Kompleksiranje polikationa s DNA ; Motivacija u nastavi kemije - studija slučaja

Ćalušić, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:016744

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

HELENA ĆALUŠIĆ

KOMPLEKSIRANJE POLIKATIONA S DNA

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja magistra edukacije kemije i fizike

Zagreb, 2017.

Izjavljujem da sam ovaj rad izradila samostalno koristeći stečena znanja tijekom studija i navedenu literaturu.

Zahvaljujem se cijenjenim mentorima prof. dr. sc. Davoru Kovačeviću i izv. prof. dr.sc. Draginji Mrvoš-Sermek te asistentici mag. chem. Jasmini Salopek na stručnoj pomoći i vođenju izrade ovog diplomskog rada. Ponajviše hvala na strpljenju i razumijevanju.

Veliku zahvalu iskazujem svojoj obitelji, dečku i prijateljicama na bezuvjetnoj podršci za vrijeme studiranja i izrade ovog diplomskog rada.

SADRŽAJ:

SAŽETAK vi
ABSTRACT vii
1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED
2.1. Polielektroliti 2
2.1.1. Podjela polielektrolita 2
2.1.2. Konformacija polielektrolita 3
2.1.3. Fizika polielektrolita 5
2.1.3.1 Poisson-Boltzmannova jednadžba 5
2.1.3.2. Debye-Hückelova aproksimacija 6
2.1.3.3 Manning-Oosawa kondenzacija 7
2.1.4. Poli(dialildimetilamonijev klorid), PDADMAC 8
2.2. Deoksiribonukleinska kiselina, DNA 9
2.2.1. Sekundarna struktura DNA 11
2.2.1.1. Denaturacija 12
2.2.1.2. Stabilizacija strukture DNA 13
2.3. Kompleksiranje polielektrolita 13
2.3.1. Kompleksi DNA s polikationima 15
2.3.1.1. Genska terapija 18
2.4. Fizikalno-kemijske metode 19
2.4.1. Elektroforeza 19
2.4.1.1. Elektroforetska pokretljivost 19
2.4.1.2. Električni međupovršinski sloj 20
2.4.1.3. Određivanje elektrokinetičkog (zeta, ζ) potencijala 22
2.4.2. Spektroskopija kvazielastičnog raspršenja svjetlosti 23
3. EKSPERIMENTALNI DIO
3.1. Materijali 25
3.2. Metode 25
3.2.1. Određivanje veličine čestica 26
3.2.2. Određivanje pokretljivosti i elektrokinetičkog (zeta, ζ) potencijala 27
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati dobiveni metodom elektroforeze 28
4.1.1. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini NaCl 28
4.1.2. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini $CaCl_2$ 30
4.1.3. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini pufera 31
4.1.4. Usporedba utjecaja vrste soli na kompleksiranje tijekom titracije s DNA 32
4.1.5. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini NaCl 34
4.1.6. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini $CaCl_2$ 35
4.1.7. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini pufera 36
4.1.8. Usporedba utjecaja vrste soli na kompleksiranje tijekom titracije s PDADMAC-om 37
4.2. Rezultati dobiveni metodom kvazielastičnog raspršenja svjetlosti 39
4.2.1. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini NaCl 39
4.2.2. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini $CaCl_2$ 40
4.2.3. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini pufera 41
4.2.4. Usporedba utjecaja vrste soli na veličinu kompleksa tijekom titracije s DNA 42
4.2.5. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini NaCl 43
4.2.6. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini $CaCl_2$ 44
4.2.7. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini pufera 45
4.2.8. Usporedba utjecaja vrste soli na veličinu kompleksa tijekom titracije s PDADMAC-om 46
5. ZAKLJUČAK 47
6. LITERATURNA VRELA 48
7. POPIS KRATICA 49
8. METODIČKI DIO
MOTIVACIJA U NASTAVI KEMIJE – STUDIJA SLUČAJA 50
8.1. Uvod 50
8.2. Motivacija i učenje 51
8.3. Problemska nastava 54
8.4. Studija slučaja 55
8.4.1. Faze učenja kroz problem studije slučaja 59
8.4.2. Uloga nastavnika u provedbi studije slučaja 61
8.5. Priprema uz predloženi nastavni sat 63
8.5.1. „Bijeg iz zatvora“ 65
8.6. Prijedlog radnog listića za nastavnu jedinicu *Elektroliza* 66

9. ZAKLJUČAK 76
10. LITERATURNA VRELA 77
11. ŽIVOTOPIS 78

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

KOMPLEKSIRANJE POLIKATIONA S DNA

HELENA ĆALUŠIĆ

Zavod za fizikalnu kemiju, Zavod za opću i anorgansku kemiju,
Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a

Ovaj diplomski rad sastoji se od dvije cjeline: istraživačkog i metodičkog dijela. U istraživačkom dijelu proučavani su uvjeti u kojima dolazi do kompleksiranja DNA s poli(dialildimetilamonijevim kloridom), PDADMAC. Korištene metode su elektroforeza za određivanje pokretljivosti, a time i ζ-potencijala nastalih kompleksa te kvazielastično raspršenje svjetlosti za određivanje veličine kompleksa. Ispitan je i potvrđen utjecaj vrste soli na pokretljivost, ζ-potencijal i veličinu nastalih kompleksa, a pokazano je i da smjer titracije utječe na stvaranje kompleksa.

U metodičkom dijelu rada pod naslovom *"Motivacija u nastavi kemije – studija slučaja"* opisana je studija slučaja kao nastavni postupak učenja kroz rješavanje problema koji pozitivno utječe na motivaciju učenika. Predložena je studija slučaja kao nastavni dvosat u kojem su ciljana obrazovna postignuća za uzrast učenika trećeg razreda gimnazije povezana s opažanjima iz pokusa.

(78 stranica, 34 slike, 4 tablice, 30 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a

Ključne riječi: polielektroliti / poli(diallidimetilamonijev klorid) / DNA / pokretljivost / zeta potencijal / kvazielastično raspršenje svjetlosti / studija slučaja / motivacija / učenje otkrivanjem

Mentori: prof. dr. sc. Davor Kovačević, izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Davor Kovačević
izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek
prof. dr. sc. Damir Veža
v. pred. dr. sc. Ana Sušac

Zamjene: prof. dr.sc. Tajana Preočanin
doc. dr. sc. Mario Novak

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

COMPLEXATION OF POLYCATIONS WITH DNA

HELENA ĆALUŠIĆ

Division of Physical Chemistry, Division of General and Inorganic Chemistry,
Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a

This Diploma thesis consists of two parts: the research part and the methodological part. The research part presents the study of conditions at which DNA forms complexes with poly(diallyldimethylammonium chloride), PDADMAC. The following methods were used: electrophoresis for mobility (including ζ-potential) determination and quasi-elastic light scattering for size determination. The effect of cation type on electrophoretic mobility and ζ-potential of PDADMAC-DNA system and size of formed complexes was investigated and confirmed. It was also shown that the direction of titration influences the complexation of polycations with DNA.

In the methodological part of the *Thesis* entitled „*The motivation in chemistry teaching - a case study*" a case study method as a tool for teaching chemistry with positive results on student's motivation is described. The case study is suggested as a two hour lesson in which targeted educational achievements of the third year high school students are related to observations from the experiment.

(78 pages, 34 figures, 4 tables, 30 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a

Keywords: polyelectrolytes / poly(diallydimethylammonium chloride) / DNA / electrophoretic mobility / zeta potential / quasielastic light scattering / case study / motivation / learning by discovering

Supervisors: Dr. Davor Kovačević, Prof., Dr. Draginja Mrvoš-Sermek, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Davor Kovačević, Prof.

Dr. Draginja Mrvoš-Sermek, Assoc. Prof.

Dr. Damir Veža, Prof.

Dr. Ana Sušac, Senior Lecturer

Substitutes: Dr. Tajana Preočanin, Prof.

Dr. Mario Novak, Asst. Prof.

1. UVOD

Polielektroliti su polimerni spojevi koji se sastoje od monomera s ionizirajućim skupinama. Prostorno uređenje tih sustava ovisi o strukturi poliiona, naboju protuiona te o vrsti i množini dodanog elektrolita. Deoksiribonukleinska kiselina, DNA, predstavlja važan modelni sistem u istraživanju polielektrolita. Nerijetko znanstvena istraživanja u području fizikalne kemije pridaju pažnju kompleksiranju DNA s polikationima istražujući utjecaj različitih interakcija na stvaranje DNA-polikation kompleksa uključujući uvjete stabilnosti i zaštite same DNA od enzimskih i mehaničkih oštećenja sustava. Značajni napori ulažu se u istraživanja polielektrolita i zbog raznovrsnih primjena kao što su genska terapija, genski čipovi, sekvenciranje DNA, biokompatibilni materijali i sl. Ova tema postala je zanimljiva molekularnim biolozima i biokemičarima zbog mogućnosti proučavanja transformacije stanica nastalim kompleksima polikation-polianion. Naime, kompleksi DNA ili oligonukleotida s polikationima smatraju se alternativnim vektorima u području genske terapije s ciljem efikasnog prijenosa DNA u stanice viših organizama, a da pritom stanične nukleaze ne razgrade stranu DNA. No, treba uzeti u obzir kako interakcije između polielektrolitnih kompleksa uvelike ovise o različitim faktorima kao što su kemijska struktura kompleksa, temperatura, pH, ionska jakost, vrsta dodane soli, molekulska masa DNA i polikationa, itd. Stoga, prije same primjene navedenih sustava u biološke i medicinske svrhe potrebno je pronaći vezu između količine polikationa i polianiona tijekom kompleksiranja i udjela pojedinih komponenti u kompleksu.

Proces nastanka polielektrolitnih kompleksa može se pratiti titracijskim tehnikama, tehnikama raspršenja svjetlosti, elektroforetskim tehnikama i kalorimetrijski. Korištene metode u ovom diplomskom radu su elektroforeza za mjerenje pokretljivosti, odnosno elektrokinetičkog (zeta, ζ) potencijala te spektroskopija kvazielastičnog raspršenja svjetlosti za određivanje veličine čestica. Navedenim metodama ispitivan je utjecaj otopina različitih soli na kompleksiranje između negativno nabijene DNA i pozitivno nabijenog sintetskog polimera poli(dialildimetilamonijeva klorida), PDADMAC.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Polielektroliti

Polielektroliti su molekule koje otopljene u polarnom otapalu disociraju na poliion i protuione. Prisutni ioni znatno se razlikuju po veličini i naboju. Pod pojmom polielektrolit najčešće podrazumijevamo spoj linearne strukture kod kojeg je gustoća naboja na poliionu jako velika, jer obično posjeduju nekoliko stotina ili tisuća ionizirajućih funkcionalnih skupina istoimenog naboja. Otopina kuhinjske soli u vodi je primjer jednostavnog elektrolita s homogenom raspodjelom iona u otopini. Protuioni u otopini polielektrolita neće biti homogeno raspoređeni oko poliiona te raspodjela pozitivnih i negativnih naboja u otopini neće biti jednolika. Najjednostavniji polielektroliti sastoje se identičnih monomernih podjedinica povezanih u lanac čije su funkcionalne skupine nosioci električnog naboja. Takvi spojevi poznati su i pod nazivom homopolielektroliti. Ukoliko polimerni lanci sadržavaju više različitih funkcionalnih skupina, polielektroliti se nazivaju heteropolielektroliti. Polielektrolite možemo smatrati molekulama dvojne prirode, istovremeno makromolekule i elektrolite. Svojstva polielektrolita ovise o njihovoj strukturi, koncentraciji, naboju protuiona te naboju i koncentraciji dodane soli.

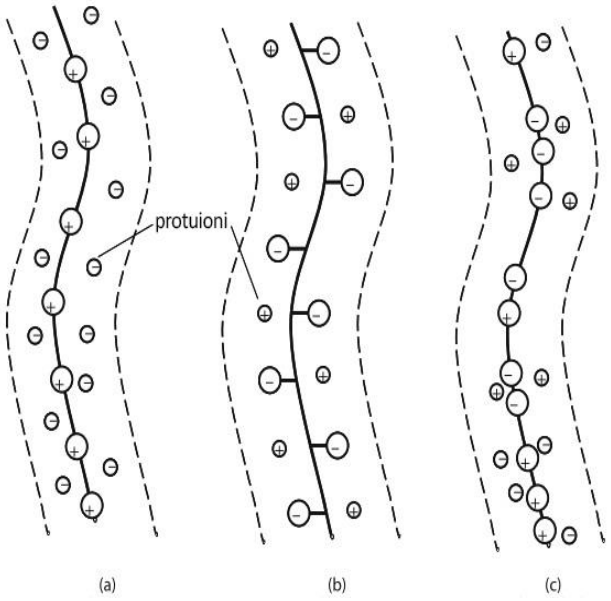
2.1.1. Podjela polielektrolita

- S obzirom na podrijetlo polielektroliti se dijele na:

- prirodne (npr. DNA)
- modificirane prirodne (npr. derivati celuloze)
- sintetske (npr. poli(dialildimetilamonijev klorid)

- Prema naboju polielektroliti[1] se dijele na:

- polianione
- polikatione
- poliamfolite (koji sadrže pozitivno i negativno nabijene funkcionalne skupine)



Slika 1. Podjela polielektrolita na a) polikatione, b) polianione, c) poliamfolite.

- Ovisno o jakosti ionskih skupina monomera koji ih sačinjavaju razlikuju se:
- slabi polielektroliti
- jaki polielektroliti

Stupanj disocijacije slabih polielektrolita manji od 1 i ovisi o pH otopine pa je ukupni naboj takvih molekula varijabilan. To su, na primjer, polimeri s amino i karboksilnim skupinama. Jaki polielektroliti u potpunosti disociraju u širokom rasponu pH te se njihov ukupan naboj smatra konstantnim. Disocijacijom polielektrolita povećava se ionska jakost otopine, a time i njena električka vodljivost.

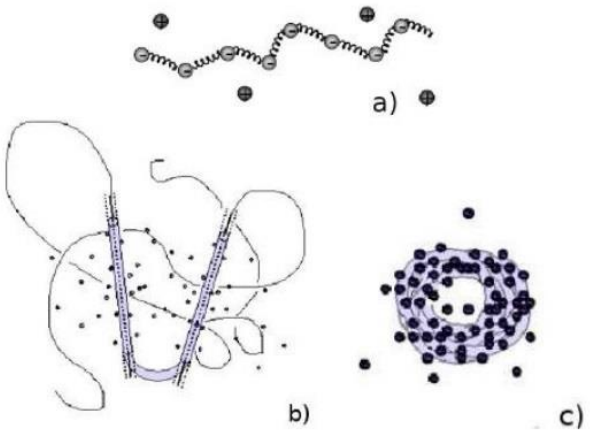
2.1.2. Konformacija polielektrolita

Složeno ponašanje polielektrolita u otopini usko je povezano ne samo s interakcijama koje makromolekula tj. polielektrolit ostvaruje s otapalom i između lanaca makromolekula (intermolekulske interakcije) nego i s interakcijama između pojedinih segmenata unutar lanca (intramolekulske interakcije). Najvažnije vrste interakcija u takvim sustavima su Coulombove

interakcije, van der Waalsove interakcije, hidrofobne interakcije i vodikove veze. Odnosi doprinosa tih interakcija imaju odlučujuću ulogu u tome kakvu će konformaciju u otopini poliioni zauzimati, a samim time je određena i njihova funkcija. Također konformacija polielektrolita ovisi o vrsti otapala, kemijskoj strukturi makromolekula, koncentraciji makromolekula, temperaturi i ionskoj jakosti otopine stoga razlikujemo slijedeće konformacije:

- kompaktna
- izdužena
- slučajna
- štapičasta
- sferična

Poliion teži štapićastoj strukturi, jer postoji vrlo snažna odbojna sila između istoimenih naboja na poliionu. Tako zauzima puno prostora i otežava kretanje molekula otapala čineći otopinu viskoznijom. Kondenzacijom, odnosno vezivanjem jednostavnih protuiona dolazi do djelomične kompenzacije odbojnih interakcija. Naime, dodatkom soli dolazi do zasjenjenja elektrostatskog odbijanja pa konformacija polielektrolita postaje sve fleksibilnija. Polivalentni protuioni ili dodana sol imaju sposobnost da elektrostatsko odbijanje pretvore u elektrostatsko privlačenje što dovodi do promjene konformacijskog stanja, iz krutog u kompaktno stanje. Teško možemo odrediti doseg djelovanja pojedinog poliiona, jer jako nabijen fleksibilan ili djelomično fleksibilan poliionski lanac zadržava u svojoj okolini dio protuiona. Također, na doseg djelovanja poliiona utječu sami protuioni te kationi i anioni iz otopine. Protuioni koji se nalaze unutar dosega poliiona ograničeni su na gibanje uzduž poliionskog lanca, dok se ostali protuioni mogu slobodno ili gotovo slobodno kretati.



Slika 2. a) izdužena konformacija polimera u vodenoj otopini, b) lanac polimera u otopini soli visoke koncentracije jednovalentnih iona, c) kompaktna konformacija polimera u vodenoj otopini polivalentnih iona.

2.1.3. Fizika polielektrolita

2.1.3.1 Poisson-Boltzmannova jednadžba

Poisson-Boltzmannova jednadžba[2] najjednostavnije opisuje elektrostatske interakcije polielektrolita s jednovalentnim protuionima i dodanom soli. Povezivanjem Poissonove jednadžbe koja povezuje gustoću naboja i potencijal i Boltzmannove raspodjele za opis raspodjele iona u otopini dobivamo izraz za gustoću naboja:

$$\Delta\varphi(r) = -\frac{e}{\varepsilon}\sum_i z_i c_i\,(\infty) e^{\frac{-z_i e\varphi(r)}{kT}} \qquad (1)$$

gdje φ označava električni potencijal, e elementarni naboj, ε je permitivnost otapala, z je nabojni broj iona, kT energijska skala Boltzmannove raspodjele zadana termičkim gibanjem čestica, a $c(\infty)$ označava koncentraciju iona daleko od promatrane točke u kojoj računamo električni potencijal.

Ionska otopina jednovalentnih iona, koje predstavljamo kao točkaste naboje, teži stanju homogene raspodjele naboja u cijeloj otopini. Homogenu raspodjelu pozitivnih i negativnih točkastih naboja osigurava termičko gibanje u otopini. Međutim, gibanje protuiona koji se nalaze uz poliion je ograničeno elektrostatskim međudjelovanjem što onda sprječava i jednoliku raspodjelu disociranih protuiona.

2.1.3.2. Debye-Hückelova aproksimacija

Ako je elektrostatsko međudjelovanje slabo i zadovoljen je uvjet $z_i e\varphi \ll kT$, tada Poisson-Boltzmannovu eksponencijalnu funkciju možemo razviti u Taylorov red gdje se uzimaju u obzir samo prva dva člana reda (gdje prvi član iznosi 0 zbog neutralnosti otopine) te dobivamo sljedeći izraz[2]:

$$\Delta\varphi(r) = -\frac{e^2}{\varepsilon kT}\sum_i z_i^2 c_i\,(\infty)\varphi(r) \tag{2}$$

Radi pojednostavljivanja izraza uvodimo varijablu κ:

$$\kappa^2 = -\frac{e^2}{\varepsilon kT}\sum_i z_i^2 c_i\,(\infty) \tag{3}$$

Iz izraza 3 dobivamo lineariziranu Poisson-Boltzmannovu jednadžbu:

$$\Delta\varphi(r) = \kappa^2\varphi(r) \tag{4}$$

Rješenje navedene linearizirane jednadžbe daje potencijal oblika:

$$\varphi \propto \frac{e^{-\kappa r}}{r} \tag{5}$$

Veličina κ^{-1} ima dimenziju duljine i naziva se Debyeva duljina. Na udaljenostima manjim od κ^{-1} elektrostatsko međudjelovanje je snažno, praktički Coulombsko, dok na udaljenostima većima od

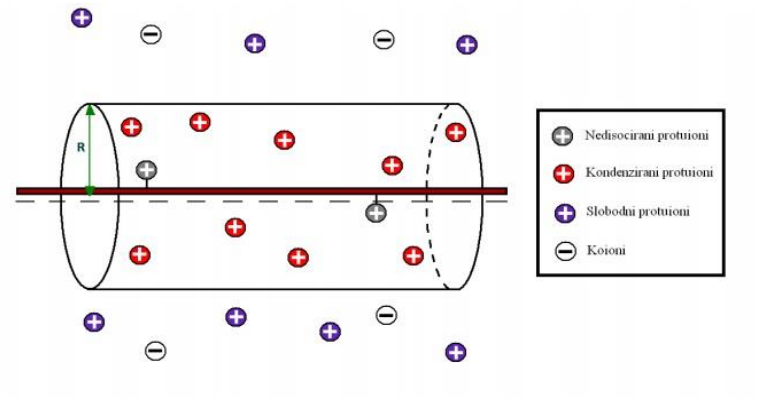
κ^{-1} elektrostatsko međudjelovanje naglo slabi tj. eksponencijalno trne. Drugim riječima, doseg Coulombovog potencijala je konačan u otopini. Ovakvo ponašanje potencijala je izravna posljedica preraspodjele jednostavnih iona u otopini te kažemo da je elektrostatski potencijal u otopini zasjenjen.

2.1.3.3 Manning-Oosawa kondenzacija

Linearna gustoća naboja na poliionu u polielektrolitu je velika pa uvjet $z_i e\varphi \ll kT$ iz Debye-Hückelove aproksimacije često ne može biti zadovoljen. Upravo zato postoji jako elektrostatsko privlačenje između poliionskih lanaca i protuiona iako protuioni nisu kemijski vezani na poliion. To privlačenje rezultira pojavom kondenzacije protuiona na lancima. Kondenzacija efektivno smanjuje linearnu gustoću naboja poliiona, što onda zaustavlja i daljnju kondenzaciju – linearna gustoća se smanjuje samo do određene granice.

Polielektrolitski lanac[2] određen je linearnom gustoćom naboja e/b gdje je b prosječna udaljenost između susjednih elementarnih naboja na polielektrolitnom lancu. Slika 3. prikazuje pojednostavljenu sliku polielektrolitne otopine za koju pretpostavljamo da je otapalo homogeno, relativne permitivnosti ε_r, te da postoji jednolika raspodjela točkastih naboja. Poliionski lanac opisujemo cilindrom beskonačne duljine i polumjera *R*.

Nedisocirani protuioni su ioni koji su još uvijek kemijski vezani s poliionom. Kondenzirani protuioni su ioni koji su nastali disocijacijom s poliiona te se gibaju unutar prikazanog cilindra oko poliiona. Slobodni protuioni su nastali disocijacijom poliiona ili iz dodane soli, a nalaze se izvan cilindričnog volumena. Koioni su nastali iz soli koja je dodana u otopinu.



Slika 3. Prikaz protuiona koji se nalaze u cilindru oko poliiona i izvan njega[2].

Iz Gaussovog teorema dobivamo izraz za elektrostatski potencijal linearne gustoće naboja $^{e}/_{b}$:

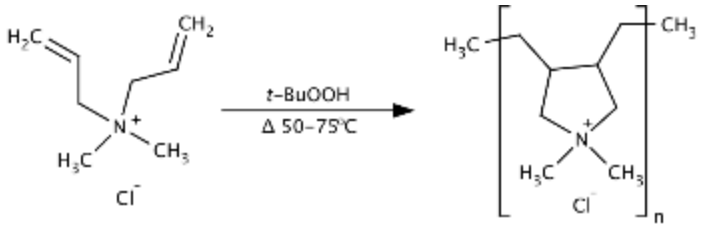
$$\varphi(r) = \frac{2e}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r b} lnr \qquad (6)$$

gdje je *r* je udaljenost protuiona od lanca za koju vrijedi: $r \leq R$.

Sporo opadanje elektrostatskog potencijala s logaritamskom funkcijom ukazuje na to da ioni osjećaju elektrostatski potencijal i na većim udaljenostima što dovodi do pojave kondenzacije iona. Pojava kondenzacije u okviru Manning-Oosawa teorije je uvjetovana ispunjenjem zahtjeva da Debyeva duljina mora biti puno veća od polumjera polimera: $\kappa^{-1} \gg a(R)$, a s obzirom da je $k^{-1} \propto I_c^{-1/2}$, uvjet može biti ispunjen samo u otopinama s niskom ionskom jakošću.

2.1.4. Poli(dialildimetilamonijev klorid), PDADMAC

PDADMAC, kemijske formule $(C_8H_{16}NCl)_n$, je linearni homopolimer nastao procesom radikalske polimerizacije dialildimetilamnijevog klorida, DADMAC, s organskim peroksidom kao katalizatorom.

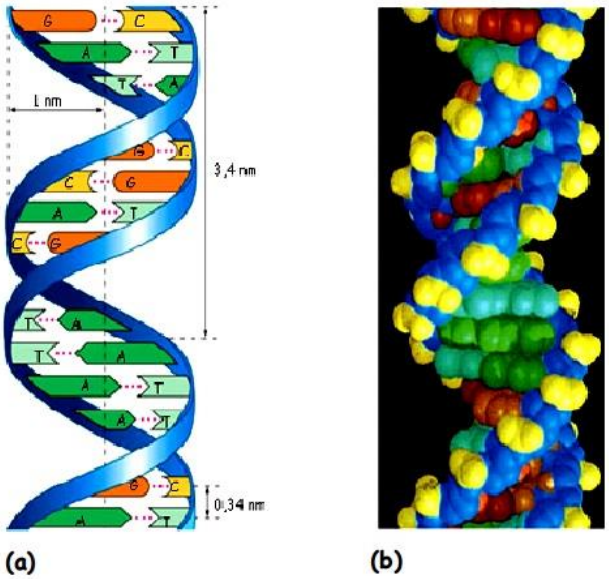


Slika 4. Sinteza PDADMAC-a.

Specifičnost ovog polimera ogleda se u mogućnosti otapanja u vodi nasuprot dotadašnjim sintetičkim polimerima koji su dobiveni polimerizacijom monomera koji sadrže više od jedne vinilne funkcionalne grupe. Topljiv je u vodi te je dostupan u obliku vodene otopine s masenim udjelom između 10 i 50 %. PDADMAC je jak polielektrolit uslijed čega njegova gustoća naboja ne ovisi od pH vrijednosti otopine. Spada u skupinu kationskih polimera koji se koriste u industriji proizvodnje papira, pročišćavanju vode (vode za piće i otpadnih voda), kao sredstvo za fiksiranje boja itd.

