sada ovi micelarni sistemi nisu još ispitani. Radi proučavanja uticaja dužine hidrofobnog segmenta polisorbata, odnosno stereohemije OH grupa steroidnog skeleta na sinergistički efekat između različitih gradivnih jedinica (dodatna Gibbs-ova energija) mešovite micela, termodinamički parametri micelarnih sistema HD – T-20, odnosno HD – T-60 upoređuju se sa termodinamičkim parametrima micelarnih sistema natrijum-holata (C) – T-20, odnosno C – T-60. Takođe, cilj je da se primenom potenciometrijske titracije micelarno vezanog anjona žučne kiseline ispita mogućnost brze karakterizacije binarnih mešovitih micela soli žučnih kiselina – polisorbata u smislu mogućeg sinergizma (termodinamičke stabilizacije), što je poželjno u industrijskim laboratorijama. Naime, kod tenziometrijskog ili spektrofluorometrijskog (sa probnim molekulom) određivanja kritične micelarne koncentracije binarne smeše surfaktanata, za svaki odgovarajući sastav smeše surfaktanata (molski udeo  $\alpha$ ) potrebno je praviti seriju rastvora različitih koncentracija. Dok kod potenciometrijske titracije dovoljan je jedan rastvor binarne smeše (iznad kritične micelarne koncentracije) za svaku vrednost  $\alpha$ .

2. Postavljanje fizičko hemijskog modela koji opisuje promenu  $pK_a$  vrednosti micelarno vezane žučne kiseline.

Cilj je termodinamička karakterizacija binarne smeše surfaktanata Na-hiodeoksiholata i Tritona X-100 koja u literaturi još nije opisana. Ovaj sistem je interesantan sa stanovišta biomedicinske primene, pošto hiodeoksiholna kiselina ima dve ekvatorijalne OH grupe u steroidnom skeletu, što je poželjno u pogledu smanjenja hemolitičkog potencijala. Takođe, cilj je ispitati da li je moguća procena termodinamičke stabilnosti

mešovitim micela Na-hiodeoksiholata – Tritona X-100 i mešovitim micela Na-holata – Tritona X-100 na osnovu potenciometrijske titracije njihovog micelnog rastvora.

3. Ispitivanje Hofmeister-ovog efekta pri različitim temperaturama na termodinamičku stabilizaciju micelnih sistema.

Tumačenje Hofmeister-ove serije uveliko zavisi od koncentracije soli koja je u rastvoru, jer pri malim koncentracijama efekat je prekriven očekivanim ponašanjem molekula vode, dok pri velikim koncentracijama fine razlike u uticaju koje su potrebne da bi se uspostavio redosled (serija) jona postaju nevidljive. Joni kod kojih je prisutna velika hidratacija značajno menjaju kapacitet molekula vode za formiranje međusobnih vodoničnih veza, što uzrokuje lokalna narušavanja tetraedarske mreže vodoničnih veza molekula vode [91]. Očekuje se da uticaj jona prividno smanjuje raspoloživu količinu molekula vode koja bi inače interreagovala sa makromolekulom. Ako se posmatraju soli žučnih kiselina, koje su amfifilni bipolarni površinski aktivni molekuli, može se očekivati da će joni svojim prisustvom u određenoj koncentraciji uzrokovati raniju pojavu kritične micelarne koncentracije u vodenom rastvoru soli žučnih kiselina. Ako razmotrimo katjone I-a grupe periodnog sistema elemenata, iako su nosioci iste količine pozitivnog naelektrisanja, zbog različite gustine tog naelektrisanja očekuje se da manji katjoni pokazuju veći uticaj od masivnijih katjona, pa je moguće raspoređivanje ovih jona u Hofmeister-ovu seriju u odnosu na to kako utiču na formiranje micela soli žučnih kiselina.

Očekivani rezultati istraživanja su sledeće hipoteze:

1. Promena  $pK_a$  vrednosti micelarno vezane žučne kiseline je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa apsolutnim vrednostima koeficijenta interakcije - povećanje  $pK_a$  vrednosti opisuje termodinamičku stabilizaciju mešovite micelle.
2. Poznavajući particioni koeficijent žučne kiseline za 1-oktanol i poznavajući kritičnu micelarnu koncentraciju anjona žučne kiseline, moguće je konstruisati fizičko hemijski model po kojem micelarno vezana žučna kiselina ima dodatnu Gibbs-ovu energiju (excess Gibbs energy) iz koje proizilazi promena  $pK_a$  vrednosti.
3. Što je manji prečnik katjona, to je veća termodinamička stabilizacija micelnog sistema u vodenom rastvoru.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

### 4.1 Materijal

Tween-ovi (20, 60) čistoće >99% nabavljeni su od kompanije J.T. Baker. Triton X-100 nabavljen je od kompanije J.T. Baker (>99%). Natrijum hiodeoksiholat, natrijum deoksiholat i natrijum holat kupljeni su od kompanije Sigma-Aldrich (čistoće >99%).

Katjoni ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) dobijeni su u vodenim rastvorima iz hlorida ovih metala.

### 4.2 Metode

#### 4.2.1 Spektrofluorimetrija

Spektrofluorimetrija (fluorescentna spektroskopija) bavi se elektronskim i vibracionim stanjima. Molekuli se nalaze na različitim energetske nivoima. U fluorescentnoj spektroskopiji uzorak se ekscituje iz osnovnog stanja, apsorpcijom fotona, na neki od vibracionih ekscitiranih stanja. Sudari ekscitiranih molekula sa drugim molekulima uzorka uzrokuju gubitak vibracione energije, dok se ne postigne najniže vibraciono stanje.

Molekul se vraća u osnovno vibraciono stanje emitujući foton, a emitovani fotoni će imati različite energije, i različite frekvencije. Pri fluorescenciji molekula pojavljuju se snopovi zračenja, jer se elektronski pobuđeni molekuli mogu relaksirati u bilo koji od nekoliko vibracionih nivoa u osnovnom elektronskom stanju. Molekulski fluorescentni snopovi sastavljeni su od linija većih talasnih dužina, odnosno manjih energija od apsorbovanog zračenja. Taj pomak talasnih dužina ka većim vrednostima naziva se Stokes-ov pomak.

Pirenski fluorescentni spektri mogu se koristiti za određivanje kritične micelarne koncentracije rastvora surfaktanata [109]. Piren  $I_1/I_3$  odnos je često korišćena metoda određivanja ovog parametra micelarnih sistema [110]. Određivanje CMC pomoću pirena koristi se u rastvorima čistih surfaktanata, i u rastvorima mešoviti micela [111].

Kriva piren  $I_1/I_3$  odnosa u funkciji ukupne koncentracije surfaktanata pokazuje infleksionu tačku oko kritične micelarne koncentracije. Ispod CMC vrednosti piren  $I_1/I_3$  odnos pokazuje polarnu sredinu, a iznad CMC piren  $I_1/I_3$  odnos dostiže približno konstantnu vrednost zbog inkorporacije probnog molekula u hidrofobni region micela.

Funkcija zavisnosti  $I_1/I_3$  odnosa od ukupne koncentracije surfaktanata može se opisati Boltzmann-ovom sigmoidalnom krivom. Odnos  $x_0/\Delta x$  može upotrebiti za odabir načina određivanja CMC, tj. koji deo sigmoidalne krive se koristi za definiciju CMC. [111].

U literaturi se infleksiona tačka  $x_0$  koristi za određivanje CMC za surfaktante koji imaju vrlo niske CMC vrednosti (ispod  $1\text{mmol/dm}^3$ ), a presek sa tangentom koja prolazi kroz  $x_0$  koristi za određivanje CMC u ostalim slučajevima surfaktanata [112].

Molekuli pirena se prevode u pobuđeno stanje na talasnoj dužini od 334nm (Agilent Cary Eclipse spektrofluorifotometar opremljen sa Peltier termostatskim držačem ćelija) [113]. Promena intenziteta prve ( $I_1$ , 373 nm) i treće ( $I_3$ , 384 nm) vibracione trake emisionog spektra pirena posmatra se u funkciji od ukupne koncentracije surfaktanata ( $c_T$ ) na temperaturi od 298,15 K (ili kada je reč o merenju uticaja katjona prve grupe na CMC i proučavanju Hoffmeister-ovog efekta, u više temperaturnih vrednosti do 323,15 K). Kritične micelarne koncentracije (CMC) čistog surfaktanta, kao i CMC binarnih smeša surfaktanata, određivane su u presecima pravih dve tangente u ravni  $(I_1/I_3) - c_T$ . Merenja su ponavljana ( $n=7$ ) sedam puta da bi se potvrdila ponovljivost merenja. Greška u određivanju CMC vrednosti nije prelazila 4% (greška merenja predstavlja  $error = (s_{\bar{x}}/\bar{x})100$ , gde je  $s_{\bar{x}}$  standardna devijacija srednje vrednosti  $\bar{x}$ ).

#### 4.2.2 Titracija

Titracija je izvedena pomoću Radiometer Analytical TIM870 Titration Manager, uz korišćenje softvera Titra Master 85 [20]. Titracija je sprovedena u prisustvu 300 mM NaCl i u atmosferi azota. Prilikom titracije korišćena je dinamička infleksiona tačka, sa PHC 2001 elektrodom (kombinovana pH elektroda), sa brzinom birete 10 ml/min, akceptacijom (acceptation) 10 s, i kriterijumom stabilnosti 50 mpH/min. Titracije su ponavljane 5 puta i izračunata je prosečna  $pK_a$  vrednost. Greška određivanja vrednosti  $pK_a$  nije bila veća od 3%.

Vrednost  $pK_a$  se može izračunati na osnovu formule Back-a i Steenberg-a [114]:

$$pK_a = pH_y + \log \frac{HA}{TOT-HA} + \frac{0.5\mu^{0.5}}{1 + \mu^{0.5}}$$

gde su:

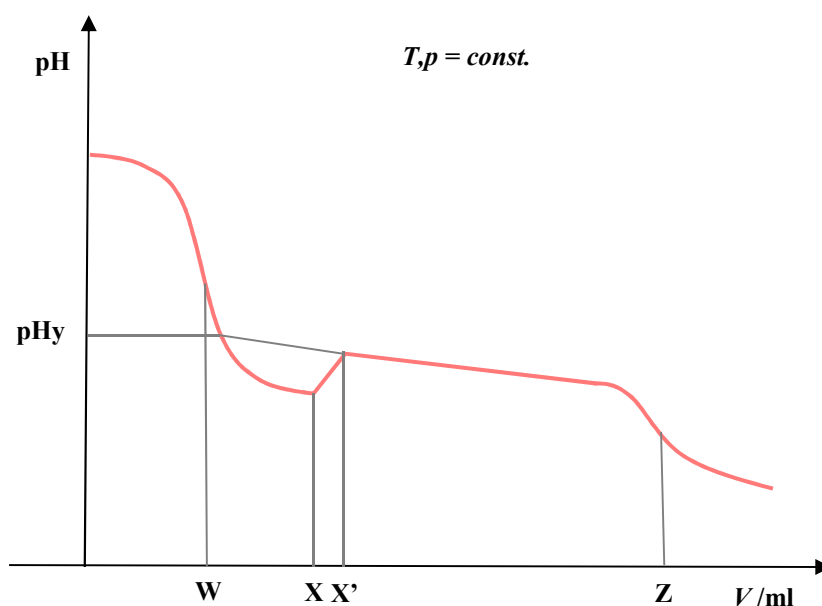
$pH_y$  – pH vrednost u tački y;

HA – zapremina hlorovodonične kiseline koja je potrebna za početak precipitacije natrijumovih soli žučnih kiselina;

TOT – ukupna zapremina hlorovodonične kiseline koja je potrebna za neutralizaciju NaOH i natrijumovih soli žučnih kiselina;

$I$  – jonska jačina u tački y,

HA = Z – W [ml]; TOT = y – W [ml] (Slika 4.1).



Slika 4.1. Potenciometrijska kriva titracije natrijum-holata i natrijum-hidroksida sa hlorovodoničnom kiselinom

U rastvorima anjona žučnih kiselina (u prisustvu Triton X-100) 2,5 mol/dm<sup>3</sup> natrijum hidroksid je dodat da poveća pH vrednost rastvora iznad 10. Hidrohlorna kiselina (standardizovana na nivou četvrte decimale) pripremljena je u koncentraciji od 10 mmol/dm<sup>3</sup> za titraciju natrijumovih soli holne i hiodeoksiholne kiseline (aliquot od 10 ml za potenciometrijsku titraciju u kojem je  $c = 10$  CMC – kritična micelarna koncentracija anjona

žučne kiseline) i u koncentraciji od 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> za titraciju anjona žučnih kiselina u pseudofazi mešovite micelle (aliquot od 100 ml za potenciometrijsku titraciju,  $c = 10 \text{ CMC}_{ij}$  – kritična micelarna koncentracija smeše surfaktanata natrijumove soli žučne kiseline i Tritona X-100). Greška određivanja  $pK_a$  vrednosti nije prelazila 2,5%.

#### 4.2.3 Određivanje slobodne količine kontra jona

Vrednosti frakcije micelarno vezanog kontra jona ( $\xi$ ) su određivane pomoću Radiometer TitraLab 845 titratora koji poseduje jonski selektivnu elektrodu ISE21Na i referentnu elektrodu RedRod201 (Ag/AgCl) na sobnoj temperaturi. Kalibracija je izvršena sa rastvorima NaCl.

#### 4.2.4. Termometrijska titracija

Eksperimenti u kojima je korišćena termometrijska titracija su izvođeni na 283,15, 288,15, 293,15 i 303,15 K ( $T \pm 2 \times 10^{-4}$  K) uz praćenje termalne aktivnosti (thermal activity monitor - TAM) pomoću mikrokolorimetar izotermalnog toplotnog protoka (ThermoMetric LKB 2277, Lund, Sweden). Identičan detektor, koji poseduje ćeliju za uzorak i referentnu ćeliju je takođe korišćen. Ćelija sa uzorkom, koja poseduje mehanizam za mešanje rastvora, i Lund mikrotitrator je napunjen sa 2 ml vode. Titrant je iniciran u ćeliju u alikvotima od 10  $\mu$ l na brzini mešanja od 60 rpm (rotacija po minuti), u intervalima od 90 minuta (0,5 ml; 5 mM HD – Triton X-100 (molarni odnos 1:1); 5 mM C – Triton X-100 (molarni odnos 1:1); 200 mM HD; 200 mM C, 5 mM Triton X-100). Eksperiment je kompjuterski upravljani pomoću softvera DigiTam 4.1. Nivo šuma bazne linije kalorimetra tokom merenja bio je u granicama  $\pm 0,05 \mu\text{Jsec}^{-1}$ . Ponovljivost dobijenih kalorimetrijskih pikova (maksimuma) u eksperimentu sa titracijom bila je u proseku bolja od 2%.

#### 4.2.5. Nuklearna Overhauser-ova spektroskopija (Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy - NOESY)

Nuklearna Overhauserova spektroskopija (Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy - NOESY) je neinvazivna tehnika koja može da se koristi za određivanje lokacije solubilizata u micelama ili njegove interakcije sa micelom. Ova merenja (2 mM HD – Triton X-100 (molarni odnos 1:1) u D<sub>2</sub>O i 2 mM of C – Triton X-100 (molarni odnos 1:1) u D<sub>2</sub>O, 293,15 K) izvršena su pomoću uređaja Bruker Avance III 500 (500 MHz).



## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. Binarne mešovite micelle polisorbata (Tween 20 i Tween 60) i žučnih soli (Na-holata odnosno Na-hiodeoksiholata): RST i promena $pK_a$ vrednosti micelarne žučne kiseline – novi pristup proceni stabilnosti mešovitih micela

Ovaj deo istraživanja bavi se termodinamičkom karakterizacijom binarnih smeša surfaktanata: natrijum hiodeoksiholata (HD) i polisorbata Tween 20 (T20), zatim HD i Tween 60 (T60). Upoređuju se termodinamički parametri micelarnih sistema HD-T20, odnosno HD-T-60 sa termodinamičkim parametrima micelarnih sistema natrijum holata C-T20, odnosno C-T60, radi proučavanja uticaja dužine hidrofobnog segmenta polisorbata, odnosno stereochemije OH grupa steroidnog skeleta na sinergističke efekte između različitih gradivnih jedinica mešovite micelle, odnosno na dodatnu Gibbs-ovu energiju. Ovo istraživanje povezuje konstantu protolize micelarne žučne kiseline sa sinergističkim efektom između različitih gradivnih jedinica binarne mešovite micelle (tj. termodinamičkom stabilnošću micelle).

Žučne soli imaju znatno veće vrednosti (između 50 i 100 puta) kritične micelarne koncentracije od polisorbata [10, 115]. Kod binarnih smeša polisorbata i žučnih soli u vodenom rastvoru najpre polisorbati formiraju sferoidne micelle u čije se žljebove (prostor između hidrofobnih segmenata polisorbata na površini micelle) tangencijalno uklapaju anjoni žučnih kiselina tako što je konveksna ravan steroidnog skeleta ( $\beta$ -strana – hidrofobna površina) orijentisana prema unutrašnjosti (hidrofobne faze) mešovite micelle.

Prisutne su sinergističke interakcije ( $\beta_{ij} < 0$ , Tabela 5.1) između gradivnih jedinica binarne mešovite micelle sistema Tween 20 (T20) i Na-hiodeoksiholata (HD), odnosno Tween 60 (T60) i Na-hiodeoksiholata. Iz ovoga se izvodi zaključak da su realne binarne mešovite micelle T20-HD odnosno T60-HD termodinamički stabilnije od idealnih binarnih mešovitih micela istih sistema surfaktanata. Građenje vodoničnih veza između  $\alpha$  orijentisanih OH grupa steroidnog skeleta HD i polioksietilenskog niza polisorbata sa površine mešovite micelle verovatno uzrokuje sinergistički efekat. Prisustvo vodonične veze očituje se u vrednostima koeficijenata aktivnosti surfaktanata za micelarnu pseudofazu koje su za obe gradivne jedinice manje od nula, što znači da je hemijski potencijal, kako polisorbata, tako i

HD smanjen u realnoj micelarnoj fazi u odnosu na micelarnu fazu kao idealnu smešu. Ovo znači da su obe gradivne jedinice su istovremeno stabilizovane (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Termodinamički parametri binarnih mešovutih micela Na-hiodeoksiholata i Tween 20(T20) odnosno Tween 60 (T60)

$\alpha$	$\frac{cmc_{ij}}{\text{mM}}$	$x_i^{mM}$	$\beta_{ij}$	$f_i^{mM}$	$f_j^{mM}$	$\frac{G_{ij}^E}{\text{Jmol}^{-1}}$
<b>T20</b>						
0,1	0,203	0,708	-6,522	0,573	0,038	-3342,48
0,2	0,118	0,732	-7,181	0,597	0,021	-3492,21
0,3	0,099	0,788	-6,288	0,754	0,020	-2604,03
0,4	0,090	0,816	-5,970	0,817	0,019	-2222,04
0,5	0,061	0,804	-7,188	0,759	0,010	-2807,96
<b>T60</b>						
0,1	0,103	0,742	-6,92	0,631	0,022	-3283,03
0,2	0,093	0,889	-4,08	0,951	0,039	-998,06
0,3	0,054	0,846	-5,85	0,870	0,015	-1889,38
0,4	0,050	0,929	-4,30	0,978	0,024	-703,092
0,5	0,041	0,944	-4,14	0,987	0,025	-542,538

T20-HD binarne mešovite micelle su više termodinamički stabilizovane u odnosu na T20-C binarne mešovite micelle [67], što se može se objasniti razlikom orijentacije OH grupa na konkavnoj površini ( $\alpha$ -strana steroidnog skeleta) anjona žučne kiseline (Tabela 5.1, Tabela 5.2). HD u položaju C6 steroidnog skeleta ima  $\alpha$  ekvatorijalnu (e) OH grupu koja je za 60° pomerenjena prema srednjoj ravni steroidnog skeleta u odnosu na orijentacije C7 i C12  $\alpha$  aksijalnih (a) OH grupa C. Pomeranje  $\alpha$ -(e)-OH grupe HD prema srednjoj ravni steroidnog skeleta (prema tangenti sferoidne micelle) daje veću efikasnost u formiranju vodoničnih veza sa polioksietilenskim (POE) grupama u odnosu na  $\alpha$ -(a)-OH grupe C koje su orijentisane ka



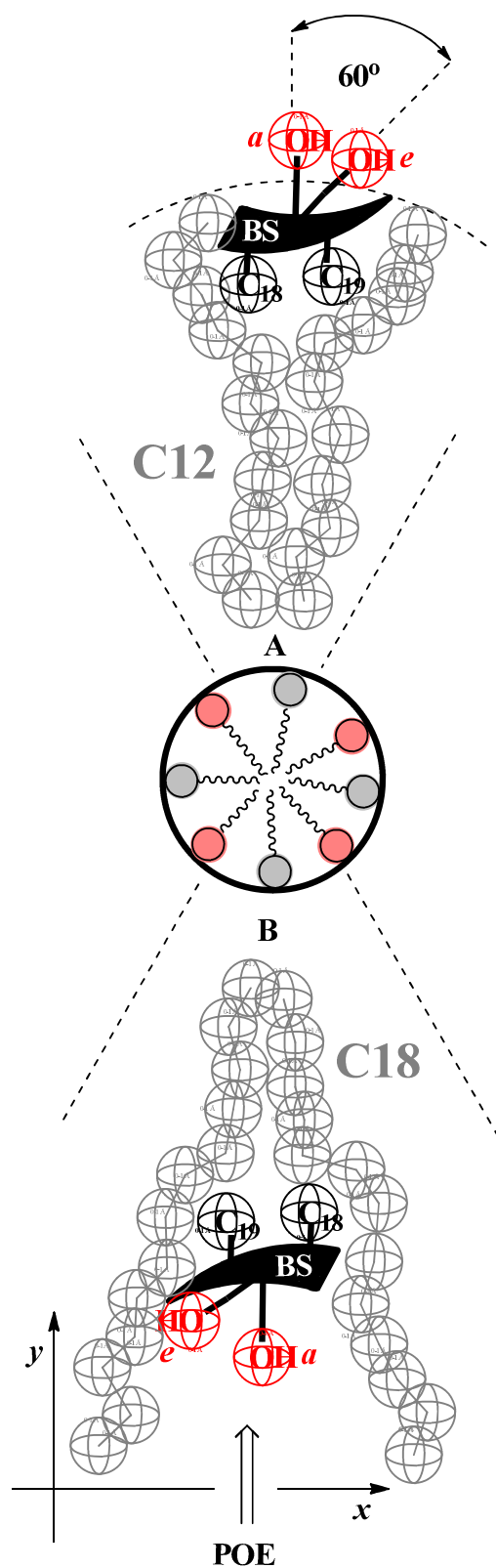
Tabela 5.2. Koeficijent interakcije ( $\beta_{ij}$ ) za binarne mešovite micelle Na-holata i Tween 20 (T20), odnosno Tween 60 (T60)

$\alpha$	T20	T60
0,1	-6,06	-7,13
0,2	-5,86	-7,2
0,3	-5,79	-7,29
0,4	-5,73	-7,74
0,5	-5,78	-7,58

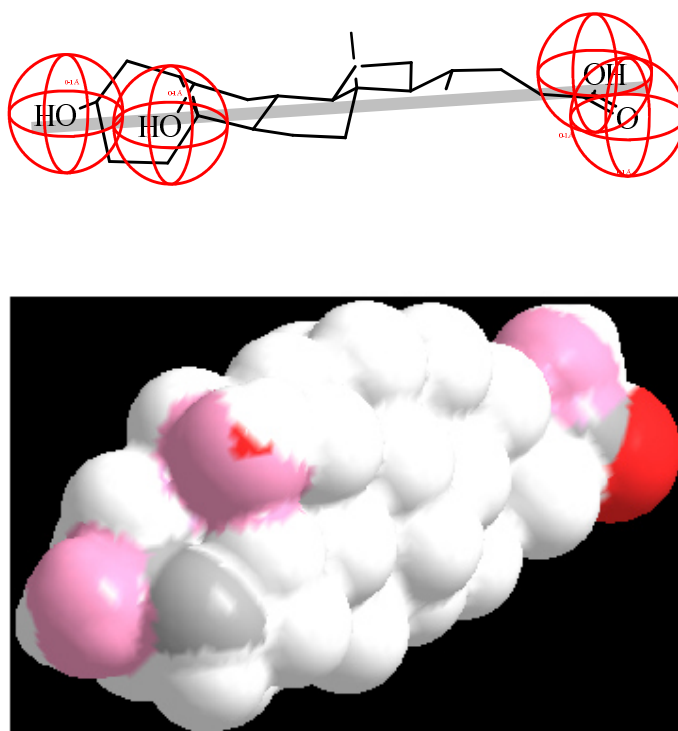
To znači da u mešovitoj miceli T20-HD steroidni skelet anjona žučne kiseline pliće uranja u žljeb micelle, tj. u hidrofobnu fazu micelle, nego kod T60-HD mešovite micelle.

Ekvatorijalna OH grupa HD gubi svoju povoljnu prostornu orijentaciju, pošto se udaljava od površine micelle i više je orijentisana ka hidrofobnoj fazi nego ka površini agregata kod T60-HD mešovite micelle, što predstavlja nepovoljan entropijski efekat. Aksijalna OH grupa C, koja ima radijalnu orijentaciju i lakše gradi vodonične veze sa POE grupama iz granične površine hidrofobne faze micelle i vodenog rastvora, ima povoljniju prostornu orijentaciju u dubljem žljebu micelle (Slika 5.2). Mešovite binarne micelle T20-C manje su termodinamički stabilne od binarnih mešovitih micela T60-C (Tabela 5.2), jer je formiranje vodoničnih veza između C i POE (T60) favorizovano kod mešovitih micela sa dubljim žljebovima. Koeficijent interakcije između različitih gradivnih jedinica kod T60-HD mešovite micelle približno je za 2 jedinice manje negativan od koeficijenta interakcije za micelarni sistem T60-C (Tabela 5.1, Tabela 5.2).

Radijalno orijentisane aksijalne OH grupe C i razlika hidrofobnih površina steroidnog skeleta C i HD uzrokuju termodinamičku stabilizaciju sistema T60-C u odnosu na sistem T60-HD [9].



