

UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU

Wydział Biologiczno-Chemiczny



**Otrzymywanie i badanie właściwości
materiałów zawierających
„małe” nanocebulki węglowe**

(streszczenie)

Joanna Breczko

Promotor:

prof. dr hab. Krzysztof Winkler (Uniwersytet w Białymstoku)

Promotor pomocniczy:

dr Marta Eliza Płońska-Brzezińska (Uniwersytet w Białymstoku)

Recenzenci:

prof. dr hab. Marcin Opałło (Instytut Chemii Fizycznej PAN)

dr hab. inż. Grzegorz Milczarek, prof. PP (Politechnika Poznańska)

Białystok 2014

Cele i założenia pracy

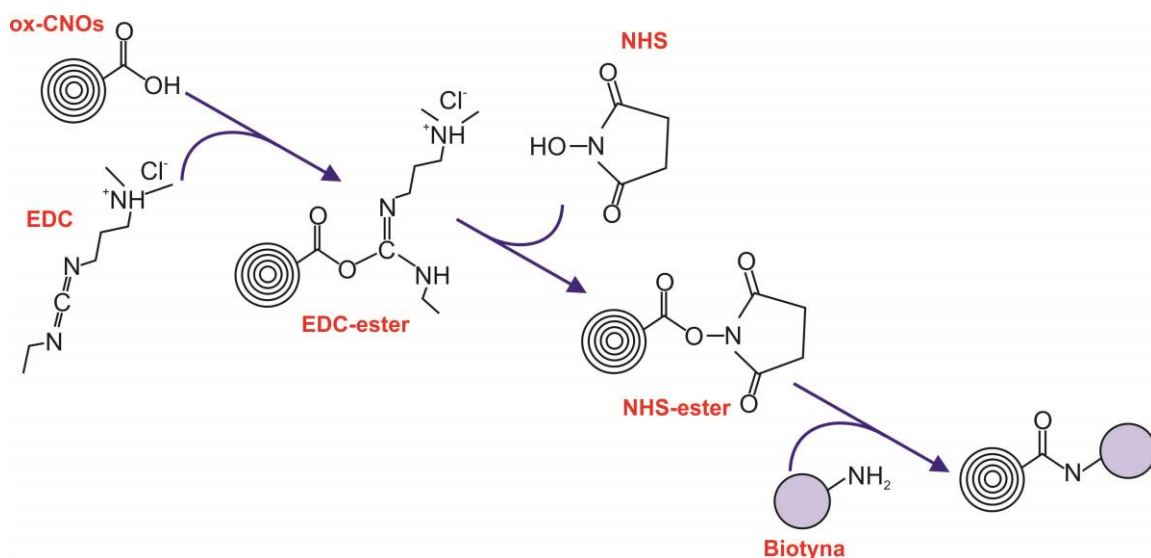
Nanocebulki węglowe (CNOs) zbudowane są ze sferycznie zamkniętych płaszczyzn grafenowych o wzrastającej średnicy, celem umieszczenia ich jedna w drugiej i otoczenia pustego fulerenowego rdzenia. Stanowią one struktury pośrednie między fulerenami, a wielościennymi nanorurkami, więc przypuszczalnie mogą wykazywać właściwości zarówno jednych, jak i drugich.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej wykorzystywano „małe” CNOs o średnicy 5-6 nm, w związku z tym, że wykazują one większą reaktywność niż te, określane jako „duże” (15-25 nm). Głównym celem przeprowadzonych badań była synteza różnego typu materiałów stanowiących połączenie nanocebulek węglowych z biocząsteczkami, polielektrolitami lub polimerami. Były one następnie charakteryzowane i badane pod kątem aktywności chemicznej i elektrochemicznej. Pozwoliło to na ocenę możliwości zastosowania takich materiałów w tworzeniu biosensorów i kondensatorów.

Tworzenie bioczuJNIKA z wykorzystaniem nanocebulek węglowych

Możliwość wykorzystania CNOs w bioczuJNIkach pracujących w warunkach „in situ” wymagała wcześniejszego sprawdzenia wpływu CNOs na związki biologiczne i żywe komórki. W tym celu przeprowadzony został test MTS (z użyciem soli (3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-5-(3-karboxymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2*H*-tetrazolowej) pozwalający na określenie stopnia cytotoksyczności badanych nanostruktur i ich pochodnych. Otrzymane wyniki wskazują na dobrą cytokompatybilność oraz brak właściwości cytotoksycznych wobec komórek fibroblastów wszystkich testowanych nanocebulek w zakresie stężeń od 30 do 300 µg/ml.

