



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Chemii

Katedra Chemii Biomedycznej i Polimerów

Kinga Mylkie

**Nanocząstki magnetyczne funkcjonalizowane polisacharydami
zawierającymi ugrupowanie kwasu boronowego do wiązania
alfa-1-kwaśnej glikoproteiny**

Rozprawa doktorska

napisana pod kierunkiem

dr hab. Marty Ziegler-Borowskiej

Toruń 2023

Składam serdeczne podziękowania:

Pani dr hab. Marcie Ziegler-Borowskiej

*za promotorski trud, opiekę
oraz poświęcony czas
i cenne rady naukowe;*

Pani prof. dr hab. Halinie Kaczmarek

*za liczne wskazówki naukowe,
wszechstronną pomoc
i dyskusje na tematy merytoryczne;*

dr Dorocie Chelminiak-Dudkiewicz

*za naukowe rozmowy
oraz nieocenione wsparcie;*

dr n. farm. Dariuszowi T. Młynarczykowi

*z Katedry i Zakładu Technologii
Chemicznej Środków Leczniczych
Wydziału Farmaceutycznego UM
w Poznaniu, za cenne wskazówki i pomoc
techniczną w wykonaniu badań toksyczności;*

Pani prof. UMK dr hab. Annie Ilnickiej

*za wykonanie pomiaru izotermy adsorpcji
azotu;*

a także wszystkim

Pracownikom i Doktorantom

Katedry Chemii Biomedycznej i Polimerów

za miłą i przyjazną atmosferę

Spis treści

Wstęp	13
Część teoretyczna.....	14
1.Budowa i funkcje białek	15
1.1.Podział białek.....	17
1.1.1.Glikoproteiny	19
1.1.2.Podział glikoprotein	20
1.1.3.Funkcje glikoprotein	23
1.1.4.Glikoproteiny w wirusach.....	24
1.1.5. α -1-kwaśna glikoproteina	26
1.1.6.Identyfikacja glikoprotein.....	30
2.Magnetyczne nanocząstki	33
2.1.Metody syntezy magnetycznych nanocząstek	33
2.1.1.Metoda współwytrącania	34
2.1.2.Metoda rozkładu termicznego.....	35
2.1.3.Mikroemulsja	36
2.1.4.Metoda hydrotermalna	36
2.1.5.Metody sonochemiczne	37
2.1.6.Metody elektrochemiczne	37
2.2.Funkcjonalizacja magnetycznych nanocząstek.....	39
2.2.1.Chitozan (Cs)	40
2.2.2.Skrobia (S)	41
2.3.Metody charakteryzowania nanocząstek magnetycznych	42
2.4.Zastosowanie magnetycznych nanocząstek.....	44
3.Magnetyczne nanocząstki modyfikowane kwasami boronowymi do wiązania glikoprotein.....	47
3.1.Magnetyczne nanocząstki pokryte związkami nieorganicznymi modyfikowane kwasami boronowymi	47
3.2.Magnetyczne nanocząstki pokryte polimerami funkcjonalizowanymi kwasami boronowymi	53
4.Cel i zakres pracy.....	59
Część eksperymentalna.....	64
5.Aparatura.....	65
6.Materiały.....	67

7.Wyznaczanie stopnia deacetylacji chitozanu	68
8.Wyznaczanie zawartości amylozy i amylopektyny w skrobi	68
9.Określenie ilości pierwszorzędowych grup aminowych na powierzchni modyfikowanych polimerów	68
10.Określenie zawartości grup aldehydowych na powierzchni modyfikowanych polimerów	69
11.Określenie stopnia podstawienia grupami karboksylowymi na powierzchni modyfikowanych polimerów (DS)	69
12.Modyfikacja chitozanu.....	70
12.1.Chitozan modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzonym wiązaniem iminowym (Cs-4FPBA) (1)	70
12.2.Chitozan modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzonym wiązaniem aminowym (Cs-4FPBA-R) (2).....	71
12.3.Chitozan dialdehydowy (DACs) (3)	71
12.4.Chitozan dialdehydowy modyfikowany kwasem 3-aminofenyloboronowym (DACs-PBA) (4).....	72
12.5.Karboksymetylochitozan (CMCs) (5).....	73
12.6.Karboksylometylochitozan modyfikowany kwasem 3-aminofenyloboronowym (CMCs-PBA) (6).....	74
12.7.Chitozan z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej Cs1 (7).....	74
12.8.Chitozan z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym Cs1-FPBA (8).....	75
12.9.Chitozan z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej Cs2 (9)	76
12.10.Chitozan z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym Cs2-FPBA (10)	77
12.11.Chitozan z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej Cs3 (11).....	77
12.12.Chitozan z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym Cs3-FPBA (12)	78
13.Modyfikacja skrobi	79
13.1.Skrobia dialdehydowa DAS (13)	79
13.2.Skrobia dialdehydowa modyfikowana kwasem 3-aminofenyloboronowym (DAS-PBA) (14).....	79
13.3.Karboksymetyloskrobia (CMS) (15)	80
13.4.Karboksymetyloskrobia modyfikowana kwasem 3-aminofenyloboronowym CMS-PBA (16)	81

14.Synteza nanocząstek magnetycznych	82
14.1.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem Cs-MNPs (17).....	82
14.2.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem modyfikowane kwasem 4- formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania iminowego (Cs-FPBA-MNPs) (18)	82
14.3.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania aminowego (Cs-FPBA-R-MNPs) (19)	83
14.4.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem dialdehydowym DACs-MNPs (20)	84
14.5.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem dialdehydowym modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym DACs-PBA-MNPs (21)	84
14.6.Nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetylochitozanem CMCs-MNPs (22).	85
14.7.Nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetylochitozanem modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym CMCs- PBA-MNPs (23).....	85
14.8.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej (Cs1-MNPs) (24).....	86
14.9.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs1- FPBA-MNPs) (25)	87
14.10.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej Cs2-MNPs (26)	88
14.11.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowane kwasem 4- formylofenyloboronowym (Cs2-FPBA-MNPs) (27).....	89
14.12.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs3-MNPs) (28).....	89
14.13.Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs3-FPBA-MNPs) (28).....	90
14.14.Nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią (S-MNPs) (29).....	91
14.15.Nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią dialdehydową (DAS-MNPs) (30)	91
14.16.Nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią dialdehydową modyfikowane kwasem 3- aminofenyloboronowym (DAS-PBA-MNPs) (31)	92
14.17.Nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetyloskrobią (CMS-MNPs) (32).....	92
14.18.Nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetyloskrobią modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym CMS- PBA-MNPs (33)	93
15.Charakterystyka właściwości fizykochemicznych otrzymanych materiałów.....	94

15.1.Pomiar kąta zwilżania	94
15.2.Określenie porowatości materiałów magnetycznych.....	95
16.Ocena aktywności przeciwbakteryjnej	96
17.Badanie zdolności wiązania glukozy przez otrzymane materiały	97
17.1.Krzywa wzorcowa glukozy w buforze fosforanowym o pH=7,4 (50 mM).....	97
17.1.1.Ilościowe oznaczanie związanej glukozy przez otrzymane materiały w buforze fosforanowym o pH 7,4 (50 mM)	97
17.2.Krzywa wzorcowa glukozy w buforze wodorowęglanowym o pH= 9,0 (50 mM) ...	98
17.2.1.Ilościowe oznaczanie związanej glukozy przez otrzymane materiały w buforze wodorowęglanowym o pH=9,0 (50 mM).....	98
18.Badanie zdolności wiązania glikoproteiny przez otrzymane materiały.....	98
18.1.Krzywa wzorcowa α -1- kwaśnej glikoproteiny w buforze fosforanowym pH 7,4 (50 mM).....	98
18.1.1.Wiązanie α -1-kwaśnej glikoproteiny przez otrzymane materiały w buforze fosforanowym pH 7.4 (50 mM)	99
18.2.Krzywa wzorcowa α -1- kwaśnej glikoproteiny w buforze wodorowęglanowym pH= 9,0 (50 mM)	99
18.2.1.Wiązanie α -1-kwaśnej glikoproteiny przez otrzymane materiały w buforze wodorowęglanowym o pH 9.0 (50 mM).....	99
Wyniki i dyskusja	100
19.Struktura chitozanu i jego pochodnych.....	100
20.Modyfikacja skrobi kukurydzianej	125
21.Badanie kąta zwilżania materiałów	135
22.Charakterystyka nanocząstek magnetycznych pokrywanych modyfikowanymi polisacharydami	140
23.Analiza rentgenograficzna otrzymanych nanocząstek magnetycznych.....	158
24.Określenie porowatości materiałów magnetycznych.....	160
25.Charakterystyka termiczna.....	162
25.1.Charakterystyka termiczna natywnych i modyfikowanych polimerów w atmosferze powietrza	162
25.2. Charakterystyka termiczna natywnych i modyfikowanych polimerów w atmosferze azotu	168
25.3.Charakterystyka termiczna nanocząstek magnetycznych pokrywanych natywnymi i modyfikowanymi polimerami w atmosferze powietrza.....	174
25.4.Charakterystyka termiczna nanocząstek magnetycznych pokrywanych natywnymi i modyfikowanymi polimerami w atmosferze azotu.....	181

26.Badania Microtox.....	187
27.Wstępna ocena zdolności materiałów do wiązania cukrów	190
28.Ocena zdolności materiałów do wiązania glikoproteiny	194
29.Podsumowanie i wnioski	201
30.Streszczenie.....	205
31.Literatura.....	207

Wykaz stosowanych skrótów

Cs – chitozan,

S – skrobia kukurydziana,

DNS - kwas 3,5 dinitrosalicylowy,

AGP - α -1-kwaśna glikoproteina,

Cs-FPBA-R - chitozan modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania aminowego,

Cs-FPBA - chitozan modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania iminowego,

DAC- chitozan dialdehydowy,

DACs-PBA - chitozan dialdehydowy modyfikowany kwasem 3-aminofenyloboronowym,

CMCs – karboksymetylochitozan,

CMCs-PBA - karboksylometylochitozan modyfikowany kwasem 3-aminofenyloboronowym

Cs1 - chitozan z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej,

Cs1-FPBA - chitozan z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym,

Cs2 - chitozan z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej,

Cs2-FPBA - chitozan z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej

modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym,

Cs3 - chitozan z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej,

Cs3-FPBA - chitozan z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym,

DAS - skrobia dialdehydowa,

DAS-PBA - skrobia dialdehydowa modyfikowana kwasem 3-aminofenyloboronowym,

CMS - karboksymetyloskrobia,

CMS-PBA - karboksymetyloskrobia modyfikowana kwasem 3-aminofenyloboronowym

Cs-MNPs - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem,

Cs-FPBA-MNPs - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania iminowego,

Cs-FPBA-R-MNPs - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania aminowego,

- DCs-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem dialdehydowym,
- DACs-PBA-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem dialdehydowym modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym,
- CMCs-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetylochitozanem,
- CMCs-PBA-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetylochitozanem modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym,
- Cs1-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej,
- Cs1-FPBA-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym,
- Cs2-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej,
- Cs2-FPBA-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym,
- Cs3-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej,
- Cs3-FPBA-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym,
- S-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią,
- DAS-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią dialdehydową,
- DAS-PBA-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią dialdehydową modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym,
- CMS-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetyloskrobią,
- CMS-PBA-MNPs** - nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetyloskrobią modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym,
- sulfo-NHS** - N-hydroksysulfosukcynimid,
- EDC** - chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu,
- OVA** - albumina jaja kurzego,
- Trf** - transferyna,
- Lyz** - lizozym,
- Cyt C** - cytochrom c pozyskany z serca konia,

