

UNIVERZITET U BEOGRADU

VEĆE ZA STUDIJE PRI UNIVERZITETU

Dragosav R. Mutavdžić

PRIMENA MULTIVARIJACIONE ANALIZE U
SPEKTROSKOPSKIM PODACIMA

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

COUNCIL FOR MULTIDISCIPLINARY GRADUATE STUDIES

Dragosav R. Mutavdžić

APPLICATION OF MULTIVARIATE ANALYSIS
ON SPECTROSCOPIC DATA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

KOMISIJA:

Prof. dr Dušanka Milojković Opsenica, redovni profesor, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu
Mentor

Dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu
Mentor

Dr Slađana Spasić, viši naučni saradnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Dr Aleksandra Mitrović, viši naučni saradnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Dr Jelena Bogdanović Pristov, viši naučni saradnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:
Beograd, _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Odseku za žive sisteme Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu.

Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 173017.

Izradom doktorske disertacije rukovodili su dr Dušanka Milojković Opsenica, redovni profesor Hemijskog fakulteta u Beogradu i dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, kojima dugujem zahvalnost na pomoći u svim etapama izrade ove disertacije.

Hvala i svim kolegama sa Odseka za žive sisteme, Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu koji su na bilo koji način pomogli u izradi ove disertacije.

Zahvalnost dugujem i prijateljima koji su me razumeli, bodrili i na sve načine pomagali da istrajem u ostvarenju svog cilja. Beskrajno sam zahvalan i svojoj porodici: supruzi Tatjani, Irini i Stefanu.

Dragosav Mutavdžić

Primena multivarijacione analize u spektroskopskim podacima

REZIME

U ovoj tezi su primenjene hemometrijske metode u dekompoziciji fluorescentnih i FTIR spektara, dobijenih snimanjem uzoraka nanočestica, proteina i bioloških uzoraka. U cilju dekompozicije spektralnih podataka korišćene su: multivarijaciona rezolucija krivih, analiza glavnih komponenti i paralelna faktorska analiza. Ove analize su rađene u cilju: (i) karakterisanja nanočestica (kvantnih i karbonskih tačaka) koje imaju različite vrste primena, (ii) proučavanja strukturnih promena ćelijskog zida koje nastaju usled mutacija u biosintezi njegovih konstitutivnih polimera u *cad-c cad-d* mutantu u odnosu na divlji tip *Arabidopsis thaliana*, (iii) praćenja strukturnih prelaza kod proteina goveđi serum albumin (BSA) usled interakcije sa ATP-om.

Multivarijaciona rezolucija krivih je pokazala da se struktura nanosenzora ZnS:Mn^{2+} ne menja funkcionalizacijom sa dendrimerom PAMAM-OH. Ovo ukazuje da se ovaj nanosenzor može koristiti za detekciju i kvantifikaciju Cd^{2+} . Ista hemometrijska metoda je pokazala da je kompleks CDs-MSA stabilan nakon dodavanja Ag^+ jona, što ukazuje na veliku selektivnost ovog senzora u detekciji Ag^+ jona.

U proučavanju fluorescentnih CdSe kvantnih tačaka dopiranih sa poroznim fosfatnim heterostrukturama (PPH-NH₂@CdSe), multivarijaciona rezolucija krivih je pokazala da se emisione trake CdSe ne menjaju pod uticajem čvrstog nosača (da su fotostabilne) i da mogu biti korišćene kao agens za označavanje otisaka prstiju. Ova fotostabilnost PPH-NH₂@CdSe se pokazala kao osobina koja poboljšava kvalitet slike latentnih otisaka prstiju na neporoznim površinama, u odnosu na uobičajene forenzičke tehnike.

Razvijena faktorska analiza i Multivarijaciona rezolucija krivih su korišćene za određivanje prečnika hidrofobnih (CdSe) i hidrofilnih (CdSe:ZnS) kvantnih. Određivanje prečnika je bazirano na njegovoj povezanosti sa pozicijom maksimuma emisije spektralnih profila ekstrahovanih komponenti pomoću MCR. Rezultati su pokazali da je fluorescentna spektroskopija, u kombinaciji sa pomenutim hemometrijskim tehnikama, jednostavna i pouzdana metoda u oceni prečnika frakcija kvantnih tačaka i proveriti (ne)homogenosti njihovih rastvora.

U proučavanju razlika u strukturi ćelijskog zida divljeg tipa i *cad-c cad-d* mutanta *Arabidopsis thaliana*, na osnovu FTIR spektara, T test je pokazao da se divlji tip i mutant razlikuju u količini lignina, hemiceluloza i celuloze, kao i aldehida i konjugovanih aldehida. Lignin i celuloza se nalaze u promenjenom okruženju u mutantu u odnosu na divlji tip. Ove promene su različito izražene u fiberu i ksilemu. Rezultati analize glavnih komponenti su pokazali da u fiberu divljeg tipa je zastupljeniji lignin nego kod ostalih uzoraka, dok je u fiberu mutanta izraženo prisustvo estara polisaharida. U ksilemu divljeg tipa je izražen kondenzovani lignin i aldehydne strukture.

Kao primena hemometrije u proučavanju konformacionih promena protein, upotrebljena je PARAFAC analiza fluorescentnih spektara BSA, u odsustvu i prisustvu ATP. Ova metoda je pokazala prisustvo dve spektralne komponente koje odgovaraju triptofanima u različitom okruženju, jedan na površini proteina a drugi unutar proteinske globule blizu površine. U rastvoru čistog BSA dvodnevnom stajanjem dolazi do konformacione promene, u kojoj unutrašnji triptofan menja okruženje, a protein postaje umotaniji. U interakciji sa ATP-om dešava se konformacioni prelaz dva sata nakon mešanja, u kome unutrašnji triptofan menja okruženje i protein takođe prelazi u umotaniju konformaciju.

Ključne reči: Hemometrija, multivarijaciona rezolucija krivih, paralelna faktorska analiza, nanočestice, *Arabidopsis thaliana*, ćelijski zid, goveđi serum albumin, konformacione promene, fluorescentna spektroskopija, FTIR spektroskopija.

Naučna oblast: IMT

Uža naučna oblast: hemometrija

Application of multivariate analysis on spectroscopic data

ABSTRACT

In this thesis chemometric methods in decomposition of fluorescent and FTIR spectra were applied. The spectra were obtained by recording samples of nanoparticles, proteins and biological samples. Decomposition of spectral data was performed by using: multivariate curve resolution, principal components analysis and parallel factor analysis. These analyses were carried out in order to: (i) characterize nanoparticles (quantum and carbon dots) that have a variety of applications, (ii) study the structural changes in the cell wall due to mutations in the biosynthesis of its constituent polymers in *cad-c cad-d* mutant of *Arabidopsis thaliana* and compare with the wild-type, (iii) monitor the structural transition in the case of the protein bovine serum albumin (BSA) as a result of interaction with ATP.

Multivariate curve resolution showed that the structure of nanosensors ZnS:Mn_2^+ does not change by functionalization with PAMAM-OH dendrimer. This indicates that this nanosensor can be used for detection and quantitation of Cd_2^+ . The same chemometric methods showed that the complex MSA-CDs is stable after addition of Ag^+ ions, which indicates a high selectivity of the sensor in detection of Ag^+ ions.

In the study of fluorescent CdSe quantum dots doped with phosphate porous heterostructures (PPH-NH₂@CdSe), multivariate curve resolution showed that the CdSe emission band does not change under the influence of the solid support (that are photostable) and can be used as an agent for labeling finger prints. This photostability of PPH-NH₂@CdSe proved to be a feature that improves image quality of latent fingerprints on non-porous surfaces, compared to the usual forensic techniques.

Evolving factor analysis and multivariate curve resolution were used to determine the diameter of hydrophobic (CdSe) and hydrophilic (CdSe:ZnS) quantum dots. Determination of the diameter is based on its correlation with position of maximum emission of spectral profiles of components extracted by MCR. The results showed that the fluorescence spectroscopy, in

combination with the above chemometric techniques, is simple and reliable method to estimate the diameter of the fractions of quantum dots and check (non)homogeneity of their solution.

In the study of the structural differences in the cell wall of wild-type and *cad-c cad-d* mutant of *Arabidopsis thaliana*, on the basis of the FTIR spectra, T test showed that the wild-type and mutant differ in the amount of lignin, hemicellulose and cellulose, as well as in aldehyde and conjugated aldehyde content. Lignin and cellulose are in the changed area in the mutant compared to the wild type. These changes were differentially expressed in fiber and xylem. The results of principal component analysis showed that lignin in the fiber of the wild type is more frequent than in the other samples, while in the mutant's fiber the presence of esters of polysaccharides is more expressed. In the xylem of wild type, condensed lignin and aldehyde structures were frequent.

As an application of Chemometrics in the study of protein conformational changes, PARAFAC analysis on fluorescent spectra of BSA in the absence and presence of ATP was applied. This method showed the presence of two spectral components corresponding to different environments of tryptophan, one at protein surface and the other within the protein globule near the surface. In a solution of pure BSA in phosphate buffer pH 7, after two days of incubation a conformational change was recorded in which tryptophan changed its internal environment and the protein became more folded. In BSA interaction with ATP, conformational transition occurs two hours after mixing, in which tryptophan changed its internal environment and the protein acquired more folded conformation.

Keywords: Chemometrics, multivariate curve resolution, parallel factor analysis, nanoparticles, carbon dots, *Arabidopsis thaliana*, cell wall, bovine serum albumin, conformational change, fluorescence spectroscopy, FTIR spectroscopy.

Scientific field: IMT

Specific scientific field: Chemometrics

Lista skraćenica

a skalar

\mathbf{a} vektor

\mathbf{A} matrica

$\underline{\mathbf{A}}$ tenzor

\mathbf{A}^T transponovana matrica

\mathbf{A}^{-1} inverzna matrica

\mathbf{A}^+ pseudo-inverzna matrica

\mathbf{E} matrica reziduala

F broj komponenti

\otimes Kronekerov proizvod

\odot Katri-Rao proizvod

PCA analiza glavnih komponenti

NIPALS nelinearni iterativni algoritam parcijalnih najmanjih kvadrata

MCR multivarijaciona rezolucija krivih

PARAFAC paralelna faktorska analiza

AAS atomska apsorpciona spektroskopija

TEM transmisiona elektronska mikroskopija

AFM mikroskopija sa atomskom rezolucijom (atomic force microscopy)

EFA razvijena faktorska analiza

FSMW-EFA razvijena faktorska analiza pokretnih prozora fiksne veličine

FTIR infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

NIR bliska infracrvena spektroskopija

EEM ekscitaciono-emisiona matrica

PAMAM poli(amidoamin)

DAB diamino butan

PPH porozne fosfatne heterostukture

CAD cinamil alkohol dehidrogenaza

PAMAM Poliamidoamin

SADRŽAJ

| | | |
|------------|---|----|
| 1. | UVOD..... | 1 |
| 1.1. | Uvod u hemometrijske metode | 1 |
| 1.1.1. | Analiza glavnih komponenti..... | 4 |
| 1.1.2. | NIPALS algoritam..... | 9 |
| 1.2. | Multivarijaciona rezolucija krivih | 11 |
| 1.2.1. | <i>Razvijena faktorska analiza</i> | 15 |
| 1.2.2. | Analiza proširenih matrica | 17 |
| 1.2.3. | Ograničenja u MCR | 18 |
| 1.3. | Multidimenzioni modeli | 20 |
| 1.3.1. | Paralelna faktorska analiza | 20 |
| 1.3.1.1. | Jedinstvenost rešenja PARAFAC modela..... | 24 |
| 1.3.1.2. | Ocenjivanje opterećenja u PARAFAC modelu | 26 |
| 1.3.2. | PARAFAC2 model | 27 |
| 1.3.3. | Tucker modeli..... | 29 |
| 1.4. | Spektroskopija | 31 |
| 1.4.1. | Fluorescentna spektroskopija | 32 |
| 1.4.1.1. | Fluorescencija proteina | 37 |
| 1.4.1.1.1. | Spektralne klase triptofanskih ostataka | 41 |
| 1.4.2. | FTIR spektroskopija | 42 |
| 2. | CILJ RADA | 45 |
| 3. | MATERIJAL I METODE | 46 |
| 3.1. | Sinteza, prečišćavanje i funkcionalizacija ZnS kvantnih tačaka | 46 |
| 3.2. | Sinteza, prečišćavanje i funkcionalizacija karbonskih tačaka | 47 |
| 3.3. | Sinteza PPH-NH₂@CdSe | 47 |
| 3.4. | Sinteza CdSe kvantnih tačaka | 48 |
| 3.5. | Biljni materijal i uslovi rasta <i>Arabidopsis</i> linija | 49 |
| 3.6. | Eksperimentalni uslovi za interakciju BSA i ATP | 50 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4. | REZULTATI I DISKUSIJA | 51 |
| 4.1. | Primeri korišćenja multivarijacione analize u obradi fluorescentnih spektara različitih tipova nanočestica u cilju njihove karakterizacije..... | 51 |
| 4.1.1. | Nanočestice kao senzori za detekciju i kvantifikaciju kadmijuma | 51 |
| 4.1.1.1. | Komponentna analiza ZnS:Mn@PAMAM-OH _{G=3} | 53 |
| 4.1.1.2. | Primena ZnS:Mn@PAMAM-OH _{G=3} senzora u kvantifikaciji kadmijuma u pijaćoj vodi..... | 55 |
| 4.1.2. | Nanočestice kao senzori za detekciju i kvantifikaciju srebra | 56 |
| 4.1.2.1. | Analiza fluorescentnih spektara | 58 |
| 4.1.2.2. | Detekcija Ag ⁺ | 60 |
| 4.1.2.3. | Određivanje koncentracije Ag ⁺ u srebrnim nanočesticama..... | 61 |
| 4.1.3. | Nanočestice kao senzori za detekciju otisaka prsta..... | 61 |
| 4.1.4. | Korišćenje multivarijacione analize za određivanje broja frakcija i njihovog prečnika, u smeši nanočestica različite veličine, metodom fluorescentne spektroskopije..... | 64 |
| 4.1.5. | Primena multivarijacione faktorske analize u ispitivanju razlika u nanoarhitekturi ćelijskog zida divljeg tipa i cad c i cad d mutanata <i>Arabidopsis thaliane</i> | 75 |
| 4.1.6. | Proučavanje interakcije BSA i ATP | 86 |
| 4.1.6.1. | Interakcija BSA i ATP odmah posle mešanja..... | 87 |
| 4.1.6.2. | Interakcija BSA i ATP dva sata posle mešanja..... | 88 |
| 4.1.6.3. | Analiza spektara čistog BSA..... | 89 |
| 5. | ZAKLJUČCI | 92 |
| 6. | LITERATURA | 94 |

1. UVOD

1.1. Uvod u hemometrijske metode

Ova doktorska disertacija je napisana sa ciljem da pokaže mogućnosti primene matematičko-statističkih tehnika u spektroskopiji, koje se jednim imenom nazivaju multivarijaciona analiza. Skup ovih tehnika se može nazvati i hemometrija. Svante Wold je 1971 godine definisao hemometriju kao „umetnost ekstrahovanja hemijski relevantnih informacija iz podataka dobijenih hemijskim eksperimentom”. Hemometrija je ime dobila po analogiji sa biometrijom, ekonometrijom, psihometrijom i ostalim „metrikama”. Metode multivarijacione analize se mogu primeniti u raznim disciplinama, počev od analitičke hemije, analize poslovnih procesa, senzorne analize, logistike, psihologije, biologije, itd. Primena multivarijacione analize u biologiji može biti zakomplikovana biološkim i ekološkim varijacijama. Velika prednost multivarijacionih metoda, je da one mogu biti često primenjene u situacijama u kojima su alati klasične statističke analize nemoćni. Na primer, spektroskopski podaci su često visoko korelisani, jer se dobijaju na istom uzorku u nekoliko vremenskih intervala ili u sličnim okolnostima. Na taj način se dobijaju višedimenzioni podaci na kojima se moraju primeniti metode multivarijacione analize, za razliku od klasične statističke analize, koja se uglavnom primenjuje na jednoj varijabli (univarijaciona analiza).







Ova teza će se osim multivarijacionim tehnikama, baviti i bazičnim teorijama pojedinih spektroskopskih tehnika (fluorescentna i FTIR spektroskopija) i njihovom primenom u proučavanju kvantnih tačaka i bioloških uzoraka.

Podaci koji se dobijaju spektroskopskim merenjima, najčešće se čuvaju u matricnoj formi ili u formi tenzora. Na pr., snimanje serije emisionih spektara jednog uzorka, na više pobudnih talasnih dužina, daće kao rezultat dvodimenzionu matricu. Ukoliko se snimanje ponovi na više uzoraka, dobija se više dvodimenzionih matrica koje izgrađuju tenzor. Tenzori igraju veoma važnu ulogu u reprezentovanju i analiziranju multidimenzionalnih podataka u mnogim naučnim

disciplinama kao što su: hemometrija, psihometrija, industrija hrane, ekologija, analiza signala i slika, neuronauke, informacione tehnologije, pretraživanja podataka (data mining) i dr.

S obzirom da eksperimentalni rad rezultuje različitim vrstama podataka, neophodno je opisati načine njihovog aranžiranja. Signal registrovan sa detektora koji meri samo jednu vrednost po uzorku (na pr. pH), daje skalar (podatak nultog-reda). Vektor se dobija registrovanjem signala iz više uzoraka (jednosmerni podaci) ili na pr., snimanjem signala na više talasnih dužina jednog uzorka (podaci prvog reda). Ukoliko se analiza sprovedi na više od jednog uzorka, podaci mogu biti aranžirani u dvodimenzinoj matrici (dvosmerni podaci), gde kolone odgovaraju uzorcima, a redovi na pr, apsorbcijama na pojedinim talasnim brojevima u FTIR spektroskopiji. Podaci mogu biti aranžirani u matričnoj formi (podaci drugog reda) i u slučaju jednog uzorka, kada se za svaku pobudnu talasnu dužinu registruje jedan emisioni spektar (na pr. u fluorescentnoj spektroskopiji). U slučaju kada postoji više uzoraka i kada se za svaki uzorak registruje po jedna matrica, tada su tenzori višeg reda najpodesniji za aranžiranje podataka.

Grafička ilustracija različitih dimenzionalnosti podataka i načini njihovog aranžiranja su prikazani na Slici 1. S obzirom, da postoji više matematičkih objekata pomoću kojih se mogu aranžirati eksperimentalno dobijeni podaci, neophodno je uvesti način njihove nomenklature koji je predložio Kiers 2000. godine. Italik malo slovo se koristi za označavanje skalara, boldovano malo slovo za vektore, boldovano veliko slovo za matrice, dok je veliko boldovano podvučeno slovo oznaka za tenzore.

| | Jedan uzorak | Više uzoraka |
|--------------------------|--|---|
| Jedna vrednost po uzorku | podatak nultog reda skalar  | jednosmerni vektor  |
| Jedan vektor po uzorku | podatak prvog reda vektor  | dvosmerni matrica  |
| Jedna matrica po uzorku | podatak drugog reda matrica  | trosmerni tenzor 3. reda  |

Slika 1. Ilustracija načina aranžiranja podataka različite dimenzionalnosti

Multivarijaciona analiza se odnosi na sve one statističke tehnike koje se bave analizom podataka koji sadrže više od jedne promenljive.

Najpopularniji modeli za analizu višedimenzionih struktura podataka su Tuckerovi (Tucker) i CANDECOM-PARAFAC modeli, koji su najpre razvijeni i primenjeni u domenu numeričke psihologije. CANDECOM-PARAFAC model je predložen 1970. godine nezavisno od dve grupe istraživača.

Tehnike rezolucije krivih predstavljaju alternativu algoritimima za dekonvoluciju. Ove tehnike mogu da obrade čitav set uzoraka istovremeno i zajedno sa PARAFAC2 modelima, su se pokazale vrlo korisnim alatima u analizi hromatografskih podataka^{1,2}. Za razliku od multivarijacione rezolucije krivih i PARAFAC modela, koji broj faktora procenjuju numeričkim metodama, PARAFAC2 model zahteva iskustvo istraživača i teorijsko poznavanje spektroskopske tehnike, u evaluaciji broja faktora. Ovo ograničenje objašnjava zašto se PARAFAC2 još uvek ne koristi rutinski u analiziranju spektralnih podataka.

FTIR spektri bioloških sistema su vrlo kompleksni jer sadrže preklapljene apsorpcione trake glavnih biomolekula i da bi se izvukle značajne informacije sadržane u spektrima, neophodno je primeniti odgovarajuće tehnike multivarijacione analize koje mogu da obrade višedimenzionalne podatke. Za razliku od FTIR spektara, fluorescentni spektri ne izgledaju kompleksno, ali i njih karakteriše preklapanje emisionih profila emitujućih komponenti (fluorofora). Što su ova preklapanja veća, to je teže razdvojiti signale pojedinih komponenti. Primena multivarijacionih tehnika dolazi do izražaja i kod vremenski zavisnih bioloških procesa, kao što su diferencijacija ili sazrevanje ćelija^{3,4}.

1.1.1. Analiza glavnih komponenti

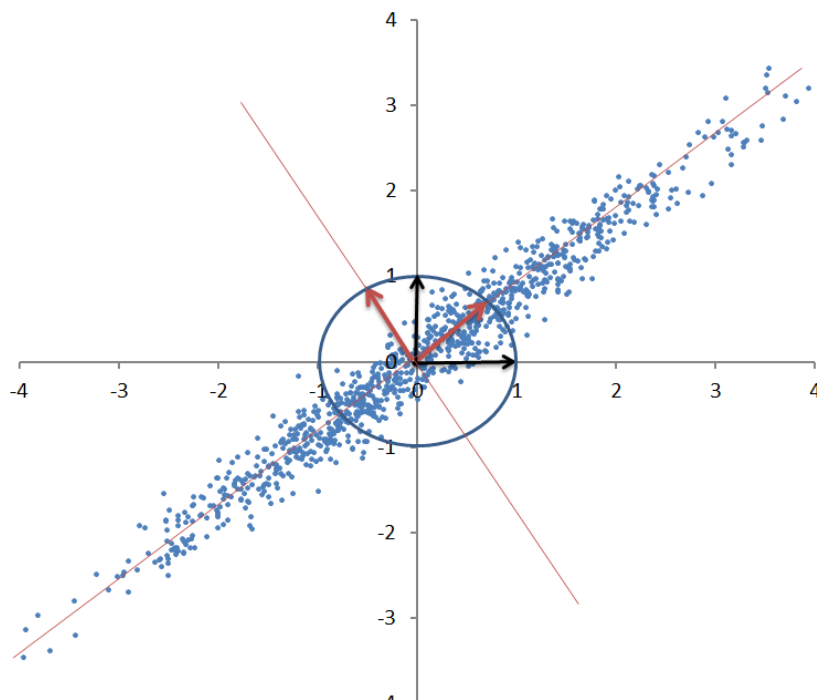
Analiza glavnih komponenti je jedna od najfundamentalnijih i najprimenljivijih multivarijacionih tehnika. Ona je verovatno i najstarija multivarijaciona tehnika i njeno poreklo se može zabeležiti u radovima Pirsona⁵ ili čak Košija⁶. PCA analizira matricu podataka koja reprezentuje skup međusobno zavisnih varijabli, registrovanih na posmatranim objektima. Cilj ove analize je da ekstrahuje i vizualizuje važne informacije iz matrice podataka i da ove informacije izrazi kao set novih, međusobno ortogonalnih (nekorelisanih) varijabli, koje se nazivaju glavne komponente. Ova tehnika može takođe reprezentovati povezanost objekata i varijabli, ukoliko se objekti i varijable mapiraju na istom dijagramu⁷. Analiza glavnih komponenti se takođe koristi i za redukciju dimenzionalnosti vektorskog prostora, jer se obično u daljoj analizi zadržava samo nekoliko prvih glavnih komponenti, koje apsorbuju najveći deo varijabiliteta originalnog seta podataka. Zbog njenog velikog značaja i primene u skoro svim naučnim disciplinama, PCA je implementirana u svim softverskim paketima namenjenim za analizu podataka.

Matematički se analiza glavnih komponenti može opisati kao bilinearni model koji traži linearnu kombinaciju varijabli koja opisuje zajedničku strukturu u matrici podataka $\mathbf{X}(m \times n)$. Matrica podataka ima m redova koji odgovaraju objektima (u hemometriji to su obično uzorci) i n kolona koje odgovaraju varijablama. U spektroskopskoj analizi, na pr. fluorescenciji, svaka

vrsta matrice podataka odgovara jednoj emisionoj talasnoj dužini, a svaka kolona jednom emisionom spektru.

Geometrijski, analiza glavnih komponenti prikazuje podatke u novoj bazi, odnosno ona traži potprostor određenih dimenzija koji obuhvata najveći deo varijanse podataka. Vektor prve glavne komponente usmeren je u pravcu maksimalne varijabilnosti podataka, dok su ostali vektori međusobno ortogonalni i svaki od njih apsorbuje maksimum preostale varijanse podataka. Ovi vektori, koji se zovu i sopstveni vektori, sadrže elemente linearne kombinacije (opterećenja) kojima se glavne komponente dobijaju iz originalnih varijabli i smešteni su u matrici koja se obično označava sa $\mathbf{P}(n \times k)$. Svaki uzorak, koji je reprezentovan tačkom u višedimenzionom prostoru, ima ortogonalne projekcije na svaki od sopstvenih vektora, a ove projekcije predstavljaju skorove i oni su smešteni u matrici $\mathbf{T}(m \times k)$ ¹. Ovi skorovi opisuju vrednosti latentnih varijabli u svakom uzorku, dok opterećenja sadrže informacije o međusobnoj povezanosti varijabli i glavnih komponenti. Kako svaka naredna komponenta ima sve manju varijansu moguće je zadržati samo prvih nekoliko komponenti, a ignorisati preostale. Varijansa odstranjenih komponenti obično se pripisuje nesistemskim varijacijama ili šumu i obično se naziva rezidualom. Vrednosti reziduala uglavnom predstavljaju elemente matrice $\mathbf{E}(m \times n)$. Geometrijska interpretacija analize glavnih komponenti u slučaju dve varijable prikazana je na Slici 2.

¹ U hemiji može biti i nejasno koji set vektora predstavlja opterećenja a koji skorove (R. A. Harshman, 1994).



Slika 2. Grafički prikaz analize glavnih komponenti u dvodimenzionom prostoru. Vektori polazne baze su označeni crnom bojom, a vektori glavnih komponenti crvenom

U matematičkom smislu, PCA se bazira na dekompoziciji kovarijacione ili korelacione matrice podataka. Ova dekompozicija može biti sprovedena NIPALS algoritmom ili algoritmom dekompozicije singularnih vrednosti. Kovarijaciona matrica matrice podataka \mathbf{X} , je definisana na sledeći način:

$$Cov(\mathbf{X}) = \mathbf{S} = \frac{\mathbf{X}^{*T}\mathbf{X}^*}{m-1}, \quad (1)$$

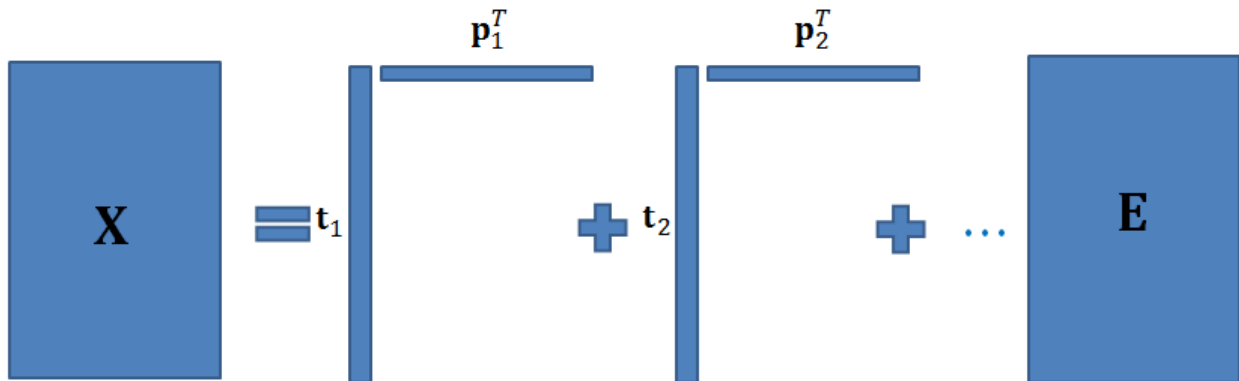
gde je $\mathbf{X}^* = \mathbf{X} - \mathbf{1}\bar{\mathbf{X}}$ matrica centriranih podataka (matrica kod koje je svaka kolona matrice \mathbf{X} umanjena za svoju srednju vrednost, čime se dobija nulti prosek u svakoj koloni), $\mathbf{1}(m \times 1)$ je vektor kolona čiji su svu elementi jedinice, a $\bar{\mathbf{X}}(1 \times n)$ je vektor vrsta čiji su elementi srednje vrednosti kolona matrice \mathbf{X} : $\bar{\mathbf{X}} = (\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_n)$. Matrica podataka može biti prikazana kao suma spoljašnjih (outer) proizvoda vektora skorova (\mathbf{t}_i) i vektora loadingsa (\mathbf{p}_i), plus matrica reziduala:

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_k \mathbf{p}_k^T + \mathbf{E} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} = \hat{\mathbf{X}} + \mathbf{E} \quad (2)$$

gde je $\mathbf{T}(m \times k)$ matrica skorova, $\mathbf{P}(n \times k)$ matrica opterećenja, $\hat{\mathbf{X}}$ je matrica ocenjenih vrednosti (vrednosti predviđenih modelom), a k je broj komponenti pri čemu je $k \leq \min(m, n)$. Dakle, ovaj metod uključuje dekompoziciju matrice podataka u strukturni deo i deo koji se odnosi na šum:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} = \text{strukturni deo} + \text{šum}. \quad (3)$$

Na Slici 3 je data grafička prezentacija dekompozicije matrice podataka.



Slika 3. Grafički prikaz dekompozicije matrice podataka

Poželjno je da strukturni deo sadrži visok procenat objašnjene varijanse, odnosno da šum koji je reprezentovan matricom \mathbf{E} , ima što manje vrednosti. Da bi se ovo postiglo, neophodno je odrediti tačan (optimalan) broj komponenti u podacima. Određivanje optimalnog broja komponenti obično se postiže analiziranjem matrice reziduala. Postoji više načina za određivanje broja komponenti a o njima će biti više reči u nastavku. Dakle, skorovi i opterećenja su najvažniji elementi u analizi glavnih komponenti.

Skorovi

Skorovi predstavljaju strukturni deo matrice podataka i dobijaju se kao linearna kombinacija varijabli. U matrici \mathbf{T} , prva kolona (\mathbf{t}_1) sadrži skorove prve glavne komponente, druga kolona (\mathbf{t}_2) sadrži skorove druge glavne komponente itd. Ukoliko prve dve komponente dosta dobro aproksimiraju matricu podataka i ako se skorovi prikazu grafički u prostoru prve dve glavne komponente, mogu se uočiti sličnosti među uzorcima, jer će uzorci sa sličnim vrednostima po svim varijablama biti blisko pozicionirani. Kako u spektroskopiji objekti predstavljaju talasne dužine ili talasne brojeve, to znači da nije od interesa da se oni grafički mapiraju na dijagramu definisanom sa PC_1 i PC_2 , već da se nacrtaju grafici skorova u funkciji talasnih dužina u fluorescentnoj spektroskopiji, ili u funkciji talasnih brojeva u FTIR spektroskopiji. U slučaju fluorescentne spektroskopije ovi grafici predstavljaju ocene emisionih profila fluorofora, koji učestvuju u formiranju zbirnog fluorescentnog spektra.

Opterećenja (Loadings)

Oni takođe predstavljaju strukturni deo matrice podataka i pokazuju uticaj pojedinih varijabli na skorove. Pomoću njih se može videti koje varijable i u kojoj meri su odgovorne za vrednosti skorova.

Reziduali

Reziduali aranžirani u matrici \mathbf{E} , nisu deo strukturnog modela jer predstavljaju ocenu šuma. To je razlog zašto vrednosti reziduala, prilikom ocenjivanja opterećenja i skorova, treba da budu što manje. Evaluacija matrice reziduala, je uvek relativna u odnosu na „prosečne objekte” matrice \mathbf{X} . ”Prosečan objekat“ može biti shvaćen kao prva aproksimacija matrice \mathbf{X} , ili kao nulta glavna komponenta (PC_0). Ukoliko se računa više komponenti, doći će do promene rezidualne varijanse. Uvek se počinje sa \mathbf{E}_0 , odnosno sa rezidualnom varijansom od 100% i objašnjenom varijansom od 0%, jer u tom koraku ne postoji strukturni deo modela ($\mathbf{TP}^T = \mathbf{0}$). S druge strane, ukoliko se zadrže sve komponente, imaćemo obrnutu situaciju, rezidualna varijansa biće jednaka 0%, a objašnjena 100%. Za bilo koji broj komponenti važiće relacija:

$$\text{objašnjena varijansa} + \text{rezidualna varijansa} = 100\%.$$

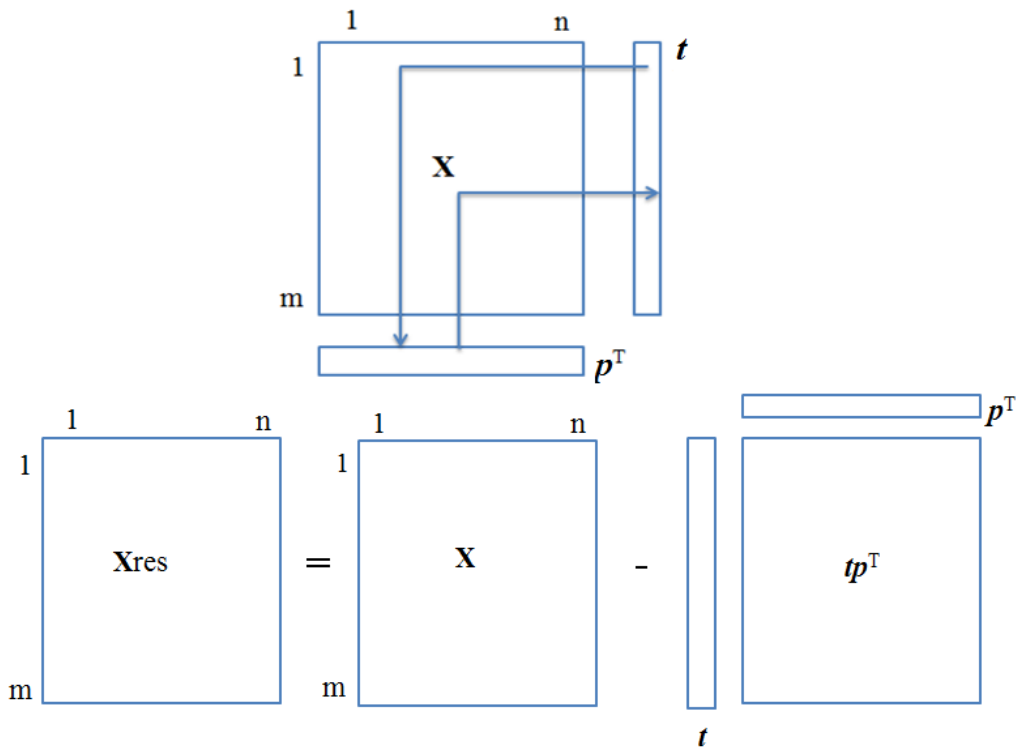
Shodno prethodnoj diskusiji, optimalan broj komponenti se može odrediti grafičkim prikazivanjem promena u rezidualnoj varijansi, u funkciji broja komponenti.