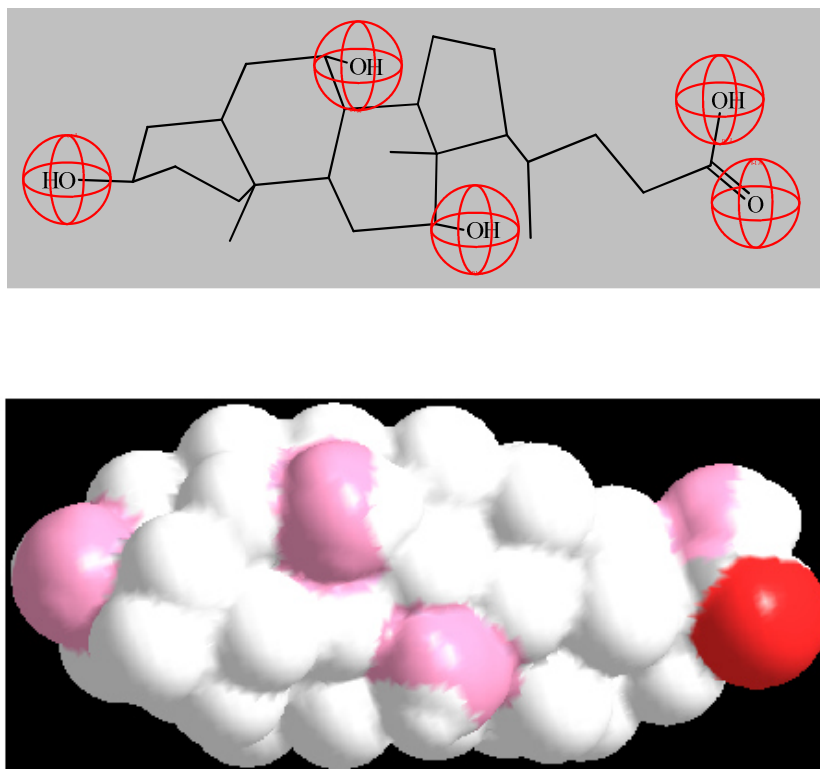
Slika 5.2. Uticaj dužine hidrofobnog segmenta polisorbata (**A** = T20) i (**B** = T60) na dubinu uranjanja steroidnog skeleta u hidrofobnu fazu binarne mešovite micelle; **POE** = polioksietilenski niz



Slika 5.3. Konformacija i molekularni model HD

Zajednička imaginarna prava (Slika 5.3), koja se naziva hidrofилна ivica molekula (*amphiphile with hydrophilic edge*), prolazi kroz molekul HD sa grupama C3- $\alpha$ -(e)-OH, C6- $\alpha$ -(e)-OH i karboksilne grupe bočnog niza. Molekul C sa grupama C3- $\alpha$ -(e)-OH, C7- $\alpha$ -(a)-OH, C12- $\alpha$ -(a)-OH i karboksilna grupa bočnog niza formiraju zajedničku hidrofилnu ravan ( $\alpha$ -strana steroidnog skeleta) tako da je  $\beta$  strana steroidnog skeleta C hidrofobna (Slika 5.4), pa je molekul C biplanarni amfifil. Zbog toga je ukupna hidrofobna površina C manja od ukupne hidrofobne površine HD.

Dok su reverznofazni hromatografski retencioni parametri proporcionalni sa hidrofobnom površinom sa  $\beta$ -strane steroidnog skeleta,  $\log P$  je proporcionalan sa ukupnom hidrofobnom površinom molekula. Razlika koja postoji između logaritama koeficijenta raspodele (nejonizovani oblik žučne kiseline) 1-oktanol / vodena faza ( $\log P$ ): HD ( $\log P = 3,08$ ) i C ( $\log P = 2,02$ ) to potvrđuje [45]. Kada je steroidni skelet binarne mešovite micelle sa T60 dublje uronjen u žljeb – hidrofobnu fazu – micelle, nego što je steroidni skelet C uronjen u žljeb mešovite micelle T60-C, veća je ukupna hidrofobna površina HD.



Slika 5.4. Konformacija i molekularni model C

Protoliza micelarno vezane žučne kiseline ( $\mathbf{HA}_{(mM)}$ ) može da se predstavi reakcijom:



Kada se anjon takođe nalazi u micelarnoj fazi ( $\mathbf{A}^-_{(mM)}$ ), standardna promena Gibbs-ove energije reakcije jonizacije micelarno vezane žučne kiseline ( $\mathbf{HA}_{(mM)}$ ) (5.1), određuje se na sledeći način:

$$\Delta_{mM} G_r^\bullet = \left( \left( \mu_{\mathbf{A}^-}^{mM} \right)^\bullet + \mu_{\text{H}_3\text{O}^+}^\bullet - \left( \mu_{\mathbf{HA}}^{mM} \right)^\bullet - \mu_{\text{H}_2\text{O}}^\bullet \right) = -RT \ln \left( \frac{f_{\mathbf{A}^-}^{mM} f_{\text{H}_3\text{O}^+}}{f_{\mathbf{HA}}^{mM}} \frac{x_{\mathbf{A}^-}^{mM} x_{\text{H}_3\text{O}^+}}{x_{\mathbf{HA}}^{mM}} \right) \quad (5.2)$$

gde su:

$f^{mM}$  i  $f$  - koeficijenti aktivnosti odgovarajućih reakcionih vrsta u mešovitoj miceli i vodenoj fazi,

$x^{mM}$  i  $x$  - molski udeli reakcionih vrsta u micelarnoj i vodenoj fazi,

$\mu_{H_3O^+}^\bullet$  - standardni hemijski potencijal hidronijum jona u vodenoj fazi prema Henry-jevom zakonu,

$\mu_{H_2O}^\bullet$  - standardni hemijski potencijal molekula vode (molarna Gibbs-ova energija čiste vodene faze),

$(\mu_{A^-}^{mM})^\bullet$  - standardni hemijski potencijal anjona žučne kiseline u binarnoj micelarnoj fazi,

$\mu_{A^-}^M$  - hemijski potencijal monokomponentne micelle anjona žučne kiseline u vodenoj fazi,

$(\mu_{HA}^{mM})^\bullet$  - standardni hemijski potencijal nejonizovane žučne kiseline u binarnoj micelarnoj fazi prema Henry-jevom zakonu

U izrazu (5.2) standardni hemijski potencijal anjona žučne kiseline u binarnoj micelarnoj fazi  $(\mu_{A^-}^{mM})^\bullet$  jednak je hemijskom potencijalu monokomponentne micelle anjona žučne kiseline u vodenoj fazi ( $\mu_{A^-}^M$ ):

$$(\mu_{A^-}^{mM})^\bullet = \mu_{A^-}^M = (\mu_{A^-}^{aq})^\bullet + RT \ln cmc_{A^-} \quad (5.3)$$

gde su:

$cmc_{A^-}$  - kritična micelarna koncentracija žučne soli,

$(\mu_{A^-}^{aq})^\bullet$  - standardni hemijski potencijal anjona žučne kiseliline (srednji hemijski potencijal žučne soli) u vodenom rastvoru, prema Henry-jevom zakonu.

Standardni hemijski potencijal nejonizovane žučne kiseline u binarnoj micelarnoj fazi  $(\mu_{HA}^{mM})^\bullet$  u izrazu (5.2) može da se izrazi preko ravnoteže raspodele žučne kiseline (nejonizovani oblik) između micelarne pseudofaze i vodene faze:



$$\left(\mu_{HA}^{mM}\right)^{\bullet} = \left(\mu_{HA}^{aq}\right)^{\bullet} + RT \ln \frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}} \quad (5.4)$$

Koeficijenti aktivnosti u izrazu za standardnu Gibbs-ovu energiju (5.2) mogu da se razdvoje:

$$\begin{aligned} \Delta_{mM} G_r^{\bullet} &= RT \ln f_{HA}^{mM} - RT \ln f_{A^-}^{mM} f_{H_3O^+} - RT \ln \frac{x_{A^-}^{mM} x_{H_3O^+}}{x_{HA}^{mM}}, \\ \Delta_{mM} G_r^{\bullet} - RT \ln f_{HA}^{mM} &= -RT \ln f_{A^-}^{mM} f_{H_3O^+} - RT \ln \frac{x_{A^-}^{mM} x_{H_3O^+}}{x_{HA}^{mM}}, \\ \Delta_{mM} G_r^{\bullet} - G_{HA}^E &= -RT \ln f_{A^-}^{mM} f_{H_3O^+} - RT \ln K \end{aligned} \quad (5.5)$$

Prvi član na desnoj strani jednačine (5.5) je konstantan u slučaju kada je velika jonska jačina vodenog rastvora (300 mM NaCl):

$$-RT \ln f_{A^-}^{mM} f_{H_3O^+} \approx const. \quad (5.6)$$

Pod istim uslovom (5.6), član  $RT \ln f_{HA}^{mM}$  predstavlja dodatnu Gibbs-ovu energiju ( $G_{HA}^E$ ) za reakciju protolize micelarno vezane žučne kiseline [116].

Zamenom (5.3) i (5.4) u izrazu (5.2) za promenu standardne Gibbs-ove energije protolize micelarno vezane žučne kiseline dobija se izraz:

$$\begin{aligned} \Delta_{mM} G_r^{\bullet} &= \left( \left(\mu_{A^-}^{aq}\right)^{\bullet} + \mu_{H_3O^+}^{\bullet} - \left(\mu_{HA}^{aq}\right)^{\bullet} - \mu_{H_2O}^{\bullet} + RT \ln cmc_{A^-} - RT \ln \frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}} \right), \\ \Delta_{mM} G_r^{\bullet} &= \Delta G_r^{\bullet} + RT \ln cmc_{A^-} - RT \ln \frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}}. \end{aligned} \quad (5.7)$$

Član  $\Delta G_r^\circ$  predstavlja promenu standardne Gibbs-ove energije protolize žučne kiseline u vodenom rastvoru. Na osnovu vrednosti kritične micelarne koncentracije natrijum-hiodeoksiholata, koja iznosi 12,5 mM (298,15 K) [21], izračunava se vrednost člana  $RT \ln cmc_{A^-} = -16394,88 \text{ J}$ . Vrednost izraza  $\ln\left(\frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}}\right)$  se procenjuje na osnovu  $-\log P$  (1-oktanol/voda) [45]. Tako se dobija  $RT \ln\left(\frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}}\right) = -7554,10 \text{ J}$  i shodno tome se određuje  $RT \ln cmc_{A^-} - RT \ln\left(\frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}}\right) = -8840,78 \text{ J}$ . To znači da je  $\Delta_{mM} G_r^\circ < \Delta G_r^\circ$ , odnosno da  $pK_a$  vrednost protolize micelarno vezane žučne kiseline treba da bude manja od  $pK_a$  vrednosti protolize žučne kiseline iz vodenog rastvora. Međutim, eksperimentalno određene vrednosti  $pK_a$  (Tabela 5.3) pokazuju suprotno, što ukazuje da je u binarnoj mešovitoj miceli nejonzovana žučna kiselina termodinamički stabilnija nego u vodenom rastvoru, odnosno da postoji dodatna Gibbs-ova energija:

$$\left( G_{HA}^E < 0 \wedge |G_{HA}^E| > \left| RT \ln cmc_{A^-} - RT \ln \frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}} \right| \right):$$

$$\Delta_{mM} G_r^\circ = \Delta G_r^\circ + RT \ln cmc_{A^-} - RT \ln \frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}} - G_{HA}^E = const. - RT \ln K \quad (5.8)$$

Podaci iz Tabele 5.3 pokazuju da vrednost  $pK_a$  micelarno vezane žučne kiseline zavisi od molskog udela polisorbata u binarnoj smeši surfaktanata ( $\alpha$ ), odnosno od vrste kosurfaktanta (polisorbata).

Tabela 5.3.  $pK_a$  vrednosti micelarnih žučnih kiselina

$\alpha$	C		HD	
	T20	T60	T20	T60
0,1	5,38	5,46	5,72	5,65
0,2	5,42	5,50	5,75	5,86
0,3	4,47	5,74	5,88	5,83
0,4	5,64	5,82	6,13	5,92
0,5	5,66	5,95	6,30	6,01

Dodatna Gibbs-ova energija ( $\beta_{ij}$ ), odnosno dodatna termodinamička stabilnost binarne mešovite micela žučnih soli i polisorbata određena je vodoničnim vezama između različitih gradivnih jedinica. Shodno tome, vodonične veze između POE grupa polisorbata i  $\alpha$ OH grupa nejonizovane žučne kiseline u micelarnoj fazi povećavaju njenu  $pK_a$  vrednost, odnosno termodinamički je stabilizuju. Zato se dodatna Gibbs-ova energija iz jednačine (5.8) može predstaviti kao funkcija  $G_{HA}^E = f(\beta_{ij}\alpha)_g$ , odnosno  $\Delta G_r^\bullet - f(\beta_{ij}\alpha)_g = (const.)_2 - RT \ln K$ . Ukoliko je  $\alpha = 0,1$ , u sledećem nizu binarnih mešovitih micela T60-C >T20-C >T20-HD >T60-HD opada vrednost  $\Delta pK_a$  (razlika između  $pK_a$  vrednosti žučne kiseline iz mešovite micela i  $pK_a$  vrednosti nemicelarne žučne kiseline). Za  $\alpha = 0,5$  vrednost  $\Delta pK_a$  opada u nizu mešovitih micela T60-C >T20-HD >T20-C >T60-HD. Identičan niz se formira na osnovu opadanja sinergističkog efekta (apsolutne vrednosti  $\beta_{ij}$ ), odnosno termodinamičke stabilizacije mešovite micela (Tabela 5.4). Molski udeo polisorbata u micelarnoj fazi raste sa porastom molskog udela polisorbata u binarnoj smeši surfaktanta ( $\alpha$ ) (Tabela 5.1), pa zato raste i verovatnoća formiranja vodoničnih veza između  $\alpha$  OH grupa nejonizovane žučne kiseline i POE grupa.

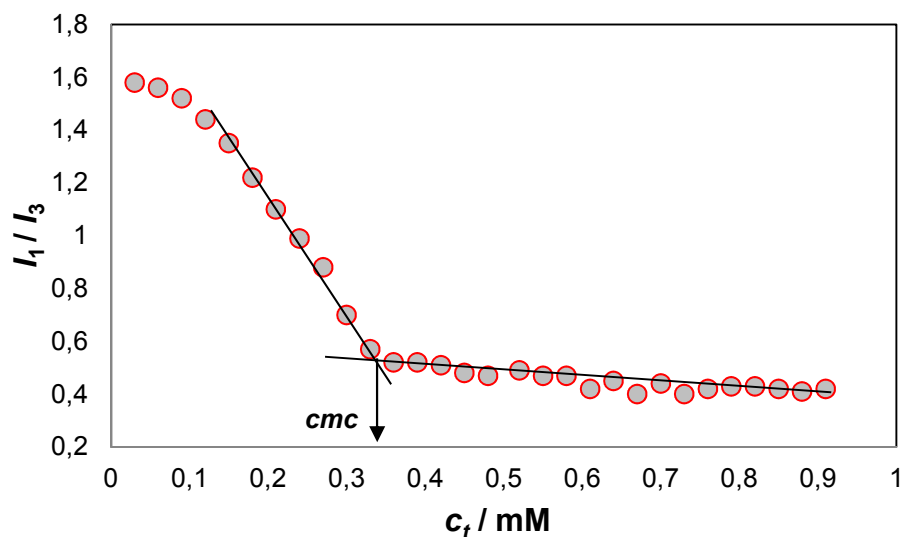
Tabela 5.4. Promena  $pK_a$  vrednosti žučne kiseline iz mešovite micela u odnosu na  $pK_a$  vrednost nemicelarne žučne kiseline

$\alpha$	C		HD	
	T20	T60	T20	T60
$\Delta pK_a(\alpha=0,1)$	0,25	0,33	0,14	0,07
$\Delta pK_a(\alpha=0,5)$	0,53	0,82	0,72	0,43

## 5.2. Binarne mešovite micelle Tritona X-100 i izabраниh žučnih soli: termodinamička stabilizacija i $pK_a$ vrednosti žučnih kiselina u obliku micelle

### 5.2.1. Dodatna Gibbs-ova energija (koeficijent interakcije) binarne mešovite micelle i konformacione razlike između steroidnog skeleta hiodeoksiholne i holne kiseline

Piren (probni molekul) ulazi u hidrofobni domen micelle, što rezultuje u smanjenju vrednosti odnosa intenziteta fluorescencije njegove prve i treće vibracione trake ( $I_1/I_3$ ). Zana i Guveli [117], upoređujući smanjenje vrednosti odnosa ( $I_1/I_3$ ) i poluživot micelarno solubilizovanog pirena za micelle konvencionalnih surfaktanata i za micelle soli žučnih kiselina, zaključili su da u micelama anjona žučnih kiselina piren zauzima mesto između konveksnih ravni i steroidnog skeleta. Takođe, piren se ne zadržava dugo unutar micelle, već u toku svog poluživota u micelarnoj fazi (reda veličine mikrosekunde) ulazi unutar mnogih micela i zato piren ne narušava strukturu micela u znatnoj meri, što ga čini dobrim probnim molekulom. Kriva zavisnosti promene odnosa ( $I_1/I_3$ ) u funkciji od ukupne koncentracije surfaktanata ( $c_t$ ) ima naglu promenu ispod kritične micelarne koncentracije (Slika 5.5.). Kritična micelarna koncentracija za Triton X-100 jeste 0,242 mM (spektrofluorimetrijska merenja sa pirenom u vodenom rastvoru), što odgovara literaturnoj vrednosti 0,240 mM [118, 119], gde je CMC određen neinvazivnom metodom u vodenom rastvoru. Kritična micelarna koncentracija za hiodeoksiholat (HD), koji je određen spektrofluorometrijski, je 16,4 mM, dok se neinvazivnim metodama dobija od 16,0 do 16,3 mM, takođe u vodenom rastvoru [34].



Slika 5.5. Promena vrednosti odnosa ( $I_1/I_3$ ) u zavisnosti od ukupne koncentracije surfaktanata (HD – Triton X-100,  $\alpha = 0.4$ )

Binarne mešovite micelle HD i Tritona X-100na svakoj ispitivanoj vrednosti  $\alpha$  (molarni udeo polisorbata u binarnoj surfaktantskoj smeši) karakterisani su negativnim vrednostima dodatne Gibbs-ove energije ( $G^E$ ) i negativnom vrednošću koeficijenta interakcije ( $\beta_{ij}$ ) između različitih gradivnih jedinica mešovite micelle (Tabela 5.5). Ovo znači da su realne binarne mešovite micelle termodinamički stabilnije u odnosu na idealne mešovite micelle. Upoređujući vrednosti  $\beta_{ij}$  (uz iste vrednosti  $\alpha$ ) između micelarnih sistema HD – Triton X-100 i C – Triton X-100 (Tabela 5.6) [118] pokazuje se da binarne mešovite micelle HD – Triton X-100 poseduju veću termodinamičku stabilnost u poređenju sa binarnim mešovitim micelama C – Triton X-100.

Tabela 5.5. Termodinamički parametri binarnih mešovutih micela natrijum hiodeoksiholata i Tritona X-100 (TX):  $\alpha$  (TX) molarni udeo u binarnom surfaktantskom sistemu Tritona X-100,  $cmc_{ij}$  kritična micelarna koncentracija binarnog surfaktantskog sistema,  $x_i^{mM}$  molarni udeo Tritona X-100 u binarnoj mešovitoj miceli,  $\beta_{ij}$  koeficijenti interakcije,  $f_i^{mM}$  koeficijent aktivnosti Tritona X-100 u mešovitoj miceli,  $f_j^{mM}$  koeficijent aktivnosti HD u mešovitoj miceli,  $G^E$  dodatna Gibbs-ova energija. Merenja su izvršena na temperaturi  $T = 293.1$  K i pritisku  $p_a = 1.00 \times 10^5$  Pa.

$\alpha$ (TX)	$cmc_{ij}$ /mM	$x_i^{mM}$	$\beta_{ij}$	$f_i^{mM}$	$f_j^{mM}$	$G^E$ /Jmol <sup>-1</sup>
0,1	0,815	0,643	-5,01	0,528	0,126	-2850,94
0,2	0,529	0,698	-5,04	0,631	0,086	-2633,69
0,3	0,378	0,721	-5,43	0,655	0,059	-2707,76
0,4	0,345	0,763	-5,04	0,753	0,053	-2259,3
0,5	0,320	0,802	-4,71	0,831	0,048	-1854,09

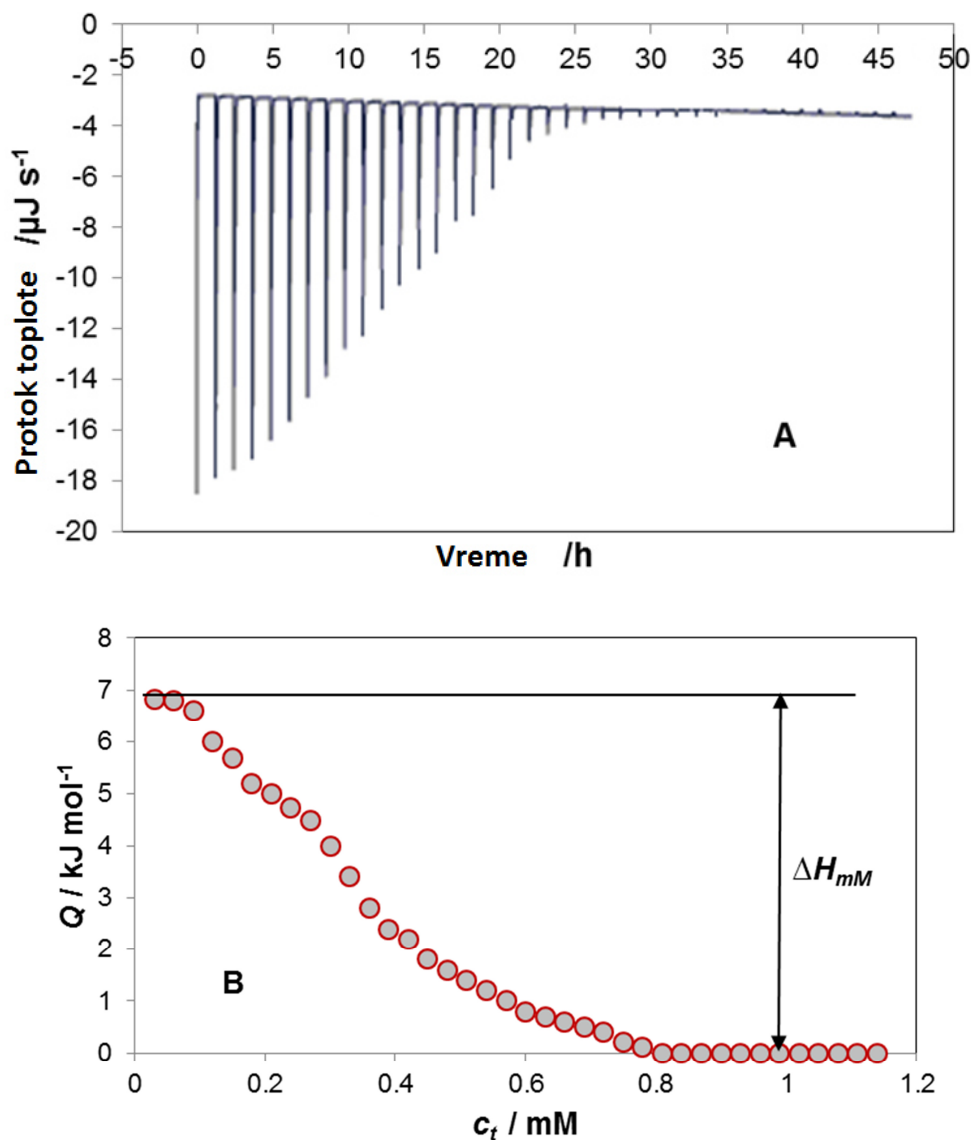
Standardne nesigurnosti  $u$ , su:  $u(T) = \pm 0,1$  K,  $u(p) = \pm 0,002$  MPa,  $u(\alpha) = \pm 0,01$ ,  $u(cmc_{ij}) = \pm 0,003$  mM,  $u(x_i^{mM}) = \pm 0,002$ ,  $u(\beta_{ij}) = \pm 0,03$ ,  $u(f_i^{mM}) = \pm 0,03$ ,  $u(f_j^{mM}) = \pm 0,03$ ,  $u(G^E) = \pm 4,45$  Jmol<sup>-1</sup>

Tabela 5.6. Koeficijent interakcije ( $\beta_{ij}$ ) [118] za binarne mešovite micelle natrijum holata i Tritona X-100 (TX),  $T = 293,1$  K |  $p_a = 1,00 \times 10^5$  Pa

$\alpha$ (TX)	$\beta_{ij}$
0,1	-1,64
0,2	-2,27
0,3	-2,19
0,4	-1,96
0,5	-2,26

Standardne nesigurnosti  $u$ , su:  $u(T) = \pm 0,1$  K,  $u(p) = \pm 0,002$  MPa,  $u(\alpha) = \pm 0,01$ ,  $u(\beta_{ij}) = \pm 0,02$

Dodatna entalpija ( $H^E$ ), koja potiče od dodatne Gibbs-ove energije ( $G^E = H^E - TS^E$ ), za ispitivane binarne mešovite micelle najverovatnije potiče od vodoničnih veza, koje se formiraju između steroidnih OH grupa (iz anjona žučne kiseline) i polioksietilenske grupe u Tritonu X-100. Budući da steroidni skelet holata (C) sadrži tri OH grupe, moguće su tri vodonične veze između različitih gradivnih jedinica u mešovitoj miceli C – Triton X-100. Zbog postojanja dve OH grupe u steroidnom skeletu HD, moguće su dve vodonične veze između različitih gradivnih jedinica u mešovitoj miceli HD – Triton X-100. Zato, apsolutna vrednost dodatne entalpije za micelarni sistem C – Triton X-100 treba da bude veća od apsolutne vrednosti dodatne entalpije za sistem HD – Triton X-100. Za proveru odnosa dodatnih entalpija kod ispitivanih binarnih micela primenjena je izotermalna kalorimetrijska titracija (Isothermal Titration Calorrimetry - ITC) [120-123]. Za ITC eksperiment uzete su binarne smeše surfaktanta sa 1:1 ( $\alpha = 0,5$ ) molskim odnosom različitih molekula (Slika 5.6.).