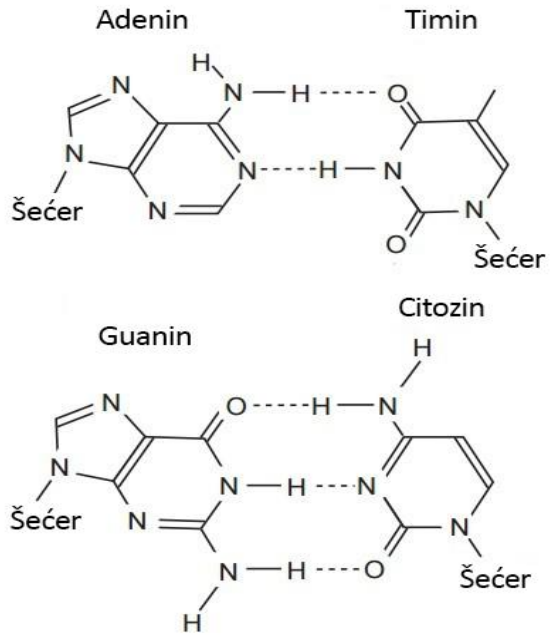
2.2. Deoksiribonukleinska kiselina, DNA

Molekulu DNA možemo nazvati biopolimerom koji je važan modelni sistem u istraživanju polielektrolita. Početak istraživanja strukture DNA započinje istraživanjima Watsona i Cricka koji 1953. godine predložili spiralni model DNA sa specifičnim uparivanjem baza. Upravo to specifično uparivanje baza omogućuje prenošenje genetske informacije.



Slika 5. a) izgled dvostruke uzvojnice DNA, b) trodimenzionalni model molekule DNA.

DNA je polimerni lanac čiji su monomeri kovalentno povezani 1,5 fosfodiesterskom vezom. DNA monomer (nukleotid) se sastoji od fosfatne skupine i od nukleozida - kombinacije šećera (2-deoksiriboze) i pirimidinske (timin i citozin) odnosno purinske (adenin i gvanin) baze. Pri fiziološkim uvjetima molekula DNA postoji kao dvostruka uzvojnica, dva polinukleotidna lanca teku usporedno, ali u suprotnim smjerovima, zavijeni oko zajedničke osi. Okosnica šećer-fosfat pojedinog lanca nalazi se na periferiji dvostruke uzvojnice, dok se purinske i pirimidinske baze nalaze u unutrašnjosti. Fosfatna skupina potječe od jake kiseline s pK_a oko 1. Stoga će u fiziološkim uvjetima svaki fosfat biti negativno nabijen i dobit ćemo snažno nabijeni poliion. Lanci se drže zajedno vodikovim vezama koje stvaraju baze u unutrašnjosti uzvojnice i van der Waalsovim interakcijama među bazama usporedno s osi uzvojnice. Vodikove veze u DNA nastaju uvijek između gvanina i citozina te adenina i timina. Prema tome, jedan lanac u dvostrukoj uzvojnici komplementaran je drugome. Precizni redoslijed baza duž lanca DNA predstavlja šifriranu genetičku informaciju. Os dvostruke uzvojnice može i sama biti zavrnuta tvoreći superzavojnicu. Superzavijena DNA ima mnogo kompaktniju strukturu od opuštene DNA.



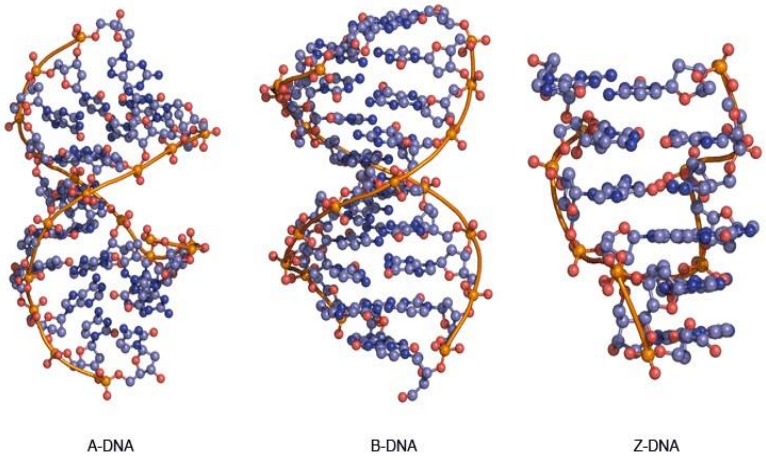
Slika 6. Kemijski prikaz komplementarnih baza s naznačenim vodikovim vezama među njima.

2.2.1. Sekundarna struktura DNA

DNA je izvanredno savitljiva molekula. Značajne rotacije su moguće oko brojnih veza u šećerno-fosfatnoj okosnici, a termičke fluktuacije mogu uzrokovati savijanje, istezanje i odvajanje (otapanje) lanaca.

Dvolančana DNA može postojati u nekoliko različitih sekundarnih struktura ovisno o primarnoj strukturi (zastupljenost pojedinih dušičnih baza) ili sastavu otapala. Analizom rezultata dobivenih difrakcijom rentgenskog zračenja predložena su 3 modela sekundarne strukture dvostruke uzvojnice: A-DNA, B-DNA i Z-DNA oblik. Model Watsona i Cricka se naziva i B-oblikom DNA ili B-DNA i najstabilnija je sekundarna struktura za nasumičnu sekvencu DNA molekule u fiziološkim uvjetima pa je stoga referentna točka u svakom istraživanju svojstava DNA. U dehidratacijskim uvjetima B-DNA podliježe reverzibilnoj konformacijskoj promjeni u A-DNA koja se razlikuje od B-DNA u mnogo karakteristika kao što su nagib (eng. *pitch*), duljina potrebna za jedan kompletni okret uzvojnice ili udaljenost između uzastopnih parova baza. B-DNA je prema tome dulja i tanja u odnosu na kratku i zdepastu A-DNA koja svoje parove baza ima smještene oko osi heliksa. Z konformacija uočena je kod DNA s alternirajućim purin-pirimidin

dušičnim bazama u lancu. Takva DNA nastaje u otopinama uz prisutnost visoke koncentracije soli (obično natrijeva klorida) pri čemu dolazi do stabilizacije uzvojnice zbog smanjenih odbojnih sila među fosfatnim skupinama.



Slika 7. Model trodimenzionalne strukture A-DNA, B-DNA i Z-DNA.

2.2.1.1. Denaturacija

Uređena sekundarna struktura DNA može se narušiti promjenom parametara sustava poput temperature, ionske jakosti, vrijednosti pH i općenito uvođenjem novih komponenti u sustav. Taj proces nazivamo denaturacija. Tijekom denaturacije dvolančane DNA dolazi do razdvajanja polinukleotidnih lanaca pri čemu se vodikove veze između parova baza zamijenjuju vodikovim vezama između dušičnih baza i molekula vode. Temperatura pri kojoj je približno polovica dvolančane uzvojnice DNA razdvojena na pojedinačne lance nazivamo temperatura mekšanja (eng. *melting temperature*, T_m). Ta vrijednost je mjera stabilnosti uzvojnice. Denaturacijom se mijenja i njena apsorbancija. Naime, u ultraljubičastom području spektra apsorbiraju baze. Prilikom denaturacije baze iz gusto složene strukture postaju razmjerno pokretne i apsorbancija im naraste za oko 40 % na svim valnim duljinama u ultraljubičastom dijelu spektra. Taj učinak denaturacija na apsorpcijski spektar nazivamo hiperkromizam. Proces denaturacije je povratan,

stoga ukoliko se parametri sustava vrate na početne vrijednosti ponovno će se uspostaviti nativna struktura DNA tj. molekula DNA će se renaturirati.

2.2.1.2. Stabilizacija strukture DNA

Prema istraživanju Recorda i suradnika[3] na stabilnost DNA, osim vodikovih veza, hidrofobnih i van der Waalsovih interakcija, utječu i elektrostatske interakcije. Ispitujući utjecaj koncentracije DNA, koncentracije Na^+ protuiuona, udjela Mg^{2+} protuiona u odnosu na Na^+ na temperaturu mekšanja uočeno je da porastom koncentracije kationa dolazi do porasta termičke stabilnosti DNA što se očituje kroz povišenje temperature mekšanja pri čemu dvovalentni kationi boje stabiliziraju uzvojnicu od jednovalentnih. Dvovalentni protuioni prilaze bliže lancima DNA i istiskuju jednovalentne, a ujedno bolje zasjenjuju sami naboj fosfatnih skupina na lancima. Pri tome se i smanjuje odbijanje dvaju lanaca i povećava stabilnost sekundarne strukture.

2.3. Kompleksiranje polielektrolita

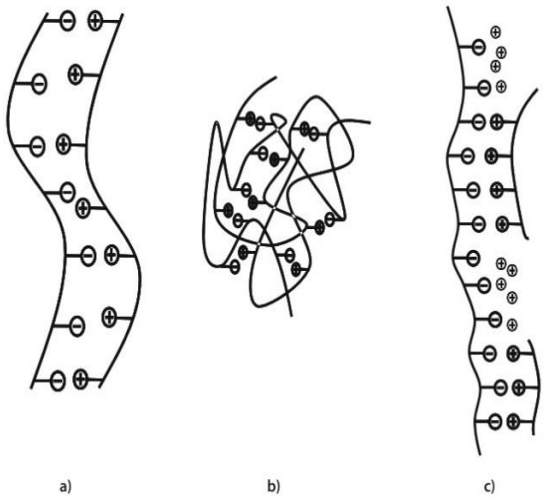
Proučavanje polielektrolitnih kompleksa[1] započelo je krajem 19. stoljeća Kosselovim taloženjem albumina iz jajeta protaminom. Komplekse sintetskih polielektrolita među prvima je istraživao Michaels[4] šezdesetih godina 20. stoljeća na primjeru kompleksiranja poli(4-vinilbenzilamonijevog klorida) i poli(natrijevog stirensulfonata).

Polielektroliti u otopinama stvaraju komplekse velike važnosti, jer pružaju mogućnost da se kombiniraju fizikalno-kemijska svojstva najmanje dva polielektrolita. Jake Coulombove interakcije odgovorne su za stvaranje kompleksa suprotno nabijenih polielektrolita što dovodi do interpolimerne ionske kondenzacije. Dodatna stabilizacija putem sila kratkog dometa poput hidrofobnih interakcija i vodikovih veza omogućava im opstanak i u uvjetima visoke ionske jakosti. Utjecaj van der Waalsovih sila dolazi do izražaja u pokusima s proteinima. Ponekad desolvatacija uzrokuje entropijski povoljno uspostavljanje interpolimernih kompleksa dok pri visokoj ionskoj jakosti mogu nastati kompleksi i između molekula istoimenih naboja. Nastajanje polielektrolitnog kompleksa je spontan proces, a jedan od najvažnijih parametara koji utječe na koloidnu stabilnost nastalog kompleksa je omjer naboja komponenata. Pri odgovarajućim uvjetima

navedene komplekse možemo istaložiti. Također, sastav polielektrolitnih kompleksa vrlo često ovisi i o načinu pripreme te smjeru titracije (ukoliko se provodi titracija).

Miješanjem polielektrolita jakih ionizirajućih skupina i sličnih molekulskih masa ostvaruju se ionske interakcije između gotovo svih pozitivno i negativno nabijenih funkcionalnih skupina te se uočava 1:1 stehiometrija nastalog kompleksa pod nazivom stehiometrijski kompleks. Funkcionalne skupine nestehiometrijskih kompleksa dobivenih miješanjem polielektrolita sa slabim ionizirajućim skupinama i velikom razlikom u veličini, odnosno molekulskoj masi, ostvaruju ionsku vezu i s funkcionalnim skupinama suprotno nabijenog polielektrolita, pri čemu se znatan dio kompenzira protuionima.

Konačna struktura kompleksa[1] može se opisati pomoću dva modela: uređeni stepenasti model (eng. *ladder*) i model nasumičnog klupka (eng. *scrambled egg*). Stvaranje uređenih struktura ponajviše ovisi uvjetima nastajanja kompleksa i preciznosti smještaja naboja komponenti.



Slika 7. a) i b) stehiometrijski kompleksi polielektrolita, c) nestehiometrijski.

Ponašanje polielektrolitnih kompleksa, među ostalim, ovisi o kemijskoj strukturi polielektrolita, pH, ionskoj jakosti, vrsti dodane soli te koncentraciji polielektrolita.

Proces nastanka kompleksa može se pratiti titracijskim tehnikama (potenciometrijskom, konduktometrijskom i turbidimetrijskom titracijom), tehnikama raspršenja svjetlosti, elektroforetskim tehnikama i kalorimetrijski. Konduktometrijskom i potenciometrijskom titracijom dolazimo do više o informacijama o tijeku reakcije i sparivanju monomera suprotno nabijenih polielektrolita dok turbidimetrija daje predodžbu o stabilnosti i veličini nastalih kompleksa. Za točnija određivanja veličine potrebno je koristiti metode raspršenja svjetlosti. Elektroforetskim mjerenjima, koja daju informaciju o površinskom naboju kompleksa, ustanovljeno je da unatoč stehiometriji ionskog vezanja 1:1 kod jakih polielektrolita dolazi do prenabijanja kompleksa kad se elektroliti pomiješaju u nestehiometrijskom omjeru.

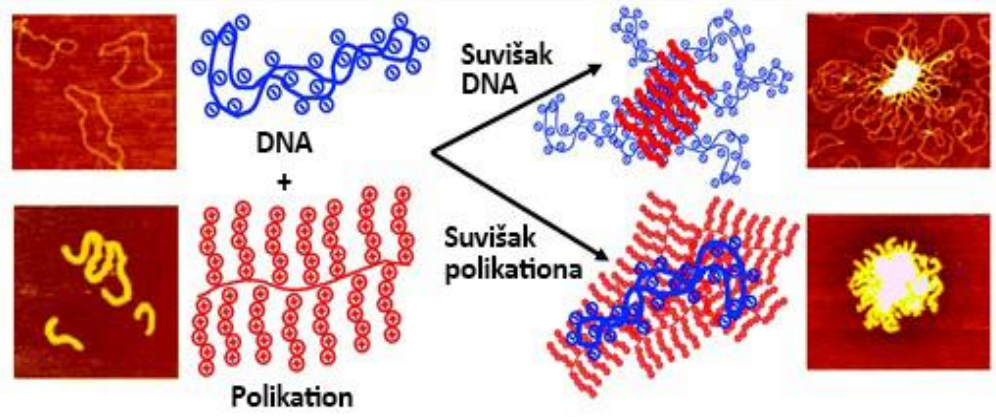
2.3.1. Kompleksi DNA s polikationima

Kompleksi DNA s kationskim polimerima koji se koriste za prijenos gena često se nazivaju polipleksima. Najčešće optimirani parametar u dizajnu ovakvih vektora je omjer kationskih funkcionalnih skupina prema anionskim. Kako su kationske funkcionalne skupine obično amino skupine, riječ je o N/P omjeru. Taj omjer utječe na zeta potencijal, veličinu te topljivost kompleksa.[5]

Navedimo nekoliko eksperimentalnih rezultata koji su poslužili kao polazna stanica u razumijevanju prirode nastalih kompleksa.

Storkle je sa suradnicima[6] proučavao kompleksiranje DNA sa suprotno nabijenim polielektrolitima u vodenoj otopini koristeći metode raspršenja svjetlosti, gel elektroforezu i AFM (*mikroskopija atomskih sila,* eng. *Atomic Force Microscopy*). Proučavani polikationi sastojali su se od cilindričnih „četki" s kvaterniziranim poli(vinilpiridin) i poli(etilenimin) bočnim ograncima. Polikationi su se međusobno razlikovali po prosječnoj molekulskoj masi koja se kretala se u rasponu $3 \cdot 10^4$ g mol^{-1} < M_w < $1 \cdot 10^7$ g mol^{-1} te je naboj po molekuli polikationa, Z^+ iznosio $127 < Z^+ < 5500$. Ukoliko je jedna od komponenti kompleksa dodana u suvišku, DNA ili polikation, mjerenja pokazuju da nastali kompleksi koegzistiraju s nekompleksiranim molekulama komponente u suvišku. Pritom je veličina nastalog kompleksa invarijantna na promjenu molekulske mase komponente koja nije u suvišku. Ukoliko brojnost nastalog kompleksa postane usporediva s brojnošću nekompleksiranih molekula tada dolazi do faznog razdvajanja. Izuzetno

velika razlika u naboju između DNA i polikationa dovodi do prenabijanja sustava ukoliko je proces kompleksiranja praćen suviškom polikationa dok suvišak DNA tijekom kompleksiranja ima za posljedicu mali negativni naboj kompleksa.



Slika 8. Kompleksiranje DNA s polielektrolitima u istraživačkom radu Storkle i suradnika[9].

Istraživački pothvati Fischera i suradnika donijeli su nova saznanja vezano za utjecaj molekulske mase i gustoće naboja (eng. *charge density*) polikationa na formiranje kompleksa s DNA. Tijekom kompleksiranja s DNA korišteni su poli(dialildimetilamonijev klorid), PDADMAC različite molekulske mase (5000-244000 g mol^{-1}) i DADMAC/*N*-metil-*N*-vinilacetamid heteropolimeri različitih množinskih udjela (24-75 %). Istraživala se poveznica između strukture polimera, nastajanje polipleksa i stabilnosti te njihove biološke aktivnosti. Elektroforetska mjerenja pokazuju da povećanje molekulske mase polikationa kao i povećanje omjera naboja, tzv. N/P omjer, pogoduju nastanku kompleksa i kondenzaciji DNA, a ujedno se povećava mjera zaštite DNA od enzimskih i mehaničkih oštećenja. Rezultati mjerenja statičkog i dinamičkog raspršenja svjetlosti pokazuju da svi kompleksi DNA-polikation sferne strukture, veličine 100-150 nm, tvore kompaktnije strukture povećanjem N/P omjera koja je potom stabilna preko 24 h. Istovremeno povećanjem elektrostatskih interakcija s DNA dolazi do snažnijih interakcija naboja sa staničnim membranama što implicira povećanje *in vitro* citotoksičnosti polikationa i njihovih kompleksa. Shodno takvom ponašanju toksičnosti i gotovo nemogućnosti

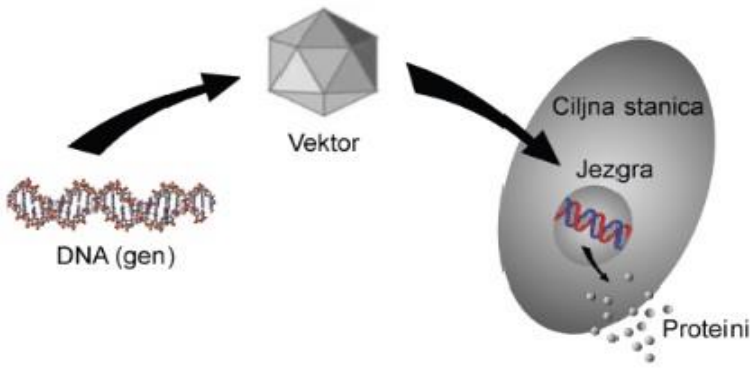
otpuštanja DNA iz kompleksa proizlazi zaključak da je učinak transfekcije slabo usporediv s drugim vrstama polikationa.

Alatorre-Meda je sa suradnicima[8] također proučavao kompleksiranje DNA poli(dialildimetilamonijev kloridom), PDADMAC, i uspješnost transformacije stanica nastalim kompleksima. Praćen je utjecaj količine naboja polikationa, odnosno duljine lanca na stvaranje kompleksa pri različitim omjerima N/P. Rezultati konduktometrijske titracije DNA s PDADMAC-om pokazuju da N/P omjer pri kojem je DNA potpuno vezana u kompleks vrlo malo ovisi o duljini polikationa te iznosi 0,6 ili 0,7. Takav omjer često se naziva i omjer kompaktnosti, $(N/P)_c$. Mjerenja vezana za određivanje zeta potencijala na temelju izmjerene elektroforetske pokretljivosti kao i za veličine nastalih kompleksa metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) izvedena su pri $0{,}2 \leq N/P \geq 10$. Rezultati pokazuju da svi kompleksi s PDADMAC-om imaju pozitivne vrijednosti zeta potencijala pri $N/P \geq 1$ te da maksimalna vrijednost iznosi 12 mV bez obzira na daljenje povećanje N/P omjera. DLS metoda pokazala se nekompetentnom metodom za određivanje veličine nastalih kompleksa pri omjeru $N/P \leq 1$ što najvjerojatnije ukazuje na činjenicu nastanka izduženih linearnih struktura. Unatoč očekivanjima da će polikationi s većom količinom naboja zajedno s DNA tvoriti komplekse manjeg radijusa čineći strukturu kompleksa kompaktnijom, jedan od zaključaka ovog istraživanja upućuje na činjenicu da porast duljine polikationa dovodi do porasta veličine kompleksa.

Zanimljivost u istraživačkom radu Zhou i Li[9] vezana je za utjecaj prisutne soli (NaCl) u otopini tijekom kompleksiranja. Spektroskopskim metodama proučavana je interakcija između poli(alilaminhidroklorida), PAH i DNA. Rezultati mjerenja pokazuju da se porastom ionske jakosti smanjuje stabilnost kompleksa te da sol u otopini zasjenjuje naboje pri čemu je elektrostatsko vezanje DNA i PAH oslabljeno. Posljedica zasjenjenja naboja je disocijacija kompleksa. Do konformacijske promjene dolazi blizu $N/P = 1$, a iznad tog omjera otopina postaje zamućena što je vjerojatno posljedica agregacije PAH-DNA kompleksa.

2.3.1.1. Genska terapija

Utjecaj različitih interakcija na stvaranje DNA-polikation kompleksa, kao i uvjeti stabilnosti nastalih koloidnih kompleksa te zaštita same DNA od enzimskih i mehaničkih oštećenja sustava, učestali su predmet znanstvenih istraživanja. Nastali kompleksi imaju i biološku važnost. Smatra se da su kompleksi DNA ili oligonukleotida s polikationima budući preferirani sustavi u području genske terapije. Osnovni princip genske terapije je ubacivanje novog genetskog materijala u stanice da bi se kompenzirala aktivnost abnormalnih gena. Ukoliko postoji mutirani gen, on ne kodira protein koji je neophodan organizmu pa se u tim slučajevima može u genom domaćina ubaciti novi, normalan gen, koji će kodirati protein koji nedostaje. Terapijski geni u organizam pacijenta unose se pomoću vektora ili direktnim ubacivanjem ogoljene DNA. Najveći problemi genske terapije su tehnički nedostaci, jer ne postoji siguran način da se novi geni ubace u točno određene stanice i da se njihova funkcija poslije insercije (umetanja) precizno kontrolira. Stoga je cilj zamijeniti uobičajne vektore, poput plazmida, s navedenim kompleksima kako bi se istovremeno osigurala visoka učinkovitost transformacije stanica i niska smrtnost.



Slika 9. Novi gen ubačen vektorom u stanicu kodira protein.

2.4. Fizikalno-kemijske metode

Metode korištene tijekom izvedbe diplomskog rada su elektroforeza i spektroskopija kvazielastičnog raspršenja svjetlosti. U ovom poglavlju bit će navedene teorijske karakteristike spomenutih metoda kao i pregled najvažnijih jednadžbi vezanih uz određivanje odgovarajućih fizikalnih veličina.

2.4.1. Elektroforeza

Većina bioloških makromolekula je električki nabijena, te će se stoga gibati u električnom polju. Gibanje čestice kroz otapalo pod djelovanjem električnog polja naziva se elektroforezom. Pri elektroforezi na nabijenu česticu djeluje elektrostatska sila kojoj se suprostavlja sila trenja uslijed viskoznosti medija. Nalazi li se čestica s nabojem q u izolatorskom mediju smještenom u električnom polju jakosti E, čestica će se gibati stalnom brzinom v koju određuje ravnoteža između električne sile i sile trenja: $F_{el} = F_{tr} \rightarrow Eq = fv$, gdje je f koeficijent trenja odnosno mjera otpora koji otopina (medij) pruža gibanjem nabijene molekule, te ovisi o obliku, veličini i solvataciji nabijene molekule kao i o viskoznosti otopine. Koristan način karakterizacije makromolekula jest upravo metoda koja se temelji na njihovoj brzini kretanja u električnom polju. Pomoću ovog svojstva mogu se odrediti molekulske mase proteina, razlikovati molekule na temelju njihovog ukupnog naboja ili oblika, detektirati promjene nabijenog u nenabijeni aminokiselinski ostatak ili obrnuto ili pak kvantitativno odijeliti različite makromolekule.

2.4.1.1. Elektroforetska pokretljivost

Elektroforetska pokretljivost nabijene molekule, μ_e ($m^2\ V^{-1}\ s^{-1}$), definira se kao brzina, v, po jakosti električnog polja, E:

$$\mu_e = \frac{v}{E} \tag{7}$$

Budući da pokretljivost ovisi o koeficijentu trenja, koji je funkcija nekog od fizičkih svojstava molekule, vrijednost μ bi u načelu trebala pružati informaciju o veličini i obliku molekule.

Međutim, medij u pravilu nije izolator nego elektrolit koji sadrži ione te nabijena čestica u elektrolitu privlači male ione, te je stoga okružena rojem iona koji ju zaklanja od vanjskog električnog polja. Nastali roj iona djelomično se razara djelovanjem polja i gibanjem čestice kroz medij. Teorija elektroforeze još uvijek nije uspjela na odgovarajući način objasniti ove i neke druge efekte zbog čega elektroforeza ne može pružiti detaljne informacije o strukturi makromolekula.

Zaključno, pokretljivost ima pozitivnu vrijednost ako se čestice gibaju prema negativnoj elektrodi odnosno prema nižem potencijalu, a ukoliko se gibaju prema višem potencijalu poprima negativnu vrijednost.