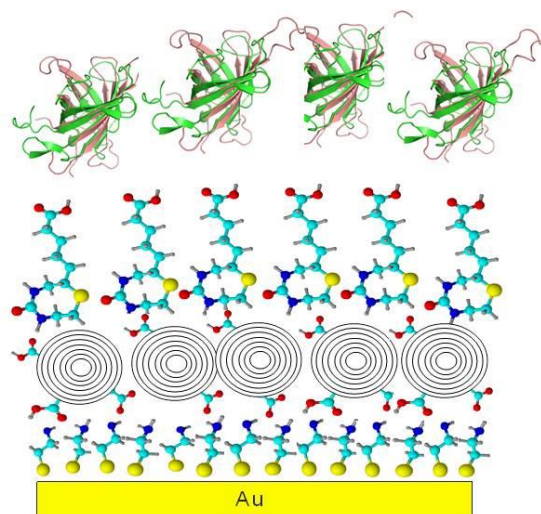
Równie ważna w konstrukcji bioczuJNIków z udziałem „małych” CNOs jest ich zdolność do tworzenia trwałych połączeń z biocząsteczkami. W związku z tym przeprowadzono próbę funkcjonalizacji nanocebulek substancjami czynnymi biologicznie. W tym celu, w pierwszej kolejności, badane struktury węglowe utleniało za pomocą kwasu azotowego, wprowadzając na ich powierzchnię grupy zawierające tlen i podnosząc tym samym ich hydrofilowość. Następnie na powierzchnię otrzymanych ox-CNOs podziałano hydrazidem kwasu biotynoamidoheksanowego (BioAH) w obecności aktywatorów: chlorowodoru *N*-(3-dimetyloaminopropylo)-*N'*-etylokarbodiimidu (EDC) i *N*-hydroksysukcynimidu (NHS), inicjujących reakcję amidacji zgodnie z mechanizmem przedstawionym na Schemacie 1. Przebieg procesu modyfikacji śledzono metodą spektroskopii w podczerwieni.



Schemat 1. Mechanizm tworzenia wiązania amidowego pomiędzy utlenionymi nanocebulkami a sfunkcjonalizowanymi cząsteczkami biotyny w obecności aktywatorów EDC i NHS.

Wyniki uzyskane techniką IR wskazują na możliwość kowalencyjnej funkcjonalizacji utlenionych nanocebulek węglowych, za pomocą związków aktywnych biologicznie, zgodnie z procedurami obowiązującymi dla kwasów karboksylowych. Właściwość ta pozwala na ich wykorzystanie w tworzeniu bioczujników techniką „warstwa po warstwie”

Wykorzystując opisaną metodę modyfikacji podjęto próbę utworzenia bioczujnika z udziałem „małych” CNOs w oparciu o modelowe oddziaływanie biotyny z awidyną. Poszczególne warstwy bioczujnika nanoszono na powierzchnię złota w różnej kolejności, a ich tworzenie monitorowano za pomocą wybranych technik badania powierzchni (SPR, AFM oraz FTIR-HATR). Najlepsza ze zbadanych konfiguracja bazowała na modyfikacji powierzchni złota samoorganizującą się warstwą cysteaminy, a następnie utworzeniu wiązań amidowych w obecności aktywatorów pomiędzy wolnymi grupami aminowymi tiolu, a grupami karboksylowymi utlenionych nanocebulek. Kolejnym etapem tworzenia tego bioczujnika była analogiczna reakcja amidacji przebiegająca z udziałem unieruchomionych ox-CNOs oraz cząsteczek biotyny. Utworzona konfiguracja Au/tiol/ox-CNOs/biotyna stanowiła bioczujnik oddziałujący specyficznie z cząsteczkami awidyny, tak jak przedstawiono to na Schemacie 2.



Schemat 2. Model biosensora Au/tiol/ox-CNOs/biotyna czułego na awidynę tworzony techniką „warstwa po warstwie”.

Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły tworzenie bioczuJNIKA, w którym kolejne warstwy wiązane były kowalencyjnie. Mając na celu sprawdzenie potencjalnych możliwości zastosowania analitycznego tego bioczuJNIKA przeprowadzono pomiary metodą SPR, wykazując wysoką bioaktywność układu wobec oznaczanej awidyny.

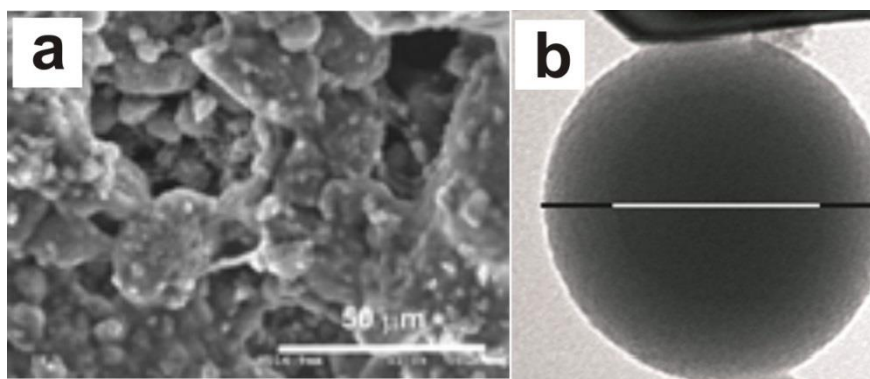
Otrzymywanie kompozytów zawierających nanocebulki węglowe

Tworzenie kompozytów w oparciu o połączenie nanostruktur węglowych z polielektrolitami lub polimerami jest jednym z wiodących zagadnień we współczesnej chemii materiałowej. Rolą zarówno polielektrolitu, jak i polimeru jest przeciwdziałanie tendencji nanostruktur do tworzenia agregatów oraz poprawa jednorodności i mechanicznej trwałości materiału kompozytowego. Obecność nanomateriału węglowych wpływa natomiast istotnie na właściwości elektrochemiczne kompozytów. W niniejszej rozprawie opisano otrzymywanie kompozytów „małych” CNOs z polielektrolitami takimi jak chitozan (Chit) czy poli(chlorek diallilodimetyloamoniowy) (PDDA) oraz z polianiliną (PANI), po wcześniejszej ich funkcjonalizacji grupami fenylnoaminowymi.

Synteza kompozytów CNOs/Chit o różnym stosunku masowym struktur węglowych do polielektrolitu opierała się na rozpuszczeniu odpowiedniej ilości chitozanu w 0,05 M kwasie chlorowodorowym, ogrzewaniu mieszaniny w temperaturze 90°C do momentu uzyskania jednorodnej cieczy, obniżeniu wartości pH roztworu do 4, a następnie dodaniu niezmodyfikowanych nanocebulek węglowych, które dyspergowano stosując 15-minutową ultrasonifikację. Procedura przygotowywania roztworów PDDA polegała na rozcieńczeniu ciepłego poli(chloroku diallilodimetyloamoniowego) celem uzyskania odpowiednich jego

stężeń, a następnie, analogicznie do poprzedniej procedury, wprowadzano do nich CNOs działając przez 15 minut łaźnią ultradźwiękową. Synteza kompozytów CNOs z polianiliną była bardziej skomplikowana, wymagała bowiem wcześniejszej modyfikacji powierzchni nanocebulek za pomocą kwasu 4-aminobenzoowego (4-ABAc) lub *p*-fenylenodiaminy (*p*-PDA), a dopiero potem miała miejsce chemiczna polimeryzacja „in situ” aniliny.