Slika 5.6. Titracija 5 mM binarne smeše ( $\alpha = 0,5$ ) HD i Tritona X-100 u vodi u 2 mL vode na 293,15 K - kalorimetrijski tragovi: 38 injekcija od po 10  $\mu\text{L}$  alikvota (A) i reakciona entalpija ( $-Q$ ) u odnosu na ukupnu koncentraciju deterdženta u reakcionoj ćeliji (B)

Prema teoriji pseudofazne separacije [124, 125], entalpija micelizacije binarne mešovite micele ( $\Delta H_{mic}^{mM}$ ) pri nekoj konstantnoj temperaturi je (uopšteno, u ITC eksperimentu se meri entalpija demicelizacije:  $\Delta H_{demic} = -\Delta H_{mic}$ ):

$$\Delta H_{mic}^{mM} = x_i^{mM} \Delta H_{mic}^M(i) + x_j^{mM} \Delta H_{mic}^M(j) + H^E \quad (5.9)$$



gde su  $x_i^{mM}$  i  $x_j^{mM}$  molski udeli različitih molekula surfaktanata u binarnoj mešovitoj miceli, dok  $\Delta H_{mic}^M(i)$  i  $\Delta H_{mic}^M(j)$  predstavljaju entalpije micelizacije monokomponentnih micela gradivnih jedinica binarne mešovite micelle. Dilucione entalpije monomera i micela u  $\Delta H_{mic}^{mM}$  se mogu zanemariti [120, 121], mada se pri dobijanju  $H^E$  iz jednačine (5.9) ove entalpije iz  $\Delta H_{mic}^{mM}$  svakako poništavaju sa dilucionim entalpijama koje su poreklom od entalpija:  $\Delta H_{mic}^M(i)$  i  $\Delta H_{mic}^M(j)$ . Pri temperaturi od 293,15 K (Tabela 5.5.:  $x_i^{mM}$  za HD ( $\alpha = 0,5$ ); [118]:  $x_j^{mM}$  za C ( $\alpha = 0,5$ ); Tabela 5.7.:  $\Delta H_{mic}^M(i)$  za HD,  $\Delta H_{mic}^M(j)$  za C i  $\Delta H_{mic}^{mM}$ ) prema jednačini (5.9) dodatne entalpije su  $H^E$  (C – Triton X-100) = -1260 J mol<sup>-1</sup> i  $H^E$  (HD – Triton X-100) = -350 J mol<sup>-1</sup>, tj. postoji:

$$|H^E|(\text{C – Triton X-100}) > |H^E|(\text{HD – Triton X-100}).$$

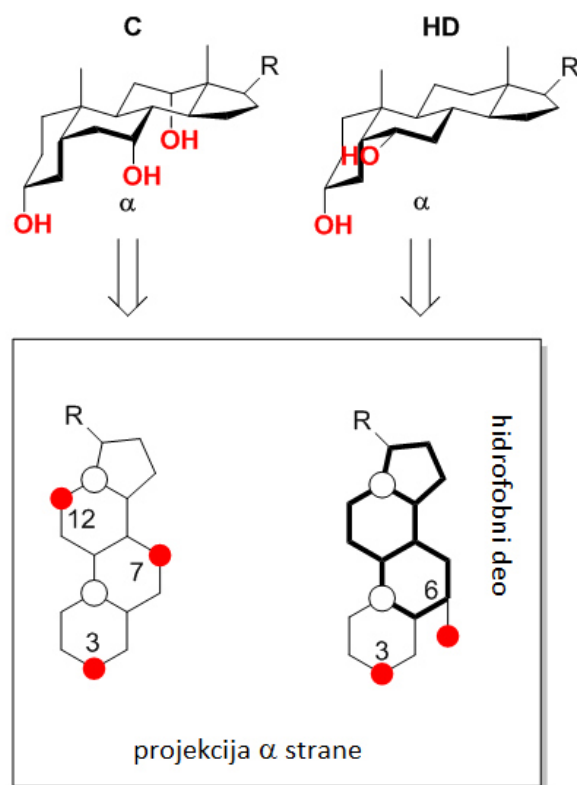
Tabela 5.7. Entalpije micelizacije binarnih mešovitih micela ( $\Delta H_{mic}^{mM}$ ) pri 1 : 1 molskom odnosu smeše surfaktanata (vodeni rastvor) i entalpije micelizacije monokomponentnih micela  $\Delta H_{mic}^M$  (vodeni rastvor),  $p_a = 1.00 \times 10^5$  Pa

T /K	$\Delta H_{mic}^{mM}$ ( HD – Triton X-100) / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H_{mic}^{mM}$ ( C – Triton X-100) / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H_{mic}^M$ (HD) / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H_{mic}^M$ (C) / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H_{mic}^M$ (TX) / kJ mol <sup>-1</sup>
283,1	9,51	8,85			
288,1	8,93	7,79			
293,1	6,82	6,45	2,40	1,83	8,37
298,1	1,05	0,82			

Standardne nesigurnosti  $u$ , su:  $u(T) = \pm 0,1$  K,  $u(p) = \pm 0,002$  MPa,  $u(\Delta H_{mic}^{mM}) = \pm 0,07$  kJmol<sup>-1</sup> (HD – Triton X-100),  $u(\Delta H_{mic}^{mM}) = \pm 0,05$  kJmol<sup>-1</sup> (HD – Triton X-100),  $u(\Delta H_{mic}^M) = \pm 0,03$  kJmol<sup>-1</sup> (HD),  $u(\Delta H_{mic}^M) = \pm 0,02$  kJmol<sup>-1</sup> (C),  $u(\Delta H_{mic}^M) = \pm 0,05$  kJmol<sup>-1</sup> (Triton X-100)

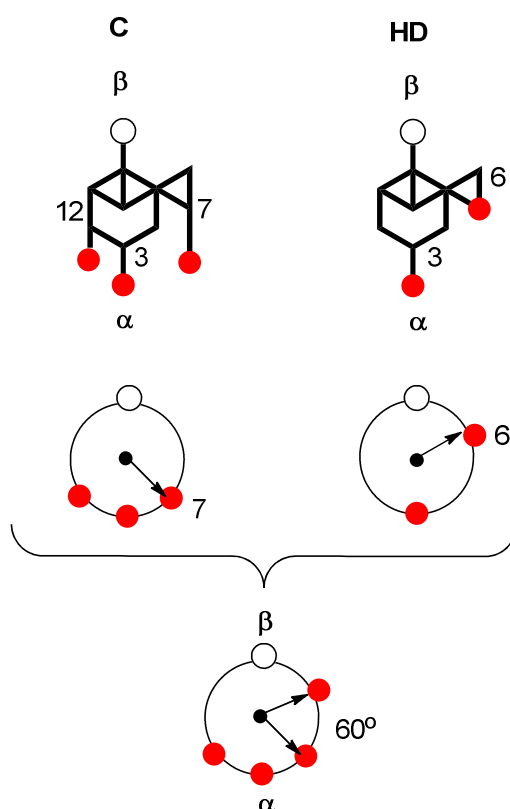
Međutim, što je negativnija vrednost interakcionog parametra (ili dodatne Gibbs-ove energije) za binarne mešovite micide HD – Triton X-100, to će dodatna entropija micelnog sistema C – Triton X-100 biti negativnija nego kod micelnog sistema HD – Triton X-100 (Tabela 5.5. i Tabela 5.6. [118]).

Na Slici 5.7. prikazane su konformacije formule C i HD, kao i pogled na molekule sa  $\alpha$  strane steroidnog skeleta (tj. projekcija atoma steroidnog skeleta iz konformacije formule na srednjoj hiper-ravni konformacije i translacija hiper-ravni u 2D ravan). U holnoj kiselini, prostorni položaji C7- $\alpha$ -aksijalne(*a*)-OH grupe, C12- $\alpha$ -(*a*)-OH grupe i C3- $\alpha$ -ekvatorijalne(*e*)-OH grupe su međusobno paralelni, tj. ove OH grupe su pozicionirane u A, B i C prstenu steroidnog skeleta, što čini hidrofilnom  $\alpha$  konkavnu površinu C molekula. Međutim, C3- $\alpha$ -(*e*)-OH i C6- $\alpha$ -(*e*)-OH grupe hiodeoksiholne kiseline nisu međusobno paralelne, već su ove grupe orijentisane jedna prema drugoj, što uzrokuje dislokaciju C6- $\alpha$ -(*e*)-OH grupe iz prostornog regiona B prstena. Iz ovoga sledi da je  $\alpha$  strana B, C i D prstena steroidnog sistema prstena hidrofobni deo konkavne površine HD molekula, dok je prostorni region prstena A hidrofilni deo konkavne površine HD molekula (Slika 5.7.). Pogled ispitivanih žučnih kiselina (C i HD) iz pravca A prstena steroidnog skeleta, tj. Newman-ove projekcije formule (Slika 5.8), pokazuju da je C6- $\alpha$ -(*e*)-OH grupa HD molekula pomerena prema  $\beta$  strani steroidnog skeleta za 60° u odnosu na C7- $\alpha$ -(*a*)-OH grupu C molekula. Ovo znači da HD poseduje manju hidrofobnu površinu na  $\beta$  strani steroidnog skeleta (konveksna površina) nego molekul C. Ovo je takođe potvrđeno retencionim koeficijentom (*k*) koji je dobijen reverzno faznom tečnom hromatografijom visoke rezolucije. Za HD, *k* = 3,49 (25 °C), a za C, *k* = 5,21 (25 °C) (za žučne kiseline, *k* je veće ako hidrofobna površina sa  $\beta$  strane steroidnog skeleta veća) [126].



Slika 5.7. Konformacije steroidnog skeleta holne (C) i hiodeoksiholne kiseline (HD) i pogled na molekule sa  $\alpha$  strane steroidnog skeleta

Međutim, vrednost  $\log P$  ( $P$  = particioni koeficijent sistema 1-oktanol – voda) je veća za HD (3,08), nego za C (2,02) [45]. Pošto je  $\log P$  proporcionalan ukupnoj hidrofobnoj površini molekula, može se zaključiti da veća hidrofobna površina HD molekula u odnosu na C potiče od hidrofobnog regiona B, C i D prstena sa  $\alpha$  strane steroidnog skeleta.

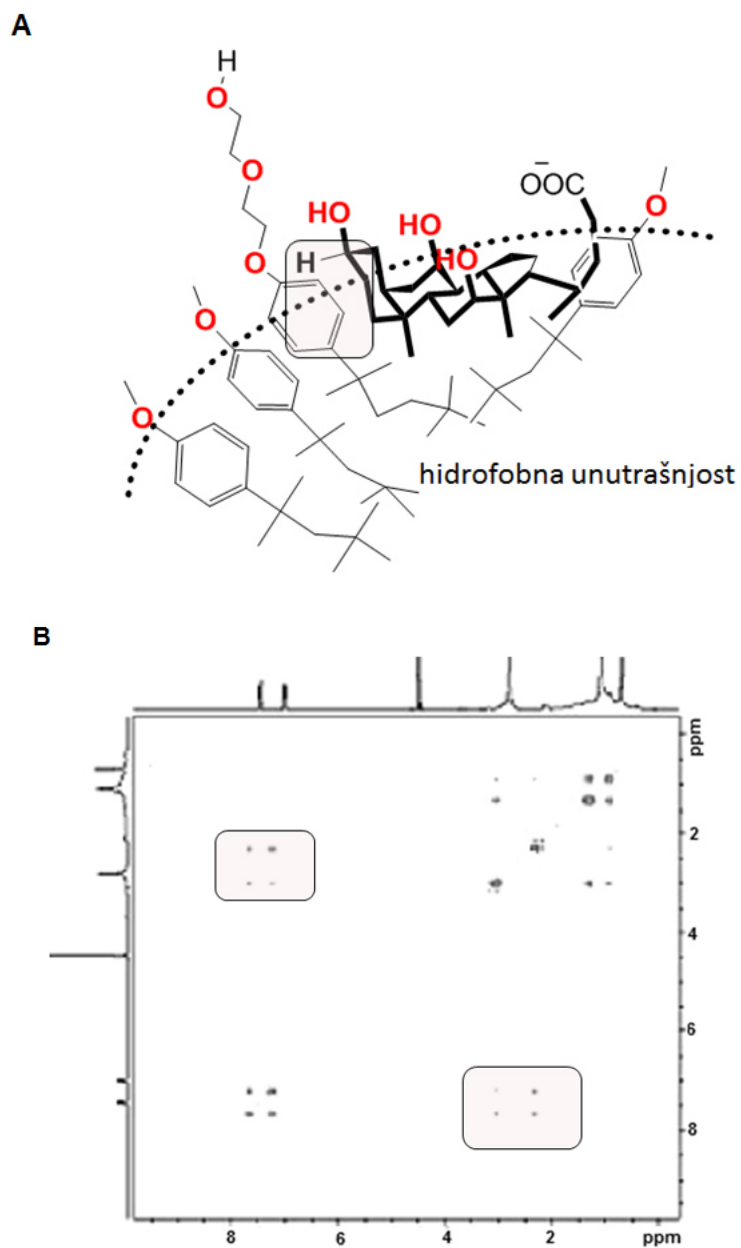


Slika 5.8. Pogled na ispitivane molekule u pravcu A prstena steroidnog skeleta, i globalne Newman-ove projekcije ovih molekula

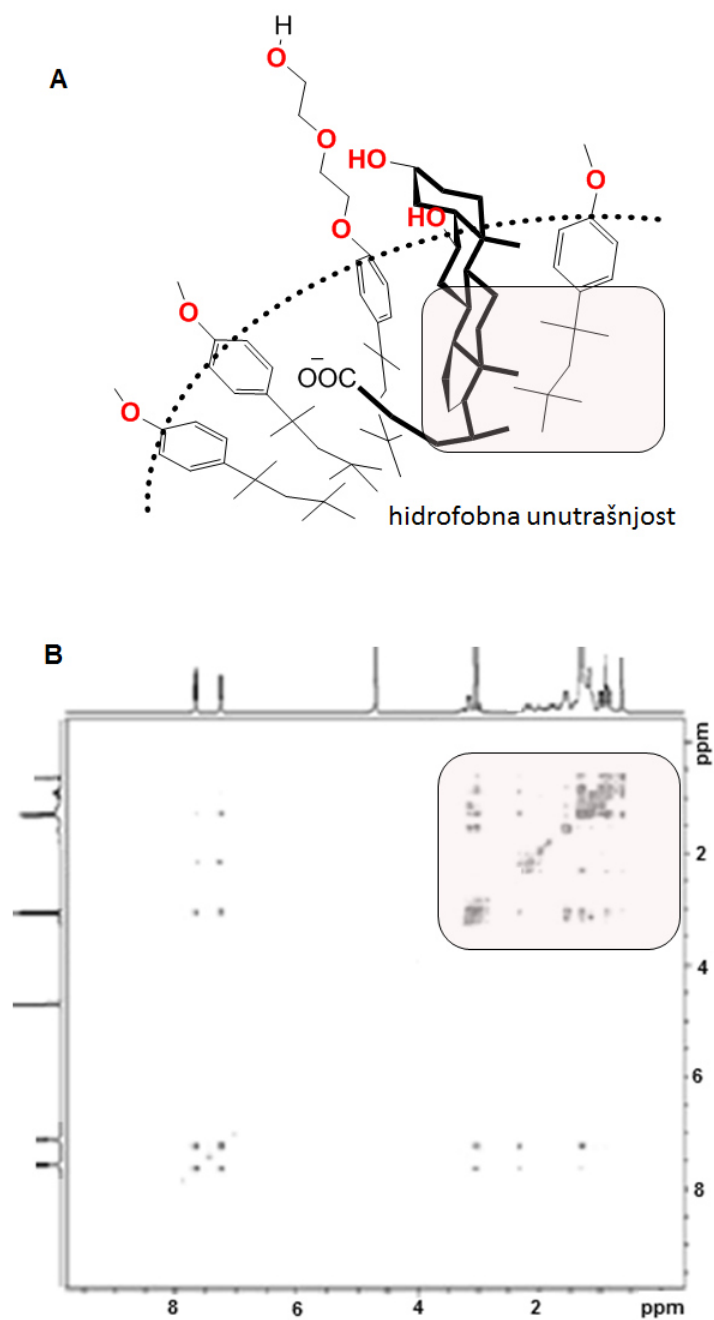
Različita raspodela hidrofobne površine u HD i C verovatno uzrokuje različite prostorne orijentacije njihovih steroidnih skeleta u hidrofobnom domenu binarne mešovite micelle sa Tritonom X-100.

Kako je Triton X-100 hidrofobniji surfaktant u odnosu na žučne soli, u vodenim rastvorima Triton X-100 prvo formira sferoidne micelle. U hidrofobnim domenima micela Tritona X-100, hidrofobni segmenti (4-(1,1,3,3-tetrametil)-butil-fenil grupa) su izdužene konformacije i radijalno raspoređeni (zbog benzenskog jezgra i metil grupa postoji manja konformaciona fleksibilnost hidrofobnog domena u hidrofobnom lancu – zbog voluminoznosti hidrofobnih grupa). U prostoru između radijalno raspoređenih hidrofobnih segmenata Tritona X-100 (žljeb micelle) anjoni C su ugrađeni na takav način da je konveksna površina steroidnog skeleta ( $\beta$  strana – hidrofobna površina) orijentisana prema hidrofobnom domenu mešovite micelle (Slika 5.9 A). Konkavna površina steroidnog skeleta ( $\alpha$  strana) je orijentisana prema unutrašnjosti vodenog rastvora. U NOESY [127] spektru C –

Triton X-100 binarne mešovite micelle uočava se ukrštanje pikova (7-8 ppm) između aromatičnih vodonika Tritona X-100 i C3-β-(α)-H (Slika 5.9 B). Različita raspodela hidrofobne površine HD molekula u odnosu na C molekul, tj. postojanje hidrofobne površine na α strani steroidnog skeleta (Slika 5.7) HD (B, C i D prstenovi) uzrokuje različito ugrađivanje HD steroidnog skeleta u mešovitu micelu (sa Tritonom X-100) u poređenju sa ugrađivanjem C steroidnog skeleta (Slika 5.9. A). Hidrofobni prstenovi B, C i D steroidnog sistema prstenova HD u sferoidnoj mešovitoj miceli (tj. u hidrofobnoj pseudofazi) zadržavaju radijalnu konformaciju, dok bočni niz sa karboksilatnom grupom u fjordu mešovite micelle (fisura na površini micelle, tj. prostor između radijalno orijentisanih Triton X-100 molekula). U NOESY spektru binarne smeše surfaktanata HD – Triton X-100 takođe se uočavaju ukršteni (cross) pikovi aromatičnih protona i C3-β-(α)-H. Međutim, za razliku od NOESY spektra za C – Triton X-100 ovde se u oblasti od 0,5 do 3,5 ppm uočavaju intenzivni cross pikovi koji potiču od interakcija između protona metil grupa i metilenske grupe hidrofobnog segmenta Tritona X-100 i protona B, C i D prstena steroidnog skeleta HD (Slika 5.10). Ovo ukazuje na dublje uranjanje steroidnog skeleta HD u hidrofobni domen binarne mešovite micelle, nego što je uranjanje steroidnog skeleta C.



Slika 5.9. Tangencijalna lokalizacija C u binarnoj mešovitoj miceli sa Tritonom X-100 (A) i NOESY spektar za binarnu smešu ( $\alpha = 0,5$ ) Tritona X-100 i C na 20 °C (B)



Slika 5.10. Radijalna lokalizacija HD u binarnoj mešovitoj miceli sa Tritonom X-100 (A) i NOESY spektar za binarnu smešu ( $\alpha = 0,5$ ) Triton X-100 i HD na 20 °C (B)

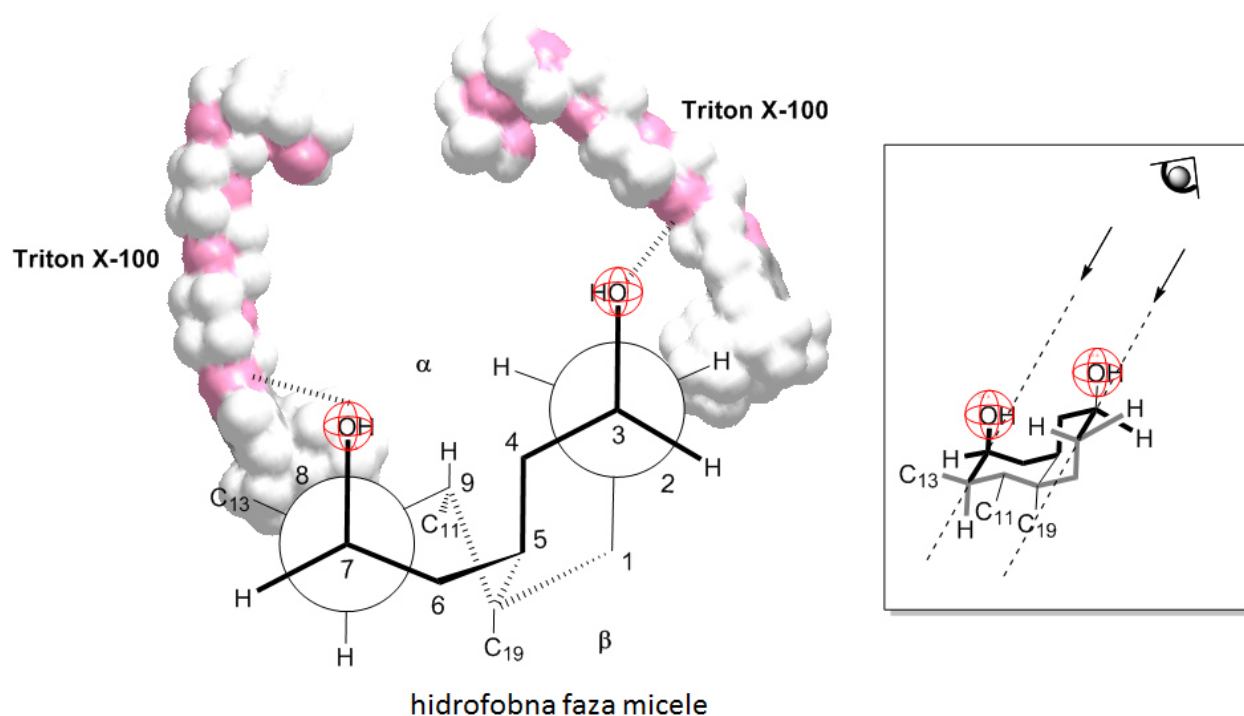
Promena toplotnog kapaciteta (*change in heat capacity*) u toku demicelizacije iznosi:

$$\Delta C_p^{demic} = \left( \frac{\partial \Delta H_{demic}}{\partial T} \right)_p = - \left( \frac{\partial \Delta H_{mic}}{\partial T} \right)_p$$

Ukoliko je pozitivna vrednost, to znači da se u toku raspada micela povećava stepen hidratacije hidrofobne površine u odnosu na stepen hidratacije hidrofobne površine monomera u miceli [124, 125]. Na osnovu temperaturne zavisnosti entalpije micelizacije (polinom drugog reda) (Tabela 5.7.) ispitivanih binarnih mešoviti micela (u vodenoj sredini), za promenu toplotnog kapaciteta demicelizacije dobijaju se sledeće vrednosti:  $\Delta C_p^{demic}$  (HD – Triton X-100,  $\alpha = 0,5$ ) = 812 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> odnosno  $\Delta C_p^{demic}$  (C – Triton X-100,  $\alpha = 0,5$ ) = 737 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>. Ovo znači da u mešovitim micelama HD – Triton X-100 veći deo hidrofobne površine gradivnih jedinica micela je ekraniran od hidratacije, nego u mešovitim micelama C – Triton X-100, što ide u prilog pretpostavljenim strukturama mešoviti micela (Slika 5.9. i Slika 5.10.). Naime, u odnosu na sferoidnu micelu, konveksna strana tangencijalno postavljenog steroidnog skeleta, zbog zakrivljenosti micelarne površine, manje je ekranirana hidratacijom, nego kod radijalno orijentisanog steroidnog skeleta.

Paralelna prostorna orijentacija steroidnih OH grupa u C molekulu i razdaljina veća od 5 Å između svakog para OH grupa (C3-OH – C7-OH; C3-OH – C12-OH; C7-OH – C12-OH) omogućava formiranje vodoničnih veza između svake OH grupe anjona holne kiseline i polioksietilenske grupe različitog molekula Tritona X-100 (Slika 5.11). Zato, jedan molekul (jon) C formira tri vodonične veze. Ove energije predstavljaju dodatnu entalpiju za micelarni sistem C – Triton X-100 ( $H^E(C-TX100)$ ). Međutim, u blizini anjona C postoji smanjenje entropije vodonično vezanih Triton X-100 molekula (vodonična veza predstavlja barijeru u sistemu) u odnosu na Triton X-100 molekule koji nisu u vodoničnim vezama. Smanjenje entropije u micelarnom sistemu C – Triton X-100 predstavlja dodatnu entropiju ( $S^E(C-TX100)$ ) binarne mešovite micela.

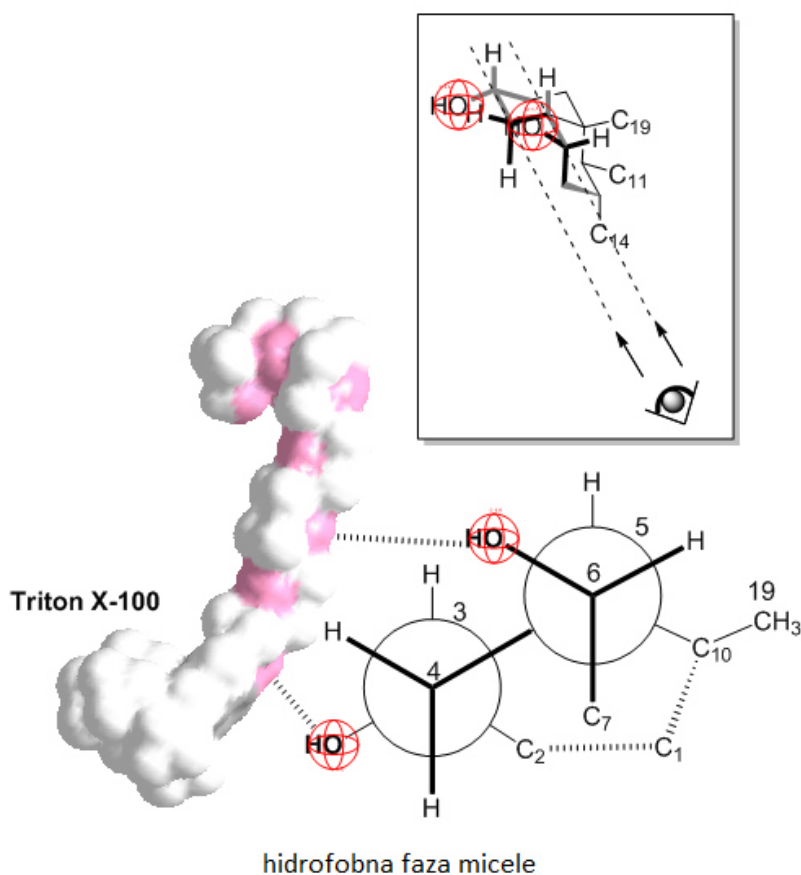




Slika 5.11. Newman-ova projekcija prostorno bliskih grupa C7-OH i C3-OH holne kiseline i formiranje vodoničnih veza između OH grupa holne kiseline i polioksietilenskih grupa Tritona X-100

Ova prostorna orijentacija HD u mešovitoj miceli HD – Triton X-100 omogućava pozicioniranje hidrofobnih delova Tritona X-100 duž B, C i D prstena sa  $\alpha$  strane steroidnog skeleta. Dalje, trebalo bi da se uzme u obzir da u HD steroidnom skeletu OH grupe nisu paralelne (kao u C), nego su orijentisane jedna prema drugoj (Slika 5.7.). Imajući to u vidu, može se zaključiti da je istovremeno formiranje dve vodonične veze sa molekulom Tritona X-100 stereohemijski dozvoljeno (C3- $\alpha$ -(e)-OH i C7- $\alpha$ -(e)-OH grupe istovremeno formiraju vodonične veze sa jednim Triton X-100 molekulom, Slika 5.12.). Naime, kada se formira vodonična veza, bez obzira koja OH grupa HD molekula je u pitanju, Triton X-100 molekul je fiksiran i zbog prostorne blizine druge OH grupe, formira vodoničnu vezu i sa tom drugom OH grupom. Ovo se zove kooperativno vezivanje (vezivanje Tritona X-100 sa jednom OH grupom HD omogućava formiranje vodonične veze sa drugom OH grupom HD, u ovom slučaju zbog prostorne blizine i povoljne orijentacije). Kao rezultat kooperativnog vezivanja Tritona X-100 sa HD, veće količine Tritona X-100 koje nisu vodonično vezane ostaju u blizini HD, i zato imaju veći stepen slobode u međusobnim translokacijama unutar mešovite micela HD – Triton X-100, nego što je to slučaj u mešovitoj miceli C – Triton X-100. Stoga, u mešovitoj miceli HD – Triton X-100  $S^E$  (HD-TX100) je manje negativno nego u mešovitoj

miceli C – Triton X-100, tj.  $S^E(\text{HD-TX100}) > S^E(\text{C-TX100})$ . Zato, ukupna dodatna entropija formiranja binarne mešovite micelle HD – Triton X-100 je veća (tj. dodatna Gibbs-ova energija je manja) nego ukupna dodatna entropija C – Triton X-100 mešovite micelle, jer je u HD – Triton X-100 pozitivna dodatna entropija okoline (koja potiče dodatne entalpije, zbog formiranja vodoničnih veza) kompenzovana negativnom dodatnom entropijom sistema (mešovite micelle) u manjem obimu nego u binarnoj mešovitoj miceli C – Triton X-100.