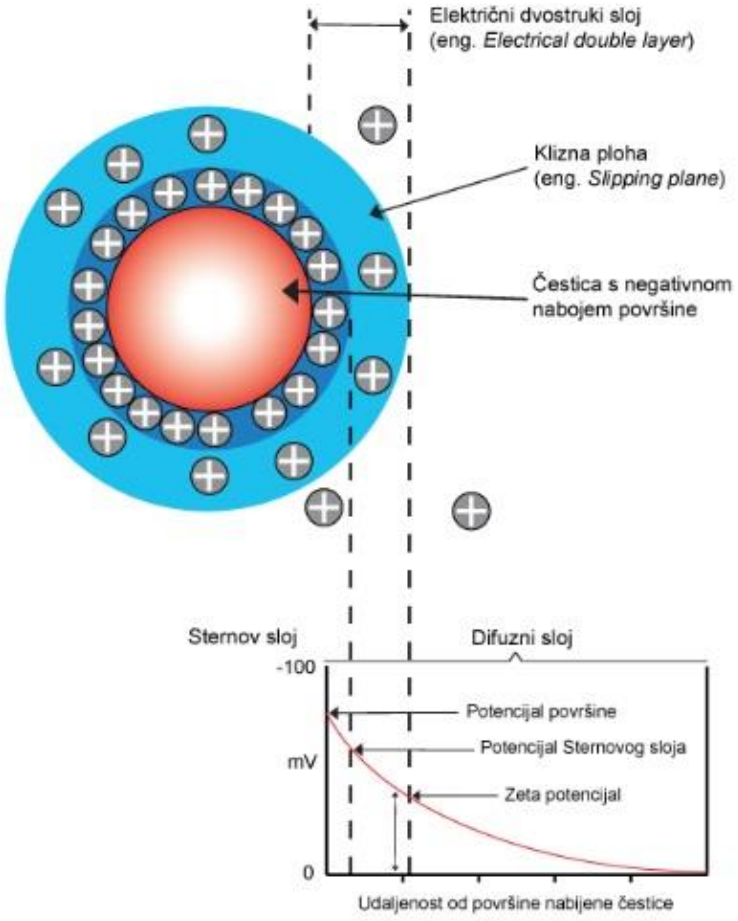
2.4.1.2. Električni međupovršinski sloj

Raspored elektrostatskih naboja na krutoj površini[10] i uravnotežavajućih naboja tekućine naziva se električni međupovršinski sloj (eng. *Electrical Interfacial Layer*, EIL). Električni potencijal površine čestice privlači ione suprotnog naboja i na taj način se stvara ionska atmosfera. Prijanjanjem čestica neke tvari na površinu koloidne čestice ostvaruje se ravnomjeran sloj nepomičnih iona koji čvrsto priliježu na površinu i suprotno nabijenih iona, zajedno tvoreći električni dvostruki sloj (dvosloj). Razlog nastajanja dvostrukog sloja je neelektrični afinitet naboja prema površini. Taj proces dovodi do nakupljanja električnog naboja na površini koji stvara električno polje koje nadalje utječe na ione u tekućini. Nastalo električno polje u kombinaciji s termalnim gibanjem stvara protuione koji zasjenjuju površinske naboje. Ukupni električni naboj u tom zasjenjujućem difuznom sloju je jednako velik kao i ukupni površinski naboj, ali suprotnog polariteta, stoga je posljedica ukupne strukture električki neutralan sustav.

Prema Helmholtzovu modelu naboj iona na površini metala neutraliziran je nabojem protuiona iz otopine na udaljenosti δ od površine pri čemu se potencijal linearno smanjuje od površine prema protuionima u otopini. U prilog tome ide i Columbov potencijal točkastog naboja koji je obrnuto proporcionalan udaljenosti od naboja. Gouy-Chapman-Sternov model uključuje Helmholtzov model, uz određene pretpostavke: ione aproksimira kao točkaste naboje, električnu permitivnost dvosloja uzima kao konstantnu vrijednost te pretpostavlja homogenost otapala na atomskoj skali. Uzimajući u obzir navedene modele, možemo reći da se električni dvosloj sastoji se od unutrašnjeg i vanjskog sloja. Kompaktni unutrašnji sloj, poznat kao Sternov sloj, čine suprotno nabijeni ioni vezani za površinu dovoljno čvrsto da nadilaze termička gibanja. On privlači

određeni udio suprotno nabijenih iona iz tekuće faze. Vanjski sloj sa suprotnim nabojem nalazi se u tekućoj fazi, odnosno u disperznom sredstvu i uz samu površinu čvrste faze. Izvan toga sloja, utjecaj električnog polja na ione je manji pa su ioni pokretni. Raspored iona od promatrane granice eksponencijalno opada u tzv. difuznom sloju zvanom Gouy-Chapmanov sloj. Svojstva tog sloja ovise samo o elektrostatskim interakcijama nabijenih vrsta. Karakteristična duljina tog sloja je obrnuto proporcionalna korijenu koncentracije iona u tekućini. Stabilnost električnog dvostrukog sloja moguće je narušiti ukoliko se sustavu dovede energija, najčešće zagrijavanjem, koja potiče ubrzano termodinamičko gibanje čestica. Tada se pri sudaru dvije čestice razbijaju dotad čvrsto priljubljeni slojevi iona na površini čestice i nastaju nakupine. U koloidnim sustavima na granici između dvije faze javlja se električni potencijal kao posljedica stvaranja električnog dvosloja. Prema slici 9. vidljivo je kako potencijal površine čestice linearno opada u Sternovom sloju i eksponencijalno u difuznom sloju. Granica Sternovog i difuznog sloja naziva se klizna ploha. Ta ploha dijeli elektrokinetičku jedinicu od ostatka otopine. Elektrokinetička jedinica je dio otopine uz površinu čestice koji se u električnom polju giba zajedno s tom česticom.

Posljedica formiranja dvostrukog sloja je kretanje koloidnih čestica kroz medij pod utjecajem električnog polja. Pri kretanju nabijenih koloidnih čestica u električnom polju dolazi do razdvajanja suprotno nabijenih slojeva dvostrukog sloja pri čemu treba savladati potencijal koji postoji između njih. Potencijal klizne plohe naziva se elektrokinetički (zeta, ζ) potencijal. Elektrokinetička mjerenja, odnosno određivanje elektrokinetičkog potencijala može se primjeniti i na sustave u kojima ne pratimo adsorpciju, već stvaranje kompleksa između suprotno nabijenih makromolekula.



Slika 10. Shematska ilustracija promjene potencijala s udaljenošću od površine čestice[10].

2.4.1.3. Određivanje elektrokinetičkog (zeta, ζ) potencijala

Zeta potencijal, ζ (mV), određen je udaljenošću između površine čestice i klizne plohe te ovisi o svojstvima tekućine kao i o svojstvima površine. Zeta potencijal, dakle nije potencijal na samoj površini čestice, odnosno promatranog kompleksa, već potencijal na granici elektrokinetičke jedinice, odnosno na granici između pokretnog i nepokretnog dijela difuznog sloja. Njegova vrijednost direktno je proporcionalna debljini difuzijskog sloja. Elektrostatsko odbijanje između čestica ovisi o vrijednosti zeta potencijala: što je viši potencijal to je jače odbijanje i sustav postaje stabilniji. Zeta potencijal nije izravno mjerljiv parametar, ali se može prema odgovarajućim teorijskim približenjima izračunati pomoću elektroforetske pokretljivosti.

Naime, eksperimentalno se određuje brzina čestica u električnom polju te se uz poznatu jakost električnog polja prema jednadžbi (7) izračunava elektroforetska pokretljivost.

Prilikom izrade diplomskog rada za računanje zeta potencijala na temelju elektroforetske pokretljivosti primjenjena je teorija krutih sfera čije se ograničenje odnosi na bezdimenzijski umnožak κa koji se javlja u Debye-Hückelovoj teoriji ionskih interakcija. κ je recipročna vrijednost Debyejeve duljine, dok je a radijus iona. Za većinu koloidnih sustava koristi se jednadžba Smoluchowskog koja glasi:

$$\mu_{\mathrm{e}} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \tag{8}$$

uz uvjet κa >> 1 gdje je η viskoznost, a ε dielektrična konstanta otapala. Teorija Smoluchowskog vrijedi za dispergirane čestice bilo kojeg oblika pri bilo kojoj koncentraciji, no ima ograničenja valjanosti, jer ne uključuje Debyevu duljinu, κ^{-1}, koja mora biti važna za elektroforezu. Međutim, teorijska analiza pokazuje da teorija Smoluchowskog vrijedi samo za dovoljno tanke dvostruke slojeve odnosno kada je radijus čestica mnogo veći od Debyeve duljine. Ovaj model je važeći za većinu vodenih sistema gdje je Debyeva duljina obično samo nekoliko nanometara.

2.4.2. Spektroskopija kvazielastičnog raspršenja svjetlosti

Kvazielastično raspršenje svjetlosti (QELS) poznato i kao dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) je metoda za određivanje distribucije veličina malih čestica u suspenziji.

Raspršenje svjetlosti prvi je proučavao Rayleigh. Prema njemu je intenzitet raspršene svjetlosti, I_{s} , na vrlo malim česticama (s promjerom manjim od dvadesetine valne duljine svjetlosti) dan jednadžbom:

$$I_{\mathrm{s}} = \frac{8}{3}\pi N \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \alpha^2 I_0 \tag{9}$$

pri čemu je N broj čestica, α polarizabilnost, λ valna duljina zračenja, I_{o} intenzitet upadnog zračenja. Kad dimenzije čestica premašuju Rayleighijev uvjet, intenzitet raspršene svjetlosti ovisi i o kutu raspršenja (Θ).

Osnovni princip rada tehnike kvazielastičnog raspršenja svjetlosti je vrlo je jednostavan: uzorak osvjetlimo laserskim snopom zraka pri čemu dolazi do raspršenja svjetlosti. Intenzitet raspršenog zračenja flukturia na detektor pod točno određenim kutom raspršenja, Θ. Potrebno je znati točnu temperaturu tijekom mjerenja, jer viskoznost tekućine ovisi o njezinoj temperaturi. Temperatura također treba biti stabilna, inače će konvekcija struje u uzorku uzrokovati ne-slučajne pokrete koji će spriječiti ispravnu interpretaciju veličine. Brzina Brownovog gibanja je definirana svojstvom nazvanim translacijski difuzijski koeficijent, D. Poznavanjem difuzijskog koeficijenta i uz odgovarajuće pretpostavke o obliku čestica, možemo odrediti veličinu čestica. Najčešća je pretpostavka o sfernom obliku čestica gdje se u obzir uzima samo translacijski doprinos koeficijenta difuzije te je njihov hidrodinamički radijus R_h dan Stokes-Einsteinovom relacijom:

$$R_\mathrm{h} = \frac{k_b T}{6\pi\eta D} \qquad (10)$$

gdje je k_b Boltzmanova konstanta, T je apsolutna temperatura, η viskoznost otapala, D je difuzijski koeficijent čestice. Radijus dobiven ovim postupkom je radijus sfere koja ima isti translacijski koeficijent difuzije kao čestica.

Tirado i suradnici[11] eksperimentalno su pokazali da se za fragmente DNA duljine 40-50 parova baza (pb) hidrodinamičko ponašanje podudara s ponašanjem ravnih štapića, cilindara. U vodenim otopinama, zbog elektrostatskog odbijanja koje izravnava poliion to vrijedi i do nekoliko stotina parova baza. Za razliku od izraza za difuzijski koeficijent sfernih čestica ovdje je osim glavne dimenzije čestica, L_c, potrebno uvesti i logaritamsku ovisnost o omjeru duljine i promjera cilindra, $\frac{L_c}{d}$.

Iako je metoda kvazielastičnog raspršenja svjetlosti obično primjenjiva za sferne čestice potrebno je imati na umu da navedenu metodu ne možemo pouzdano primjenjivati u otopinama u kojima nema dodane soli, odnosno elektrolita niske molekulske mase. U tom slučaju intenzitet raspršene svjetlosti vodenih otopina polielektrolita jedva je nešto viši od intenziteta svjetlosti raspršene na čistom otapalu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U eksperimentalnom dijelu diplomskog rada korišteni su sljedeći materijali:

- DNA izolirana iz testisa lososa, $M_w \approx 1{,}3 \cdot 10^6$ g mol^{-1} (Sigma Aldrich)
- poli(dialildimetilamonijev klorid), PDADMAC, M_w = 100 000 – 200 000 g mol^{-1} (Sigma Aldrich)
- natrijev klorid, NaCl, p.a., *M*r = 58,44 (Fluka)
- kalcijev klorid dihidrat, $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, p.a., *M*r = 147,02 (Riedel-de Haën)
- pufer 4- (2-hidroksietil) -1-piperazinetansulfonska kiselina, HEPES, *M*r = 260,29 (Sigma Aldrich)
- 3 standardna pufera s pH vrijednostima 3,7 i 10 (Riedel-de Haën)

Za pripremu otopina korištena je redestilirana voda.

U svim računima, gdje je to bilo potrebno, uzeta je vrijednost prosječne molekulske mase monomera 161,7 g mol^{-1}.

3.2. Metode

Kako bi ispitali utjecaj vrste soli na kompleksiranje DNA s PDADMAC-om potrebno je pripremiti otopine odgovarajućih koncentracija i provesti postupak titracije. Titracijska mjerenja izvodila su se u oba smjera (titracija otopine DNA s otopinom PDADMAC i obrnuto) u prisutnosti odgovarajuće soli ili pufera stalne koncentracije, $c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}. Neovisno o smjeru titracije, za koncentracije titransa i titranda uzete su sljedeće vrijednosti: c(titrans) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, c(titrand) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}.

Točan pH otopine DNA i otopine PDADMAC izmjeren je kombiniranom elektrodom s referentnom Ag/AgCl elektrodom. Elektroda je prije mjerenja pH baždarena s tri sandardna pufera. Izmjereni pH navedenih otopina iznosio je približno 6.9

Komercijalna DNA je liofilizirana te je otopina takve DNA pripremljena otapanjem odgovarajuće mase DNA uz miješanje na magnetskoj miješalici sve dok se prestao uočavati talog,

a točna koncentracija određena je spektrofotometrijski. Koncentracija DNA računata je na temelju izmjerene apsorbancije pri 260 nm, što odgovara maksimumu apsorbancije za nukleinske kiseline. Poznato je da 50 μg dvolančane DNA ima pri 260 nm apsorbanciju jednaku 1. Podatak koji je važan pri radu s DNA je njezina čistoća, što se izražava omjerom A_{260}/A_{280} pri čemu glavno onečišćenje DNA predstavljaju protein čiji je maksimum apsorbancije pri 280 nm. Čistoća DNA je zadovoljavajuća ukoliko je taj omjer između 1,7 i 2,0.

UV/Vis spektar otopine DNA sniman je na instrument *Cary 5 UV-Vis-NIR Spectrophotometer, Varian* u intervalu od 200 – 400 nm pri temperaturi 25 ˚C.

3.2.1. Određivanje veličine čestica

Prvi dio eksperimenta odnosio se na mjerenje veličine čestica kompleksa DNA-PDADMAC nastalog titriranjem otopine PDADMAC (c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) s otopinom DNA (c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}). Naime, pratio se utjecaj omjera množina DNA i PDADMAC-a na hidrodinamički promjer čestica kompleksa, pri čemu su sve navedene množinske koncentracije računate po monomeru, odnosno za DNA po bazi, uz procijenjenu količinu pozitivnog naboja PDADMAC-a i negativnog naboja DNA po lancu (s obzirom na ukupnu duljinu lanca i broj amino, odnosno fosfatnih skupina).

U drugom dijelu eksperimenta provedena je titracija u obrnutom smjeru, odnosno titracija otopine DNA (c = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) s otopinom PDADMAC (c = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}) te je ponovo praćen utjecaj omjera množina na veličinu nastalog kompleksa.

Mjerenja su izvedena na instrumentu *Particle Size Analyzer, Brookhaven Instrument Corporation* pri temperaturi 25 ˚C. Otopine su međusobno miješane u odgovarajućem omjeru direktno u kiveti za mjerenje pri čemu je između miješanja i samog mjerenja proteklo 10 minuta. Potrebno je voditi računa o minimalnom i maksimalnom volumenu stoga je početni volumen titransa iznosio 0,2 ml, a konačni volumen smjese oko 1,5 ml. Veličine čestica određene su uz sljedeće uvjete: *dust filter on, dust cutoff* 30 % uz pretpostavku nastajanja uniformnih sfernih čestica.

3.2.2. Određivanje pokretljivosti i elektrokinetičkog (zeta, ζ) potencijala

Ponovnim provođenjem titracijskih mjerenja u oba smjera pri istim uvjetima ispitivala se metoda određivanja pokretljivosti i elektrokinetičkog potencijala nastalog kompleksa DNA-PDADMAC u prisutnosti otopina različitih soli, odnosno različitih kationa. Istraživao se utjecaj omjera množina DNA i PDADMAC-a na pokretljivost i elektrokinetički potencijal nastalog kompleksa tijekom titracije. Sva mjerenja također su napravljena u oba smjera pri čemu su koncentracije titransa i titranda ostale nepromjenjene.

Mjerenja su provedena na instrumentu *Zeta Plus, Zeta Potential Analyzer, Brookhaven Instruments Corporation*. Pomicanje tekućine izazvano je vanjskim električnim poljem pri čemu se koristi polje istosmjerne struje ili nisko frekventno (manje od 10 KHz) polje izmjenične struje. Sva mjerenja izvedena su u kiveti s optičkim putem 1 cm pri temperaturi 25 ˚C.

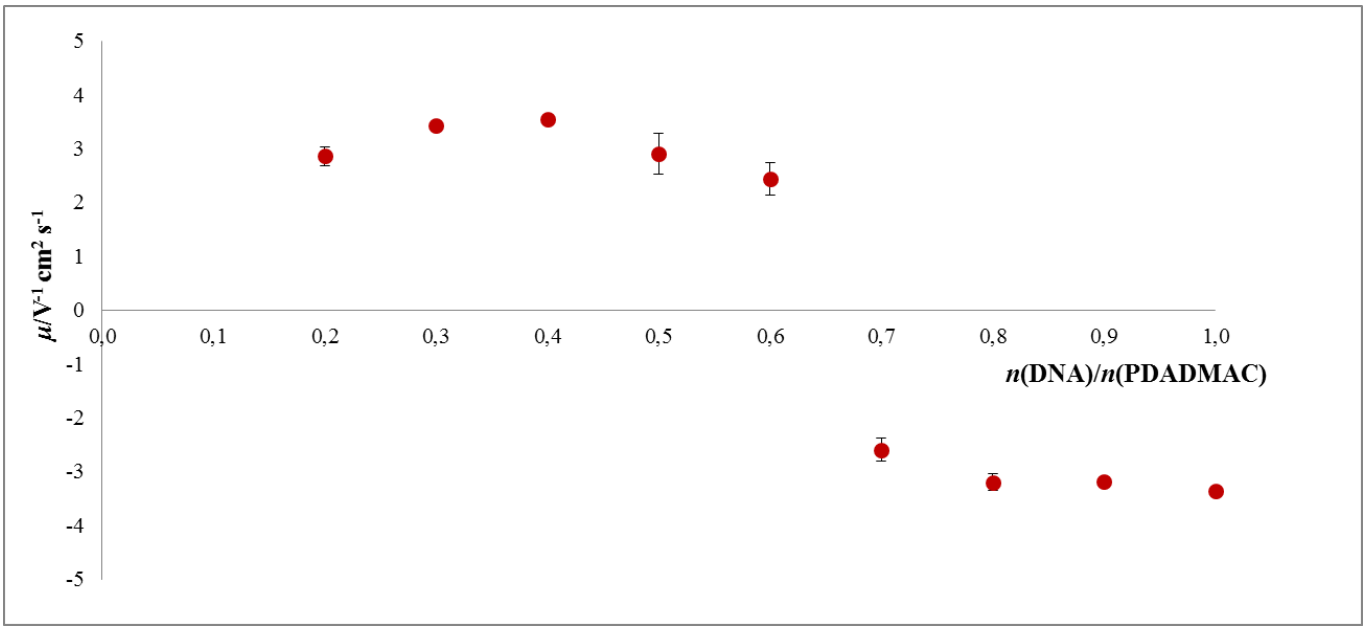
4. REZULTATI I RASPRAVA

Utjecaj vrste soli na kompleksiranje DNA s PDADMAC-om istraživan je metodama elektroforeze i spektroskopije kvazielastičnog raspršenja svjetlosti. Drugim riječima, određivala se veličina čestica nastalog kompleksa, pokretljivost čestica i zeta potencijal u otopinama različitih soli (NaCl, $CaCl_2$, HEPES). Smjer titracije također se promatrao kao mogući utjecaj na stvaranje kompleksa pa su se sva mjerenja izvodila u obliku titracije u oba smjera: otopina DNA u otopini PDADMAC i obrnuto.

4.1. Rezultati dobiveni metodom elektroforeze

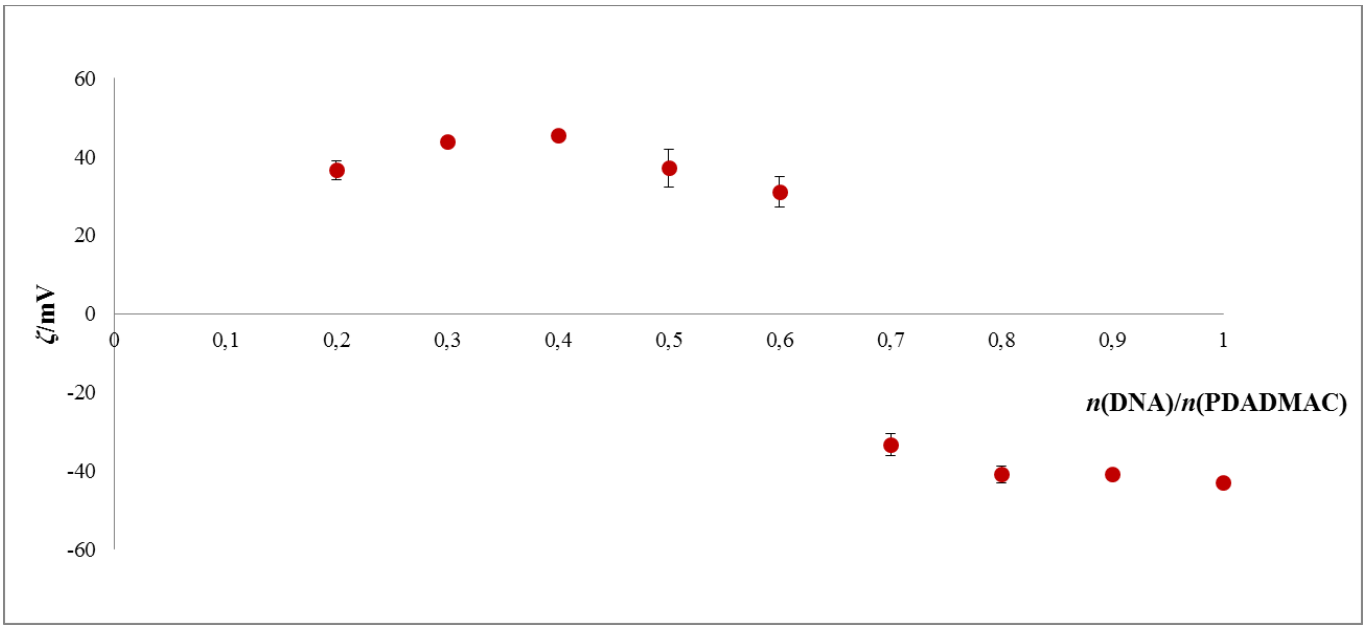
4.1.1. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini NaCl

U prvom nizu eksperimenata titracije otopine PDADMAC s otopinom DNA mjerenja su izvedena u prisustvu otopine NaCl, c(NaCl) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}.



Slika 11. Pokretljivost PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije PDADMAC-a s DNA u otopini NaCl.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3},
c(NaCl) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

Zeta potencijal, veličina koju nije moguće direktno izmjeriti, određena je iz brzine kretanja čestica u električnom polju, odnosno na temelju dobivenih vrijednosti pokretljivosti tijekom kompleksiranja u otopini NaCl (slika 11.).

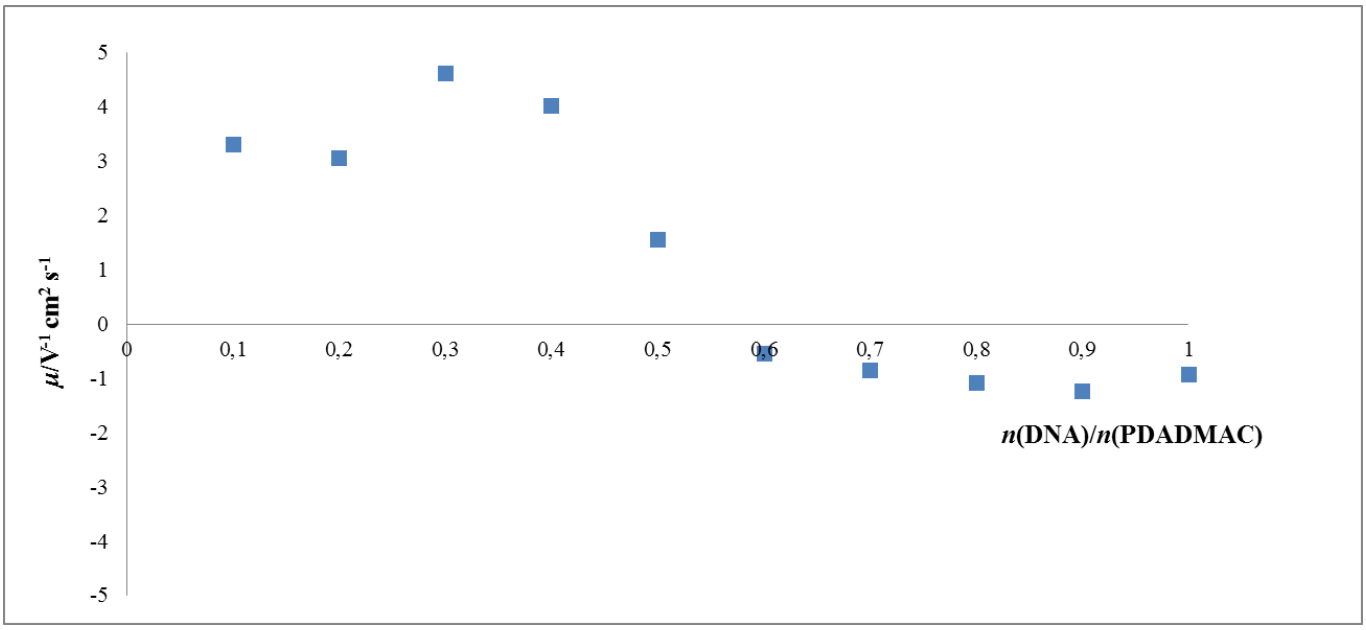


Slika 12. Zeta potencijal PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije PDADMAC-a s DNA u otopini NaCl.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3},
c(NaCl) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

Na slici 11. i 12. prikazan je utjecaj otopine NaCl na pokretljivost i zeta potencijal tijekom kompleksiranja. Nastali kompleksi sadrže suvišak pozitivnog naboja sve do pojavljivanja izoelektrične točke pri omjeru množina n(DNA)/n(PDADMAC) = 0,65. Kao izoelektrična točka uzima se vrijednost omjera množina pri kojoj je zeta potencijal jednak nuli. Iznad navedenog omjera pokretljivost i zeta potencijal poprimaju negativne vrijednosti, jer dolazi do prenabijanja kompleksa, odnosno javlja se suvišak negativnog naboja. Vrijednosti zeta potencijala prikazane na slici 12. izračunate su iz vrijednosti pokretljivosti (slika 11.) korištenjem jednadžbe po Smoluchowskom (jednadžba 8). Isti je model korišten i za preostale izračune zeta potencijala.