Nakon ovih razmatranja, mogu se sumirati glavni ciljevi analize glavnih komponenti:

- i) ekstrakcija najvažnijih informacija iz matrice podataka,
- ii) kompresija dimenzije podataka uz zadržavanje relevantnih informacija,
- iii) pojednostavljeno opisivanje matrice podataka i
- iv) analiziranje strukture objekata i varijabli.

1.1.2. NIPALS algoritam

NIPALS algoritam ("Nonlinear Iterative Partial Least Squares") je, uz dekompoziciju singularnih vrednosti, jedan od najzastupljenijih metoda za određivanje sopstvenih vektora (vektora opterećenja) u analizi glavnih komponenti. Njegova proširena verzija se koristi i u PLS regresiji. Ova dekompozicija se oslanja na dekompoziciju singularnih vrednosti a geometrijska interpretacija ovog algoritma data je na Slici 4.



Slika 4. Geometrijska interpretacija NIPALS algoritma. Ocena vektora opterećenja i vektora skorova (gore) i provera optimalnosti (dole)

U matematičko-algoritamskoj notaciji NIPALS algoritam može biti opisan na sledeći način:

| Korak | Iteracija $i=1$ do broja glavnih komponenti | Opis koraka |
|-------|--|---|
| 1. | X_{i-1} | X_0 je centrirana matrica podataka. |
| 2. | $t = x_j$ | Algoritam započinje proizvoljno izabranim vektorom skorova za koji se može izabrati bilo koja varijabla iz matrice podataka ili varijabla sa najvećom varijansom. |
| 3. | $p = X_{i-1}^T t$, $p = \frac{p}{\ p\ } = p(p^T p)^{-0.5}$ | Projekcija centrirane matrice na vektor t u cilju dobijanja prve aproksimacije vektora opterećenja p i njegovo normiranje na jediničnu dužinu. |
| 4. | $t^* = Xp$ | Projekcija centrirane matrice na prethodno dobijeni vektor |

| | | |
|----|--|--|
| | | \mathbf{p} u cilju izračunavanja poboljšanog vektora skorova. |
| 5. | $\mathbf{t}_\Delta = \mathbf{t}^* - \mathbf{t}$ $\Delta t = \mathbf{t}_\Delta^T \mathbf{t}_\Delta$ | Provera konvergencije: izračunavanje sume kvadrata razlika prethodnih i unapređenih skorova. Ako je $\Delta t < \varepsilon$ postignuta je konvergencija, glavna komponenta je izračunata, nastavak u koraku 6. U suprotnom se nastavlja sa korakom 3 (ε se na pr., može podesiti na 10^{-6}). |
| 6. | $\mathbf{X}_i = \mathbf{X}_{i-1} - \mathbf{t}\mathbf{p}^T$ | Uklanjanje prve glavne komponente iz matrice podataka. |

1.2. Multivarijaciona rezolucija krivih

Multivarijaciona rezolucija krivih je popularni hemometrijski metod za ekstrahovanje relevantnih informacija o čistim komponentama u pomešanim sistemima, pomoću bilinearne dekompozicije eksperimentalne matrice $\mathbf{D}(I \times J)$, u proizvod matrica $\mathbf{C}(I \times K)$ i $\mathbf{S}^T(K \times J)$. Matrica \mathbf{C} je povezana sa redovima matrice \mathbf{D} i uglavnom predstavlja koncentracione profile, dok je matrica \mathbf{S} povezana sa kolonama matrice \mathbf{D} i obično reprezentuje spektralne profile komponenti⁸.

Lamber-Berov zakon opisuje vezu između spektroskopskih informacija i koncentracije uzorka:

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \varepsilon l c. \quad (4)$$

gde je A apsorbanacija, I i I_0 su intenziteti propuštenog i upadnog zračenja, respektivno, ε je apsorpcioni koeficijent (konstanta karakteristična za određenu supstancu i talasnu dužinu), l je efektivni put zračenja, a c je ukupna koncentracija analita u uzorku. Ovaj zakon, kao što se vidi iz jednačine (4) opisuje zbirni signal svih analita, gde je apsorbanacija direktno proporcionalna njihovim koncentracijama. MCR precizno fituje ova merenja, jer dekomponovani model vrlo

dobro aproksimira njihovu strukturu. Stoga se bilinearni model MCR-ALS može opisati sledećom jednačinom:

$$\mathbf{D} = \sum_{i=1}^K \mathbf{c}_i \mathbf{s}_i^T + \mathbf{E} = \mathbf{C} \mathbf{S}^T + \mathbf{E}. \quad (5)$$

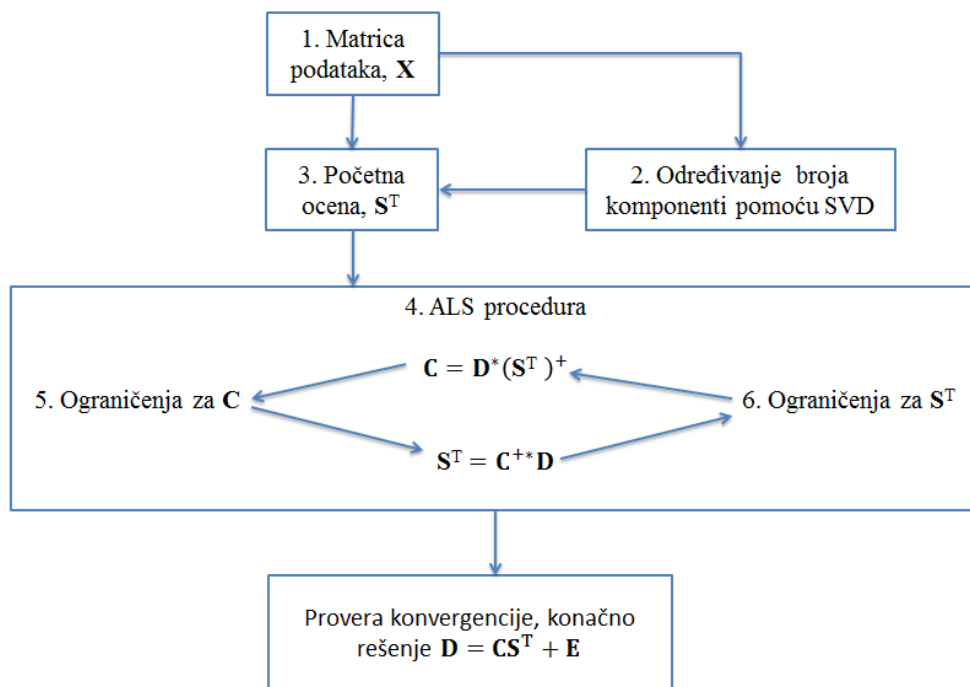
Razlaganje matrice \mathbf{D} postiže se iterativnim postupkom, a dobijene matrice \mathbf{C} i \mathbf{S}^T imaju smislenu hemijsku interpretaciju. Matrica $\mathbf{E}(I \times J)$ je matrica reziduala i predstavlja deo podataka neobjašnjenih bilinearnim modelom. Indeks I je oznaka za broj uzoraka (spektara), J je oznaka za broj talasnih dužina, a K je oznaka za broj komponenti prisutnih u uzorcima, pri čemu je $K \ll I, J$. Za određivanje broja prisutnih komponenti može se upotrebiti analiza glavnih komponenti⁷ ili dekompozicija pomoću singularnih vrednosti. U većini slučajeva, polulogaritamski dijagram sopstvenih (ili singularnih) vrednosti u funkciji broja komponenti, rezultuje pouzdanim određivanjem broja komponenti u podacima. Ukoliko nije izabran tačan broj komponenti, nije moguće realistično oceniti kako spektralne, tako ni koncentracione profile. U modelu (5) se može prepoznati analogija bilinearne veze između eksperimentalnih podataka, sa Lamber-Berovim zakonom, odnosno njena višetlasna ekstenzija u matricnoj formi.

Za razliku od metode glavnih komponenti, multivarijaciona rezolucija krivih ne zahteva ortogonalna ograničenja ekstrahovanih komponenti, već su tako dobijene komponente direktne spektralne ocene čistih hemijskih komponenti. Ovo je vrlo korisno jer su skorovi komponenti direktno proporcionalni koncentracijama komponenti prisutnih u uzorku. Mana ove metode je što dobijeno rešenje nije jedinstveno (rotaciona dvosmislenost). Ovaj nedostatak se može izbeći nametanjem različitih ograničenja matricama \mathbf{C} i \mathbf{S} , čime se smanjuje broj mogućih rešenja i što konačno može dati jedinstveno rešenje.

Glavni koraci u izgradnji MCR-ALS modela mogu se sumirati na sledeći način:

- i) Kolekcija matrice podataka \mathbf{D} ,
- ii) Ocena broja komponenti prisutnih u matrici \mathbf{D} (ocena pseudo-ranga matrice podataka),
- iii) Traženje početnih ocena spektralnih (ili koncentracionih) profila,
- iv) Iterativno ALS ocenjivanje spektralnih i koncentracionih profila pod ograničenjima,
- v) Proveravanje konvergencije.

Na Slici 5 data je grafička ilustracija koraka u multivarijacionoj rezoluciji krivih.



Slika 5. Pregled koraka u proceduri multivarijaciona rezolucija krivih-naizmenični najmanji kvadrati

U nastavku će biti ukratko opisani koraci u MCR-ALS proceduri:

U slučaju fluorescentne spektroskopije, svaki red matrice podataka korespondira broju ekscitacionih talasnih dužina (odnosno broju emisionih spektara), a svaka kolona predstavlja odgovarajuću emisionu talasnu dužinu. U tom slučaju, kolone matrice \mathbf{C} reprezentuju ekscitacione profile komponenti, a redovi matrice \mathbf{S}^T njihove emisione spektre. S obzirom da dekompozicija matrice \mathbf{D} , u matrice \mathbf{C} i \mathbf{S} , može dati beskonačan broj mogućih rešenja, neophodno je nametnuti određena ograničenja ovoj bilinearnoj dekompoziciji u cilju dobijanja hemijski smislenih rešenja. Rešenje modela (5) se uopšteno može dobiti metodom naizmeničnih najmanjih kvadrata, koji obično sadrži dva koraka. U prvom koraku se izaberu početni (pretpostavljeni) koncentracioni ili emisioni profili. Ukoliko se počinje sa inicijalnim ocenama koncentracionih profila, onda se spektralni profili računaju na sledeći način:

$$\mathbf{S}^T = \mathbf{C}(\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{D} = \mathbf{C}^+\mathbf{D}. \quad (6)$$

Ovako izračunati emisioni profili se koriste u sledećem koraku za dobijanje „poboljšanih” koncentracionih profila:

$$\mathbf{C}^T = \mathbf{D}\mathbf{S}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1} = \mathbf{D}\mathbf{S}^+. \quad (7)$$

Ovi koraci se ponavljaju sukcesivno, sve dok se ne postigne minimalna Frobenijusova ili Euklidska norma matrice reziduala

$$\mathbf{E} = \mathbf{D} - \mathbf{C}\mathbf{S}^T. \quad (8)$$

Postizanje konvergencije se može pratiti i na sledeći način: kada su u dva uzastopna iterativna ciklusa, relativne razlike između eksperimentalnih vrednosti i vrednosti ocenjenih ALS metodom (reziduali), manje od prethodno izabrane vrednosti, uglavnom od 0.1%, tada se algoritam zaustavlja. Obično se na početku studije koristi veća vrednost za grešku (na pr. 1%), a kada se nađe dobar model može se pokušati i sa nižim vrednostima kako bi se videlo da li postoje primetna poboljšanja u rešenjima matrica \mathbf{C} i \mathbf{S}^T .

Za ocenu kvaliteta podešavanja modela, može se upotrebiti funkcija gubitka (*LOF*), koja pokazuje razliku između početne matrice podataka i njene ocene dobijene modelom MCR-ALS:

$$LOF(\%) = 100 \sqrt{\frac{\sum_i \sum_j e_{ij}^2}{\sum_i \sum_j d_{ij}^2}} \quad (9)$$

gde su e_{ij} i d_{ij} , elementi matrice reziduala i matrice podataka, respektivno⁹. Moguće je izračunati i procenat objašnjene varijanse (10) i standardne devijacije reziduala (11), na sledeći način:

$$r^2 = \frac{\sum_i \sum_j d_{ij}^2 - \sum_i \sum_j e_{ij}^2}{\sum_i \sum_j d_{ij}^2} \quad (10)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i \sum_j e_{ij}^2}{IJ}} \quad (11)$$

Ova dva parametra se takođe mogu upotrebiti za ocenu kvaliteta uklapanja modela, pri čemu veća vrednost za r^2 i manja vrednost za s , podrazumevaju kvalitetnije podešavanje.

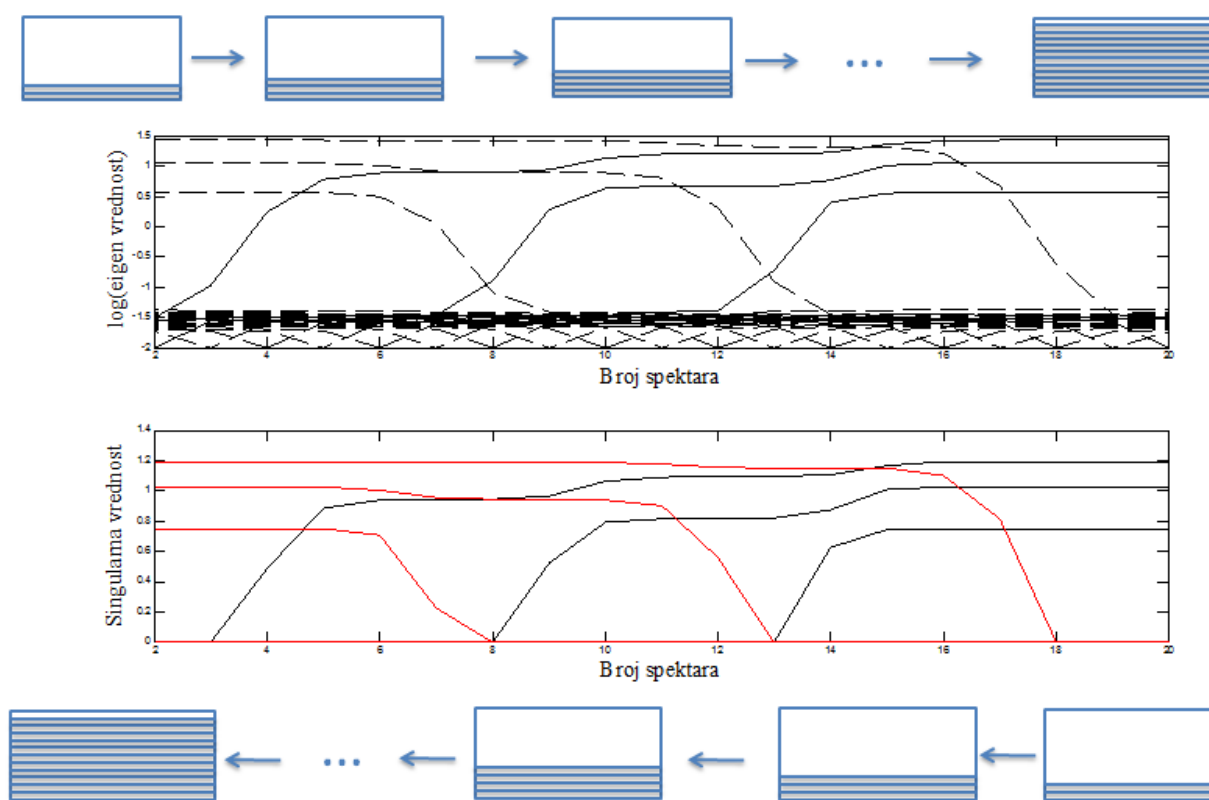
1.2.1. Razvijena faktorska analiza

Glavni cilj multivarijacione rezolucije krivih je, kao i u faktorskoj analizi, otkrivanje broja latentnih faktora koji predstavljaju izvor varijacije u podacima, kao i ocenjivanje opterećenja i skorova. U svrhu ocenjivanja broja faktora, mogu se upotrebiti dve tehnike: *razvijena faktorska analiza* (EFA) i *razvijena faktorska analiza pokretnih prozora fiksne veličine* (FSMW-EFA). Ovo su dve pionirske metode u analizi lokalnog ranga matrice, koje se i danas koriste u velikoj meri za određivanje broja komponenti. EFA je više orijentisana ka procesima u kojima komponente evoluiraju u funkciji vremena ili drugih varijabli, dok je FSMW-EFA može biti primenjena u smešama. Postepena evolucija hemijskih sistema podrazumeva snimanje vektora odgovora u svakom koraku procesa. Evolucija hemijskog sistema se može uočiti i u fluorescentnoj spektroskopiji, gde do promene udela pojedinih spektralnih komponenti u zbirnom spektru, dolazi zbog promene u ekscitacionoj talasnoj dužini.

Razvijena faktorska analiza se bazira na eigen-analizi submatrica, koje postepeno povećavaju veličinu dodavanjem novih spektara. Prva submatrica ima samo dva spektra i shodno tome, dve singularne (odnosno eigen) vrednosti. Za svaku submatricu se odrede singularne ili eigen vrednosti odgovarajuće korelacione matrice, a zatim se konstruiše grafik singularnih vrednosti (ili eigen vrednosti) ili njihovih logaritama, u funkciji broja uključenih spektara. Ovako opisan proces se naziva EFA unapred. EFA unazad se sprovodi na isti način, samo što se kreće

od dva poslednja spektra, a zatim se sukcesivno dodaju preostali spektri, jedan po jedan (Slika 6).

Pojava singularne vrednosti iznad nivoa šuma, znači pojavu nove komponente, u slučaju EFA unapred, i njeno nestajanje u slučaju EFA unazad metode. Površina ispod i -te eigen vrednosti kod EFA unapred metode i $(n+1-i)$ -te kod EFA unazad metode, zajedno kod obe krive, mapira koncentracioni profil i -te komponente.



Slika 6. Šematski prikaz primene *razvijene faktorske analize* unapred (gore) i unazad (dole). Usredini je prikazan kombinovani dijagram za EFA unapred (puna i crna linija) i EFA unazad (isprekidana i crvena linija)

1.2.2. Analiza proširenih matrica

Moguće je proširenje MCR-ALS analize na više dvodimenzionih matrica podataka dobijenih u različitim eksperimentalnim uslovima. Ovako prikupljeni podaci zahtevaju proširivanje matrice podataka, u odnosu na matricu sa kakvom se srećemo u slučaju jednog eksperimenta. Ovo proširivanje se može odnositi na povećanje broja kolona, broja vrsta matrice podataka ili i broja kolona i broja vrsta. Da bi ovakvo aranžiranje imalo smisla, sve pojedinačne matrice treba da dele neke informacije sa ostalim dodatim matricama. Izvanredna prednost ovakvog proširivanja matrica je pozitivan efekat na rezoluciju najkompleksnijih spektralnih struktura. Uvođenje selektivnosti ili nametanje uslova lokalnog ranga u ovakav tip podataka je vrlo jednostavno i moguće dodavanjem matrica iz jednostavnijih procesa (na pr., matrica podataka dobijena praćenjem kiselo-bazne reakcije liganda jednom spektroskopskom tehnikom se može proširiti drugom matricom spektroskopskih podataka, koja prati kompleksiranje istog liganda metalom, uz promenu pH-vrednosti ili dodavanjem matrica „čistih” odgovora jednog ili nekoliko analita, prisutnih u mnogo kompleksnijoj matrici podataka)¹⁰. Dakle, ukoliko se u više eksperimenata koristi ista spektroskopska tehnika, matrica podataka se proširuje na način da sve one dele vektorski prostor kolona (matrice se postavljaju jedna ispod druge) i u tom slučaju će ocenjeni spektri biti zajednički za sve eksperimente, a koncentracioni profili će varirati od eksperimenta do eksperimenta. Ukoliko se spektri prikupljaju u R eksperimenata onda se proširenje MCR-ALS modela može zapisati na sledeći način:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{D}_1 \\ \vdots \\ \mathbf{D}_R \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}_1 \\ \vdots \\ \mathbf{C}_R \end{bmatrix} \mathbf{S}^T + \begin{bmatrix} \mathbf{E}_1 \\ \vdots \\ \mathbf{E}_R \end{bmatrix} \quad (12)$$

Kada se S istih uzoraka snima sa više različitih spektroskopskih tehnika, tada se proširenje matrice podataka postiže postavljanjem matrica od svake spektroskopske tehnike, jedne pored druge (matrica podataka se proširuje na način da sve one dele vektorski prostor vrsta). Matrični zapis ovakvog eksperimentalnog dizajna glasi:

$$[\mathbf{D}_1 \cdots \mathbf{D}_S] = \mathbf{C}[\mathbf{S}_1^T \cdots \mathbf{S}_S^T] + [\mathbf{E}_1^T \cdots \mathbf{E}_S^T] \quad (13)$$

U jednačini (13) figuriše jedna matrica \mathbf{C} , jer su koncentracije prisutnih vrsta (komponenti) jednake u svim eksperimentima, i \mathbf{S} spektralnih matrica, koje odgovaraju spektrima komponenti korespondentnih spektroskopskih tehnika.

Na kraju, moguće je istovremeno analiziranje podataka dobijenih primenom više spektroskopskih tehnika na više uzoraka. Ovim se povećava kako broj kolona tako i broj vrsta matrice podataka. U slučaju R spektroskopskih tehnika i S uzoraka, bilinearni model MCR-ALS se može formulisati na sledeći način:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{D}_1^1 \cdots \mathbf{D}_S^1 \\ \vdots \\ \mathbf{D}_1^R \cdots \mathbf{D}_S^R \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}^1 \\ \vdots \\ \mathbf{C}^R \end{bmatrix} [\mathbf{S}_1^T \cdots \mathbf{S}_S^T] + \begin{bmatrix} \mathbf{E}_1^1 \cdots \mathbf{E}_S^1 \\ \vdots \\ \mathbf{E}_1^R \cdots \mathbf{E}_S^R \end{bmatrix}. \quad (14)$$

Ovaj bilinearni model je moćniji od sva tri prethodno opisana modela, jer može da unapredi rezoluciju vrlo kompleksnih struktura podataka¹¹. Sem toga, on daje i pouzdanija rešenja, jer eliminiše problem rotacione neodređenosti i deficita ranga.

1.2.3. Ograničenja u MCR

Metoda MCR-ALS ne zahteva prethodne informacije o proučavanom hemijskom sistemu. Ipak, ukoliko ove informacije postoje mogu se upotrebiti za dobijanje koncentracionih ili spektralnih profila sa poznatim karakteristikama, što može dovesti do minimiziranja neodređenosti u dekompoziciji podataka. Iskorišćavanje ovih informacija se može sprovesti uvođenjem određenih ograničenja u algoritam za dekompoziciju. Ograničenja se mogu definisati kao matematička ili hemijska svojstva nametnuta celom sistemu ili nekom od njegovih delova. Ova ograničenja su prevedena u matematički jezik i iterativno forsiraju optimizaciju profila do željenih rešenja. Pregled ograničenja sa opisom njihovih osobina, koja se najčešće sreću u spektroskopiji dat je u Tabeli 1.

Tabela 1. Pregled ograničenja koja se najčešće sreću u spektroskopiji i uslovi za njihovu primenu

| Ograničenje | Uslov za primenu |
|-----------------|---|
| Nenegativnost | Kada se očekuje da eksperimentalne vrednosti budu pozitivne (eventualno jednake nuli). Na pr., ekscitacioni i emisioni spektri u fluorescentnoj spektroskopiji, apsorpcioni spektri, hromatogrami itd., nikada nisu negativni. Zbog ovih činjenica, ovo ograničenje forsira nenegativne vrednosti odgovarajućih profila. Jedan način eliminisanja negativnih vrednosti je njihova zamena sa nulom, a drugi je upotreba algoritma nenegativnih najmanjih kvadrata. |
| Unimodalnost | Kada se očekuje prisustvo samo jednog maksimuma u profilima. Na pr., fluorescentni emisioni spektri imaju jedan pik, odnosno njihovi intenziteti najpre rastu sa porastom emisione talasne dužine, a zatim opadaju. |
| Balans mase | Obično se koristi u reakcionim sistemima, gde je ukupna masa svih profila konstantna (na pr. razlaganje proteina u amino kiseline). |
| Poznati profili | Kada je poznat oblik spektralnih ili koncentracionih profila-na pr., Gausov ili Lorencov. |

1.3. Multidimenzioni modeli

1.3.1. Paralelna faktorska analiza

Paralelna faktorska analiza (PARAFAC) je matematičko-statistička tehnika koja se koristi za dekompoziciju tenzora višeg reda. Ova analiza je moćan multilinearni algebarski alat koji postaje sve popularniji u brojnim naučnim disciplinama¹². PARAFAC model je generalizacija PCA na tenzore koji predstavljaju n -modalnu generalizaciju matrica. Ovaj metod, za razliku od PCA, kreira jedinstveno rešenje i zasnovan je na principu paralelnih proporcionalnih profila koje je definisao Cattell (1944) i koji je tvrdio da rotaciona neodređenost kod analize glavnih komponenti može biti prevaziđena traženjem pomenutih profila. Ukoliko su isti faktori prisutni u dva različita seta podataka, ali u različitim relativnim proporcijama, tada postoji jedinstven set osa, u oba prostora, koji otkriva ove paralelne proporcionalne veze. Dokaz jedinstvenosti rešenja PARAFAC modela biće dat kasnije. Ovi principi imaju jasnu hemijsku interpretaciju u rezoluciji krivih. Slične ideje u hemiji su nezavisno pokrenuli Ho et al, koji su razvili metodu poništavanja ranga (rank annihilation), čija je ideja bliska PARAFAC dekompoziciji^{13,14}.

Paralelna faktorska analiza pripada familiji takozvanih multi-modalnih (multi-way) metoda koje se mogu primeniti na podatke aranžirane u tro- ili višedimenzione matrice (tenzore). Primeri tenzora koji mogu biti analizirani ovom metodom su: ekscitaciono-emisione matrice (uzorak \times ekscitacija \times emisija), hromatografski podaci (GC-MS: uzorak \times eluciono vreme \times m/z struktura), elektroencefalografija (prostor \times vreme \times frekvenca), itd¹⁵. Ovaj metod predstavlja generalizaciju analize glavnih komponenti. Metod su nezavisno predložili Harshman (1970) i Carrol i Chang (1970), koji su ga nazvali model kanonijske dekompozicije (CANDECOMP).

U rastvoru koji sadrži jednu fluoroforu, intenzitet emitovane svetlosti na i -toj emisionoj talasnoj dužini i j -toj ekscitacionoj talasnoj dužini može biti, u slučaju razblaženih rastvora, opisan na sledeći način:

$$x_{ij} = ab_i c_j, \quad (15)$$

gde je b_i relativna emisija na i -toj talasnoj dužini, c_j relativna količina apsorbovane svetlosti na j -toj ekscitacionoj dužini, dok je a koncentracija analita (fluorofore). Može se pretpostaviti da je u rastvoru koji sadrži F analita, ukupan signal emitovane svetlosti na i -toj emisionoj i j -toj ekscitacionoj talasnoj dužini jednak zbiru signala pojedinih analita:

$$x_{ij} = \sum_{f=1}^F x_{ijf} = \sum_{f=1}^F a_f b_{if} c_{jf}. \quad (16)$$

Prethodno razmatranje pokazuje da je doprinos signala pojedinih analita nezavisan od doprinosa preostalih analita (aditivnost signala). U izrazu 16, a_f predstavlja koncentraciju analita f , b_{if} je relativna emisija analita f na i -toj emisionoj talasnoj dužini, dok je c_{jf} relativna apsorpcija analita f na j -toj ekscitacionoj talasnoj dužini. Prethodna diskusija važi za jedan uzorak. Ukoliko se fluorescencija meri u K uzoraka, a_{kf} postaje koncentracija f -tog analita u k -tom uzorku. U tom slučaju vrednost intenziteta fluorescencije na i -toj emisionoj, j -toj ekscitacionoj i u k -tom uzorku se može izraziti na sledeći način:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{kf} b_{if} c_{jf}. \quad (17)$$

gde je $i = 1, \dots, I; j = 1, \dots, J; k = 1, \dots, K$.

Analiza glavnih komponenti se primenjuje na podacima aranžiranim u matricama. Matrice kojima se uglavnom bavi ova teza su ekscitaciono-emisione matrice, snimljene na jednom uzorku i ovakve matrice su uvek dvodimenzione, odnosno bimodalne. Podaci dobijeni snimanjem intenziteta fluorescencije na više emisionih, više ekscitacionih talasnih dužina i u više uzoraka mogu se aranžirati u tenzor (višedimenziona odnosno multi-modalna matrica).

S obzirom da se prilikom snimanja spektara pojavljuje i šum, onda se vrednost izmerenog signala može predstaviti u sledećoj formi:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{kf} b_{if} c_{jf} + e_{ijk}. \quad (18)$$

gde je e_{ijk} korenspondirajuća vrednost šuma.

Kao što je već rečeno, za dekompoziciju ovako opisanih eksperimentalnih podataka, može se koristiti PARAFAC model, koji se definiše na sledeći način:

$$\hat{x}_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf}, \quad (19)$$

gde \hat{x}_{ijk} predstavlja ocenu intenziteta emitovane svetlosti u k -tom uzorku, i -toj emisioj i j -toj ekscitacionoj talasnoj dužini. Upotrebom Kronekerovog proizvoda (\otimes), strukturni model može biti zapisan i u sledećoj formi:

$$\hat{\mathbf{X}}^{(I \times JK)} = \sum_{f=1}^F \mathbf{a}_f (\mathbf{c}_f^T \otimes \mathbf{b}_f^T) = \mathbf{A}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T, \quad (20)$$

gde je $\hat{\mathbf{X}}^{(I \times JK)}$ tenzor prikazan kao $I \times JK$ matrica, dok su \mathbf{a}_f , \mathbf{b}_f i \mathbf{c}_f f -te kolone matrica \mathbf{A} , \mathbf{B} i \mathbf{C} , respektivno. Elementi matrice $\mathbf{A}(I \times F)$, a_{if} , su skorovi, odnosno ocene koncentracije komponente f u k -tom uzorku. Shodno ovome, elementi matrice $\mathbf{B}(J \times F)$, b_{jf} , su opterećenja i predstavljaju ocenu intenziteta emitovane svetlosti komponente f na i -toj emisioj talasnoj dužini, dok su elementi matrice $\mathbf{C}(K \times F)$, c_{kf} , takođe opterećenja i predstavljaju ocene intenziteta apsorbovane svetlosti komponente f na j -toj ekscitacionoj talasnoj dužini.

PARAFAC dekompozicija se može opisati i kao dekompozicija tenzora $\underline{\mathbf{X}} \in R^{I \times J \times K}$, u sumu minimalnog broja tenzora ranga 1¹⁵(model 21). Tenzor ranga jedan se naziva trijada, predstavlja ekvivalent dijadi i označava jednu PARAFAC komponentu:

$$\underline{\mathbf{X}} = \sum_{f=1}^F \mathbf{a}_f \circ \mathbf{b}_f \circ \mathbf{c}_f + \underline{\mathbf{E}}, \quad (21)$$

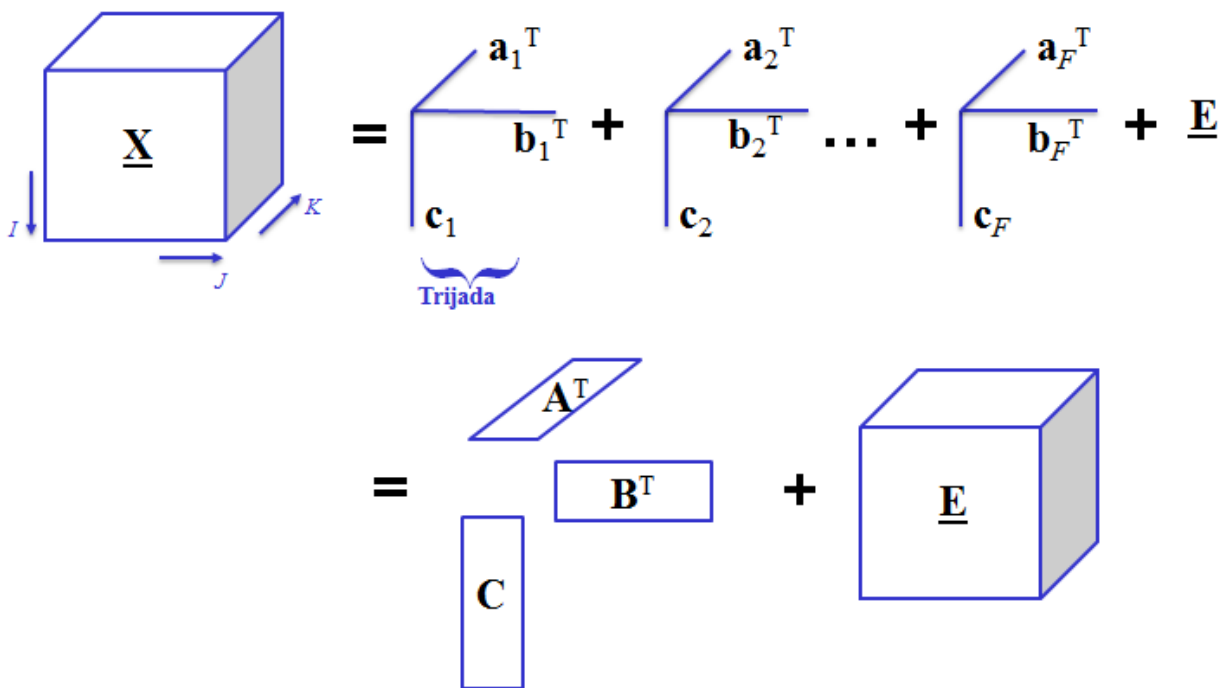
gde su \mathbf{a}_f , \mathbf{b}_f i \mathbf{c}_f f -ta kolona matrica opterećenja, $\mathbf{A} \in R^{I \times F}$, $\mathbf{B} \in R^{J \times F}$ i $\mathbf{C} \in R^{K \times F}$, respektivno, a $\underline{\mathbf{E}}$ je tenzor reziduala (\circ je oznaka za spoljašnji proizvod vektora).

PARAFAC model može biti zapisan i u matričnoj notaciji na sledeća tri načina¹²:

$$\begin{aligned} \mathbf{X}^{(1)} &= (\mathbf{A} \circ \mathbf{C}) \mathbf{B}^T \\ \mathbf{X}^{(2)} &= (\mathbf{B} \circ \mathbf{A}) \mathbf{C}^T, \\ \mathbf{X}^{(3)} &= (\mathbf{C} \circ \mathbf{B}) \mathbf{A}^T \end{aligned} \tag{22}$$

gde je $\mathbf{X}^{(1)} \in R^{IK \times J}$, $\mathbf{X}^{(2)} \in R^{JI \times K}$ i $\mathbf{X}^{(3)} \in R^{KJ \times I}$.

Na Slici 7 data je grafička ilustracija PARAFAC modela sa F komponenti.



Slika 7. Grafička prezentacija dekompozicije tenzora $\underline{\mathbf{X}}$ u F -komponentni PARAFAC model; \mathbf{a}_i i \mathbf{b}_i su vektori opterećenja, \mathbf{c}_i su vektori skorova i ($\underline{\mathbf{E}}$) je tenzor reziduala.