Slika 5.12. Newman-ova projekcija okoline grupa C6-OH i C3-OH hiodeoksiholne kiseline i formiranje vodoničnih veza između OH grupa hiodeoksiholne kiseline i polioksietilenskih grupa Tritona X-100

### 5.2.2. pKa vrednosti žučnih kiselina i termodinamička stabilizacija realnih binarnih mešovutih micela sa Tritonom X-100

Ispitivanje potenciometrijske titracije natrijumovih soli žučnih kiselina i mešovutih micela sa Tritonom X-100 je izvedeno u ukupnoj koncentraciji  $10 \text{ CMC}_{ij}$ , stoga koncentracija slobodnih anjona žučne kiseline može biti zanemarena u odnosu na koncentraciju anjona žučne kiseline vezanih u miceli. Reakcija protolize micelarno vezane žučne kiseline ( $\mathbf{HA}_{(mM)}$ ) može se prikazati reakcijom:



Standardna promena Gibbs-ove energije reakcije jonizacije micelarno vezane žučne kiseline (5.10) ( $\mathbf{HA}_{(mM)}$ ), gde je anjon takođe u micelarnoj fazi ( $\mathbf{A}^-_{(mM)}$ ), iznosi:

$$\Delta_{mM} G_r^\ominus = \left( (\mu_{\mathbf{A}^-}^{mM})^\ominus + \mu_{\text{H}_3\text{O}^+}^\ominus - (\mu_{\mathbf{HA}}^{mM})^\ominus - \mu_{\text{H}_2\text{O}}^\ominus \right) = -RT \ln \left( \frac{f_{\mathbf{A}^-}^{mM} f_{\text{H}_3\text{O}^+} x_{\mathbf{A}^-}^{mM} x_{\text{H}_3\text{O}^+}}{f_{\mathbf{HA}}^{mM} x_{\mathbf{HA}}^{mM}} \right) \quad (5.11)$$

gde su:

- $f^{mM}$  - koeficijenti aktivnosti reaktanata u mešovitim micelama,
- $x^{mM}$  - molarni udeo reaktanta u micelarnoj fazi,
- $\mu_{\text{H}_3\text{O}^+}^\ominus$  - standardni hemijski potencijal hidronijum jona u vodenoj fazi,
- $\mu_{\text{H}_2\text{O}}^\ominus$  - po Henry-evom zakonu, hemijski potencijal molekula vode (molarna Gibbs-ova energija čiste vodene faze),

U izrazu (5.10)  $(\mu_{\mathbf{A}^-}^{mM})^\ominus$  predstavlja standardni hemijski potencijal anjona žučne kiseline u binarnoj micelarnoj fazi. Uz pretpostavku da je binarna mešovita micela u stvari binarna smeša monokomponentnih micela (teorija pseudofazne separacije), onda je  $(\mu_{\mathbf{A}^-}^{mM})^\ominus$  jednako hemijskom potencijalu monokomponentne micle ( $\mu_{\mathbf{A}^-}^M$ ) anjona žučne kiseline u vodenoj fazi:

$$\left(\mu_{A^-}^{mM}\right)^{\ominus} = \mu_{A^-}^M = \left(\mu_{A^-}^{aq}\right)^{\ominus} + RT \ln cmc_{A^-} \quad (5.12),$$

gde su:

$cmc_{A^-}$  - kritična micelarna koncentracija žučne soli,

$\left(\mu_{A^-}^{aq}\right)^{\ominus}$  - standardni hemijski potencijal anjona žučne kiseline u vodenoj fazi po Henry-evom zakonu.

U izrazu (5.11)  $\left(\mu_{HA}^{mM}\right)^{\ominus}$  predstavlja standardni hemijski potencijal nejonizovane žučne kiseline u binarnoj micelarnoj fazi po Henry-evom zakonu, i može se izraziti preko ravnotežne raspodele (equilibrium distribution) žučnih kiselina (u nejonizovanom obliku) između micelarne pseudofaze i vodene faze:

$$\left(\mu_{HA}^{mM}\right)^{\ominus} = \left(\mu_{HA}^{aq}\right)^{\ominus} + RT \ln \frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}} \quad (5.13)$$

U izrazu za Standardnu Gibbs-ovu energiju (5.11) koeficijenti aktivnosti se mogu razdvojiti:

$$\begin{aligned} \Delta_{mM} G_r^{\ominus} &= -RT \ln \frac{f_{A^-}^{mM} f_{H_3O^+}}{f_{HA}^{mM}} - RT \ln \frac{x_{A^-}^{mM} x_{H_3O^+}}{x_{HA}^{mM}}, \\ \Delta_{mM} G_r^{\ominus} - G_{HA}^E &= -RT \ln f_{A^-}^{mM} f_{H_3O^+} - RT \ln K \end{aligned} \quad (5.14)$$

Kontra-jon vezan ( $Na^+$  ion) za mešovitu micelu HD – Triton X-100 i C – Triton X-100 može se zanemariti – udeo micelarno vezanog kontra-jona ( $\xi$ ) (Tabela 5.8). Anjoni žučne kiseline su razdvojeni sa relativno velikim micelarnim površinama, koje se sastoje od polarnih POE grupa Tritona X-100, što je slično kao kod mešoviti micela natrijum-dodecilsulfata i natrijum-holata, gde vezani kontra-joni takođe mogu biti zanemareni [36], i zato se karboksilne grupe ponašaju kao individualne grupe. Na visokim micelarnim koncentracijama ( $10cmc_{ij}$ ), zbog smanjenja prečnika jonske atmosfere micelnog polianjona (300 mM NaCl), koeficijent aktivnosti ( $f_{A^-}^{mM}$ ) se određuje pomoću Coulomb-ovih elektrostatičkih interakcija, koje se javljaju između negativno naelektrisanih binarnih mešoviti micela, odnosno između karboksilatnih grupa steroidnog skeleta unutar micle, tako da se mogu zanemariti ostale međumolekulske interakcije u  $RT \ln f_{A^-}^{mM}$ .

Ako je jonska jačina vodenog rastvora velika (300 mM NaCl), onda prvi član na desnoj strani jednačine (5.14) predstavlja konstantu za svaki ispitivani micelarni sistem anjona žučne kiseline i Tritona X-100 i iznosi:

$$-RT \ln f_{A^-}^{mM} f_{H_3O^+} \approx const. \quad (5.15)$$

i uz taj uslov član  $RT \ln f_{HA}^{mM}$  u izrazu (5.15) predstavlja dodatnu Gibbs-ovu energiju ( $G_{HA}^E$ ) za reakciju protolize micelarno vezane žučne kiseline i predstavlja specifičnu karakteristiku svake micle.

Ako se u izraz za standardnu promenu Gibbs-ove energije protolize micelarno vezane žučne kiseline uvedu jednačine (5.12) i (5.13), dobija se sledeći izraz

$$\Delta_{mM} G_r^\ominus = \left( (\mu_{A^-}^{aq})^\ominus + \mu_{H_3O^+}^\ominus - (\mu_{HA}^{aq})^\ominus - \mu_{H_2O}^\ominus + RT \ln cmc_{A^-} - RT \ln \frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}} \right),$$

$$\Delta_{mM} G_r^\ominus = \Delta G_r^\ominus + RT \ln cmc_{A^-} - RT \ln \frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}} \quad (5.16),$$

gde je  $\Delta G_r^\ominus$  standardna promena Gibbs-ove energije protolize žučne kiseline u vodenom rastvoru. Kritična micelarna koncentracija natrijum hiodeoksiholata (298,15 K) je 12,5 mM [21] i zato je  $RT \ln cmc_{A^-} = -16394.88 \text{ J}$ , dok se  $\ln(x_{HA}^{aq}/x_{HA}^{mM})$  procenjuje na osnovu vrednosti  $-\log P$  (1-oktanol/voda) [45], tako da  $RT \ln(x_{HA}^{aq}/x_{HA}^{mM})$  je  $-7554.10 \text{ J}$ . Iz ovoga proizilazi da je:  $RT \ln cmc_{A^-} - RT \ln(x_{HA}^{aq}/x_{HA}^{mM}) = -8840.78 \text{ J}$ . To znači da je:  $\Delta_{mM} G_r^\ominus < \Delta G_r^\ominus$ , tj. da  $pKa$  vrednosti protolize micelarno vezane žučne kiseline treba da imaju nižu vrednost u odnosu na  $pKa$  vrednosti protolize žučne kiseline iz vodene faze. Jednačina (5.16) važi u idealnim uslovima kada između gradivnih jedinica micle ne postoje međumolekulske interakcije i ujedno karboksilatne grupe steroidnog skeleta deluju individualno u micelarnoj pseudofazi. Pri ovakvim idealnim uslovima veliki afinitet monomernog anjona ka micelarnoj pseudofazi ( $RT \ln cmc_{A^-}$ ) smanjuje  $\Delta_{mM} G_r^\ominus$  u odnosu na  $\Delta G_r^\ominus$ . Međutim, eksperimentalno određene  $pKa$  vrednosti (Tabela 5.8.) pokazuju suprotno.

Tabela 5.8. Protolitička konstanta ( $pK_a$ ) micelarno vezane žučne kiseline i udela micelarno vezanog kontrajona  $\xi$  ( $\text{Na}^+$ ),  $T = 298,1 \text{ K}$  i  $p_a = 1,00 \times 10^5 \text{ Pa}$

$\alpha$ (TX)	Na-holat		Na-hiodeoksiholat	
	$pK_a$	$\xi$	$pK_a$	$\xi$
0,1	5,27	0,020	5,78	0,022
0,2	5,40	0,018	6,20	0,020
0,3	5,48	0,015	6,28	0,017
0,4	5,55	0,016	6,32	0,018
0,5	5,63	0,015	6,39	0,018

$pK_a$  (Na-holat) = 5,13;  $pK_a$  (Na-hiodeoksiholat) = 5,58

Standardne nesigurnosti  $u$ , su:  $u(T) = \pm 0,1 \text{ K}$ ,  $u(p) = \pm 0,002 \text{ MPa}$ ,  $u(pK_a) = \pm 0,02$ ,  $u(\xi) = \pm 0,003$

Ovo znači da je nejonizovana žučna kiselina u binarnoj mešovitoj miceli termodinamički stabilnija nego u vodenom rastvoru, tj. da postoji dodatna Gibbs-ova energija ( $G_{HA}^E$ ):

$$\Delta G_r^\ominus + RT \ln cmc_{A^-} - RT \ln \frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}} - G_{HA}^E = const. - RT \ln K \quad (5.17).$$

Iz Tabele 5.8. može se zaključiti da  $pK_a$  vrednosti micelarno vezane žučne kiseline zavise od molarnog udela Tritona X-100 u binarnoj smeši surfaktanata ( $\alpha$ ). Pri svakom molarnom odnosu Tritona X-100 u binarnoj smeši surfaktanata ( $\alpha$ ) promena  $pK_a$  vrednosti, tj. povećanje micelarno vezanog HD u odnosu na nevezani HD ( $\Delta pK_a$ ) je veće nego kod iste promene  $pK_a$  vrednosti kod C (Tabela 5.9.).

Tabela 5.9. Promena  $pK_a$  vrednosti žučne kiseline iz mešovite micela u odnosu na  $pK_a$  vrednost ne-micelarne žučne kiseline ( $\Delta pK_a$ )

$\alpha$ (TX)	Na-holat	Na-hiodeoksiholat
0,1	0,14	0,20
0,2	0,27	0,62
0,3	0,35	0,70
0,4	0,42	0,74
0,5	0,50	0,81

$$u(\Delta pK_a) = \pm 0,03$$

Koeficijenti interakcije ( $\beta_{ij}$ ) se ponašaju slično kod mešoviti micela HD – Triton X-100 i mešoviti micela C – Triton X-100 (Tabela 5.5, Tabela 5.6, Tabela 5.8.).  $\beta_{ij}$  se odnosi na interakciju između anjona žučnih kiselina i Tritona X-100 u micelarnoj pseudofazi, gde  $\beta_{ij}$  pokazuje sinergističku interakciju između različitih gradivnih jedinica mešovite micela. Sinergistička interakcija je najverovatnije posledica formiranja vodoničnih veza između steroidnih OH grupa i POE grupa Tritona X-100. Iste vodonične veze su prisutne između Tritona X-100 i OH grupa micelarnih nejonizovanih žučnih kiselina, tj. vodonične veze termodinamički stabilizuju nejonizovane žučne kiseline u pseudofazi mešovite micela. Zato je  $G_{HA}^E$  (5.14, 5.17) manje od nula, ali zbog negativnog predznaka u jednačinama (5.14) i

$$(5.17) \Delta_{mM} G_r^\ominus \text{ se povećava u odnosu na } \Delta G_r^\ominus \left( \underbrace{RT \ln cmc_{A^-} - RT \ln \frac{x_{HA}^{aq}}{x_{HA}^{mM}}}_{<0} < -G_{HA}^E \right), \text{ tj. } pK_a$$

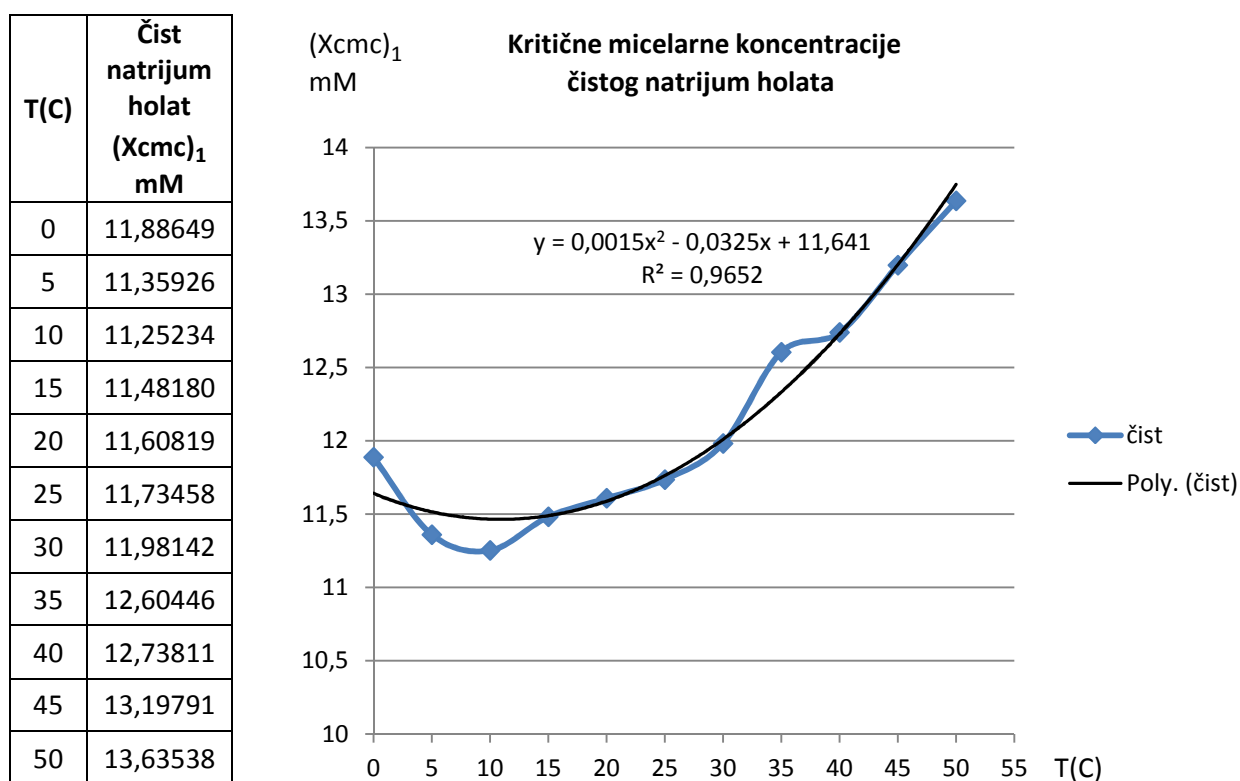
vrednosti micelarnih žučnih kiselina se povećavaju u skladu sa  $pK_a$  vrednostima žučnih kiselina iz vodenog rastvora (Tabela 5.9). Sa povećanjem molarnog udela Tritona X-100 u binarnoj smeši surfaktanata ( $\alpha$ ), vrednosti  $\Delta pK_a$  se povećavaju. Sa porastom vrednosti  $\alpha$ ,  $x_i^{mM}$  se povećava (molarni udeo Tritona X-100 u binarnoj mešovitoj miceli) i zato raste verovatnoća da molekuli žučnih kiselina budu okruženi molekulima Tritona X-100, kao i

verovatnoća formiranja vodoničnih veza između steroidnih OH grupa i POE grupa Tritona X-100. Na osnovu toga, dodatna Gibbs-ova energija (5.14) i (5.17) iznosi:  $G_{HA}^E = f(\beta_{ij}, \alpha)$ .

### 5.3. Hoffmeister-ov efekat

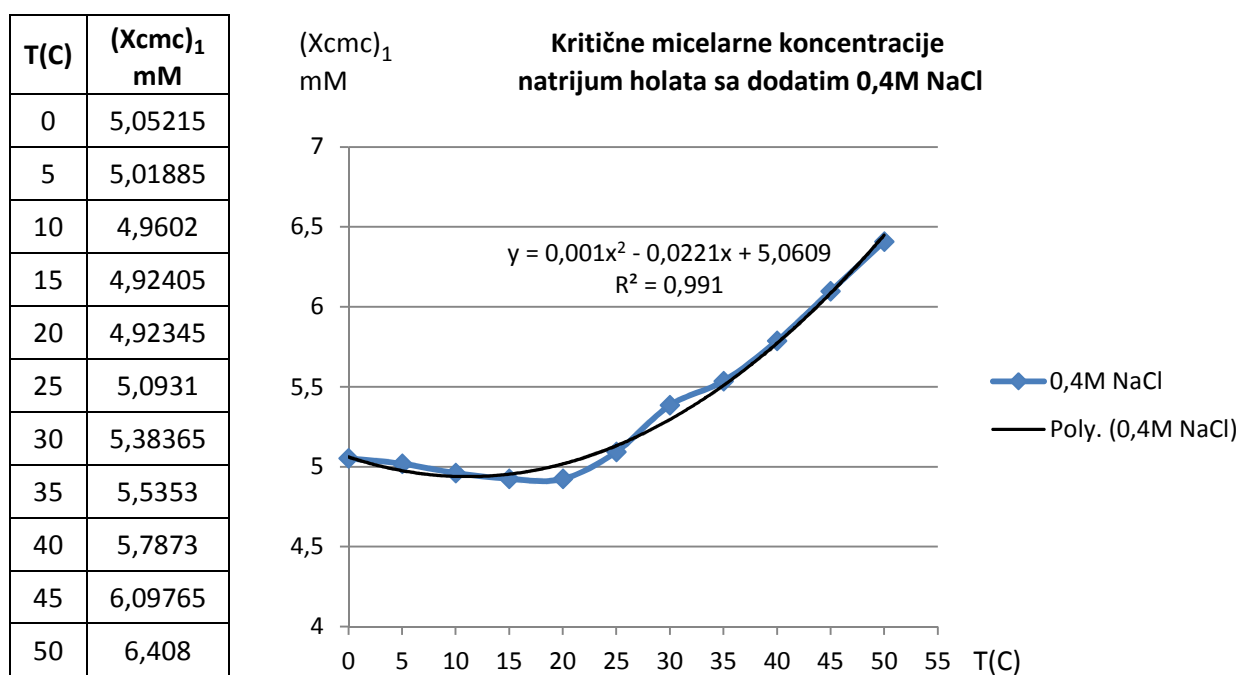
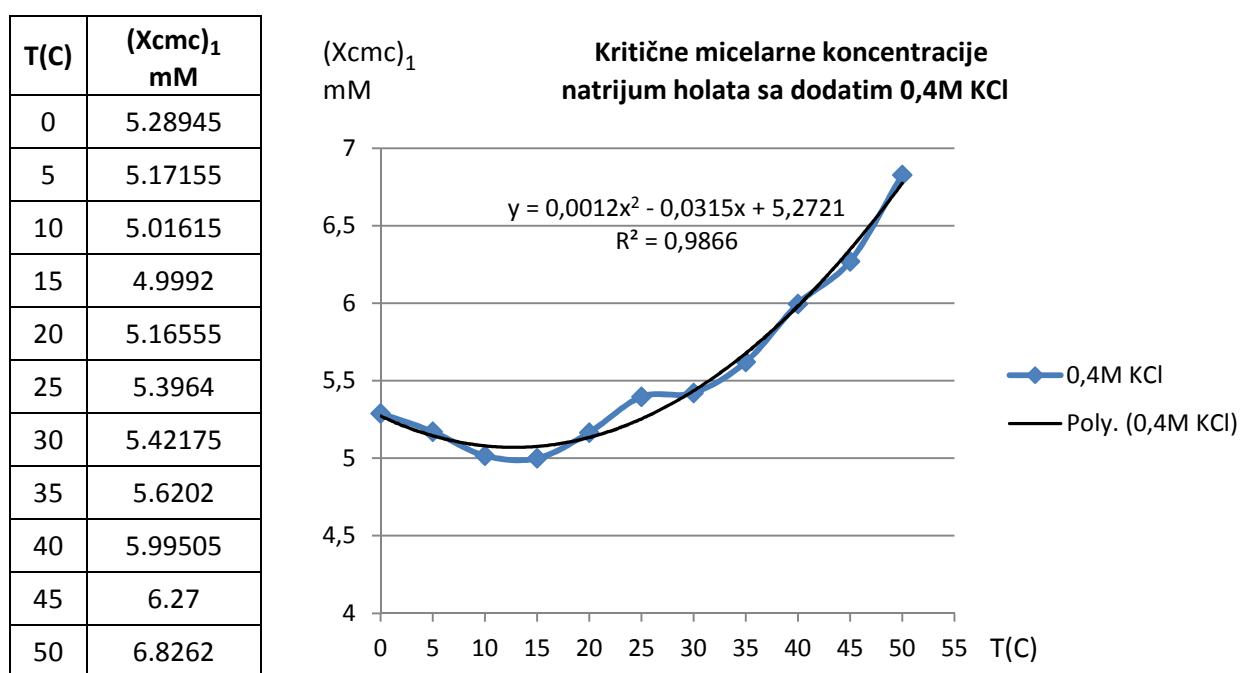
„U” krive koje se dobijaju merenjem CMC vrednosti u zavisnosti od temperature (Slike 5.1.-5.15., Tabele 5.1.-5.4.) objašnjavaju se po opštoj teoriji hidrofobnosti (Frank-Evansova teorija).

Kod određivanja CMC pomoću fitovanja krive  $I_1/I_3 = f(C_t)$  sa Boltzman-ovom funkcijom, dobija se fluktuacija kritičnih micelarnih koncentracija u zavisnosti od koncentracija soli. Ovo znači da se u ispitivanju uticaja Hoffmeister-ovog efekta na samoasocijaciju surfaktanata za kritičnu micelarnu koncentraciju dobijaju tačnije vrednosti ukoliko se CMC određuje kao infleksiona tačka funkcije  $I_1/I_3 = f(C_t)$  (Prilog, Slike 8.1.-8.15., Tabele 8.1.-8.4.).