4.1.2. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini $CaCl_2$

Radi usporedbe s rezultatima dobivenim tijekom kompleksiranja u otopini NaCl, gdje disocijacijom soli nastaju jednovalentni ioni (Na^+), kompleksiranje je istraživano i za otopinu dvovalentnih iona (Ca^{2+}), $c(CaCl_2) = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}.

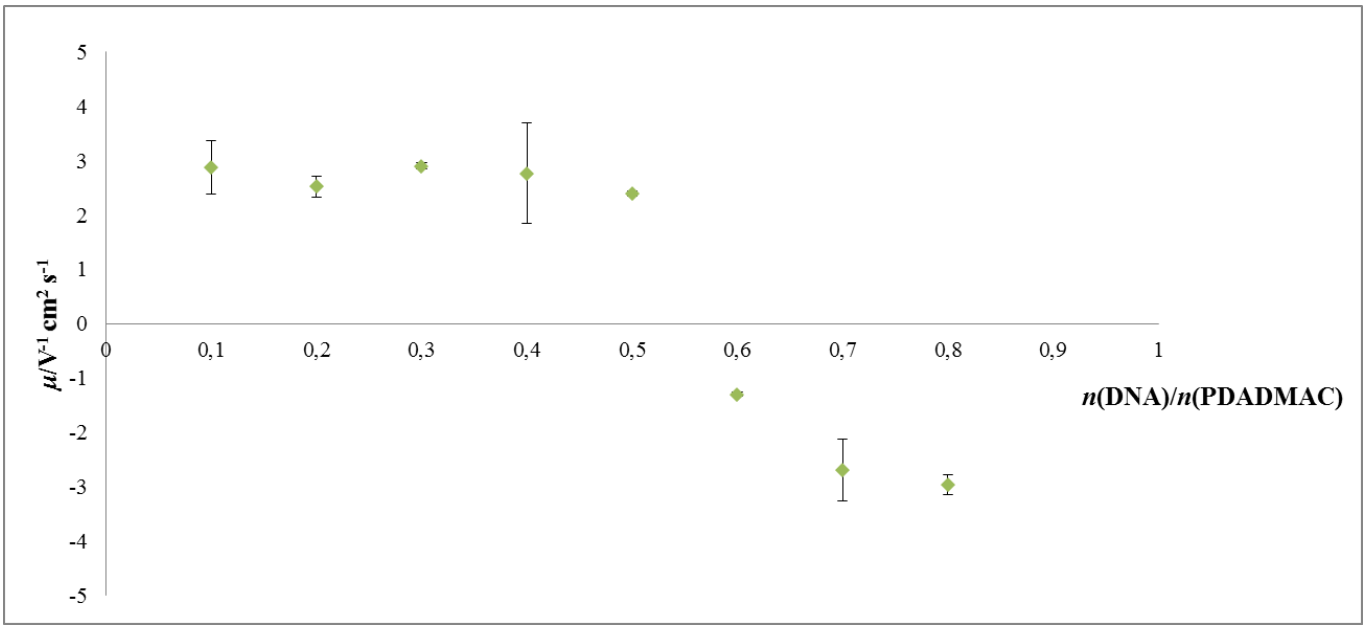


Slika 13. Pokretljivost PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije PDADMAC-a s DNA u otopini $CaCl_2$.
$c(PDADMAC) = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, $c(DNA) = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3},
$c(CaCl_2) = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} ; θ = 25 °C

Na slici 13. vidimo kako utjecaj otopine $CaCl_2$ na pokretljivost i zeta potencijal tijekom kompleksiranja rezultira pojavljivanjem izoelektrične točke pri omjeru množina $n(DNA)/n(PDADMAC)$ = 0,55. Navedena vrijednost nešto je niža nego kod mjerenja pokretljivosti PDADMAC-DNA kompleksa u otopini NaCl. Iznad navedenog omjera javlja se suvišak DNA, odnosno suvišak negativnog naboja kompleksa gdje pokretljivost i zeta potencijal poprimaju negativne.

4.1.3. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini pufera

Osim utjecaja jednovalentnih, odnosno dvovalentnih iona na kompleksiranje istraživao se i utjecaj pufera HEPES, c(pufer) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}, na stvaranje kompleksa PDADMAC-DNA.

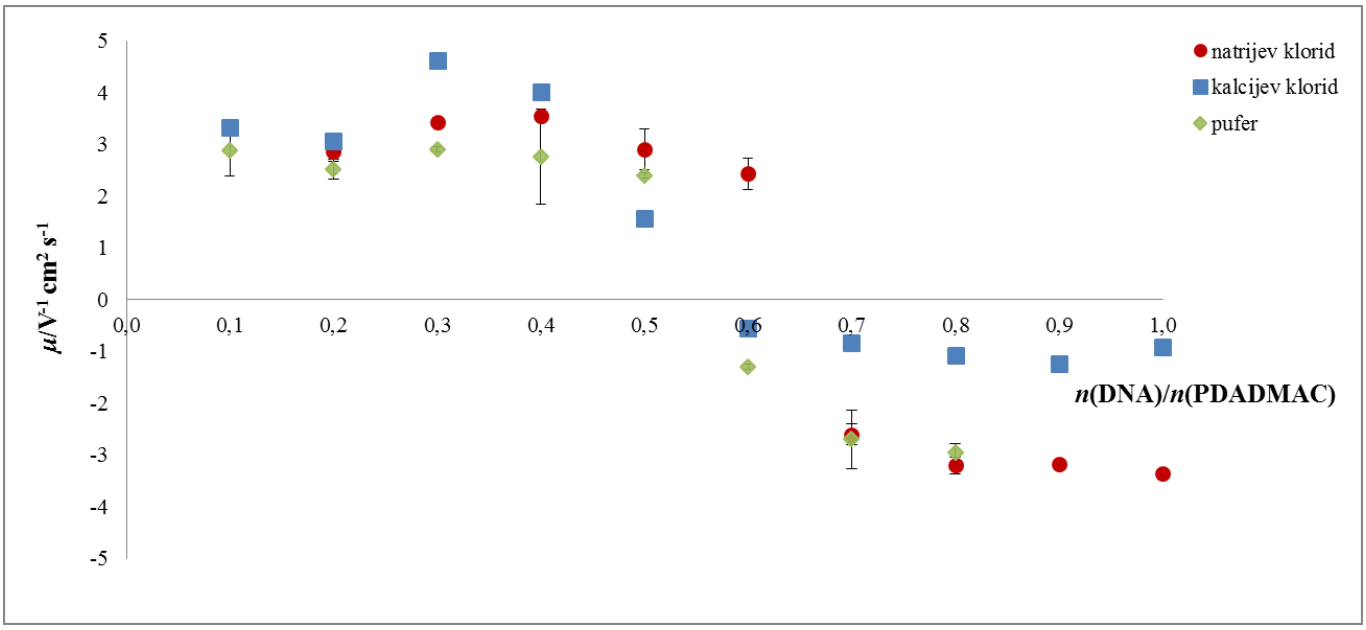


Slika 14. Pokretljivost PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije PDADMAC-a s DNA u otopini pufera.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3},
c(pufer) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

Na temelju slike 14. pojavljivanje izoelektrične točke tijekom kompleksiranja u prisutnosti pufera možemo očekivati pri omjeru množina n(DNA)/n(PDADMAC) = 0,55, slično kao i tijekom kompleksiranja u otopini $CaCl_2$ (slika 13.). Što je veći suvišak DNA, vrijednosti pokretljivosti i zeta potencijala poprimaju sve manje vrijednosti, s time da pokretljivost i zeta potencijal poprimaju pozitivnije vrijednosti u oba područja tijekom kompleksiranja u otopini $CaCl_2$ nego u puferu.

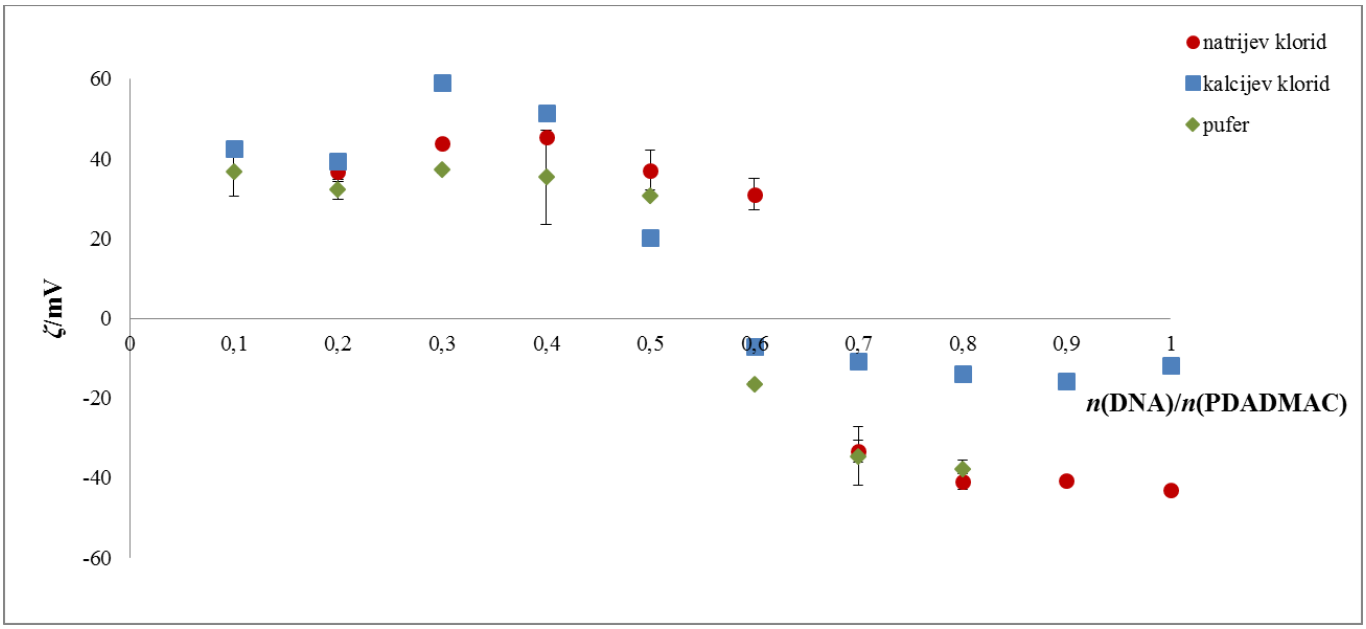
4.1.4. Usporedba utjecaja vrste soli na kompleksiranje tijekom titracije s DNA

Usporedbom rezultata dobivenih tijekom titracije otopine PDADMAC s otopinom DNA u otopinama različitih soli (NaCl, $CaCl_2$ i pufer) dobivamo bolji uvid na koji način i pri kojim uvjetima određeni kationi utječu na kompleksiranje.



Slika 15. Utjecaj vrste soli na pokretljivost PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije PDADMAC-a s DNA u otopinama različitih soli.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} , c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3},
c(sol) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

Važnost praćenja pokretljivosti, odnosno zeta potencijala očituje se u pojavljivanju izoeletrične točke. Istraživanje uvjeta pri kojima su kompleksi neutralni spada među glavne predmete interesa u ovom diplomskom radu.

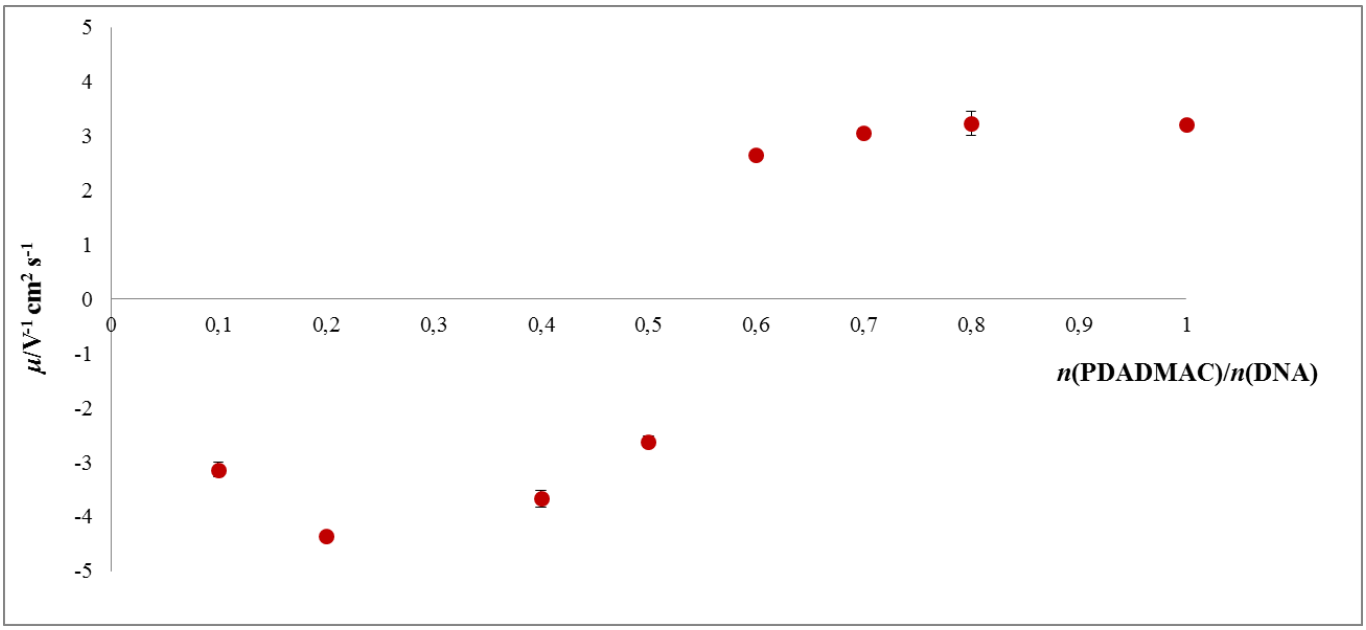


Slika 16. Utjecaj vrste soli na zeta potencijal PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije PDADMAC-a s DNA u otopinama različitih soli.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3},
c(sol) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

U području omjera množina do 0,5 nije uočena značajna razlika između sustava u otopinama različitih soli (razlika je u okviru eksperimentalne pogreške). U području omjera iznad 0,6, gdje su kompleksi negativno nabijeni, vrijednosti pokretljivosti, a time i zeta potencijala, su više (pozitivnije) u slučaju otopine $CaCl_2$ u odnosu na otopinu NaCl i pufer. Stoga, najveći utjecaj soli vidi se upravo u negativnom dijelu kada je DNA u suvišku, odnosno kad su kompleksi negativno nabijeni.

4.1.5. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini NaCl

Promjena smjera titracije također se promatrala kao mogući utjecaj na stvaranje kompleksa DNA-PDADMAC. Poznato je da smjer titracije utječe na nastajanje polielektrolitnih kompleksa što je pokazano na primjeru kompleksiranja poli(alilamonijevog) klorida[12] , kao i na kompleksiranje u sustavu lizozim natrijev poli(stirensulfonat)[13]. Titracijom otopine DNA s otopinom PDADMAC u otopini NaCl, c(NaCl) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}, dobiveni su sljedeći rezultati pokretljivosti:

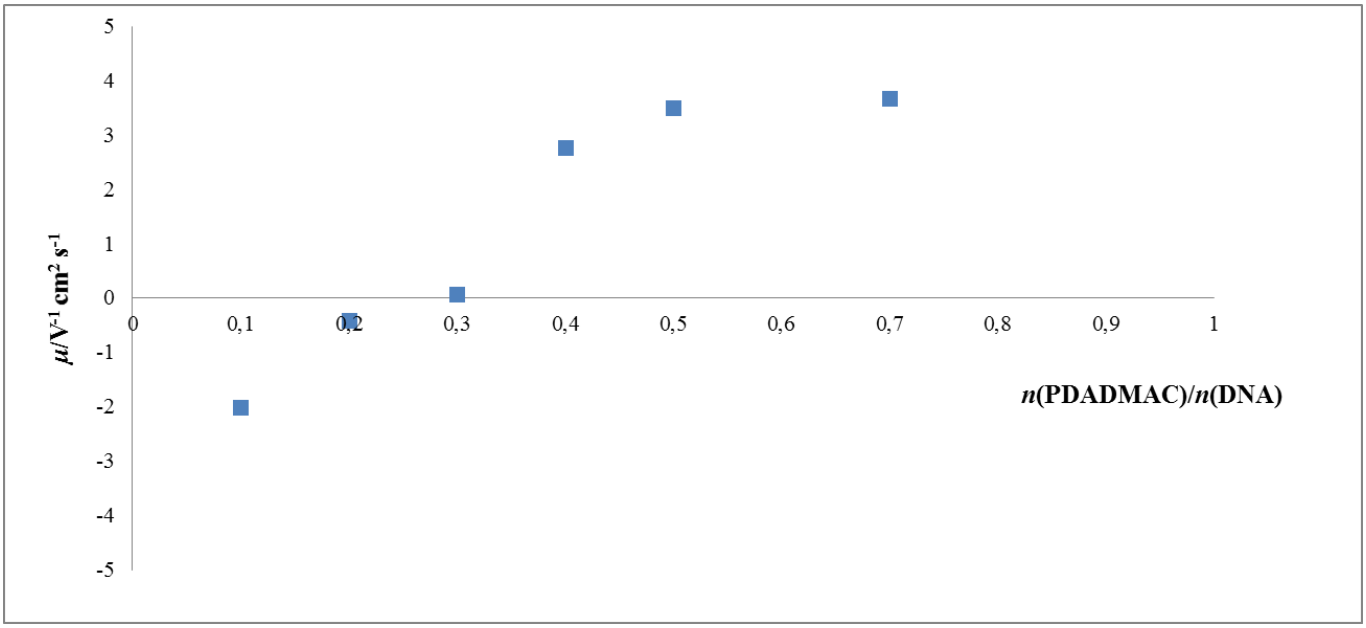


Slika 17. Pokretljivost PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije DNA s PDADMAC-om u otopini NaCl.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^3, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^3,
c(NaCl) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^3 ; θ = 25 °C

Na temelju slike 17. opažamo kako promjenom smjera titracije vrijednosti pokretljivosti i zeta potencijala kompleksa u otopini NaCl prvo poprimaju negativne vrijednosti. Povećanjem udjela PDADMAC-a tijekom kompleksiranja vrijednosti pokretljivosti i zeta potencijala su sve pozitivnije, no ako uspoređujemo apsolutne vrijednosti u oba područja primjećujemo kako su te vrijednosti dosta slične Izoelektrična točka se nalazi pri omjeru n(PDADMAC)/n(DNA) = 0,55.

4.1.6. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini $CaCl_2$

Za usporedbu s rezultatima dobivenim u otopini NaCl (slika 21. i 22.) istraživan je utjecaj promjene smjera titracije i tijekom kompleksiranja u otopini $CaCl_2$, $c(CaCl_2) = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}.



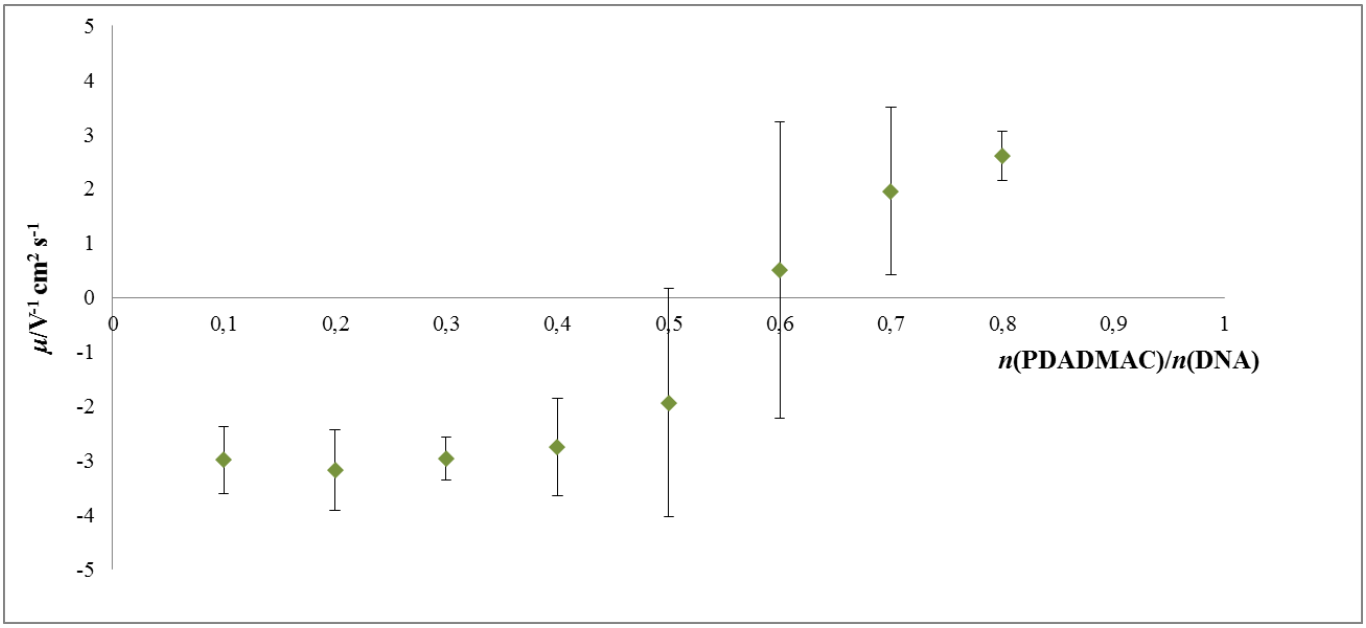
Slika 18. Pokretljivost PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije DNA s PDADMAC-om u otopini $CaCl_2$.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3},
$c(CaCl_2) = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

Slika 18. zorno prikazuju kako se tijekom kompleksiranja u otopini $CaCl_2$ izoelektrična točka postiže pri vrlo niskom omjeru množina, n(PDADMAC)/n(DNA) = 0,3, što je bitno niža vrijednost nego u slučaju otopine NaCl (slika 19. i 20.). Iznad navedenog omjera vrijednosti pokretljivosti i zeta potencijala naglo rastu.

U literaturnom pregledu navedeno je istraživanje Recorda i suradnika[3] prema kojem dvovalentni protuioni prilaze bliže lancima DNA i pritom bolje zasjenjuju naboj fosfatnih skupina na lancima, nego kad se DNA nalazi u otopini NaCl.

4.1.7. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini pufera

Rezultati mjerenja pokretljivosti i zeta potencijala tijekom titracije otopine DNA s otopinom PDADMAC u otopini pufera prikazani su na slici 19.

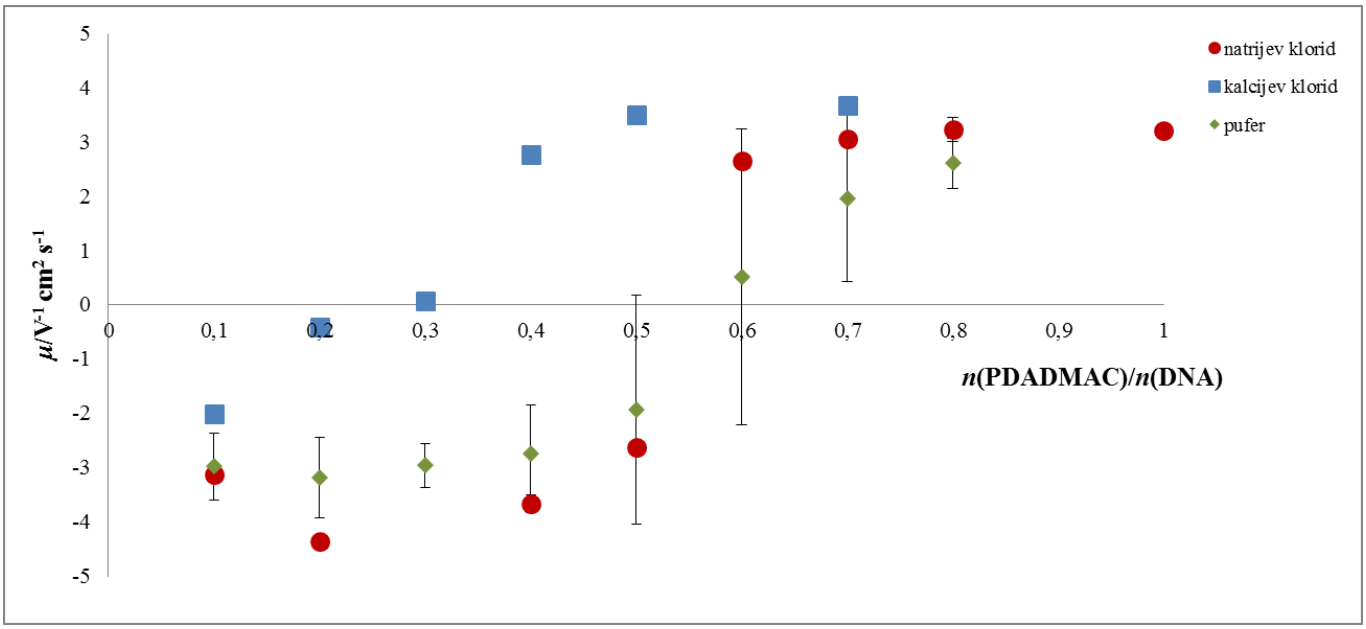


Slika 19. Pokretljivost PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije DNA s PDADMAC-om u otopini pufera.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3},
c(pufer) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

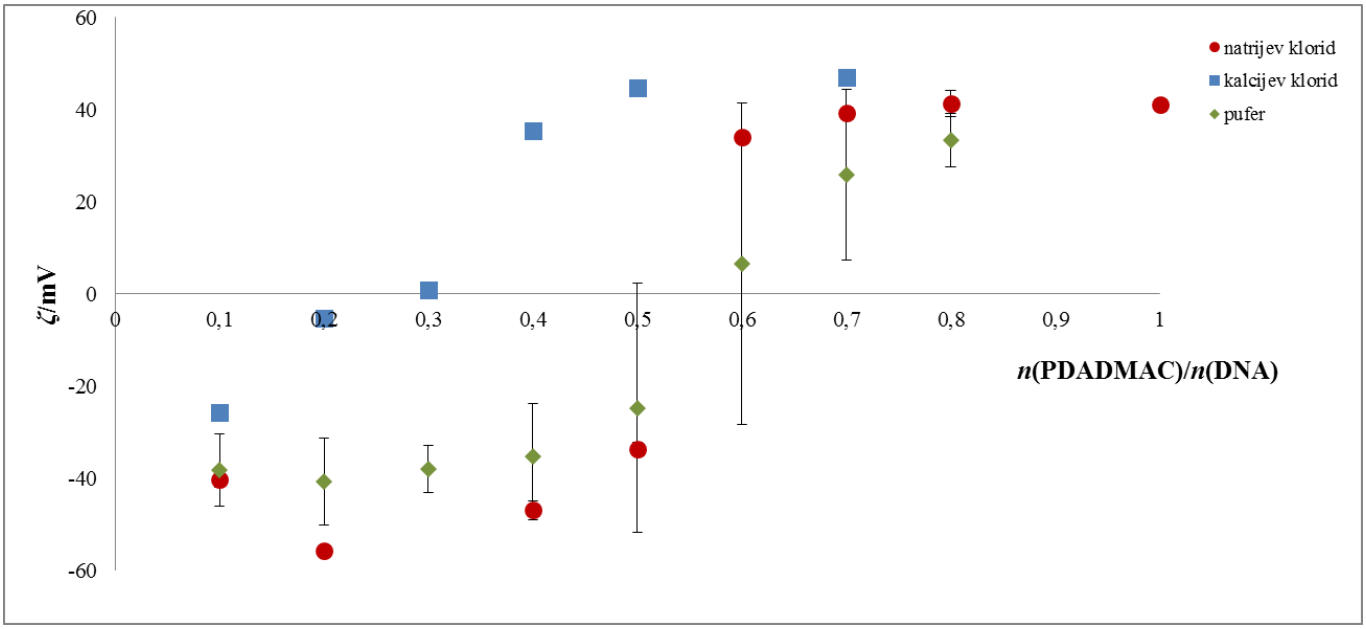
Kod rezultata prikazanih na slici 19 može se uočiti kako povećanjem udjela PDADMAC-a vrijednosti pokretljivosti i zeta potencijala postepeno rastu. Značajniji rasap točaka ukazuje na slabiju reproducibilnost. Izoelektrična točka je procijenjena na n(PDADMAC)/n(DNA) = 0,55, slično kao i tijekom kompleksiranja u otopini NaCl (slika 17.).