Da bi PARAFAC metod bio uspešno korišćen u dekompoziciji multi-modalnih podataka, neophodno je da budu ispunjene sledeće pretpostavke:

- i) Varijabilnost: ne treba da postoje dve komponente koje imaju perfektno kovariranje, odnosno savršenu korelaciju, tj., identične spektre,
- ii) Trilinearnost: izvor hemijskog variranja u svakom modu seta podataka, je posledica prisustva istog broja komponenti. Na pr., kod seta podataka koji predstavljaju fluorescentne intenzitete, to znači da su emisijski spektri invarijantni za svaku ekscitacionu dužinu, ekscitacioni profili su invarijantni za sve emisije talasne dužine, kao i to da se intenzitet fluorescencije menja približno linearno sa koncentracijom,
- iii) Aditivnost: Ukupan signal je zbir (linearna superpozicija) signala svih komponenti.

Treća pretpostavka može biti narušena, odnosno signal postaje multiplikativan, ako je spektralno variranje posledica hemijske reakcije, gašenja, interakcije između komponenti ili zbog promene elektronskog okruženja fluorofore¹⁵.

1.3.1.1. Jedinственost rešenja PARAFAC modela

Ukoliko se matrica podataka dekomponuje analizom glavnih komponenti, dobijeno rešenje neće biti jedinstveno. Ovo znači da postoji beskonačno mnogo matrica skorova i matrica opterećenja, koje matricu podataka mogu fitovati na isti način:

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}\mathbf{B}^T + \mathbf{E} = \mathbf{A}\mathbf{I}\mathbf{B}^T + \mathbf{E} = \mathbf{A}\underbrace{\mathbf{P}\mathbf{P}^{-1}}_{\mathbf{I}}\mathbf{B}^T + \mathbf{E}, \quad (23)$$

gde je \mathbf{P} , $F \times F$ nesingularna matrica.

Gornja ekspresija pokazuje da su vrednosti novih skorova sadržani u matrici \mathbf{AP} , dok se opterećenja nalaze u matrici $\mathbf{B}(\mathbf{P}^{-1})^T$. Kod PARAFAC modela ne postoji ovakva neodređenost. Ukoliko se matrica \mathbf{X}_k (matrica podataka k -tog uzorka), zarotira na sledeći način

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{A}\mathbf{D}_k\mathbf{B}^T + \mathbf{E} = \mathbf{A}\underbrace{\mathbf{T}\mathbf{T}^{-1}}_{\mathbf{I}}\mathbf{D}_k\underbrace{\mathbf{S}\mathbf{S}^{-1}}_{\mathbf{I}}\mathbf{B}^T + \mathbf{E},^2 \quad (24)$$

može se uočiti da su nova opterećenja matrice \mathbf{A} sadržana u matrici \mathbf{AT} , matrice \mathbf{B} u matrici $\mathbf{B}(\mathbf{S}^{-1})^T$, a matrice \mathbf{D}_k u matrici $\mathbf{T}^{-1}\mathbf{D}_k\mathbf{S}$. Zbog zahteva da matrice \mathbf{D}_k i matrica $\mathbf{T}^{-1}\mathbf{D}_k\mathbf{S}$ moraju biti dijagonalne, to znači da samo određene matrice \mathbf{T} i \mathbf{S} mogu zadovoljiti ovaj zahtev, a to su permutacione i skalirajuće matrice³. To znači da je u PARAFAC modelu, jedina neodređenost vezana za poredak komponenti i skaliranje njihovih vektora opterećenja. Ova neodređenost je trivijalna i nije od velike važnosti.

Dakle, nasuprot bilinearnim modelima, gde je jedinstveno određen samo potprostor „razapet“ podacima, PARAFAC model ne određuje jedinstveno samo potprostor, već i ose koje ga definišu. Za određivanje ovih osa koristi se jednostavna matična algebra. Jednoznačnost određivanja osa u PARAFAC rešenju postiže se traženjem sistemski proporcionalnog istežanja ili skupljanja distanci (od jedne submatrice tenzora do sledeće), duž konzistentnog skupa pravaca u faktorskom prostoru (Slika 8). Takva sistemska proporcionalna variranja u rastojanjima između tačaka duž posebnih pravaca, mogu biti prisutna samo ako postoji zajednički uticaj na određeni set varijabli u prostoru. Ovi uticaji mogu biti detektovani kao različiti faktori, a njihov relativni značaj se menja od jedne do druge matrice u tenzoru⁷⁵.

² Elementi dijagonalne matrice \mathbf{D}_k predstavljaju proporcionalne promene faktorskih opterećenja po submatricama.

³ Permutaciona matrica $n \times n$, je matrica dobijena iz odgovarajuće jedinične matrice permutovanjem njenih redova ili kolona. Ove matrice su ortonormirane ($\mathbf{P}^{-1} = \mathbf{P}^T$) i idempotentne ($\mathbf{P}^2 = \mathbf{P}$). Skalirajuće matrice su dijagonalne matrice sa različitim vrednostima na glavnoj dijagonali.



Slika 8. Grafička prezentacija jedinstvenosti rešenja PARAFAC modela

1.3.1.2. Ocenjivanje opterećenja u PARAFAC modelu

Za određivanje komponenti PARAFAC modela (matrice **A**, **B** i **C**), koristi se metod naizmeničnih najmanjih kvadrata. S obzirom na način definisanja PARAFAC modela (model 20), odgovarajuća funkcija gubitka u smislu najmanjih kvadrata glasi:

$$\min_{\mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{C}} \|\mathbf{X} - \mathbf{A}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T\|_F^2. \quad (25)$$

Da bi se fitovao model korišćenjem naizmeničnih najmanjih kvadrata, neophodno je ažuriranje matrice **A** za dato **B** i **C**, matrice **B** za dato **A** i **C** i matrice **C** za dato **A** i **B**. Za ocenjivanje matrice **A**, za uslovno **B** i **C**, optimizacioni problem je formulisani na sledeći način:

$$\min_{\mathbf{A}} \|\mathbf{X} - \mathbf{AZ}^T\|_F^2, \quad (26)$$

gde je $\mathbf{Z} = \mathbf{C} \otimes \mathbf{B}$. Predloženo je nekoliko metoda za početne vrednosti matrica **B** i **C**. U jednom od predloženih metoda, za početne vrednosti se koriste slučajno generisani brojevi. Kako bi se proverila pouzdanost dobijenog rešenja, algoritam se ponavlja nekoliko puta sa različitim

početnim vrednostima matrica **B** i **C** i ukoliko se u svakom pokušaju dobije isto rešenje, to znači da je malo verovatno da je početno rešenje odabrano „nesrećno”. U Tabeli 2 su prikazani svi koraci u algoritmu za ocenjivanje matrica **A**, **B** i **C**.

Tabela 2. Algoritam za PARAFAC

| Korak | Opis koraka |
|-------|--|
| 1 | Inicijalizacija B i C $\mathbf{Z} = \mathbf{C} \otimes \mathbf{B}$ $\mathbf{A} = \mathbf{X}^{(I \times JK)} \mathbf{Z} (\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^+$ |
| 2 | $\mathbf{Z} = \mathbf{C} \otimes \mathbf{A}$ $\mathbf{B} = \mathbf{X}^{(J \times IK)} \mathbf{Z} (\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^+$ |
| 3 | $\mathbf{Z} = \mathbf{B} \otimes \mathbf{A}$ $\mathbf{C} = \mathbf{X}^{(K \times IJ)} \mathbf{Z} (\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^+$ |
| 4 | Povratak na korak 1 dok relativna promena u fitu ne postane relativno mala |

Metod naizmeničnih najmanjih kvadrata je „atraktivan” jer obezbeđuje poboljšanje rešenja u svakoj iteraciji, a glavni nedostatak je vreme neophodno za ocenu modela, naročito u slučaju velikog broja varijabli.

Za određivanje optimalnog broja komponenti korišćen je „core consistency“ metod kao i metod vizuelne procene ocenjenih emisionih i ekscitacionih profila emitujućih komponenti.

1.3.2. PARAFAC2 model

Ovaj model se može primeniti na set kovarijacionih matrica i može ekstrahovati ortogonalne ili neortogonalne faktore, u zavisnosti od toga koji od njih bolje fituju podatke. PARAFAC2 se koristi u slučajevima kada podaci, zbog problema uzorkovanja ili fizičkih artefakata, nisu idealno trilinearni ili kada pojedine submatrice tenzora nemaju isti broj redova ili kolona. Na pr., snimanje ekscitaciono-emisionih matrica proteina na različitim pH vrednostima, daje podatke kojima odgovara sledeća struktura: emission-wavelength \times excitation-wavelength \times pH. Ukoliko se na ovako strukturirane podatke primeni PARAFAC model, dobiće se matrice

\mathbf{A} , \mathbf{B} i \mathbf{C} , čije f -te kolone odgovaraju emisionom, ekscitacionom i koncentracionom (apsorpcionom) profilu komponente f . Međutim, promena pH vrednosti rastvora proteina može dovesti do promene maksimuma emisije pojedinih fluorofora, odnosno pomeranja emisionog profila duž emisione ose, tako da primena PARAFAC modela može dati pogrešne rezultate, s obzirom da ovaj model pretpostavlja da su emisioni i ekscitacioni profili svih komponenti jednaki u svim uzorcima (na svim pH vrednostima). Ovaj problem može biti prevaziđen primenom PARAFAC2 modela koji ne zahteva ovako rigorozne pretpostavke.

Već je pomenuto da se PARAFAC model može zapisati na sledeći način:

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{A}\mathbf{D}_k\mathbf{B}^T + \mathbf{E}_k, \quad k = \overline{1, K}. \quad (27)$$

Umesto modelovanja tenzora \mathbf{X} dimenzija $(I \times J_k \times K)$, koji sadrži submatrice \mathbf{X}_k $(I \times J_k)$, sa različitim brojem kolona, mogu se modelovati tenzori \mathbf{Y} , koji sadrže kvadratne matrice $\mathbf{Y}_k = \mathbf{X}_k\mathbf{X}_k^T$ $(I \times I)$ i koji će imati dimenzije $(I \times I \times K)$. Ukoliko je PARAFAC model validan, tada, zanemarujući šum, važi:

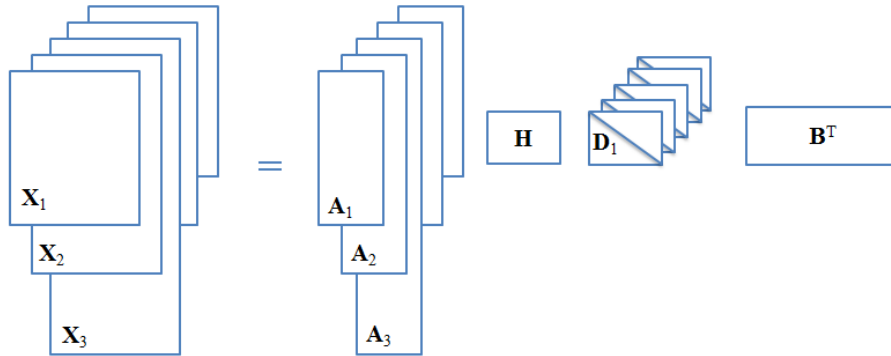
$$\begin{aligned} \mathbf{Y}_k &= \mathbf{X}_k\mathbf{X}_k^T = (\mathbf{A}\mathbf{D}_k\mathbf{B}^T)(\mathbf{A}\mathbf{D}_k\mathbf{B}^T)^T = \\ &= \mathbf{A}\mathbf{D}_k\underbrace{\mathbf{B}^T\mathbf{B}}_{\mathbf{H}}\mathbf{D}_k\mathbf{A}^T = \mathbf{A}\mathbf{D}_k\mathbf{H}\mathbf{D}_k\mathbf{A}^T. \end{aligned} \quad (28)$$

Ukoliko se tenzor \mathbf{Y} , rearanžira na način $\mathbf{Y}^{(K \times II)}$, tada se PARAFAC2 model može ovako formulirati:

$$\mathbf{Y}^{(K \times II)} = (\mathbf{C}^T | \otimes | \mathbf{C}^T)^T \text{diag}(\text{vec}\mathbf{H})(\mathbf{A} \otimes \mathbf{A})^T. \quad (29)$$

S obzirom da se ovde ocenjuje matrica \mathbf{H} , koja je dobijena iz matrice \mathbf{B} , to znači da profili sadržani u matrici \mathbf{B} ne moraju da budu jednaki, već samo njihovi unakrsni proizvodi. Implikacija ovog razmatranja u fluorescentnoj spektroskopiji je da ekscitacioni profili, sadržani u

matrici \mathbf{A} i koncentracioni profili, sadržani u matrici \mathbf{C} , ostaju nepromenjeni, ali emisijski profili ne moraju biti isti u svim submatricama. Na Slici 9 data je grafička reprezentacija PARAFAC2 modela.



Slika 9. Grafička reprezentacija PARAFAC2 modela

Ukoliko profili u k -tom modu mogu biti definisani tako da je $\mathbf{B}_k = \mathbf{P}_k \mathbf{B}$, tada važi da je $\mathbf{B}_k^T \mathbf{B}_k = (\mathbf{P}_k \mathbf{B})^T (\mathbf{P}_k \mathbf{B}) = \mathbf{B}^T \mathbf{B}$, jer je \mathbf{P}_k ortonormirana matrica po kolonama ($\mathbf{P}_k^T \mathbf{P}_k = \mathbf{I}$). U tom slučaju PARAFAC2 model se može zapisati na sledeći način:

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{A} \mathbf{D}_k \mathbf{B}_k^T = \mathbf{A} \mathbf{D}_k (\mathbf{P}_k \mathbf{B})^T. \quad (30)$$

Iz modela specificiranog u (28) se može videti koje vrste devijacija od PARAFAC modela mogu biti obuhvaćene PARAFAC2 modelom.

1.3.3. Tucker modeli

Ovi modeli su predloženi od strane Ledyard Tucker-a, jednog od pionira u multi-modalnoj analizi, a danas su poznati i pod imenom N -modalna analiza glavnih komponenti.

PARAFAC model je uveden uopštavanjem dekompozicije singularnih vrednosti. Matrica $\mathbf{X}(I \times J)$, sa tipičnim elementom x_{ij} , bazirana na redukovanoj dekompoziciji singularnih vrednosti, može biti zapisana na sledeći način:

$$x_{ij} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} g_{ff} + e_{ij} = \mathbf{A}\mathbf{G}\mathbf{B}^T; \quad i = 1, \dots, I; j = 1, \dots, J \quad (31)$$

gde su $\mathbf{A}(I \times F)$ i $\mathbf{B}(J \times F)$ ortogonalne matrice, a $\mathbf{G} = \text{diag}(g_{11}, \dots, g_{ff})$ dijagonalna matrica singularnih vrednosti ili jezgro-matrica koja sadrži F najvećih singularnih vrednosti poređanih u opadajućem poretku. Kao i u svim modelima, e_{ij} predstavlja rezidual, odnosno nesistematski deo varijacije. Dalje, moguće je uopštavanje modela specificiranog u jednačini 29, uvođenjem nedijagonalne jezgro-matrice $\tilde{\mathbf{G}}$:

$$x_{ij} = \sum_{d=1}^D \sum_{e=1}^E a_{id} b_{je} \tilde{g}_{de} + e_{ij}; \quad i = 1, \dots, I; j = 1, \dots, J \quad (32)$$

ili u matricnoj notaciji

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}\tilde{\mathbf{G}}\mathbf{B}^T + \mathbf{E} \quad (33)$$

Za razliku od modela 31, ovaj model ne zahteva isti broj komponenti u matricama \mathbf{A} i \mathbf{B} ¹⁶. Postoje tri TUCKER modela: Tucker1, Tucker2 i Tucker3 model, pri čemu su prva dva modela specijalni slučajevi Tucker3 modela. Zbog ovoga će najpre biti razmotrena struktura Tucker3 modela, koja može biti zapisana na sledeći način:

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}\mathbf{G}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T + \mathbf{E} \quad (34)$$

U strukturnom modelu 40, matrica $\mathbf{X}(I \times JK)$ odgovara razmotranom tenzoru $\underline{\mathbf{X}}(I \times J \times K)$. Ovaj model omogućava ekstrahovanje različitog broja faktora u svakom modu.

1.4. Spektroskopija

U poslednjih nekoliko decenija, došlo je do značajnog porasta upotrebe spektroskopskih tehnika, kako u industriji, tako i u naučnim istraživanjima. Za ovaj porast su zaslužna dva razloga:

- i) opšte znanje o spektroskopiji je poraslo, kao i upotreba primenjene matematike u analiziranju spektroskopskih podataka i
- ii) spektroskopske metode su uopšteno brže i neinvazivnije u odnosu na tradicionalne metode (na pr., ekstrakcija, titracija i dr.). Zamena ovih tradicionalnih metoda se pokazala vrlo korisnom u mnogim oblastima, na pr., procesna industrija¹⁷, farmaceutska industrija¹⁸, biohemija^{19,20}, nauka o hrani²¹, nauka o životnoj sredini²².

Spektroskopija je uglavnom korišćena za ispitivanje karakteristika čvrstih uzoraka. Kasnije je uočen linearni trend između intenziteta spektroskopskih signala i koncentracije rastvorenih analita u uzorku. Ova povezanost je omogućila izgradnju modela za predikciju koncentracije analita u uzorcima, baziranih na promeni amplitude signala registrovanog na jednoj talasnoj dužini (talasnom broju) u zavisnosti od koncentracije analita. S druge strane, registrovanje signala na samo jednoj talasnoj dužini (broju), ne može dati uvid u njegovu kompleksnost i može rezultirati lošom predikcijom ukoliko nekoliko fenomena doprinosi amplitudi signala. Spektroskopske tehnike mogu biti proširene registrovanjem amplitude nekoliko pikova, što dovodi do porasta količine ekstrahovanih informacija. Dalji razvoj spektroskopskih metoda je vodio ka razdvajanju (gasna hromatografija) i identifikaciji različitih analita u smeši (infracrvena spektroskopija).

Dakle, može se reći da je spektroskopija naučna disciplina koja proučava interakciju različitih vrsta elektromagnetnog zračenja sa materijom. Ova interakcija zavisi od energije zračenja (talasne dužine), vrste i količine atoma i molekula koji su prisutni u uzorku i od matriksa, t.j. mikrokruženja individualnih molekula. Analizom odgovora, registrovanog od uzorka pod zračenjem, na specifičnoj talasnoj dužini, može se zaključivati o fizičkim i hemijskim osobinama uzorka, odnosno može se uraditi kvalitativna i kvantitativna analiza.

1.4.1. Fluorescentna spektroskopija

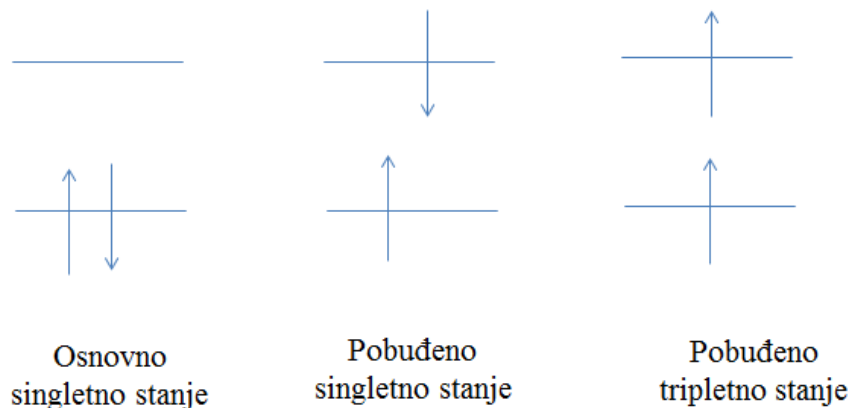
Teorijske osnove

Najveći deo ove teze bazira se na primeni fluorescentne spektroskopije u ispitivanju kvantnih tačaka i proteina. Zbog toga će se ovaj odeljak baviti osnovnim principima ove spektroskopske tehnike. Ukoliko se molekul izloži zračenju, dolazi do apsorpcije zračenja i on prelazi u pobuđeno stanje. Količina apsorbovane svetlosti je proporcionalna koncentraciji apsorbujuće molekulske vrste i može se opisati Lamber-Berovim zakonom:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon cl \quad (35)$$

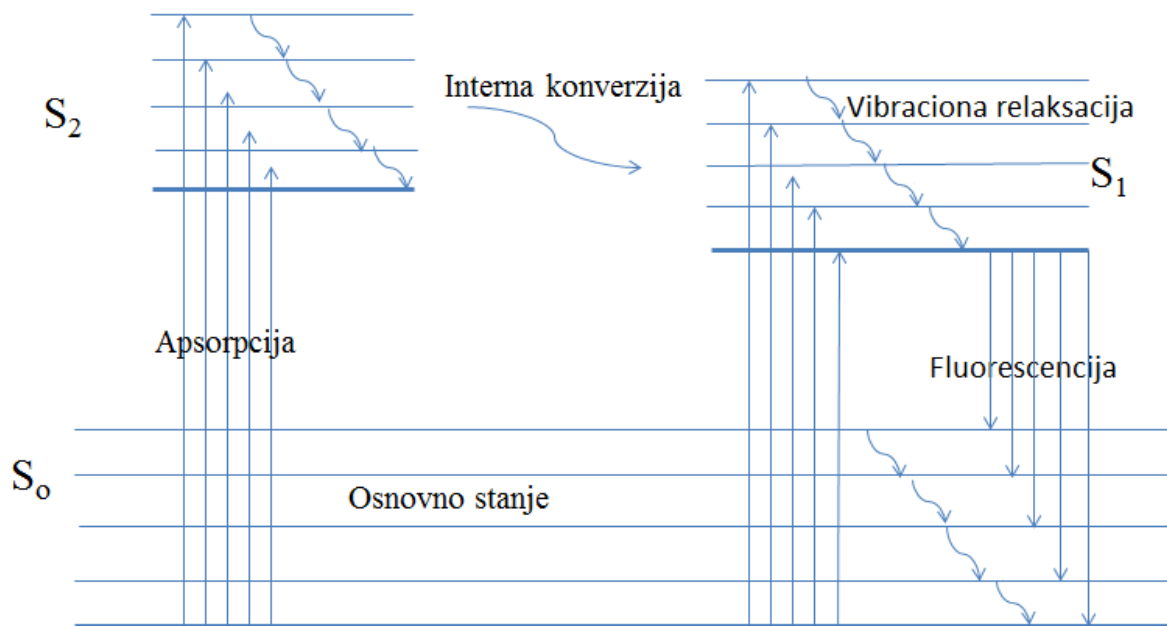
gde je A apsorbanacija, I_0 i I su intenziteti upadnog i propuštenog zračenja, ϵ je molarna apsorptivnost izražena u $\frac{L}{mol \cdot cm}$, c je koncentracija u $\frac{mol}{L}$, a l je debljina kivete u cm . Apsorpcioni spektar se dobije merenjem intenziteta apsorbovane svetlosti na više talasnih dužina. Za razliku od fluorescencije, apsorbanacija se bavi samo tranzicijom molekula iz osnovnog u pobuđeno stanje.

Fluorescencija je jedna od tri luminiscentne metode koje se koriste u spektroskopiji. Ostale dve metode su fosforescencija i hemiluminiscencija. Fluorescencija i fosforescencija se razlikuju u spinu elektrona u pobuđenim nivoima molekula. U osnovnom stanju, upareni elektron ima dva moguća ekscitaciona nivoa. Pobuđeni elektron u fluorescenciji je uparen sa drugim elektronom u osnovnom stanju i on se vrlo brzo vraća ($\sim 10^{-8}$ s, Slika 10) u osnovno stanje, spin-dozvoljenim prelazom. Kod fosforescencije, pobuđeni elektron ima isti spin kao elektron u osnovnom stanju i njegova tranzicija u osnovno stanje se dešava relativno sporo (uglavnom od 1ms do 1s).



Slika 10. Osnovno i dva moguća pobuđena elektronska stanja

Kada se elektron pobudi, apsorbovanjem fotona energije iz UV-VIS opsega, on prelazi u pobuđeno stanje, S_1 ili S_2 . Ukoliko je molekul prešao u stanje S_2 , on se relaksira kroz internu konverziju i vibracionu relaksaciju, u najniži relaksacioni nivo pobuđenog stanja S_1^{23} . Ova relaksacija traje $\sim 10^{-12}$ s. Nakon ovoga, elektron se vraća u osnovno stanje S_0 uz emitovanje energije, a zatim prelazi u njegov najniži nivo kroz seriju vibracionih relaksacija. Samo energetska razlika između pobuđenog i osnovnog stanja, ima dovoljan intenzitet (energiju) da bi bio detektovan fluorescentnom spektroskopijom. Ceo proces može biti grafički prezentovan Jablonski dijagramom (Slika 11).

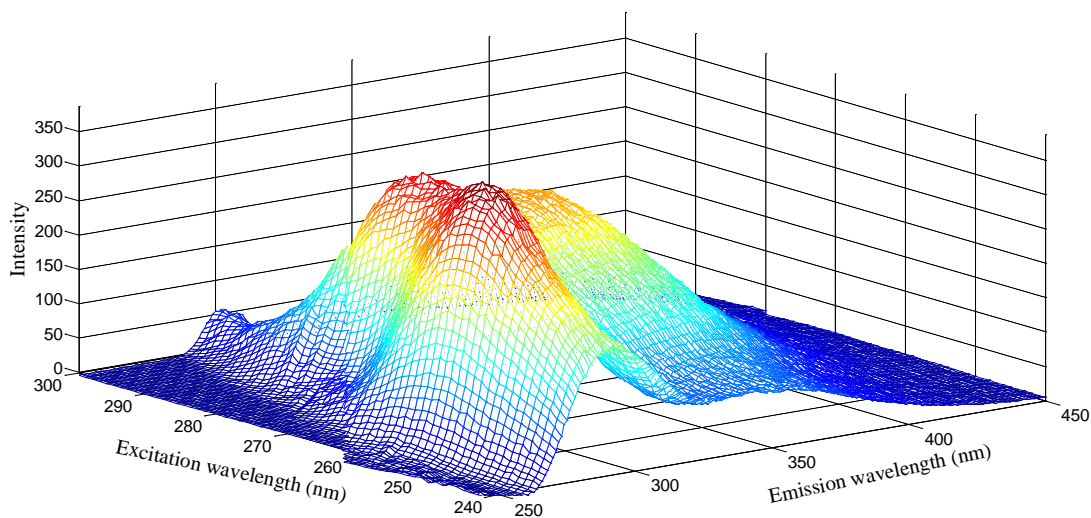


Slika 11. Jablonski dijagram fenomena fluorescencije. Molekuli koji su pobuđeni prelaze iz osnovnog stanja S_0 u jedno od pobuđenih stanja S_1 ili S_2 , a fluorescencija se događa relaksacijom molekula iz S_1 u osnovno stanje.

Energija emisije je niža od energije ekscitacije, što znači da će talasna dužina na kojoj se događa emisija biti veća od ekscitacione talasne dužine. Razlika u ovim talasnim dužinama se naziva Stoksov pomeraj. Pobuđivanje do različitih singletnih stanja i do njihovih različitih vibracionih nivoa događa se na specifičnim ekscitacionim talasnim dužinama. Tranzicije do različitih singletnih stanja ($S_0 \rightarrow S_1$, $S_0 \rightarrow S_2$) i do različitih vibracionih nivoa singletnih stanja (Jablonski dijagram), se reflektuju kao „šiljci” na vrhu ekscitacionog spektra. Ovo razmatranje upućuje na zaključak da su ekscitacioni i apsorpcioni spektri jedne molekulske vrste identični. Emisija se uvek događa sa najnižeg singletnog stanja S_1 , u osnovno stanje S_0 ; to je razlog zašto emisijski spektar uvek ima samo jedan pik, koji može biti simetričan ili asimetričan. Ukoliko u emisijskom spektru postoje „šiljci”, to znači da je došlo do tranzicije do viših vibracionih nivoa S_0 . Kako je emisijski spektar rezultat tranzicije iz S_1 u S_0 stanje, a ekscitaciono/apsorpcioni podrazumeva tranziciju iz S_0 u S_1 , to će se ovi spektri odnositi kao predmet i lik u ogledalu²³. Kao konsekvencija ovih razmatranja, može se zaključiti da emisijski spektri određene fluorofore, registrovani na raznim ekscitacionim talasnim dužinama, mogu varirati samo u intenzitetu, dok

njihove pozicije i oblik ostaju nepromenjeni. Važi i da je ekscitacioni spektar nezavisan od emisije.

Emisioni spektar se dobija kada se registruje emitovana svetlost u nekom intervalu talasnih dužina, na fiksiranoj ekscitacionoj talasnoj dužini. Ekscitacioni spektar date fluorofore se određuje na sličan način, praćenjem emisije na talasnoj dužini maksimalnog intenziteta, dok se fluorofora pobuđuje kroz interval talasnih dužina. Kada se uzorci izlože seriji ekscitacionih talasnih dužina i kada se signal emisije registruje na više talasnih dužina, tada podaci mogu biti aranžirani u obliku ekscitaciono-emisione matrice (EEM). Grafička ilustracija jedne takve matrice data je na Slici 12.



Slika 12. Grafički prikaz ekscitaciono-emisione matrice uzorka koji sadrži triptofan, fenilalanin i tirozin⁴

Samo manji broj molekula podleže fluorescenciji, a u slučaju proteina fluorescencija potiče od dela molekula koji mu daje osobinu fluorescentnosti. Molekuli ili delovi molekula koji fluoresceiraju se nazivaju fluorofore. Fluorescencija se uglavnom događa kod aromatičnih molekula, molekula sa konjugovanim dvostrukim vezama ili sličnih rigidnih struktura, koje sprečavaju relaksaciju kroz torzionu energiju. Uobičajeni primeri fluorofora su aromatične amino kiseline, tirozin, fenil alanin i triptofan, pri čemu je triptofan najzaslužniji za fluorescenciju

⁴ Podaci su preuzeti sa <http://www.models.life.ku.dk/datasets>

proteina. Razvoj fluorescentne spektroskopije doveo je do upotrebe novih fluorescentnih sonda, koje se mogu svrstati u jednu od sledećih klasa:

- organske boje: fluorescein je sintetička organska boja i jedna od prvih komponenti korišćenih u biološkim istraživanjima, a njegovi derivati (fluorescein izotiocijanat i rodamin) su, zbog male veličine korišćeni za povezivanje sa biološkim strukturama (antitelima, biotinom, avidinom i dr.), bez interferiranja sa njihovim biološkim funkcijama²⁴.
- biološke fluorofore: one su prvi put korišćene devedesetih godina prošlog veka, kada je zeleni fluorescentni protein, koji je izolovan iz meduze *Aequorea victoria*, primenjen kao „reporter“ ekspresije gena²⁵. Od tada, mnogi derivati ovog proteina, kao i fikobiliproteini (alofikocianin, fikocianin, fikoeritrin i fikoeritrocianin), su dizajnirani za upotrebu u biološkim sistemima, kao sami ili fuzionisani sa proteinom od interesa. Prednost bioloških fluorofora je što one mogu biti korišćene u bakterijama, ćelijama, organima ili celim organizmima. Biološke fluorofore nemaju istu fotostabilnost kao sintetičke fluorescentne boje i mogu menjati funkciju bioloških procesa od interesa. Od bioloških fluorofora treba pomenuti koenzime NAD(P)H i FAD, kao i određene vitamine (A, B, D i E)²⁶,
- kvantne tačke: su poluprovodni nanokristali sa jedinstvenim optičkim i hemijskim osobinama, koje ih čine interesantnim fluorescentnim alatom za *in vitro* i *in vivo* ispitivanja, a mogu se koristiti i kao biološki senzori. Za njihovu primenu u biološkim fluidima i vodenim sredinama, neophodno je učiniti ih rastvorljivim, što se postiže obmotavanjem sa raznim polimerima i vezivanjem raznih funkcionalnih grupa²⁷. Kvantne tačke imaju veličinu od 2 do 50 nm. Veličina kvantne tačke može da utiče na njihovu emisiju, pri čemu manje kvantne tačke emituju na većim energijama.

Moderni fluorescentni spektrometri mogu da prebrojavaju pojedinačne fotone, dok tradicionalni instrumenti pretvaraju svetlosni puls u analogni električni signal. Obe metode mogu da detektuju nekoliko fotona, što fluorescentnu spektroskopiju čini 100 do 1000 puta osetljivijom u poređenju sa ostalim spektroskopskim tehnikama. Fluorescencija može poticati od fluorofora samog biološkog uzorka (autofluorescencija) ili od vezanih specifičnih molekula dodatih u uzorak pre merenja. U molekularnoj biologiji se češće koriste vezane fluorofore, jer mogu da posluže kao biomarkeri²⁸.

Na intenzitet fluorescencije mogu da utiču razni faktori, kao na pr., lokalno okruženje fluorofore, pH-vrednost, temperatura, koncentracija i polarnost rastvarača. Polarni rastvarači smanjuju dipolni momenat, a time i energiju između dva stanja, što dovodi do povećanja emisije talasne dužine (crveni pomeraj). Ovo je važno ne samo kada se meri fluorescencija fluorofore u različitim rastvaračima, nego i kada se meri fluorescencija makromolekula, na pr. proteina, čija fluorescencija potiče od triptofana na različitim pozicijama. Triptofanski ostaci locirani u unutrašnjosti proteina i oni koji se nalaze na njegovom spoljašnjem delu, imaju različita okruženja, koja mogu uticati na njihove emisione maksimume, što u krajnjoj liniji može značiti i mogućnost njihove diskriminacije. Intenzitet fluorescencije zavisi i od ukupne apsorpcije uzorka, odnosno od koncentracije fluorofore, kao i od ostalih apsorbujućih supstanci u uzorku. Na niskim koncentracijama, intenzitet fluorescencije se pokorava Lamber-Berovom zakonu. U slučaju koncentrovanijih uzoraka, može doći do reapsorpcije od strane uzorka (koncentraciono gašenje ili unutrašnji filter-efekat), čime se fluorescencija može smanjiti ili čak ugasiti. Ova reapsorpcija narušava linearnu vezu između intenziteta fluorescencije i koncentracije, što znači da u tom slučaju ne važi Lamber-Berov zakon. Koncentraciono gašenje može biti samnjeno ili uklonjeno, bilo razblaživanjem uzorka, bilo smanjenjem dužine apsorpcionog puta. Za visoko koncentrovane, neprozirne ili čvrste uzorke, kao što su krv, žive ćelije, polimerni filmovi i dr., „front face” fluorescencija nudi mnoge prednosti u kvantitativnim i kvalitativnim ispitivanjima. Ukoliko se merenje sprovodi pod uglom od 90^0 (prav ugao), emisijski spektri mogu biti iskrivljeni. Ovaj problem se takođe rešava „front face” tehnikom, jer se ekscitaciona svetlost fokusira na prednju površinu uzorka i sa istog regiona se registruje emitovana svetlost pod uglom koji minimizira reflektovanu i rasutu svetlost.