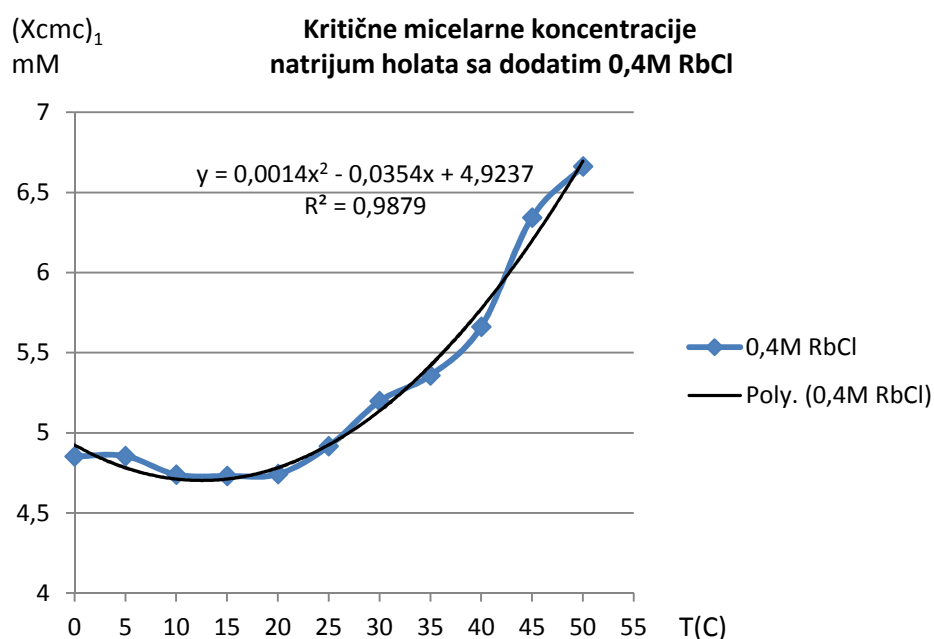


Slika 5.1. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>1</sub> čistog natrijum holata



Slika 5.2. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>1</sub> natrijum holata sa dodatim 0,4M NaClSlika 5.3. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>1</sub> natrijum holata sa dodatim 0,4M NaCl

T(C)	(Xcmc) <sub>1</sub> mM
0	4.8524
5	4.8555
10	4.7393
15	4.7312
20	4.7421
25	4.916
30	5.1973
35	5.358
40	5.6615
45	6.3433
50	6.6627

Slika 5.4. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>1</sub> natrijum holata sa dodatim 0,4M RbCl

T(C)	(Xcmc) <sub>1</sub> mM
0	4,3317
5	4,1081
10	4,20025
15	4,2924
20	4,4202
25	4,6644
30	4,9086
35	5,102
40	5,4221
45	5,848
50	6,4085

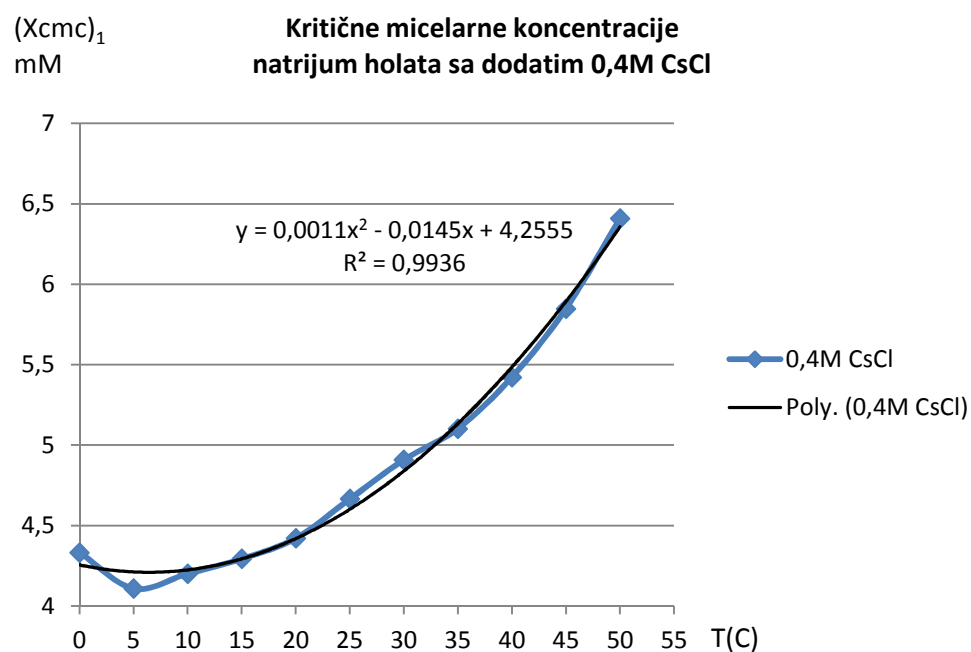
Slika 5.5. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>1</sub> natrijum holata sa dodatim 0,4M CsCl

Tabela 5.1. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_1$  natrijum holata sa dodatim NaCl

T(C)	čist	0,05M NaCl	0,1M NaCl	0,2M NaCl	0,3M NaCl	0,4M NaCl
0	11,88649	8,3424	7,23915	5,99805	5,3886	5,05215
5	11,35926	8,2464	6,9477	5,7909	5,6123	5,01885
10	11,25234	8,0208	6,99345	5,79855	5,30025	4,9602
15	11,48180	8,04525	6,81225	5,88195	5,32095	4,92405
20	11,60819	8,34885	6,9267	5,83545	5,382	4,92345
25	11,73458	8,3613	7,29825	5,97345	5,5041	5,0931
30	11,98142	8,9679	7,48245	6,4038	5,74095	5,38365
35	12,60446	9,3888	7,8807	6,6513	5,93355	5,5353
40	12,73811	10,19655	8,2752	6,93075	6,2556	5,7873
45	13,19791	10,79725	8,76135	7,45545	6,68025	6,09765
50	13,63538	11,50515	10,12875	7,9872	7,23795	6,408

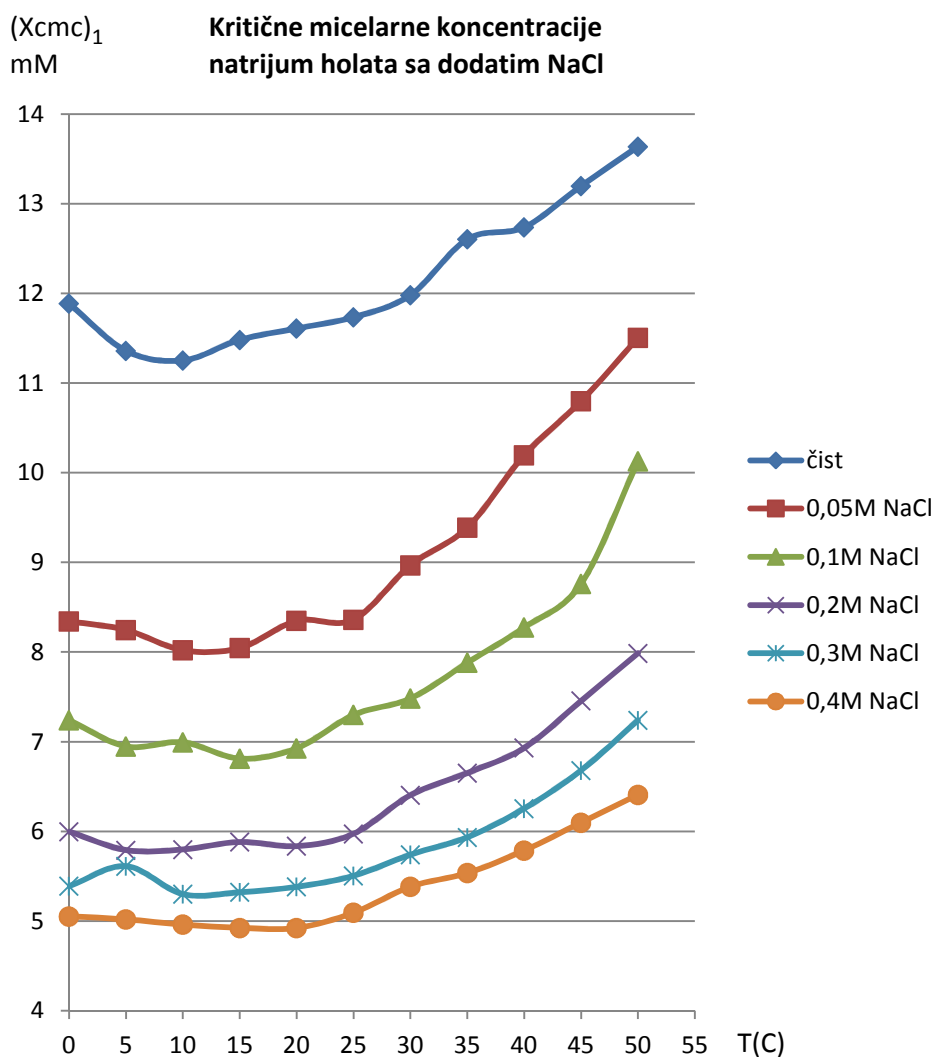
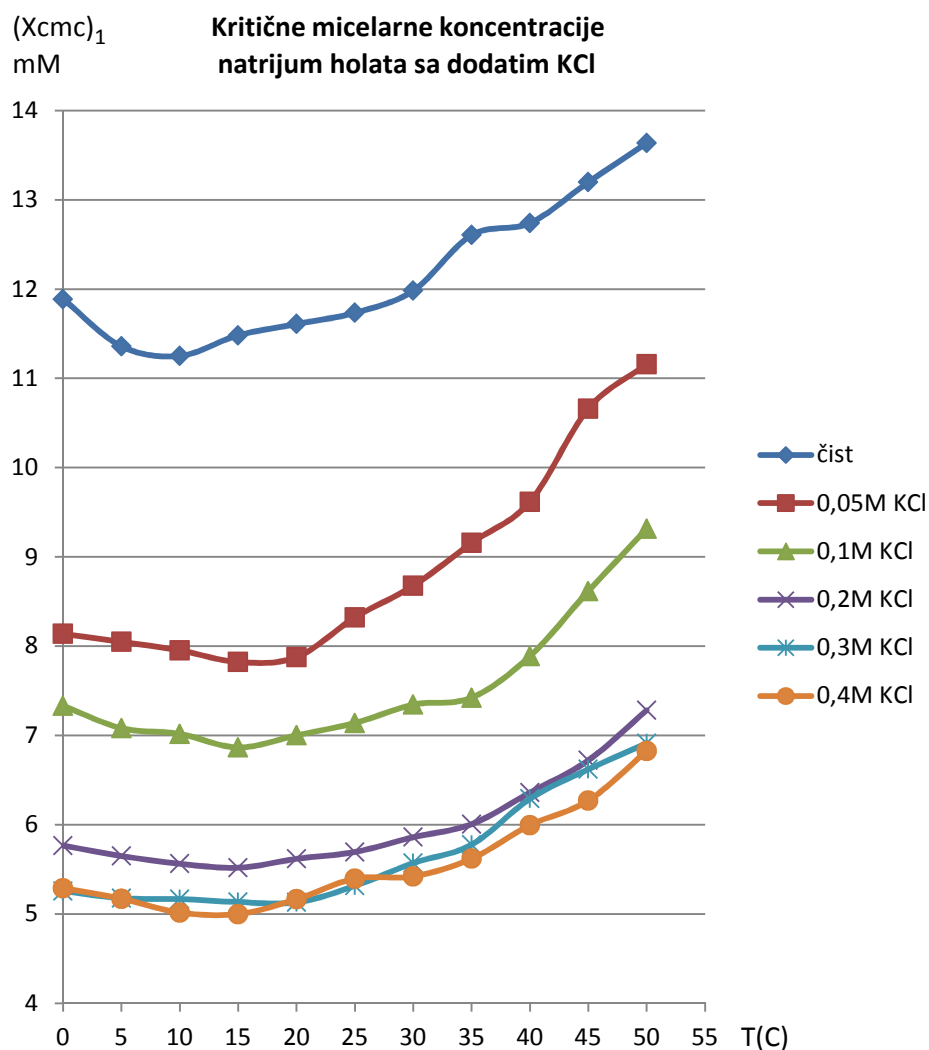
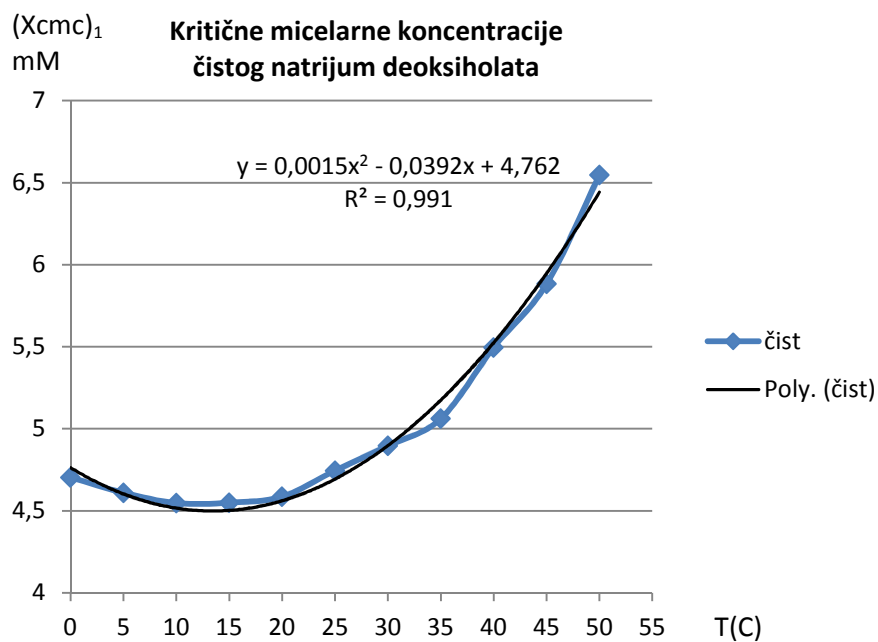
Slika 5.6. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_1$  natrijum holata sa dodatim NaCl

Tabela 5.2. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_1$  natrijum holata sa dodatim KCl

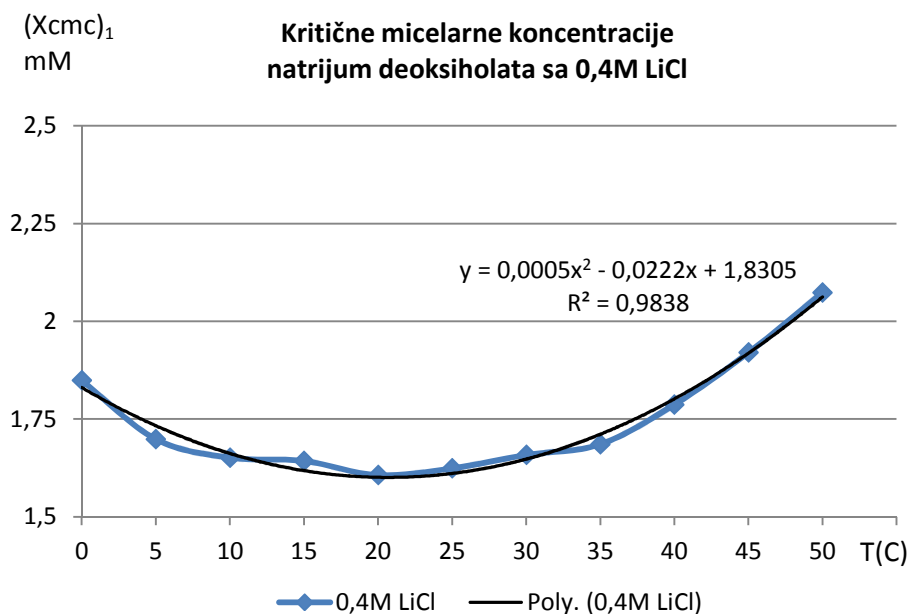
T(C)	čist	0,05M KCl	0,1M KCl	0,2M KCl	0,3M KCl	0,4M KCl
0	11,88649	8,1372	7,3311	5,76645	5,25585	5,28945
5	11,35926	8,04825	7,08105	5,6496	5,1777	5,17155
10	11,25234	7,9533	7,01655	5,5635	5,16645	5,01615
15	11,48180	7,8222	6,86595	5,5179	5,13435	4,9992
20	11,60819	7,87635	7,0017	5,61825	5,12985	5,16555
25	11,73458	8,32245	7,1397	5,6949	5,31525	5,3964
30	11,98142	8,6763	7,34505	5,86035	5,57025	5,42175
35	12,60446	9,1557	7,42305	6,0069	5,7762	5,6202
40	12,73811	9,6171	7,8894	6,36	6,2907	5,99505
45	13,19791	10,65975	8,61555	6,7209	6,6207	6,27
50	13,63538	11,15865	9,315	7,28175	6,91185	6,8262

Slika 5.7. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_1$  natrijum holata sa dodatim KCl

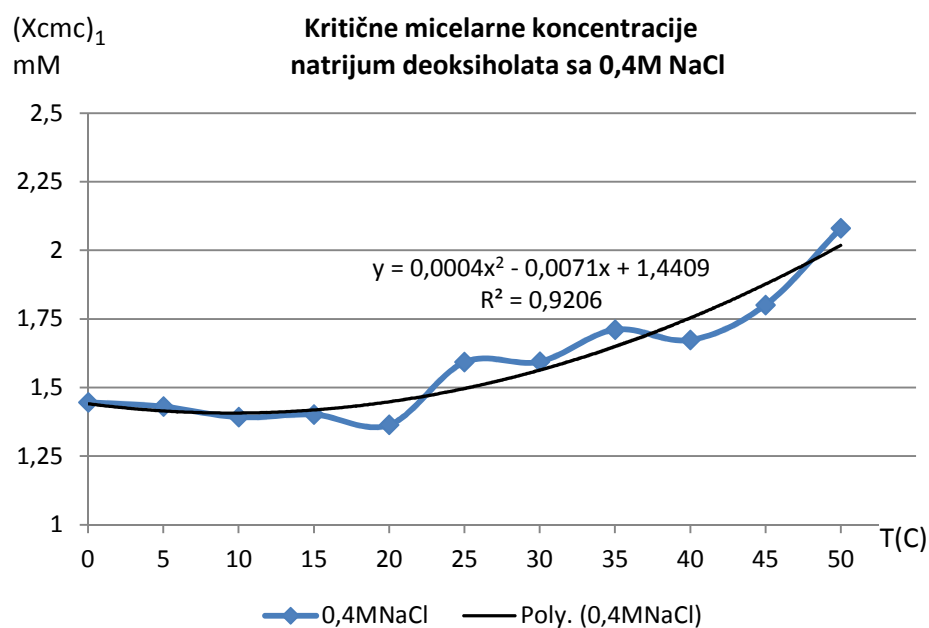
T(C)	Čist natrijum deoksiholat ( $X_{cmc})_1$ mM
0	4,7031
5	4,6101
10	4,547
15	4,5491
20	4,5858
25	4,7448
30	4,8954
35	5,0615
40	5,495
45	5,8827
50	6,5471

Slika 5.8. Kritične micelarne koncentracije ( $X_{cmc})_1$  čistog natrijum deoksiholata

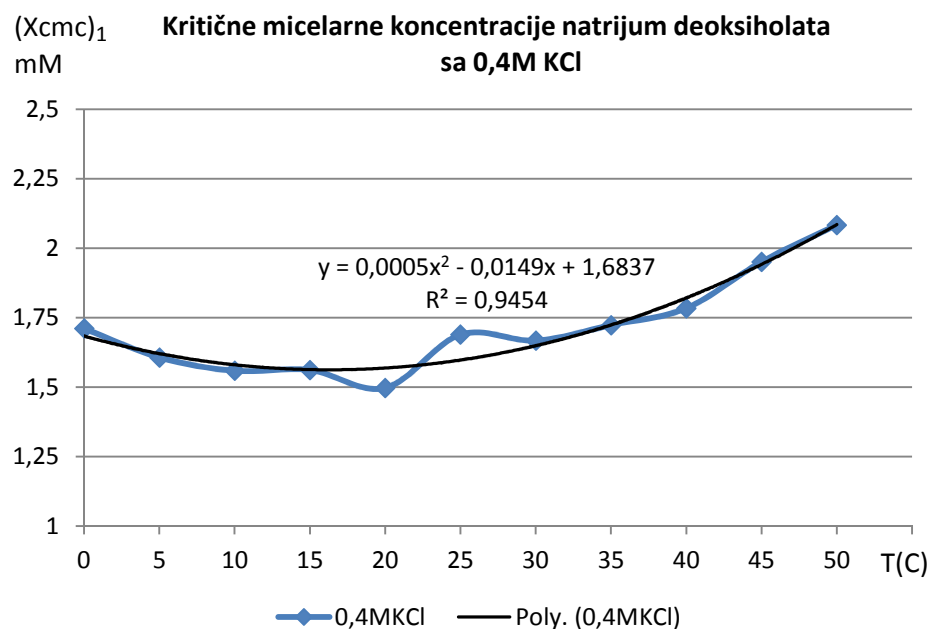
T(C)	( $X_{cmc})_1$ mM
0	1,8489
5	1,6987
10	1,6512
15	1,6428
20	1,6065
25	1,6239
30	1,6581
35	1,6855
40	1,787
45	1,92
50	2,0737

Slika 5.9. Kritične micelarne koncentracije ( $X_{cmc})_1$  natrijum deoksiholata sa dodatim 0,4M LiCl

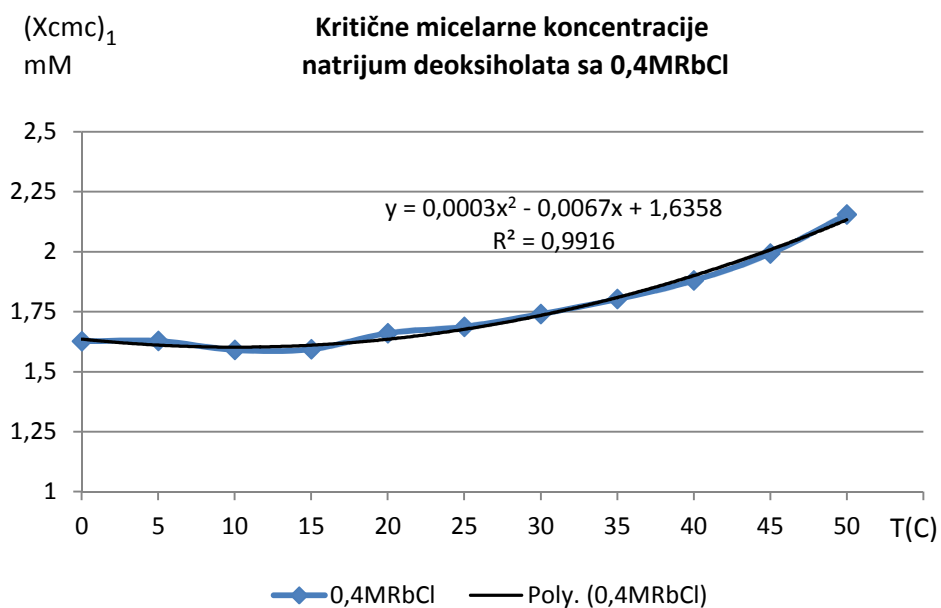
T(C)	(Xcmc) <sub>1</sub> mM
0	1,4462
5	1,4301
10	1,3919
15	1,4015
20	1,3636
25	1,5925
30	1,5942
35	1,7111
40	1,673
45	1,8009
50	2,0806

Slika 5.10. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>1</sub> natrijum deoksiholata sa dodatim 0,4M NaCl

T(C)	(Xcmc) <sub>1</sub> mM
0	1,7108
5	1,6069
10	1,5588
15	1,5614
20	1,4969
25	1,6891
30	1,6675
35	1,7232
40	1,7842
45	1,9513
50	2,0839

Slika 5.11. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>1</sub> natrijum deoksiholata sa dodatim 0,4M KCl

T(C)	(Xcmc) <sub>1</sub> mM
0	1,6268
5	1,6279
10	1,5905
15	1,5936
20	1,6604
25	1,687
30	1,7403
35	1,8024
40	1,88
45	1,9922
50	2,155

Slika 5.12. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>1</sub> natrijum deoksiholata sa dodatim 0,4M RbCl

T(C)	(Xcmc) <sub>1</sub> mM
0	1,1943
5	1,3209
10	1,3065
15	1,337
20	1,3677
25	1,4543
30	1,5508
35	1,5917
40	1,7268
45	1,843
50	1,9919

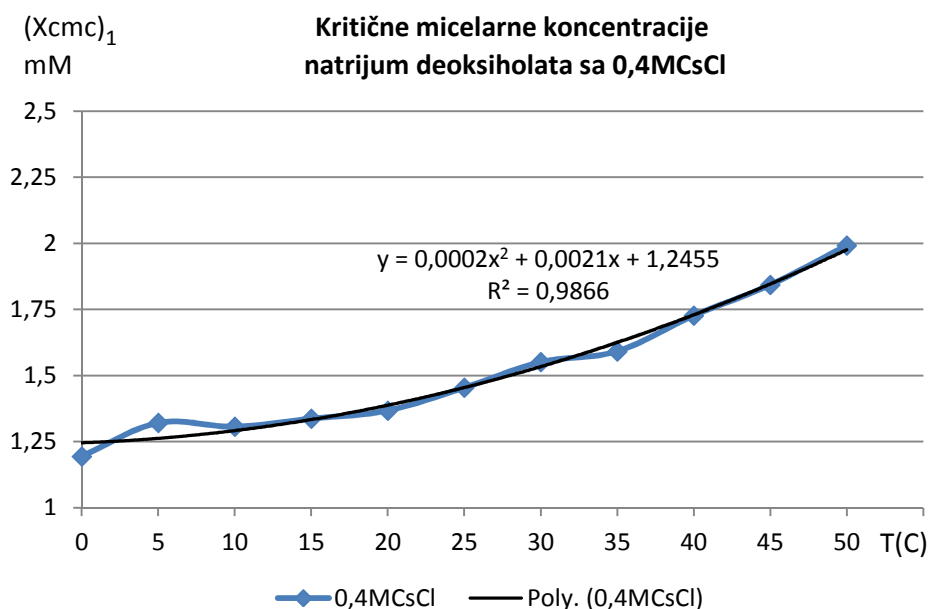
Slika 5.13. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>1</sub> natrijum deoksiholata sa dodatim 0,4M CsCl

Tabela 5.3. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_1$  natrijum deoksiholata sa dodatim NaCl

T(C)	čist	0,05M NaCl	0,1M NaCl	0,2M NaCl	0,3M NaCl	0,4M NaCl
0	4,7031	2,8405	2,4123	2,0616	1,7383	1,4462
5	4,6101	2,7071	2,2552	1,9807	1,7332	1,4301
10	4,547	2,6784	2,2461	1,9274	1,6233	1,3919
15	4,5491	2,6133	2,2236	1,9506	1,6007	1,4015
20	4,5858	2,6114	2,2685	1,9636	1,6052	1,3636
25	4,7448	2,6325	2,3613	2,0516	1,6409	1,5925
30	4,8954	2,8714	2,3969	2,0648	1,6361	1,5942
35	5,0615	2,8905	2,5698	2,1117	1,6972	1,7111
40	5,495	3,1732	2,7631	2,2629	1,771	1,673
45	5,8827	3,355	2,9861	2,4249	1,8773	1,8009
50	6,5471	3,6409	3,1587	2,6026	2,0971	2,0806