BSA - albumina surowicy bydłęcej,
BHb - hemoglobina bydłęca,
HRP - peroksydaza chrzanowa,
MPS - 3-(metakryloiloxy)propylotrimetoksylosilan,
GLYMO - 3-glicydoksypropylotrimetoksysilan,
DPP - polimeryzacja destylacyjno-precypitacyjna,
PEI – polietylenoimina,
DFFPBA - 2, 4- kwas difluoro-3-formylo-fenyloboronowy,
PBA - kwas 3-aminofenyloboronowy,
TEOS – tetraetoksysilan,
APTES - (3-aminopropylo)trietoksysilan),
DA - stopień deacetylacji,
DS. - stopień podstawienia grupami karboksylowymi,
HILIC - chromatografia cieczowa z interakcjami hydrofilowymi,
Gal – galaktoza,
Glc - glukoza,
Man – mannoza,
NeuAc - kwas *N*-acetyloneuraminowy,
Fuc - fukoza,
GalNA - *N*-acetylogalaktozamina,
GlcNA - *N*-acetyloglukozamina,
Xyl - ksyloza

Wstęp

Głównym problemem w pracy z wolnym białkiem jest trudność jego oddzielenia od supernatantu, co wymaga zastosowania takich technik, jak ultrafiltracja [1], ultrawierowanie [2] i mikrodializa [3]. Metody te jednak są czasochłonne i przede wszystkim ich zastosowanie powoduje jednak pewne straty ilościowe związane z tym, że część białka pomimo wszystko zostaje w roztworze. Rozwiązaniem tego problemu może być unieruchomienie białka na stałym nośniku co w ostatnich latach jest bardzo często stosowane zarówno w analityce jak i samej izolacji białek. Immobilizacja wymaga zastosowania odpowiedniego nośnika, który w połączeniu z białkiem utworzy układ. W literaturze opisanych jest wiele różnych nośników, które można wykorzystać do wiązania białek, spośród których najbardziej obiecujące i efektywne jest zastosowanie nanocząstek magnetycznych [4-7]. Materiałem najczęściej stosowanym w tych aplikacjach są nanocząstki manganu, ze względu na ich sprawdzone i wydajne metody syntezy. Związanie białka na nośniku magnetycznym pozwala na proste i szybkie oddzielenie układu nanocząstka–białko od supernatantu za pomocą przyłożonego magnesu [8].

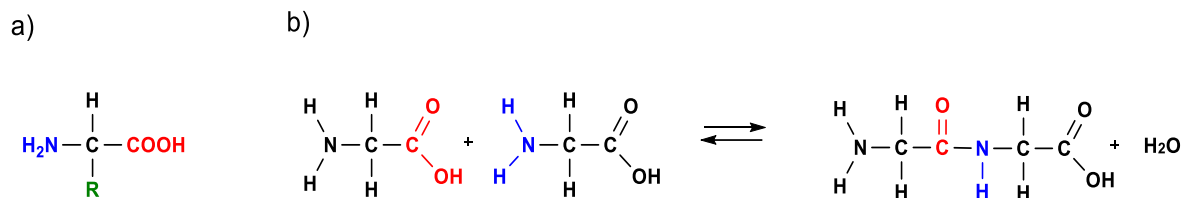
Nośniki białek osocza poszukiwane są nie tylko do celów diagnostycznych i monitorowania przebiegu chorób, ale również do celów badawczych i terapeutycznych. Ponadto, tego typu układy można również stosować w kontrolowanym dostarczaniu środków terapeutycznych, w tym leków dzięki wykorzystaniu ich powinowactwa do określonych białek osocza [9]. Pozwala to na zwiększenie stabilności leku, jego biodostępności oraz ukierunkowaną dystrybucję do określonych tkanek lub komórek. Dodatkowo nośniki można również stosować w badaniu parametrów farmakokinetycznych substancji czynnych takich jak ich stopień wiązania z białkami osocza. Umożliwia to zrozumienie w jaki sposób będą one dystrybuowane, metabolizowane i eliminowane w organizmie a także na ustalenie dawki terapeutycznej. Badanie zachowania białek osocza, ich wiązania lub interakcji z innymi bioligandami jest również ważne dla zrozumienia procesów biologicznych i mechanizmów chorobowych zachodzących w organizmach [10].

Zastosowanie nośników pozwalających na efektywną immobilizację białek osocza umożliwia zatem zarówno stosunkowo łatwe wykorzystanie białek w analizie farmaceutycznej czy biochemicznej ale także na precyzyjne dostarczanie leków i diagnostykę chorób. Poszukiwanie nowych i efektywnych nośników jest zatem ważne dla rozwoju nauk biomedycznych.

Część teoretyczna

1. Budowa i funkcje białek

Białka to związki wielkocząsteczkowe, które występują we wszystkich żywych organizmach (w tym m.in. w wirusach). Składają się z aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi. Wynikiem reakcji grupy karboksylowej jednego aminokwasu z grupą aminową drugiego aminokwasu, powstaje polipeptyd z jednoczesnym wydzieleniem cząsteczki wody [11] (Rysunek 1).



Rysunek 1. a) Wzór ogólny aminokwasu; b) reakcja tworzenia wiązania peptydowego pomiędzy glicyną i alaniną [11].

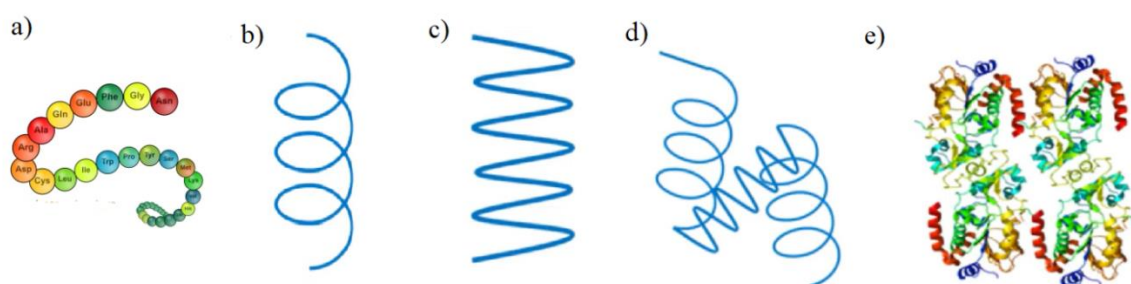
W budowie białek wyróżnia się cztery struktury, z których każda jest odmienna i zależna od występujących oddziaływań między aminokwasami. Pierwszą i najprostszą strukturą jest struktura pierwszorzędowa (I^o). Jest to liniowa sekwencja aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi. Struktura ta jest genetycznie zdeterminowana przez kolejność ułożenia zasad azotowych w genie kodującym dane białko (Rysunek 2a).

W wyniku tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy grupą aminową jednego aminokwasu, a grupą karboksylową drugiego, które znajdują się blisko siebie w łańcuchu polipeptydowym, powstaje struktura drugorzędowa (II^o). Znane są dwa typy struktury drugorzędowej: α -helisa (Rysunek 2b) oraz β -kartka zwana również β -harmonijką (Rysunek 2c). Struktura α -helisy tworzy się w wyniku prawoskrętnego zwinięcia łańcucha polipeptydowego wokół osi, co umożliwia utworzenie wiązań wodorowych pomiędzy grupami C=O oraz N-H, co cztery kolejne aminokwasy [11]. Prowadzi to do ukierunkowania grup bocznych na zewnątrz helisy. Przykładem białka o strukturze α -helisy jest ferrytyna (białko magazynujące żelazo w organizmie) [12]. Kształt β -kartki wynika z ułożenia łańcucha polipeptydowego w płaszczyźnie. Struktura ta występuje m.in. w białkach jedwabiu [11].

Przestrzenne ułożenie względem siebie struktur drugorzędowych tego samego łańcucha polipeptydowego, wywołane wewnątrzcząsteczkowym oddziaływaniem łańcuchów bocznych aminokwasów, określane jest jako struktura trzeciorzędowa (III^o). Końcowa struktura trzeciorzędowa zależy od sekwencji aminokwasów i utrzymuje

się zarówno dzięki obecności wiązań wodorowych i mostków disiarczkowych, jak również dzięki oddziaływaniom hydrofobowym i siłom elektrostatycznym (takim jak: oddziaływanie jonowe i van der Waalsa) (Rysunek 2d) [1].

Najwyższy poziom organizacji białek, obejmujący wiele łańcuchów polipeptydowych i ich trójwymiarowe ułożenie, stanowi struktura czwartorzędowa (IV^o). Struktura ta to wzajemne położenie łańcuchów polipeptydowych oraz ewentualnie struktur niebiałkowych (grup prostetycznych), takich jak np.: cukry w glikoproteinach, lipidy w lipoproteidach, kwasy nukleinowe w nukleoproteidach, barwniki w chromoproteidach, czy reszty kwasu fosforowego w fosfoproteidach (Rysunek 2e).



Rysunek 2. Schematyczne struktury białek: a) pierwszorzędowa (I^o); b) drugorzędowa (II^o) (α -helisa); c) drugorzędowa (II^o) (β -kartka); d) trzeciorzędowa (III^o); e) czwartorzędowa (IV^o) [11].

Jedną z najważniejszych funkcji białek jest funkcja budulcowa. Białka znajdują się we wszystkich tkankach ustrojowych - skórze, włosach, paznokciach, chrząstkach, mięśniach. Dla przykładu, kolagen, czy białko fibrylarne, zapewniają dużą elastyczność mięśni oraz tkanki kostnej, a histony odgrywają kluczową rolę w upakowaniu DNA w chromatynie [13]. Białka pełnią również rolę enzymów, a także funkcję transportowo-magazynującą [11]. Enzymy są bardzo silnymi katalizatorami, które odpowiadają za regulowanie wszystkich etapów metabolizmu w komórce dzięki specyficznym właściwościom [13]. Również przenoszenie małych cząsteczek i jonów oraz ich magazynowanie i wymiana z otoczeniem, zachodzi przy udziale wielu białek. Przykładem takiego białka jest hemoglobina, która uczestniczy w transporcie tlenu w krwinkach czerwonych, czy mioglobina (pokrewne białko), która jest odpowiedzialna za transport tlenu w mięśniach. Białka osocza krwi przenoszą inne, najczęściej hydrofobowe związki, jak np. żelazo, które transportowane jest przez transferynę, natomiast przechowywane w wątrobie w kompleksie z ferrytyną [13]. Ponadto białka pełnią ważną rolę w procesach immunologicznych. Immunoglobuliny to białka o dużej swoistości, które rozpoznają

substancje obce dla ustroju chroniąc organizm przed antygenami obcymi dla danego gatunku oraz czynnikami chorobotwórczymi - bakteriami lub wirusami [13]. Ważną funkcją białek jest również wytwarzanie i przekazywanie impulsów nerwowych. Reakcja komórek receptorowych na specyficzne bodźce przebiega z udziałem białek receptorowych. Przykładem jest białko fotoreceptorowe - rodopsyna, które występuje w komórkach pręcikowych siatkówki. Receptory, podatne na pobudzenie przez małe swoiste cząsteczki (na przykład acetylocholinę), są odpowiedzialne za przenoszenie impulsów w synapsach (czyli połączeniach między komórkami nerwowymi) [13]. Funkcje transkrypcyjne białek polegają na kontroli odpowiedniej kolejności ekspresji informacji genetycznej. W organizmach, wzrost i różnicowanie kontrolują białkowe czynniki wzrostu, np. czynnik wzrostu nerwu kieruje tworzeniem sieci nerwowej [13].