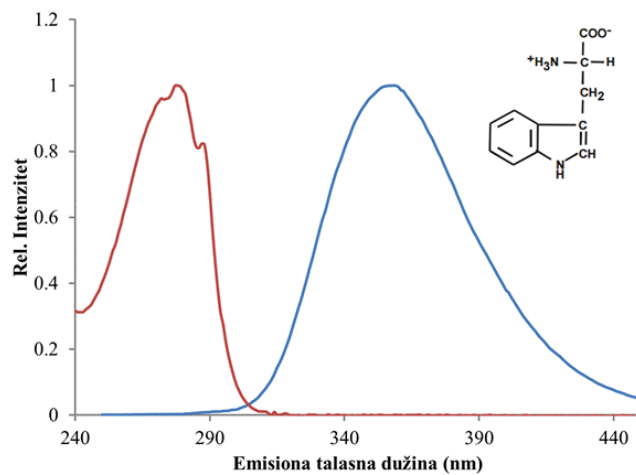
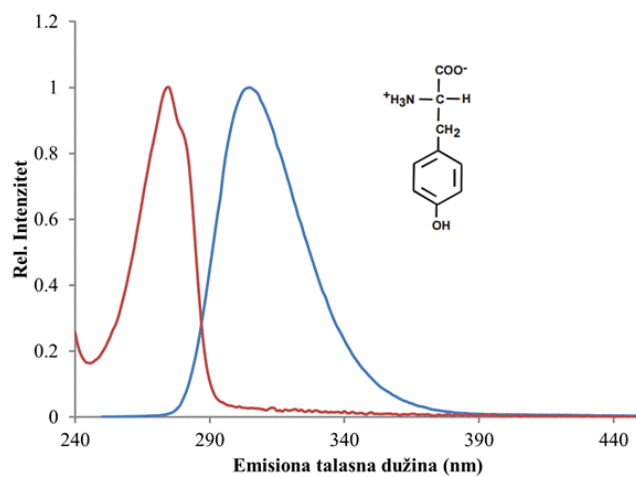
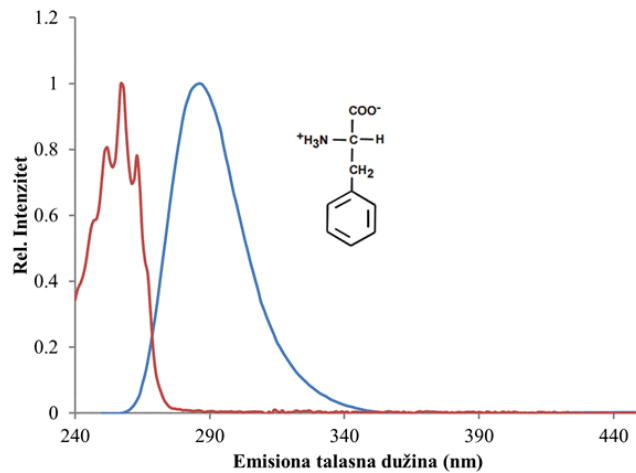
1.4.1.1. Fluorescencija proteina

Proteini su biomolekuli izgrađeni od jednog ili više polipeptida, koji mogu imati globularnu ili vlaknastu formu, neophodnih za biološku funkciju, rast i održavanje živih sistema. Za razliku od većine bioloških struktura koje ne pokazuju fluorescenciju (lipidi, membrane i saharidi) ili je pokazuju u vrlo slaboj meri (DNK), proteini su jedinstveni u pogledu fluorescencije. Fluorescencija proteina je kompleksna, ali značajan napredak je ostvaren u poslednje dve decenije. Fluorescencija proteina potiče od tri aromatične amino kiseline:

triptofana, tirozina i fenilalanina⁵, pri čemu je triptofan dominantna unutrašnja fluorofora i vrlo slabo je zastupljen u proteinima. Ova tri amino kiselinska ostatka imaju razdvojene apsorpcije i emisije i različite kvantne prinose. Njihovi emisioni i apsorpcioni spektri su prikazani na Slika 13, a u Tabeli 3 su prikazani njihovi fluorescentni parametri. Fluorescencija tirozina može biti ugašena prisustvom bliskih triptofanskih grupa preko rezonantnog transfera energije, a takođe i jonizacijom njegove aromatične hidroksilne grupe. Fenilalanin pokazuje vrlo slabu fluorescenciju i on može biti registrovan samo u odsustvu tirozina i triptofana. Dakle, zbog činjenice da triptofan pokazuje veću apsorptivnost, veći kvantni prinos i rezonantni transfer energije (energija apsorbovana od strane tirozina i fenilalanina, je često transferovana na triptofanske ostatke), fluorescentni signal proteina potiče uglavnom od triptofana. Proteini uglavnom sadrže jedan ili nekoliko triptofanskih ostataka što olakšava interpretaciju spektralnih podataka, jer kada bi svih 20 amino kiselina pokazivalo fluorescenciju, tada bi emisioni spektri proteina bili jako kompleksni. Korisna karakteristika fluorescencije proteina je visoka osetljivost triptofana na njegovo mikrokruženje. Promene u emisionim spektrima triptofana se često događaju usled konformacionih tranzicija, asocijacije subjedinica, vezivanja supstrata ili denaturacije. Ove interakcije mogu uticati na mikrokruženje indolskog prstena. Dalje komplikovanje fluorescencije proteina može nastati zbog prisustva više fluorescentnih aminokiselinskih ostataka, koji se mogu naći u različitim okruženjima i što može rezultovati njihovim različitim spektralnim osobinama. Fluorescentne osobine triptofana zavise i od polarnosti rastvarača. Manje polarni rastvarači pomeraju emisioni spektar ka kraćim talasnim dužinama i povećavaju intenzitet emisije. Triptofanski ostaci „ugnježdjeni” u hidrofobni domen proteina, pokazuju pomeranje emisionog pika za 10 do 20 nm. Ovaj fenomen može biti vrlo koristan u proučavanju denaturacije proteina²³.

Apsorpcioni i emisioni spektri triptofanskih ostataka se preklapaju, zbog čega je teško razdvojiti spektralni doprinos svake rezidue posebno. Apsorpcija triptofana je uslovljena $\pi \rightarrow \pi^*$ tranzicijom u indolnom prstenu, pri čemu kratkotalasna apsorpcija na 220 nm nastaje zbog 1B_b tranzicije, dok apsorpcija na 260-290 nm nastaje usled dve preklapljene (izoenergetske) tranzicije 1L_a i 1L_b . Ove elektronske tranzicije pokazuju posebne apsorpcione, emisione i anizotropne spektre, kao i različitu osetljivost na polarne rastvarače. Isto tako, prisustvo ova dva

⁵ Aminokiseline se obično označavaju troslovnim ili jednoslovnim skraćenicama: tirozin (tyr, Y), triptofan (trp, W), i fenilalanin (phe, F).



Slika 13. Emisioni spektri (plavo) i apsorpcioni spektri (crveno): fenilalanina (gore), tirozina (u sredini) i triptofana (dole)

Tabela 3. Fluorescentne karakteristike aromatičnih amino kiselina

| Amino kiselina | Apsorpcija | | Emisija | |
|----------------|---------------------|---------------|---------------------|-----------------------------|
| | Talasna dužina (nm) | Apsorptivnost | Talasna dužina (nm) | Kvantni prinos ⁶ |
| Triptofan | 280 | 5600 | 348 | 0.20 |
| Tirozin | 274 | 1400 | 303 | 0.14 |
| Fenilalanin | 257 | 200 | 282 | 0.04 |

izoenergetska stanja, čine triptofanski ostatak kompleksnom fluoroforom, što rezultuje velikom osetljivošću triptofana na mikrookruženje. Za razliku od triptofana, tirozin je neosetljiv na mikrookruženje jer se njegova emisija događa sa jednog elektronskog stanja. Ova osetljivost triptofana na polarnost i mikrookruženje, čini da fluorescentni signal triptofana predstavlja važnu alatku u proučavanju strukture i dinamike proteina.

Spektralne osobine triptofana su kompleksne čak i u peptidima, koji se proučavaju radi boljeg razumevanja emisije triptofana u proteinima²⁹. Mogućnost različite orijentacije amino i karboksilne grupe u odnosu na indolni prsten, omogućava postojanje rotamera (rotacionih konformacionih izomera) i oni mogu fluorescentne spektre proteina učiniti kompleksnijim. Spektralne osobine proteina čak i sa jednim triptofanskim ostatkom, mogu biti dosta varijabilne, zbog prisustva „gasioca” u proteinima. Skoro sve polarne grupe mogu biti gasioci. Asparaginski i glutaminski ostaci efektivno gase fluorescenciju triptofana u neutralnom stanju, dok su lizinski i argininski ostaci, gasioci u naelektrisanom stanju. Histidin na nižim pH vrednostima gasi, fluorescenciju formiranjem kompleksa sa indolskim prstenom. Osim navedenih, kao gasioci su se pokazale i peptidne grupe. U proteinima koji sadrže hem, može doći do transfera energije i gašenja fluorescencije, jer dolazi do spektralnog preklapanja emisije triptofanskih ostataka i apsorpcije hema. Ovaj efekat komplikuje analizu proteinske fluorescencije, ali s druge strane može biti jako koristan u ekstrakciji strukturnih informacija. Na pr, u membranama citohroma *b₅*, gašenje triptofanske fluorescencije (Trp-109) hemom, se može iskoristiti za ocenu distribucije distanci između dva domena u proteinu³⁰. Slabljenje fluorescentnog signala triptofana se ne može opisati jednom eksponencijalnom krivom, već je uočeno da triptofan ima dva poluvremena opadanja, od 0.5 i 3.1 ns, kada se nalazi u obliku cviter jona u vodenom rastvoru na sobnoj temperaturi³¹.

⁶ Kvantni prinos je definisan kao odnos broja emitovanih i apsorbovanih fotona.

1.4.1.1.1. Spektralne klase triptofanskih ostataka

Pozicija maksimuma emisijih spektara triptofana može varirati od 307 do 353 nm i na osnovu modela diskretnih stanja, postoji pet najverovatnijih spektralnih formi triptofanskih ostataka³²: spektralna forma *A*, *S*, *I*, *II* i *III*. Formiranje ekscipleksa (kompleksa u pobuđenom stanju) i naknadna dipolna relaksacija, mogu dovesti do crvenog pomaka emisije.

Spektralna forma A, odgovara emisiji indolske hromofore u ekstremno nepolarnom mikrookruženju unutar proteinske globule. Ova spektralna forma je primećena kod azurina, malog globularnog proteina koji može da vezuje metale (bakar) i sadrži jedan triptofanski ostatak. Ova spektralna forma ima ekstremni plavi pomak (307 nm) i poseduje izrazite vibracione strukture.

Spektralna forma S, odgovara emisiji indolske hromofore locirane u relativno nepolarnom okruženju unutar proteinske globule, koja formira 1:1 ekscipleks sa određenim polarnim proteinskim grupama. Ova spektralna forma ima maksimum emisije na 316-317 nm i „ramena” na 305-307 nm i 320-330 nm.

Spektralna forma I, odgovara emisiji indolske hromofore locirane u polarnom, ali rigidnom okruženju unutar proteinske globule, a nastaje formiranjem 2:1 ekscipleksa sa dve susedne polarne proteinske grupe. Ova spektralna forma ima maksimum emisije na 330 nm, sa poluširinom od 50 nm, a za razliku od spektralnih formi *A* i *S*, ne pokazuje vibracionu strukturu. Ova spektralna forma je uočena kod aktina, himotripsina i melitina.

Spektralna forma II, odgovara emisiji indolske hromofore na površini proteina, koja je u kontaktu sa vodom i ostalim polarnim grupama. Ova spektralna forma ima crveni pomak u odnosu na spektralnu formu *I*, maksimum emisije na 340 nm, sa poluširinom od 55 nm. Ova spektralna forma je uočena kod humanog serum albumina i miozina.

Spektralna forma III, korespondira emisiji indolske hromofore locirane na površini proteina i koja je u kontaktu sa slobodnim molekulima vode. Ima maksimum emisije na 350 nm

sa poluširinom od 60 nm i od svih spektralnih formi, spektar ove forme najviše liči na spektar slobodnog triptofana³³.

1.4.2. FTIR spektroskopija

William Hershel je 1800. godine otkrio nevidljivu formu svetlosti izvan vidljivog opsega, koja se danas naziva infracrveno zračenje (infra=ispod, na latinskom). Infracrvena, bliska infracrvena spektroskopija i Ramanska spektroskopija, se jednim imenom nazivaju vibraciona spektroskopija. Infracrveni talasi su elektromagnetni talasi u regionu od 4000 do 200 cm^{-1} , NIR talasi pripadaju regionu od 13000 do 4000 cm^{-1} i korespondiraju vibracijama hemijskih veza. Ovi talasi imaju energiju u opsegu od 8-40 kJ/mol. Za dalji razvoj vibracione spektroskopije u infracrvenom regionu i interpretaciju IR spektara, zaslužna je kvantna teorija. Furijeovi transformacioni spektrometri su uvedeni 1980. godine i značajno su smanjili vreme analize, a u isto vreme su razvijena i optička vlakna koja su omogućila snimanje NIR spektara u realnom vremenu.

IR i NIR spektroskopija su bazirane na merenju apsorpcije (A) ili transmitancije (T) u funkciji talasnog broja ($\bar{\nu}$) i mogu se opisati Bouguer-Beer-Lambert-ovim zakonom:

$$A(\bar{\nu}) = -\log_{10} T(\bar{\nu}) = a(\bar{\nu})bc \quad (36)$$

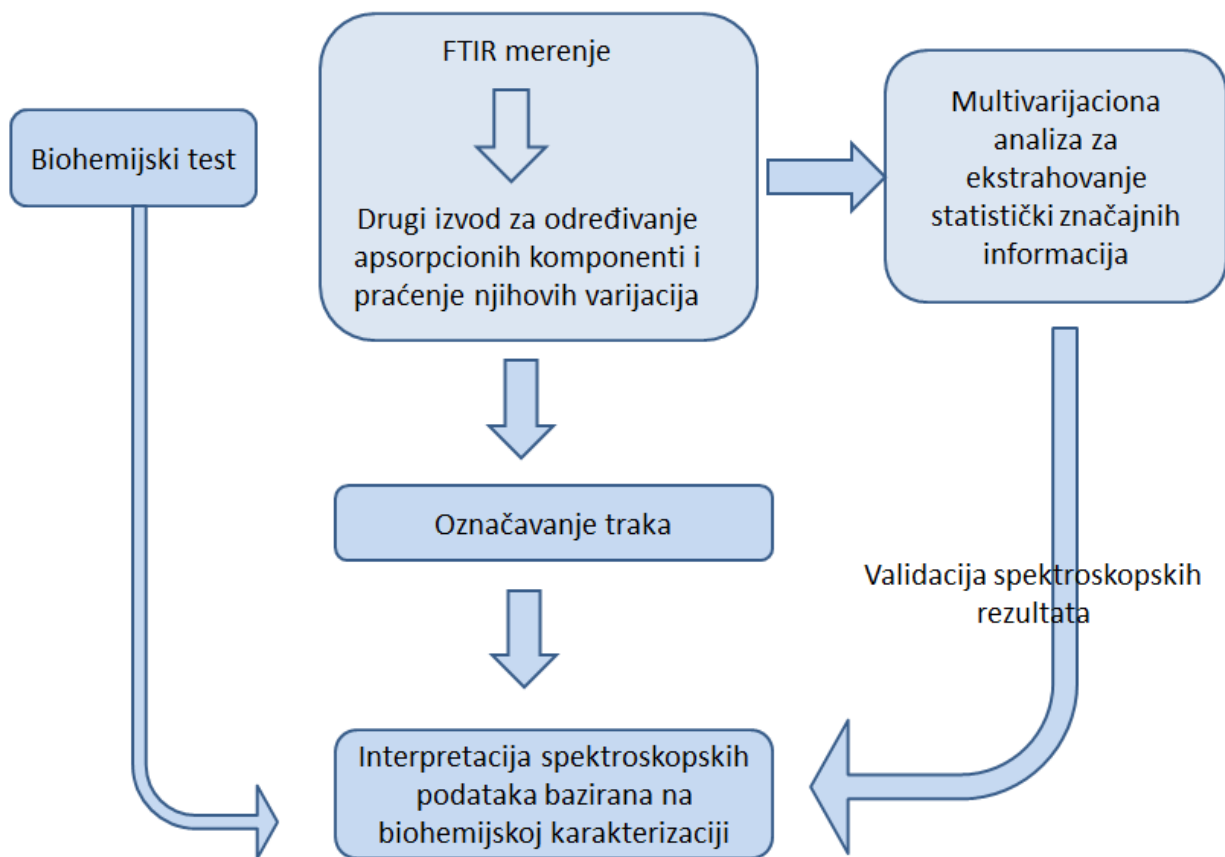
gde je a apsorpcioni koeficijent, b dužina apsorpcionog puta i c koncentracija. Ukoliko je u rastvoru prisutno n apsorbujućih vrsta, tada se totalna apsorpcija može izraziti na sledeći način³⁴:

$$A(\bar{\nu}) = \sum_{i=1}^n a_i(\bar{\nu})bc_i \quad (37)$$

Kao što je već rečeno, energija infracrvenog zračenja odgovara vibracijama hemijskih veza i kada se frekvencija upadnog zračenja poklopi sa frekvencijom veze prisutne u uzorku,

dolazi do apsorpcije zračenja. Registrovanjem apsorbovanog zračenja na talasnim brojevima koji odgovaraju IR opsegu, dobija se infracrveni spektar. Ramanski spektri pokrivaju isti region kao i IR spektri, ali njihove trake imaju različit intenzitet. Apsorpcija IR zračenja nastaje usled interakcije zračenja sa monohromatskog izvora i hemijske veze koja je prisutna u uzorku, a do apsorpcije može doći jedino ukoliko se zbog sopstvene vibracije ili rotacije, menja dipolni moment molekula. Drugim rečima, apsorpcija nastaje kada se frekvencija upadnog zračenja poklopi sa frekvencijom prirodne vibracije molekulske veze. Frekvencija koja odgovara vibracionim energijama kovalentnih veza zavisi od mase atoma i jačine veze. Specifične vibracione frekvencije veza mogu biti delimično objašnjene kao harmonijski oscilator: viša vibraciona frekvencija nastaje u slučaju jačih veza i u slučaju veće razlike u masi vibrirajućih atoma.

FTIR spektroskopija je neinvazivna tehnika koja je vrlo interesantna u biologiji i medicini, jer se uspešno može primeniti ne samo na proučavanje strukturnih osobina izolovanih biomeolekula, kao što su proteini, nukleinske kiseline, lipidi i ugljeni hidrati, već i na karakterizaciju kompleksnih bioloških sistema, na pr., netaknutih ćelija^{35,36}, tkiva i celih model-organizama (na pr. nematode *Caenorhabditis elegans*)³⁷. FTIR mikrospektroskopija, dobijena kuplovanjem infracrvenog mikroskopa i FTIR spektrometra, omogućava snimanje IR spektara izabranih uzoraka sa površine reda veličine mikrona, kada se koriste konvencionalni IR izvor i detektor, a sa specijalizovanim i osetljivim detektorima i sinhotronim izvorom svetlosti, moguće je snimiti spektar oblasti od nekoliko mikrometara. Na taj način, FTIR mikrospektroskopija omogućava dobijanje informacija o biološkim procesima *in situ*, na pr., diferencijaciji matičnih ćelija^{38,39,40}, reprogramiranju somatskih ćelija³⁵, nastanku i progresiji kancera^{41,42,43,44} i dr., kao i dobijanje informacija ne samo iz pojedinih ćelija, nego i iz subćelijskih struktura⁴⁵. Na Slici 14 data je šema upotrebe FTIR spektroskopije u proučavanju kompleksnih bioloških sistema



Slika 14. Šema upotrebe FTIR spektroskopije u proučavanju kompleksnih bioloških sistema. Drugi izvod se koristi za povećanje rezolucije zbog problema preklapanja apsorpcionih komponenti i praćenja njihove varijacije. Spektroskopski rezultati se analiziraju pogodnom multivarijacionom tehnikom kako bi se proverili specifični markeri traka ispitivanih procesa. Interpretacija spektroskopskih podataka treba da bude potvrđena standardnim biohemijskim testovima

Glavna prednost FTIR mikrospektroskopije je mogućnost proučavanja izabраниh oblasti (površina) uzorka koji se ispituje, što je vrlo korisno kod sistema koje odlikuje unutrašnja heterogenost, kao što su biološki sistemi. Nedostatak FTIR spektroskopije je jaka apsorpcija vode jer njena traka može preklopiti trake od interesa.

2. CILJ RADA

Ova teza se fokusira na primeni hemometrijskih metoda u dekompoziciji fluorescentnih i FTIR spektara, dobijenih snimanjem uzoraka nanočestica, proteina i bioloških uzoraka. Hemometrijske metode koje su korišćene u cilju dekompozicije spektralnih podataka su: multivarijaciona rezolucija krivih, analiza glavnih komponenti i paralelna faktorska analiza: PARAFAC.

Pomenute hemometrijske metode su korišćene u analizi fluorescentnih spektara različitih vrsta nanočestica u cilju:

- i) karakterisanja nanočestica (kvantnih i karbonskih tačaka) koje se mogu upotrebiti kao senzori za detekciju i kvantifikaciju jona metala (kadmijum, srebro),
- ii) karakterisanja nanočestica koje su predložene za detekciju otisaka prsta,
- iii) određivanja broja frakcija u smeši nanočestica (kvantnih tačaka) različite veličine i određivanje njihovog prečnika.

Fokus ove teze biće i analiziranje i upoređivanje FTIR spektara uzoraka ćelija divljeg tipa *Arabidopsis Thaliana*, sa ćelijama *cad-c cad-d* mutanta, u cilju proučavanja strukturnih promena ćelijskog zida, koje nastaju usled mutacija u biosintezi njegovih konstitutivnih polimera. Rezultati analize FTIR spektara će biti upotrebljeni i za ispitivanje hemijskih razlika između ovih tipova *Arabidopsisa*, odnosno razlika u nanostrukturnim karakteristikama njihovih ćelijskih zidova. Takođe, cilj je i da se ispita da li fiber i ksilem različito utiču na ove razlike.

Takođe, jedan od ciljeva biće primena hemometrijskih metoda u praćenju strukturnih prelaza kod proteina izazvanih određenim poremećajem, pomoću fluorescentne spektroskopije. Konkretnije biće ispitana konformaciona promena goveđeg serum albumina, vezivanjem sa ATP-om.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Sinteza, prečišćavanje i funkcionalizacija ZnS kvantnih tačaka

Kvantne tačke, koje su korišćene kao senzori za detekciju i kvantifikaciju kadmijuma, su sintetizovane po sledećoj proceduri: pomešano je 2,5 ml 0.1 mol dm⁻³ zink(II)-acetata, sa 25 ml cisteina i 0.02 M merkapto-sirćetne kiseline. Nakon 15 min mešanja, dodata su 4 ml 0.01 M MnCl₂ i mešanje je nastavljeno još jedan sat. Prethodno je pH vrednost rastvora podešana na 11 pomoću 1 mol dm⁻³ rastvora NaOH, a zatim je, uz lagano mešanje, dodato 3,5 ml 0.1 M Na₂S. Ovako dobijena sirova reakciona smeša je zagrevana pola sata na 90⁰C uz fluorescentnu kontrolu na 545 nm. Posle 48 h, proces prečišćavanja je nastavljen šestočasovnom dijalizom ZnS:Mn kvantnih tačaka, taloženjem sa 0.1 M HCl, centrifugiranjem, filtriranjem i rastvaranjem na pH = 8,5, pri čemu je dobijen bezbojni rastvor koji apsorbuje na 595 nm. Sinteza je urađena u laboratoriji dr Manuela Algare, na Univerzitetu u Malagi, odeljenju za neorgansku hemiju, kristalografiju i mineralogiju.

Fluorescentna merenja su sprovedena na Jobin Yvon Fluoromax 4 TCSPC (Horiba) spektrofluorimetru. Registrovan je opseg od 400 do 670 nm (sa korakom od 3 nm), uz integraciono vreme od 0.1 s i emisione i ekscitacione slitove od 5 nm. Ekscitacione talasne dužine su varirale od 300 do 400 nm, sa korakom od 5 nm i na taj način je dobijena serija od po 21 emisijonog spektra, za svaki analizirani uzorak: čist ZnS, čist PAMAM-OH_{G=3} dendrimer, ZnS:Mn i ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3}. Rezultati koje sadrži ova doktorska disertacija odnose se na analize spektara koji su uključeni u kompletan proces ispitivanja funkcionalizacije ZnS kvantnih tačaka.

3.2. Sinteza, prečišćavanje i funkcionalizacija karbonskih tačaka

Za dobijanje karbonskih tačaka, 100 ml 1M laktoze je tretirano sa 50 ml H₂SO₄, uz jednočasovni ultrazvučni tretman. Rezultujuća žuta suspenzija je zagrevana sledećih 24 h na 80 °C. Nakon toga, rastvor je centrifugiran, filtriran, neutralizovan do pH vrednosti 7 i ponovo centrifugiran. Na kraju je rastvor karbon-tačaka koncentrovan uparavanjem na rotacionom uparivaču, do trećine početne zapremine. Prečišćavanje karbonskih tačaka je sprovedeno dijalizom, a njihova funkcionalizacija sa merkaptosukciničnom kiselinom (MSA), 3-merkaptopropionskom kiselinom, merkaptosirćetnom kiselinom, *N*-acetil cisteinom, cisteinom i glutationom. Funkcionalizacija je sprovedena dodavanjem 1 ml ovih hemikalija u 2 ml rastvora karbonskih tačaka, uz jednosatno mešanje. Sinteza je urađena u laboratoriji dr Manuela Algare, na Univerzitetu u Malagi, odeljenju za neorgansku hemiju, kristalografiju i mineralogiju. Rezultati koje sadrži ova doktorska disertacija odnose na analize spektara koje su uključene u ceo rad.

3.3. Sinteza PPH-NH₂@CdSe

Sto mg PPH-NH₂ je dispergovano u 50 ml dejonizovane vode i snažno je mešano 5 h. Nakon ovoga, pH rastvora je podešen na 7, dodavanjem NaOH. Zatim je u rastvor dodato približno 30 mg (1.66×10^{-4} M rastvora) kadmijum-hlorida i ostavljen je da stoji narednih 24 h kako bi se formirao kompleks između -NH₂ grupa i Cd(II). Onda je dodato 100 µl 3-merkaptopropionske kiseline i smeša je ostavljena da stoji još 12 h. Na kraju je dodato 100 µl redukovano seleno (SeH⁻) i dobijen je svetlo-narandžasti prah. Kako bi se uklonili neizreagovane komponente, čvrsta supstanca je isprana dejonizovanom vodom i acetonom pre dijalize. Sinteza je urađena u laboratoriji dr Manuela Algare, na Univerzitetu u Malagi, odeljenju za neorgansku hemiju, kristalografiju i mineralogiju, a rezultati ove doktorske disertacije se odnose na snimanje i analize svih spektara uključenih u rad. Fluorescentni spektri PPH-NH₂@CdSe i PPH-NH₂, su snimljeni na Fluorolog-3 spektrofluorimetru (Jobin Yvon Horiba, Paris, France) opremljenim sa ksenonskom lampom od 450 W i fotomultiplikatorom. Za merenje spektara PPH-NH₂@CdSe i PPH-NH₂, korišćena je front-face konfiguracija. Slitovi emisionog i

ekscitacionog snopa su podešeni na 4 nm i 2 nm, respektivno. Integraciono vreme je bilo 0.1 s, a za svaku talasnu dužinu su tri signala usrednjena, u cilju smanjivanja nivoa šuma. Sva merenja su sprovedena na kontrolisanoj temperaturi od 25⁰C. Za svaki uzorak snimljena je serija emisijonih spektara, pobuđivanjem na različitim talasnim dužinama. Fluorescentni signal za PPH-NH₂ je registrovan u opsegu od 310-340 nm, a za PPH-NH₂@CdSe u opsegu 350-420 nm.

3.4. Sinteza CdSe kvantnih tačaka

Kadmijum-selenidne kvantne tačke su dobijene pirolizom prekursora Cd i Se u trioktilfosfin oksidu na temperaturi od 270-320⁰C. Kao prekursor za kadmijum korišćeni su CdO i tetradecilfosfonična kiselina, a trioktilfosfin selenid kao prekursor za selenid. Nanočestice su prikupljene kao puder, precipitacijom metanolom i osušene su u vakumu. Hidrofilne kvantne tačke su kupljene kao komercijalni proizvod kompanije eBioscience (San Diego, CA, pod komercijalnim imenom EviTag)⁷ i korišćene su kao takve.

Za snimanje apsorpcionih i fluorescentnih spektara, kvantne tačke CdSe i CdSe/ZnS su rastvorene u hloroformu i dejonizovanoj vodi, respektivno. Apsorpcioni spektri su snimani na spektrofotometru marke Shimadzu UV-2501 PC (Kyoto, Japan). Fluorescentni spektri su registrovani na Fluorolog-3 spektrofluorimetru (Yobin Ivon Horiba, Paris, France), koji je opremljen ksenonskom lampom od 450 W i fotomultiplikatorom. Kako bi se dekompozicijom detektovale sve fluorofore na različitim pozicijama maksimuma, snimljeno je 15 do 20 emisijonih spektara, pobuđivanjem uzoraka na različitim ekscitacionim talasnim dužinama. Da bi rezultati dekompozicije bili pouzdani, fluorescentni spektri su registrovani samo na opsegu talasnih dužina u kome postoji fluorescencija, od 560 do 700 nm. Kako registrovanje emisijonih spektara počinje od talasne dužine veće za 15 nm u odnosu na odgovarajuću ekscitacionu talasnu dužinu, ekscitacioni opseg je bio podešen na interval od 450 do 545 nm, sa korakom od 5 nm. Slitovi ekscitacionog i emisijonog snopa su bili fiksirani na 4 i 2 nm, respektivno. Integraciono vreme svih spektara je bilo 0.1 s, svaki emisijoni spektar je sniman 10 puta a zatim je usrednjen.

⁷ Kvantne tačke su dobijene od prof. Rodžera Leblana, Department of Chemistry, University of Miami, Coral Gables, FL, 33124, USA

Temperatura na kojoj su snimani spektri je bila 22 °C i kontrolisana je pomoću Peltijeovog (Peltier) elementa.

3.5. Biljni materijal i uslovi rasta *Arabidopsis* linija

Divlji tip i *cad-c cad-d* linije *Arabidopsis* su gajeni u stakleniku na 20-22 °C sa 16 h fotoperiodom na 150 $\mu E/ms$. Za analizu su korišćeni bazalni delovi stabljike sa zrelim cvastima. Biljke su gajene u Institutu INRA, Laboratorija za ćelijsku biologiju, Versaj, Francuska. Stabljike su presečene vibratomom, kako bi se dobili uzorci jednakih debljina. Uzorci su najpre inkubirani, u apsolutnom metanolu, uz konstantno mešanje 30 min, kako bi se uklonio hlorofil i intracelularni i rastvorljivi apoplastični sadržaji. Ovaj tretman je ponovljen dva puta, nakon čega su uzorci isprani dejonizovanom vodom tri puta. Hemijski tretmani ćelijskih zidova su sprovedeni sa:

- i) smešom dioksan/voda 9:1 (v/v) na 100 °C, tokom 30 minuta, prema;
- ii) 30% H₂O₂/97% glacijalne sirćetne kiseline, 1:1 (v/v) na 100 °C;
- iii) 0,1 M NH₄OH na 60 °C;
- iv) kao kontrola su korišćeni tretmani sa dejonizovanom vodom. Kontrolni uzorci su inkubirani na istim temperaturama i u istom periodu kao tretirani uzorci.

FTIR spektri su snimani na površini 50 μm \times 50 μm , u ksilemu i floemu, sa ThermoNicolet Nexus spektrometrom opremljenim sa kontinualnim mikroskopom, u Institutu INRA, Laboratorija za ćelijsku biologiju, Versaj, Francuska. U cilju poboljšanja odnosa signal šum, snimljeno je 50 interferograma sa rezolucijom 8 cm⁻¹. FTIR spektri ekstrakata su snimljeni Nicolette 6700 spektrometrom, tehnikom smanjene totalne refleksije.

Studentov T test je korišćen za upoređivanje:

- i) FTIR spektara tretiranih uzoraka sa spektrima korespondirajućih netretiranih, za fiber i ksilem, posebno za divlji tip i za mutante i za svaki tretman;
- ii) FTIR spektara *cad c cad d* sa spektrima divljeg tipa, i za ksilem i za fiber, kao i za svaki tretman posebno.

3.6. Eksperimentalni uslovi za interakciju BSA i ATP

U cilju proučavanja interakcije BSA i ATP, snimljena je serija ekscitaciono-emisionih matrica u molskim odnosima 1:1, 1:2 i 2:1, respektivno. Svi rastvori su imali pH vrednost 7. Fluorescentni spektri su registrovani neposredno nakon mešanja proteina i ATP, dva sata i dva dana nakon mešanja. Za svaki odnos BSA-ATP i u svakom od pomenutih vremena, je snimljena jedna ekscitaciono-emisiona matrica. Serija emisionih spektara je snimljena pobuđivanjem uzoraka na različitim talasnim dužinama u opsegu od 260 do 296 nm, sa korakom 2 nm. Fluorescentni signal je registrovan u opsegu od 300 do 400 nm, sa korakom od jednog nm. Na taj način je za svaki odnos BSA/ATP dobijena matrica dimenzija 101×19 . Kako je u svakom vremenu vršeno merenje za tri odnosa BSA-ATP, na taj način su formirani tenzori dimenzija $101 \times 19 \times 3$. Pod istim uslovima snimljeni su spektri rastvora čistog BSA, kao rastvora čistog BSA nakon dva dana. Rastor BSA je imao koncentraciju $0,7523 \text{ mM dm}^{-3}$.

Softverski paketi koji su korišćeni za obradu podataka i grafičku vizualizaciju su: MATLAB R2010a, IBM SPSS v 22, Microsoft Excel 2010 i Unscrambler.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Primeri korišćenja multivarijacione analize u obradi fluorescentnih spektara različitih tipova nanočestica u cilju njihove karakterizacije

4.1.1. Nanočestice kao senzori za detekciju i kvantifikaciju kadmijuma

Razvoj nanomaterijala sa različitim i unapređenim osobinama izaziva sve veću pažnju i može se postići upotrebom dopiranih, umesto sirovih kvantnih tačaka. Ukoliko se cink-sulfidne fluorescentne kvantne tačke dopiraju sa Mn^{2+} koji im daje karakterističnu emisiju nezavisno od njihove veličine (zbog nižeg osnovnog stanja Mn^{2+} , ${}^4T_1 \rightarrow {}^6A_1$)⁴⁶, dolazi do većeg Stoksovog pomeraja, čime se izbegava samoapsorpcija, produžava vreme pobuđenog stanja, poboljšava njihova termička i hemijska stabilnost, uz minimiziranje toksičnosti^{47,48,49,50}.

Cink-sulfidni nanokristali, dopirani jonima mangana (ZnS:Mn), privukli su veliko interesovanje zbog svoje velike kvantne efikasnosti i termičke stabilnosti, posedovanja osobina bitnih za hemijsku primenu, od kojih treba pomenuti biosenzore, molekularno slikanje, praćenje „isporuke” leka, itd. Značajno unapređenje ovih osobina može se postići modifikovanjem njihovih površina ovih nanokristala. Na taj način, ZnS:Mn može biti konjugovan sa različitim ligandima koji menjaju oblažuće agense kao što su glukoza-oksidaza (koja se koristi kao biosenzor glukoze u biološkim fluidima), polietilenamin (test za heparin), tioglicerol (za bioimidžing), citosan i PEG (za bio-označavanje), itd. Pored svih ovih nanokompozitnih materijala od nedavno se za oblaganje nanočestica koriste i dendrimer-derivati, koji mogu promeniti njihovo naelektrisanje, reaktivnost i funkcionalnost. Istovremeno, kuplovanje kvantnih tačaka sa dendrimerima povećava njihovu stabilnost i dispergovanost. Prethodni rezultati su pokazali da dendrimeri koji su funkcionalizovani sa CdSe i ZnSe kvantnim tačkama, poboljšavaju njihove osobine koje se mogu upotrebiti za kvantifikaciju teških metala (u vodenim

rastvorima) i C-reaktivnog proteina (CRP⁸), pomoću efekta gašenja prouzrokovanog emisijom kvantnih tačaka^{51,52}. Na primer, CdS kvantne tačke su sintetizovane pomoću PAMAM dendrimera sa hidroksi-završecima i istraživan je efekat odnosa Cd²⁺/dendrimer, generacije dendrimera i temperature, na ove kvantne tačke, kako bi bio rasvetljen mehanizam njihovog formiranja i određeni optimalni uslovi za njihovu ugradnju⁵³.