4.1.8. Usporedba utjecaja vrste soli na kompleksiranje tijekom titracije s PDADMAC-om

Istraživati utjecaj promjene smjera titracije u potpunosti je opravdan. Na temelju teorijskih saznanja jasno je kako će navedena promjena utjecati na pozitivne i negativne vrijednosti pokretljivosti i zeta potencijala kompleksa (u kojem području će kompleksi biti pozitivno nabijeni, a u kojem negativno nabijeni), no u fokusu se nalazi moguća promjena uvjeta pri kojima uočavamo izoelektričnu točku.



Slika 20. Pokretljivost PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije DNA s PDADMAC-om u otopinama različitih soli.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3},
c(sol) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C



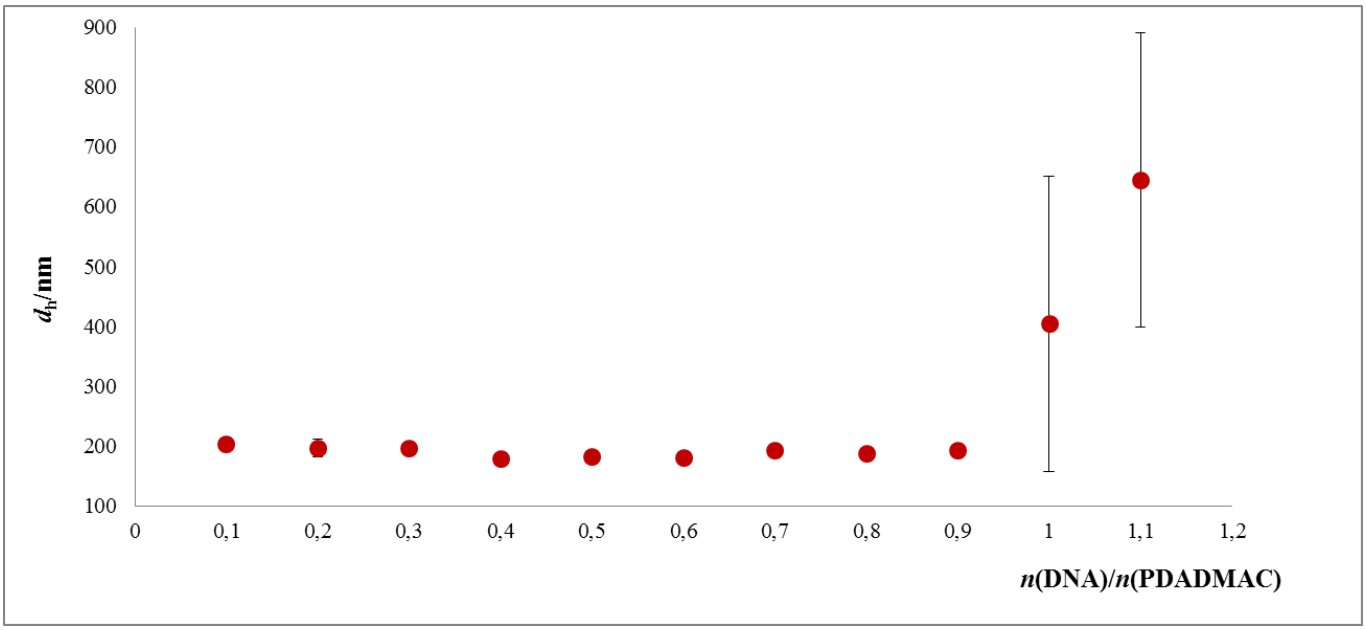
Slika 21. Zeta potencijal PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije DNA s PDADMAC-om u otopinama različitih soli.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3},
c(sol) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

Rezultati dobiveni titracijom DNA s PDADMAC-om upućuju na slično ponašanje kompleksa u otopini NaCl i puferu kao što je to bilo prilikom titracije s DNA (slika 15. i 16.). Istaknimo kako su navedeni rezultati u skladu s rezultatima dobivenih u ranijim istraživanjima[5] utjecaja ionske jakosti na kompleksiranje DNA i PDADMAC-a gdje je pokazano da ionska jakost ima utjecaj na izoelektričnu točku zeta potencijala u sustavima PDADMAC-DNA. Porastom ionske jakosti dolazi do sustavnog pomaka izoelektrične točke u smjeru većeg udjela DNA. Uočeni efekt je očekivan, jer sol prisutna u sustavu zasjenjuje naboje funkcionalnih skupina i otežava kompleksiranje. Pri višim ionskim jakostima potrebno je više DNA za kompleksiranje, stoga je postizanje izoelektrične točke u otopini $CaCl_2$ pri dosta nižem množinskom omjeru posve očekivano.

4.2. Rezultati dobiveni metodom kvazielastičnog raspršenja svjetlosti

4.2.1. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini NaCl

Titracijska mjerenja u otopinama različitih soli poslužila su i za praćenje odnosa veličina kompleksa. Na slici 25. prikazane su srednje vrijednosti promjera kompleksa u otopini NaCl tijekom titracije otopine PDADMAC s otopinom DNA.

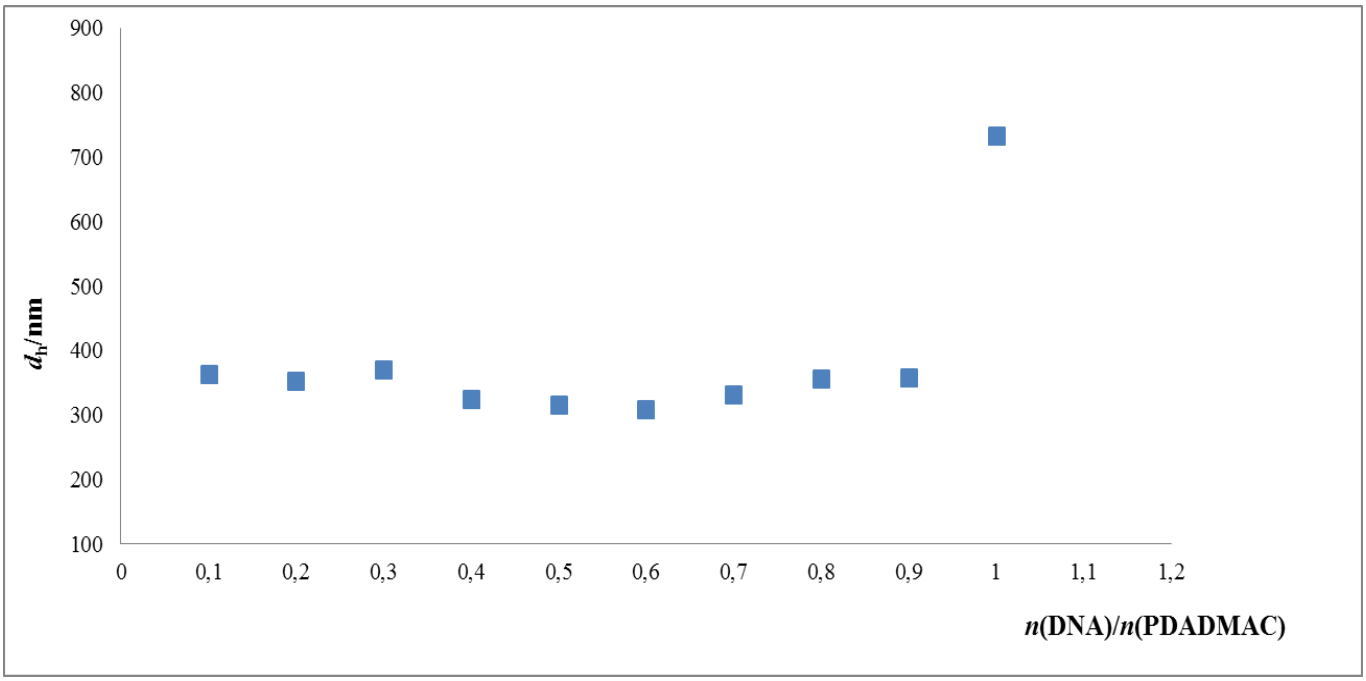


Slika 22. Hidrodinamički promjer PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije PDADMAC-a s DNA u otopini NaCl.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3},
c(NaCl) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

Na slici 22. opažamo kako se veličina kompleksa ne mijenja značajno do omjera množina n(DNA)/n(PDADMAC) = 0,9, što ukazuje na činjenicu da u tom području nastaju novi kompleksi, a ne dolazi do rasta (agregacije) postojećih. Pri n(DNA)/n(PDADMAC) = 1 dolazi do naglog porasta veličine kompleksa, odnosno do procesa flokulacije.

4.2.2. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini $CaCl_2$

Rezultati mjerenja dobiveni tijekom kompleksiranja u otopini $CaCl_2$ pokazuju kako prisutnost dvostruko većeg naboj iona disocirane soli utječe na veličinu nastalih kompleksa tijekom titracije otopine PDADMAC s otopinom DNA.

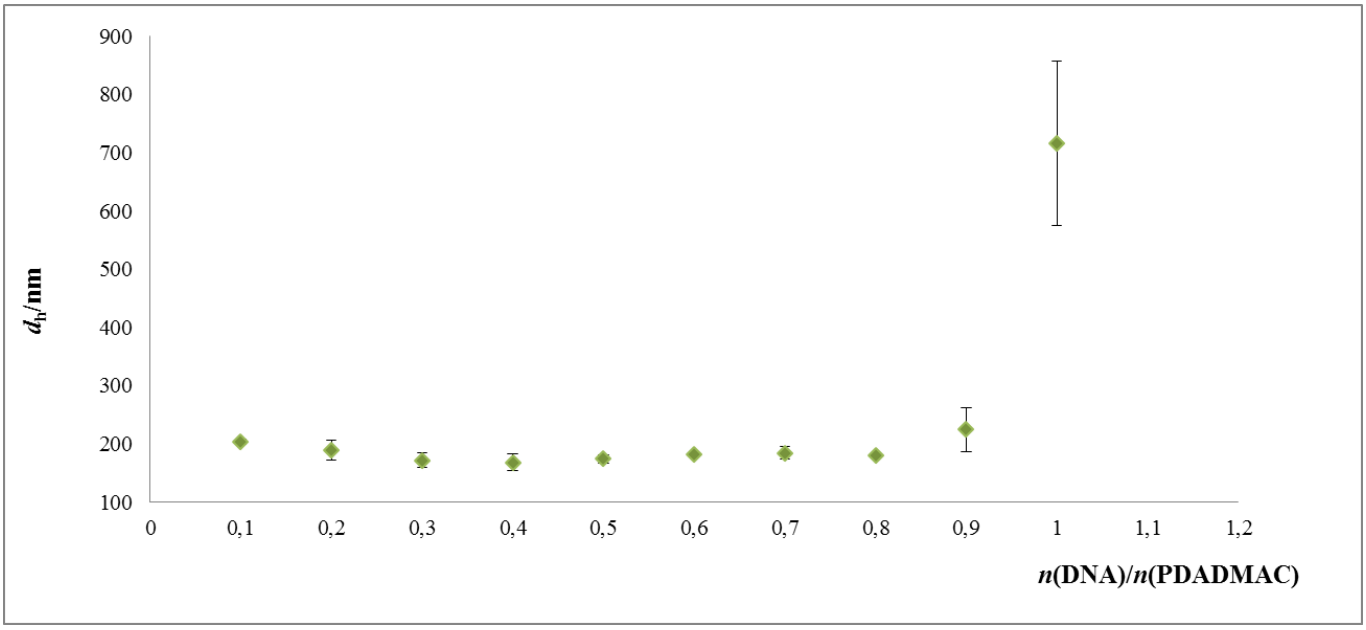


Slika 23. Hidrodinamički promjer PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije PDADMAC-a s DNA u otopini $CaCl_2$.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm^3, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3,
$c(CaCl_2) = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm^3; θ = 25 °C

Slika 23. ukazuje na isti trend ponašanja srednje veličine promjera kompleksa u otopini $CaCl_2$ kao i tijekom kompleksiranja u otopini NaCl (slika 22.) s time da su kompleksi u otopini $CaCl_2$ gotovo dvostruko veći od onih u otopini NaCl, dok se nagli porast uočava pri sličnom omjeru, n(DNA)/n(PDADMAC) = 1.

4.2.3. Titracija PDADMAC-a s DNA u otopini pufera

Kompleksiranje u prisutnosti otopine pufera također utječe na veličinu kompleksa, a dobiveni rezultati mjerenja prikazani su na slici 24.

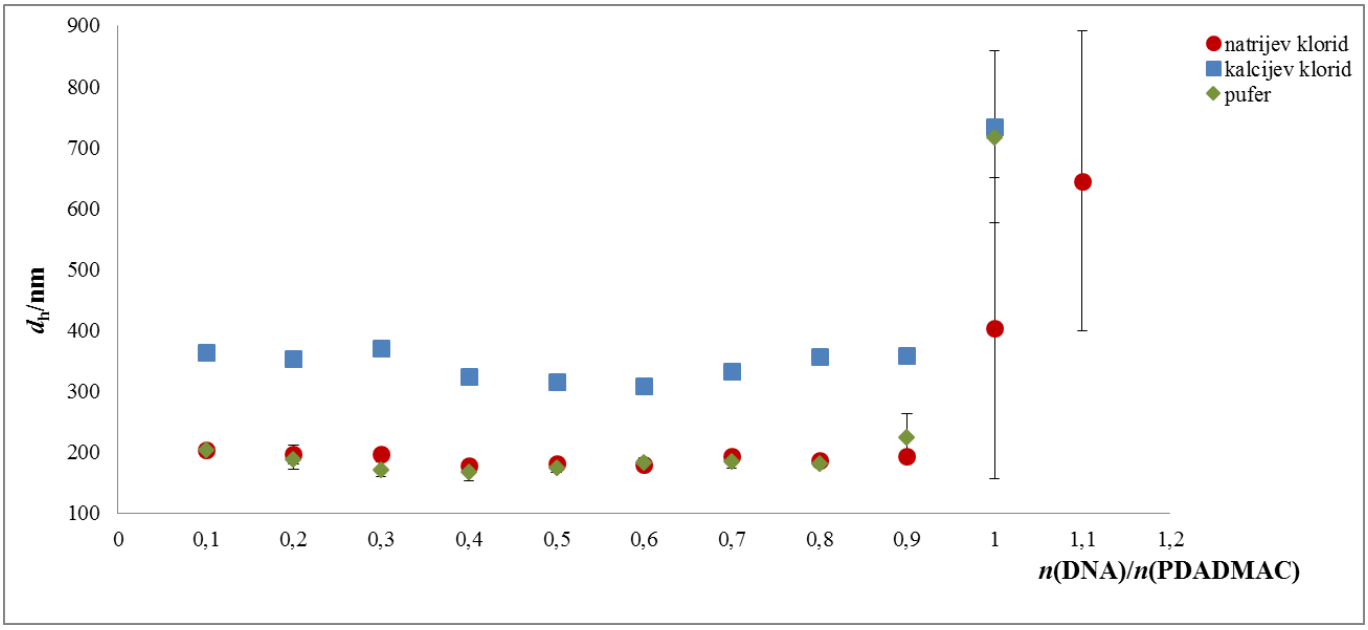


Slika 24. Hidrodinamički promjer PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije PDADMAC-a s DNA u otopini pufera.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3},
c(pufer) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

Na slici 24. opažamo kako je raspon veličina kompleksa u puferu pri svim omjerima vrlo sličan rasponu veličina u otopini NaCl (slika 22.) te najveće komplekse možemo očekivati pri n(DNA)/n(PDADMAC) = 1. Slično ponašanje je na neki način i logično, jer je HEPES anion relativno velik i zbog steričkih razloga ne može se u većoj količini vezati na lance PDADMAC-a te utjecati na reakciju DNA/PDADMAC dok je kation u HEPES-u isto Na^+.

4.2.4. Usporedba utjecaja vrste soli na veličinu kompleksa tijekom titracije s DNA

Odnos veličina kompleksa, kao i uvjeti nastajanja najvećih kompleksa tijekom titracije otopine PDADMAC s otopinom DNA u otopinama različitih soli, prikazan je na slici 25.

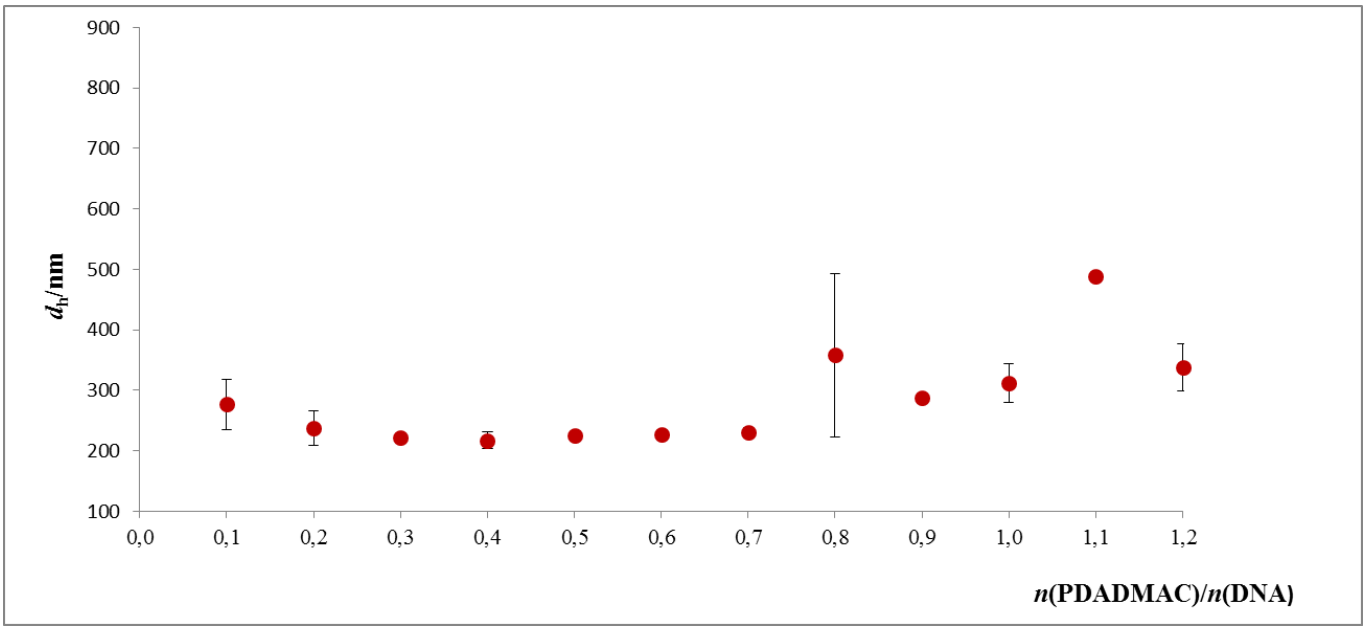


Slika 25. Utjecaj vrste soli na hidrodinamički promjer PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije PDADMAC-a s DNA u otopini različitih soli.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3},
c(sol) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}; θ = 25 °C

Na temelju slike 25. možemo zaključiti kako tijekom titracije s DNA vrijednosti veličina kompleksa prije naglog porasta bitno su veće u otopini $CaCl_2$ nego u otopini NaCl ili pufera. Unatoč tome, nema značajne razlike u omjerima množina za sve tri otopine pri kojima dolazi do naglog porasta veličine PDADMAC-DNA kompleksa.

4.2.5. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini NaCl

Kao i tijekom mjerenja pokretljivosti i zeta potencijala, istraživan je i mogući utjecaj smjera titracije na veličinu kompleksa nastalih tijekom titracije. Na slici 26. prikazani su rezultati mjerenja dobiveni titracijom otopine DNA s otopinom PDADMAC u otopini NaCl, c(NaCl) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}.

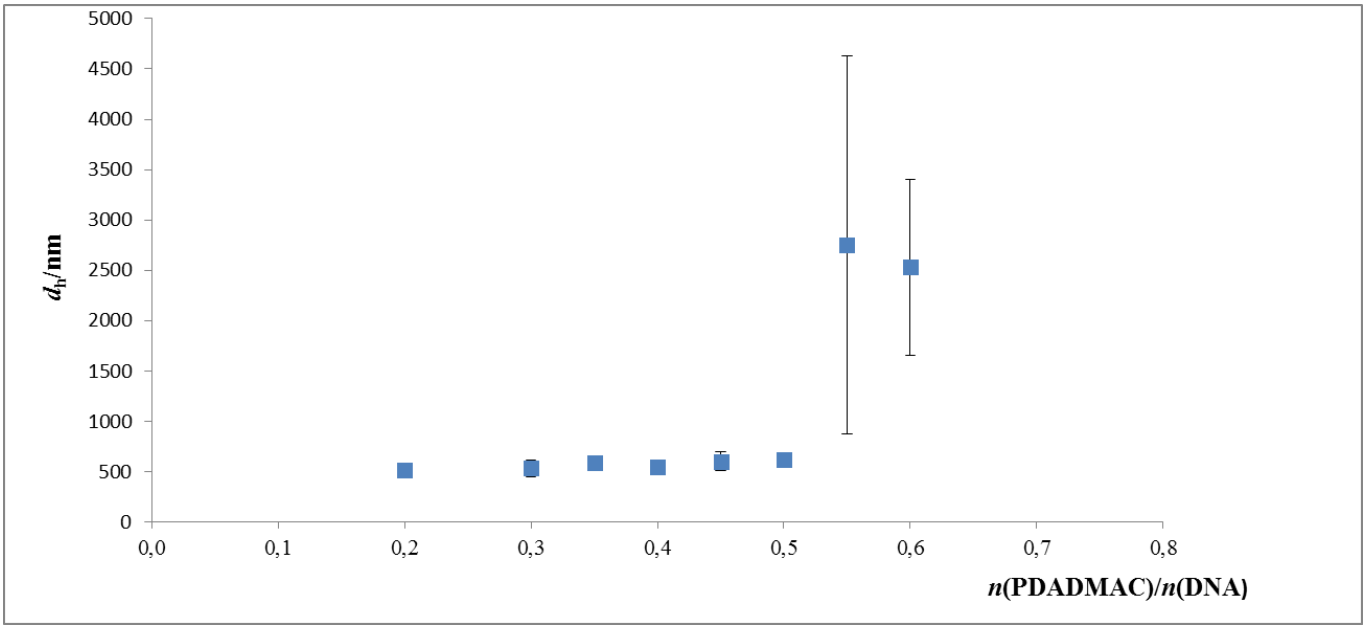


Slika 26. Hidrodinamički promjer PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije DNA s PDADMAC-om u otopini NaCl.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3},
c(NaCl) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} ; θ = 25 °C

Na slici 26. teško možemo uočiti da se dogodio značajni porast vrijednosti veličina kompleksa tijekom kompleksiranja u odnosu na titraciju u suprotnom smjeru (slika 22.), što upućuje na različit ishod reakcije u ta dva smjera. Jedan od uzroka takvog ponašanja može biti i razlika u molekulskoj masi/duljini lanca DNA i PDADMAC.

4.2.6. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini $CaCl_2$

S obzirom da su tijekom titracije s otopinom DNA u otopini $CaCl_2$ (slika 23.) nastali kompleksi većeg hidrodinamičkog promjera, zanimljivo je pogledati hoće li se jednaka promjena u veličini kompleksa dogoditi i tijekom titracije s otopinom PDADMAC, $c(CaCl_2) = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}.