1.1.Podział białek

Białka charakteryzują się szeroką różnorodnością, dlatego można je sklasyfikować na wiele sposobów. Jednym z najczęściej stosowanych podziałów jest klasyfikacja, opierająca się na składzie chemicznym, w której wyróżnia się białka proste oraz złożone. Białka proste, zbudowane wyłącznie z aminokwasów, można podzielić w zależności od ich rozpuszczalności na [1]:

- albuminy – białka obojętne, które występują w płynach takich jak osocze krwi, mleko, płyny tkankowe, oraz w tkankach zwierzęcych i nasionach roślin. Cechują się stosunkowo niewielkimi masami cząsteczkowymi oraz dobrą rozpuszczalnością w wodzie [11],
- protaminy – białka silnie zasadowe, charakteryzujące się dużą zawartością argininy oraz brakiem aminokwasów zawierających siarkę. Są również dobrze rozpuszczalne w wodzie [11],
- globuliny – w ich skład wchodzi wszystkie aminokwasy białkowe, jednak ze znaczącą przewagą kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego; w odróżnieniu od albumin są słabo rozpuszczalne w wodzie, natomiast dobrze w rozcieńczonych roztworach soli [11],
- histony – podobnie jak protaminy, są silnie zasadowe i dobrze rozpuszczalne w wodzie; wchodzi w skład chromatyny. W ich składzie znajduje się duża ilość takich aminokwasów jak lizyna i arginina [14],

- prolaminy – typowe białka roślinne występujące w nasionach. Charakteryzują się dużą zawartością glutaminy i proliny. Są rozpuszczalne w stężonych roztworach wodnych niskocząsteczkowych alkoholi, np. w 60–70% etanolu [14],
- skleroproteiny – białka proste o strukturze włókienkowej, stanowiące podstawowy materiał budulcowy organizmów zwierzęcych, charakteryzujące się dużą zawartością cysteiny i aminokwasów zasadowych oraz kolagenu i elastyny, a także proliny i hydroksyproliny. Są nierozpuszczalne w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli [14].

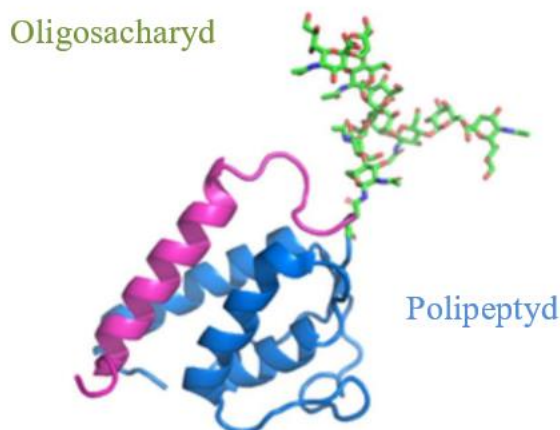
W przeciwieństwie do białek prostych, białka złożone zawierają dodatkowo komponenty niebiałkowe. Do białek złożonych należą:

- chromoproteiny – ich grupa prostetyczna pochłania promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie widzialnym (chromofor), dając w efekcie zabarwienie. Typowymi chromoforami są porfiryny, zawierające atomy metali. Należą tu hemoproteidy (hemoglobina, mioglobina, cytochromy, katalaza, peroksydaza), zawierające układ hemowy oraz flawoproteiny [14],
- fosfoproteiny – grupa białek o charakterze kwasowym, w których grupy hydroksylowe reszt seryny i treoniny są zestryfikowane kwasem fosforowym (przykładem jest kazeina mleka) [83],
- nukleoproteiny – składające się z białek zasadowych i kwasów nukleinowych. Są to między innymi rybonukleoproteiny zlokalizowane przede wszystkim w cytoplazmie, w rybosomach, mikrosomach i mitochondriach [14],
- lipidoproteiny – połączenia białek z tłuszczami prostymi lub złożonymi, które odgrywają ważną rolę w metabolizmie i transporcie lipidów [14],
- metaloproteiny – grupą prostetyczną w tych białkach stanowi atom lub atomy metali, takich jak miedź, wapń, żelazo itp. Metale są związane z częścią białkową wiązaniem kowalencyjnym [14],
- glikoproteiny – są białkami, posiadającymi kowalencyjnie przyłączone łańcuchy cukrowe [14].

Ze względu na cel pracy, w dalszej części szerzej omówiono białka z grupy glikoprotein.

1.1.1. Glikoproteiny

Glikoproteiny, jak wspomniano wyżej, należą do białek złożonych, w których do części białkowej przyłączony jest łańcuch oligosacharydowy (Rysunek 3).

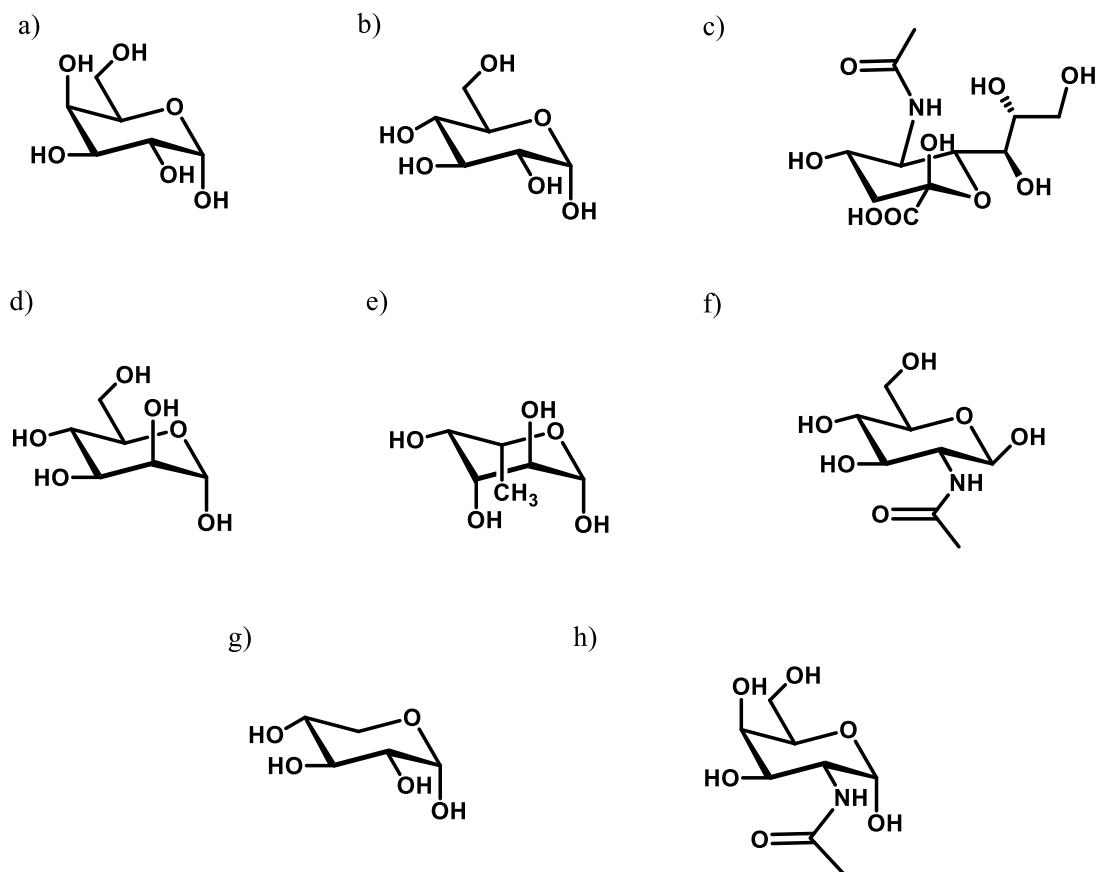


Rysunek 3. Schemat budowy glikoproteiny [14]

Zgodnie z danymi literaturowymi, około 50% wszystkich białek organizmów eukariotycznych zawiera przyłączone węglowodany, zatem glikozylacja, czyli enzymatyczne wbudowanie węglowodanów do białek jest najczęstszą potranslacyjną modyfikacją białek [15,16]. Proces ten zachodzi wewnątrz aparatu Golgiego i retikulum endoplazmatycznego. Dzięki glikozylacji, białka zyskują dodatkowe właściwości, umożliwiające im pełnienie swoich funkcji. Nieprawidłowości w tym procesie powodują ciężkie i często nieuleczalne choroby.

Nieenzymatyczna glikozylacja, zwana glikacją, ma natomiast charakter spontaniczny, a jej nasilenie zależy od zawartości cukrów prostych, w tym glukozy w organizmie. Zjawisko glikacji białek jest znane od ponad 100 lat. W 1912 roku Louis Camille Maillard po raz pierwszy opisał reakcję spontanicznego łączenia się aminokwasów i cukrów prostych, określając ją jako tzw. reakcję brązowienia [16,17].

W budowie łańcucha cukrowego glikoprotein może występować wiele monosacharydów, jednak najczęściej jest to osiem związków, takich jak: galaktoza, glukoza, mannoza, kwas *N*-acetyloneuraminowy, fukoza, *N*-acetylogalaktozamina, *N*-acetyloglukozamina oraz ksyloza (Rysunek 4) [11,13].



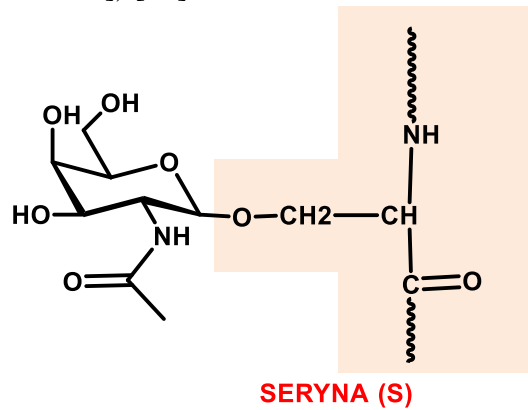
Rysunek 4. Najważniejsze cukry występujące w ludzkich glikoproteinach: a) galaktoza (Gal), b) glukoza (Glc), c) kwas *N*-acetylneuraminowy (NeuAc) d) mannoza (Man), e) fukoza (Fuc), f) *N*-acetyloglukozamina (GlcNAc), g) ksyloza (Xyl), h) *N*-acetylogalaktozamina (GalNAc), [11]

1.1.2. Podział glikoprotein

Ze względu na sposób połączenia reszty cukrowej z białkiem, wyróżnia się trzy klasy glikoprotein. Pierwszą klasę stanowią białka, zawierające wiązanie *O*-glikozydowe (wiązane przez tlen), łączące hydroksylowy koniec łańcucha seryny lub treoniny z takim cukrem, jak *N*-acetylogalaktozamina (GalNAc-Seryna[Treonina]) (Rysunek 5). W ludzkich glikoproteinach rozpoznano przynajmniej cztery podklasy wiązania *O*-glikozydowego [18]:

- Dominujące wiązanie GalNAc-Seryna (Treonina). Najczęściej reszta Gal lub NeuAc jest przyłączona do GalNAc, ale stwierdza się dużą zmienność składu i długości łańcuchów oligosacharydowych. Ten typ wiązania występuje w mucynach [19].

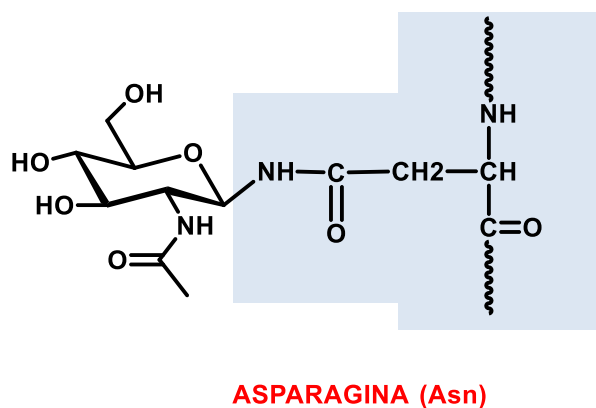
- Proteoglikany, zawierające trisacharyd Gal-Gal-Xyl-Seryna (tzw. wiążący trisacharyd) [20].
- Kolageny zawierające wiązanie Gal-hydroksylizyna (Hyl) [21].
- Wiele białek jądrowych i białek cytozolowych zawiera boczne łańcuchy zbudowane z pojedynczego GlcNAc, przyłączonego do reszty seryny lub treoniny (GlcNAc Seryna[Treonina]) [22].