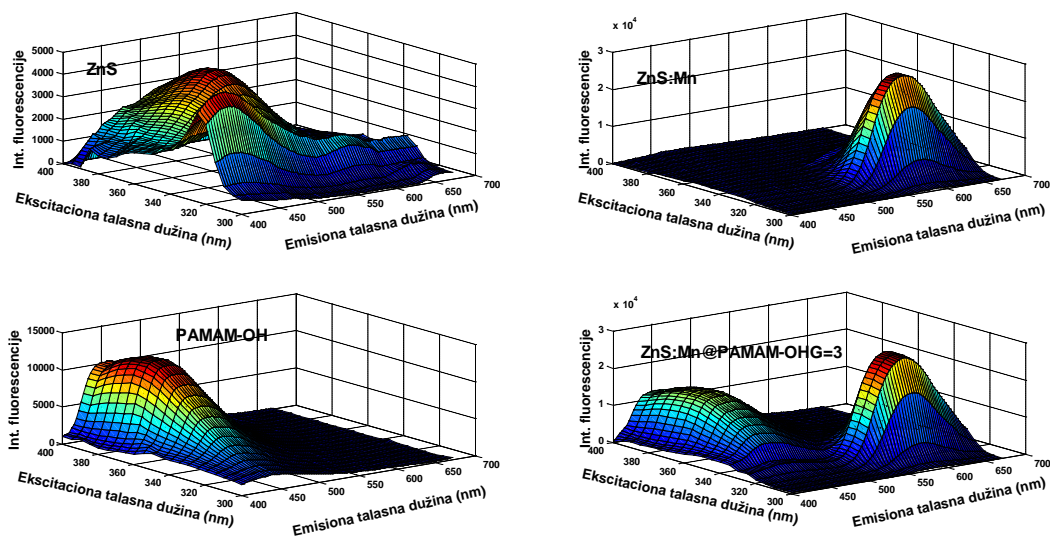
Deo ovog rada je i komponentna analiza fluorescentnih spektara novih hemijskih nanosenzora za Cd²⁺ jone, koji su bazirani na PAMAM-OH dendrimerima treće generacije. Ovi nanosenzori su rezultat istraživanja dve različite familije i generacije dendrimera, PAMAM sa hidroksi završecima (PAMAM-OH_{G=2,3,5}) i DAB⁹ dendrimeri sa tiolnim završecima (DAS_{G=2-5}). Prisustvo ovih jona u okruženju izaziva zdravstvene probleme kod ljudi. Ovi, Cd²⁺ nanosenzori, pokazuju minimalnu interferenciju sredinskih uslova u poređenju sa ostalim vrstama, a isto tako je primećeno da prisustvo Cd²⁺ jona povećava intenzitet fluorescencije. Ovi nanosenzori sa optimalno definisanim odnosom komponenti, bazirani na kvantnim tačkama funkcionalizovanim sa dendrimerima, su prvi put primenjeni u detekciji L-triptofana⁵⁴ i termometriji⁵⁵.

Na Slici 15 prikazane su ekscitaciono-emisione matrice uzoraka, čistog ZnS, čistog PAMAM-OH_{G=3} dendrimera, ZnS:Mn i ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3}. Ramanske trake iz sirovih spektara su uklonjene pomoću a/e-UV-vis-IR Spectral Software 1.2¹⁰. Svaka od četiri matrice je analizirana multivarijacionom rezolucijom krivih, koja ekstrahuje kako broj komponenti tako i njihove emisije i ekscitacione profile.

⁸ CRP je set proteina koji predstavljaju kritičnu komponentu imunog sistema. Otkriven je sedamdesetih godina prošlog veka prilikom istraživanja humanih inflamatornih odgovora. Nedavno je otkrivena i njegoova uloga u bolestima srca.

⁹ Diamino butan

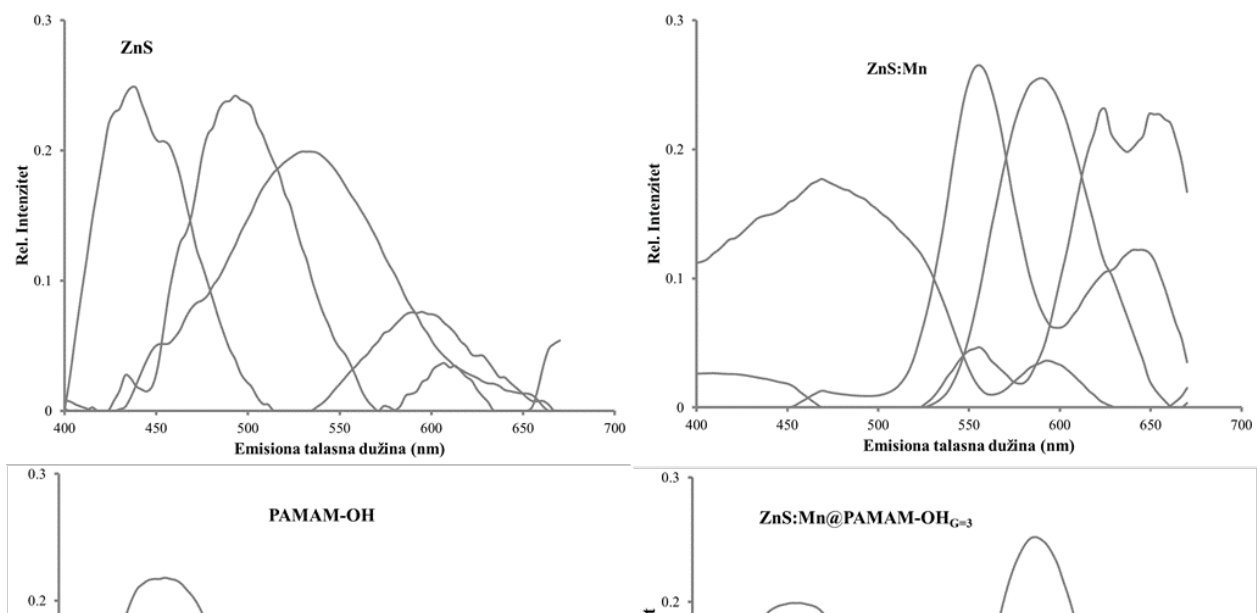
¹⁰ www.fluortools.com



Slika 15. Grafički prikaz ekscitaciono-emisionih matrica čistog ZnS, čistog PAMAM-OH dendrimera, ZnS:Mn i ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3}.

4.1.1.1. Komponentna analiza ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3}

Emisioni profili, dobijeni primenom multivarijacione rezolucije krivih, na ekscitaciono-emisione matrice uzoraka čistog ZnS, čistog PAMAM-OH_{G=3} dendrimera, ZnS:Mn i ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3}, prikazani su na slici 13. Emisioni spektri ZnS sadrže četiri komponente sa maksimumima na 439, 493, 535 i 595 nm. Kompleksiranjem sa Mn²⁺ nestaju prve tri komponente, zbog formiranja novog jedinjenja, dok četvrta komponenta ostaje nepromenjena. Novoformirane komponente imaju pozicije maksimuma na 472, 556, 589 i 643 nm. Iz EEM PAMAM-OH su ekstrahovane dve komponente sa pozicijama maksimuma 454 i 465 nm.



Slika 16. Grafički prikaz ekscitaciono-emisionih matrica čistog ZnS, ZnS:Mn, čistog PAMAM-OH_{G=3} dendrimera i ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3}.

Iz EEM ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3} ekstrahovano je pet komponenti. Komponenta kod PAMAM-OH na 454 nm je ostala nepromenjena, dok je druga komponenta pokazala „plavo“ pomeranje za 20 nm, na poziciju od 445 nm. Preostale tri komponente, na pozicijama 556, 589 i 643 nm su iste kao kod ZnS:Mn⁵⁶. Prethodna diskusija dokazuju da je novoformirani kompleks stabilan, jer PAMAM-OH ne menja strukturu ZnS:Mn, dok je promena komponenti kod PAMAM-OH nastala usled vezivanja sa ZnS:Mn.

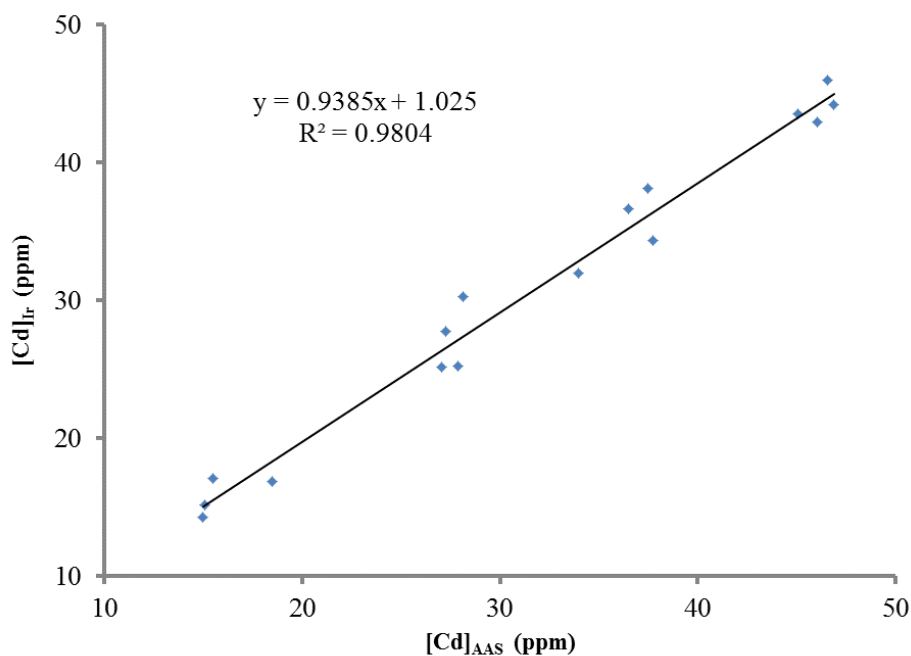
4.1.1.2. Primena ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3} senzora u kvantifikaciji kadmijuma u pijaćoj vodi

Kontaminacija pijaće vode kadmijumom uglavnom nastaje kao rezultat nečistoća od Zn²⁺ ili galvanizovanih cevi, lemljenih okova koji sadrže Cd²⁺, bojlera, aparata za hlađenje vode i slavina. Pripremljeni su rastvori različitih koncentracija Cd²⁺ u vodi iz gradskog vodovoda, flaširanoj vodi, rečnoj i otpadnoj vodi. Dobijeni rezultati su upoređivani sa rezultatima atomske apsorpcione spektroskopije i prezentovani su u Tabeli 4. Rezultati određivanja koncentracije novopredloženim senzorom pokazuju neznatno odstupanje u odnosu na rezultate dobijene pomoću AAS. Upoređivanje preciznosti ove dve metode dalo je sledeće rezultate: ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3} senzor je pokazao prosečnu preciznost od 5,88% ± 2,45%, dok je AAS imala preciznost od 1,41%±0,76%. Ovo se najverovatnije događa zbog velikog broja aktivnih mesta na dendrimerima na kojima mogu biti kompleksirani Cd²⁺ joni i koji na taj način mogu generisati signal sa blagom devijacijom.

Tabela 4. Rezultati upoređivanja AAS i ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3} senzora, u određivanju koncentracije Cd²⁺ u uzorcima vode. Koncentracija je prikazana kao srednja vrednost iz tri različita određivanja, a u zagradi je data standardna devijacija.

| | [Cd] _{AAS} (ppm) | [Cd] _{Ir} (ppm) | Pouzdanost (%) |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------|----------------|
| Voda sa gradske mreže | 18,48 (0,25) | 16,89 (1,40) | 8,59 |
| | 27,86 (0,27) | 25,26 (1,72) | 9,34 |
| | 36,49 (0,74) | 36,65 (1,50) | 0,44 |
| | 46,56 (0,19) | 46,02 (1,89) | 1,15 |
| Flaširana voda | 15,07 (0,20) | 15,15 (1,35) | 0,5 |
| | 27,03 (0,57) | 25,16 (1,41) | 6,93 |
| | 37,72 (0,54) | 34,33 (1,10) | 8,99 |
| | 46,88 (0,14) | 44,19 (1,28) | 5,73 |
| Rečna voda | 14,97 (0,18) | 14,30 (1,36) | 4,51 |
| | 28,12 (0,38) | 30,30 (1,79) | 7,74 |
| | 33,94 (0,20) | 31,98 (1,31) | 5,8 |
| | 45,08 (0,89) | 43,57 (1,52) | 3,36 |
| Otpadna voda | 15,47 (0,49) | 17,09 (1,83) | 10,5 |
| | 27,24 (0,56) | 27,77 (2,05) | 1,96 |
| | 37,45 (0,22) | 38,16 (1,91) | 1,89 |
| | 46,03 (0,81) | 42,93 (1,76) | 6,72 |

Na Slici 17 je grafički ilustrovano slaganje rezultata određivanja kadmijuma u uzorcima vode pomoću AAS i ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3} senzora. Visoka vrednost koeficijenta determinacije od 0,9804, vrednost nagiba od 0,9835 (koja je bliska 1) i vrednost odsečka od 1,025 (koja je relativno bliska nuli) pokazuju da ove dve metode daju vrlo slične vrednosti koncentracije kadmijuma.



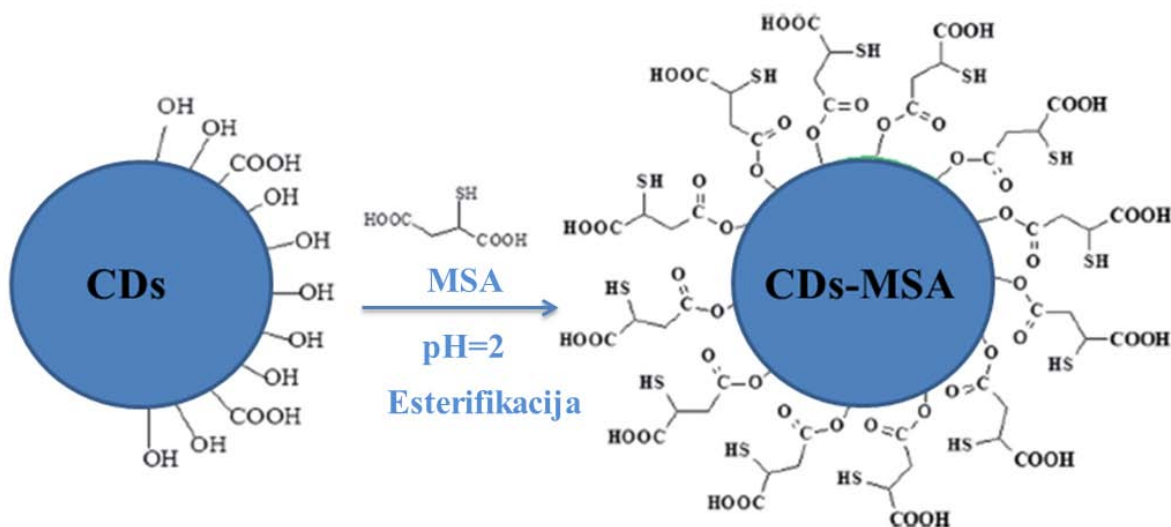
Slika 17. Upoređivanje rezultata određivanja kadmijuma u uzorcima vode pomoću AAS i ZnS:Mn@PAMAM-OH_{G=3} senzora. Na slici su prikazani i linearni regresioni model i koeficijent determinacije

4.1.2. Nanočestice kao senzori za detekciju i kvantifikaciju srebra

Nanočestice na bazi ugljenika (karbonske tačke, CD) su se pojavile nedavno kao rezultat potrage za novim nanomaterijalima i imaju manju toksičnost u odnosu na slične alternative kao što su kvantne tačke. Iako imaju osobine pogodne za upotrebu u živim sistemima, potrebno je i dalje proučavati njihovu optimizaciju. Ove nanočestice su uglavnom malih dimenzija (ispod 10 nm), sa raznim svojstvima i poslednjih godina su našle primenu u mnogobrojnim poljima. U poređenju sa kvantnim tačkama i organskim bojama, karbonske tačke su superiorne u pogledu visoke rastvorljivosti u vodi, hemijske inertnosti, jednostavne funkcionalizacije, otpornosti na

foto-izbeljivače, niske toksičnosti i biokompatibilnosti^{57,58}. Sem toga, ove tačke pokazuju dobru membransku propustljivost i mogu biti korišćene u monitoringu nivoa sulfidnih jona u tekućoj vodi i živim ćelijama⁵⁹, kao i u biološkom označavanju i praćenju isporuke lekova^{60,59,61}. Emitovana svetlost od karbonskih tačaka može biti ugašena efikasno pomoću elektron-akceptorskih ili elektron-donorskih molekula u rastvoru. Ovi zanimljivi foto-indukovani transferi elektrona karbonskih tačaka, nude mogućnost njihove primene u konverziji svetlosne energije, fotonaponskim uređajima i sličnim aplikacijama^{62,63}. Pošto je cilj, ispitivanje mogućnosti primene ovih nanočestica kao senzora za određivanje koncentracije Ag^+ jona, predmet ovog dela disertacije je da se analiziraju fluorescentni spektri da bi se okarakterisale nanočestice i utvrdili paametri za njihovu optimalnu primenu.

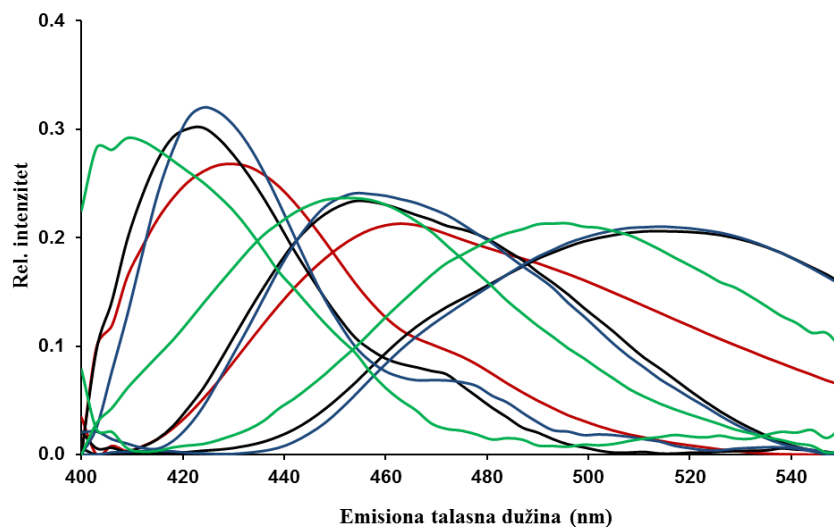
Na Slici 18 prikazana je površina karbonskih tačaka i njihovih MSA pandana. Ovakva struktura može biti od presudne važnosti za fluorecentno ponašanje ovih materijala.



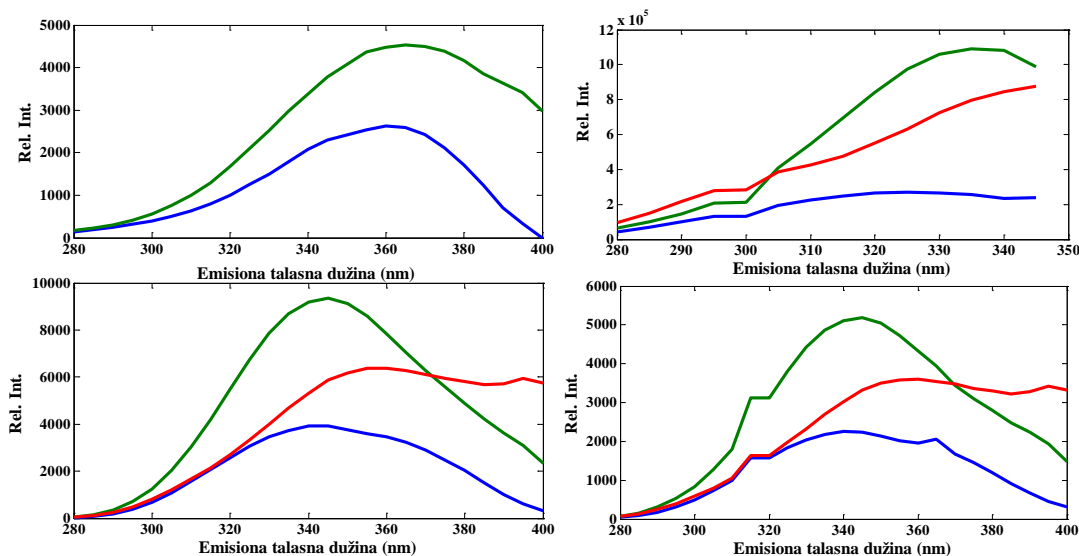
Slika 18. Grafička ilustracija formiranja kompleksa CDs-MSA koji se može koristiti kao senzor za Ag^+

4.1.2.1. Analiza fluorescentnih spektara

Za svaki uzorak: čist rastvor karbonskih tačaka, čist rastvor merkaptosukcinske kiseline, kompleks CD-MSA i kompleks CD-MSA@Ag⁺, je snimljen set od 21 fluorescentnog spektra i na taj način su dobijene 4 ekscitaciono-emisione matrice koje odgovaraju ovim uzorcima. Za analizu ovih matrica korišćena je metoda multivarijacione rezolucije krivih. Rezultati ove analize prikazani su na Slici 19. Emisioni spektri čistih karbonskih tačaka sadrže dve fluorofore sa pozicijama maksimuma na 430 nm i 463 nm, koje se mogu povezati sa različitim kiseoničnim grupama kojima je bogata površina karbonskih tačaka, što je potvrđeno XPS i FTIR analizom⁶⁴. Spektar čiste merkaptosukcinske kiseline sadrži tri komponente sa emisionim maksimumima na 409 nm, 454 nm i 496 nm, koji mogu biti povezani sa povećanjem površinske heterogenosti zahvaljujući reakcijama esterifikacije i prisustvu tiolnih grupa. Spektri karbonskih tačaka funkcionalizovanih sa MSA i MSA@Ag⁺ takođe sadrže tri komponente sa pozicijama maksimuma koje se neznatno razlikuju u odnosu na oba materijala: 424 nm, 457 nm i 514 nm. Ove razlike se mogu pripisati novoformiranim vezama nastalim kao rezultat funkcionalizacije (esterifikacije) i prisustvu karbonskog matriksa u karbonskim tačkama, koji može da utiče na proces prenosa elektrona i njihovu relaksaciju.



Slika 19. Emisioni spektri čistih komponenti dobijeni MCR-ALS metodom analiziranjem emisionih spektara čistih CDs (crveno), čiste MSA (zeleno), CDs-MSA kompleksa (plavo) i CDs-MSA@Ag⁺ kompleksa (crno)



Slika 20. Ekscitacioni spektralni profili koji odgovaraju spektralnim komponentama sa slike 6, dobijeni MCR-ALS metodom. Gornji panel: CDs (levo) i MSA (desno), donji panel: CDs-MSA (levo) i CDs-MSA@Ag⁺ (desno)

Odgovarajući ekscitacioni profili komponenti prikazanih na Slici 19, dati su na Slici 20. Ekscitacioni spektri čiste MSA, CD-MSA i CD-MSA@Ag⁺, imaju slične profile (menjaju se na sličan način sa promenom ekscitacione talasne dužine). Ovi ekscitacioni profili se razlikuju od profila za karbonske tačke. Rezultati pokazuju da funkcionalizacija karbonskih tačaka merkaptosukcinskom kiselinom dovodi do promene emissionog spektra. Prva i treća komponenta CD-MSA mogu biti povezane sa novim/modifikovanim entitetima zakačenim na površinu karbonske tačke. Druga komponenta ukazuje na poreklo od MSA i može se objasniti efektom tiolne grupe na emisiju. Nepromenjene pozicije svih komponenti u CD-MSA@Ag⁺, u poređenju sa komponentama u CD-MSA, indikuju da vezivanje Ag⁺ jona ne izaziva značajne promene u fluoroforama CD-MSA. Ovakav zaključak ukazuje na stabilnost ovako modifikovanog materijala i njegovu moguću primenu u detekciji jona metala. Dodatna potvrda stabilnosti modifikovanih karbonskih tačaka je sličnost ekscitacionih profila njihovih komponenti. Analiza vremenskog raspada fluorescencije pokazuje da vremena života komponenti, računatih sa trokomponentnim modelom za CD, CD-MSA i CD-MSA@Ag⁺, nisu naročito osetljiva na prisustvo gasioca. Ova vremena ne zavise od koncentracije Ag⁺ jona, što ukazuje na efekat

statičkog gašenja preko CD-MSA povezanog sa formiranjem stabilnog kompleksa između fluorofore i Ag^+ jona. Ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima dobijenim analizom fluorescentnih spektara u stanju ravnoteže⁶⁴.

4.1.2.2. Detekcija Ag^+

Preliminarni eksperimenti su pokazali da se ne događa promena u fluorescenciji kada se inicijalne karbonske tačke koriste za detekciju metala. Posle funkcionalizacije sa merkaptosukcinskom kiselinom (CD-MSA), prisustvo Ag^+ jona uzrokuje vidljivo gašenje fluorescencije⁶⁴. To znači da je merkaptosukcinična kiselina zakačena za površinu karbonske tačke, ključni faktor za njihovu primenu u detekciji metala. Može se pretpostaviti da dolazi do modifikacije MSA vezivanjem za karbonske tačke i da su tiolne grupe osetljiva mesta za koja se vezuju joni srebra. Iako joni srebra uzrokuju gašenje fluorescencije, oni ne menjaju strukturu CD-MSA. Ovo gašenje je povezano sa neradijacionim transferom pobuđenih elektrona sa CD na jone, što rezultuje njihovim prelaskom u atomsko stanje. Fluorofore u CD-MSA nisu jednako pristupačne za jone metala i samo deo njih je pod uticajem Ag^+ i izložen je fluorescentnom gašenju. Funkcionalizacija CD sa MSA, omogućava stabilno vezivanje Ag^+ . U CD-MSA, tiolne grupe su mesta na kojima se vezuju joni srebra, a odnos tiolnih i karboksilnih grupa u ovom senzoru je 1:1 (jer su ostale karboksilne grupe esterifikovane). Ovi rezultati takođe sugerišu i da je merkaptosukcinska kiselina ravnomerno distribuirana oko karbonske tačke, jer površina tačke nije osetljiva za vezivanje Ag^+ (Slika 18).

Predloženi senzor je optimizovan u cilju dobijanja najbolje osetljivosti. Za demonstriranje ograničenosti senzora u detekciji jona srebra, određene su granica detekcije (GD^{11}) i granica kvantifikacije (GK) i one su iznosile 385 nM i 1,2 μM , respektivno. Preciznost metode je određena analiziranjem deset uzoraka koji su sadržali $1,6 \times 10^{-4}$ M Ag^+ i iznosila je 1,76% $\left(\frac{\text{st.devijacija}}{\text{srednja vrednost}} \times 100\right)$.

¹¹ Granica detekcije je određena množenjem standardne devijacije blanka ($n=10$) sa tri i deljenjem ovog proizvoda sa nagibom kalibracione prave ($\text{GD} = \frac{3\text{SDblank}}{b}$), dok je granica kvantifikacije dobijena množenjem GD sa tri.

4.1.2.3. Određivanje koncentracije Ag⁺ u srebrnim nanočesticama

U duhu prethodnih razmatranja, testirana je mogućnost primene karbonskih nanočestica funkcionalizovanih sa merkaptosukcinskom kiselinom, za određivanja koncentracije slobodnih jona srebra u rastvoru srebrnih nanočestica. Za ovo određivanje odabran je metod standardnog dodatka i srebrne nanočestice su rastvorene kako bi se dobio signal od preostalih Ag⁺ jona u optimalnom mernom opsegu. Rezultati određivanja koncentracije Ag⁺, su prikazani u Tabeli 5 i pokazuju pouzdanost u intervalu od 96% do 102%, što demonstrira upotrebljivost CD-MSA kao Ag⁺ senzora.

Tabela 5. Rezultati određivanja Ag⁺ u rastvorima srebrnih nanočestica pomoću CD-MSA. Rezultati su dati kao srednja vrednost tri merenja

| Koncentracija dodatog Ag ⁺ (M) | Nađeno Ag ⁺ (M) | Pouzdanost (%) |
|---|----------------------------|----------------|
| 0,005 | 0,0048±0,0011 | 96 |
| 0,006 | 0,0061±0,0015 | 102 |
| 0,007 | 0,0069±0,0021 | 99 |
| 0,009 | 0,0092±0,0019 | 102 |

4.1.3. Nanočestice kao senzori za detekciju otisaka prsta

Otisak prsta je jedan od najvažnijih fizičkih dokaza u polju forenzičkih nauka i vrlo je koristan jer svaka osoba ima jedinstven otisak prsta. U nekim situacijama, ovi otisci su jedva vidljivi i neophodno je učiniti ih vidljivim, za šta se mogu upotrebiti određeni prahovi, hemijske pare ili alternativni izvori svetlosti. Najkorišćeniji metodi za vizualizaciju, odnosno otkrivanje latentnih otisaka prstiju na neporoznim površinama, su tretmani sa ninhidrinom^{65,66}, srebro nitratom⁶⁷ i isparenjima joda⁶⁵, itd. Za označavanje latentnih otisaka se mogu upotrebiti i novi materijali, kao što su fluorescentni poluprovodnici bazirani na nanotehnologijama (kvantne tačke), na pr.: CdS, CdTe, CdAu ili CdSe^{68,69,70,71}. Inkorporacija ovih kvantnih tačaka na inertne čvrste matrice sa ravnomernim nanoporama i kontrolisanim prečnikom, je naročito interesantna. Za ovu svrhu su izabrane porozne fosfatne nanostrukture koje omogućavaju stratešku

funkcionalizaciju njihovih površina, "kačenjem" organskih funkcionalnih grupa, koje mogu vezati molekule od interesa⁷². Ovi hibridni materijali kombinuju korisne osobine, kako kvantnih tačaka, tako i inertnih matrica i daju nove materijale sa jedinstvenim optičkim i hemijskim osobinama. Ove analize su pokazale mogućnost primene CdSe kvantnih tačaka, ugrađenih u funkcionalizovane porozne fosfatne nanostrukture sa amino grupom (PPH-NH₂@CdSe), u detekciji latentnih otisaka prstiju na različitim neporoznim površinama⁷³. Rezultat rada je novi metod za poboljšanje kvaliteta slike otisaka prstiju, primenom novog praha.

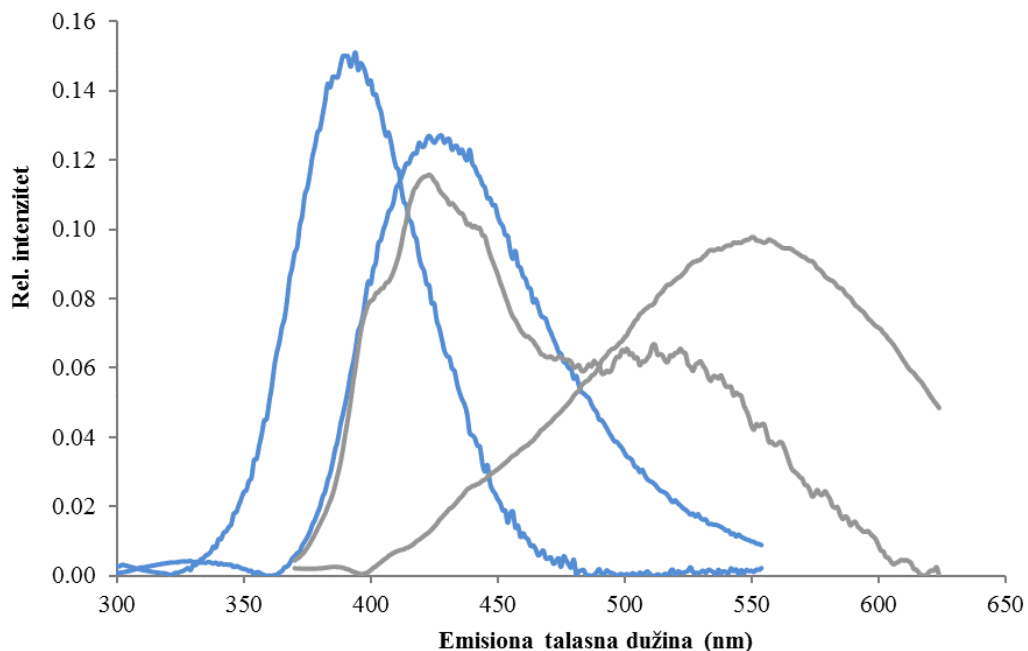
Osim fluorescentne spektroskopije, za hemijsku karakterizaciju ovih kvantnih tačaka, korišćena je i FTIR spektroskopija, kao i metoda rentgenske difrakcije. Za analizu emisionih fluorescentnih spektara korišćena je multivarijaciona rezolucija krivih. U slučaju PPH-NH₂ ekstrahovane su dve komponente, dok su kod uzorka PPH-NH₂@CdSe ekstrahovane četiri komponente, od kojih se dve po položaju poklapaju sa dve komponente nosača, a dve su nove komponente. Emisioni profili ovih komponenti prikazani su na Slici 21. Rezultati ove analize su potvrđeni i dodatno, nelinearnim fitovanjem pomoću jednostavnog, Nelder-Mead algoritma¹², implementiranog u Matlab 6.5⁷⁴, koji je ranije razvijen⁷⁴.

$$F_{\lambda} = \sum_{i=1}^{N_L} F_{m,i} \exp \left\{ - \left(\frac{\ln 2}{\ln^2 \rho_i} \right) \ln^2 \left[\frac{\frac{1}{a_i} - \frac{1}{\lambda}}{\frac{1}{a_i} - \frac{1}{\lambda_m}} \right] \right\} \quad (38)$$

¹² Fitovanje je bazirano na dekonvoluciji emisionih spektara u asimetrične, log-normalne komponente, na sledeći

način: $F_{\lambda} = \begin{cases} F_m \exp \left\{ - \left(\frac{\ln 2}{\ln^2 \rho} \right) \ln^2 \left[\frac{\frac{1}{a} - \frac{1}{\lambda}}{\frac{1}{a} - \frac{1}{\lambda_m}} \right] \right\}, & \lambda > a \\ 0, & \lambda \leq a \end{cases}$, gde F_m označava maksimalni intenzitet fluorescencije, ρ

parametar asimetričnosti, a vrednost talasne dužine od koje se registruju emisioni spektri, dok λ_m predstavlja vrednost talasne dužine na kojoj se postiže maksimalna emisija⁵⁶.