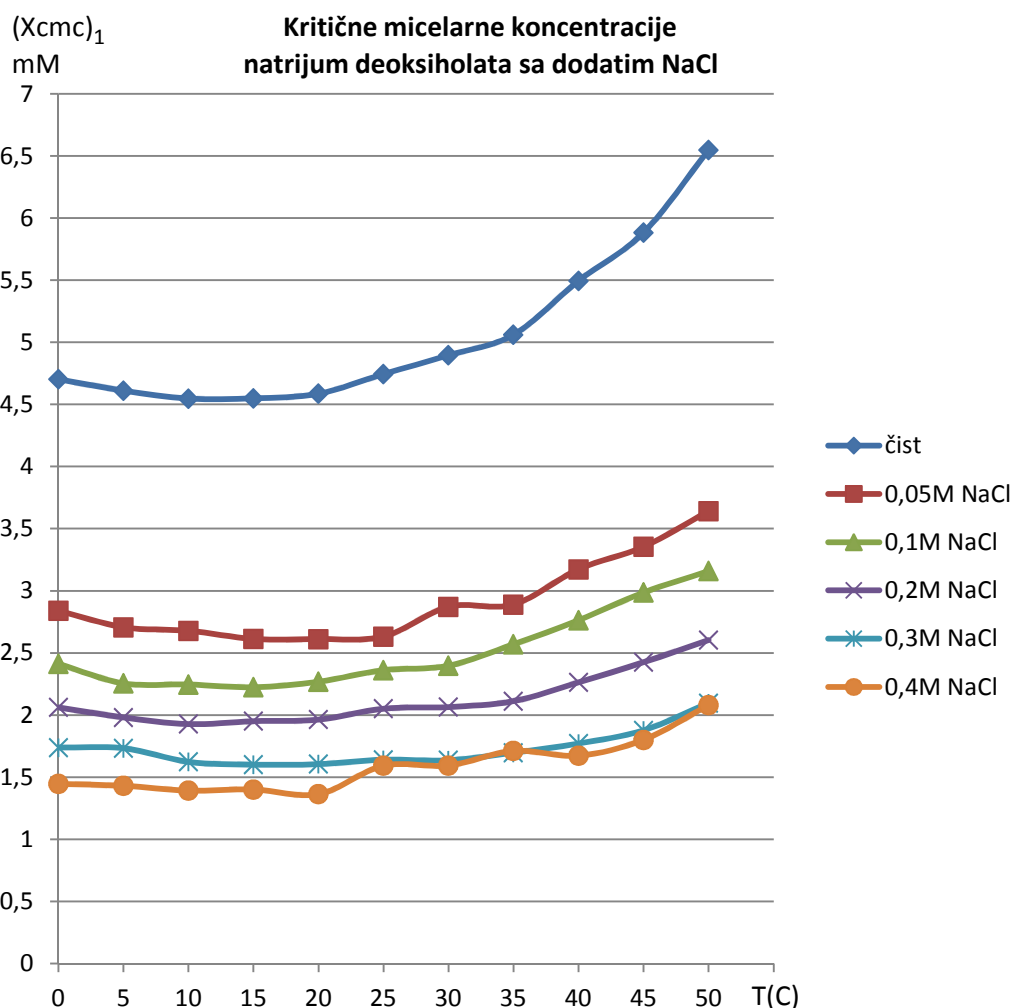
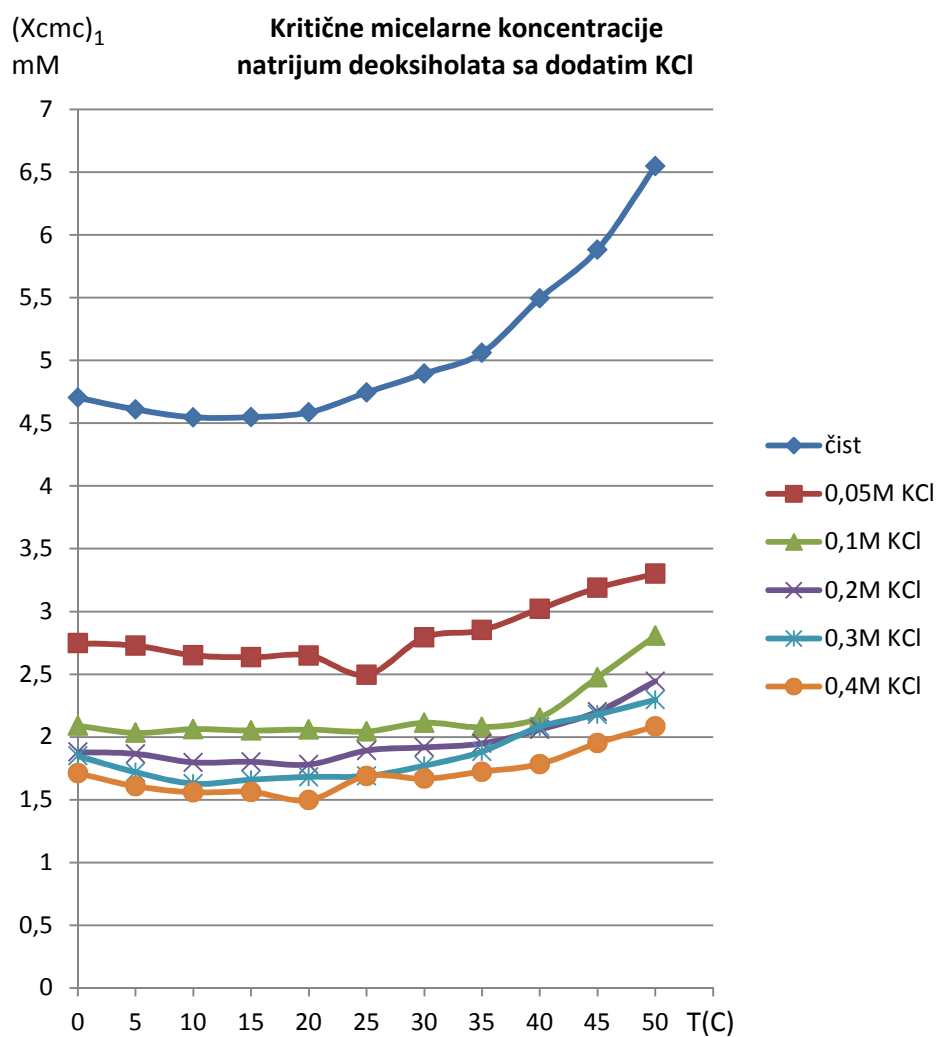
Slika 5.14. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_1$  natrijum deoksiholata sa dodatim NaCl



Tabela 5.4. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_1$  natrijum deoksiholata sa dodatim KCl

T(C)	čist	0,05M KCl	0,1M KCl	0,2M KCl	0,3M KCl	0,4M KCl
0	4,7031	2,7469	2,089	1,8794	1,8484	1,7108
5	4,6101	2,7263	2,0321	1,8652	1,719	1,6069
10	4,547	2,6515	2,0616	1,7971	1,6282	1,5588
15	4,5491	2,6348	2,0507	1,8023	1,6584	1,5614
20	4,5858	2,649	2,0587	1,7804	1,6817	1,4969
25	4,7448	2,4949	2,0432	1,8912	1,6885	1,6891
30	4,8954	2,793	2,1133	1,9174	1,7706	1,6675
35	5,0615	2,8509	2,0781	1,9487	1,8836	1,7232
40	5,495	3,0214	2,1541	2,0584	2,0819	1,7842
45	5,8827	3,1878	2,475	2,2016	2,1781	1,9513
50	6,5471	3,3	2,8053	2,4439	2,2962	2,0839

Slika 5.15. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_1$  natrijum deoksiholata sa dodatim KCl

Nestabilizovani molekuli vode sa hidrofobne strane monomera imaju uređenije stanje (low density water) i manje stepena slobode, pa poseduju samo rotaciono i vibraciono kretanje, a time i manju entropiju nego molekuli vode u unutrašnjosti rastvora, koji imaju mogućnost da ostvare 4 vodonične veze. Sistem uvek teži većoj entropiji, pa molekuli vode (low density) teže da dospeju u unutrašnjosti rastvora. Sa povećanjem temperature rastvora, povećava se rotaciona i vibraciona energija low density molekula vode male gustine i oni u toku fazne transformacije dobijaju translacionu energiju, pa ovaj proces obeležava dehidraciju hidrofobne površine monomera (pseudofazna transformacija, poput topljenja leda). Zbog dehidracije monomera (nepolarne strane) raste tendencija samoasocijacije, pa se u prvom delu krive smanjuje CMC vrednost. Dodatnim povećanjem temperature započinje drugi proces, gde same gradivne jedinice micelle dobijaju dodatnu vibracionu energiju i pomeraju se po longitudinalnoj osi, što opet izlaže nepolarne strane monomera molekulima vode i rehidraciji (hidratacija hidrofobnog domena micelle, micelle postaju difuznije, rastresitije pod uticajem temperature). Kod svake korišćene soli (NaCl, KCl, LiCl, RbCl, CsCl) dolazi do smanjenja CMC vrednosti do 50 %. Ovo se objašnjava u manjoj meri neutralizacijom anjonskih grupa na površini micelle, i u većoj meri zbog toga što se soli (NaCl, KCl, LiCl, RbCl, CsCl) hidratišu, pa time odvlače molekule vode iz hidratacionog sloja monomera. Uticaj NaCl i KCl na funkciju  $CMC = f(T)$  se međusobno ne razlikuje značajno, dok se kod RbCl i CsCl statistički značajno razlikuje kriva CMC u odnosu na uticaj NaCl i KCl od 0° do 20°C, a od 20° do 50°C ne postoji značajna razlika. Ovo se objašnjava time što, najverovatnije, Rb i Cs zbog najvećeg jonskog radijusa i najveće površine imaju najveći stepen koordinacije molekula vode, pa deluju najviše na dehidraciju monomera.

## 6. ZAKLJUČAK

Kod binarnih mešovutih micela hiodeoksiholata i polisorbata sistem (mešovita micela) T20-HD je termodinamički stabilniji od T60-HD. Dok kod binarnih mešovutih miceli holata i polisorbata je obrnuto, tj. termodinamički je stabilnija mešovita micela T60-C od mešovite micide T20-C. Mešovita micela polisorbata sa C12 hidrofobnim segmentom i hiodeoksiholatom termodinamički je stabilnija od mešovite micide sa istim polisorbatom i anjonom holne kiseline. Ukoliko je u binarnoj mešovitoj miceli jedna od gradivnih jedinica polisorbat T60 (C18 hidrofobni segment) onda je termodinamički stabilniji sistem sa anjonom holne kiseline (druga gradivna jedinica) u odnosu na sistem sa anjonom hiodeoksiholne kiseline (druga gradivna jedinica).  $pK_a$  vrednost žučne kiseline u micelarnoj fazi veća je od  $pK_a$  vrednosti slobodne žučne kiseline. Sa povećanjem molskog udela polisorbata u binarnoj smeši surfaktanata raste  $pK_a$  vrednost žučne kiseline iz micelarne pseudofaze. Povećanje  $pK_a$  vrednosti žučne kiseline kod ispitivanih micelarnih sistema polisorbata u odnosu na  $pK_a$  vrednost žučne kiseline iz vodenog rastvora je mera za termodinamičku stabilnost realne mešovite micide u odnosu na idealnu binarnu mešovitu micelu. Stoga od različitih binarnih sistema homolognih surfaktanata tipa: polisorbat (ili neki drugi nejonski klasični surfaktant) – žučna so, jednostavnim eksperimentom potenciometrijske titracije, tj. korišćenjem jednog rastvora od svakog tipa binarne smeše surfaktanata iznad kritične micelarne koncentracije, na osnovu  $pK_a$  vrednosti može se odabrati sistem surfaktanta (koji je termodinamički najviše stabilizovan) za detaljniju termodinamičku analizu.

Na osnovu izvršenih ispitivanja  $pK_a$  vrednosti žučnih kiselina i termodinamičke stabilizacije realnih binarnih mešovutih micela sa Tritonom X-100, mogu se izvesti sledeći zaključci. Mešovite micide HD – Triton X-100 se karakterišu negativnim vrednostima parametra interakcije (što predstavlja sinergističke interakcije), realne binarne mešovite micide su termodinamički stabilnije, nego idealne mešovite micide. Dve ekvatorijalne grupe, C3-OH i C6-OH, u molekulu HD, posebno doprinose termodinamičkoj stabilizaciji mešovite micide zbog formiranja kooperativnih vodoničnih veza sa Tritonom X-100.  $pK_a$  vrednosti micelarno vezanih žučnih kiselina HD i C su veće nego kod žučnih kiselina van micide.  $\Delta pK_a$  vrednosti predstavljaju skrivenu razliku između standardne promene Gibbs-ove energije

protolize micelarno vezane žučne kiseline i standardne promene Gibbs-ove energije protolize žučne kiseline iz vodenog rastvora. Stoga su  $\Delta pK_a$  vrednosti povezane sa dodatnom Gibbs-ovom energijom ( $G_{HA}^E$ ), koja je posledica vodoničnih veza koje se formiraju između steroidnih OH grupa žučne kiseline i POE grupa Tritona X-100 u mešovitoj miceli. Ovo znači da u mešovitim micelama žučnih soli i Tritona X-100  $\Delta pK_a$  vrednosti pokazuju sinergističke interakcije između različitih gradivnih jedinica slično kao koeficijent interakcije iz Teorije regularnih rastvora (Regular Solution Theory - RST).

Kako kod natrijum holata, tako i kod natrijum deoksiholata NaCl, KCl, RbCl, CsCl na svakoj ispitivanoj temperaturi značajno snižavaju CMC vrednost u odnosu na sistem surfaktanata bez ispitivanih jona. Uticaji KCl i NaCl na krivu CMC u funkciji od temperature se međusobno ne razlikuju. U intervalu temperature od 0° do 20°C uticaj RbCl i CsCl na funkciju CMC (T) se značajno razlikuje u odnosu na delovanje NaCl i KCl.

Iznad temperature od 20°C ispitivane soli imaju isto dejstvo na funkciju CMC(T). Termodinamički najstabilnije micelle natrijum holata i natrijum deoksiholata se dobijaju u prisustvu RbCl ili CsCl pri koncentraciji od 400mM i na temperaturi od 15°C. Ovaj efekat se može objasniti time što katjoni Rb i Cs imaju najveću površinu, stoga mogu vezati najveći broj molekula vode iz hidratacionog sloja sa hidrofobne strane monomera - dolazi do izražaja konfiguracioni efekat hidratacije u odnosu na elektrostatički efekat privlačenja dipola molekula vode i gustine površinskog naelektrisanja jona.

## 7. LITERATURA

- [1] Mata J, Varade D, Bahadur P. Aggregation behavior of quaternary salt based cationic surfactants. *Thermochimica Acta*. 2005;428:147–155.
- [2] Guerrero AR, Vernon EJ, Demarse NA. Thermodynamics of Micelle Formation. *TA Instruments – Waters LLC*. 2010;MCAPN-2010-5:1-6.
- [3] Flores MV, Voutsas EC, Spiliotis N, Eccleston GM, Bell G, Tassios DP, Halling PJ. Critical Micelle Concentrations of Nonionic Surfactants in Organic Solvents: Approximate Prediction with UNIFAC. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2001;240:277–283.
- [4] Singh TS, Mitra S. Interaction of charge transfer fluorescence probe with nonionic surfactants: Estimation of physic chemical properties and association constant). *European Journal of Chemistry*. 2010;1(4):341-347.
- [5] Jones GP, Regismond S, Kwetkat K, Zana R. Micellization of Nonionic Surfactant Dimers and of the Corresponding Surfactant Monomers in Aqueous Solution. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2001;243:496–502.
- [6] Zhang L, Gao L, Liu Q, Yang F, Fanga Y. Novel surfactant-like fluorophore and its probing ability to the aggregation of amphiphilic compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2012;245:58–65.
- [7] Shi Y, Luo HQ, LiN B. Determination of the critical premicelle concentration, first critical micelle concentration and second critical micelle concentration of surfactants by resonance Rayleigh scattering method without any probe. *Spectrochimica Acta Part A*. 2011;78: 1403–1407.
- [8] Kolishetti N, RamakrishnanS. Effect of surfactants on the fluorescence spectra of watersoluble MEHPPV derivatives having grafted polyelectrolyte chains. *Journal of Chemical Sciences*, 2007; 119(2):185–193.
- [9] Poša M. Mixed micelles of binary surfactant mixtures: Tween 40 - Na-3,12-dioxo-5 $\beta$ -cholanate; Tween 80 - Na-3,12-dioxo-5 $\beta$ -cholanate and their thermodynamic description-characterisation. *Chemical Engineering Research and Design*. 2014;92(12):1826-1839.
- [10] Poša M, Vapa I, Ćirin D. Influence of surfactant hydrophobic segment length on the thermodynamic parameters of binary mixed micelles of homologues polysorbates and Triton X-100. *Fluid Phase Equilibria*. 2014;376:124-131.
- [11] Yu H, Narusawa H, Itoh K, Oshi A, Yoshino N, Ohblu K, Shirakawa T, Fukada K, Fujii M, Kato T, Seimiys T. Hydrophilicity of polar and apolar domains of amphiphiles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000;229:375-390.

- [12] Subuddhi U, Mishra AK. Micellization of bile salts in aqueous medium: A fluorescence study. *Colloids and Surfaces B*. 2007;57:102–107.
- [13] Holland PM, Rubingh DN. Nonideal multicomponent mixed micelle model. *Journal of Physical Chemistry*. 1983;87:1984-1990.
- [14] Holland PM. Nonideal mixed micellar Solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1986;26:111-129.
- [15] Rosen MJ. Surfactant and interfacial phenomenon. 3<sup>rd</sup> ed. Wiley-Interscience, New York, 2004.
- [16] Huang L, Somasundaran P. Theoretical model and phase behaviour for binary surfactant mixtures. *Langmuir*. 1997;13:6683-6688.
- [17] Hoffmann H, Pössnecker G. The mixing behavior of surfactants. *Langmuir*. 1994;10:381-389.
- [18] Clint JH. Micellization of mixed nonionic surface active agents. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 1975;71:1327-1334.
- [19] Poša M, Csanádi J, Kövér K.E., Guzsány V, Batta Gy. Biophysico-chemical study of molecular interactions between selected sodium salts of bile acids and morphine hydrochloride. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012;94:317-323.
- [20] Schulz PC, Rodríguez JL, Minardi RM, Sierra MB, Morini MA. Are the mixtures of homologous surfactants ideal? *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006;303:264-271.
- [21] Poša M. QSPR study of the effect of steroidal hydroxy and oxo substituents on the critical micellar concentrations of bile acids. *Steroids*. 2011;76(1-2):85-93.
- [22] Poša M. Hydrophobicity and self-association of bile acids with a special emphasis on oxo derivatives of 5- $\beta$ -cholanolic acid. *Current Organic Chemistry*. 2012;16(16):1876-1904.
- [23] Poša M. Heuman indices of hydrophobicity in bile acids and compared with new developed and conventional molecular descriptors. *Biochimie*. 2014;97:28-38.
- [24] Johnson M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. Synatom Research, Princeton, New Jersey, United States, *Materials and Methods*. 2013;3:163. DOI <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.163>  
<http://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>
- [25] Chae P, Rasmussen S, Rana R, Gotfryd K, Chandra R, Goren M, et al. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nature methods*. 2010;7:1003-1008.
- [26] Linke D. Detergents: an overview. *Methods in Enzymology*. 2009;463:603-617.

- [27] Poša M. Termodinamika binarnih smeša i mešovutih micela: sistemi natrijumovih soli žučnih kiselina i nejonskih surfaktanata. Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Novi Sad, 2015; p. 9.
- [28] Roda A, Hofmann AF, Mysels KJ. The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258:6362-6370.
- [29] Mikov M, Fawcett JP. Bile Acids, 1rd ed. Medishet Publisher, Geneva, 2007.
- [30] Poša M, Kuhajda K. Hydrophobicity and haemolytic potential of oxo derivatives of cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic acids. *Steroids*. 2010;75(6):424-431.
- [31] Poša M, Farkaš Z. Cholesterol solubilization by oxo derivatives of selected bile acids and their osmotic resistance. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 2010;75(8):767-784.
- [32] Yang L, Zhang H, Mikov M, Tucker IG. Physicochemical and biological characterization of monoketocholeic acid, a novel permeability enhancer. *Molecular Pharmaceutics*. 2009. 6(2):448-456.
- [33] Poša M, Tepavčević V. Mixed micelles of 7,12-dioxolithocholic acid and selected hydrophobic bile acids: interaction parameter, partition coefficient of nitrazepam and mixed micelles haemolytic potential. *Colloids and Surfaces Biointerfaces*. 2011;86:285-291.
- [34] Poša M, Ćirin D. Mixed micelles of sodium salts of bile acids and Tween 40: Effect of the steroid skeleton on the coefficient of interaction in mixed micelles. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2012;51:14722-14728.
- [35] Poša M, Sebenji A. Determination of the number average aggregation numbers of bile salt micelles with a special emphasis on their oxo derivatives – the effect of the steroid skeleton. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*. 2014;1840:1072-1082.
- [36] Jójárt B, Poša M, Fisher B, Szöri M, Farkaš Z, Viskolcz B. Mixed micelles of sodium cholate and sodium dodecylsulphate 1:1 binary mixture at different temperatures - experimental and theoretical investigations. *Public Library of Science One*. 2014;9(7):e-102–e-114.
- [37] Jójárt B, Viskolcz B, Poša M, Fejer Sz. Global optimization of cholic acid aggregates. *Journal of Chemical Physics*. 2014;140:1443021-1443027.
- [38] Calabresi M, Andreozzi P, La Mesa C. Supra-molecular association and polymorphic behaviour in systems containing bile acid salts. *Molecules*. 2007;12(8):1731-1754.
- [39] Dopico MA, Walsh VJ, Singer J. Natural bile acids and synthetic analogues modulate large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BKCa) channel activity in smooth muscle cells. *Journal of General Physiology*. 2002;119:251-273.

- [40] Chiang JY. Bile acid regulation of hepatic physiology III. Bile acids and nuclear receptors. *American Journal of Physiology*. 2003;284:G349-G356.
- [41] Rao PY, Stravitz TR, Vlahcevic RZ, Curley CE, Sando JJ, Hylemon BP. Activation of protein kinase C alpha and delta by bile acids: correlation with bile acids structure and diacylglycerol formation. *Journal of Lipid Research*. 1997;38:2446-2454.
- [42] Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7:678-693.
- [43] Hofmann FA, Roda A. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *Journal of Lipid Research*. 1984;25:1477-1489.
- [44] Armstrong JM, Carey CM. The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *Journal of Lipid Research*. 1982;23:70-80.
- [45] Roda A, Minutello A, Angellotti MA, Fini A. Bile acid structure-activity relationships: evaluation of bile acids lipophilicity using 1-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. *Journal of Lipid Research*. 1990;31:1433-1443.
- [46] Heuman MD. Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. *Journal of Lipid Research*. 1989;30:719-730.
- [47] Garidel P, Hildebrand A, Knauf K, Blume A. Membranolytic activity of bile salts: influence of biological membrane properties and composition. *Molecules*. 2007;12(10):2292-2326.
- [48] Mikov M, Kevresan S, Kuhajda K, Jakovljevic V, Vasovic V.  $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy-12-oxo-5 $\beta$ -cholanate as blood-brain barrier permeator. *Polish Journal of Pharmacology*. 2004;56:367-371.
- [49] Al-Salami H, Butt G, Tucker IG, Mikov M. Influence of the semisynthetic bile acid MKC on the ileal permeation of gliclazide in vitro in healthy and diabetic rats treated with probiotics. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 2008;30(2):107-113.
- [50] Poša M, Kevrešan S, Mikov M, Ćirin-Novta V, Kuhajda K. Effect of cholic acid and its keto derivatives on the analgesic action of lidocaine and associated biochemical parameters in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*. 2007;32:109-117.
- [51] Kuhajda I, Poša M, Jakovljević V, Ivetić V, Mikov M. Effect of 12-monoketocholic acid on modulation of the analgesic action of morphine and tramadol. *European Journal of Drug Metabolism And Pharmacokinetics*. 2009;34:73-78.



- [52] Vasović V, Vukmirović S, Poša M, Mikov M, Rašković A, Jakovljević V. Effect of rat pretreatment with aqueous solution of stevioside and bile acids on the action of certain cardioactive drugs. *European Journal of Drug Metabolism And Pharmacokinetics*. 2006;31:311–314.
- [53] Rašković A, Mikov M, Škrbić R, Jakovljević V, Vasović V, Poša M, Kuhajda K, Kevrešan S, Tomić Z, Siladji Dj. Effect of stevioside and sodium salt of monoketocholic acid on glycemia in normoglycemic and diabetic rats. *European Journal of Drug Metabolism And Pharmacokinetics*. 2008;33:17–22.
- [54] Poša M, Kuhajda K. Influence of bile acids on the adsorption of lidocaine and verapamil in an in vitro experiment. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2010;75(4):433-440.
- [55] Kuhajda K, Kandrac J, Kevrešan S, Mikov M, Fawcett JP. Structure and origin of bile acids: An overview. *European Journal of Drug Metabolism And Pharmacokinetics*. 2006;31:135–143.
- [56] Kevrešan S, Kuhajda K, Kandrac J, Fawcett JP, Mikov M. Biosynthesis of bile acids in mammalian liver. *European Journal of Drug Metabolism And Pharmacokinetics*. 2006;31:145–156.
- [57] Kuhajda K, Kevrešan S, Kandrac J, Fawcett JP, Mikov M. Chemical and metabolic transformations of selected bile acids. *European Journal of Drug Metabolism And Pharmacokinetics*. 2006;31,179–235.
- [58] Carey MC, Montet J-C, Phillips MC, Armstrong MJ, Mazer NA. Thermodynamic and molecular basis for dissimilar cholesterol solubilizing capacities by micellar solutions of bile salts: cases of sodium chenodeoxycholate and sodium ursodeoxycholate and their glycine and taurine conjugates. *Biochemistry*. 1981;20:3637-3648.
- [59] Mazer NA, Carey MC, Kwasnick RF, Benedek GB. Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Size, shape and thermodynamics of bile salt micelles. *Biochemistry*. 1979;18:3064-3075.
- [60] Bertolasi V, Ferretti V, Fantin G, Fogagnolo M. Solid state molecular assemblies of five bile acid derivatives. *Zeitschrift für Kristallographie*. 2008;223:515-523.
- [61] Camile W. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 2nd ed.; Academic Press: Oxford, 2003.
- [62] Bhattacharjee J, Verma G, Aswal VK, Date AA, Nagarsenker MS, Hassan PA. Tween 80-sodium deoxycholate mixed micelles: structural characterization and application in doxorubicin delivery. *Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114:16414-16421.

- [63] Schiweck H, Bär A, Vogel R, Schwarz E, Kunz M, Dusautois C, Clement A, Lefranc C, Lüssem B, Moser M, Peters S. Sugar Alcohols. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim, 2012; doi:10.1002/14356007.a25\_413.pub3
- [64] Kerwin BA. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97:2924–2935.
- [65] Smullin CF, Wetterau FP, Olsanski VL. The determination of polysorbate 60 in foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1971;48(1):18-20.
- [66] Mohajeri E, Noudeh GD. Effect of Temperature on the Critical Micelle Concentration and Micellization Thermodynamic of Nonionic Surfactants: Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters. *E-Journal of Chemistry*. 2012;9(4):2268- 2274.
- [67] Ćirin DM, Poša MM, Krstonošić VS, Milanović ML. Conductometric study of sodium dodecyl sulfate–nonionic surfactant (Triton X-100, Tween 20, Tween 60, Tween 80 or Tween 85) mixed micelles in aqueous solution. *Hemijska Industrija*. 2012;66(1):21– 28.
- [68] Gui liY, Chen B, Chen Z, Zhu L. Surfactant Effects on the Affinity of Plant Cuticles with Organic Pollutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57:3681–3688.
- [69] Lu D, Rhodes DG. Mixed Composition Films of Spans and Tween 80 at the Air-Water Interface. *Langmuir*. 2000;16:8107-8112.
- [70] Chakraborty S, Shukla D, Jain A, Mishra B, Singh S. Assessment of solubilization characteristics of different surfactants for carvedilol phosphate as a function of pH. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009;335:242–249.
- [71] Zhang D, Zhu L. Effects of Tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1. *Environmental Pollution*. 2012;164:169-174.
- [72] Ba A, Podgo W. Investigation of drop breakage and coalescence in the liquid-liquid system with nonionic surfactants Tween 20 and Tween 80. *Chemical Engineering Science*. 2012;74:181–191.
- [73] Marzio LD, Marianecchi C, Petrone M, Rinaldi F, Carafa M. Novel pH-sensitive nonionic surfactant vesicles: comparison between Tween 21 and Tween 20. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;82:18–24.
- [74] Samanta S, Ghosh P. Coalescence of air bubbles in aqueous solutions of alcohols and nonionic surfactants. *Chemical Engineering Science*. 2011;66:4824–4830.
- [75] Samanta S, Ghosh P. Coalescence of bubbles and stability of foams in aqueous solutions of Tween surfactants. *Chemical Engineering Research and Design*. 2011;8(9): 2344–2355.