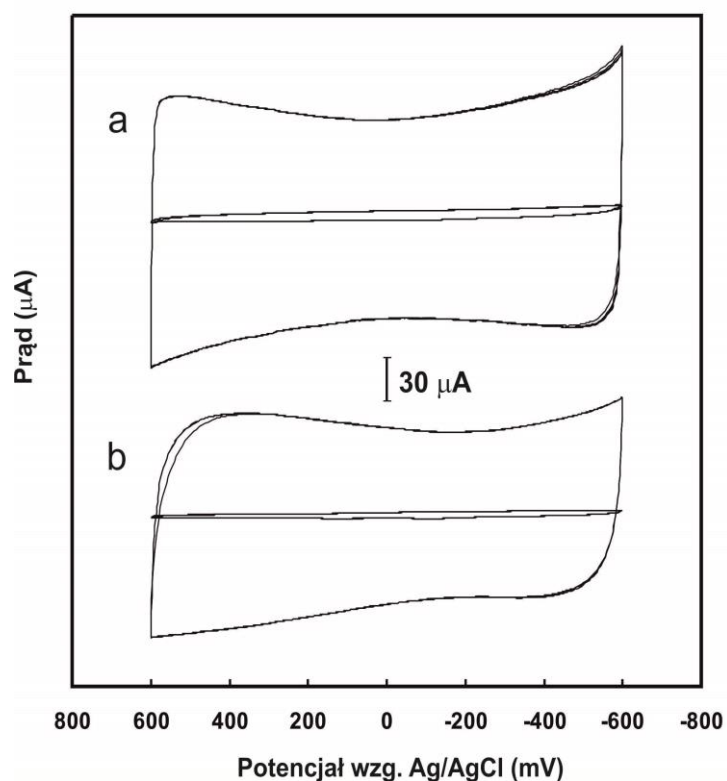
Filmy kompozytowe uzyskiwano poprzez nanoszenie na powierzchnię elektrody z węgla szklanego (GCE), folii złotej lub szklanej płytki pokrytej złotem, 10 μ l otrzymanego roztworu i odparowanie rozpuszczalnika w atmosferze argonu. Następnie otrzymane kompozyty były charakteryzowane technikami mikroskopii elektronowej oraz spektroskopowymi, co miało na celu potwierdzenie tworzenia zaplanowanych struktur w poszczególnych krokach syntezy oraz poznanie wybranych właściwości fizykochemicznych końcowego materiału. Techniki mikroskopowe SEM i TEM dostarczały informacji dotyczących odpowiednio morfologii filmów kompozytowych oraz budowy pojedynczych struktur po modyfikacji powierzchniowej (Rysunek 1). Metody FTIR oraz spektroskopia Ramana wskazywały na tworzenie wiązań chemicznych oraz umożliwiły określenie stopnia funkcjonalizacji CNOs.



Rysunek 1. Zdjęcia SEM filmu kompozytowego CNOs/Chit (a) oraz TEM kompozytu CNOs/4-ABAc/PANI (b).

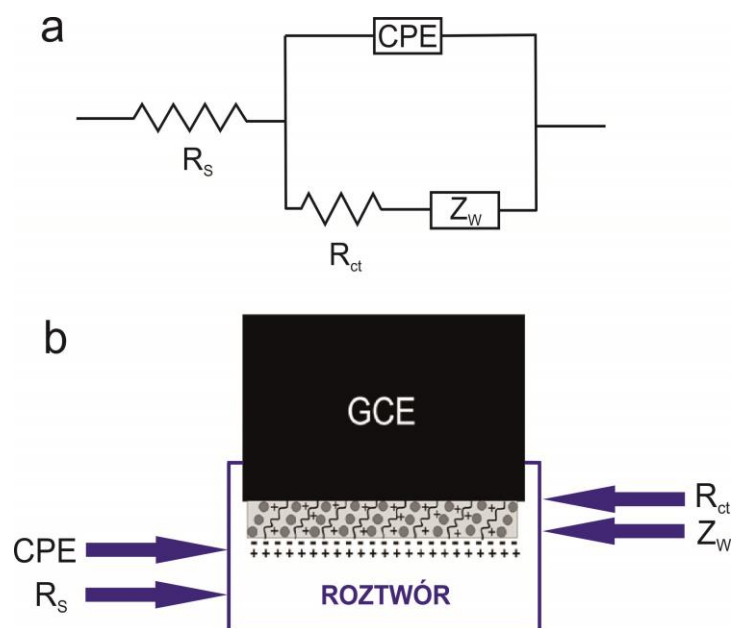
Wiele uwagi poświęcono badaniom właściwości elektrochemicznych uzyskanych kompozytów stosując woltamperometrię cykliczną (CV) oraz spektroskopię impedancyjną (EIS) w układzie trójelektrodowym, gdzie rolę elektrody pracującej pełniła elektroda z węgla szklanego (GCE) modyfikowana badanym filmem kompozytowym, elektrodę chlorosrebrową stosowano w charakterze elektrody odniesienia, natomiast elektroda platynowa stanowiła elektrodę pomocniczą. Opisana została także próba pomiarów właściwości elektrochemicznych wybranego materiału kompozytowego w symetrycznym układzie dwuelektrodowym. Wyniki uzyskane obydwoma technikami wskazały na typowe zachowanie pojemnościowe badanego materiału kompozytowego. Krzywe cykliczne