Slika 21 Emisioni profili matriksa (plavo) i kompleksa sa CdSe (sivo), dobijeni primenom multivarijacione rezolucije krivih

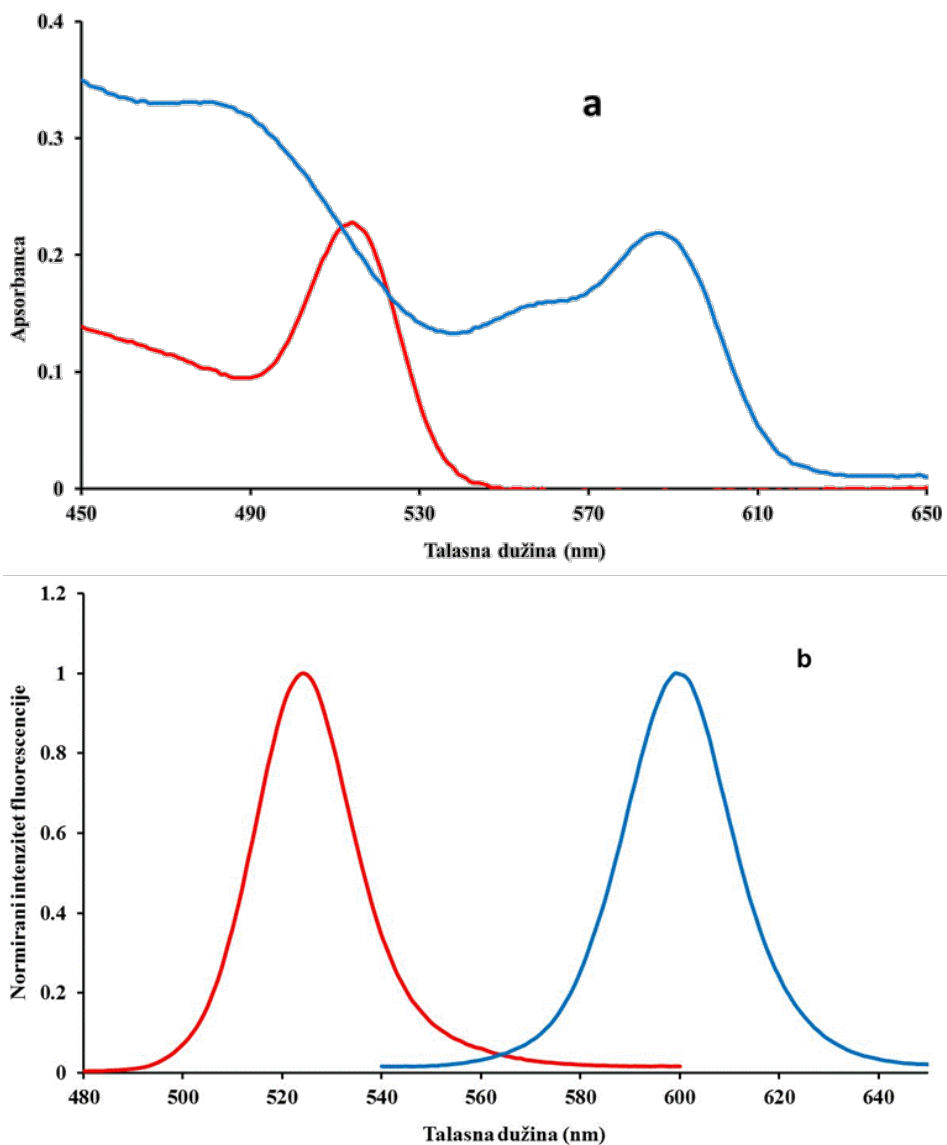
Dve nove komponente potiču od novih fluorofora koje se pojavljuju kada se CdSe veže za podlogu. Promene u FTIR spektrima ukazuju da su nove fluorofore formirane kroz vezivanje CdSe na karbonilne i amino grupe, a takođe i kroz interakciju nanočestica sa P-O i C-N vezama. Spektri kompleksa imaju različit broj komponenti i oni se mogu razložiti u četiri komponente u regionu 350-360 nm, tri komponente u regionu 370-410 nm i dve komponente 420-430 nm. Ovo se dešava zbog toga što sa porastom ekscitacione talasne dužine, pobuđuju različite fluorofore⁷⁵.

4.1.4. Korišćenje multivarijacione analize za određivanje broja frakcija i njihovog prečnika, u smeši nanočestica različite veličine, metodom fluorescentne spektroskopije

Poluprovodljivi nanokristali imaju primenu u različitim tehnologijama kao što su: LED⁷⁶, laseri⁷⁷, solarne ćelije⁷⁸, biomedicina⁷⁹, remedijacija životne sredine zagađene opasnim kontaminantima uključujući i pesticide, prečišćavanje vode⁸⁰ i dr. Određivanje veličine, odnosno prečnika nanočestica, jako je važno u primeni ovih čestica u pomenutim tehnologijama, kao i u mehanističkom proučavanju nukleacije i rasta koloidnih nanokristala. Takođe treba napomenuti da veličina nanočestice utiče na transport naelektrisanja, što može dovesti do drastičnih promena u njihovim optičkim i katalitičkim osobinama, u poređenju sa onima kod većine poluprovodnika⁸¹. Veliko variranje prečnika nanočestica, može da komplikuje korelisanost fizičkih (elektronskih i optičkih) i hemijskih osobina poluprovodnika sa veličinom kristalčnosti. Zbog svega navedenog, velika pažnja je usmerena ka pouzdanim metodama određivanja distribucije veličine nanočestica, kao što su: visoko-rezoluciona transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)^{82,83}, SAXS-rasejanje X zraka pod malim uglom^{82,83}, Ramansko rasejanje⁸⁴, UV-VIS apsorpciona spektroskopija⁸⁵. Sve pomenute metode imaju ozbiljna ograničenja prilikom određivanja veličine nanočestica (dugo vreme pripreme uzoraka i obrade podataka, dostupnost instrumenata, nisku rezoluciju, itd) i nisu u potpunosti pouzdane⁸⁶. Suptilne razlike u sintezi nanočestica, mogu da utiču na varijacije njihovih spektroskopskih osobina. S druge strane, komercijalne kvantne tačke nisu dovoljno standardizovane, niti su kompletno karakterizovane, tako da je za njihovu dalju upotrebu neophodna dodatna evaluacija⁸⁷.

Poznato je da su neke osobine nanočestica, kao što su boja, a naročito emisija, zavisne od njihove veličine⁸⁸. Kvantne tačke su sjajne i stabilne u relativno ekstremnim uslovima, imaju uske emisione spektre čije širine variraju između 20 i 40 nm na polumaksimumu intenziteta^{89,90}. Na osnovu pregledane literature nije primećena nijedna studija koja je korelirala poziciju fluorescentnih emisionih maksimuma sa prečnikom kvantnih tačaka, kao ni upotreba bilo koje spektroskopske tehnike (pa time ni fluorescencije), koja bi se bavila analiziranjem uzoraka nanočestica koji sadrže frakcije različitih prečnika. Zato će u nastavku biti proučavana korelisanost pozicije fluorescentnih maksimuma sa prečnicima dva tipa kvantnih tačaka: CdSe- kao primera hidrofobnih i CdSe/ZnS kao primera hidrofилnih kvantnih tačaka. Vezano za ovo

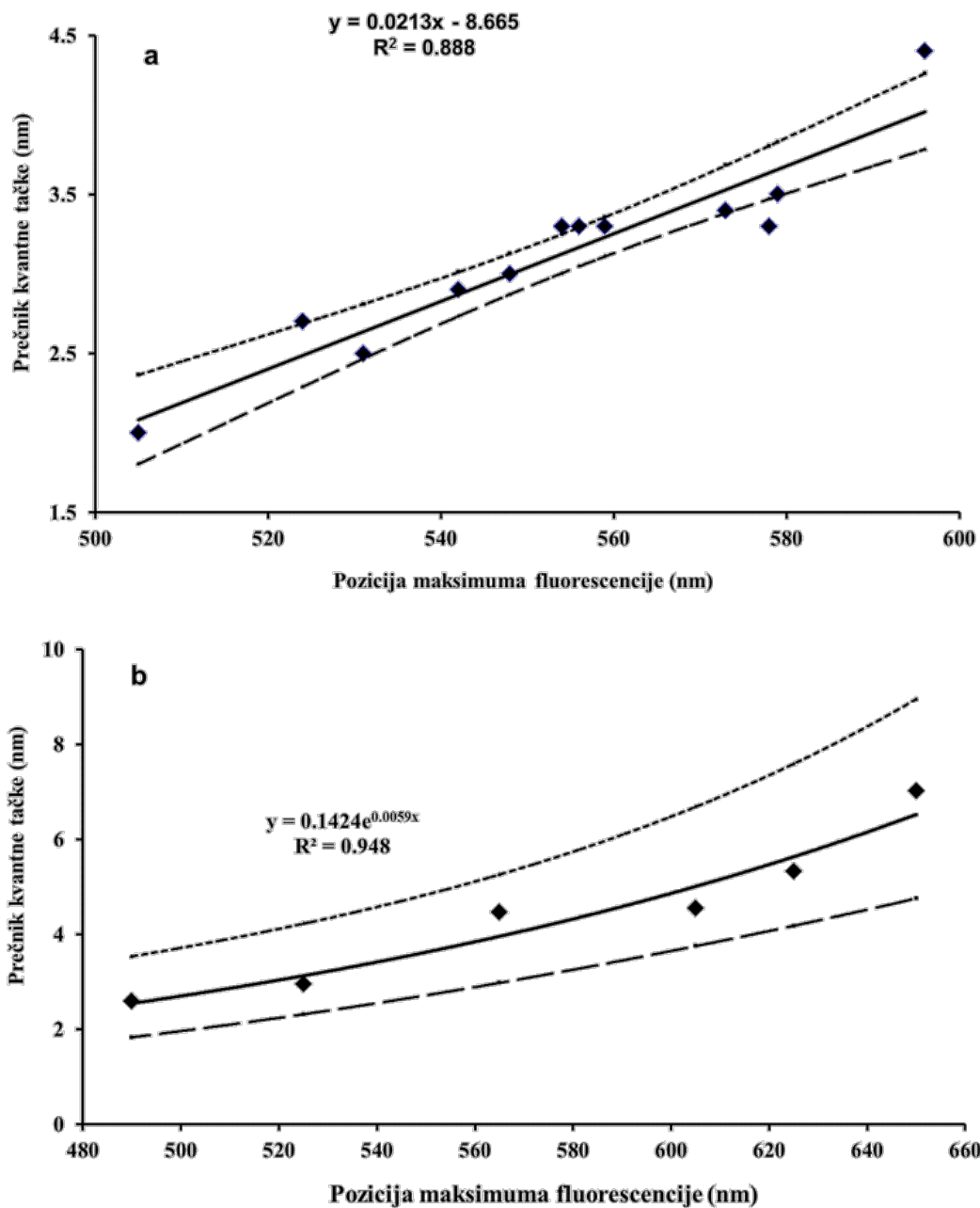
ispitivanje predložen je metod za određivanje prečnika frakcija nanočestica različitih dimenzija prisutnih u uzorcima, primenom EFA i MCR-ALS na njihove ekscitaciono-emisione matrice.



Slika 22 (a) Apsorpcioni spektri CdSe kvantnih tačaka koje imaju veličinu 2.7 nm (crvena linija) i 4.4 nm (plava linija); (b) odgovarajući emisijski spektri dobijeni pobudom na 435 i 520 nm, respektivno

Na Slici 22(a) su prikazani apsorpcioni spektri hidrofobnih kvantnih tačaka (CdSe), čije si dimenzije 2,7 i 4,4 nm. Za svaku veličinu kvantnih tačaka, snimljena je serija emisijskih spektara

na raznim ekscitacionim talasnim dužinama, a na Slici 22(b) prikazana su dva emisiona spektra dobijena ekscitacijom na 435 i 520 nm, respektivno.



Slika 23. Zavisnost prečnika od pozicije maksimuma fluorescencije za hidrofobne-CdSe (a) i hidrofilne-CdSe/ZnS (b) kvantne tačke. Prečnik hidrofobnih kvantnih tačaka je ocenjen na bazi njihovih spektralnih apsorpcionih maksimuma, dok je u slučaju hidrofilnih kvantnih tačaka prečnik određen pomoću TEM. Regresione linije pokazuju procene prosečnih vrednosti prečnika kvantnih tačaka, a na graficima su prikazane i vrednosti donje (---) i gornje (···) granice 95% intervala poverenja prosečnog prečnika.

Veličina hidrofobnih kvantnih tačaka je određena na osnovu njihovih apsorpcionih spektara, kao što je opisano od Yu *at al*⁸⁵. Oni su opisali da ekstinkcioni koeficijent po molu nanokristala na prvom eksitoničnom apsorpcionom piksu za visoko-kvalitetne kvantne tačke (CdTe, CdSe i CdS) jako zavisi od njihovog prečnika, pri čemu je oblik zavisnosti između kvadratnog i kubnog. Zbog ovoga je pretpostavljeno da između pozicije maksimuma fluorescencije i prečnika kvantnih tačaka, takođe postoji zavisnost. Ova zavisnost je prikazana na Slika 23, kako za hidrofobne, tako i za hidrofilne kvantne tačke. Prečnik hidrofobnih kvantnih tačaka (Slika 23a) je određen na bazi njihovih apsorpcionih maksimuma, koristeći publikovane kalibracione krive⁸⁵. Prečnik hidrofilnih kvantnih tačaka (Slika 23b), je određen pomoću TEM. Izbor modela koji najbolje opisuje zavisnost prečnika kvantnih tačaka od pozicije maksimuma fluorescencije, baziran je na dva kriterijuma: (i) kriterijum srednje kvadratne greške, odnosno koeficijenta determinacije R^2 , (bolji je model koji ima manju vrednost srednje kvadratne greške, odnosno veću vrednost R^2) i (ii) kriterijum širine intervala poverenja, uži interval znači precizniju ocenu prosečnog prečnika. Kod hidrofobnih kvantnih tačaka (slika 8a), prečnik varira između 2 i 4,5 nm, a linearni i eksponencijalni model daju slične vrednosti za R^2 (0,888 i 0,898, respektivno). Kako je linearni model imao uži interval poverenja, on je odabran kao model koji bolje opisuje ovu zavisnost. U slučaju hidrofilnih kvantnih tačaka (slika 8b), čiji je prečnik varirao između 2 i 7,1 nm, izabran je eksponencijalni model kao precizniji jer je imao veću vrednost za R^2 , 0,948 u odnosu na 0,904 za linearni model. Vrednosti dprečnika za CdSe i CdSe/Se kvantne tačke određene fluorescentnom metodom (koristeći kalibracione krive sa Slike 23), su upoređene sa odgovarajućim vrednostima dobijenim ostalim metodama, Tabela 6 i Tabela 7, respektivno.

Na Slici 24 prikazana je ekscitaciono-emisiona matrica CdSe/ZnS komercijalnih kvantnih tačaka (EviTag 605). Kao što je već rečeno, promena pobudne talasne dužine dovodi do sistemskih varijacija u fluorescentnom intenzitetu, jer ova promena dovodi do promene udela pojedinih komponenti u zbirnom spektru. Na taj način moguće je detektovati sve fluorofore u multifluorofornom sistemu. U ovom eksperimentu fluorofore su frakcije nanočestica sa različitim prečnicima. Broj komponenti u ekscitaciono-emisionim matricama određen je EFA metodom. Rezultati ove metode prikazani su na Slika 25a i sugerišu prisustvo dve ili tri komponente, ali oblici emisionih profila komponentu ocenjenih multivarijacionom rezolucijom krivih su potvrdili prisustvo dve komponente koje su prezentovane na Slika 25b. Ovakav rezultat

upućuje na zaključak da EviTag 605 sadrži dve frakcije nanočestica (sa dva različita prečnika). Koristeći pozicije njihove maksimalne fluorescencije, određeni su prečnici ovih frakcija na osnovu eksponencijalnog regresionog modela i oni su iznosili 3,1 i 3,7 nm.

Tabela 6. Prečnik hidrofobnih kvantnih tačaka ocenjen apsorpcionom, fluorescentnom i AFM metodom

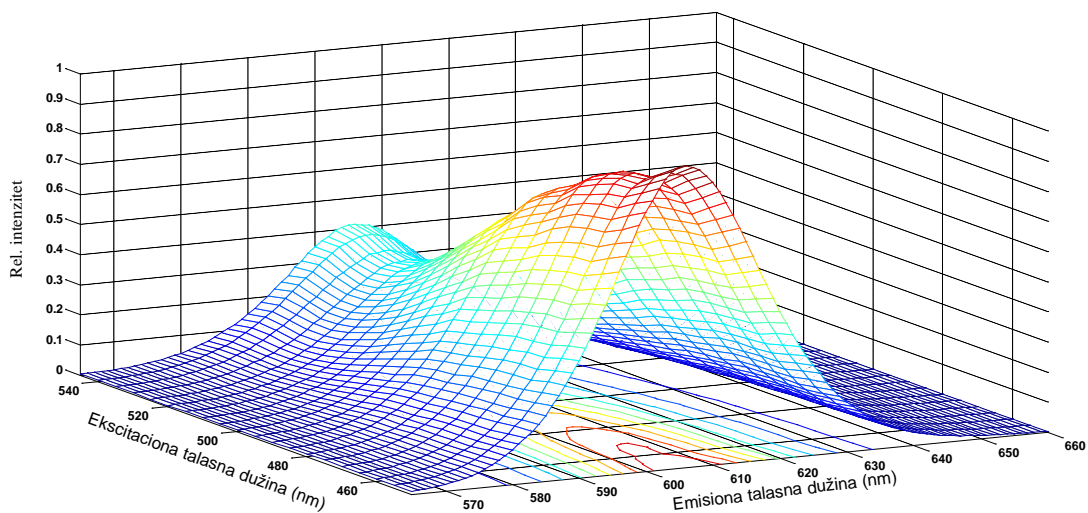
| $\lambda_{max}^{em} (nm)$ | Prečnik nanočestice (nm) | | |
|---------------------------|--------------------------|----------------|------|
| | Apsorbancija | Fluorescencija | AFM |
| 596 | 4,4 | 4 | |
| 505 | 2 | 2,1 | |
| 531 | 2,5 | 2,6 | |
| 559 | 3,3 | 3,2 | |
| 524 | 2,7 | 2,5 | |
| 578 | 3,3 | 3,6 | |
| 573 | 3,4 | 3,5 | |
| 573 | 3,4 | 3,5 | |
| 579 | 3,5 | 3,7 | 3,5 |
| 542 | 2,9 | 2,9 | |
| 548 | 3 | 3 | 2,85 |
| 554 | 3,3 | 3,1 | |

Tabela 7. Prečnik komercijalnih hidrofobnih kvantnih tačaka (EviTag) i njihove vrednosti ocenjene pomoću TEM i fluorescentne spektroskopije

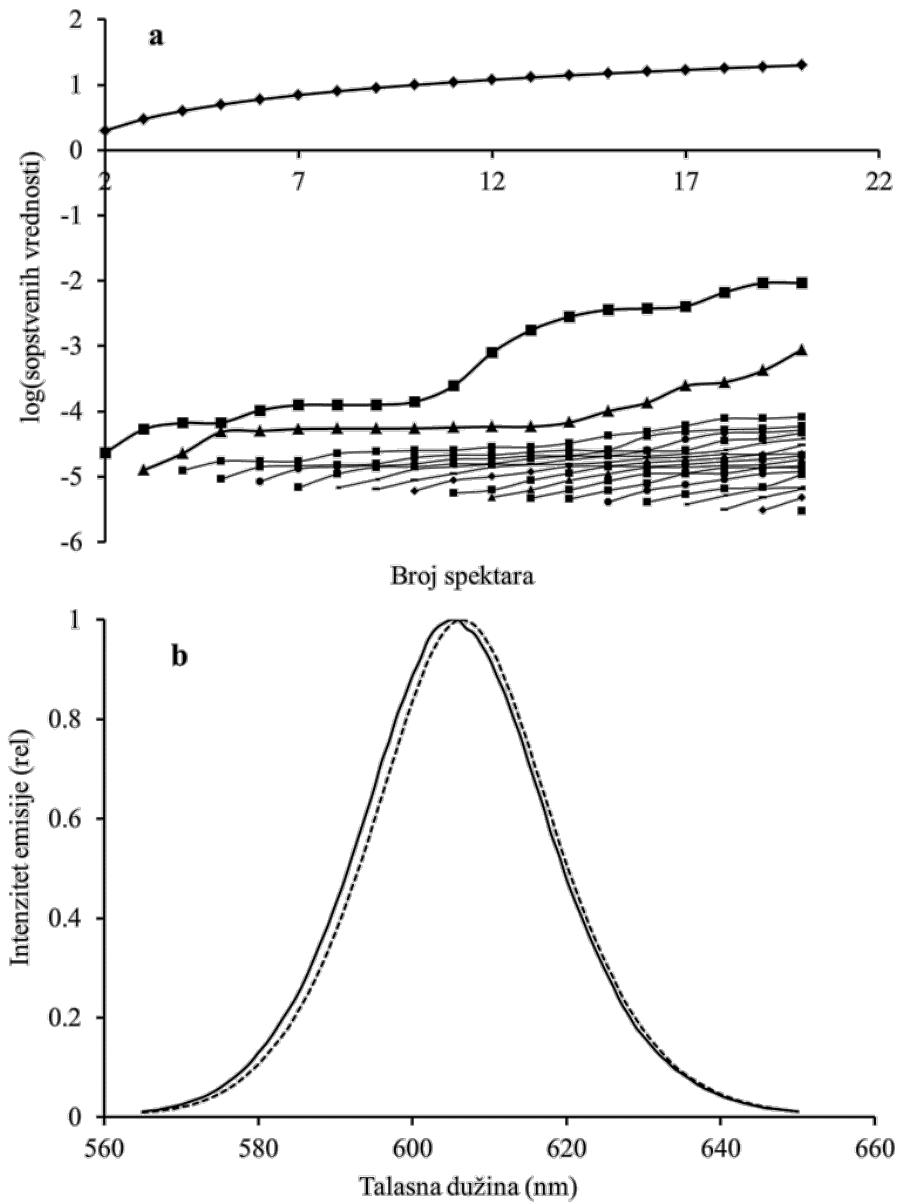
| $\lambda_{max}^{em} (nm)$ | Prečnik nanočestice (nm) | | |
|---------------------------|--------------------------|-----|----------------|
| | EviTag | TEM | Fluorescencija |
| 490 | 2 | 2,6 | 2,6 |
| 518 | 2,3 | 3 | 3 |
| 562 | 2,9 | 4,5 | 3,9 |
| 605 | 4,4 | 4,6 | 5,1 |
| 620 | 5 | 5,3 | 5,5 |
| 656 | 7,1 | 7 | 6,8 |

Na Slici 26 su prikazani emisioni spektri hidrofobnih CdSe kvantnih tačaka rastvorenih u hloroformu i snimljenih pobudom na različitim talasnim dužinama, sa korakom od 5 nm. Na Slici 27a reprezentovan je odgovarajući 2D grafik ekscitaciono-emisione matrice, sa koga se može uočiti promena emisionih spektara, odnosno pomeranje njihovih maksimuma sa promenom pobudne talasne dužine. Ovo pomeranje navodi na *a priori* zaključak da uzorak ove kvantne tačke sadrži više od jedne frakcije. Odgovarajući EFA dijagram prikazan je na Slici 27b i on

sugeriše prisustvo četiri komponente u integralnim spektrima, odnosno prisustvo četiri frakcije različitih prečnika u analiziranom uzorku.



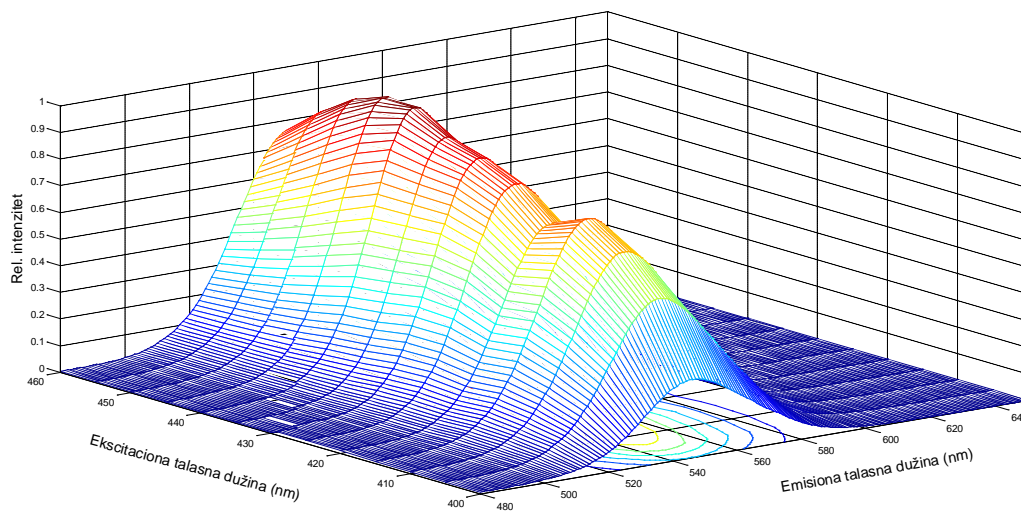
Slika 24. Emisioni spektri (sa kontur plotom) komercijalnih EviTag 605 hidrofilnih kvantnih tačaka posle pobuđivanja na različitim talasnim dužinama



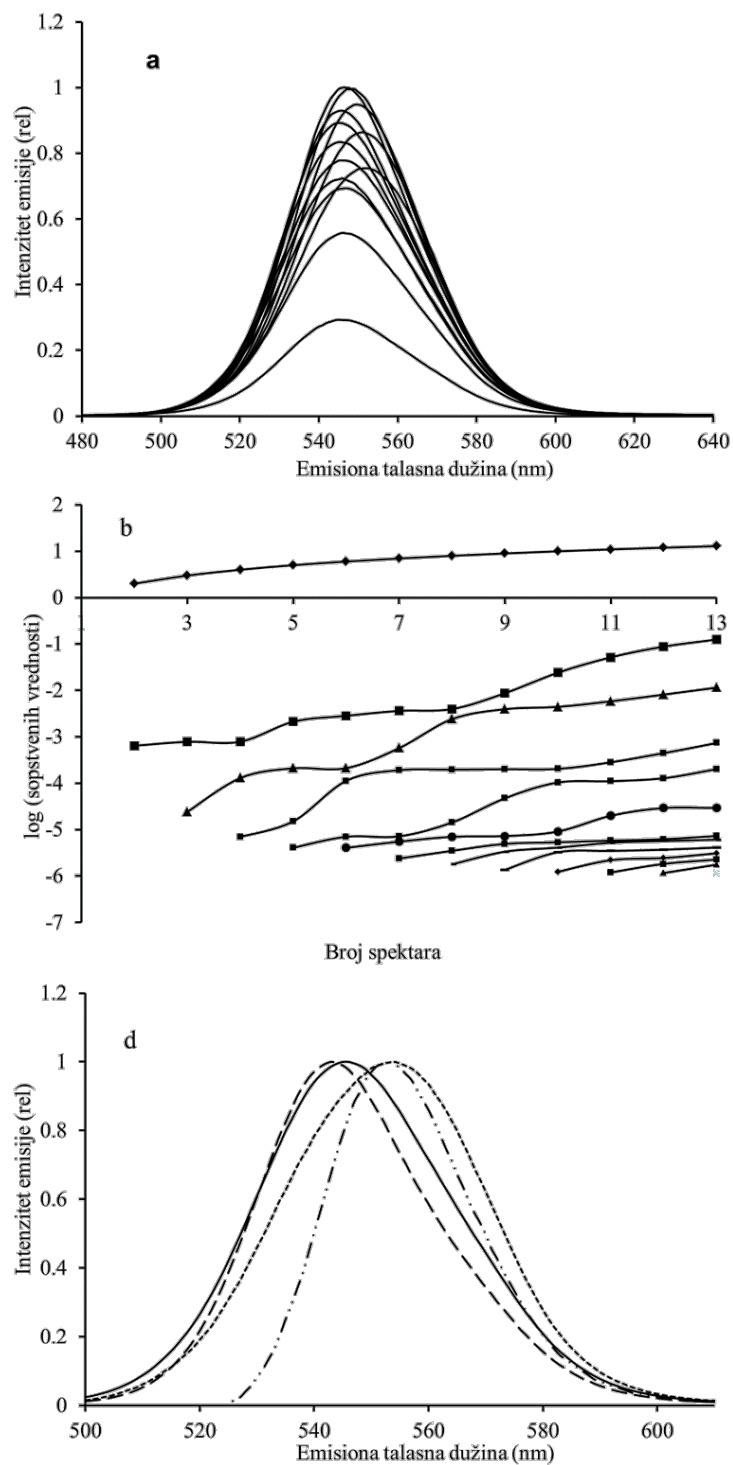
Slika 25. Rezultati dekompozicije emisionih spektara komercijalnih EviTag 605 hidrofilnih kvantnih tačaka: EFA dijagram (a) i emisioni profili komponenti (b)

Pomoću linearnog regresionog modela koji opisuje oblik zavisnosti prečnika hidrofobnih kvantnih tačaka od pozicije maksimuma fluorescencije, ocenjeni su prečnici ovih frakcija koji su iznosili: $2,89 \pm 0,14$, $2,95 \pm 0,13$, $3,10 \pm 0,12$ i $3,12 \pm 0,12$ nm. Emisioni profili ovih frakcija,

koji su dobijeni multivarijacionom rezolucijom krivih, prikazani su na Slika 27c. Dve frakcije imaju skoro identične pozicije maksimuma fluorescencije, ali različit spektralni oblik.



Slika 26. Emisioni spektri (sa kontur plotom) hidrofobnih CdSe kvantnih tačaka posle pobuđivanja na različitim talasnim dužinama



Slika 27. Emisioni spektri hidrofobnih CdSe kvantnih tačaka (a), rezultati EFA analize (b) i emisioni profili lomponenti (c)

Poznato je da su kvantne tačke monodisperzne ukoliko su proizvedene na visokim temperaturama u organskim rastvaračima i kao takve imaju uske fluorescentne trake. S druge

strane, hidrofilne kvantne tačke imaju veći opseg prečnika zbog nehomogenog širenja, a time i šire trake⁹⁰. Velika vrednost koeficijenta determinacije, između pozicije maksimuma fluorescencije i prečnika, kako hidrofobnih tako i hidrofilnih kvantnih tačaka, znači da je određivanje prečnika na bazi pozicije maksimuma fluorescencije vrlo pouzdana metoda. Ovo je važno, tim pre što je određivanje prečnika kvantnih tačaka, manjeg od 10 nm, generalno teško⁸⁹. U slučaju hidrofobnih kvantnih tačaka, oba regresiona modela i linearni i eksponencijalni, imaju slične vrednosti koeficijenta determinacije, ali konačno je odabran linearni model jer ima uži interval poverenja. S druge strane, kod hidrofilnih nanočestica, izabran je eksponencijalni model za određivanje prečnika, jer ima veću vrednost koeficijenta determinacije. Uopšteno, postoji eksponencijalna zavisnost između pozicije apsorpcionog pika i prečnika kvantnih tačaka⁸⁵, koja može voditi sličnoj zavisnosti i između pozicije maksimuma fluorescencije i prečnika nanočestica. Rezultati prikazani u ovom delu rada, pokazuju da je određivanje prečnika nanočestica na bazi maksimuma fluorescencije, vrlo osetljiva metoda, čak i u slučaju malih nanočestica. U Tabeli 6 i Tabeli 7, pokazano je dobro slaganje prečnika nanočestica dobijenih fluorescentnom metodom i prečnika određenih apsorpcijom, TEM i u nekoliko slučajeva pomoću AFM. Prirodno je pretpostaviti da metodologija određivanja prečnika nanočestica bazirana na matematičko-statističkoj povezanosti između pozicije maksimuma fluorescencije i njihovog prečnika može biti primenjena na sve fluorescentne nanočestice koje imaju dostupne serije dobro definisanih uzoraka za konstrukciju kalibracionih krivih.

Prednost fluorescentne metode u odnosu na apsorpcionu, može se uočiti sa Slike 26. Apsorpciona traka nudi ograničene i manje precizne informacije, nasuprot fluorescenciji koja pruža pune spektralne informacije. Preciznije određivanje pozicije trake u fluorescentnom spektru, nasuprot apsorpcionom, vodi ka pouzdanijem određivanju dimenzije nanočestice. Zbog činjenice da su emisije trake potpuno definisane i nezavisne od ostalih spektralnih karakteristika, za razliku od apsorpcionih traka, moguće je analizirati uzorke kvantnih tačaka koji sadrže frakcije čestica sličnih prečnika, upotrebom merne procedure koja podrazumeva postepeno pobuđivanje nanočestica na različitim talasnim dužinama, kombinovana sa matematičko-statističkim metodama spektralne analize, kao što je ilustrovano (Slika 25 i Slika 27). Ovakav tip analize nije moguće primeniti na apsorpcionim spektrima jer su oni jako preklapljeni. Isto tako, fluorescentna spektroskopija zahteva male količine uzorka i ono što je jako bitno, može biti primenjena i na čvrstim uzorcima. S druge strane, TEM je nedvosmisleno

najmoćnija tehnika za karakterizaciju nanočestica i njihovih konjugata⁸⁹. Mada TEM nudi lak način merenja jezgra nanočestica, analiziranje TEM slika zahteva korišćenje softvera za analizu istih, čime ovaj metod postaje sporiji u odnosu na fluorescenciju⁹¹. Dodatna prednost fluorescentne metode ogleda se i u činjenici da se ona može brzo primeniti za proveru čistoće nanočestica u toku njihove proizvodnje kao i za određivanje nepoznatog prečnika. Isto tako TEM instrumenti nisu lako dostupni u poređenju sa spektrofluorimetrima. Ova poređenja demonstriraju isplativost, preciznost i pouzdanost fluorescentne metode u poređenju sa ostalim metodama za određivanje veličine nanočestica. Analitičke krive kreirane na bazi TEM za dati tip nanočestice, mogu biti iskorišćene za određivanje njihove veličine na bazi fluorescentne metode.

Što se tiče AFM, ona je jednostavnija za upotrebu nego TEM, daje dobro slaganje prečnika sa ostalim metodama i kao takva može biti potencijalno korišćena kao metod za određivanje veličine nanočestica, odnosno za konstrukciju kalibracionih krivih.

Nehomogena priroda rastvorenih nanočestica, prouzrokovana prisustvom njihovih frakcija različitih veličina, može zamagliti diskretnu prirodu elektronskih tranzicija individualnih kvantnih tačaka⁹². Rezultati našeg rada su pokazali da je pomeranje emisionog maksimuma kvantnih tačaka sa promenom ekscitacione talasne dužine (Slika 27), povezano sa prisustvom frakcija različitih veličina. Multivarijaciona rezolucija krivih primenjena u dekompoziciji emisionih spektara je pokazala broj frakcija prisutnih u rastvoru, kao i njihove prečnike, dok je apsorpcioni spektar pokazao prisustvo samo jedne komponente veličine 3 nm⁸⁵. Ova analiza je pokazala da je fluorescentni metod osetljiviji na varijaciju veličine nanočestica nego UV-Vis apsorpcioni metod, a takođe je pokazala da fluorescentna tehnika, u kombinaciji sa podesnim matematičko-statističkom alatom u dekompoziciji emisionih spektara nanočestica, može biti pouzdana metoda za skrining nehomogenosti rastvora. Ovo zapažanje može biti primenjeno u određenim praktičnim procedurama, na pr., u procesu prečišćavanja nanočestica u toku njihove sinteze, a takođe i u ispitivanju stabilnosti njihovih rastvora. Činjenica da u određenim slučajevima, neki nanokristali sa istom pozicijom apsorpcionog pika imaju različite prečnike⁸⁶, ilustruje koliko je opisana fluorescentna metoda korisna u verifikaciji homogenosti rastvora nanočestica.

4.1.5. Primena multivarijacione faktorske analize u ispitivanju razlika u nanoarhitekturi ćelijskog zida divljeg tipa i cad c i cad d mutanata *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana je pogodan eksperimentalni model za proučavanje strukture i arhitekture ćelijskog zida, jer ima potpuno sekvenciran genom i veliku kolekciju okarakterisanih mutanata. Njeni mutanti se relativno lako mogu generisati i mogu biti dosta informativni u proučavanju sinteze ćelijskog zida. Takođe mogu biti dobar model za proučavanje strukturnih promena ćelijskog zida, koje nastaju usled mutacija u biosintezi konstitutivnih polimera ćelijskog zida, kao što je lignin. Iako lignin pruža šumskom drveću i agronomski važnim biljkama, mehaničku potporu i otpornost na biotički i abiotički stres, on loše utiče na probavu stočne hrane i poželjno je da se ukloni iz celuloznih vlakana prilikom industrijske proizvodnje celuloze i papira⁹³.