- [76] Mahmood ME, Al-Koofee DAF. Effect of Temperature Changes on Critical Micelle Concentration for Tween Series Surfactant. *Global Journal of Science Frontier Research Chemistry*. 2013;13(4):1-7.
- [77] Arnold T, Linke D. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. *Biotechniques*. 2007;43:427-434.
- [78] Koley D, Bard AJ. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(39):16783–16787.
- [79] Nagarajan R. Molecular theory for mixed micelles. *Langmuir*. 1985;1(3):331-341.
- [80] Tanford C. Physical Chemistry of Macromolecules. John Wiley & Sons, Inc., New York. 1967, p. 478.
- [81] Rubingh DN. In: Mittal, K. L. (Ed), Solution Chemistry of Surfactants. Plenum Press, New York, 1979; pp. 337–354.
- [82] Rodenas E, Valiente M, Del Sol Villafuella M. Different theoretical approaches for the study of the mixed tetraethylene glycol momo-n-dodecyl ether/hexadecyltrimethylammonium bromide micelles. *Journal of Physical Chemistry B*. 1999;103:4549-4554.
- [83] Letellier P, Mayaffre A, Turmine M. Thermodynamics of mixed micelles: determination of the aggregate composition. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008;327:186-199.
- [84] Letellier P, Mayaffre A, Turmine M. Thoughts on the ideal behavior of mixed micelles and the appropriate application of regular solution theory (RST). *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011; 354:248-255.
- [85] Porter AW. On the vapour-pressures of mixtures. *Transactions of the Faraday Society*. 1920;16:336-345.
- [86] Korrapati S, Sanjeeva SK, Vijayalakshmi U. Effect of Hofmeister series salts and BSA on fluorescein compounds. *International Journal of Chemical Technology Research*. 2015;8(12):348-359.
- [87] Hofmeister F. About regularities in the protein precipitating effects of salts and the relation of these effects with the physiological behaviour of salts. *Archiv fuer experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 1887;24:247–260.
- [88] Yang Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 2009;144(1):12–22.

- [89] Zhang Y, Cremer PS. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006;10(6):658–663.
- [90] Leberman R. and Soper AK. Effect of high-salt concentrations on water-structure, *Nature*. 1995;378:364-366.
- [91] Chaplin M. Hofmeister Series. *Water Structure and Science*. London South Bank University, 2014; <http://www1.lsbu.ac.uk/water/hofmeist.html>
- [92] Baldwin RL. How Hofmeister Ion Interactions Affect Protein Stability. *Biophysical Journal*. 1996;71:2056-2063.
- [93] Debye P. and Hückel E. The theory of electrolytes. I. Lowering of freezing point and related phenomena. *Physikalische Zeitschrift*. 1923;24:185–206.
- [94] Poša M, Pilipović A, Lalić M. The influence of NaCl on hydrophobicity of selected, pharmacologically active bile acids expressed with chromatographic retention index and critical micellar concentration. *Colloids and Surfaces. Biointerface*. 2010;81:336-343.
- [95] Ivanov IB, Slavchov RI, Basheva ES, Sidzhakova D, Karakashev S.I. Hofmeister effect on micellization, thin films and emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011;168:93–104.
- [96] Evens TJ. and Niedz RP. Are Hofmeister series relevant to modern ion-specific effects research? *Scholarly Research Exchange*. 2008;761-829.
- [97] Collins KD. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*. 2004;34:300-311.
- [98] Collins KD, Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization. *Biophysical Chemistry*. 2006;119:271-281.
- [99] Genck, Wayne. "Make The Most of Antisolvent Crystallization". *Chemical Processing*, 2010; <http://www.chemicalprocessing.com/articles/2010/210/>
- [100] Lund M, Jungwirth P. Patchy proteins, anions and the Hofmeister series. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2008;20:494-218.
- [101] Song J. Insight into "Insoluble Proteins" with pure water. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 2009;583: 953-959.
- [102] Pinna MC, Bauduin P, Touraud D, Monduzzi M, Ninham BW, Kunz W. Hofmeister effects in biology: effect of choline addition on the salt-induced super activity of horseradish peroxidase and its implication for salt resistance of plants. *Journal of Physical Chemistry B*. 2005; 109(34):16511-16514.

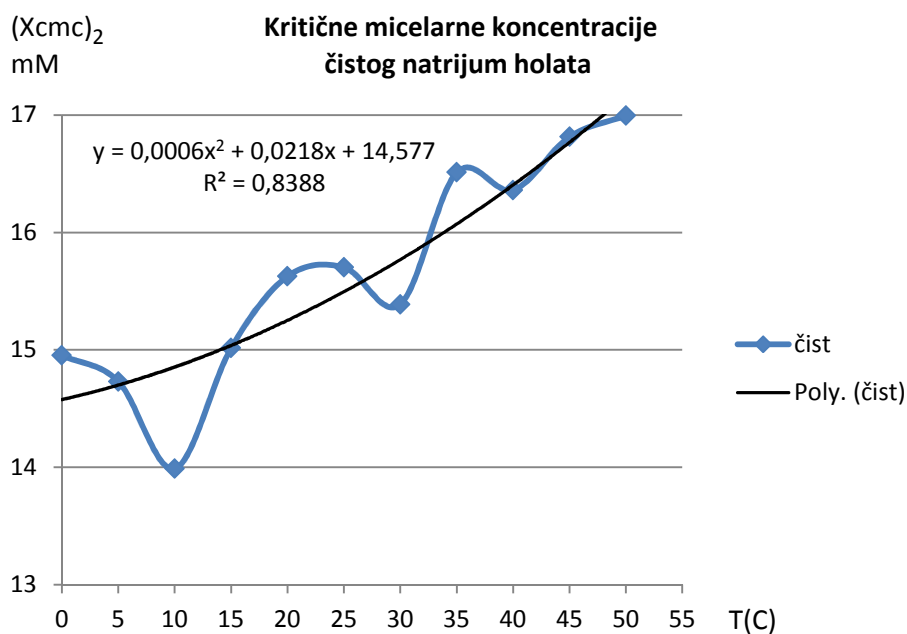
- [103] Vrbka L, Jungwirth P, Bauduin P, Touraud D, Kunz W. J Phys Chem B. Specific ion effects at protein surfaces: a molecular dynamics study of bovine pancreatic trypsin inhibitor and horseradish peroxidase in selected salt solutions. *Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110(13):7036-7043.
- [104] Bauduin P, Nohmie F, Touraud D, Neueder R, Kunz W, Ninham BW. Hofmeister specific-ion effects on enzyme activity and buffer pH: Horseradish peroxidase in citrate buffer. *Journal of Molecular Liquids*, 2006;123(1):14–19.
- [105] Salis A, Bilanicova D, Ninham BW, Monduzzi M. Hofmeister effects in enzymatic activity: weak and strong electrolyte influences on the activity of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Physical Chemistry B*. 2007;111(5):1149-1156.
- [106] Salis A, Monduzzi M, Ninham BW. Hofmeister effects in enzymatic activity, colloid stability, and pH measurements: ion-dependent specificity of intermolecular forces. Chapter in: Stefano Bellucci (Ed.). Nanoparticles and nanodevices in biological applications. Lecture notes in nanoscale science and technology 4. The Instituto Nazionale di Fisica Nucleare Lectures – Vol. I, *Springer - Verlag*, Berlin Heidelberg 2009; pp. 159-160.
- [107] Pinna MC, Salis A, Monduzzi M, Ninham BW. Hofmeister Series: The Hydrolytic Activity of *Aspergillus niger* Lipase Depends on Specific Anion Effects. *Journal of Physical Chemistry B*. 2005; 109(12):5406–5408.
- [108] Yang Z, Liu XJ, Chen C, Halling PJ. Hofmeister effects on activity and stability of alkaline phosphatase. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2009;1804:821-828.
- [109] Kalyanasundaram K, Thomas JK. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *Journal of the American Chemical Society*. 1977;99(7):2039–2044.
- [110] Kalyanasundaram K. Photomechanics in Microheterogeneous Systems, Academic Press, New York, 1987.
- [111] Aguiar J, Carpena P, Molina-Bolívar JA, Carnero Ruiz C. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003;258:116–122.
- [112] Zana R, Lévy H, Kwetkat K. Mixed Micellization of Dimeric (Gemini) Surfactants and Conventional Surfactants. I. Mixtures of an Anionic Dimeric Surfactant and of the Nonionic Surfactants C12E5 and C12E8. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1998;197:370-376.
- [113] Agilent Technologies. Agilent Cary Eclipse Spectrofluorimeter – User’s Guide. Sixth edition, June 2016, Mulgrave, Victoria, Australia. <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/1758.pdf>.
- [114] Nair P, Kritchevsky D. The Bile Acids. Plenum Press, New York/London, 1971.

- [115] Poša M, Ćirin D, Krstonošić V. Physico-chemical properties of bile salt-Tween 80 mixed micelles in the viewpoint of regular solution theory. *Chemical Engineering Science*. 2013;98:195-202.
- [116] Poša M, Popović K, Ćirin D, Farkaš Z. Binary mixed micelles of polysorbates (Tween 20 and Tween 60) and bile salts (Na-hyodeoxycholate and Na-cholate): Regular solution theory and change of  $pK_a$  values of micellar bile acid - a novel approach to estimate of the stability of the mixed micelles. *Fluid Phase Equilibria*. 2015;396:1-8.
- [117] Zana R, Guveli D. Fluorescence probing study of the association of bile salts in aqueous solutions. *Journal of Physical Chemistry*. 89 1985;89(9):1687–1690.
- [118] Ćirin D, Poša M, Krstonošić V. Interactions between selected bile salts and Triton X-100 or sodium lauryl ether sulphate. *Chemistry Central Journal*. 2011;5:89.
- [119] Hait SK, Moulik SP. Determination of Critical Micelle Concentration (CMC) of Nonionic Surfactants by Donor-Acceptor Interaction with Iodine and Correlation of CMC with Hydrophile-Lipophile Balance and Other Parameters of the Surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2001;4(3):303-309.
- [120] Garidel P, Hildebrand A. Thermodynamic properties of association colloids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2005;82:483-489.
- [121] Hildebrand A, Garidel P, Neubert R, Blume A. Thermodynamics of demicellization of mixed micelles composed of sodium oleate and bile salts. *Langmuir*. 2004;20:320-328.
- [122] Waters LJ, Hussain T, Parkes GMB. Titration calorimetry of surfactant–drug interactions: Micelle formation and saturation studies. *Journal of Chemical Thermodynamics*. 2012;53: 36-41.
- [123] Ito TH, Clinckspoor KJ, de Souza RN, Sabadini E. The thermal signature of wormlike micelles. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 2016; 94: 61-66.
- [124] Paula S, Süss W, Tuchtenhagen J, Blume A. Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: a high sensitivity titration calorimetry study. *Journal of Physical Chemistry*. 1995;99: 11742-11751.
- [125] Garidel P, Hildebrand A, Neubert R, Blume A. Thermodynamic Characterization of Bile Salt Aggregation as a Function of Temperature and Ionic Strength Using Isothermal Titration Calorimetry. *Langmuir*. 2000;16(12):5267-5275.
- [126] Poša M, Pilipović A, Lalić M, Popović J. Determination and importance of temperature dependence of retention coefficient (RPHPLC) in QSAR model of nitrazepam's partition coefficient in bile acid micelles. *Talanta*. 2011;83(5):1634-1642.
- [127] Hore PJ. Nuclear Magnetic Resonance. *Oxford University Press*, Oxford, 1995.

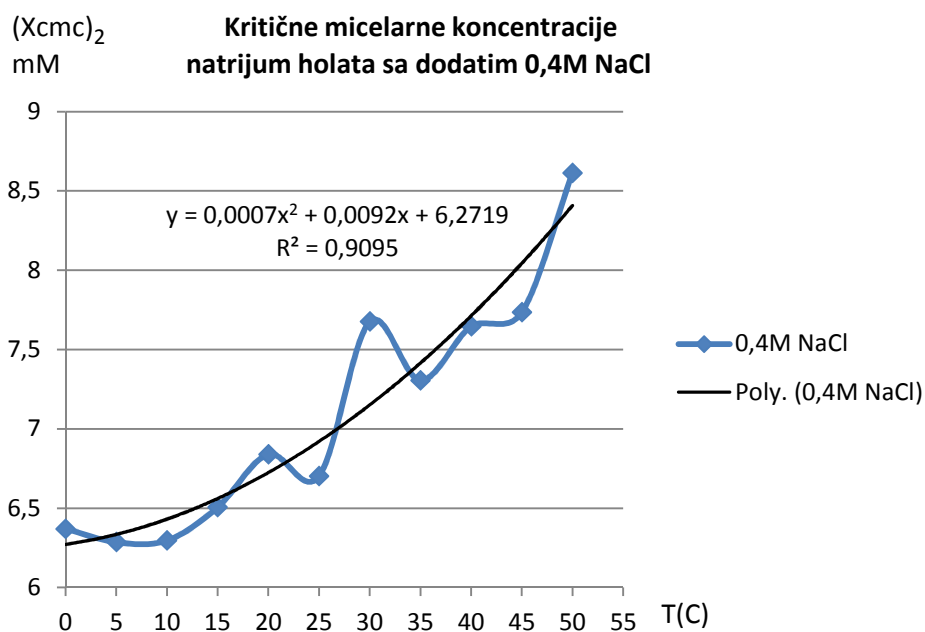
## 8. PRILOG

Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  natrijum holata

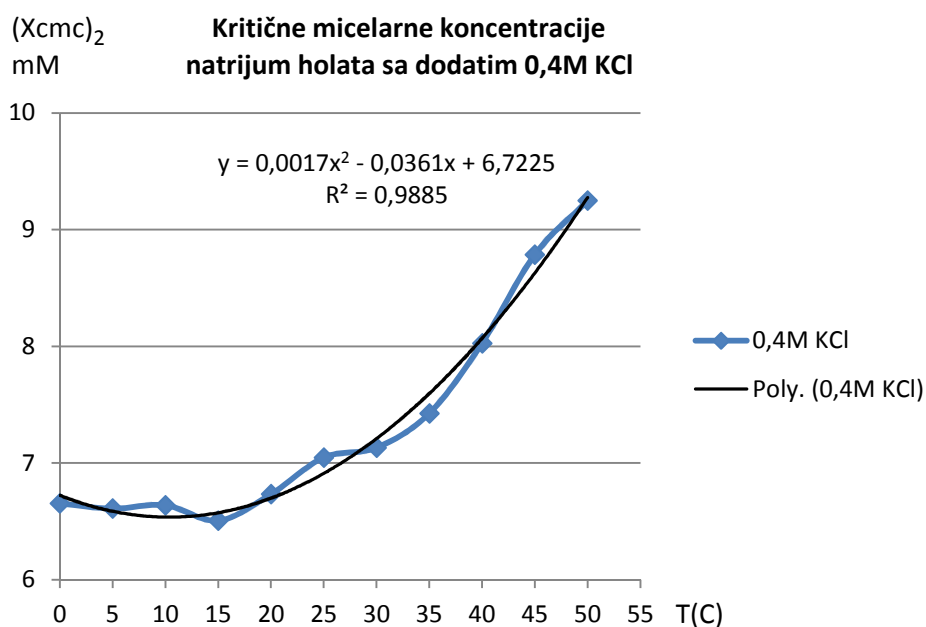
T(C)	$(X_{cmc})_2$ mM
0	14,95285
5	14,73098
10	13,98738
15	15,01522
20	15,62583
25	15,70338
30	15,38768
35	16,51144
40	16,36107
45	16,81449
50	16,99522

Slika 8.1. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  čistog natrijum holata

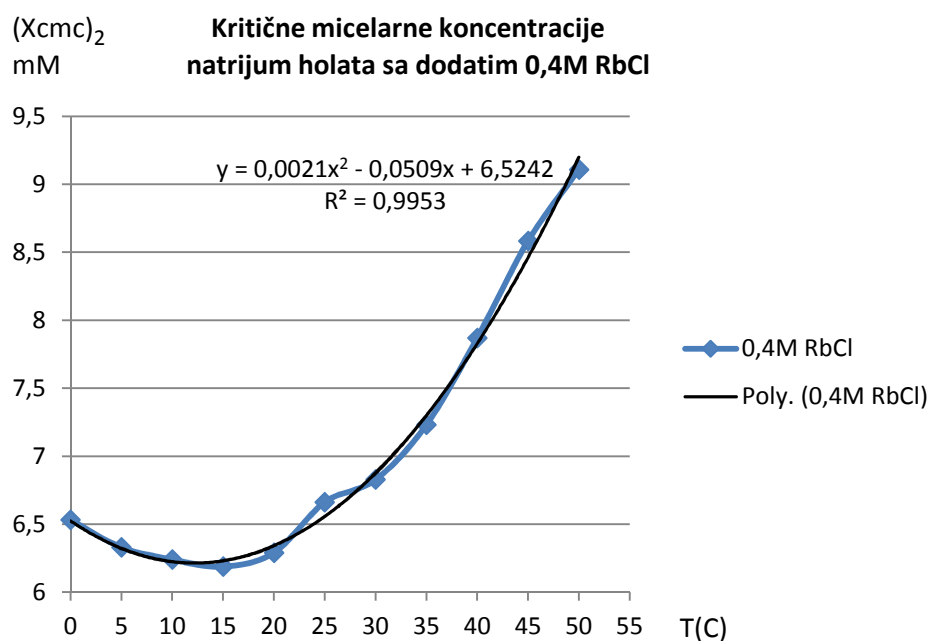
T(C)	$(X_{cmc})_2$ mM
0	6,36975
5	6,28545
10	6,2955
15	6,50535
20	6,83955
25	6,7014
30	7,67565
35	7,3062
40	7,6458
45	7,7343
50	8,613

Slika 8.2. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  natrijum holata sa dodatim 0,4M NaCl

T(C)	(Xcmc) <sub>2</sub> mM
0	6,65265
5	6,60885
10	6,63765
15	6,5058
20	6,73275
25	7,0464
30	7,13115
35	7,4247
40	8,02575
45	8,7861
50	9,2481

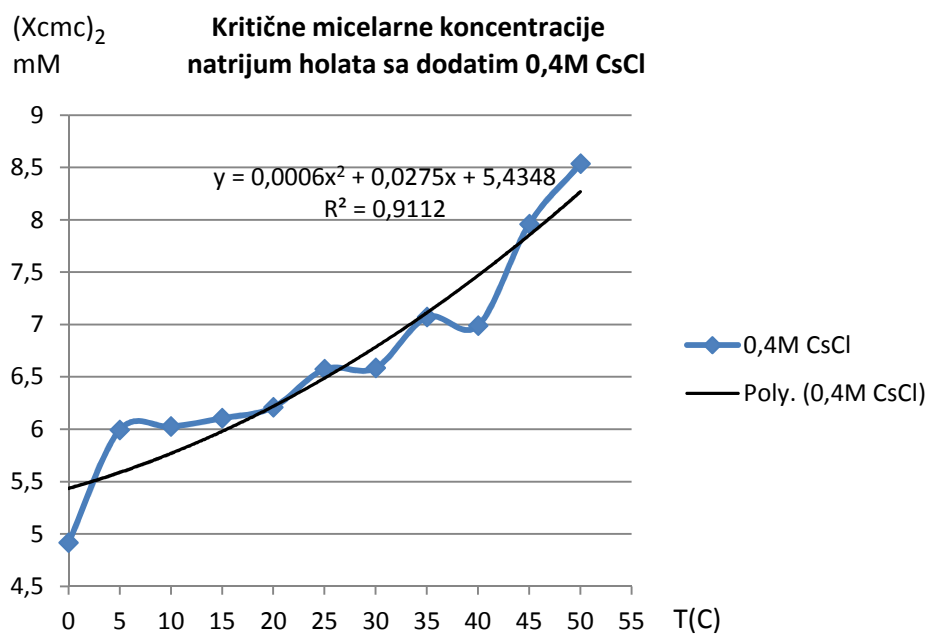
Slika 8.3. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>2</sub> natrijum holata sa dodatim 0,4M KCl

T(C)	(Xcmc) <sub>2</sub> mM
0	6,53148
5	6,33024
10	6,24
15	6,18686
20	6,29012
25	6,66098
30	6,82726
35	7,23146
40	7,8695
45	8,5833
50	9,1069

Slika 8.4. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>2</sub> natrijum holata sa dodatim 0,4M RbCl



T(C)	(Xcmc) <sub>2</sub> mM
0	4,91532
5	5,99266
10	6,02484
15	6,1044
20	6,20958
25	6,57306
30	6,58542
35	7,07108
40	6,98814
45	7,9592
50	8,5345



Slika 8.5. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>2</sub> natrijum holata sa dodatim 0,4M CsCl

Tabela 8.1. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  natrijum holata sa dodatim NaCl

T(C)	čist	0,05M NaCl	0,1M NaCl	0,2M NaCl	0,3M NaCl	0,4M NaCl
0	14,95285	12,3381	9,76665	7,70325	6,9114	6,36975
5	14,73098	12,1743	9,2931	7,6698	7,0304	6,28545
10	13,98738	11,5527	9,34425	7,62405	6,86115	6,2955
15	15,01522	11,89065	9,17385	7,73895	7,10235	6,50535
20	15,62583	12,47625	9,4215	7,79085	7,2162	6,83955
25	15,70338	12,7953	9,99555	8,07465	7,3977	6,7014
30	15,38768	13,0752	10,03425	8,5365	7,78245	7,67565
35	16,51144	13,5051	10,4901	9,021	7,82805	7,3062
40	16,36107	14,49855	11,3547	9,20295	8,5284	7,6458
45	16,81449	15,12495	12,04335	9,81345	9,08055	7,7343
50	16,99522	15,12315	13,45575	10,9521	9,66525	8,613