Rysunek 5. O-wiązanie (*N*-acetylogalaktozamina z seryną)

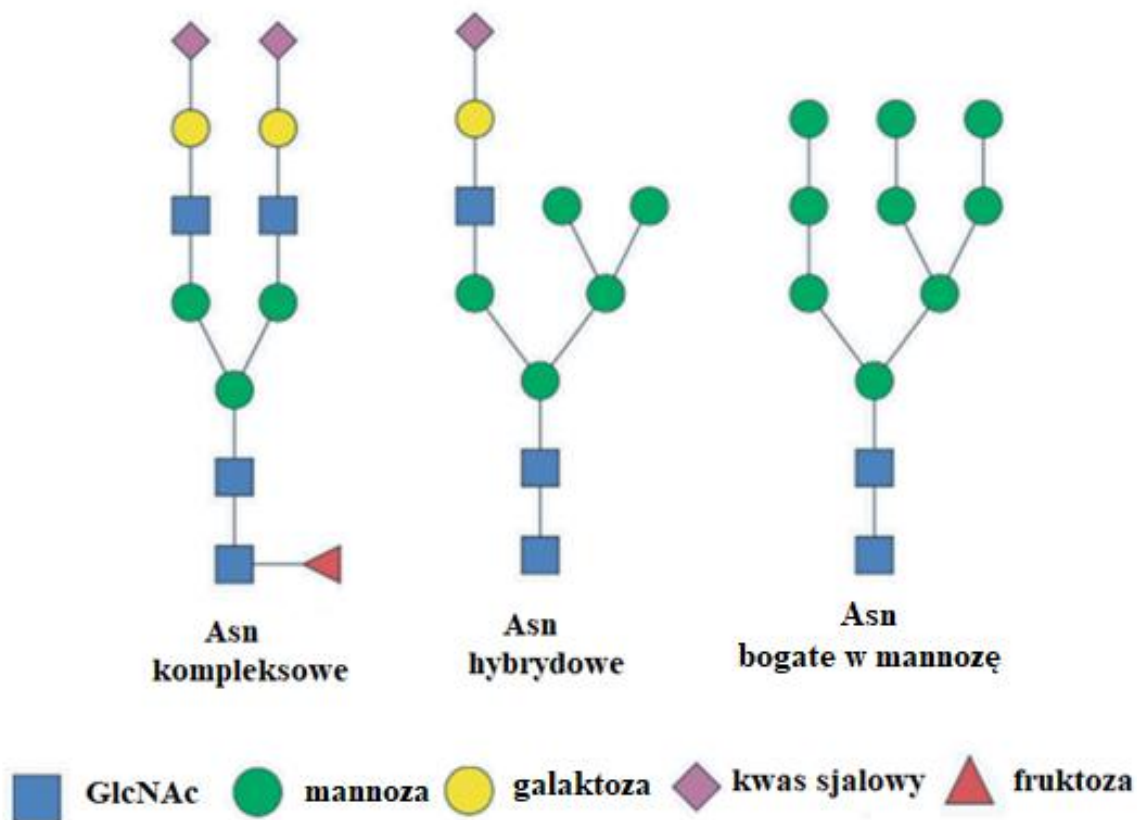
Glikoproteinami, które zawierają dużą ilość wiązań *O*-glikozydowych, są mucyny, znajdujące się w wydzielinach przewodu pokarmowego, dróg oddechowych i dróg rodnych oraz w błonach wielu komórek [11].

Drugą klasę stanowią białka zawierające wiązanie *N*-glikozydowe (wiązanie przez azot), łączące azot amidowy asparagianu i *N*-acetyloglukozaminę (GlcNAc-Asn) (Rysunek 6).



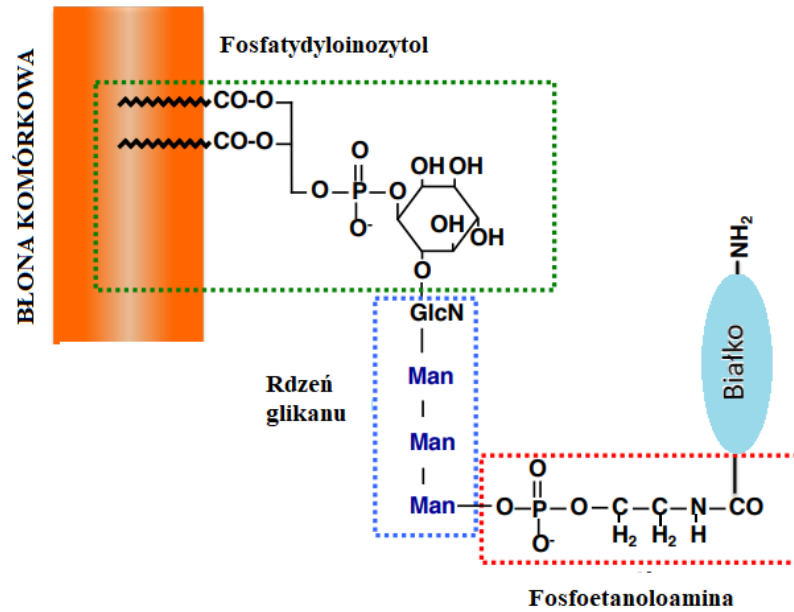
Rysunek 6. *N*-wiązanie (*N*-acetyloglukozoamina z asparaginą)

N-glikany dołączone są do atomu azotu grupy amidowej Asparaginy (Asn), zlokalizowanej w określonej sekwencji Asparagina-X-Seryna/Treonina polipeptydu (X jest dowolnym aminokwasem z wyjątkiem proliny), podczas gdy *O*-glikany związane są przez resztę *N*-acetylogalaktozaminy lub *N*-acetyloglukozoaminy z grupą hydroksylową głównie seryny lub treoniny oraz rzadziej tyrozyny albo histydyny [23,24]. Znane są trzy główne typy *N*-wiązanych glikoprotein: złożone (kompleksowe), hybrydowe oraz glikoproteiny bogate w mannozę. Elementem wspólnym tych klas jest pentasacharyd Man₃GlcNAc₂, przyłączony do asparaginianu, natomiast różnicą jest rodzaj zewnętrznego rozgałęzienia (Rysunek 7) [25–27].



Rysunek 7. Budowa głównych typów oligosacharydów zawierających asparaginę [28]

Trzecia klasa to białka łączące grupę karboksylową końcowego aminokwasu przez fosforyloetanolaminę z oligosacharydem (glikanem) łącznikowym, który z kolei jest przyłączony przez glukozoaminę (GlcN) do fosfatydyloinozytolu (PI). Klasa ta jest określana jako glikoproteiny zakotwiczone w glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI-zakotwiczone) (Rysunek 8) [11,29].



Rysunek 8. Schemat struktury białka zakotwiczonego w glikozylofosfatidyloinozycie (GPI-AP) [30]

1.1.3. Funkcje glikoprotein

Jak już wcześniej wspomniano, glikoproteiny są białkami powszechnie występującymi i pełniącymi różne funkcje. W Tabeli 1 zestawiono przykładowe glikoproteiny oraz funkcje jakie pełnią w organizmach żywych.

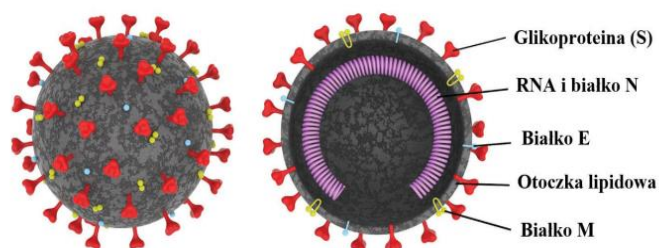
Tabela 1. Przykłady glikoprotein oraz pełnione przez nie funkcje [11]

Glikoproteina	Funkcja
Mucyna	Składnik śliny (nadający jej lepkość) i żółci, występujący również w żołądku oraz jelicie, gdzie chroni ich błony śluzowe przed działaniem enzymów trawiennych
Transferyna	Regulująca stężenie jonów żelaza w osoczu krwi i transportująca je do tkanek
Ceruloplazmina	Odpowiedzialna za transport jonów miedzi w organizmie człowieka
Gonadotropina kosmówkowa	Hormon odgrywający istotną rolę we wczesnej ciąży, stymulujący ciało żółte
Tyreotropina	Hormon, który pobudza tarczycę do produkcji tyroksyny i trijodotryroniny
Fosfotaza alkaliczna	Enzym, który usuwa grupy fosforanowe z różnych związków chemicznych
Lektyny	W roślinach pełnią funkcje magazynowania cukrów oraz funkcje ochronne
Tropokolagen	Prekursor dojrzałego kolagenu
α -1-kwaśna glikoproteina	Wiązanie i transport leków
Immunoglobuliny	Funkcja odpornościowa
Białko Notch	Bierze udział w kontroli proliferacji i różnicowania komórek, a także regulacji funkcji komórek krwiotwórczych

1.1.4. Glikoproteiny w wirusach

Wiele wirusów zawiera glikoproteiny, które często odgrywają kluczową rolę w przyłączaniu się wirusa do komórek [11]. Wirusy, pomimo swojej stosunkowo prostej budowy, wykształciły wiele mechanizmów, ułatwiających im wykorzystanie struktur komórek gospodarza. Aby wywołać infekcję, wirus musi wprowadzić swój genom do wnętrza komórki żywiciela. W procesie rozpoznawania receptorów komórkowych i nikielania wirusa do komórek gospodarza niezbędne są białka powierzchniowe, inaczej zwane glikoproteinami otoczkowymi [31,32].

Części cukrowe (glikany) glikoprotein otoczki są głównymi składnikami najbardziej zewnętrznej powierzchni wirusów. Na interakcję patogenów wirusowych z ich gospodarzami wpływa struktura glikanów oraz wiążące je receptory [33]. Konformacja glikoprotein powierzchniowych odpowiada strukturze receptorów komórek gospodarza, a zatem duża zmienność sekwencji aminokwasowej białek powierzchniowych wynika z różnorodności wykorzystywanych receptorów. Glikoproteiny otoczkowe mają silne właściwości immunogenne. Odgrywają kluczową rolę w procesie wywoływania infekcji przez wirusy m.in. z grupy *Coronavirinae*, takie jak: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-SARS i HCoV-MERS (Rysunek 9), czyli patogeny wywołujące groźne choroby, przeciwko którym obecnie nie ma skutecznej broni w postaci substancji czynnej zdolnej do ich dezaktywacji oraz zapobiegania namnażaniu i transmisji. Glikoproteiny wchodzą również w skład wirusa HIV, Eboli, zapalenia wątroby typu C (HCV), Borna, wścieklizny, Epsteina-Barra i wielu innych, powodujących obecnie poważne i nieuleczalne choroby [33–35]. W Tabeli 2 zebrano rodzaje glikoprotein obecnych w wirusach.