U poslednjem koraku biosinteze monolignola, pre oksidativne polimerizacije u ćelijskom zidu, dolazi do redukcije cinamilaldehida u cinamil alkohol pomoću enzima cinamil alkohol dehidrogenaze (CAD). *CAD-C* i *CAD-D* su primarni geni uključeni u biosintezu lignina od koniferil i sinapil alkohola, u ćelijama *A. Thaliana*. Ovi mutanti proizvode jače fenotipove, u poređenju sa bilo kojom dikotiledon angiospermom sa poremećenim CAD. Fenotipske posledice ovih strukturnih promena u ćelijskom zidu su sporiji rast, smanjenje veličine, rano starenje (pod suvim uslovima ili permanentnom svetlošću). S jedne strane, nema razlike u nelignifikovanim tkivima (floem), između mutanata i divljih tipova biljaka. S druge strane, *CAD* mutacije utiču na nanoarhitekturne karakteristike ćelijskog zida fibera (potporne ćelije oko sprovodnih snopića) i ksilema (spvodne ćelije)⁹⁴. Ova tkiva su interesantna jer je njihov ligninski sastav različit: ksilemske ćelije su lignifikovane uglavnom sa G jedinicom, dok se lignin kod fibera sastoji i od G i od S jedinice.

Proučavanje kompleksne arhitekture ćelijskog zida samo izolacionim metodama nije dovoljno, jer izolovanje pojedinih komponenti ne pruža informacije o intermolekulskim vezama, a sem toga, menja i prirodnu konformaciju i način povezivanja komponenti sadržanih u ćelijskom zidu. FTIR spektroskopija je pogodna tehnika za proučavanje kompleksnih hemijskih veza u netaknutim sekcijama tkiva, odnosno u proučavanju korelacije između spektralnih

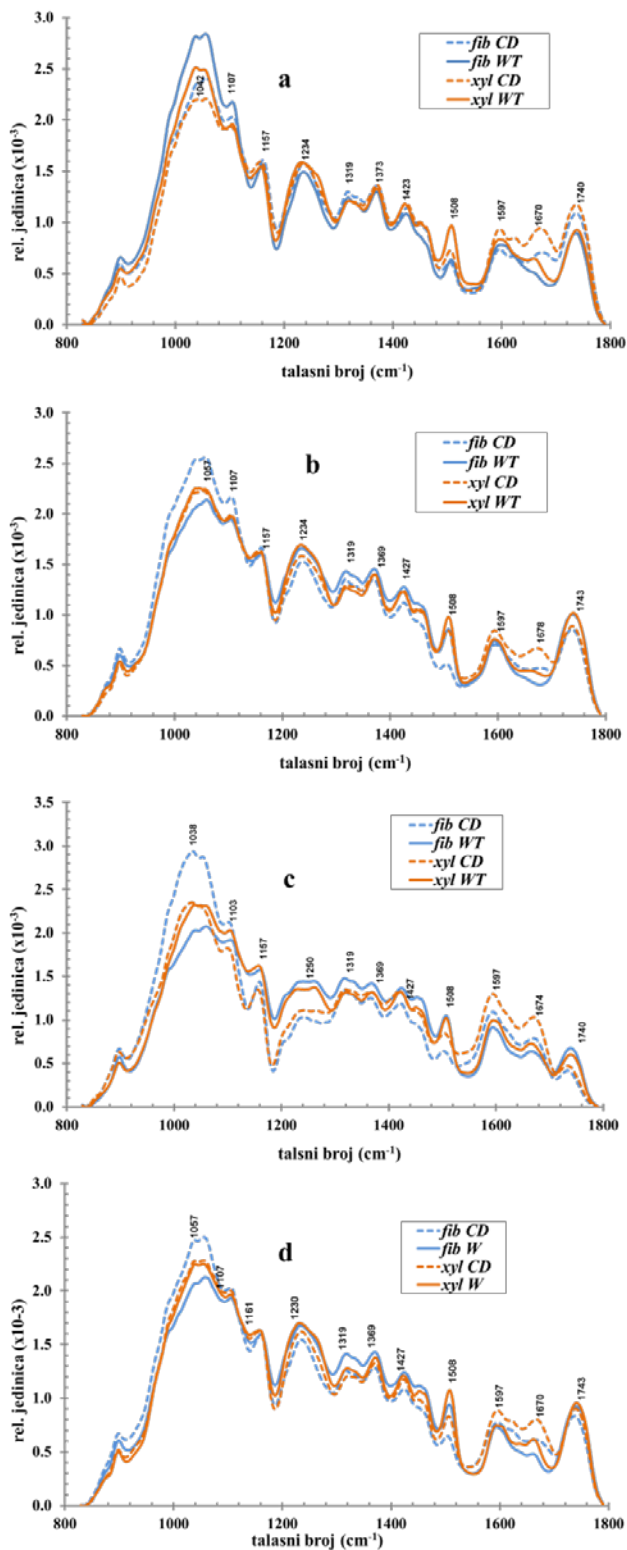
promena i promena u arhitekturi ćelijskog zida^{95,96,97}. FTIR spektri su vrlo osetljiv indikator hemijskih i strukturnih varijacija vibrirajućih molekula.

Interpretacija FTIR spektara je otežana, zbog preklapanja traka i pomeranja njihovih maksimuma prouzrokovanih različitim molekulskim interakcijama, koje su posledica građe ćelijskog zida koji predstavlja mrežu celuloze, lignina, hemiceluloze i strukturnih proteina, isprepletenih na kompleksan način. Razvoj statističkih metoda dopušta identifikaciju spektralnih promena povezanih sa izmenjenim sadržajem pojedinih komponenti ćelijskog zida^{98,97,99}. Kako bi se uporedile nanostrukturne karakteristike divljeg tipa i mutanata *Arabidopsis*, parcijalno su ekstrahovane pojedine komponente ćelijskog zida, upotrebom različitih rastvarača koji selektivno rastvaraju ove (makro)molekule. Kao rastvarači korišćeni su dioksan/voda, vodoniok peroksid/sirćetna kiselina i amonijak. Izbor rastvarača je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima^{100,101,102}. Ovi rastvarači selektivno ekstrahuju pojedine komponente. Rastvarač dioksan/voda (9/1 v/v) uglavnom ekstrahuje lignin¹⁰² i jednostavne fenolne komponente¹⁰³, H₂O₂/sirćetna kiselina-polisaharide i jednostavne fenole, dok amonijum hidroksid ekstrahuje jednostavne fenole.

Posle ekstrakcije su snimljeni FTIR spektri analiziranih sekcija tkiva i sprovedeno je upoređivanje ćelija divljeg tipa *Arabidopsis*, sa ćelijama *cad-c cad-d* mutanta. Ovo ispitivanje je urađeno sa ciljem da ispita da li informacije dobijene pomoću FTIR spektara mogu biti povezane sa hemijskim razlikama između ovih tipova *Arabidopsis*, odnosno razlikama u nanostrukturnim karakteristikama njihovih ćelijskih zidova. Isto tako, cilj je i da se ispita da li fiber i ksilem različito utiču na ove razlike.

Rezultati

Na Slici 28 su prikazani FTIR spektri tretiranih i netretiranih ćelijskih zidova divljeg tipa *A. thaliana* i *cad-c cad-d* mutanta u spektralnom regionu od 1800 do 800 cm⁻¹. Očigledno je da sve vibrirajuće strukture korespondiraju sa glavnim konstituentima ćelijskog zida: celulozom, ligninom i hemicelulozom. U celom spektralnom opsegu se mogu uočiti razlike između divljeg tipa i mutanata, između fibera i ksilema, kao i između različitih tretmana. Za kvantifikaciju ovih



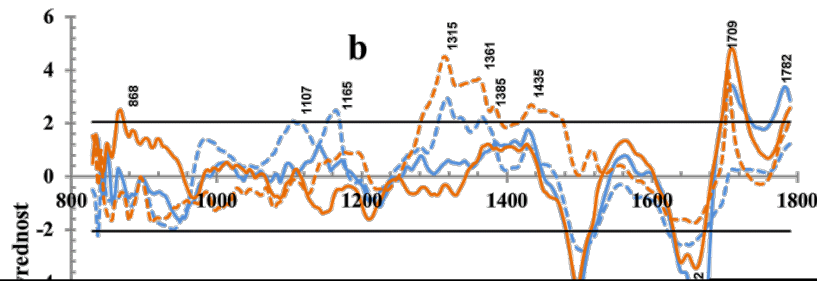
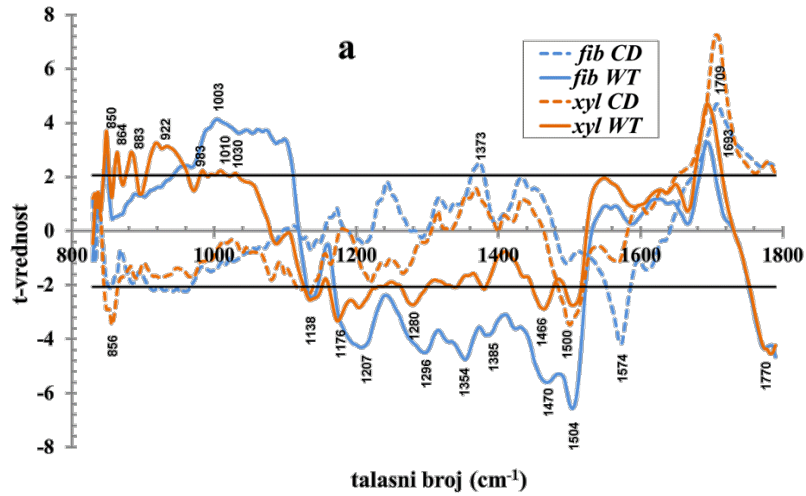
Slika 28. FTIR spektri tretiranih i netretiranih ćelijskih zidova *A. thaliane* u regionu 1800 do 800 cm⁻¹: a) tretman sa rastvaračem dioksan/voda, b) sirćetna peroksid, c) amonijum hidroksid i d) netretirani uzorci

razlika korišćene su razlike spektara i samo pikovi sa statistički značajnom razlikom su diskutovani. Uticaj tretmana na fiber i ksilem, kako kod divljeg tipa, tako i kod mutanata, prikazan je na Slici 29. Kao referentni spektar za sve razlike, korišćen je spektar netretiranog tkiva, pri čemu pozitivna razlika pokazuje veću apsorpciju u tretiranom tkivu, a negativna manju.

Tretman (a): dioksan/voda daje kompleksne spektralne promene u poređenju sa netretiranim biljkama, i kod fibera i ksilema, jer ovaj rastvarač ekstrahuje lignine i jednostavne fenolne komponente i na taj način dolazi do „popuštanja” ćelijskog zida (Slika 28a i d).

Tretman (b): H_2O_2 /sirćetna kiselina uklanja hemicelulozu, pektin i najverovatnije jednostavne fenolne komponente¹⁰⁰, ali lignin i celulozu ostavlja netaknutim. Na Slika 29b prikazane su razlike spektara između tretiranih i netretiranih biljaka.

Tretman (c): NH_3 uklanja fenolne kiseline koje su estarski povezane sa hemicelulozom, pri čemu ne uklanja one koje su povezane sa ligninom¹⁰¹. U amonijačnom ekstraktu nisu nađene ostale fenolne komponente (potvrđeneo HPLC analizom).

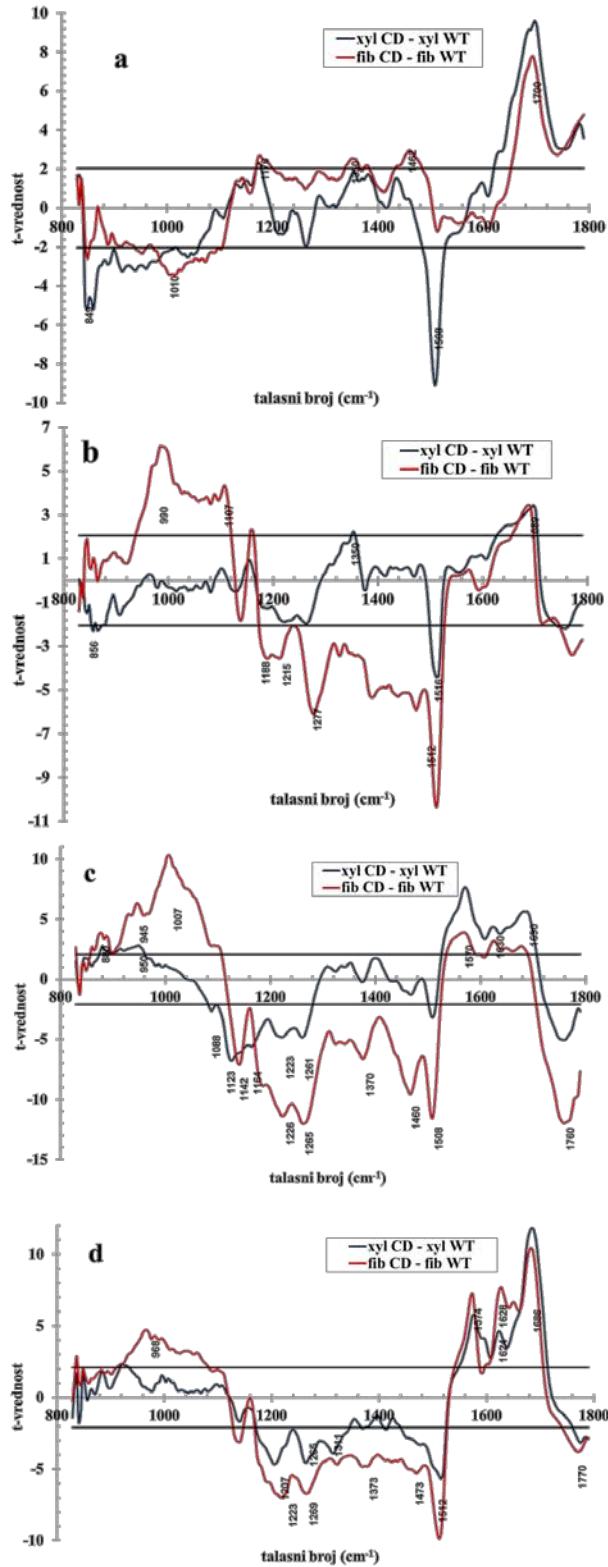


Slika 29. Razlike između tretiranih i netretiranih uzoraka, za fiber i ksilem i za tri primenjena tretmana; a) dioksan-voda, b) peroksid-sirćetna kiselina i c) amonijak¹³

¹³ t-vrednost je sračunata za svaki talasni broj na osnovu statistike bazirane na Studentovoj raspodeli za dva nezavisna uzorka.

Prethodne analize su pokazale da se interfascikularni fiber i ksilem mogu razlikovati na poprečnom preseku, uprkos malim veličinama *Arabidopsis* stabljike. Ova tkiva su interesantna jer su njihove ligninske kompozicije različite: ksilemske ćelije su lignifikovane uglavnom sa G jedinicom, dok se lignin kod fibera sastoji i od G i od S jedinice.

Razlike između divljeg tipa i mutanata su objašnjene u prethodnom tekstu, a u cilju detaljnijih ispitivanja variracija u strukturi njihovih ćelijskih zidova analizirane su razlike spektara odgovarajućih tkiva pri čemu su tkiva divljeg tipa korišćena kao referentna. Na Slika 31 prikazane su razlike u FTIR spektrima između dvostrukog mutanta (*cad-c cad-d*) i divljeg tipa *Arabidopsis thaliana*, dobijenih primenom tri tretmana, kao i netretiranog uzorka. Može se uočiti da je kod svih tretmana, kao i kod netretiranih biljaka, razlika između spektara mutanata i divljeg tipa veća kod fibera nego kod ksilema. Ove razlike su u nekim spektralnim regionima pozitivne, a u nekim negativne. Pozitivne razlike znače da je IR apsorpcija u mutantima intenzivnija nego u divljem tipu, dok negativne razlike imaju suprotno značenje. Intenzivnija apsorpcija može poticati od većeg broja vibrirajućih struktura koje apsorbuju na datom talasnom broju, od veće polarnosti veza ili zbog oba razloga. U svim tretiranim i netretiranim uzorcima i ksilema i fibera, pozitivna razlika u spektralnom području C=O vibracija ($1686-1700\text{ cm}^{-1}$), se može pripisati konjugovanim aldehidima, što znači da mutanti imaju veću količinu ove strukture. Ovo je jedna od glavnih karakteristika ovog mutanta, jer je cinamil-aldehid glavni monomer za lignin, umesto alkohola⁹⁴.



Slika 30. Razlike između divljeg tipa i mutanata za fiber i ksilem, za tri primenjena tretmana; a) dioksan-voda, b) peroksid-sirćetna kiselina, c) amonijum hidroksid i d) netretirani uzorak

Razlike FTIR spektara između divljeg tipa i mutanata postoje čak i kod netretiranih biljaka i jače su kod fibera (Slika 30d). Kod fibera, u spektralnom regionu $914-1084\text{ cm}^{-1}$ postoji razlika, koja je karakteristična za celulozu i hemicelulozu (ksiloglukan, arabinoksilan), dok je kod ksilema ovaj deo spektra bio pod uticajem mutacija. Ovi rezultati indikuju veću količinu polisaharida u mutiranim fiberima, dok je njihov sadržaj u ksilemu i kod divljeg tipa i kod mutanata, približno jednak. Negativna razlika, koja je izraženija kod fibera, u regionu koji odgovara celulozi i skeletnim vibracijama lignina, kod ksilema ($1176-1527\text{ cm}^{-1}$) i fibera ($1169-1527\text{ cm}^{-1}$) pokazuje veću količinu tih polimera u divljem tipu nego u mutantima. Negativna traka na 1223 cm^{-1} ukazuje na veću količinu kondenzovane G jedinice u divljem tipu i očiglednija je u fiberu.

Pozitivne razlike se uočavaju u regionu karakterističnom za C=O i C=C veze kod lignina i fenolnih kiselina u ksilemu od $1550-1716\text{ cm}^{-1}$ i fiberu od $1601-1709\text{ cm}^{-1}$. Pozitivna razlika, koja je izraženija kod fibera, u regionu ligninskog bočnog lanca (C=C na 1628 cm^{-1}) ukazuje na to da postoji više neizreagovanih dvostrukih veza u bočnim lancima kod mutanata nego u divljem tipu. U mutantima postoji veća količina konjugovanih aldehida, a razlika je približno ista za fiber i za ksilem. To znači da je su aldehidi prisutni u oba mutirana tkiva u jednakim količinama. Negativna razlika u regionu $1725-1770\text{ cm}^{-1}$ ukazuje da su estarske veze više prisutne u divljem tipu nego u mutantima.

Na Slici 30 prikazane su razlike spektara divljeg tipa i mutanata, za obe vrste tkiva. Razlike spektara između mutanata i divljeg tipa, nakon tretiranja dioksanom (Slika 30a), imaju različite karakteristike u odnosu na netretirane biljke. Ove razlike su manje nego u netretiranim biljkama i logično je pretpostaviti da preostala celuloza i lignin imaju manje strukturne razlike nego u netretiranim ćelijskim zidovima. Ovo dalje znači da dioksan uklanja glavne strukturne razlike između mutanata i divljeg tipa. Najveća razlika se uočava u spektralnom regionu koji potiče od celuloze i aromatičnih skeletnih vibracija lignina. Negativni pik razlike na 1508 cm^{-1} , je intenzivniji kod ksilema, ukazujući da više lignina preostaje u divljem tipu nego u mutantu. Poznato je da dioksan uklanja manje kondenzovani lignin i kako su ksilemski i fiber pikovi preokrenuti nakon tretmana, može se zaključiti da je kondenzovani lignin više zastupljen u divljem tipu ksilema, nego u fiberu. Odsustvo pika na 1508 cm^{-1} u razlici spektara fibera,

dokazuje da je lignin u fiberu, više osetljiv na ekstrakciju, nego u ksilemu. Pozitivan pik na oko 1700 cm^{-1} , potiče od stare (netrtirane) strukture, ali i zbog novoformiranih vibrirajućih struktura.

Tretman peroksid/sirćetna kiselina ne daje značajne razlike u spektrima ksilema između divljeg tipa i mutanata (Slika 30b). Jedina značajna razlika se uočava na poziciji 1512 (1516 u ksilemu) cm^{-1} i 1689 (1697 u ksilemu) cm^{-1} , koje pripadaju ligninskom skeletu, konjugovanim aldehidima i karboksilnim vibracijama, respektivno. Negativni ligninski pik na 1516 cm^{-1} , u tretiranom ksilemu, ima istu magnitudu kao i netretirani uzorak. Isti zaključak važi i za fiber (Slika 31b i d). Ovo razmatranje predstavlja jak dokaz da tretman peroksid/sirćetna ostavlja lignin netaknutim. Ovaj spektralni region potiče od konjugovanih aldehidnih struktura na koje tretman jednako deluje i kod ksilema i fibera. Pozitivni pikovi koji pripadaju ksilemu i fiberu, imaju relativno istu magnitudu i pre i posle tretmana, ali mnogo nižu posle tretmana. Ovo indikuje da je veliki pozitivni vrh konjugovanih aldehidnih struktura u mutantu, znatno umanjen tretmanom (Slika 30b i d). Pik na 1689 (1687) cm^{-1} , uključuje intenzivnu karboksilnu vibraciju formiranu posle tretmana. Nasuprot ksilemu, razlika spektara fibera su značajne u skoro celom spektralnom regionu. Najočiglednije promene u razlici spektara se pojavljuju u spektralnom regionu celuloze i ostalih ugljenih hidrata (940 to 1120 cm^{-1}), pri čemu tretman ovu razliku između mutanata i divljeg tipa pojačava. Budući da ova široka traka pripada celulozi i drugim ugljenim hidratima, njen rast nakon tretmana može se objasniti time da se ove komponente uklanjaju ovim tretmanom, ali je uklanjanje veće kod mutanata, jer je pik pozitivan. U regionu 1176 do 1530 cm^{-1} , karakterističnom za vibracije koje potiču od aromatičnih skeleta lignina, celuloze, pektina, fenolne kiseline i hemiceluloze, postoji negativna razlika i kod tretiranih i kod netretiranih fibera. Promene u razlici spektara nakon tretmana, ukazuju na eliminaciju ovih komponenti, sa dominantnim efektom uklanjanja fenolne komponente. Ovaj zaključak potvrđuje pik na 1188 i 1215 cm^{-1} koja pripada $\text{C}=\text{O}$ u konjugovanim estarskim vezama i $\text{C}-\text{O}$ plus i $\text{C}-\text{C}$ plus $\text{C}=\text{O}$ vibracija, respektivno. Ove spektralne razlike gotovo nema kod tretiranih biljaka, za razliku od netretiranih. To znači da je približno ista količina celuloze i lignina ostala u mutantu i divljem tipu ksilema, nakon uklanjanja fenolnih jedinjenja, pektina i hemiceluloze. Međutim, isti tretman kod fibera daje negativne razlike vrhova u istom regionu, što znači da divlje biljke imaju veće količine lignina i celuloze od mutanata. Razlike spektara i ksilema i fibera u regionu 1170 – 1530 cm^{-1} , nakon tretmana sa dioksanom (Slika 30a), ukazuje da oba tkiva imaju istu količinu lignina i celuloze. Višak lignina koja se vidi fiberu nakon obrade s peroksid/sirćetnom kiselinom

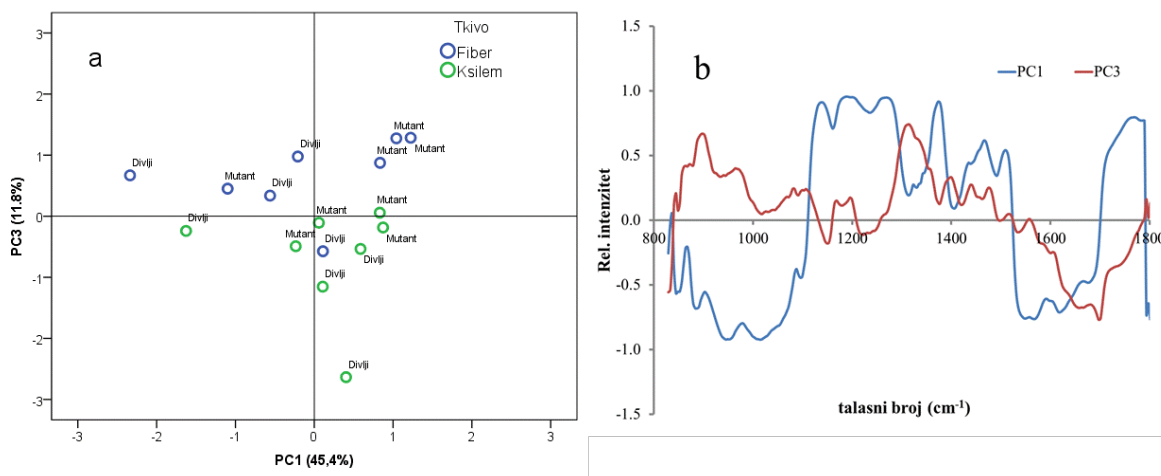
može se pripisati manje kondenzovanom ligninu, koji je uklonjen dioksanom, ali ne i peroksid/sirćetnom kiselinom. To znači da ove strukture nema u mutantima ili da se jače vezuje na ćelijske zidove divljeg tipa. Efekat ovog tretmana je veći od efekta dioksan/vode.

Efekat tretmana NH_4OH je više izražen na fiberu nego na ksilemu (Slika 30c). Intenzivni negativni pik na 1760 cm^{-1} i 1223 (1226) cm^{-1} , u opsegu estarskih vibracija, indikuje da je mnogo više fenolnih alkohola uklonjeno iz fibera mutanata, nego iz divljeg tipa. Ova promena je u saglasnosti sa negativnom razlikom u regionu celuloze i pektina, kako u fiberu (1123 - 1523 cm^{-1}), tako i u ksilemu (1080 - 1280 cm^{-1}). Ova situacija upućuje na zaključak, da posle ovog tretmana dolazi verovatno do promene u simetriji ovih molekula. Ligninske aromatične skeletne vibracije (1508 cm^{-1}), nestaju u razlici spektara ksilema u poređenju sa netretiranim biljkama. Budući da ovaj tretman ne uklanja lignin, može se zaključiti da se promene u simetriji grupa unutar makromolekula događaju nakon tretmana. Promene u simetriji ligninskih molekula uočavaju se i kod fibera. Ovo je vidljivo kroz povećanje intenziteta vibracije na 1460 cm^{-1} , nakon tretmana u odnosu na razlike spektara netretiranih biljaka. Ova traka potiče iz asimetrične vibracije CH_2 veza u ligninu^{104,105,106}. Tretman amonijakom ne utiče na $\text{C}=\text{C}$ u bočnom lancu ligninski jedinica (vibracija na 1630 cm^{-1} se ne vidi u razlici spektara tretiranih/netretiranih biljaka, ni u divljem tipu ni u mutantu, Slika 30c). S druge strane, u razlici spektara mutant/divlji tip i za tretirane i za netretirane biljke, ta vibracija je vidljiva (Slika 30c). To znači da je bočni lanac $\text{C}=\text{C}$, ligninske jedinice, u različitim okruženjima u divljem tipu i mutantu nije promenjen pod uticajem amonijačnog tretmana, ali postaje očigledan kada se upoređuju divlji tip i mutant. Ovo je još jedan dokaz da je opšta nanoarhitektura drugačija u divljem tipu i mutantu.

Analizom razlike spektara divljeg tipa i mutanta za obe vrste tkiva, prikazanih na Slici 30, može se uočiti da divlji tip i mutant se razlikuju u količini lignina, hemiceluloza i celuloze, kao i aldehida i konjugovanih aldehida. Promenjeno je okruženje lignina i celuloze u mutantu u odnosu na divlji tip, što uslovljava veću dostupnost rastvaračima. Ove osobine su različito izražene u fiberu i ksilemu.

U cilju dodatnog ispitivanja diskriminacije između efekata različitih tretmana na fiber i ksilem, primenjena je Analiza glavnih komponenti. Ova analiza je bazirana na korelacionoj matrici, primenjena je na spektralnu oblast od 800 - 1800 cm^{-1} i pokazala je da prve tri glavne komponente „apsorbuju“ 45,4%, 28,6% i 11,8% varijanse originalnih podataka, respektivno.

Analiziranjem pozicioniranosti vektora uzoraka u prostoru prve i druge, prve i treće i druge i treće glavne komponente, uočeno je da se najbolja diskriminacija između uzoraka dobija na osnovu prve i treće glavne komponente (Slika 31a). Spektri svih uzoraka su predstavljeni kao vektori u dvodimenzionom prostoru pri čemu su uzorci sa sličnijim spektrima pozicionirani blizu jedan drugog. Uzorci fibera uglavnom imaju pozitivna opterećenja na PC3, dok su uzorci ksilema imaju negativna opterećenja na ovoj komponenti. Unutar fibera divlji tip je uglavnom pozicioniran u drugom kvadrantu, što znači da ima negativna opterećenja sa prvom glavnom komponentom, dok uzorci mutanta imaju uglavnom pozitivna opterećenja sa ovom komponentom. Uzorci ksilema su pozicionirani uglavnom u četvrtom kvadrantu. Kako bi identifikovali talasne brojeve koji su odgovorni za ovu diskriminaciju, ocenjeni su skorovi ovih komponenti (Slika 31b). Činjenica da se fiber mutant uglavnom nalazi u gornjem desnom kvadrantu ukazuje da su kod njega najizraženije funkcionalne grupe sa talasnim brojevima u oblastima 1300-1500 (celuloza), 850-1000 (hemiceluloze, pektin) i 1750-1800 (estri polisaharida i lignina) cm^{-1} . To što je fiber divlji tip uglavnom pozicioniran u gornjem levom kvadrantu ukazuje da su kod njega najizraženije funkcionalne grupe sa talasnim brojevima u oblasti 850-1100 (hemiceluloze, pektin), 1000-1100 (odredjene hemiceluloze), 1300-1400 (celuloza) i 1500-1700 (lignin) cm^{-1} . Ksilem divlji tip se uglavnom nalazi u donjem desnom kvadrantu, što znači da su kod njega najizraženije funkcionalne grupe sa talasnim brojevima oko 1160 (celuloza), 1230 (kondenzovani lignin) i 1700 (aldehidi) i 1760 (estri polisaharida i lignina) cm^{-1} . Ksilem mutant se nalazi blizu osa, što znači da u njemu nijedna spektralna komponenta, odnosno odgovarajuća molekulska vrsta, nema veliku varijabilnost. Ove spektralne analize pokazuju da u fiberu divljeg tipa je zastupljeniji lignin nego kod ostalih uzoraka, dok je u fiberu mutanta izraženo prisustvo estara polisaharida. U ksilemu divljeg tipa je izražen kondenzovani lignin i aldehidne strukture.

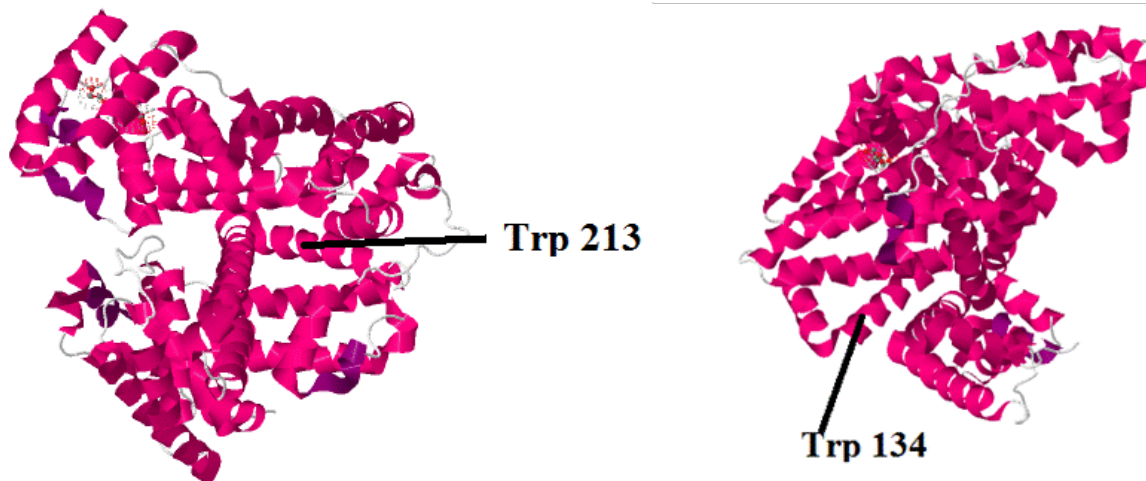


Slika 31. (a) Pozicioniranje uzoraka *Arabidopsis thaliana* po vrsti tkiva u prostoru prve i treće glavne komponente i (b) skorovi prve i treće glavne komponente

4.1.6. Proučavanje interakcije BSA i ATP

Serum albumin je jedan od najproučavanijih proteina, jer je najzastupljeniji protein krvne plazme, sa koncentracijom 50 g/l. Glavna fiziološka funkcija serum albumina je u održavanju osmotskog pritiska i pH vrednosti krvi¹⁰⁷, vrši transport lekova i liganada vezanih za njega i na taj način smanjuje njihovu serumsku koncentraciju. Najčešće proučavani albumini su: humani serum albumin (HSA), goveđi serum albumin (BSA), konjski serum albumin (ESA) i mišji serum albumin (RSA). Serum albumin je rastvorljiv, više-domenski protein, eliptičnog oblika, niske unutrašnje viskoznosti, bez prostetičkih grupa, stabilan i dostupan po povoljnoj ceni u vrlo čistom obliku. Trodimenziona struktura serum albumina je određena kristalografski. BSA ima brojne biohemijske i farmakokinetičke aplikacije i dosta fleksibilan oblik koji je promenljiv u zavisnosti od okruženja i vezanih liganada. Zahvaljujući elastičnoj strukturi, albumin lako vraća prvobitnu strukturu zbog prisustva disulfidnih mostova, koji mu daju jačinu, posebno u fiziološkim uslovima. Čak i nakon kidanja ovih mostova, albumin ih može ponovo uspostaviti i povratiti svoju prvobitnu strukturu¹⁰⁷. Primarnu strukturu BSA predstavljaju 583 aminokiselinska ostatka, molekulska masu od 66.5 kDa i 17 disulfidnih veza, što rezultira formiranjem devet petlji¹⁰⁸ (slika 33). Za razliku od HSA koji ima samo jedan triptofanski ostatka, BSA ima dva triptofanska ostatka na pozicijama 134 i 213, sa fluorescentnim emisionim spektrima

pozicioniranim na približno 340 do 350 nm, što ukazuje na njihovu unutrašnju lokalizaciju u prirodnoj konformaciji, pri čemu je ostatak 134 više izložen rastvaraču, odnosno bliži je površini proteina.