cechowały się pseudoprostokątnym profilem katodowym i anodowym, charakterystycznym dla idealnego kondensatora (Rysunek 2).



Rysunek 2. Cykliczne krzywe woltamperometryczne zarejestrowane dla elektrody GCE pokrytej filmem kompozytowym CNOs/Chit (1:1,5) (a) oraz CNOs/PDDA (1:1) (b) wobec odnośników Chit (a) oraz PDDA (b) w roztworze 0,1 M H_2SO_4 przy szybkości polaryzacji 100 mV/s .

Potwierdzenie i uzupełnienie uzyskanych wyników stanowiła analiza impedancyjna otrzymanych kompozytów. Pomiary EIS umożliwiły między innymi dopasowanie układu zastępczego, który najlepiej modelował zachodzące podczas pomiarów zjawiska i efekty (Schemat 3).

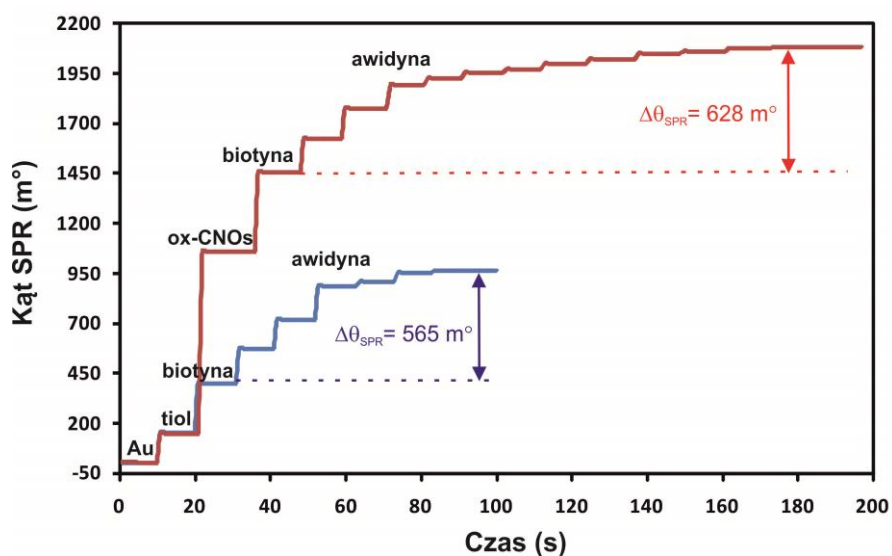


Schemat 3. Elektryczny obwód zastępczy opisujący zachowanie elektrody modyfikowanej filmem CNOs/Chit lub CNOs/PDDA zanurzonej w roztworze elektrolitu (a) oraz model ładowania warstwy podwójnej na granicy faz elektroda/elektrolit z zaznaczeniem elementów obwodu zastępczego (b).

Pojemności właściwe uzyskane metodami CV oraz EIS, w zależności od składu jakościowego i ilościowego otrzymanego kompozytu, wahały się od około 20 do 300 F/g. Niektóre z elektrod modyfikowanych warstwami kompozytów były wykorzystywane w celach analitycznych.