Rysunek 9. Schemat budowy wirionu koronawirusa na przykładzie SARS-CoV-2 [36]

Tabela 2. Glikoproteiny obecne w wirusach i ich skutki dla zdrowia człowieka wg danych Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) [35]

Wirus	Glikoproteina	Skutki
Wirus grypy	Hemaglutynina; neuramiunidaza	Według WHO, co roku na grypę i zakażenia wirusami grypopodobnymi choruje od 330 mln do 1,575 mld ludzi, 3-5 mln osób cierpi z powodu jej ostrych objawów, umiera od 500 tys. do miliona osób
SARS-CoV-2	Spike(S) glikoproteina	Według danych WHO z dnia 22 listopada 2022r. na całym świecie potwierdzono ponad 636 milionów zgłoszonych przypadków, w tym ponad 6 milionów zgonów
Wirus zapalenia wątroby typu C	E1 i E2	130 do 150 milionów ludzi zakażonych na całym świecie
HIV	gp120, gp160, gp41	35 milionów na całym świecie do 2013 r.
Wirus Eboli	Spike Białko Gp1-Gp2	do 28 czerwca 2015 r. łącznie 27 550 potwierdzonych przypadków
Wirus dengi	E (dimer)	Wirus dengi zaraża rocznie 50-100 milionów osób na świecie
Wirus Chikungunya	E1 i E2	W 2005 roku było około 1,9 miliona zgłoszonych przypadków nad Oceanem Indyjskim

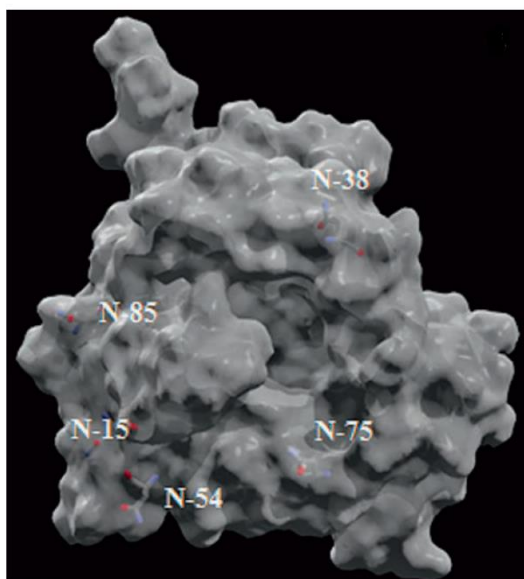
1.1.5. α -1-kwaśna glikoproteina

α -1-kwaśna glikoproteina (AGP, ORM), zwana także orosomukoidem, zaliczana jest do dodatnich białek ostrej fazy. Stan zapalny w organizmie powoduje wzrost stężenia tego białka i stanowi najwcześniejszą linię obrony organizmu wobec zaburzenia homeostazy [37]. AGP jest głównie biosyntetyzowana w wątrobie (10 mg/kg/dzień) i wydzielana do układu krążenia [38,39], a jej stężenie w surowicy zdrowego dorosłego człowieka wynosi 0,55–1,40 g/L [40]. W wielu przypadkach stężenie to jest wyższe

u mężczyzn niż u kobiet, jak również zwiększa się wraz z wiekiem. W stanach patologicznych stężenie AGP zwiększa się o co najmniej o 25% [37].

Biologiczna rola AGP nie jest w pełni poznana, chociaż opisano jej liczne działania, takie jak hamowanie aktywności enzymów lizosomalnych, rola inhibitora enzymów proteolitycznych, udział w procesie krzepnięcia krwi poprzez hamowanie lub nasilenie agregacji płytek krwi oraz wiązanie i neutralizowanie patogenów [41]. Równie istotną rolą AGP jest wiązanie i transport substancji pochodzenia endogennego i leków, głównie o charakterze zasadowym i obojętnym, takich jak: metadon, dyzopiramid, amitriptylinum, czy lidokaina [40].

Cząsteczka AGP jest glikokonjugatem, zawierającym pojedynczy łańcuch polipeptydowy złożony z 183 aminokwasów (rdzeń białkowy) i 5 rozgałęzionych łańcuchów glikanowych (część cukrowa), związanych kowalencyjnie wiązaniem *N*-glikozydowym z resztami asparaginyłowymi (Asp(N)-15, -38, -54, -75, -85) (Rysunek 10) łańcucha polipeptydowego. Białko to zawiera 59% reszt peptydowych i 41% węglowodanów (z czego około 12% to kwasy sialowe) [41].

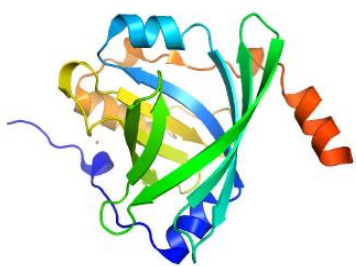


Rysunek 10. Powierzchnia AGP z zaznaczonymi pięcioma resztami asparaginyłowymi (N), które przez wiązania *N*-glikozydowe łączą się z grupami polisacharydowymi [37]

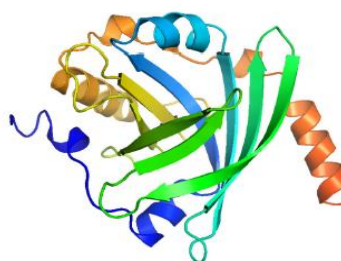
Analiza natywnego AGP wyizolowanego z surowicy krwi wykazała, że ta glikoproteina nie jest białkiem homogenicznym, ponieważ wykazuje polimorfizm genetyczny w rdzeniu białkowym i mikroheterogeniczność części cukrowej [42,43]. Genetyczny polimorfizm AGP (ORM) tłumaczony jest obecnością trzech różnych genów

kodujących to białko: genu AGP–A, –B i –B` [44]. Wariant ORM1AGP (ORM1 F1, ORM1 F2 i ORM1 kodowany jest przez trzy allele genu AGP–A) (Rysunek 11 a), natomiast wariant ORM2 (ORM2 A) kodowany jest przez geny AGP–B/B`(Rysunek 11 b). Różnice pomiędzy wariantami ORM1 A i ORM1 F oraz ORM1 S wynikają z różnic w sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym [37]. W ogólnej populacji obserwowane są najczęściej trzy główne fenotypy AGP, ORM1 F*S/ORM2 A, ORM1 F/ORM2 A i ORM1 S/ORM2 A. Warianty ORM1 F1 i ORM1 S występują na całym świecie, natomiast wariant ORM1 F2 jest wspólny dla całej populacji Europejskiej [37]. Wszystkie inne warianty AGP stanowią mniej niż 1% [45]. Różnice w strukturze I-rzędowej ORM1 F*S w stosunku do ORM2 A nie mają wpływu na II- i III- rzędową strukturę białka. β -harmonijka, α -helisa i β -nici są elementami II-rzędowej struktury AGP, przy czym β -harmonijka jest elementem dominującym i stanowi około 40% wszystkich elementów [37,46].

a)

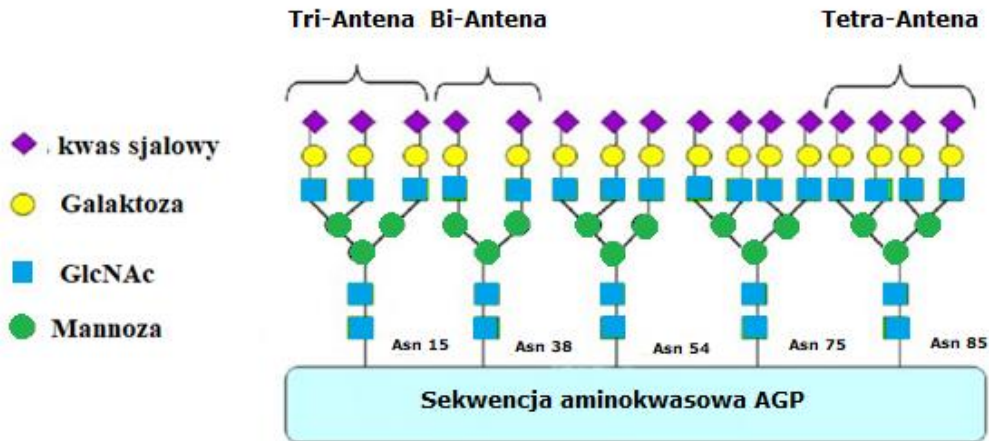


b)



Rysunek 11. Struktury ludzkich wariantów AGP a) F1*S i b) A przy rozdzielczości odpowiednio 1,8 Å i 2,1 Å [47]

Miejsca *N*-glikozylacji AGP (Asn-15, -38, -54, -75, -85) mogą łączyć dowolny glikan, pokazany na Rysunku 12 odpowiadający różnym stopniom rozgałęzienia (bi, tri- i czteroantenny) (Rysunek 12) [48].



Rysunek 12. Schemat ilustrujący strukturę AGP [47]

AGP zawiera identyczny rdzeń pentasacharydowy $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (2 cząsteczki *N*-acetyloglukozaminy, GlcNAc i 3 cząsteczki mannozy, Man), od którego odchodzą dwa, trzy lub cztery łańcuchy boczne (GalGlcNAc) zwane antenami, zawierające jedną cząsteczkę GlcNAc i jedną cząsteczkę galaktozy. Pozycję końcową zajmuje przyłączony do galaktozy kwas sjałowy (kwas *N*-acetyloneuraminowy) oraz fukoza przyłączona do GlcNAc. Około 30% kontrolnej ludzkiej surowicy nie zawiera fukozy związanej z łańcuchem bocznym. Natomiast wysoki stopień fukozytacji związany jest z niskim stężeniem lub całkowitą nieobecnością di-antenowych glikanów, jak również z wysokim stężeniem glikanów tri/lub tetra-antenowych. Te glikany są strukturalnie niejednorodne, ze względu na dużą różnorodność cukrów końcowych. Jak pokazano na Rysunku 12, kwas sjałowy jest jednym z typowych cukrów końcowych [5]. Teoretycznie możliwe jest powstanie ponad 10^5 glikoform AGP wynikających z różnych kombinacji w budowie glikanów przy pięciu miejscach glikozylacji, jednak w normalnej ludzkiej surowicy wykrywane jest tylko do 20 glikoform AGP.

Ta mikroheterogeniczność AGP ściśle zależy od aktualnego stanu organizmu. Według danych literaturowych glikozylacja AGP zmienia się w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych [49–51]. Na przykład, we wczesnym etapie reakcji ostrej fazy występuje znaczny wzrost dwuantenowych glikoform, jak również wzrost stopnia 3-fukozytacji. Zauważono również, że u pacjentów z nowotworami (chłoniak, guz jajnika itp.) AGP charakteryzuje się zwiększoną sjałilacją i fukozylacją oraz różnymi względnymi proporcjami całkowitych ilości sekwencji dwu-, trój- i czteroantenowych [52]. Ponadto, wiadomo, że inne stany patologiczne, takie jak przewlekłe stany zapalne, reumatoidalne

zapalenie stawów, alkoholowa marskość wątroby, czy posocznica, powodują zmiany w glikozylacji AGP [53].

W literaturze przedmiotu brak jest danych dotyczących wpływu glikozylacji AGP na pełnione przez nią funkcje biologiczne. Jednak wiadomo, że obecność glikanów wpływa na stabilność konformacyjną i potranslacyjną modyfikację procesu fałdowania glikoprotein, które obejmują glikoproteinę 123 typu HIV-1, kwercetynę 2, 3-dioksygenazę, α 1-antytrypsynę i białko prionowe [54-56]. Dlatego wysoce prawdopodobne jest, że zmiany w glikozylacji AGP, które występują w różnych stanach patologicznych, mogą służyć albo do ochrony białka AGP przed stresem egzogennym, albo do ułatwiania różnych zdarzeń immunomodulujących lub przeciwzapalnych.

1.1.6. Identyfikacja glikoprotein

Glikoproteiny, jak już wcześniej wspomniano, odgrywają niezwykle ważną rolę w różnych procesach biologicznych. Ponadto, występowanie wielu chorób związane jest ze stanem glikozylacji pokrewnych białek, a tym samym wiele z nich jest wykorzystanych jako swoiste biomarkery chorób.