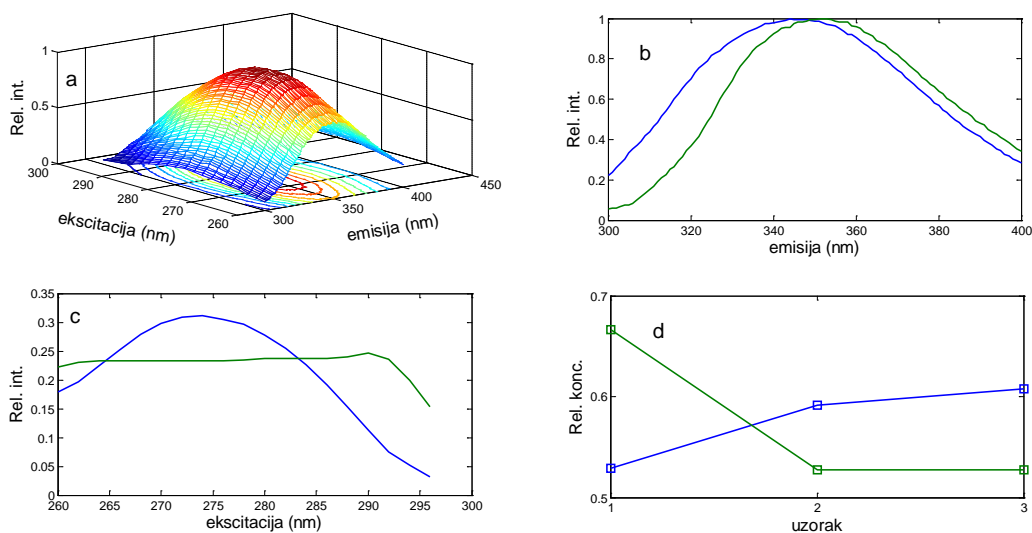


Slika 32. Trodimenziona struktura BSA kreirana pomoću „Protein Data Bank¹⁴”

4.1.6.1. Interakcija BSA i ATP odmah posle mešanja

Na slici Slici 33 prikazani su rezultati primene PARAFAC dekompozicije na tenzor formiran od tri ekscitaciono-emisione matrice, snimljenim u rastvorima sa tri različita odnosa BSA:ATP. Snimanje je izvršeno odmah nakon mešanja. Broj komponenti je određen „core-consistency” metodom. PARAFAC metoda je primenjena na tenzoru izgrađenom od tri pomenute matrice. Emisioni profili ovih komponenti prikazani su na Slici 34b, a odgovarajuće pozicije maksimuma fluorescencije su na 342 i 353 nm. Spektralni profil na poziciji 342 nm odgovara triptofanskom ostatku na poziciji 213, a profil sa maksimumom emisije na 353 korespondira triptofanskom ostatku na poziciji 134.

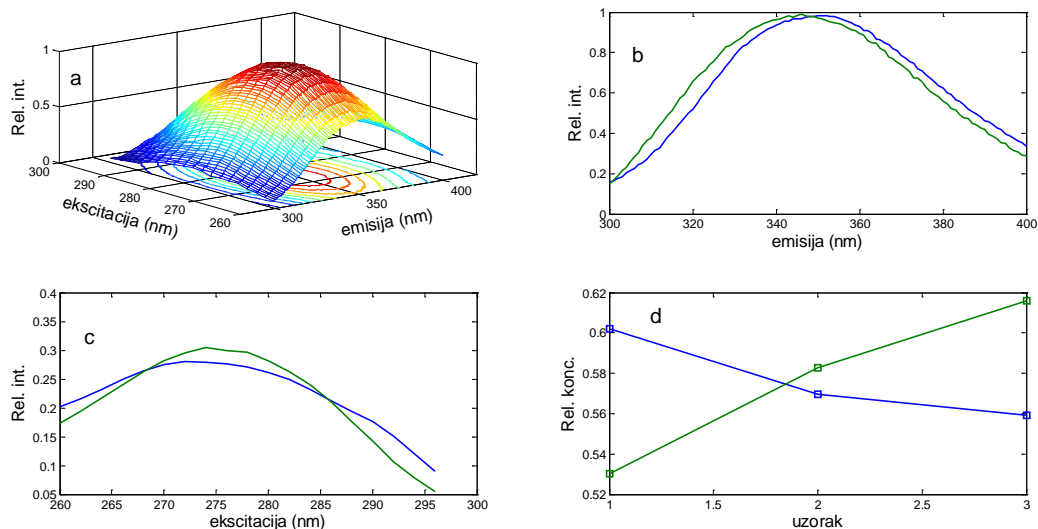
¹⁴ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>



Slika 33. Rezultati PARAFAC analize interakcije BSA i ATP odmah nakon mešanja proteina i liganda: a) ekscitaciono-emisiona matrica za odnos BSA-ATP 1:1, b) emisijski profili ekstrahovanih spektralnih komponenti, c) ekscitacioni profili i d) koncentracijski profili triptofanskih komponenti.

4.1.6.2. Interakcija BSA i ATP dva sata posle mešanja

Na slici Slici 34 prikazani su rezultati primene PARAFAC dekompozicije na tenzoru formiranom od tri ekscitaciono-emisione matrice, snimljenim na istim rastvorima kao i u prethodnom odeljku, ali dva sata nakon mešanja. Emisioni profili ekstrahovanih komponenti prikazani su na Slici 34b. Rezultati PARAFAC analize na ovom tenzoru su dali dva emisiona profila od kojih je profil triptofanske komponente sa emisionim maksimumom na 353 nm ostao nepromenjena, dok se profil komponente sa pozicijom na 345 nm pomerio na poziciju od 338 nm (Tabela 9).

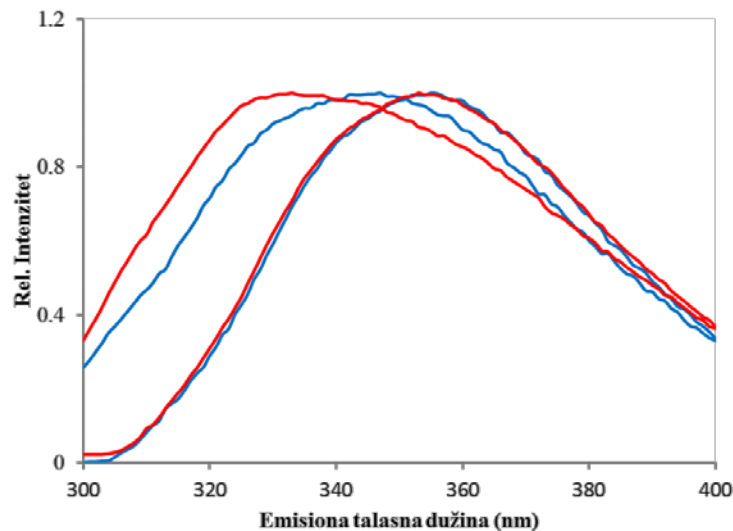


Slika 34. Rezultati PARAFAC analize interakcije BSA i ATP dva sata nakon mešanja proteina i liganda: a) ekscitaciono-emisiona matrica za odnos BSA-ATP 1:1, b) emisijski profili ekstrahiranih spektralnih komponenti, c) ekscitacioni profili i d) koncentracijski profili

4.1.6.3. Analiza spektara čistog BSA

Na Slici 35 prikazani su emisijski profili triptofanskih komponenti ocenjenih PARAFAC metodom, u uzorcima čistog BSA odmah nakon pripreme uzorka i istog uzorka nakon dva dana stajanja¹⁵. Triptofanski ostatak koji se nalazi na površini proteinske globule ima neizmenjen emisijski profil, dok je emisijski profil koji odgovara triptofanskom ostatku unutar globule pomeren ka većoj energiji za 15 nm, sa 346 na 331 nm. Kako emisijski profili triptofanskih komponenti lociranih na površini globule najviše liče na emisijski profil čistog triptofana, to ovaj plavi pomeraj pokazuje da u periodu od dva dana dolazi do većeg umotavanja proteina u domenu u kome se nalazi ovaj triptofanski ostatak.

¹⁵ Emisioni spektri BSA dva sata nakon pravljivanja rastvora nisu se razlikovali od onih snimljenih odmah nakon pravljivanja rastvora.



Slika 35. Triptofanske komponente ekstrahovane PARAFAC metodom: uzorci BSA neposredno nakon pripremanja (plavo), uzorci BSA nakon dva dana (crveno)

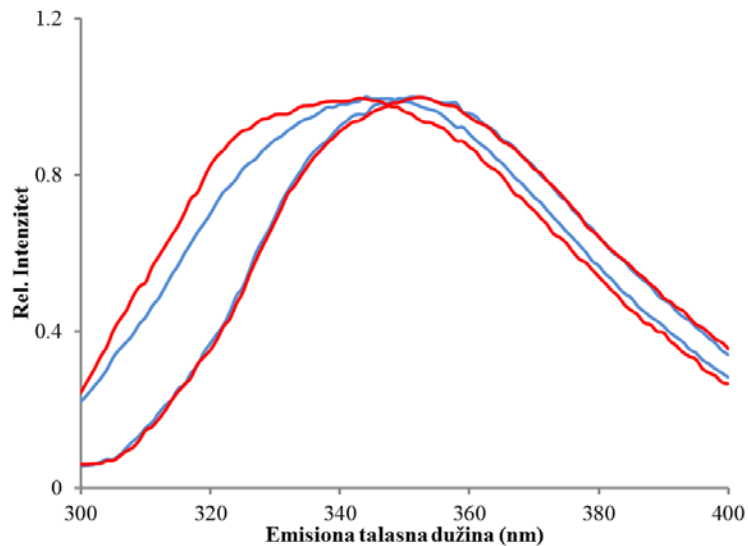
U Tabeli 9 su prikazane pozicije maksimuma emisije ekstrahovanih komponenti za uzorke BSA:ATP, kao i za čist BSA.

Tabela 8. Pozicije maksimuma fluorescencije komponenti analiziranih uzoraka dobijene PARAFAC metodom

| Vreme | Uzorak | Komponenta 1 | Komponenta 2 |
|----------|--------------------|--------------|--------------|
| Odmah | BSA:ATP 1:1 | 345 | 353 |
| | BSA:ATP 2:1 | | |
| | BSA:ATP 1:2 | | |
| Nakon 2h | BSA:ATP 1:1 | 338 | 353 |
| | BSA:ATP 2:1 | | |
| | BSA:ATP 1:2 | | |
| Čist BSA | BSA odmah | 346 | 354 |
| | BSA nakon dva dana | 331 | 354 |

Na Slici 36 prikazani su emisijski profili triptofanskih ostataka ocenjenih PARAFAC metodom u uzorcima dobijenim mešanjem BSA i ATP u tri odnosa (1:1, 1:2 i 2:1), odmah nakon mešanja i dva sata nakon toga. Triptofanska komponenta sa emisijom maksimumom na 353 nm

je ostala nepromenjena, dok se komponenta sa pozicijom na 345 nm pomerila na poziciju od 338 nm. Ovo pomeranje može se objasniti interakcijom BSA i ATP koja je triptofanski ostatak unutar globule učinila više hidrofobnim, odnosno prelazak proteina u umotaniju konformaciju. Triptofan na površini proteina nije promenio okruženje, usled čega odgovarajuća spektralna komponenta nije promenila položaj.



Slika 36. Triptofanske komponente ekstrahovane PARAFAC metodom: uzorci BSA:ATP neposredno nakon pripremanja (plavo), uzorci BSA:ATP nakon dva sata (crveno)

5. ZAKLJUČCI

- i) U okviru ispitivanja novih hemijskih nanosenzora od ZnS:Mn²⁺ fluorescentnih nanočestica, funkcionalizovanih PAMAM-OH dendrimerima treće generacije, koji se mogu koristiti kao senzori za Cd²⁺, fluorescentna komponentna analiza korišćenjem Multivarijacione rezolucije krivih je pokazala da dendrimer ne utiče na strukturu ZnS:Mn²⁺. Intenzitet trake na 595 nm, ima linearni odnos sa koncentracijom Cd²⁺ i on može biti korišćen za kvantifikaciju ovog metala u vodi.
- ii) Vezano za razvoj fluorescentnog senzora na bazi karbonskih tačaka, za detekciju Ag⁺, analiza fluorescentnih spektara je pokazala da je kompleks CDs-MSA stabilan nakon dodavanja Ag⁺ jona, pri čemu dolazi do gašenja intenziteta fluorescencije statičkim mehanizmom. Limit detekcije i limit kvantifikacije su 385,8 nM i 1,2 μM, respektivno. Nije primećena interferencija sa jonima ostalih metala prisutnih u rastvoru, što indikuje veliku selektivnost ove karbonske tačke za detekciju Ag⁺ jona.
- iii) U okviru ispitivanja fluorescentnih CdSe kvantnih tačaka dopiranih sa poroznim fosfatnim heterostrukturama (PPH-NH₂@CdSe), rezultati analize fluorescentnih spektara pomenutih kvantnih tačaka su pokazali da se njihove emisione trake ne menjaju pod uticajem čvrstog nosača (da su fotostabilne) i da mogu biti korišćene kao agens za označavanje otisaka prstiju. Ova fotostabilnost PPH-NH₂@CdSe se pokazala kao osobina koja poboljšava kvalitet slike latentnih otisaka prstiju na neporoznim površinama, u odnosu na uobičajene forenzičke tehnike.
- iv) Za određivanje prečnika hidrofobnih (CdSe) i hidrofilnih (CdSe:ZnS) kvantnih tačaka korišćene su Razvijena faktorska analiza i Multivarijaciona rezolucija krivih. Ove metode su primenjene u dekompoziciji serije fluorescentnih spektara ovih kvantnih tačaka, kako bi se ekstrahovali emisijski profili frakcija kvantnih tačaka koje imaju različit prečnik u rastvoru. Određivanje prečnika je bazirano na njegovoj povezanosti sa pozicijom maksimuma emisije. Rezultati su pokazali da je fluorescentna spektroskopija jednostavna i pouzdana metoda u oceni prečnika kvantnih tačaka. U kombinaciji sa pogodnim

statističkim tehnikama u dekompoziciji fluorescentnih spektara kvantnih tačaka, može biti brz i pouzdan metod za „skrining” (ne)homogenosti rastvora kvantnih tačaka.

- v) U analizi FTIR spektara uzoraka divljeg tipa i *cad-c cad-d* mutanta tretiranih različitim rastvaračima u cilju parcijalne ekstrakcije komponenti ćelijskog zida, T test je pokazao da se divlji tip i mutant razlikuju u količini lignina, hemiceluloza i celuloze, kao i aldehida i konjugovanih aldehida. Promenjeno je okruženje lignina i celuloze u mutantu u odnosu na divlji tip, što uslovljava veću dostupnost rastvaračima. Ove osobine su različito izražene u fiberu i ksilemu. Rezultati analize glavnih komponenti su pokazali da u fiberu divljeg tipa je zastupljeniji lignin nego kod ostalih uzoraka, dok je u fiberu mutanta izraženo prisustvo estara polisaharida. U ksilemu divljeg tipa je izražen kondenzovani lignin i aldehydne strukture.
- vi) PARAFAC analiza fluorescentnih spektara BSA je pokazala prisustvo dve spektralne komponente koje odgovaraju triptofanima u različitom okruženju, jedan na površini proteina a drugi unutar proteinske globule blizu površine. Stajanjem rastvora čistog BSA dolazi do konformacione promene BSA, u kojoj unutrašnji triptofan menja okruženje, a protein postaje umotaniji. U interakciji sa ATP-om dolazi do konformacionog prelaza dva sata nakon mešanja, u kome unutrašnji triptofan menja okruženje i protein takođe prelazi u umotaniju konformaciju.

6. LITERATURA

1. Bro, R., Andersson, C. A. & Kiers, H. A. PARAFAC2-Part II. Modeling chromatographic data with retention time shifts. *Journal of Chemometrics* **13**, 295–309 (1999).
2. Khakimov, B, Amigo, JM, Bak, S & Engelsen, SB. Plant metabolomics: resolution and quantification of elusive peaks in liquid chromatography–mass spectrometry profiles of complex plant extracts using multi-way decomposition methods. *Journal of Chromatography A* 1266, 84-94 (2012).
3. Martin, FL, German, MJ, Wit, E & Fearn, T. Identifying variables responsible for clustering in discriminant analysis of data from infrared microspectroscopy of a biological sample. *Journal of Computational biology* **14(9)**,1176-84. (2007).
4. Kelly, JG, Trevisan, J & Scott, AD. Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular structure: a multistage approach linking computational analysis with biomarkers. *Journal of proteome Research* (2011). doi:10.1021/acs.jproteome.6b00161
5. Pearson, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos Mag A* (1901).
6. Cauchy, A. Sur l'équation à l'aide de laquelle on détermine les inégalités séculaires des mouvements des planètes. *Blanchard* **9**, (1829).
7. Jolliffe, I. Principal Component Analysis. *New York Springer* (2002).
8. Jaumot, J, de Juan, A & Tauler, R. MCR-ALS GUI 2.0: new features and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **140**, 1-12 (2015).
9. Shariati-Rad, M & Hasani, M. Application of multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) for secondary structure resolving of proteins. *Biochimie*, **91(7)**,850-856 (2009).
10. Tauler, R, Maeder, M & Juan, D. A. Multiset data analysis: extended multivariate curve resolution. *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*, The University of Newcastle's Digital Repository, Volume **2**, p. 473-505 (2009).
11. Berbel, F, Kapoya, E, Díaz-Cruz, JM & Ariño, C. Multivariate resolution of coeluted peaks in hyphenated liquid chromatography–Linear sweep voltammetry. *Electroanalysis* **15**, 499-508 (2003).

12. Nion & Sidiropoulos. Adaptive Algorithms to Track the PARAFAC Decomposition of a Third-Order Tensor. *IEEE Transactions on Signal Processing* **57**, 2299-2310 (2009).
13. Ho, CN, Christian, GD & Davidson, ER. Application of the method of rank annihilation to quantitative analyses of multicomponent fluorescence data from the video fluorometer. *Analytical Chemistry* **50** 1108-11130(1978).
14. Ho, CN, Christian, GD & Davidson, ER. Application of the method of rank annihilation to fluorescent multicomponent mixtures of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Analytical Chemistry* **52**, 1071–1079 (1980).
15. Murphy, K., Stedmon, C., Graeber, D. & Bro, R. Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. *Analytical Methods* **5**, 6557–6566 (2013).
16. Smilde, A., Bro, R. & Geladi, P. Multi-way analysis: applications in the chemical sciences. *Wiley* (2005).
17. Fischer, D, Bayer, T, Eichhorn, KJ & Otto, M. In-line process monitoring on polymer melts by NIR-spectroscopy. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **359**, 74-77 (1997).
18. Guo, JH, Skinner, GW & Harcum, WW. Application of near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical solid dosage form. *Drug development and Industrial Pharmacy* **25**, 1267-70 (1999).
19. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1767**, 1073-1101 (2007).
20. Mann, TL & Krull, UJ. Fluorescence polarization spectroscopy in protein analysis. *Analyst* **128**, 313-7 (2003).
21. Scotter, C. Use of near infrared spectroscopy in the food industry with particular reference to its applications to on/in-line food processes. *Food Control* **1**, 142-149 (1990).
22. Green, SA. Applications of fluorescence spectroscopy to environmental chemistry. *Thesis (Ph. D.)--Massachusetts Institute of Technology, Dept. of Earth, Atmospheric, and Planetary Sciences*, (1992).
23. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer* (2006).
24. Krishna, M. & Periasamy, N. Fluorescence of organic dyes in lipid membranes: site of solubilization and effects of viscosity and refractive index on lifetimes. *Journal of Fluorescence* **8**, 81–91 (1998).

25. Chalfie, M, Tu, Y, Euskirchen, G & Ward, WW. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-5 (1994).
26. Christensen, J., Nørgaard, L., Bro, R. & Engelsen, S. Multivariate autofluorescence of intact food systems. *Chemical reviews* **106**, 1979–1994 (2006).
27. Hezinger, A., Teßmar, J. & Göpferich, A. Polymer coating of quantum dots—a powerful tool toward diagnostics and sensorics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **68**, 138–152 (2008).
28. Hamdan, M. H. *Cancer Biomarkers: Analytical Techniques for Discovery*. Wiley (2007).
29. Radotić, K, Melø, TB, Leblanc, RM & Yousef, YA. Fluorescence and phosphorescence of tryptophan in peptides of different length and sequence. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **157**, 120-128 (2016).
30. Ladokhin, Alexey S.; Malak, Henryk M.; Johnson, Michael L.; Lakowicz, Joseph R.; Wang, L.; Steggle, A. W.; Holloway, Peter W. Frequency-domain fluorescence of mutant cytochrome b5. *Proceedings of the SPIE* **1640** 562–569 (1992).
31. Szabo, AG & Rayner, DM. Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* **102**, 554-563 (1980).
32. Burstein, EA & Vedenkina, NS. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochemistry and Photobiology* **18**, 263-79 (1973).
33. Ladokhin, A. S. Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis: Encyclopedia of Analytical Chemistry. *John Wiley & Sons Ltd* 5762–5779, (2000).
34. Griffiths, PR. Introduction to vibrational spectroscopy. Handbook of vibrational spectroscopy. Wiley (2002).
35. Sandt, C, Féraud, O, Oudrhiri, N & Bonnet, ML. Identification of spectral modifications occurring during reprogramming of somatic cells. *PloS one* **7**, (2012).
36. Ami, D, Mereghetti, P, Natalello, A & Doglia, SM. FTIR spectral signatures of mouse antral oocytes: molecular markers of oocyte maturation and developmental competence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1813**, 1220-1229 (2011).
37. Ami, D, Natalello, A, Zullini, A & Doglia, SM. Fourier transform infrared microspectroscopy as a new tool for nematode studies. *FEBS letters* **576**, 297-300 (2004).
38. Aksoy, C. & Severcan, F. Role of vibrational spectroscopy in stem cell research. *Journal of Spectroscopy* **27**, 167–184 (2012).

39. Chan, JW & Lieu, DK. Label-free biochemical characterization of stem cells using vibrational spectroscopy. *Journal of biophotonics* **2**, 656-68 (2009).
40. Heraud, P, Ng, ES, Caine, S, Qing, CY & Hirst, C. Fourier transform infrared microspectroscopy identifies early lineage commitment in differentiating human embryonic stem cells. *Stem cell Research* **4**, 140-147 (2010).
41. Bellisola, G & Sorio, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res* **2**, 1-21 (2012).
42. Baker, MJ, Gazi, E, Brown, MD & Shanks, JH. FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. *British journal of Cancer* **99**, 1859-1866 (2008).
43. Walsh, MJ, German, MJ, Singh, M & Pollock, HM. IR microspectroscopy: potential applications in cervical cancer screening. *Cancer letters* **246**, 1-11 (2007).
44. Petibois, C & Deleris, G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. *Trends in Biotechnology* **24**, 455-62 (2006).
45. Wood, BR, Chernenko, T, Matthaus, C & Diem, M. Shedding new light on the molecular architecture of oocytes using a combination of synchrotron Fourier transform-infrared and Raman spectroscopic mapping. *Analytical Chemistry* **80**, 9065-9072 (2008).
46. Norris, DJ, Yao, N, Charnock, FT & Kennedy, TA. High-quality manganese-doped ZnSe nanocrystals. *Nano Letters* **1**, 3-7 (2001).
47. Zhang, R & Chen, W. Nitrogen-doped carbon quantum dots: facile synthesis and application as a 'turn-off' fluorescent probe for detection of Hg²⁺ ions. *Biosensors and Bioelectronics* **55**, 83-90 (2014).
48. Ju, J & Chen, W. Synthesis of highly fluorescent nitrogen-doped graphene quantum dots for sensitive, label-free detection of Fe (III) in aqueous media. *Biosensors and Bioelectronics* **58**, 219-225 (2014).
49. Wu, P & Yan, XP. Doped quantum dots for chemo/biosensing and bioimaging. *Chemical Society Reviews* **42**, 5489-5521 (2013).
50. Sarkar, S, Maity, AR & Karan, NS. Fluorescence energy transfer from doped to undoped quantum dots. *The Journal of Physical Chemistry* **117**, 21988-21994 (2013).
51. Alonso, B, Miranda, MS, Martínez, Á. & Casado, CM. Thiolated DAB dendrimers and CdSe quantum dots nanocomposites for Cd (II) or Pb (II) sensing. *Talanta* **88**, 403-407 (2012).

52. Herrera-Gutiérrez, ME, Sellar-Pérez, G & da Silva, J. Thiolated DAB dendrimer/ZnSe nanoparticles for C-reactive protein recognition in human serum. *Talanta* **99**, 574-9 (2012).
53. Yamamoto, D, Koshiyama, T & Watanabe, S. Synthesis and photoluminescence characterization of dendrimer-encapsulated CdS quantum dots. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **411**, 12-17 (2012).
54. Wei, Y, Hao, H, Zhang, J, Hao, X & Dong, C. Sensitive and selective detection of l-tryptophan using Mn–ZnS QDs as the ratiometric emission probe. *Analytical Methods* **6**, 3227-3230 (2014).
55. Park, Y, Koo, C, Chen, HY, Han, A & Son, DH. Ratiometric temperature imaging using environment-insensitive luminescence of Mn-doped core–shell nanocrystals. *Nanoscale* **5**, 4944-50 (2013).
56. Campos, B. B. *et al.* ZnS:Mn nanoparticles functionalized by PAMAM-OH dendrimer based fluorescence ratiometric probe for cadmium. *Talanta* **134**, 317–24 (2015).
57. Ray, SC, Saha, A., Jana, N. R. & Sarkar, R. Fluorescent carbon nanoparticles: synthesis, characterization, and bioimaging application. *The Journal of Physical Chemistry C* **113**, 18546–18551 (2009).
58. Yang, Y. *et al.* One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosan. *Chem. Commun. (Camb.)* **48**, 380–2 (2012).
59. Hou, X, Zeng, F, Du, F & Wu, S. Carbon-dot-based fluorescent turn-on sensor for selectively detecting sulfide anions in totally aqueous media and imaging inside live cells. *Nanotechnology* **24**, (2013).
60. Chandra, S. *et al.* Fabrication of multi-structure nanocarbons from carbon xerogel: a unique scaffold towards bio-imaging. *Chemical Communications* **47**, 8587–8589 (2011).
61. Pan, D *et al.* Cutting sp² clusters in graphene sheets into colloidal graphene quantum dots with strong green fluorescence. *Journal of Materials Chemistry* **22**, 3314-3318 (2012).
62. Lin, F, Pei, D, He, W, Huang, Z & Huang, Y. Electron transfer quenching by nitroxide radicals of the fluorescence of carbon dots. *Journal of Materials Chemistry* **22**, 11801-11807 (2012).

63. Wang, P, Gulians, EA, Meziari, MJ, Qian, H & Sun, YP. Efficient fluorescence quenching in carbon dots by surface-doped metals-disruption of excited state redox processes and mechanistic implications. *Langmuir* **28**, 16141-16147 (2012).
64. Algarra, M. *et al.* Luminescent carbon nanoparticles: effects of chemical functionalization, and evaluation of Ag + sensing properties. *J Mater Chem* **2**, 8342–8351 (2014).
65. Liberti, A, Calabro, G & Chiarotti, M. Storage effects on ninhydrin-developed fingerprints enhanced by zinc complexation. *Forensic science international* **72**, 161-169 (1995).
66. Payne, G. *et al.* A further study to investigate the detection and enhancement of latent fingerprints using visible absorption and luminescence chemical imaging. *Forensic Sci. Int.* **150**, 33–51 (2005).
67. Sodhi, GS & Kaur, J. Chemical methods for developing latent fingerprints. *Journal of Chemical Education* **76**, 488A (1999).
68. Choi, M. J., McDonagh, A. M., Maynard, P. & Roux, C. Metal-containing nanoparticles and nano-structured particles in fingermark detection. *Forensic Sci. Int.* **179**, 87–97 (2008).
69. Gao, F. *et al.* The synthesis of newly modified CdTe quantum dots and their application for improvement of latent fingerprint detection. *Nanotechnology* **22**, 075705 (2011).
70. Hussain, I. *et al.* In situ growth of gold nanoparticles on latent fingerprints-from forensic applications to inkjet printed nanoparticle patterns. *Nanoscale* **2**, 2575–8 (2010).
71. Wang, YF, Yang, RQ, Wang, YJ, Shi, ZX & Liu, JJ. Application of CdSe nanoparticle suspension for developing latent fingermarks on the sticky side of adhesives. *Forensic science International* **185**, 96-99 (2009).
72. Jiménez-Jiménez, J., Rubio-Alonso, M., Quesada, D., Rodríguez-Castellón, E. & Jiménez-López, A. Synthesis and characterisation of acid mesoporous phosphate heterostructure (PPH) materials. *J Mater Chem* **15**, 3466-3472 (2005).
73. Algarra, M, Jiménez-Jiménez, J & Moreno-Tost, R. CdS nanocomposites assembled in porous phosphate heterostructures for fingerprint detection. *Optical Materials* **33**, 893-898 (2011).
74. Kalauzi, A., Mutavdžić, D., Djikanović, D., Radotić, K. & Jeremić, M. Application of asymmetric model in analysis of fluorescence spectra of biologically important molecules. *J Fluoresc* **17**, 319–29 (2007).

75. Algarra, M. *et al.* Fingerprint detection and using intercalated CdSe nanoparticles on non-porous surfaces. *Anal. Chim. Acta* **812**, 228–35 (2014).
76. Mattoussi, H. *et al.* Electroluminescence from heterostructures of poly(phenylene vinylene) and inorganic CdSe nanocrystals. *J Appl Phys* **83**, 7965 (1998).
77. Klimov, VI *et al.* Optical gain and stimulated emission in nanocrystal quantum dots. *Science* **290**, 314–317 (2000).
78. Greenham, NC, Peng, X & Alivisatos, AP. Charge separation and transport in conjugated-polymer/semiconductor-nanocrystal composites studied by photoluminescence quenching and photoconductivity. *Physical review B* **54**, 17628-17637 (1996).
79. Müller, F. *et al.* Quantum dots-a versatile tool in plant science? *J Nanobiotechnology* **4**, 5 (2006).
80. Serpone, N & Khairutdinov, RF. Application of nanoparticles in the photocatalytic degradation of water pollutants. *Studies in Surface Science and Catalysis* **103**, 417-444 (1997).
81. Frasco, MF & Chaniotakis, N. Semiconductor quantum dots in chemical sensors and biosensors. *Sensors* **9**, 7266-7286 (2009).
82. Rogach, A. L., Kornowski, A., Gao, M., Eychmüller, A. & Weller, H. Synthesis and characterization of a size series of extremely small thiol-stabilized CdSe nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B* **103**, 3065–3069 (1999).
83. Mokari, T & Banin, U. Synthesis and properties of CdSe/ZnS core/shell nanorods. *Chemistry of materials* **15**, 3955-3960 (2003).
84. Golan, Y, Hodes, G & Rubinstein, I. Electrodeposited quantum dots. 3. Interfacial factors controlling the morphology, size, and epitaxy. *The Journal of Physical Chemistry* **100**, 2220-2228 (1996).
85. Yu, WW, Qu, L, Guo, W & Peng, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials* **15**, 2854-2860 (2003).
86. Murray, CB & Kagan, CR. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annual Review of Materials Research* **30**, 545-610 (2000).
87. Tonti, D, Mourik, V. F. & Chergui, M. On the excitation wavelength dependence of the luminescence yield of colloidal CdSe quantum dots. *Nano Letters* **4**, 2483–2487 (2004).

88. Wolfgang Parak; Liberato Manna; Friedrich Simmel; Daniele Gerion; Paul Alivisatos. Nanoparticles: From Theory to Application. *Wiley* (2005).
89. Jaiswal, J. K. & Simon, S. M. Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends in cell biology* **14**, 497–504 (2004).
90. William, Y. W., Chang, E., Drezek, R. & Colvin, V. L. Water-soluble quantum dots for biomedical applications. *Biochemical and biophysical research communications* **348**, 781–786 (2006).
91. Rameshwar, T. *et al.* Determination of the size of water-soluble nanoparticles and quantum dots by field-flow fractionation. *J Nanosci Nanotechnol* **6**, 2461–7 (2006).
92. Dabbousi, BO *et al.* (CdSe) ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *The Journal of Physical Chemistry B* **101**, 9463–9475 (1997).
93. Ragauskas, A. J. *et al.* The path forward for biofuels and biomaterials. *science* **311**, 484–489 (2006).
94. Sibout, R, Eudes, A, Mouille, G, Pollet, B & Lapierre, C. CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and-D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**, 2059-76 (2005).
95. McCann, MC, Chen, L & Roberts, K. Infrared microspectroscopy: sampling heterogeneity in plant cell wall composition and architecture. *Physiologia Plantarum* **100**, 729-738 (1997).
96. Wilson, RH, Smith, AC & Kačuráková, M. The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Plant Physiology* **124**, 397-406 (2000).
97. Mouille, G, Robin, S, Lecomte, M & Pagant, S. Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *The Plant Journal* **35**, 393-404 (2003).
98. Coimbra, MA, Barros, A, Rutledge, DN & Delgadillo, I. FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. *Carbohydrate Research* **317**, 145-154 (1999).

99. Hayashi, S, Ishii, T & Matsunaga, T. The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins SHV3 and its homologs play important roles in cell wall organization. *Plant and Cell Physiology* **49**,1522-35 (2008).
100. Deshpande, BP. Observations on the fine structure of plant cell walls I. Use of permanganate staining. *Annals of Botany* **40**, 443-446 (1976).
101. Harris, PJ & Hartley, RD. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* **259**, 508-510 (1976).
102. Higuchi, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. *In Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications* **1**, 1-19 CRC Press, Florida (1980).
103. Willemsse, M. & Emons, A. Autofluorescence and HPLC analyses of phenolics in *Zea mays* L. stem cell walls. *Acta botanica Neerlandica* **40**, 115-124 (1991).
104. Faix, O. Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics, and Technology of Wood* **45**, 21-27 (1991).
105. Faix, O. Fourier transform infrared spectroscopy. Methods in lignin chemistry. *Springer-Verlag* (1992).
106. Agarwal, UP & Atalla, RH. Raman spectroscopic evidence for coniferyl alcohol structures in bleached and sulfonated mechanical pulps. *ACS Symposium Series* **2**, 26-44 (1993).
107. Carter, DC & Ho, JX. Structure of serum albumin. *Advances in protein chemistry* **45**, 153-203 (1994).
108. He, XM & Carter, DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209-215 (1992).

BIOGRAFIJA AUTORA

Dragosav Mutavdžić je rođen 15.09.1970. godine u Novoj Varoši, Republika Srbija. Diplomirao je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2003. godine sa prosečnom ocenom 8,13 i stekao zvanje diplomirani hemičar. Upisao je postdiplomske studije na Ekonomskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2003. godine, na smeru Statistička analiza, gde je položio sve ispite sa prosečnom ocenom 9,67. Magistarsku tezu je odbranio 2010. godine pod nazivom: "Multivarijaciona faktorska analiza u fluorescentnoj spektroskopiji" na istom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od aprila 2005. godine radi u Institutu za multidisciplinarna istraživanja.

Od 2011. godine angažovan je u realizaciji naučno-istraživačkog projekta pod nazivom: "Ispitivanja odnosa struktura-funkcija u ćelijskom zidu biljaka i izmene strukture zida enzimskim inženjeringom", koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (program osnovnih istraživanja MNP Ev. br. 173017).

Tokom dosadašnjeg rada bio je autor i koautor dvadesetak naučnih radova objavljenih u vodećim međunarodnim časopisima.

Изјава о ауторству

Потписани Мутавџић Р. Драгосав

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Примена мултиваријационе анализе у спектроскопским подацима

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

Потпис аутора

У Београду, 29. 6. 2016.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Мутавцић Р. Драгосав

Наслов рада: **Примена мултиваријационе анализе у спектроскопским подацима**

Ментори: др Душанка Милојковић Опсеница и др Ксенија Радотић Хаџи-Манић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 29. 6. 2016.

Изјава о коришћењу

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

Примена мултиваријационе анализе у спектроскопским подацима

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 29. 6. 2016.