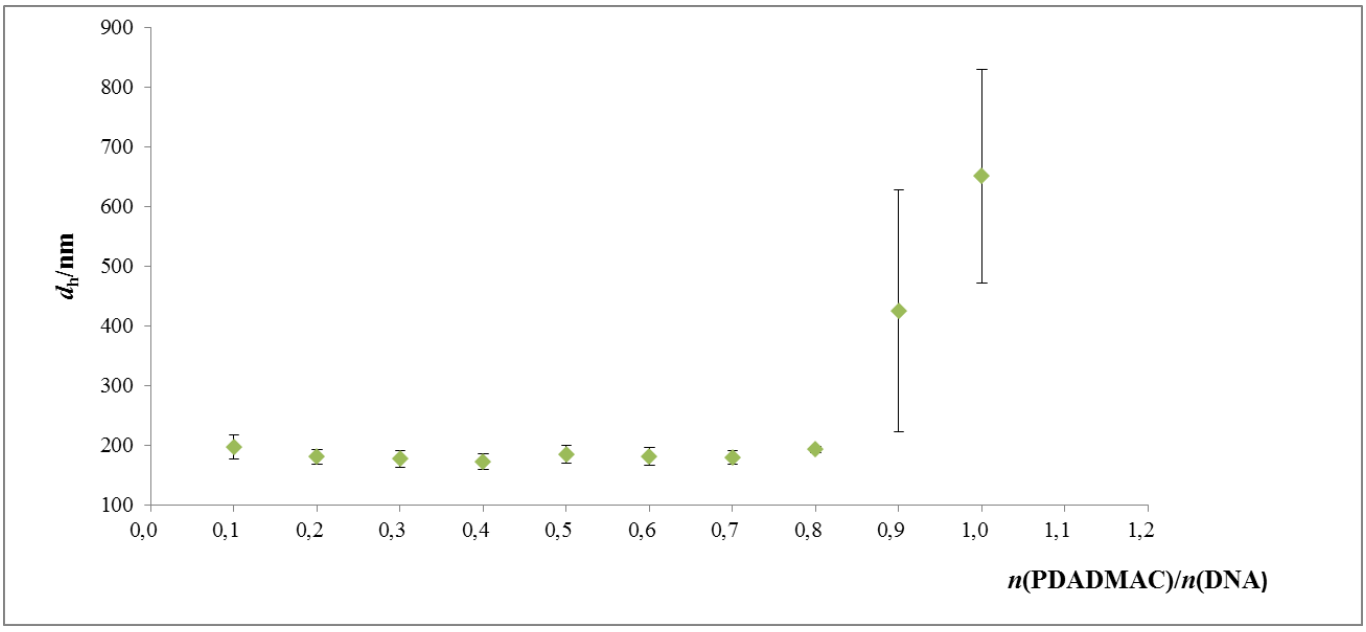


Slika 27. Hidrodinamički promjer PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije DNA s PDADMAC-om u otopini $CaCl_2$.
$c(PDADMAC) = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, $c(DNA) = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3},
$c(CaCl_2) = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^3; θ = 25 °C

Na slici 27. primjećujemo kako je nagli porast prosječne vrijednosti veličina kompleksa u otopini $CaCl_2$ uslijedio pri n(PDADMAC)/n(DNA) = 0,55. Usporedbom s rezultatima veličine kompleksa u otopini NaCl (slika 26.), opet možemo zaključiti kako je veličina kompleksa u otopini $CaCl_2$ znatno veća pri svim množinskim udjelima PDADMAC-a u otopini. Sličan zaključak donešen je tijekom titracije u suprotnom smjeru (slika 23.).

4.2.7. Titracija DNA s PDADMAC-om u otopini pufera

Vodeći se rezultatima mjerenja dobivenih tijekom titracije s otopinom PDADMAC u otopini NaCl, a potom i u otopini $CaCl_2$, istraživan je i utjecaj promjena smjera titracije na veličinu kompleksa gdje je tijekom kompleksiranja prisutan pufer, c(pufer) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}.

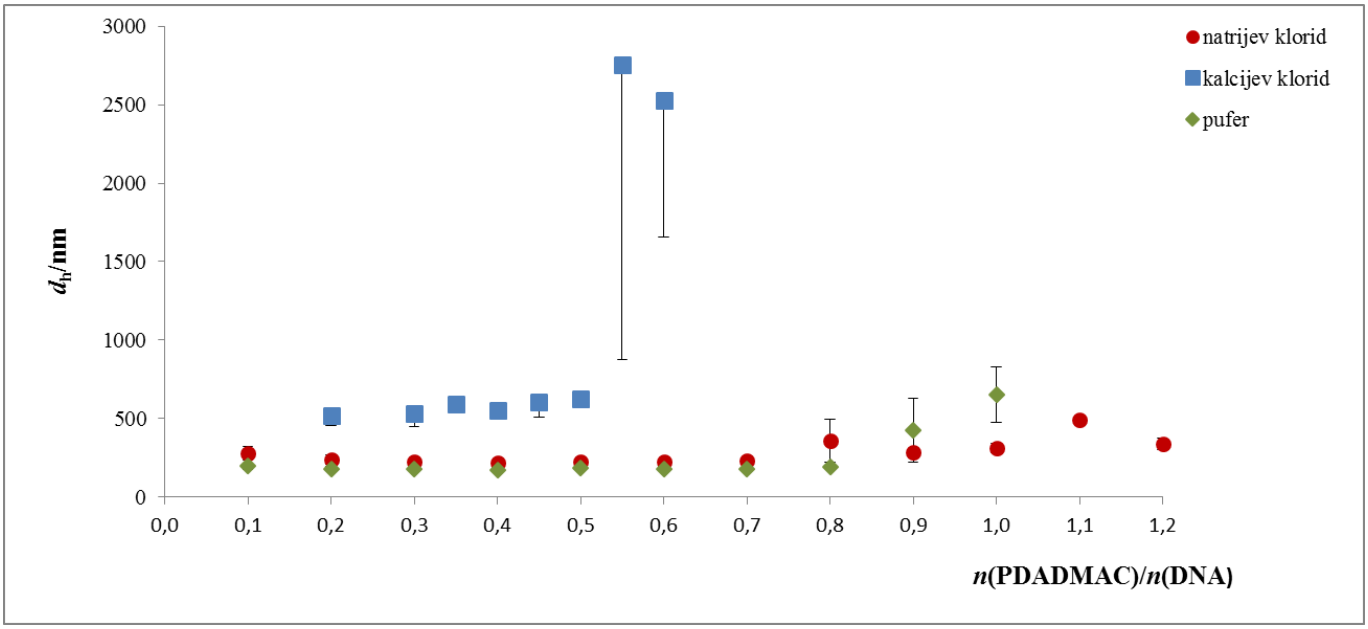


Slika 28. Hidrodinamički promjer PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije DNA s PDADMAC-om u otopini pufera.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3},
c(pufer) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} ; θ = 25 °C

Na slici 28. uočavamo nagli porast vrijednosti veličina čestica kompleksa u puferu pri n(PDADMAC)/n(DNA) = 0,9. Kao i tijekom prethodnih rezultata (slika 26. i 27.), prije naglog porasta vrijednost veličina čestica nije pokazivala značajne oscilacije, hidrodinamički promjer nalazio se u intervalu oko 200 nm. Iako je tijekom titracije PDADMAC-a s DNA uočena mala razlika u hidrodinamičkom promjeru kompleksa u otopini NaCl i pufera pri svim omjerima (slika 25.), u slučaju kada je PDADMAC titrans razlika u navedenim otopinama je ipak izraženija. (slika 26. i 28).

4.2.8. Usporedba utjecaja vrste soli na veličinu kompleksa tijekom titracije s PDADMAC-om

Usporedbom rezultata veličine kompleksa nastalih tijekom titracije otopine DNA s otopinom PDADMAC dobivamo uvid kako vrsta soli utječe na odnos veličine kompleksa.



Slika 29. Utjecaj vrste soli na hidrodinamički promjer PDADMAC-DNA kompleksa nastalog tijekom titracije DNA s PDADMAC-om u otopini različitih soli.
c(PDADMAC) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, c(DNA) = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{3},
c(sol) = $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{3} ; θ = 25 °C

Na temelju slike 29. rezultati dobiveni titracijom DNA s PDADAMC-om upućuju na zaključak kako najveći kompleksi nastaju u otopini $CaCl_2$ pri svim omjerima množina PDADMAC/DNA. Napomenimo kako su najveći kompleksi nastali u otopini $CaCl_2$ i tijekom titracije s DNA (slika 30.), no utjecaj Ca^{2+} iona na veličinu kompleksa dosta je izraženiji tijekom titracije s PDADMAC-om. U već spomenutom istraživanju[4] (komentar ispod slike 21.) pokazano je kako pri svim udjelima DNA najveći kompleksi nastaju pri najvišoj ionskoj jakosti te da različite ionske jakosti ne utječu na N/P omjer pri kojem se nalazi najveći prosječni promjer čestica. Navedeni rezultati istraživanja djelomično su u skladu s rezultatima dobivenim u ovom diplomskom radu gdje je efekt povećanja ionske jakosti u tom istraživanju sličan efektu povećanja nabojnog broja pojedinih iona.

5. ZAKLJUČAK

Eksperimentalni rezultati dobiveni u ovom radu pokazuju da ispitivani parametri (vrsta soli i smjer titracije) utječu na nastajanje kompleksa PDADMAC-DNA i da korištene metode daju korisne informacije o ispitivanim sustavima. Tijekom titracije PDADMAC-a s DNA jasno je vidljivo da nema izrazite razlike u rastu promjera kompleksa povećanjem udjela DNA za otopine različitih soli sve do n(DNA)/n(PDADMAC) = 1. Pokazano je kako do naglog porasta veličine dolazi pri sličnom omjeru u sva tri sustava. Prema očekivanjima, prisutnost otopine $CaCl_2$ tijekom kompleksiranja uzrokovalo je znatno veće komplekse pri omjerima nižim od 0,9. Nadalje, istražujući utjecaj smjera titracije na kompleksiranje DNA s PDADMAC-om uviđeno je kako tijekom titracije DNA s PDADMAC-om komplekse najvećeg promjera možemo također očekivati u otopini $CaCl_2$. Utjecaj kalcijevih iona na promjer kompleksa izraženiji je tijekom titracije u tom smjeru u odnosu na suprotni. Međutim, omjeri množina pri kojima nastaju najveći kompleksi različiti su za promatrane otopine.

Ispitivani parametri utječu i na pokretljivost, a samim time i na zeta potencijal tijekom kompleksiranja. Titracijom PDADMAC-a s DNA sustav je prvotno pozitivno nabijen (zbog suviška polikationa) gdje se uočena razlika u vrijednostima pokretljivosti i zeta potencijala u otopinama različitih soli nalazi u okviru eksperimentalne pogreške. Izoelektrična točka postignuta je pri istom omjeru množina u otopini $CaCl_2$ i pufera, no prisutnost otopine NaCl tijekom kompleksiranja utječe na (manji) pomak izoelektrične točke udesno, prema većem udjelu DNA. Promjenom smjera titracije tijekom kompleksiranja izoelektrična točka postiže se pri istom omjeru (n(PDADMAC)/n(DNA) = 0,55) za otopinu NaCl i pufer, no pojavljivanje izoelektrične točke u prisutnosti otopine $CaCl_2$ opažamo pri višim udjelima DNA, odnosno pri nižem omjeru. Uočeni efekt je očekivan, jer sol u otopini otežava stvaranje kompleksa zbog toga što ioni nastali disocijacijom soli zasjenjuju naboje funkcionalnih skupina polielektrolita i otežava kompleksiranje. Zasjenjenje naboja jače je tijekom kompleksiranja u otopini $CaCl_2$.

6. LITERATURNA VRELA

1. J. Koetz, S. Kosmella, *Polyelectrolytes and Nanoparticles*, Springer, 2007.
2. A. Vidak, *Električna vodljivost razrijeđenih otopina natrij polistiren sulfonata*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2010.
3. M. T. Record, *Biopolymers*, **14** (1975) 2137–2158.
4. Michaels AS, Miekka RG, *J Phys Chem* **65** (1961) 1765.
5. J. Salopek, *Kompleksiranje DNA s poli(dialildimetilamonijevim kloridom)*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2011.
6. D. Störkle, S. Duschner, N. Heimann, M. Maskos, M. Schmidt, *Macromolecules*, **40** (2007) 7998–8006.
7. D. Fischer, H. Dautzenberg, K. Kunath, T. Kissel, *Int. J. Pharm.* **280** (2004) 253–269.
8. M. A. Meda, P. Taboada, B. Krajewska, M. Willemeit, A. Deml, R. Klosel, J. R. Rodriguez, *J. Chem. Phys. B* **114** (2010) 9356–9366.
9. Y. Zhou, Y. Li, *Biophys. Chem.* **107** (2004) 273–281.
10. I. Piljac, *Elektroforeza*, Media Print, Zagreb, 2006.
11. M. M. Tirado, C. L. Martinez, J. G. Torre, *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 2047–2051.
12. J. Požar, J. Salopek, M. Poldrugač, D. Kovačević, *Colloids Surf. A*, **510** (2016) 159–168.
13. L. Štajner, J. Požar, D. Kovačević, *Colloids Surf. A*, **483** (2015) 171–180.
14. K. W. Mattison, P. L. Dubin, I. J. Brittain, *J. Chem. Phys. B* **102** (1998) 3830–3836.
15. A. V. Delgado, F. Gonzales-Caballero, R. J. Hunter, L. K. Koopal, J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.* **309** (2007) 194–224.
16. T. Schindler, E. Nordmeier, *Macromol. Chem. Phys.* **198** (1997) 1943–1972.
17. Brookhaven Instruments Corporation, Zeta Plus, Zeta Potential Analyzer, Instruction Manual, New York, 1994.
18. M. Borkovec, Measuring Particle Size by Light Scattering in *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*, urednik K. Holnberg, Wiley, 2001.
19. H. Oshima, *Colloids Surf. A* **103** (1995) 249–255.
20. S. F. Sun, *Physical Chemistry of Macromolecules, Basic Principles and Issues*, 2. izdanje, WileyBlackwell, 2004.
21. P. H. Rieger, *Electrochemistry*, 2. izdanje, Chapman and Hall, Inc., 1994.
22. Brookhaven Instruments Corporation, Instruction Manual for 90PLUS/BI-MAS Multi Angle Particle Size Option, New York 1994.

7. POPIS KRATICA

DNA	deoksiribonukleinska kiselina
PDADMAC	poli(dialildimetilamonijev klorid)
AFM	mikroskopija atomskih sila
EIL	električni međupovršinski sloj
QELS	kvazielastično raspršenje svjetlosti
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti
HEPES	4- (2-hidroksietil) -1-piperazinetansulfonska kiselina

8. METODIČKI DIO

MOTIVACIJA U NASTAVI KEMIJE – STUDIJA SLUČAJA

8.1. Uvod

Učenje i poučavanje predmeta kemije temelji se na stjecanju znanja i vještina putem složenih kognitivnih procesa opažanja, znanstvene komunikacije (prikazivanje opaženoga i rasprava) te rasuđivanja (analiza rasprave, vrednovanje i donošenja zaključaka). Učeći kemiju, učenici osim kemijskih spoznaja koja su temelj razumijevanja pojava u živome i neživome svijetu na čestičnoj razini razvijaju sposobnost kritičkoga mišljenja o sebi samima te o neposrednome i globalnome okruženju.[1] Uspješna provedba nastave kemije zahtjeva visoki stupanj motivacije i nastavnika i učenika. Motivacija za učenje oblikuje se tijekom vremena na temelju učenikovog iskustva sa sadržajem predmeta i njegovih interpretacija tih iskustava. Zadaća je svakog učitelja/nastavnika da odabire strategije, metode i postupke poučavanja kojima može pobuditi situacijski interes kako bi moglo doći do razvoja osobnog interesa za područje poučavanja. Uzimajući u obzir kako uspješno poučavanje ponajviše ovisi o metodologiji nastavnika važno je potaknuti budućeg nastavnika na promišljanje nastave kemije utemeljene na pokusu i učenju otkrivanjem pri poučavanju temeljnih kemijskih koncepata..

Učenje otkrivanjem naziva se i iskustveno učenje, jer se do spoznaje dolazi vlastitim iskustvom. Učenje otkrivanjem služi se trima metodama: istraživanjem, projektom i simulacijom. Studija slučaja je nastavni postupak koji zahtjeva učenje kroz rješavanje problema i dobar je alat u motivaciji učenika.

Cilj metodičkog dijela ovog diplomskog rada je predložiti provedbu nastavne jedinice *Elektroliza,* kroz nastavni dvosat u kojem su ciljana obrazovna postignuća primjerena uzrastu učenika trećeg razreda gimnazije i povezana s opažanjima iz provedenih pokusa. Nastavna priprema temeljit će se na studiji slučaja (detektivska priča) i metodičkom oblikovanju odabranih pokusa. Studija slučaja je nastavni postupak koji zahtjeva učenje kroz rješavanje problema i dobar je alat u motivaciji učenika. Uz radni listić predložena je priprema za nastavnike koja će olakšati planiranje nastavnog sata.

8.2. Motivacija i učenje

Pod pojmom motivacija podrazumijevamo sve što čovjeka pokreće na aktivnost, odnosno što određuje njezin smjer, intenzitet i trajanje.[2] Motivacija čovjeka usmjerava k ostvarenju određenog cilja, a s ciljem zadovoljavamo potrebu. Motivacija je vrlo često neuhvatljiva u nastavnom procesu, jer je njenu dinamičnost, korelativnost s drugim faktorima i sveobuhvatnost teško pratiti. No, treba imati na umu da bez motivacije tijekom nastave tj. motivacije njenih neposrednih sudionika nema valjanog odgojno-obrazovnog učinka. Motivacija temeljena na interesu ima pozitivne učinke na kvalitetu i kvantitetu sadržaja koji se uče. S obzirom da se pod pojmom interes podrazumijeva usmjerenost pažnje prema onomu što odgovara vlastitim potrebama, težnjama, sklonostima i navikama, korisno je znati kako metodički oblikovati nastavu i prilagoditi nastavne materijale kako bi se potaknuo razvoj učeničkog interesa. Prema modelu razvoja interesa[3] postoje četiri faze razvoja interesa:

1. **Pobuđeni situacijski interes** - odnosi se na psihološko stanje interesa koji proizlazi iz kratkoročnih promjena u afektivnim i kognitivnim obradama. Mogu ga potaknuti podražaji iz okoline ili obilježja gradiva poput iznenađujućih informacija, osobna važnost i intenzitet.
2. **Održavani situacijski interes** - situacijski interes se zadržava putem smislenih zadataka/aktivnosti i/ili putem osobne uključenosti. Uključuje usmjerenu pažnju i upornost, a mogu potaknuti naknadno bavljenje istom aktivnošću i daljnji razvoj interesa.
3. **Početni osobni interes –** karakteriziraju ga pozitivni osjećaji, usvojeno predznanje i vrijednosti. Učenik slobodno odabire baviti se tim aktivnostima, stvara nova pitanja iz znatiželje te ulaže trud koji mu nije naporan.
4. **Zreli osobni interes –** u pravilu je izazvan unutarnjim poticajima, ali ne uvijek. Osim što poprima obilježja prethodne faze (početni osobni interes) opisuje bavljenje dugoročnim i kreativnim aktivnostima, stvaranje više različitih vrsta strategija koje omogućuju dubinsko procesiranje. Potiče se samoregulacija.

Situacijski interes stimulira se nastavnim aktivnostima. Stvaraju ga određene akcije kao što su istraživački rad, rad na eksperimentu i/ili konkretni objekti kao zanimljiv film, tekst i sl. Za razliku od osobnog interesa koji je relativno stalan, situacijski interes ostaje postojan toliko dugo koliko

ga okolina potiče. U razrednom okruženju situacijski je interes uglavnom pod utjecajem nastavnika.

Učenje je aktivnost (iskustvo) kojom pojedinac postiže relativnu trajnu promjenu svog ponašanja pod utjecajem primljenih i prerađenih informacija.[4] Učenje uvijek predstavlja integraciju osjetilno-praktičnog i misaono-teorijskog. Što god da čini, čovjek (nesvjesno ili svjesno) generalizira. Zbog toga čin postaje iskustvom, nečim što se može koristiti i kasnije u različitim situacijama. Za većinu učenika učenje podrazumijeva pamćenje. Rezultat takvog načina razmišljanja je odbojnost prema nastavi, a samim time i prema nastavniku koji se vrlo često u razredu susreće s pitanjem: „Zašto pamtiti nešto što ću već do sutra zaboraviti?“ Prema kritičko-konstruktivnoj didaktici razvoj autonomije ličnosti osnovni je cilj obrazovanja. Poučavanje i učenje je proces interakcije u kojem učenici uz podršku nastavnika samostalno usvajaju određene forme znanja, vrednovanja i djelovanja. Primarni zadatak obrazovanja jest uvesti mladog čovjeka u svijet znanstvenoga poimanja i razumijevanja procesa koji vladaju u prirodi i društvu. Izvedba navedenog zadatka obrazovanja zahtjeva angažiranog i motiviranog nastavnika koji ima ulogu voditelja nastave primjenjujući pojedine forme nastave ovisno o ciljevima i sadržajima nastave i uzrastu učenika.

U tradicionalnom pristupu nastave, gdje je fokus nastavnika na materijalu koji predaje, učenici su izloženi tzv. akumuliranom znanju. Taj oblik poučavanja pokazao se djelotvornim za prenošenje informacija, odnosno u okvirima prirodnih znanosti, djelotvornim samo za usvajanje znanja o zakonitostima prirode. Postalo je jasno da je znanje isključivo rezultat osobnog nastojanja tj. učenja pojedinca.

Niz spoznaja utemeljenih na istraživanjima djelotvornosti predavanja kao oblika nastave dovela su do suvremenog pristupa. Pod pojmom suvremena nastava podrazumijeva se poučavanje koje potiče učenje, a važan preduvjet za takav oblik nastave je kvalitetan odnos između nastavnika i učenika usmjeren unapređenju mentalnog, socijalnog i afektivnog razvoja učenika. Napomenimo da strategije učenja i strategije poučavanja ne opisuju jednaku aktivnost. Glavna razlika je što učenje predstavlja pronalazak rješenja na problem i zaključivanje vlastitom aktivnošću dok kod poučavanja problem također postoji, ali postoje gotovi odgovori koji nisu stečeni vlastitom aktivnošću.[1] Temelji suvremene nastave zasnivaju se na otkrivanju i usvajanju znanja na način da čine cjelovit i logički sustav. Kada bismo povukli paralelu s izjavom Albert Einsteina: „Važno je nikad ne prestati postavljati pitanja.“ došli bi do zaključka da suvremenu nastavu odlikuje visoki

stupanj interakcije između znatiželjnih i motiviranih učenika s kvalitetnim nastavnikom. Karakteristike kvalitetnog nastavnika predmet su mnogih istraživanja, jer se nastavnik smatra glavnom karikom u provođenju idealne suvremene nastave. Pokazalo se da dobar nastavnik dobro strukturira predavanja uzimajući u obzir razinu znanja svojih učenika, omogućuje interakciju ilustrirajući ono o čemu govori, osigurava vrijeme za dodatna objašnjenja, pitanja, ponavlja glavne ideje te učestalo uvodi raznolikost u načinu poučavanja. S obzirom da su način poučavanja i razvoj učeničkih kompetencija usko povezani, provedba suvremene nastave omogućuje razvijanje sposobnosti razumijevanja, rješavanja problema i praktične primjene znanja uz stjecanje umijeća koja pridonose kvaliteti življenja učenika u suvremenom svijetu.

Ne postoji univerzalna nastavna metoda kojom bi svatko mogao učiti odnosno kojom bi se svakoga moglo poučavati. Odabir metode treba biti zasnovano na činjenici da je nastavna metoda jedno smišljeno racionalno postupanje (nastavnika i učenika-poučavanja i učenja) kojemu je svrha što je više moguće iskoristiti sposobnosti mišljenja i učenja odnosno aktualizirati potencijale učenika s ciljem postizanja većeg i boljeg znanja kao i ukupan razvoj ličnosti učenika.[4] Uspješno poučavanje usmjereno učeniku i razvoju njegovih kompentencija posljedica je kombinacije metoda izravnog predavanja, koje dominira u tradicionalnoj nastavi, s metodama suvremene nastave kao što su suradničko učenje, grupna rasprava i problemska nastava s individualnim istraživanjima ili grupnim projektima.

Tijekom izrade diplomskog rada pažnja će biti posvećena problemskoj nastavi tj. nastavi učenja otkrivanjem gdje će se proučavati primjena studije slučaja kao jedna od metoda izvođenja problemske nastave u suvremenom načinu poučavanja.

8.3. Problemska nastava

Jedna od najvažnijih zadaća nastave kemije, fizike i biologije jest razviti interes učenika prema prirodnim znanostima kako bi lakše razumijeli svijet oko sebe i shvatili da se suvremena civilizacija temelji na primjeni znanja iz prirodnih znanosti.[1] Primarni zadatak učenja kemije treba biti razvijanje svijesti u svakog pojedinca o potrebi očuvanja prirodnih uvjeta za vlastiti život, a to podrazumijeva stjecanje odgovarajućih znanja i navika. Prema tome, nastavnik mora uvidjeti da nastavu kemije treba povezati sa znanjima koja su učenicima potrebna u njihovom životu, potičući učenike na to da sami uočavaju i iznose probleme koji se onda rješavaju na nastavnom satu. Ciljevi nastave kemije su mnogobrojni, no u konačnici svi oni zajedno opisuju primarni cilj svake nastave, a to je razvijanje sustava mišljenja.

Problemska nastava (eng. *Learning by discovery*) ili nastava putem rješavanja problema zasniva se na tzv. iskustvenom učenju. Njen koncept polazi od toga da budućnost nastave ne može biti u tome da se realnost upoznaje posredstvom tuđeg iskustva već da se proces učenja temelji na rješavanju problema tako što angažira svoja ranija iskustva u rješavanju novonastalih situacija u vlastitom spoznajnom prostoru.[5] Težište je na inovacijskom učenju bez primjene naučenog znanja na neku standardnu situaciju gdje dolazi do izražaja snalaženje u novim uvjetima, identifikacija problema, divergentno mišljenje, kreativnost, suradnja i odgovornost odlučivanja. Problemska nastava stavlja u prvi plan tendenciju pojedinca usmjerenog na pronalaženje istine o nečemu pri čemu aktivnost učenika nipošto ne bi smjela biti poticana strahom od neuspjeha. Ukoliko se do rješenja može doći samo učenjem koje znači popunjavanje praznina u znanju, onda se ne radi o pravoj problemskoj situaciji. O problemskoj situaciji se radi tek onda kad se do rješenja može doći samo istraživanjem. Postoje različiti oblici problemske nastave, a najčešći su to metoda slučaja i simulacije.

U didaktičko-organizacijskom pogledu problemska nastava ima sljedeći tijek:

1. Problemska situacija – uočavanje problema, bilo na praktičnoj ili teorijskoj razini, kada se osjeti da se ne može naprijed bez novih znanja.
2. Rješavanje problema na temelju postavljanja hipoteze i prikupljanju relevantnih podataka, činjenica, „dokaznog“ materijala.
3. Zaključak – odgovor na problemsko pitanje zapravo je verifikacija postavljenih hipoteza.

Prednost učenja otkrivanjem je zanimljiv i dinamičan način prezentiranja kemijskih sadržaja, veća motivacija i interes učenika za predmet, razvijanje sposobnosti induktivnog zaključivanja, aktivno sudjelovanje učenika u iskustvenom učenju, integriranje znanja unutar kemije i drugih područja. Rješavanjem problema kao način nastavnog rada narušava tradicionalnu nastavu nudeći školovanje koje će najbolje pripremiti učenike za budućnost time što će se usmjeriti na sadašnjost.[5] Uz brojne prednosti nastavnici nerijetko izbjegavaju provođenje učenja otkrivanjem, jer ovakav oblik rada zahtjeva detljnije i opsežnije pripreme, nadogradnju vlastitog znanja tijekom obrade nastavnog sadržaja te suradnju s kolegama iz drugih predmetnih područja.