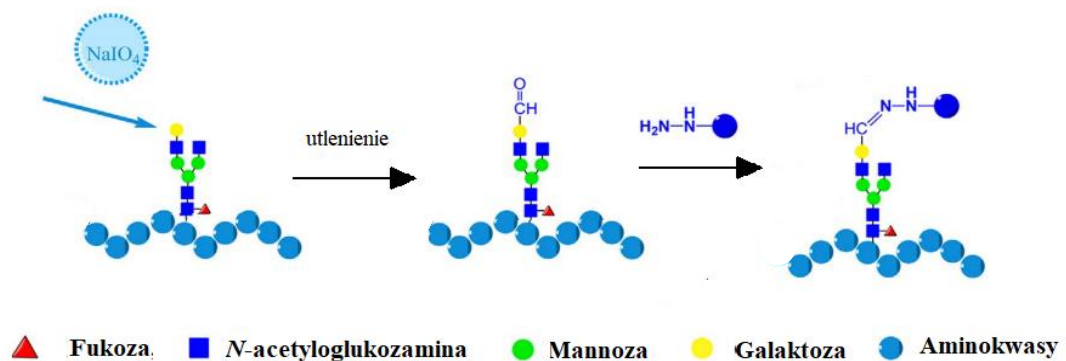
Identyfikacja glikoprotein o zróżnicowanej strukturze, ma ogromne znaczenie naukowe, szczególnie w dziedzinie zastosowań klinicznych. Jednak ze względu na stosunkowo dużą złożoność biologiczną matrycy i zakłócenia pochodzące od białek nieglikolowanych, glikoproteiny są zwykle trudne do bezpośredniego wykrycia i zidentyfikowania.

Glikoproteiny można powszechnie wychwytywać na różne sposoby. Do najpopularniejszych metod należą chromatografia powinowactwa do lektyny [57,58], chemia hydrazydów [59,60] oraz chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC) [61–63]. Alternatywną metodą jest technika oparta na ligandach kwasu boronowego, która zyskuje coraz większą popularność, ze względu na możliwość tworzenia przez ten kwas wiązania kowalencyjnego z biomolekułami zawierającymi w swojej strukturze cukry [64].

Wzbogacenie metodą chromatografii powinowactwa do lektyny zostało wykorzystane do analizy glikoproteomicznej płuc, piersi oraz raka wątroby. Lektyny to białka, które specyficznie wiążą glikany. Podczas wzbogacania, lektyny wiążą różne glikopeptydy poprzez wiązania wodorowe i interakcje hydrofilowe z jednostkami sacharydowymi. Chromatografia powinowactwa do lektyn selektywnie wzbogaca jeden typ struktury glikanu. Na przykład, konkanawalina A (Con A) selektywnie wiąże glikany, które posiadają jednostki sacharydowe i mannozowe. Kolejna lektyna *Sambucus Nigra*

Agglutinin (SNA) będzie wiązać jednostki kwasu *N*-acetylo-neuraminowego (NeuAc; kwas sialowy), a lektyna *Aleuria Aurantia* (AAL) będzie wiązać jednostki fukozy. Główną wadą tej metody jest to, że z dowolnej pojedynczej lektyny można wychwycić tylko jeden glikopeptyd z określoną jednostką sacharydową [65].

Wzbogacanie chemiczne hydrazydem również stosuje się do oczyszczania glikoprotein. W tej technice ugrupowania glikanów na glikopeptydach są najpierw utleniane z wytworzeniem aldehydów. Glikany są następnie kowalencyjnie unieruchamiane na stałym nośniku hydrazydowym (Rysunek 13). Po trawieniu trypsyną nieglikozylowane peptydy są wypłukiwane, podczas gdy glikopeptydy są zatrzymywane. Główną wadą wzbogacania w hydrazyd jest to, że dostarcza jedynie informacji specyficznych dla danego miejsca i nie pozwala na określenie struktury glikanu, ze względu na utleniające sprzężenie chemiczne między glikanem a stałym nośnikiem hydrazydu. Wzbogacenie w hydrazyd zostało wykorzystane m.in. do identyfikacji odmian glikoprotein w raku wątroby [66,67].

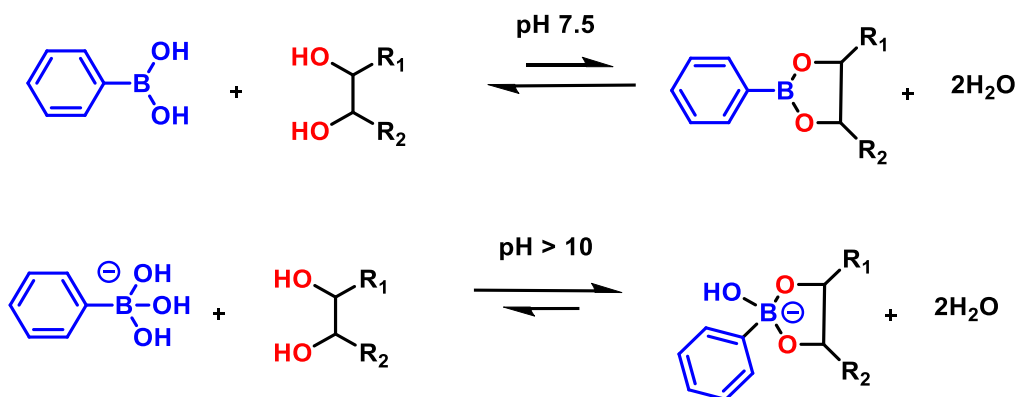


Rysunek 13. Wzbogacenie glikoprotein za pomocą reakcji z hydrazydem [66]

Chromatografia cieczowa z interakcjami hydrofilowymi (HILIC) to technika, która zyskała na popularności w ciągu ostatnich kilku lat. Technika ta opiera się na hydrofilowym oddziaływaniu między celulozą fazy stacjonarnej a grupami hydroksylowymi glikoprotein. Przemycanie peptydem zachodzi w rozpuszczalniku organicznym, po czym następuje elucja glikopeptydu w środowisku wodnym w odpowiednim buforze. Technika HILIC jest korzystna ze względu na wystarczające usunięcie konkurujących peptydów z próbki biologicznej [68].

Zastosowanie kwasu boronowego to inny rodzaj techniki rozdziału z utworzeniem wiązania kowalencyjnego, który w ostatnim czasie zyskał na popularności w procesach wzbogacania glikopeptydów. W metodzie tej kwas boronowy służy do wychwytywania ugrupowania 1,2- i 1,3-diolowego glikopeptydów poprzez tworzenie wiązania kowalencyjnego i cyklicznego estru kwasu boronowego [69,70].

Ugrupowania związane niekowalencyjnie są następnie wypłukiwane, a glikopeptydy można dalej analizować. Zaletą tej techniki jest możliwość odwrócenia reakcji poprzez zmianę pH, w celu uwolnienia glikopeptydu. Tworzenie estrów boronowych jest preferowane w środowisku alkalicznym, natomiast w mniejszym stopniu zachodzi przy pH fizjologicznym, czyli obojętnym, a w środowisku kwaśnym estry te nie powstają (ulegają całkowitemu rozkładowi) (Rysunek 14) [71,72].



Rysunek 14. Reakcja diolu z kwasem fenyloborowym przy różnych wartościach pH [70]

Ze względu na szybkość i selektywność tej reakcji, kwasy boronowe znalazły zastosowanie w konstrukcji systemów detekcji biologicznie istotnych cząsteczek o charakterze dioli i innych związków zawierających grupy hydroksylowe. [72]. Odpowiednio sfunkcjonalizowane kwasy boronowe są coraz częściej wykorzystywane do budowy chipów diagnostycznych lub testów kolorymetrycznych, które umożliwiają łatwe monitorowanie poziomu glukozy u osób chorujących na cukrzycę. Dzięki swojej zdolności do tworzenia kompleksów z grupami diolowymi, kwasy boronowe mogą być wykorzystywane do wykrywania i monitorowania różnych związków biologicznie czynnych, takich jak cukry, katecholaminy, glikoproteiny i wiele innych [73].

Funkcjonalizowane kwasem boronowym materiały, takie jak: monolity, mezoporowata krzemionka, i nanocząstki magnetyczne zostały opracowane w celu selektywnego wiązania glikoprotein. Szczególnie dużą popularność zyskały magnetyczne

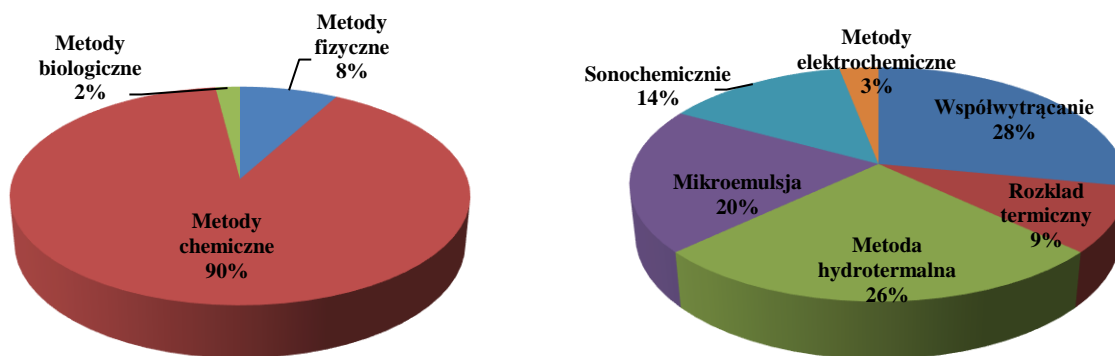
nanocząstki modyfikowane kwasem boronowym, ponieważ umożliwiają prosty i szybki sposób wychwytu glikoprotein z matrycy dzięki zastosowaniu zewnętrznego pola magnetycznego [64,69,74–77].

2. Magnetyczne nanocząstki

2.1. Metody syntezy magnetycznych nanocząstek

Od dekady obserwuje się szybki rozwój technik otrzymywania i stosowania nanocząstek magnetycznych zbudowanych z tlenku żelaza (II i III). Tlenki te mogą występować w postaci $\text{Fe}_3\text{O}_4 = \text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$ (magnetytu), $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematytu), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (magnemitu) i FeO [78,79]. Spośród nich najczęściej wykorzystywany jest magnetyt, ze względu na jego sprawdzone i efektywne metody syntezy, niską toksyczność i dobrą biokompatybilność [80,81]. Pierwsze próby otrzymywania nanocząstek magnetycznych zostały przeprowadzone pod koniec lat sześćdziesiątych XX wieku, kiedy to Papell zmielił mikroproszki magnetytowe w młynie kulowym. Długotrwałe mielenie magnetytu w obecności rozpuszczalników oraz środków powierzchniowo czynnych doprowadziło do stworzenia pierwszego nanomateriału o właściwościach ferromagnetycznych [79,82,83].

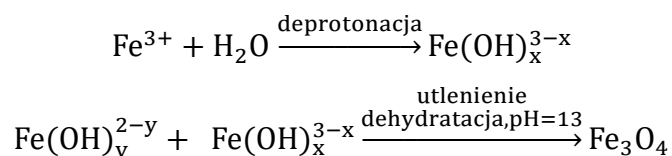
W ostatnich latach opracowano wiele technik syntezy, pozwalających na uzyskanie nanocząstek o ściśle zaplanowanych właściwościach. W literaturze opisane są trzy najczęściej wykorzystywane metody otrzymywania magnetycznych nanocząstek: metody chemiczne, fizyczne i biologiczne (Rysunek 15a). Do najczęściej stosowanych metod zalicza się metody chemiczne, takie jak: współwytrącanie, metody hydrotermalne, rozkład termiczny, mikroemulsję, metody sonochemiczne oraz metody elektrochemiczne (Rysunek 15b) [84,85]. Główną ich zaletą jest stosunkowo łatwa kontrola wielkości otrzymywanych cząstek [79,86].