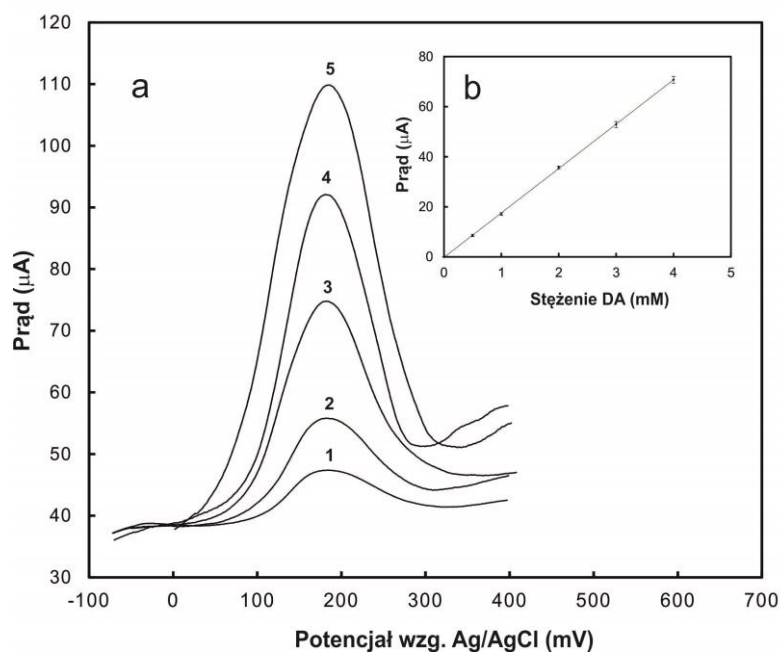
Analizy zastosoanie otrzymanych materiałów

Wyniki prac przedstawionych w niniejszej rozprawie obejmują także wstępne badania możliwości oznaczeń awidyny na utworzonym bioczuJNIku Au/tiol/ox-CNOs/biotyna. Dla porównania analogiczne badania prowadzono przy użyciu sensora bez warstwy ox-CNOs. Przedstawione na Rysunku 3 sensogramy przedstawiają zmiany sygnału analitycznego związane ze stopniowym wiązaniem awidyny (wstrzyknięcia po 20 μ l roztworu awidyny o stężeniu 0,45 μ g/ml) z powierzchnią Au/tiol/ox-CNOs/biotyna (wykres czerwony) i dla porównania z Au/tiol/biotyna (wykres niebieski).



Rysunek 3. Sensogramy przedstawiające stopniowe wiązanie awidyny na powierzchni Au/tiol/ox-CNOs/biotyna (linia czerwona) oraz Au/tiol/biotyna (linia niebieska).

Znacznie większe przesunięcie kąta SPR obserwuje się w przypadku zastosowania sensora z nanocebulkami. Świadczy to o większej liczbie cząsteczek oznaczanego białka wiązanych przez powierzchnię bioczuwnika z warstwą ox-CNOs niż przez sensor Au/tiol/biotyna.



Rysunek 4. Oznaczanie różnych stężeń dopaminy: 0,5 mM (1); 1 mM (2); 2 mM (3); 3mM (4) i 4mM (5) za pomocą metody DPV na elektrodzie GCE modyfikowanej filmem CNOs/PDDA (1:1) w buforze 0,01 M PBS (a) oraz sporządzona na tej podstawie krzywa kalibracyjna (b).

Ponadto sprawdzono zdolność elektrody modyfikowanej kompozytem CNOs/PDDA do elektrochemicznego oznaczania dopaminy (DA) w obecności kwasów askorbinowego (AA) i moczowego (UA). Ilościowa i jakościowa analiza dopaminy została przeprowadzona z użyciem cyklicznej woltamperometrii (CV), różnicowej pulsowej woltamperometrii (DPV) oraz woltamperometrii fal prostokątnych (SWV) (Rysunek 4). Zaobserwowano, że zależność prądu procesu utlenienia od stężenia DA jest liniowa w całym badanym zakresie, czyli od $5 \cdot 10^{-4}$ do $4 \cdot 10^{-3}$ mol/l ze współczynnikiem korelacji wynoszącym $R^2=0,999$. Teoretyczny limit detekcji wykonanych analiz, przy stosunku S/N=3, wyniósł $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, podczas gdy czułość została ustalona na poziomie $0,0175 \mu\text{A}/(\mu\text{mol/l})$. Otrzymane wyniki wskazują na to, że można z powodzeniem stosować elektrody modyfikowane filmami CNOs/PDDA w elektrochemicznych badaniach ilościowych dopaminy.