8.4. Studija slučaja

Proučavanje slučaja (eng. *case study*) je proučavanje stvarnog ili izmišljenog problema. Temeljito se analizira neka pojava, proces, institucija, osoba, grupa ili događaj. Za analizu se odabire predmet tj. slučaj koji je bogat informacijama i obilježjima koja se promatraju. Ta strategija pridonosi osposobljavanju učenika za samostalno učenje i istraživanje. Studije slučaja mogu odrediti uzrok i posljedicu. Hitchcock i Hughes[6] navode glavna obilježja studije slučaja:

1. Prikazuje kronološki ispričane događaje važne za slučaj.
2. Spaja opis događaja s njihovom analizom.
3. Usmjerava se na individualne sudionike ili skupine sudionika i želi razumijeti njihovo viđenje događaja.
4. Ističe specifične događaje koji su relevantni za slučaj.
5. Pokušava prikazati bogatstvo slučaja u sastavljanju izvještaja.

Sredinom 20. stoljeća američke poslovne škole počinju korisiti metodu slučaja u nastavi s ciljem što većeg približavanja nastave poslovnoj praksi. Nakon što se metoda afirmirala u Americi, proširila se u ostale dijelove svijeta. Korištenje metode slučaja u nastavi polazi od pretpostavke da nije najvažnije akumuliranje znanja nego stjecanje sposobnosti rješavanja problema. Cilj nije pojedinac koji zna, cilj je pojedinac koji zna raditi. Takva nastava uči rješavati probleme i snalaziti se u praksi. No, s manje zainteresiranim učenicima takva nastava može ostaviti velike praznine u znanjima. Da bi mogli kvalitetno proučavati metodu studije slučaja kao suvremenu nastavnu

metodu, a istovremeno izbjeći korištenje različitih materijala koji se smatraju slučajevima, ali ne ispunjavaju edukacijske ciljeve koje pred sebe postavlja metoda učenja putem studije slučaja, potrebno je prvo definirati što se točno podrazumijeva pod pojmom slučajem unutar okvira nastave. Pod slučajem podrazumijevamo opis situacije gdje je potrebno, eksplicitno ili implicitno, donijeti odluku. Također uključuje se i opis izazova ili problema s kojim se suočava osoba unutar organizacije. Naime, slučaj je predstavljen iz perspektive donosioca odluke što omogućava učenicima da se stave u poziciju onoga tko donosi odluke i s njim se poistovjeti. Uz pomoć slučaja moguće je dio stvarnosti dovesti u učionicu kako bi, što je više moguće, simulirali okruženje u kojem se nalazi donosilac odluke i proveli analizu koja će dovesti do odgovarajućeg pristupa problemu. Rad na svakom novom slučaju zahtjeva odgovarajuće razmišljanje: kod definiranja problema, kod korištenja podataka i čimbenika koji doprinose rješavanju problema, kod predlaganja odluke koja odgovara situaciji te kod provjere koliko odluka rješava problem i koliko se može primijeniti na druge situacije. Uzajamna suradnja nastavnika i učenika tijekom rješavanja problema smatra se osnovnim temeljem u provedbi suvremene nastave kroz prizmu studije slučaja. Treba imati na umu da ukoliko je glavni edukacijski cilj prenošenje znanja, metoda studije slučaja nije najbolji način da se to postigne. Dokazano je da korištenje slučajeva je najmanje efikasna metoda u prenošenju znanja.

Korištenje metode studije slučaja u nastavi omogućuje učenicima da razviju životno korisne vještine kao što su:

- Analitičke vještine – učenik je prisiljen razmišljati jasno i logično u skladu s ponuđenim podacima što dovodi do poboljšanja vještina poput kritičkog mišljenja, identifikacije samog problema i pravilno korištenje podataka.
- Vještina donošenja odluka – sukladno razvoju analitičkih vještina dolazi do razvoja vještina koje uključuju odabir kriterija odlučivanja, identifikaciju mogućih alternativa, procjenu istih i odabir najbolje
- Komunikacijske vještine – s obzirom da metoda studije slučaja spada u diskusijsku metodu, ona omogućava učenicima da iznose vlastito mišljenje popraćeno argumentima, ali i da kroz debatu razmotri stajališta drugih učenika.
- Međuljudske vještine – metoda studije slušaja kroz grupnu raspravu pomaže traženju kompromisa te tako priprema učenike na efikasniji rad unutar grupe.

- Kreativnost – s obzirom da ne postoje dva identična slučaja, metoda studije slučaja ohrabruje pronalaženje rješenja prilagođenih jedinstvenim okolnostima svakog slučaja.
- Vještina pisanja – redovito bilježenje ključnih pojmova i opažanja, pisanja pretpostavki i izvještaja

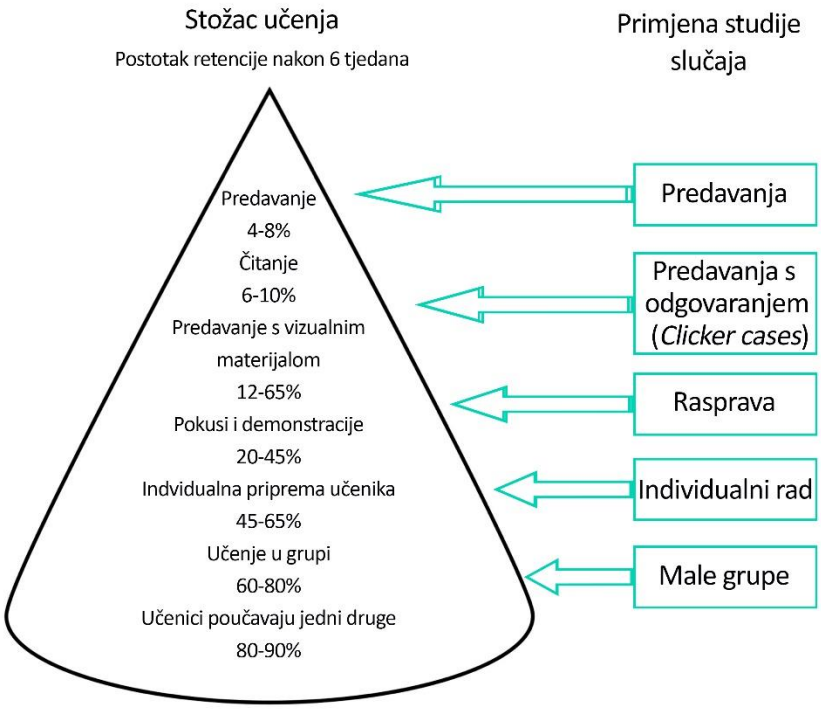
Zanimljiv podatak je iznesen u istraživanju F. Herreid[7] vezano za upotrebu metode studije slučaja u nastavi kemije. Istraživanje je provedeno na temelju aktivnih članova internetske stranice *National Center for Case Study Teaching in Science*. Naime, unatoč svim navedenim prednostima na koje ova metoda ukazuje gotovo nezamjetan postotak nastavnika fizike i kemije prakticira ovakav oblik nastave. Nadalje, tijekom istraživanja provedena je *online* konferencija gdje su nastavnici kemije iznijeli svoje mišljenje pa navedimo nekoliko najčešćih obrazloženja zašto se izbjegava ovakav oblik rada:

- Nastavni plan i program je preopširan i jednostavno nemamo vremena posvetiti se pripremi za studije slučaja.
- Učenici pružaju otpor i ignoriraju nove nastavne strategije, posebno one koje iziskuju razmišljanje.
- Potrebno je uložiti dosta vremena kako bi nastavnik promjenio svoj „ritual“ u provođenju nastave. Izlaženje iz već uhodanih okvira provedbe nastave dovodi do osjećaja nesigurnosti samog nastavnika što potencijalno dovodi do smanjene kvalitete rada.
- U nastavi kemije studija slučaja se provodi već dulji niz godina u laboratoriju.
- Nastavnici kemije izloženi su prečesto novim tehnikama i metodama poučavanja, nemoguće je sve koristiti u nastavi stoga je bolje pričekati da se pronađe najidealnija metoda počuvanja i učenja.

Nastavnici često u prvi plan stavljaju vremensku ograničenost izvedbe nastavnog plana i programa. Potpuna izvedba nastavnog plana i programa ne znači da učenici razumiju obrađeno gradivo ili da su usvojili određeno znanje.

Dobar vizualni prikaz učinkovitosti učenja putem studije slučaja sadržan je u tzv. teorijskom stošcu učenja (eng. *The theoretical Cone of Learning*). Kao najmanje učinkovita

metoda poučavanja pokazala se metoda predavanja gdje je samo 4-8 % obrađenog materijala ostalo u memoriji učenika nakon 6 tjedana. S obzirom da se tijekom provođenja studije slučaja odabrani slučajevi mogu proučavati individualno, u parovima, skupinama ili u cijeloj obrazovnoj skupini, na temelju Slike M1. možemo primjetiti da određena metoda slučaja može biti bolja od druge, ovisno koji se stupanj aktivnog učenja želi poboljšati. Najučinkovitija metoda tijekom problemske nastave pokazala se metoda rada u malim grupama. Naglasimo kako stupanj retencije ovisi o mnoštvu čimbenika uključujući vrstu slučaja, dob učenika, metode procjene te vrijeme uloženo od strane učenika. Korist učenika od metode slučaja će biti približno proporcionalna naporu koji on ulaže u analizu slučaja. Površno analiziranje slučaja će rezultirati površnim iskustvom učenja.



Slika M1. Usporedba stošca učenja s primjenjenim metodama studije slučaja prema istraživanju F. Herreid.[7]

8.4.1. Faze učenja kroz problem studije slučaja

Proces učenja primjenom metode studija slučaja prolazi kroz tri faze:

1. Individualna priprema

2. Rasprava u malim grupama

3. Rasprava na satu

Svaka od navedenih faza je neophodna za učinkovito učenje te doprinosi kvantiteti i kvaliteti naučenog.

Individualna priprema učenika

Svrha individualne pripreme učenika ogleda se u samostalnoj pripremi slučaja prije nastave i predstavlja osnovu za iduće dvije faze. Učenici moraju individualnu pripremu shvatiti ozbiljno i posvetiti joj dovoljno pažnje i vremena. Uspješna priprema započinje pažljivim čitanjem slučaja. Poželjno je pisati zabilješke koje uključuju pitanja i ideje koje se javljaju tijekom čitanja. Svaki slučaj sadrži činjenice i mišljenja, stoga činjenice treba uzeti u obzir takvim kakvim jesu, a mišljenja je potrebno kritički razmotriti.[8] Nastavnik uz pripremu može dati i pitanja za raspravu i smjernice za pripremu, što je preporučljivo za mlađe učenike. U suprotnom se od učenika očekuje da sam sebi postavi potencijalna pitanja za raspravu kao sastavni dio individualne pripreme. Idući korak samostalne pripreme je analiza podataka unutar slučaja koja uključuje promišljanje o potencijalnim uzrocima navedenog problema. U slučajevima detektivskog tipa gdje postoji više uzroka koji su doprinijeli pojavi problema vrlo često se koristi tzv. dijagram riblje kosti (dijagram uzroka i posljedice) radi lakšeg pronalaženja veze između uzroka i posljedice problema. Zaključno, glavni cilj individualne pripreme učenika jest samostalno promišljanje i identificiranje mogućih uzroka s jasno definiranim kriterijima kako bi se došlo do ključnog pitanja slučaja. Kreativnost učenika bitna je za uspješnu i kvalitetnu pripremu.

Rasprava u malim grupama

Rasprava je zajednička aktivnost koja teži nekim rješenjima iznoseći na vidjelo svu raznolikost pristupa i stajališta. Pritom je važno da svaki pojedinac utemeljeno, na činjenicama zasnovano, iznese svoje poglede. Često se ovaj korak izostavi, jer nastavnici ni učenici ne prepoznaju njegov doprinos učenju. Svrha rasprave u manjim grupama ogleda se u postizanju boljih rezultata i dostizanju većeg stupnja znanja. Grupnu raspravu možemo smatrati jednom vrstom provjere uspješnosti individualne pripreme. Naime, obaveza svakog člana grupe je da iznese svoje detaljno mišljenje aktivno sudjelujući u raspravi kako bi svojom pripremom doprinio rješavanju slučaja. Sudjelovanjem u raspravi i razmjena ideja omogućava vježbanje govora, slušanja i drugih vještina komunikacije. Na ovaj način učenici dobivaju veće samopouzdanje da ideje do kojih su došli tokom individualne pripreme imaju određenu vrijednost te da se sigurno mogu iznijeti i pred većom grupom ljudi. Vrijeme posvećeno ovoj vrsti rasprave treba biti kratko i efektivno, a grupa treba sadržavati 3-5 članova s time da nije potrebno imati vođu grupe u smislu da vođa grupe predstavlja donosioca odluke iz slučaja.

Rasprava na satu

Količina znanja koju učenici steknu kroz ovakav oblik rasprave može biti znatno veća nego u prethodne dvije faze, prvenstveno jer je moguće ponuditi više stavova, a samim time više rješenja i alternativa. Na taj način učenici su u mogućnosti spoznati različite aspekte istog problema te u skladu stječu i nova znanja i iskustva.[8] Tijek rasprave na satu se ne može u potpunosti predvidjeti niti definirati te je uloga nastavnika u ovom koraku izuzetno bitna. Na snagu stupaju vještine i sposobnosti nastavnika koje diktiraju tijek rasprave. Pristup nastavnika može biti direktan ili indirektan. Indirektan pristup obuhvaća prvo ponavljanje teorijskih znanja, a nakon toga analiziranje i obradu konkretnog problema. Direktan pristup ne zahtjeva ponavljanje teorijih postavki, već se odmah daju preliminarna rješenja koja se nakon toga razmatraju u grupi. Ključ uspjeha dobre rasprave je adekvatna formulacija pitanja. Prema Roland C. Christensenu, pitanja koja će nastavnik formulirati trebaju biti otvorenog tipa, pitanja koja predstavljaju izazov (obrazlaganje stavova i mišljenja), pitanja o predviđanju situacija u budućnosti, prioritetnih aktivnosti, ali i hipotetska pitanja. Odabir vrste pitanja ovisi o problematici koja se obrađuje, ali i o stupnju interakcije s učenicima. Rasprava započinje identificiranjem problema, a potom slijedi

kvalitativna i kvantitativna analiza podataka. Najznačajniji dio rasprave na satu je razmatranje alternativa unutar kojeg dolazi do najveće interakcije između nastavnika i učenika. Od učenika se traži definiranje alternativa, detaljno razmatranje, analiziranje i evaluiranje. Pritom je važno održavati pozitivnu atmosferu u razredu unutar koje svi učenici sudjeluju na primjeren način u raspravi. Na kraju rasprava završava utvrđivanjem plana i implementacijom definiranih rješenja. Najčešći oblik zaključivanja slučaja je da nastavnik napravi kratak sažetak cijelog procesa rješavanja problema objektivno prezentirajući sve stavove do kojih su učenici došli tijekom rasprave kako se učenici ne bi demotivirali za daljnjim istraživačkim pothvatima.

8.4.2. Uloga nastavnika u provedbi studije slučaja

Ovakav oblik nastave zahtjeva puno veću pripremu nastavnika gdje se uz veliku motivaciju i entuzijazam traži i određena razina kreativnosti u oblikovanju nastavnog sata. U pripremi se naglasak stavlja na predviđanja kako će teći sam proces rasprave na satu u kojem će biti obrađena navedena pitanja uključujući i plan zatvaranja rasprave i donošenje zaključka. Drugim riječima, u pripremi nastave nastavnik mora upoznati činjenice iz slučaja do najsitnijih potankosti, mora pribilježiti sve što je bitno za rješavanje problema te napraviti pregled predviđenih odgovora učenika, pitanja i zaključaka. Dobra pripremljenost omogućava nastavniku da usmjerava raspravu učenika u pravom smjeru kako bi se ostvario jasan tok logike. Stoga, nedovoljna pripremljenost nastavnika jedan je od glavnih razloga zašto metoda učenja putem studije slučaja može dati loše rezultate. Uspješan nastavnik kombinira direktan i indirektan pristup kako bi se izbjegli prekruti stavovi nastavnika i previše fleksibilno ponašanje učenika.

Navedimo glavna pitanja koja čine okosnicu metode učenja putem studije slučaja, a nastavnik ih mora razmotriti u pripremi kako bi uspješno predvidio tijek nastavnog sata[8]:

1. Što je svrha navedenog slučaja?
2. Postoje li unutar slučaja određene zamke, odnosno činjenice ili mišljenja koja učenike mogu navesti na razmišljanje i/ili zaključke u krivom smjeru? Unatoč činjenici da zamke možemo smatrati pozitivnim distraktorima i tako još više unaprijediti učeničke kognitivne sposobnosti, postoji mogućnost da se preveliki dio vremena utroši na analiziranje nečega što se na kraju pokaže manje značajnim. Nastavnik mora odrediti, shodno odgovoru na

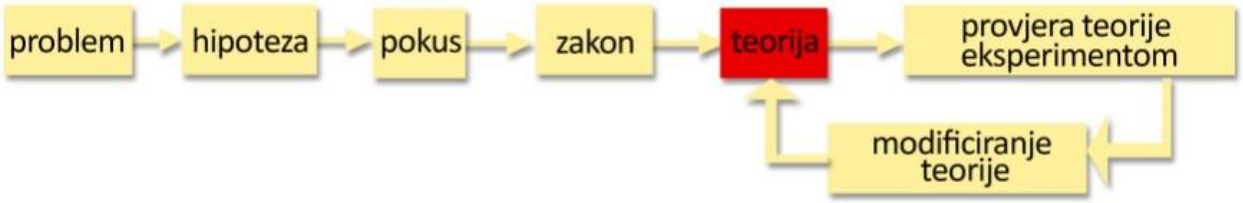
prvo pitanje, hoće li izbjeći potencijalne zamke ili će namjerno navesti učenike na njih kako bi evenutalno krenuli razmišljati u krivom smjeru sve dok se ne postave prava pitanja ili dok se ne izvrši dublja analiza.

3. Koji dijelovi slučaja djeluju zbunjujuće za nastavnika? Bitno je temeljito promotriti navedeno pitanje, jer ukoliko pojedini aspekti zbunjuju nastavnika učenike će zbuniti još više, a tada dolazi do gubitka motivacije za rješavanje slučaja. Zadatak nastavnika je upozoriti učenike na takve „ometače“ i pružiti odgovarajuće upute kako ih interpretirati.
4. Koja ključna pitanja je potrebno postaviti kako bi rasprava u razredu napredovala?
5. Koje su predviđanja nastavnika vezano za pravac u kojem rasprava može krenuti?
6. Postoji li bilo koje pitanje koje je potrebno razjasniti svim učenicima prije kraja rasprave?
7. Kako održati pažnju učenika koji imaju drugačije razmišljanje te postepeno „isključuju“ iz rasprave? Iako je intuitivno jasno, napomenimo da nastavnik mora strpljivo saslušati svakog učenika, poticati iznošenje vlastitih mišljenja, ali i taktički prekidati one koji previše pričaju ili se udaljuju od problema. Ako dođe do izvrtanja činjenica potrebno je okrenuti raspravu ka tome kako su shvaćeni podaci i ne ići dalje dok se to ne razjasni. Učenike se mora uzimati s uvažavanjem i ne smije se inzistirati na svojim stavovima kao jedinim istinama.
8. Postoji li idealna struktura rasprave odnosno na koji način rješiti navedeni slučaj? Jedna od mogućnosti je da se na početku fokusiramo na samu odluku i onda na temelju analize preispitamo odluku. Druga mogućnost je postepeno kroz analizu doći do konačne odluke tj. rješenja slučaja, što se i preporučuje u nastavi kemije.
9. Koliko vremena odvojiti za pojedine dijelove rasprave?
10. Kako završiti i zatvoriti slučaj?

Često se tijekom pripreme za nastavu zanemaruje važnost razrade plana ploče koji igra veliku ulogu u nastavnom satu. Osim što unaprijed određen raspored elemenata i naslova na ploči ostavlja dojam pripremljenog i organiziranog nastavnika na učenike, na ploči se bilježi tok rasprave nužan za razvoj kritičkog mišljenja i prosuđivanja, a na temelju kojeg učenici dobiju osjećaj važnosti kada shvate da nastavnik zna gdje je njihov komentar zabilježen i kada se pozovu na isti.

8.5. Priprema uz predloženi nastavni sat

U ovom diplomskom radu dan je prijedlog ponavljanja i ususatvljivanja gradiva nastavne jedinice *Elektroliza* kroz nastavni dvosat. Nastavna priprema temelji se na studiji slučaja putem detektivske priče pod nazivom „Bijeg iz zatvora“ s ciljem generalizacije i primjene gradiva te poticanja i razvoja učeničke kreativnosti. Motivacijska ideja provedbe nastavnog sata preuzeta je po uzoru na priču „The Chemical Adventures of Sherlock Holmes: The Blackwater Escape.“ [9] Priča slijedi shemu učenja otkrivanjem**:**



Slika M2. Shema učenja otkrivanjem.[1]

Nastava usmjerena na rješavanje problema putem studije slučaja pretpostavlja da su osnovna znanja za promatrano područje kemije usvojena. Prema tome, u tablici M1 navodimo predznanja učenika potrebna za kvalitetno pristupanje rješavanju problema putem studije slučaja kao i obrazovne ishode koje učenik treba usvojiti tijekom navedenog nastavnog dvosata. Ciljana obrazovna postignuća primjerena su uzrastu učenika trećeg razreda gimnazije i povezana s opažanjima iz provedenih pokusa.

Tablica M1. Potrebna predznanja učenika[10] i očekivani obrazovni ishodi za nastavni dvosat ponavljanja gradiva putem studije slučaja „ Bijeg iz zatvora.“

PREDZNANJA UČENIKA	OBRAZOVNI ISHODI
✓ objasniti pojmove oksidacijskoga i redukcijskoga sredstva i odrediti ih u zadanome primjeru kemijske reakcije ✓ opisati promjene na elektrodama u elektrokemijskim člancima i predvidjeti moguće reakcije do kojih će doći na elektrodama zadanoga elektrokemijskog članka primjenom elektrokemijskoga (Voltina) niza ✓ napisati jednadžbe polureakcija za oksidaciju i redukciju te ukupnu jednadžbu redoks-reakcije za zadani redoks-proces ✓ objasniti i razlikovati galvanske i elektrolizne članke ✓ analizirati zadane standardne redukcijske potencijale polučlanaka i na temelju njih predvidjeti razlike potencijala mogućih galvanskih ili elektroliznih članaka (primijeniti Voltin niz)	➢ razviti sposobnost usmenog i pisanog izražavanja o opaženim promjenama ➢ prepoznati/odabrati ključne činjenice iz navedenog slučaja za rješavanje problema uz postavljanje hipoteze ➢ izložiti i raspraviti o mogućim rješenjima problema na temelju integracije predznanja iz područja *Elektrokemije* ➢ kritički prosuđivati mišljenja i zaključke drugih učenika uz argumentiranje vlastitih stavova ➢ objašnjavati i analizirati promjene u elektrokemijskim člancima na temelju donesenih zaključaka tijekom rasprave ➢ utvrditi konačno rješenje slučaja

Strukturiranje nastavnog sadržaja odlučujući je korak u približavanju pojedine nastavne teme učenicima, istodobno razvijajući njihove radne navike i kreativne sposobnosti. Pregledom najzastupljenijih srednjoškolskih udžbenika[11-16] u nastavi kemije kroz izbor u njima opisanih pokusa željelo se poštovati osnovno metodičko načelo konstruktivizma, od temeljnog pojma prema složenom konceptu. Navedene pokuse nužno je provesti kako bi se pridonijelo usvajanju

operativnog znanja viših kognitivnih razina, a ujedno su važni za postizanje odgovarajućeg predznanja navedenog u tablici M1 prije nastavne aktivnosti predložene u nastavku.

- Relativna jakost oksidansa i reducensa[12]
- Reakcija metala s klorovodičnom kiselinom[13]
- Elektrokemijski niz elemenata (Voltin niz)[16]
- I voće može poslužiti kao galvanski članak[13]
- Elektroliza s topljivom anodom[16]

8.5.1. „Bijeg iz zatvora“

Nastavni dvosat započinje postavljanjem zanimljivog izazova pred učenike. Cilj je razriješiti slučaj pod nazivom „Bijeg iz zatvora“ po uzoru na slavnog detektiva Sherlocka Holmesa. Kao što je već navedeno u Poglavlju 8.4., rješavanje slučaja započinje individualnom pripremom učenika koja podrazumijeva pomno čitanje slučaja i pisanje zabilješki koje uključuju pitanja i ideje koje se javljaju tijekom čitanja. Potom slijedi razmjena ideja tijekom rasprave u grupama (3-5 osoba) gdje svaki učenik iznosi vlastito mišljenje.

Napomena: Individualna priprema kao i rasprava u grupama moraju biti vremenski ograničene s time da je za individualnu pripremu potrebno dati više vremena. Također u tom dijelu sata nastavnik ne smije pred učenike izložiti potrebnu aparaturu i kemikalije kako učenicima ne bi „naglo sinule“ ideje i na taj način olakšati im put k rješavanju problema.

Rasprava na satu započinje identificiranjem problema. Ključnu ulogu ima nastavnik koji osim što vodi raspravu postavljajući pitanja, mora bilježiti tok rasprave na ploči koji je nužan za razvoj kritičkog mišljenja. Potom slijedi kvalitativna i kvantitativna analiza podataka uz *Radni listić* (Poglavlje 8.6.) koji sadrži potrebne korake za provedbu rasprave na satu. Navedimo na kraju kako je predloženi nastavni dvosat probno proveden u sklopu kolegija Metodika nastave kemije 2 i na temelju tog iskustva u nekim dijelovima unaprijeđen.

8.6. Prijedlog radnog listića za nastavnu jedinicu *Elektroliza*

Cilj: Ponoviti temeljne pojmove o elektrolizi i provjeriti konceptualnu usvojenost sadržaja putem studije slučaja „ Bijeg iz zatvora“ uz razvoj analitičkih i komunikacijskih vještina kao i vještine pisanja, donošenja odluka i kreativnosti.

Istraga br. 96485**: BIJEG IZ ZATVORA**

U petak, 5. lipnja 1920. godine, u ranim jutarnjim satima čuvar zatvora primjetio je da je ćelija jednog zatvorenika prazna a zavjesa nije kao obično navučena na mali prozor. S obzirom da se radi o najopasnijem zločincu uprava zatvora odlučila je angažirati detektiva, Sherlocka Holmesa.