Rysunek 15. a) Procentowy udział metod biologicznych, chemicznych i fizycznych w syntezie nanocząstek magnetycznych; b) procentowy podział metod chemicznych otrzymywania nanocząstek magnetycznych [87]

2.1.1. Metoda współwytrącania

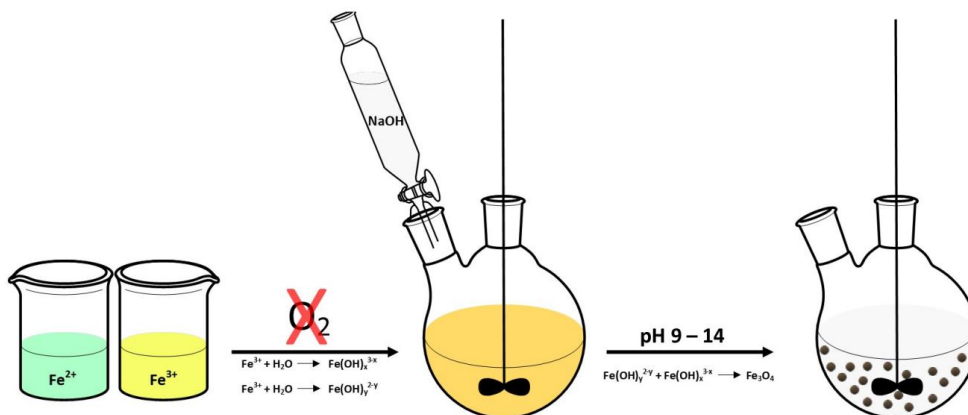
Metoda współwytrącania jest najpopularniejszą formą syntezy magnetycznych nanocząstek. Jest szeroko stosowana w aplikacjach biomedycznych ze względu na nietoksyczny charakter wykorzystywanych substratów. W procedurze tej stosuje się reakcję powstawania magnetytu w środowisku zasadowym. Reakcje otrzymywania magnetytu z roztworów alkalicznych soli żelaza (II) i (III) przedstawiono na Rysunkach 16 i 17.



Sumaryczna reakcja:



Rysunek 16. Schemat mechanizmu powstawania nanocząstek magnetytu z wodnej mieszaniny jonów żelaza (II) i jonów żelaza (III) w wyniku alkalizacji [88]



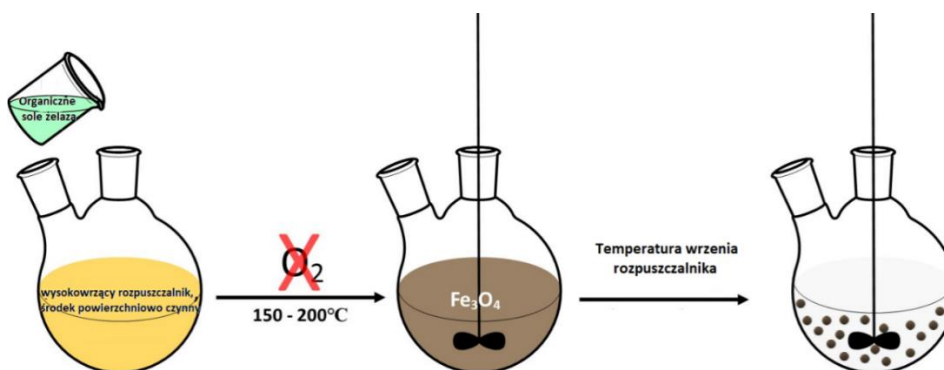
Rysunek 17. Synteza nanocząstek tlenku żelaza metodą współwytrącania [87]

Wymagane jest tu zapewnienie beztlenowych warunków reakcji, zapobiegających przemianie magnetytu w tlenek żelaza (III), a następnie w wodorotlenek żelaza (III). W celu uniknięcia utlenienia magnetytu, podczas syntezy nanocząstek wprowadza się różnego rodzaju stabilizatory, które zabezpieczają nanocząstki przed dostępem tlenu. Fazę magnetyczną i wielkość cząstek można regulować zmieniając stosunek jonów $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, temperaturę, pH oraz rodzaj użytej zasady [89]. Co więcej, podczas procesu współwytrącania, magnetyczne nanocząstki są zwykle powlekanie cząsteczkami organicznymi lub nieorganicznymi, m.in. takimi jak detergenty, białka i polimery [90].

2.1.2. Metoda rozkładu termicznego

Metoda rozkładu termicznego opiera się na dekompozycji prekursorów metali (np. acetyloacetonianów, karbonyli lub oleinianów) w temperaturach $150-300^\circ\text{C}$ i w obecności rozpuszczalników organicznych o wysokiej temperaturze wrzenia ($250-300^\circ\text{C}$), takich jak eter benzyłowy [91]. Do kontrolowania wielkości i kształtu nanocząstek oraz zapobiegania ich agregacji konieczna jest obecność dyspergatorów i hydrofobowych ligandów (Rysunek 18) [92]. W metodzie tej, początkowo rozpuszczalnik zawierający metaloorganiczne prekursory, środki powierzchniowo czynne i środki stabilizujące, ogrzewany jest ze stałą szybkością, aby osiągnąć temperaturę zarodkowania lub rozkładu prekursora. Następnie roztwór jest podgrzewany do temperatury wrzenia rozpuszczalnika (dlatego zwykle stosuje się rozpuszczalniki o wysokiej temperaturze wrzenia), co prowadzi do powstania nanokryształów. Ostatni etap obejmuje utrzymanie roztworu w temperaturze wrzenia przez określony czas (faza wzrostu), a następnie jego schładzanie do temperatury pokojowej [88]. Nanocząstki wytworzone tą metodą charakteryzują się powtarzalnością rozmiaru i kształtu

oraz monodispersyjnością. Pomimo ogromnych zalet, metoda ta wymaga długich etapów oczyszczania nanocząstek, zanim będą mogły być wykorzystane do zastosowań biomedycznych [93].



Rysunek 18. Synteza nanocząstek magnetytu metodą rozkładu termicznego [87]

2.1.3. Mikroemulsja

W metodzie mikroemulsji przygotowuje się stabilną dyspersję dwóch niemieszających się rozpuszczalników (woda/olej) stabilizowanych środkiem powierzchniowo czynnym (np. siarczanem dodecylu) [93]. W tym przypadku, faza wodna jest rozproszona w postaci nanokropelek zawierających w swoim wnętrzu prekursory magnetycznych nanocząstek, które są otoczone cząsteczkami środka powierzchniowo czynnego, tworząc micelle. W tych strukturach zachodzi synteza magnetycznych nanocząstek. Micelle warunkują stabilizację, która ogranicza zarodkowanie, wzrost i aglomerację cząstek [94]. Następnie do roztworu dodaje się drugą emulsję lub zasadę, aby wytworzyć osad. Dodatek ten powoduje zderzenie, pęknięcie i koalescencję miceli, sprzyjając tworzeniu się w ich wnętrzu nanokryształów. W końcowym etapie, dodając rozpuszczalnik organiczny, nanocząstki można ekstrahować. W ten sposób uzyskuje się nanocząstki magnetyczne w całym zakresie rozmiarów nanomateriałów (od 1 nm do 100 nm). Zaletą stosowania metody mikroemulsji jest to, że można uzyskać precyzyjną kontrolę nad wielkością, kształtem i składem nanocząstek. Właściwości nanocząstek przygotowanych metodą mikroemulsji zależą od rodzaju i struktury zastosowanego środka powierzchniowo czynnego [95,96].

2.1.4. Metoda hydrotermalna

W tej metodzie system złożony jest ze stałego linoleinianu metalu, fazy ciekłej kwasu etanolowo-linolowego i roztworu wodno-etanolowego, utrzymywanego w wysokiej temperaturze i pod wysokim ciśnieniem (warunki hydrotermalne). Typowa temperatura

reakcji do przeprowadzenia syntezy hydrotermalnej wynosi około 220°C, podczas gdy wymagane ciśnienie sięga powyżej 13,79 MPa, przy czym całkowity czas reakcji to około 72 godziny [97,98]. Reakcje hydrotermalne przeprowadzane są przy użyciu autoklawów lub reaktorów wysokociśnieniowych. Głównymi wadami tej metody jest brak syntezy cząstek mniejszych niż 10 nm, a w wysokich temperaturach reakcja zachodzi z niedużą szybkością. Istnieją jednak pewne godne uwagi zalety metody hydrotermalnej w porównaniu z innymi, na przykład większa kontrola nad rozmiarem, kształtem i dyspersją nanocząstek [99].

2.1.5. Metody sonochemiczne

Metoda sonochemiczna jest szeroko stosowana jako alternatywa w syntezie nowych nanomateriałów o ciekawych właściwościach. Działanie ultradźwięków powoduje kawitację akustyczną, która obejmuje tworzenie, wzrost i implozje pęcherzyków w cieczy. Implozyjne zapadanie się pęcherzyka powoduje powstanie miejscowo gorącego punktu poprzez adiabatyczną kompresję lub tworzenie fali uderzeniowej w fazie gazowej pęcherza. Warunki panujące w tych gorących punktach zostały określone eksperymentalnie przy temperaturach przejściowych 5000 K, ciśnieniu 1800 atm. i szybkościach chłodzenia powyżej 10^{10} K/s [100]. Te warunki są korzystne dla utworzenia nowej fazy hamując aglomerację. Metoda ta pozwala na wytwarzanie wysoce monodispersyjnych materiałów i została zastosowana do syntezy kilku nanokompozytów oraz nanocząstek tlenku żelaza [101].

2.1.6. Metody elektrochemiczne

W metodzie elektrochemicznej otrzymywania magnetycznych nanocząstek można kontrolować wielkość nanomateriałów poprzez regulację gęstości prądu (J) lub potencjału (E) w procesie elektrotleniania [102–106]. Początkowo nanocząstki magnetytu o wielkości od 20 do 30 nm były wytwarzane przez elektrotlenianie przy użyciu żelaza jako anody i katody. Utrzymywano 1 cm odległość między dwoma elektrodami. W tej metodzie do roztworu elektrolitu dodawano chlorek tetrametyloamoniowy ((CH₃)₄NCl) jako środek powierzchniowo czynny, a czas reakcji w temperaturze 60°C wynosił 1800 s [103]. Otrzymywane tym sposobem nanocząstki były jednorodne i kuliste. W następnych latach, zaproponowano kolejną metodę elektrochemiczną przy użyciu żelaza jako anody i wody jako elektrolitu, w której nie wykorzystywano środków powierzchniowo czynnych. W trakcie syntezy zwiększano odległość między elektrodami z 2 do 6 cm oraz gęstość

prądu od 205 do 415 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Wielkość cząstek wzrastała w wyniku zwiększenia gęstości prądu i zmniejszenia odległości między elektrodami. Otrzymane nanocząstki kształtem przypominały kulę, ze średnim rozmiarem w zakresie od 10 do 30 nm, w zależności od zmienności prądu i odległości między elektrodami [102].

W Tabeli 3 zestawiono wady i zalety wcześniej wymienionych metod syntezy magnetycznych nanocząstek.

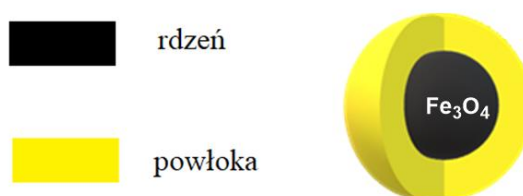
Tabela 3. Zalety i wady chemicznych metod syntezy nanocząstek magnetycznych [87,92].