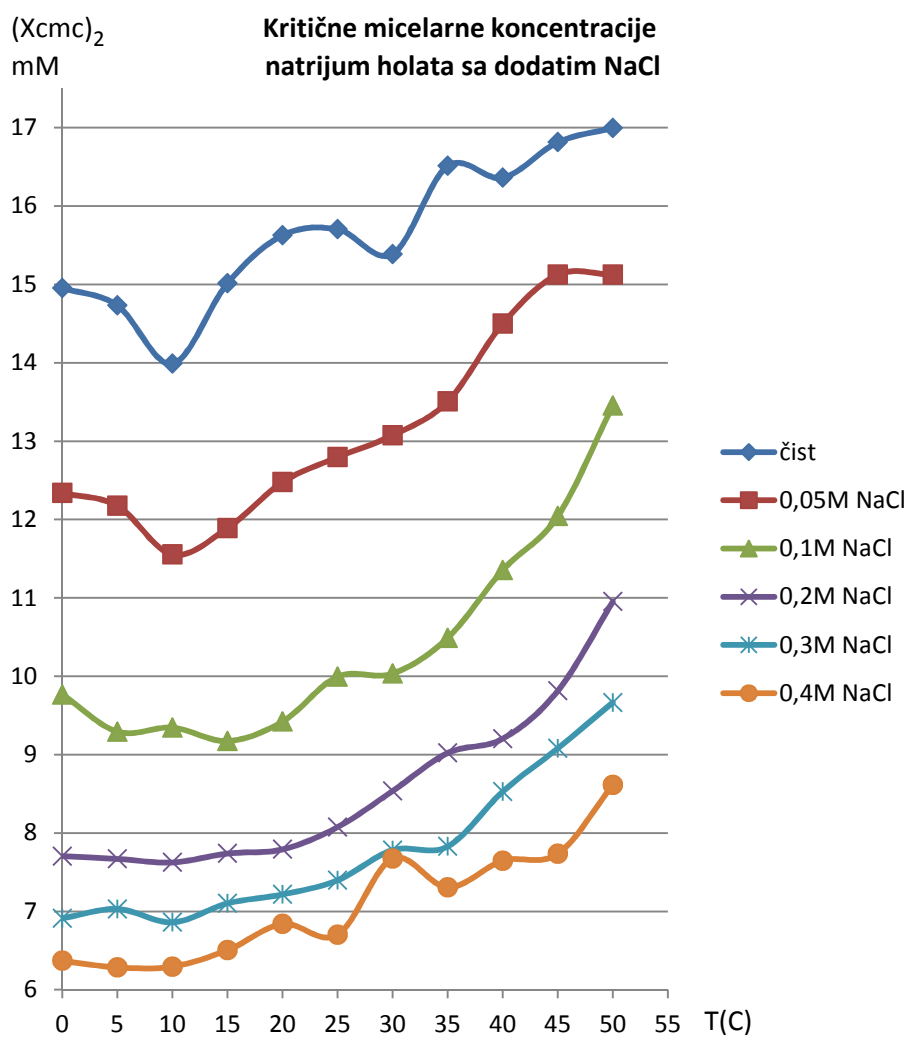
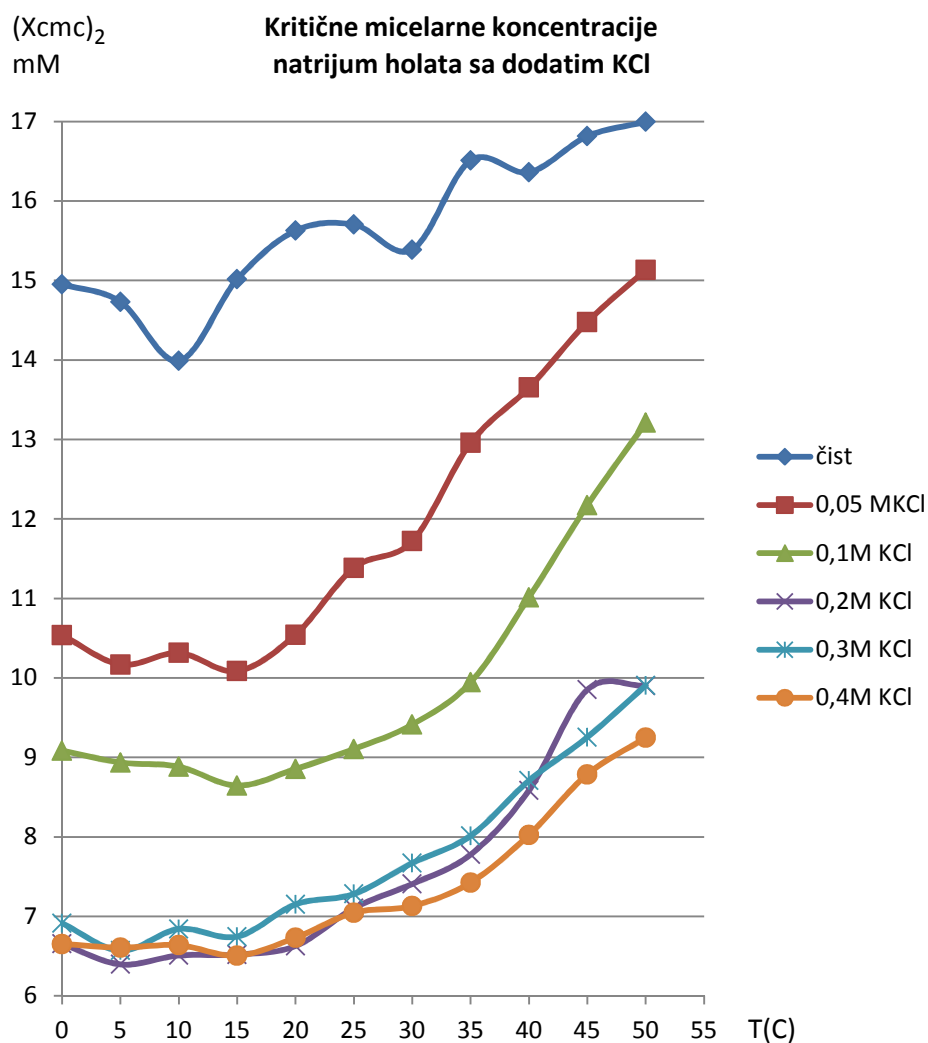
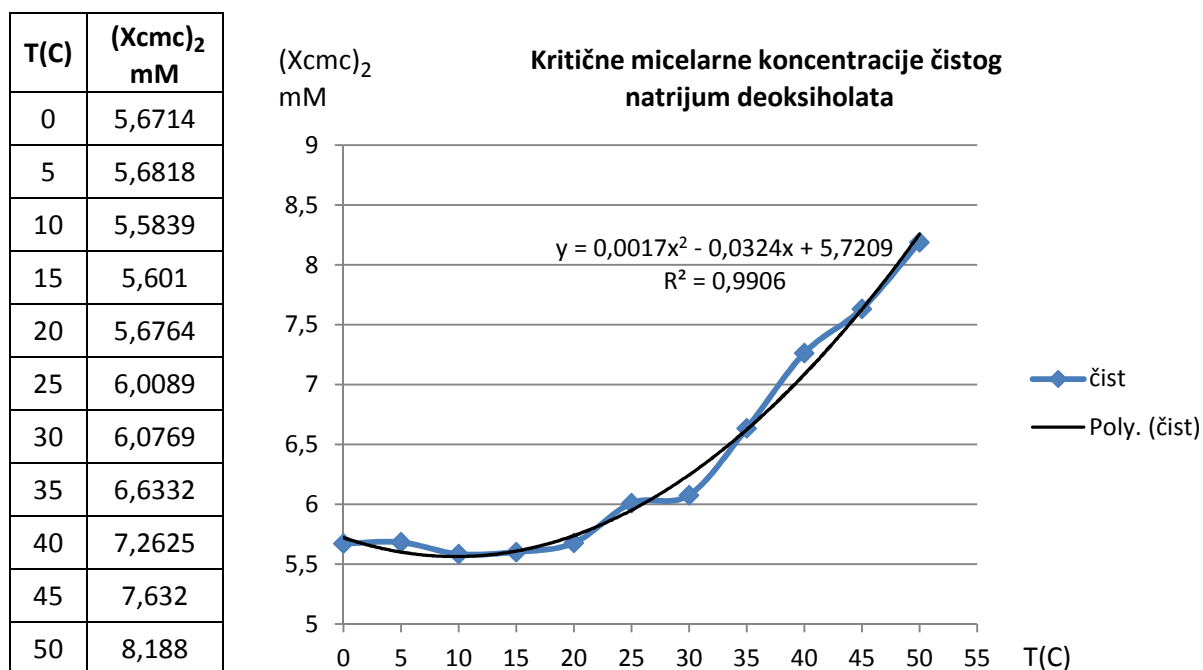
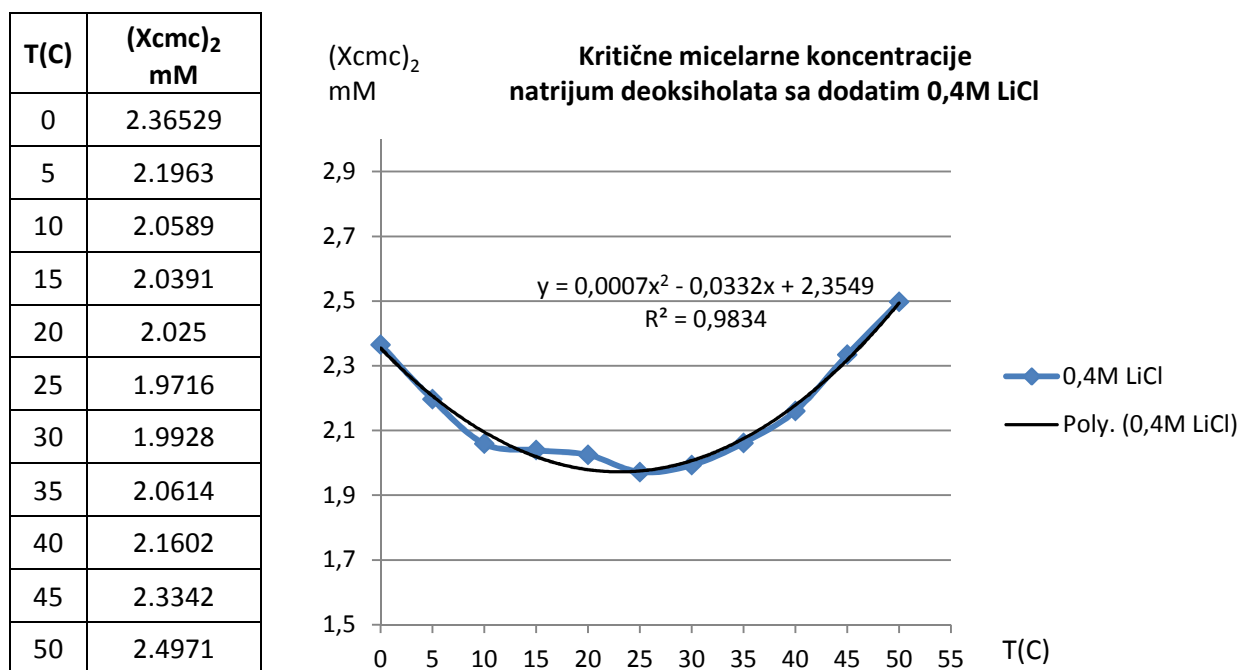
Slika 8.6. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  natrijum holata sa dodatim NaCl

Tabela 8.2. Kritične micelarne koncentracije ( $X_{cmc2}$ ) natrijum holata sa dodatim KCl

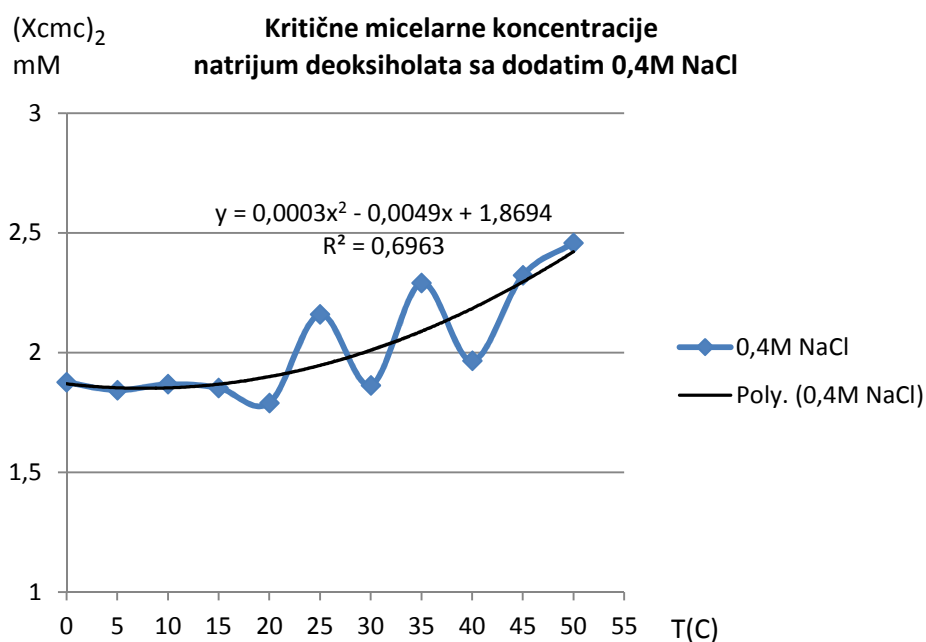
T(C)	čist	0,05M KCl	0,1M KCl	0,2M KCl	0,3M KCl	0,4M KCl
0	14,95285	10,5393	9,0855	6,65445	6,91425	6,65265
5	14,73098	10,16745	8,93685	6,3966	6,5691	6,60885
10	13,98738	10,3143	8,88345	6,5091	6,84255	6,63765
15	15,01522	10,0857	8,64525	6,5193	6,74565	6,5058
20	15,62583	10,54215	8,8542	6,62745	7,15095	6,73275
25	15,70338	11,38515	9,1059	7,104	7,28205	7,0464
30	15,38768	11,7219	9,41415	7,40745	7,67055	7,13115
35	16,51144	12,9561	9,94395	7,7775	8,0142	7,4247
40	16,36107	13,653	11,0133	8,5839	8,7087	8,02575
45	16,81449	14,47635	12,17145	9,8511	9,2538	8,7861
50	16,99522	15,13245	13,2114	9,90255	9,90495	9,2481

Slika 8.7. Kritične micelarne koncentracije ( $X_{cmc2}$ ) natrijum holata sa dodatim KCl

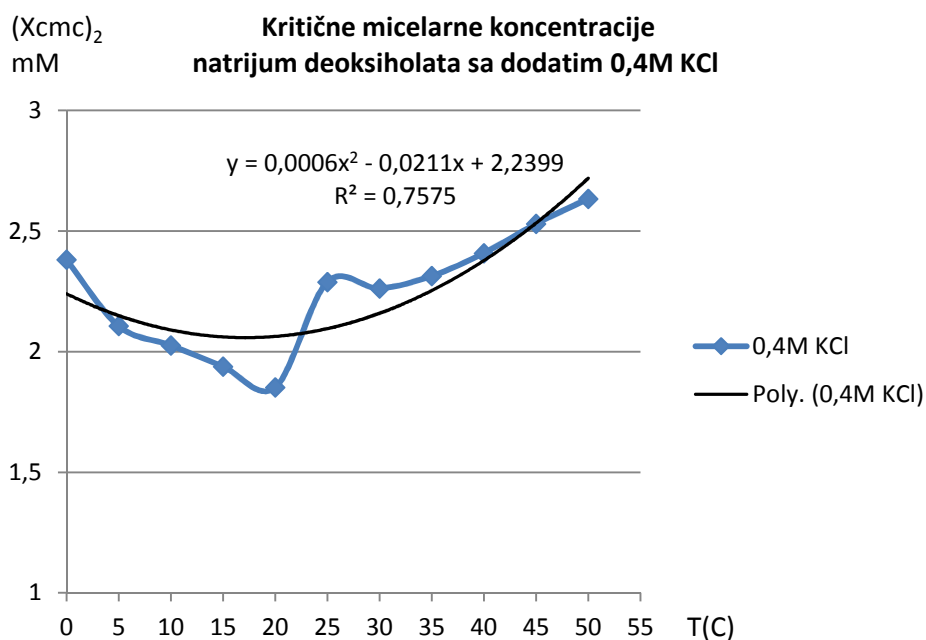
### Kritične micelarne koncentracije $(X_{cmc})_2$ natrijum deoksiholata

Slika 8.8. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  čistog natrijum deoksiholataSlika 8.9. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  natrijum deoksiholata sa dodatim 0,4M LiCl

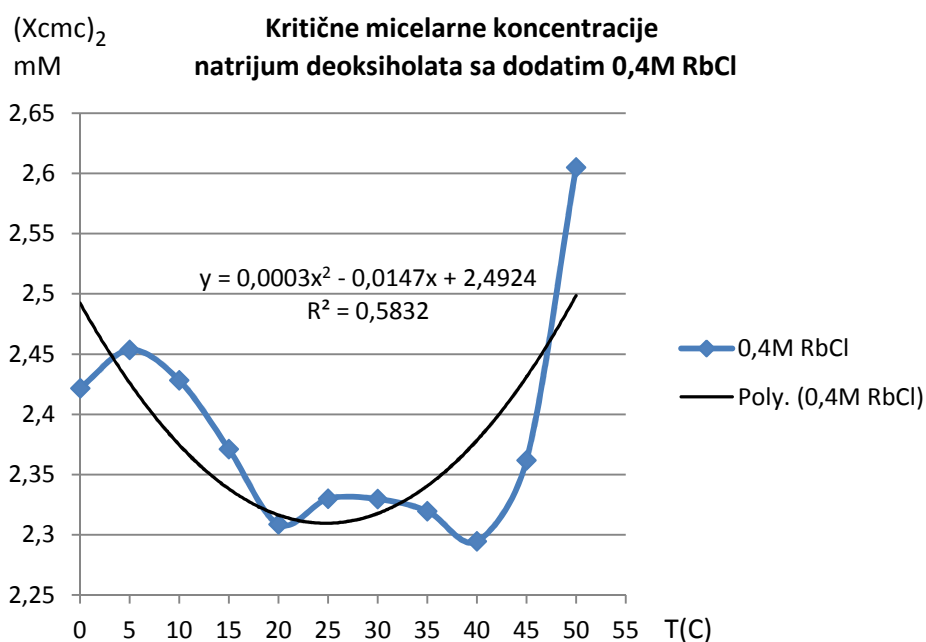
T(C)	(Xcmc) <sub>2</sub> mM
0	1.8756
5	1.8426
10	1.8676
15	1.8525
20	1.7898
25	2.1595
30	1.8633
35	2.2901
40	1.9652
45	2.3224
50	2.4575

Slika 8.10. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>2</sub> natrijum deoksiholata sa dodatim 0,4M NaCl

T(C)	(Xcmc) <sub>2</sub> mM
0	2,3807
5	2,1063
10	2,0259
15	1,9385
20	1,8518
25	2,2888
30	2,2623
35	2,314
40	2,4085
45	2,5299
50	2,6338

Slika 8.11. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>2</sub> natrijum deoksiholata sa dodatim 0,4M KCl

T(C)	(Xcmc) <sub>2</sub> mM
0	2,4216
5	2,4535
10	2,4282
15	2,3712
20	2,3088
25	2,3299
30	2,3296
35	2,3197
40	2,2945
45	2,3619
50	2,605

Slika 8.12. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>2</sub> natrijum deoksiholata sa dodatim 0,4M RbCl

T(C)	(Xcmc) <sub>2</sub> mM
0	2,3769
5	2,2097
10	2,1393
15	2,0454
20	2,0403
25	2,05
30	2,0898
35	2,1496
40	2,1693
45	2,2639
50	2,3925

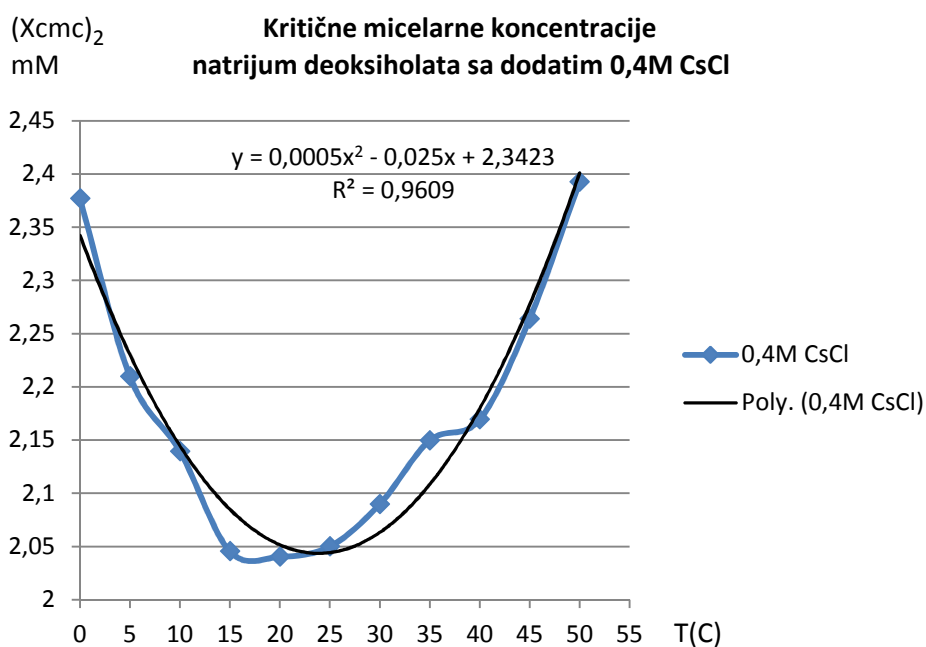
Slika 8.13. Kritične micelarne koncentracije (Xcmc)<sub>2</sub> natrijum deoksiholata sa dodatim 0,4M CsCl

Tabela 8.3. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  natrijum deoksiholata sa dodatim NaCl

T(C)	čist	0,05M NaCl	0,1M NaCl	0,2M NaCl	0,3M NaCl	0,4M NaCl
0	5,6714	3,46	2,9953	2,3959	1,7992	1,8756
5	5,6818	3,3402	2,9062	2,405	1,7878	1,8426
10	5,5839	3,3405	2,771	2,3512	1,8736	1,8676
15	5,601	3,289	2,8316	2,3817	1,8733	1,8525
20	5,6764	3,3607	2,8702	2,4179	1,8276	1,7898
25	6,0089	3,3072	3,1362	2,5575	2,0101	2,1595
30	6,0769	3,5218	3,1328	2,4489	1,8846	1,8633
35	6,6332	3,5793	3,3113	2,5758	2,0507	2,2901
40	7,2625	3,8088	3,3131	2,8328	2,1741	1,9652
45	7,632	4,2373	3,6652	3,158	2,3911	2,3224
50	8,188	4,517	3,8136	3,1683	2,5809	2,4575

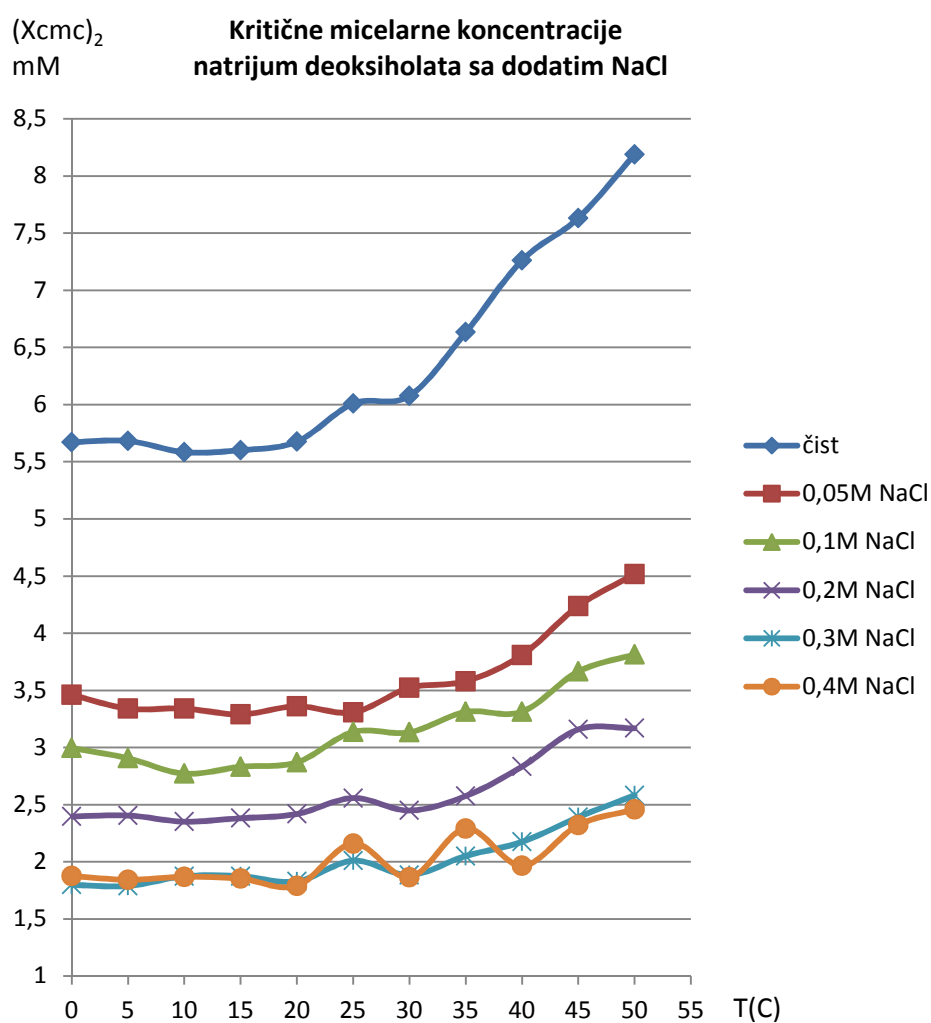
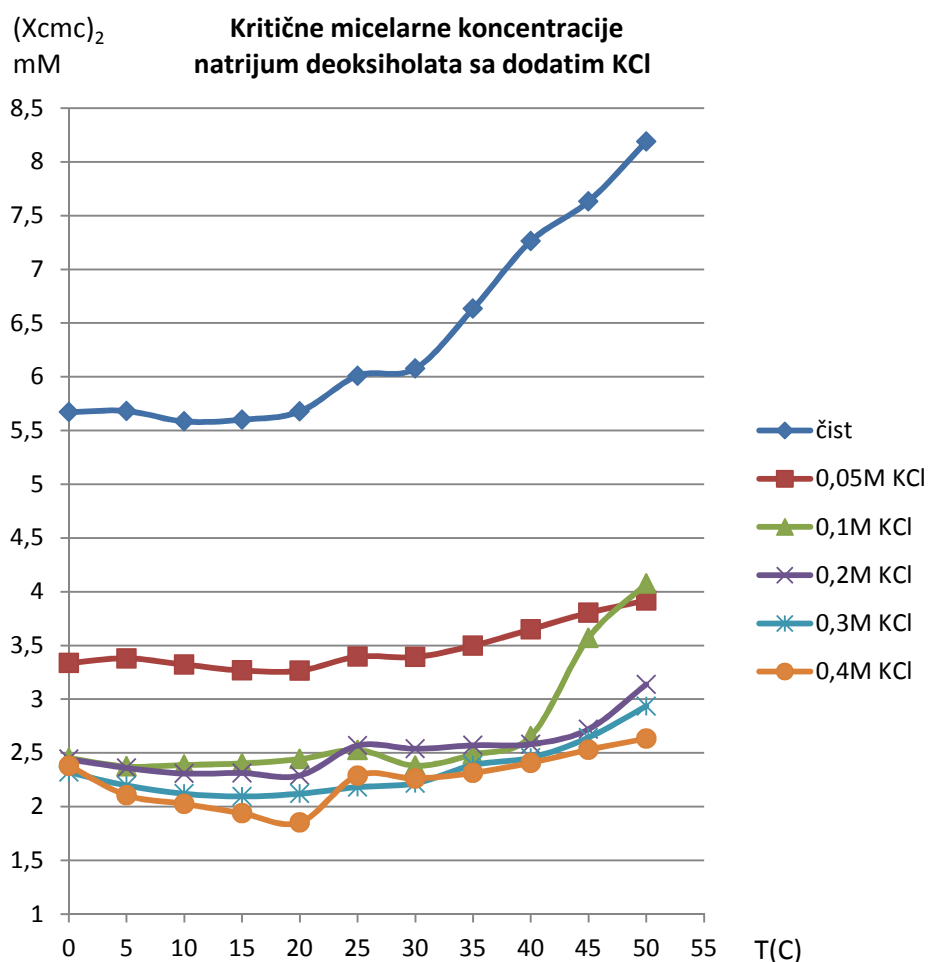
Slika 8.14. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  natrijum deoksiholata sa dodatim NaCl

Tabela 8.4. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  natrijum deoksiholata sa dodatim KCl

T(C)	čist	0,05M KCl	0,1M KCl	0,2M KCl	0,3M KCl	0,4M KCl
0	5.6714	3.3357	2.4506	2.4424	2.3208	2.3807
5	5.6818	3.3796	2.3737	2.3593	2.1968	2.1063
10	5.5839	3.3221	2.3884	2.3081	2.12	2.0259
15	5.601	3.2667	2.4025	2.3125	2.0949	1.9385
20	5.6764	3.2657	2.4421	2.2895	2.12	1.8518
25	6.0089	3.3959	2.526	2.5676	2.1818	2.2888
30	6.0769	3.3923	2.381	2.5384	2.2178	2.2623
35	6.6332	3.4983	2.4843	2.57	2.3873	2.314
40	7.2625	3.6503	2.6553	2.5812	2.4555	2.4085
45	7.632	3.8035	3.5701	2.7202	2.6434	2.5299
50	8.188	3.9186	4.0739	3.1371	2.9357	2.6338

Slika 8.15. Kritične micelarne koncentracije  $(X_{cmc})_2$  natrijum deoksiholata sa dodatim KCl



## **Biografija**

### **Kosta Popović**

Kosta Popović je rođen 29. jula 1988. godine u Novom Sadu. Završio je osnovnu školu „Đura Daničić“ u Novom Sadu kao nosilac Vukove diplome 2003. godine. Iste godine se upisao na prirodno-matematički smer u Gimnaziju „Jovan Jovanović Zmaj“. Po završetku gimnazije, koju je završio kao nosilac Vukove diplome, 2007. godine upisao se na Medicinski fakultet u Novom Sadu, smer farmacija, gde je svake godine studija bio nagrađen student, ostvarivši prosek ocena preko 9,50. Položio je sve ispite predviđene planom i programom integrisanih studija farmacije na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu sa prosekom ocena 9,85. Diplomirao je 20. aprila 2012. godine sa ocenom 10. Autor je diplomskog rada: „Uticaj hidrofobnog domena micelarnih agregata žučnih kiselina na njihov solubilizacioni kapacitet“, pod mentorstvom prof. dr Mihalja Poše. Medicinski fakultet završio je za 4 godine i 7 meseci (od 01.10.2007. do 20.04.2012. godine). Predmet Fizička hemija položio je sa ocenom 10.

Autor je ili koautor 26 naučnih radova (od kojih dva rada kategorije M21 i četiri rada kategorije M23).

Upisao je doktorske studije kliničke medicine na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu 24.10.2012. godine. Položio je sve ispite na doktorskim akademskim studijama kliničke medicine na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu i ima prijavljenu i odobrenu doktorsku tezu.

Kosta Popović je od 10.07.2013. godine zaposlen kao saradnik u nastavi za užu naučnu oblast Farmacija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, a 2014. godine je izabran za asistenta. Ima pedagoško iskustvo u radu sa studentima, pri čemu je pokazao smisao za nastavno-naučni rad. Angažovan je u izvođenju praktične nastave i održavanju konsultacija na predmetima Fizička hemija, Farmakokinetika, Medicinska biohemija i hemija. Vlada engleskim i nemačkim jezikom i veštinama rada na računaru.