Nakon dolaska na mjesto zločina Sherlock je detaljno pregledao ćeliju razgovarajući sa čuvarom zatvora.

Službeni izvještaj Sherlocka Holmesa:

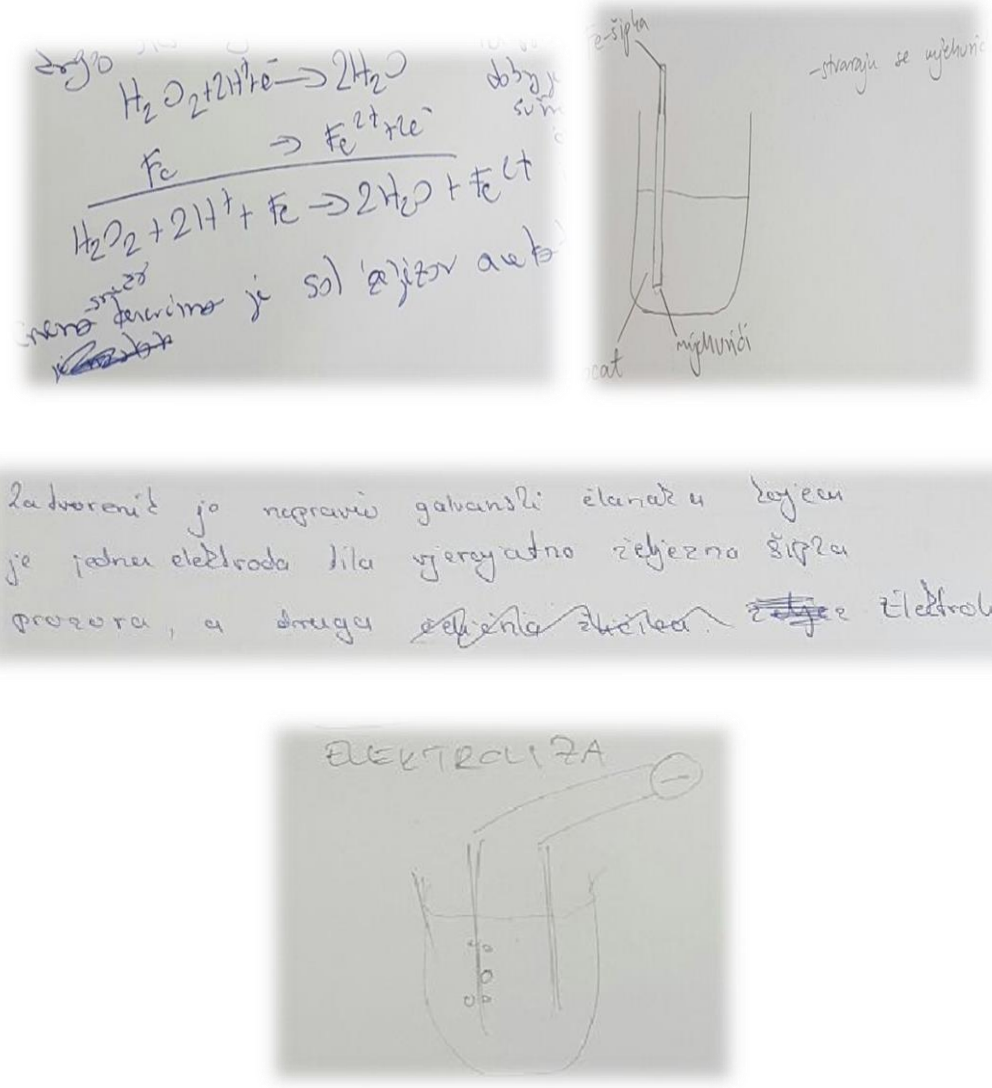
Ulaskom u ćeliju lako je bilo uočiti žarulju spojenu na dvije duge, pri kraju neizolirane žice koje vise sa stropa iz utičnice spojene na izvor istosmjerne struje. Žarulja je bila obješena pored uzglavlja ispod malog prozora s požutjelim zavjesama. Među pronađenom literaturom pored kreveta ističe se knjiga „Život i djela Michaela Faradya“, kao vrlo neobičan izbor za jednog zatvorenika. U zatvorenikovom ormariću pronađeni su šećer, mjedena žlica, čaj i vodikov peroksid. U ćeliji je prevladavao miris octa. Prema iskazu čuvara, zatvorenik je bio veliki ljubitelj ribica i krumpirića uz dodatnu količinu octa, a vodikov peroksid koristio je za dezinfekciju rane na ruci. Prozor ćelije zaštićen je s dvije željezne šipke. Oko svake šipke uočava se jamica u kamenu prozorske daske. Jedna od šipki bila je pri dnu prerezana i pomaknuta u stranu, a u njenom ležištu uočena je crveno smeđa, vlažna mrlja. Oko druge šipke uočeno je zadebljanje.

Nekoliko dana nakon podnošenja službenog izvještaja Sherlock se vratio natrag u ćeliju kako bi pomoću kalijevog tiocijanata, KSCN(aq), napravio određene pokuse koji bi potvrdili njegovu hipotezu o načinu bijega iz zatvora. Potom je u izvještaj dodao kako je pokusom potvrdio svoje sumnje te time smatra slučaj riješenim.

- Individualna priprema i rasprava u grupama

ZADATAK 1*: Predložite i obrazložite na temelju izvještaja kako je zatvorenik napustio ćeliju?*

- ✓ Nastavnik bi trebao upozoriti učenike da tijekom čitanja i pisanja zabilješki imaju na umu. da sve navedene tvari u izvještaju ne moraju nužno biti povezane s rješenjem slučaja.
- ✓ U ovom dijelu sata nastavnik mora imati ulogu promatrača te ne bi trebao davati komentare sugestivne naravi.
- ✓ Kao mala pomoć nastavnicima u predviđanju odgovora učenika priložena su najčešća rješenja dobivena od studenata 5. godine (nastavnički smjer integriranog studija kemije, biologije-kemije i fizike-kemije) tijekom probne provedbe nastavnog dvosata.



Slika M3. Najčešća rješenja dobivena od studenata tijekom probne provedbe nastavnog dvosata.

- ✓ Pripremljenost nastavnika očituje se i u poznavanju standardnih elektrodnih potencijala. Tablica M4 s navedenim vrijednostima elektrodnih potencijala zasigurno će pomoći nastavniku i učenicima tijekom rasprave o njihovim ponuđenim rješenjima.

Tablica M4. Standardni elektrodni potencijali odabranih redoks sustava u vodenim otopinama pri 25 ºC.

ELEKTRODNA REAKCIJA	E^o/V
$2\ H_2O(\ell) + 2\ e^- \rightarrow H_2(g) + 2\ OH^-(aq)$	–0,83
$Fe^{2+}(aq) + 2\ e^- \rightarrow Fe(s)$	−0,44
$2\ H_3O^+(aq) + 2\ e^- \rightarrow H_2(g) + 2\ H_2O(\ell)$	0
$Fe^{3+}(aq) + e^- \rightarrow Fe^{2+}(aq)$	0,77
$O_2(g) + 4\ H_3O^+(aq) + 4\ e^- \rightarrow 6\ H_2O(\ell)$	1,23
$H_2O_2(aq) + 2\ H_3O^+(aq) + 2\ e^- \rightarrow 4\ H_2O(\ell)$	1,78

- Rasprava na satu

- ✓ Analiza treba krenuti od prijedloga koji je „najudaljeniji“ od pravog rješenja, a potom, korak po korak, doći do analize vjerojatnog rješenja.
- ✓ Učenici sami predlažu aparaturu potrebnu za eksperimentalnu provjeru svog prijedloga rješenja.
- ✓ Plan ploče ima jako bitnu ulogu u vođenju rasprave nastavnika s učenicima o njihovim predloženim rješenjima slučaja. Analiza prijedloga rješenja zahtjeva strukturirani plan ploče koji ćemo podijeliti na 3 koraka:
  - I. kratki opis predloženog rješenja od strane učenika
  - II. skica aparature uz predloženo rješenje
  - III. eksperimentalna provjera i zapisivanje zaključka dobivenog na temelju pokusa (predlažu se demonstracijski pokusi za manje moguća ili vjerojatna rješenja, da se ne izgubi na dinamici nastavnog sata, i grupni pokus za vjerojatno rješenje)

ZADATAK 2: Analiza prijedloga rješenja

Jedna od mogućih provedbi analize ponuđenih rješenja dana je po uzoru na probnu provedbu nastavne teme sa studentima 5. godine čija su rješenja navedena na slici M3.

TVRDNJA 1: *Željezna šipka uronjena je u vodikov peroksid.*

Pribor i kemikalije: epruveta, vodikov peroksid, komad željezne žice

Postupak: u epruvetu s vodikovim peroksidom uroni se komadić željezne žice

Opažanja: nema vidljive promjene.

- ☞ Tvrdnja je odbačena, kemijska reakcija pri opisanim uvjetima eksperimenta nije opažena!
- ☝ Vodikov peroksid, unatoč tome što je jako oksidacijsko sredstvo, ne reagira s elementarnim željezom. Također, u kiselinama koje imaju jako oksidacijsko djelovanje željezo se ne otapa.

TVRDNJA 2: *Željeznu šipku uronimo o ocat.*

Pribor i kemikalije: epruveta, ocat, komad željezne žice

Postupak: u epruvetu s octom uroni se komadić željezne žice.

Opažanja: reakcije se odvija vrlo sporo uz razvijanje malih mjehurića plina na površini žice.

$$Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2\,e^-$$
$$2\,H_3O^+ + 2\,e^- \rightarrow H_2 + 2\,H_2O$$
$$Fe(s) + 2\,H_3O^+(aq) \rightarrow Fe^{2+}(aq) + H_2(g) + 2\,H_2O(\ell)$$

- ☞ Tvrdnja je odbačena, kemijska reakcija u danim uvjetima je prespora!

TVRDNJA 3: *Zatvorenik je napravio galvanski članak pomoću dvije željezne šipke.*

Pribor i kemikalije: čaša, 2 željezne elektrode, ocat, digitalni voltmetar, dvije žice s „krokodil“ nastavcima.

Postupak: u čašu s octom uronimo željezne elektrode te ih spojimo na digitalni voltmetar i očitamo napon.

Opažanja: voltmetar ne pokazuje razliku potencijala (napon je 0).

- ☞ Tvrdnja je odbačena, elektrode u galvanskom članku moraju imati različit elektrodni potencijal!

- ☝ Korisno je u ovom koraku napraviti mali odmak od teme kako bi s učenicima ponovili obrazovne ishode vezane za obradu nastavne jedinice *Galvanski članak*. Nastavnik treba imati pripremljen galvanski članak kako bi izveo još jedan demonstracijski pokus gdje će učenici ponovo očitati napon na voltmetru, a potom raspraviti i usporediti opažene promjene. Neizostavno je raspraviti s učenicima zašto je voltmetar pokazivao napon od 0 V kada smo uronili dvije željezne žice u ocat. Vrijednosti standardnog elektrodnog potencijala navedene u tablici M4 također nam pomažu tijekom ove rasprave. U konačnici, učenici bi trebali zaključiti kako TVRDNJA 3, iako je odbačena, ukazuje na činjenicu da smo na tragu rješenja.

TVRDNJA 4: *Pomoću elektrolize zatvorenik je pobjegao iz zatvora.*

Pribor i kemikalije: 2 komada željezne žice, ocat, ispravljač od 12 V, dvije žice s „krokodil" nastavcima.

Postupak: u čašu s octom uronimo željezne elektrode te ih spojimo na ispravljač.

- ✓ Provjera TVRDNJE 4 ne izvodi se demonstracijskim pokusom. Učenici dobivaju priliku napraviti pokus u grupama. Nastavnik pred učenike donosi pribor i kemikalije potrebne za izvedbu pokusa uz priloženi *Radni listić*.
- ✓ Učenici sami smišljaju kako na temelju ponuđenog pribora mogu sastaviti elektrolizni članak i provesti eksperimentalnu provjeru prijedloga rješenja prema TVRDNJI 4.
- ☝ Nastavnik mora biti spreman na raspravu s učenicima o nastanku jamica oko spoja željeznih šipki i kamena prozorske daske. Jedna od ideja učenika zasigurno će biti da je načinjena mjedenom žlicom u kamenu u kojem su bile pričvršćene željezne šipke, međutim tvrdoća kamena je veća od tvrdoće mjeda stoga bi takav prijedlog trebao biti odbačen. U

izvornom tekstu[9] nigdje nije eksplicitno navedeno kako je zatvorenik napravio udubljenje oko šipki. Jedno od mogućih rješenja je da je zatvorenik konstantno lijevao elektrolit (ocat) u područje oko šipki pa je kiselina djelovala vrlo sporo na kamen i na metal.



Slika M4. Pribor i kemikalije potrebni za provedbu elektrolize prema TVRDNJI 4.

ZADATAK 3: Rješavanje radnog listića

- ✓ Nakon sastavljanja aparature učenici dobivaju *Radni listić*, a nastavnik nadzire njihov rad
- ✓ POKUS 1 ujedno nam daje i potvrdan odgovor na TVRDNJU 4, a posebnu pažnju treba posvetiti ZADATKU 2. Naime, učenici nisu dovoljno upoznati sa svojstvima željeza da bi znali kako nestabilni Fe^{2+} ioni u vodenoj otopini slabe kiseline u prisustvu kisika lako oksidiraju u Fe^{3+} ione koji elektrolitnoj otopini daju narančasto obojenje. Potrebno je prodiskutirati s učenicima koje se reakcije događaju na pojedinim elektrodama i zašto, a tablica M4 je neizostavan „alat“ na tom putu.
- ✓ POKUS 2: od učenika se očekuje da povežu opažanja i analiziraju promjene uočene u KORAKU 2 , gdje su u elektrolitnoj otopini prisutni Fe^{2+} ioni, s promjenama iz TVRDNJE 1 (željezo uronjeno u vodikov peroksid). Vodena otopina kalijevog tiocijanata, uz prisutnost vodikovog peroksida, služi za dokazivanje Fe^{3+} iona u otopini.

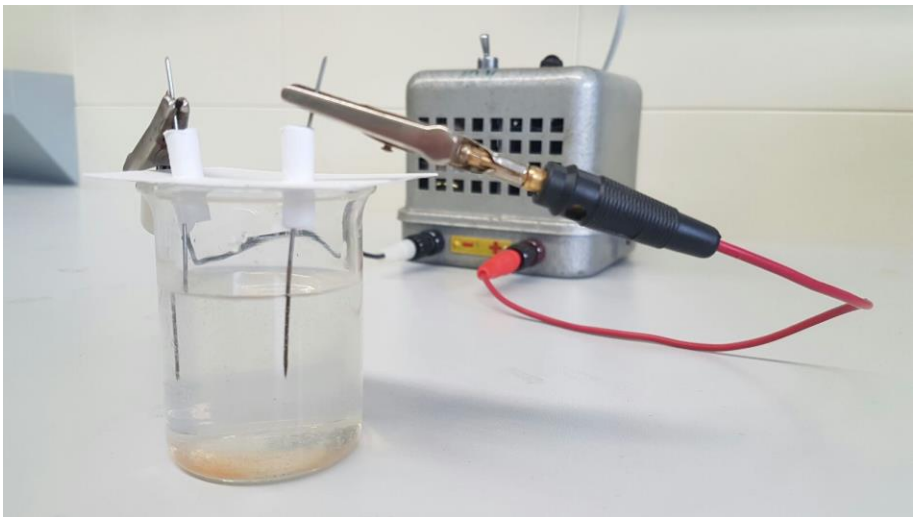
- ✓ Nakon provedbe POKUSA 1 i POKUSA 2 nastavnik i učenici zajedno još jednom rezimiraju slučaj „Bijeg iz zatvora“ te na temelju svih navedenih opažanja dolaze do konačnog zaključka:
  - ☞ Tvrdnja 4 je točna! Strujni krug koji je zatvoreniku omogućio bijeg sastojao se od 2 željezne šipke na prozoru, 2 neizolirane žice na kojima je visjela žarulja i ocat kao elektrolitna otopina. U načinjenom elektroliznom članku s topljivom anodom od željeza, zatvorenik je uspio oslabiti 'anodu' oksidacijom elementarnog željeza i omogućiti si put za bijeg. Elektrolizu je provodio tijekom dana pod okriljem požutjele zavjese, jer su noću morale u ćelijama gorjeti žarulje. Zadebljanje oko 'katode' druge željezne šipke može se pripisati nastanku hrđe djelovanjem nastalih Fe^{2+} iona u reakciji s kiselinom i kisikom iz zraka.

POKUS 1:

ZADATAK 1: Opišite postupak izvedbe elektroliznog članka uz priloženu skicu aparature.

KORAK 1: Prema predloženoj i od nastavnika odobrenoj shemi načinite elektrolizu. Zabilježite promjene uočene tijekom izvođenja pokusa.

Tijekom elektrolize na jednoj željeznoj žici (spojenoj na negativan pol, katoda) se razvijaju mjehurići plina, dok se druga žica (spojena na pozitivan pol, anoda) postepeno razlaže. Boja elektrolitne otopine je svijetlo narančasta.



Slika M5. Aparatura za elektrolizu

ZADATAK 2: Obrazložite navedena opažanja! Odgovor potkrijepite jednadžbama polureakcija koje se odvijaju na elektrodama.

U elektroliznom članku dovedena električna struja uzrokuje promjene na elektrodama. Žica koja se „troši" je anodna elektroda i na njoj dolazi do oksidacije željeza. Žica na kojoj nastaju mjehurići plina je katodna elektroda te dolazi do redukcije oksonijevih iona iz elektrolitne otopine.

Anoda: $Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2\ e^-$
Katoda: $2\ H_3O^+ + 2\ e^- \rightarrow H_2 + 2\ H_2O$

$Fe(s) + 2\ H_3O^+(aq) \rightarrow Fe^{2+}(aq) + H_2(g) + 2\ H_2O(l)$

Nastali Fe^{2+} kationi lako s kisikom iz zraka dalje oksidiraju u stabilniji željezov(III) kation, stvarajući hrđu.

$4\ Fe^{2+}(aq) + O_2(g) + 2\ H_2O(\ell) \rightarrow 4\ Fe^{3+}(aq) + 4\ OH^-(aq)$

POKUS 2:

Pribor: epruveta, stalak za epruvete, kapaljka

Kemikalije: kalijev tiocijanat, vodikov peroksid (30 %), elektrolitna otopina iz reakcijskog sustava Pokusa 1

KORAK 1: Stavite u epruvetu 3 mL elektrolitne otopine i dodajte nekoliko kapi vodene otopine kalijevog tiocijanata. Zabilježite opažanja.

Nema vidljive promjene.

KORAK 2: U istu epruvetu dodajte nekoliko kapi vodikovog peroksida. Zabilježite promjene.

Dodatkom vodikovog peroksida otopina je poprimila crveno obojanje.

ZADATAK 1: Jednadžbom kemijske reakcije prikažite ulogu vodikovog peroksida u opaženoj promjeni i izjednačite je ion-elektron metodom.

$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^-$

$H_2O_2 + 2\ H^+ + 2\ e^- \rightarrow 2\ H_2O$

$2\ Fe^{2+}(aq) + H_2O_2(aq) + 2\ H^+(aq) \rightarrow 2\ Fe^{3+}(aq) + 2\ H_2O(\ell)$

ZADATAK 2: Pomoću odgovora na ZADATAK 1 objasnite zašto je otopina poprimila crvenu boju?

Dodatkom vodikovog peroksida u elektrolitnu otopinu dolazi do oksidacije željezovog(II) kationa u željezov(III) kation koji potom s ionima tiocijanata SCN^- daje kompleks crvene boje iz serije željezovih(III) tiocijanata. U vodenim otopinama Fe^{3+} se nalazi u obliku *aqua* kompleksa te ima oktaedarsku građu.

$[Fe(H_2O)_6]^{3+}(aq) + SCN^-(aq) \rightarrow [Fe(SCN)(H_2O)_5]^{2+}(aq) + H_2O(\ell)$

PROBLEMSKI ZADATAK: KAKO PROBUŠITI ŽILET ?[17]

Pribor: žilet, našiljena grafitna elektroda, baterija (9 V), kapalica s gumicom, satno staklo

Kemikalije: klorovodična kiselina

Opaska za nastavnika: Nakon provedene rasprave *Kako probušiti žilet* i postavljenih učeničkih hipoteza načiniti pokus i potvrditi ili opovrgnuti učeničke pretpostavke.

Postupak: Žilet spojite krokodil-štipaljkom na plus pol izvora istosmjerne struje napona 9 V i postavite na satno staklo. Deblji dio grafitne elektrode spojite krokodil-štipaljkom na minus pol izvora istosmjerne struje, a zatim zašiljeni dio elektrode usmjerite prema površini žileta tako da ostane razmak od milimetra. Kapalicom s gumicom kapnite samo kap klorovodične kiseline na mjesto gdje se šiljak i žilet gotovo dotiču. Uključite ispravljač.

Napomena: Prema potrebi dodajte još koju kap klorovodične kiseline.

ZADATAK 1: Opišite promjene uočene tijekom izvođenja pokusa.

Postepeno je nastajala rupa na žiletu, neposredno ispod šiljka. Prema rubu kapljice željezo se sve sporije otapa. Klorovodična kiselina isparava.

ZADATAK 2: Obrazložite navedena opažanja! Odgovor potkrijepite jednadžbom pripadne polureakcije na elektrodama.

Otapanje ide brže neposredno ispod šiljka, jer je na tom mjestu električno polje najjače. Električno polje slabi udaljavanjem od šiljka pa se željezo sve sporije otapa prema rubu kapljice klorovodične kiseline.

Anoda: $Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2\ e^-$
Katoda: $2\ H_2O + 2\ e^- \rightarrow H_2 + 2\ OH^-$

$Fe(s) + 2\ H_2O(\ell) \rightarrow Fe^{2+}(aq) + H_2(g) + 2\ OH^-(aq)$

9. ZAKLJUČAK

Proces provedbe studije slučaja u nastavi kemije u svrhu motiviranja učenika pun je izazova, ali i obećanja. Energija prvotno mora biti usmjerena na razvoj nastavnih sredstava. Međutim, to nije jedini i najveći izazov. Anais Nin nas svojim citatom „ Ne vidimo stvari kakve jesu, vidimo stvari kakvi jesmo“ podsjeća na važnost nastavnih perspektiva i percepcija. Prema tome, razumijevanje i percepcija nastavnika, uključujući i peer percepciju, o upotrebi studije slučaja u nastavi predstavlja izuzetno značajni korak u njegovoj provedbi. Krenemo li na vrijeme razmišljati u tom smjeru sa željom za konkretnim promjenama, a istovremeno imajući na umu da svaka promjena vezana za metodologiju nastave započinje promjenom pristupa nastavnika, aktivno učenje kemije imat će još bolji učinak. To se može i treba dogoditi.

U metodičkom dijelu ovog diplomskog rada predložen je nastavni dvosat primjeren za učenike trećeg razreda gimnazije na temelju edukacijske i udžbeničke literature za nastavnu jedinicu *Elektroliza*. Radni listić namijenjen je za učenje otkrivanjem putem rješavanja slučaja na temelju individualne pripreme, rasprave u malim grupama, a potom iz zajedničke rasprave učenika i nastavnika. Rješavanjem slučaja uz izvođenje pokusa učenici će između ostalog otkrivati novo, donositi zaključke i graditi svoje znanje na konstruktivističkim principima. Predloženi dvosat moguće je izvesti u redovitoj nastavi, a pribor i kemikalije lako su dostupni.

10. LITERATURNA VRELA

1. M. Sikirica, *Metodika nastave kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 2003.
2. F. Jelavić, *Didaktika*, Naklada Slap, Zagreb, 1998.
3. S. Hidi, K. A. Renninger, *J. Educ. Psychol.* **41** (2006) 111–127.
4. L. Bognar, M. Matijević, *Didaktika*, Školska knjiga, Zagreb, 2002.
5. V. Mužić, *Uvod u metodologiju istraživanja odgoja i obrazovanja*, EDUCA, NAKLADNO DRUŠTVO d.o.o., Zagreb, 1999.
6. L. Choen, L. Manion, K. Morrison, *Metode istraživanja u obrazovanju*, Naklada Slap, Zagreb, 2007.
7. C. F. Herreid, *J. Chem. Educ.* **90** (2013) 256–257.
8. E. Agić, J. Selimović, *Priručnik za učenje putem slučajeva*, Ekonomski fakultet, Sarajevo, 2006.
9. T. G. Waddell, T. R. Rybolt, *J. Chem. Educ.* **80** (2003) 401–406.
10. http://dokumenti.ncvvo.hr/Ispitni_katalozi_15-16/Hrvatski/KEM_IK_16.pdf (25. siječanj 2017.)
11. A. Habuš, D. Stričević, S. Liber, *Opća kemija 2*, Profil Klett d.o.o., Zagreb, 2015.
12. D. Nöthing Hus, M. Herak, F. Novosel, *Opća kemija 2*, Školska knjiga, Zagreb 2014.
13. A. Habuš, D. Stričević, S. Liber, *Opća kemija 2*, Profil, Zagreb, 2006.
14. G. Pavlović, Lj. Kovačević, *Kemija 2*, Alfa, Zagreb, 2010.
15. Z. Popović, Lj. Kovačević, M. Bulić, *Kemija 3*, Alfa, Zagreb, 2014.
16. M. Sikirica, B. Korpar-Čolig, *Praktikum iz opće kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 2005.
17. M. Sikirica, *Zbirka kemijskih pokusa*, Školska knjiga, Zagreb, 2011.
18. C. L. Colyer, *J. Chem. Educ.* **90** (2013) 260–261.
19. Erskine, A. James, M. R. Leenders, L. A. Mauffette-Leenders, *Teaching with Cases*, Richard Ivey School of Business, 1998.
20. M. S. Khine, I. M. Saleh, *Practitioner Research: Teachers' Investigations in Classroom Teaching*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1. siječnja 1990. u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje započela sam 1996. godine, uključujući. 2004. godine upisala sam Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet, smjer nastavnik fizike i kemije, upisala sam 2008. godine. Tijekom studija sudjelovala sam na konferenciji studenata fizike povodom obilježavanja Međunarodne godine svjetlosti (*Lights of Tuscany*, Pisa) te kao mentor u znanstvenom edukacijskom projektu Ljetna Tvornica Znanosti, namijenjen učenicima osnovnoškolskog obrazovanja. Tijekom treće godine studija bila sam i demonstrator u praktikumu opće kemije 1. Od 2014. do 2016. godine predavala sam fiziku u Općoj privatnoj gimnaziji i Zagrebačkoj umjetničkoj gimnaziji.