Metoda	Zalety	Wady
Współwytrącanie	Bezpieczna, ekonomiczna, prosta, niskie temperatury syntezy	Utlenienie powierzchni, duży rozkład wielkości cząstek
Rozkład termiczny	Wysokiej jakości monodispersyjne cząstki, mały rozmiar	Skomplikowana, czasochłonna, proces wymaga wysokich temperatur i długotrwałego oczyszczania.
Mikroemulsje	Wysoka wartość namagnesowania materiałów	Skomplikowana, długi proces
Metoda hydrotermalna	Łatwość kontroli kształtu i wielkości cząstek	Wysokie ciśnienie i temperatura, długi czas syntezy
Sonochemiczna	Małe rozmiary cząstek	Skomplikowany mechanizm
Elektrochemiczne	Łatwość kontroli rozmiaru	Mała powtarzalność

2.2. Funkcjonalizacja magnetycznych nanocząstek

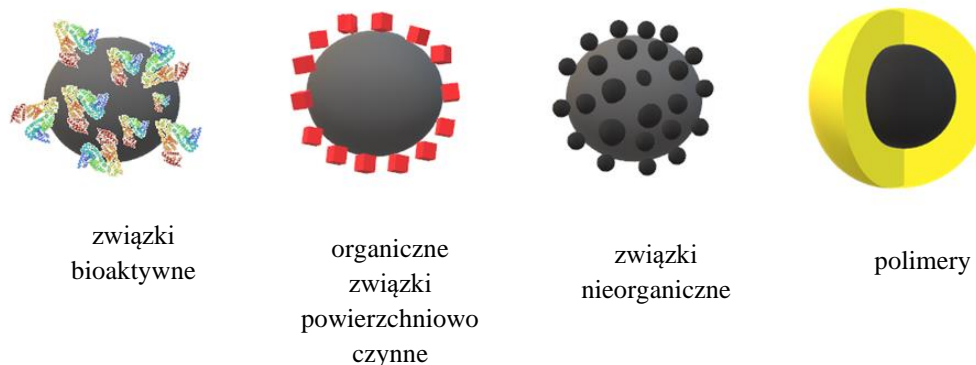
Niefunkcjonalizowane powierzchniowo nanocząstki magnetyczne posiadają ograniczone zastosowanie z powodu samorzutnego tworzenia się agregatów, co spowodowane jest ich dużą energią powierzchniową [107]. Nanocząstki magnetytu bez powłoki charakteryzują się niekorzystnymi właściwościami, takimi jak: niestabilność chemiczna w powietrzu, słaba biodegradowalność w środowisku fizjologicznym i niespecyficzne oddziaływanie z białkami surowicy krwi [108]. Dodatkowo, brak odpowiedniej powłoki stabilizującej magnetyt może spowodować jego szybkie utlenienie, co jest szczególnie niekorzystne przy zastosowaniu nanocząstek w aplikacjach biomedycznych. W przypadku stosowania nanocząstek w celach terapeutycznych, ich warstwa pokrywająca powinna ograniczać ryzyko niepożądanego działania materiału na pacjentów. Do tego typu aplikacji stabilizator powinien charakteryzować się wysoką biokompatybilnością oraz biodegradowalnością. Główne cele modyfikacji powierzchni nanocząstek to: poprawa dyspersji; poprawa aktywności powierzchniowej; poprawa właściwości fizykochemicznych i mechanicznych oraz poprawa zgodności biologicznej.

Modyfikacja powierzchni magnetycznych nanocząstek może być prowadzona, zarówno w trakcie ich syntezy *in situ*, jak i po jej zakończeniu. Proces pokrycia powierzchni nanocząstek przeprowadzony po zakończeniu ich syntezy, prowadzi do wytworzenia struktur typu rdzeń-powłoka (*core-shell*) (Rysunek 19).



Rysunek. 19. Struktura nanocząstek typu rdzeń-powłoka (*core-shell*)

Do powlekania nanocząstek magnetycznych najczęściej używane są syntetyczne i naturalne polimery, organiczne środki powierzchniowo czynne, związki nieorganiczne i związki bioaktywne (Rysunek 20) [111].



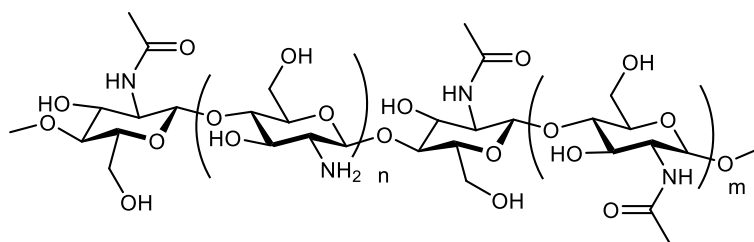
Rysunek 20. Schematyczna ilustracja głównych materiałów stosowanych do funkcjonalizacji nanocząstek magnetycznych [111]

Najczęściej wykorzystywanymi materiałami stosowanymi do powlekania powierzchni magnetycznych nanomateriałów są polimery, które mogą zapobiegać ich utlenianiu oraz nadają nanocząstkom stabilność koloidalną [90]. Wykorzystywane są polimery syntetyczne (takie jak: glikol polietylenowy, kwas poliakrylowy, polywinylopirolidon), poli(alkohol winylu), polietylenoimina, poli(kwas mlekowy-koglikolowy), poli(N-izopropylakrylamid) i poli(kwas metakrylowy) lub naturalne (chitozan, skrobia, celuloza, agarozą i dekstran). Ze względu na swoje naturalne pochodzenie, biopolimery charakteryzują się biokompatybilnością i biodegradowalnością dlatego stają się coraz bardziej popularne w zastosowaniach biomedycznych [112]. W następnym podrozdziale zostaną opisane wybrane przykłady biomateriałów wykorzystywanych jako powłoki nanocząstek.

2.2.1. Chitozan (Cs)

Chitozan, naturalny poliaminosacharyd, otrzymywany jest poprzez chemiczną lub enzymatyczną deacetylację chityny. W swojej strukturze zawiera różne ilości statystycznie rozłożonych jednostek strukturalnych 2-acetamido-2-deoksy- β -D-glukopiranozy, N-acetyloglukozoaminy oraz 2-amino-2-deoksy- β -D-glukopiranozy(-glukoaminy), połączonych wiązaniami β -(1 \rightarrow 4)-glikozydowymi (Rysunek 21) [113]. Chitozan jest słabą zasadą, nierozpuszczalną w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych. Jest jednak rozpuszczalny w kwaśnych roztworach wodnych, dzięki protonowaniu pierwszorzędowych grup aminowych [114]. Ze względu na obecność reaktywnych grup aminowych i hydroksylowych polimer ten bardzo łatwo ulega modyfikacjom [115]. Chitozan posiada szereg cennych właściwości fizykochemicznych i biologicznych, takich jak: biodegradowalność, biozgodność, biodystrybucja, brak immunogenności,

co sprawiło, że polimer ten znalazł szerokie zastosowanie w farmacji i medycynie, zwłaszcza w onkoterapii [116]. Ponadto ma on potwierdzoną aktywność przeciwwirusową, przeciwzapalną, i przeciwbakteryjną [114,117]. W literaturze znaleźć można wiele doniesień, dotyczących syntezy magnetycznych nanocząstek powlekanych chitozanem, ponieważ biopolimer ten, nie zmienia właściwości termicznych i magnetycznych materiału. Badania wykazały, że pokrywanie nanocząstek magnetycznych chitozanem prowadzi do zmniejszenia ich agregacji oraz poprawienia zdolności nanocząstek do przenikania przez błony komórkowe, co jest często wykorzystywane w aplikacjach biomedycznych [118,119]. W środowisku kwaśnym, wolne grupy aminowe chitozanu zyskują ładunek dodatni, dzięki czemu mogą reagować z ujemnie naładowanymi grupami kwasów nukleinowych, co jest wykorzystywane m.in. w obrazowaniu MRI [118,119]. Obecność wolnych grup hydroksylowych i aminowych chitozanu pozwala na modyfikację powierzchni pokrywanych nimi nanocząstek [120–123].

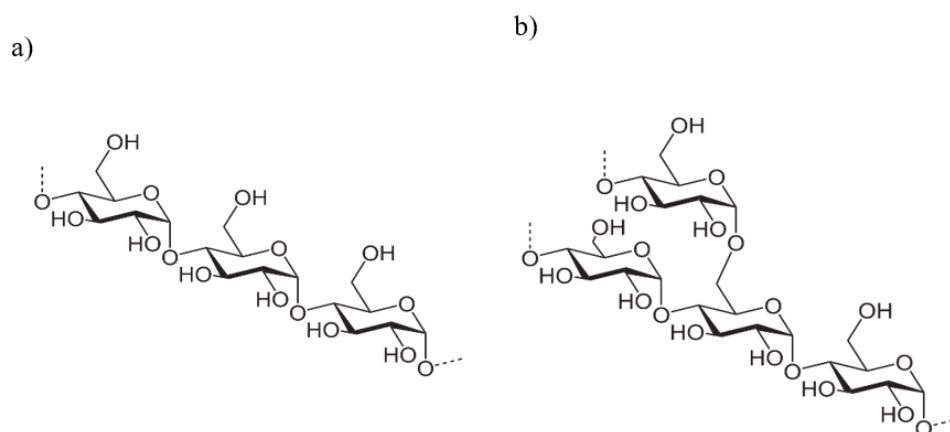


Rysunek 21. Struktura chemiczna chitozanu

2.2.2. Skrobia (S)

Skrobia jest jednym z najciekawszych naturalnych polisacharydów stosowanych do pokrywania nanocząstek. To polisacharyd pochodzenia roślinnego, składający się wyłącznie z merów glukozy, połączonych wiązaniami α -glikozydowymi oraz pełniący w roślinach funkcję magazynu energii [124]. Skrobia ulega hydrolizie do α -D-glukozy, lecz nie jest jednorodnym chemicznie związkiem, ponieważ składa się z dwóch frakcji: nierozgałęzionej amylozy (łatwo rozpuszczalnej w wodzie) oraz rozgałęzionej amylopektyny (trudno rozpuszczalnej w wodzie) (Rysunek 22) [125]. Obecność reaktywnych grup hydroksylowych i dość dobra rozpuszczalność skrobi powoduje, że jest ona podatna na modyfikacje, co stanowi inspirację do tworzenia na jej bazie nowych materiałów o poszukiwanych właściwościach, takich jak biodegradowalność i nietoksyczność [126]. W celu chemicznej modyfikacji tego polisacharydu wykorzystuje się reakcje utleniania, estryfikacji i eteryfikacji [127,128]. Potwierdzono, że nanocząstki

magnetytu pokryte skrobią zachowują swoje właściwości magnetyczne oraz charakteryzują się wysoką biokompatybilnością, a także stabilnością koloidalną i magnetyczną, dzięki czemu ten typ nanocząstek można uznać za jeden z biomateriałów o wysokim potencjale do zastosowań biomedycznych [129–131].



Rysunek 22. Struktura a) amylozy; b) amylopektyny

2.3. Metody charakteryzowania nanocząstek magnetycznych

Właściwości nanocząstek magnetycznych (takie jak: rozmiar, kształt czy rodzaj powłoki stabilizującej rdzeń) wpływają na ich zastosowanie w badaniach podstawowych *in vitro* oraz *in vivo*. Dlatego też konieczna jest dokładna charakterystyka tych materiałów. Istnieje kilka technik pozwalających na dogłębne scharakteryzowanie magnetycznych nanocząstek pod kątem ich potencjalnego zastosowania w naukach biomedycznych (Rysunek 23).

Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS, *Dynamic light scattering*) jest bardzo popularną techniką pomiaru rozkładu wielkości cząstek w zawiesinach i emulsjach koloidalnych. Metoda ta jest powszechnie stosowana do charakteryzowania i kontroli zawiesin izolowanych nanocząstek lub ich agregatów znajdujących różnorodne zastosowania w praktyce [132].

Ładunek powierzchniowy nanocząstek magnetycznych określany jest przez pomiar potencjału zeta, który może być uzyskiwany na podstawie ruchliwości elektroforetycznej nanocząstek. Ma to kluczowe znaczenie dla określenia stabilności koloidalnej naładowanych cząstek [133].

Kolejnymi metodami, dającymi informacje na temat morfologii powierzchni oraz rozmiaru nanomateriałów, są wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia

elektronowa (HR-TEM, *High Resolution Transmission Electron Microscopy*), przedstawiająca obraz rozmieszczenia cząsteczek w próbce [134] oraz skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM, *Scanning electron microscope*), przedstawiająca strukturę powierzchniową materiału [135].

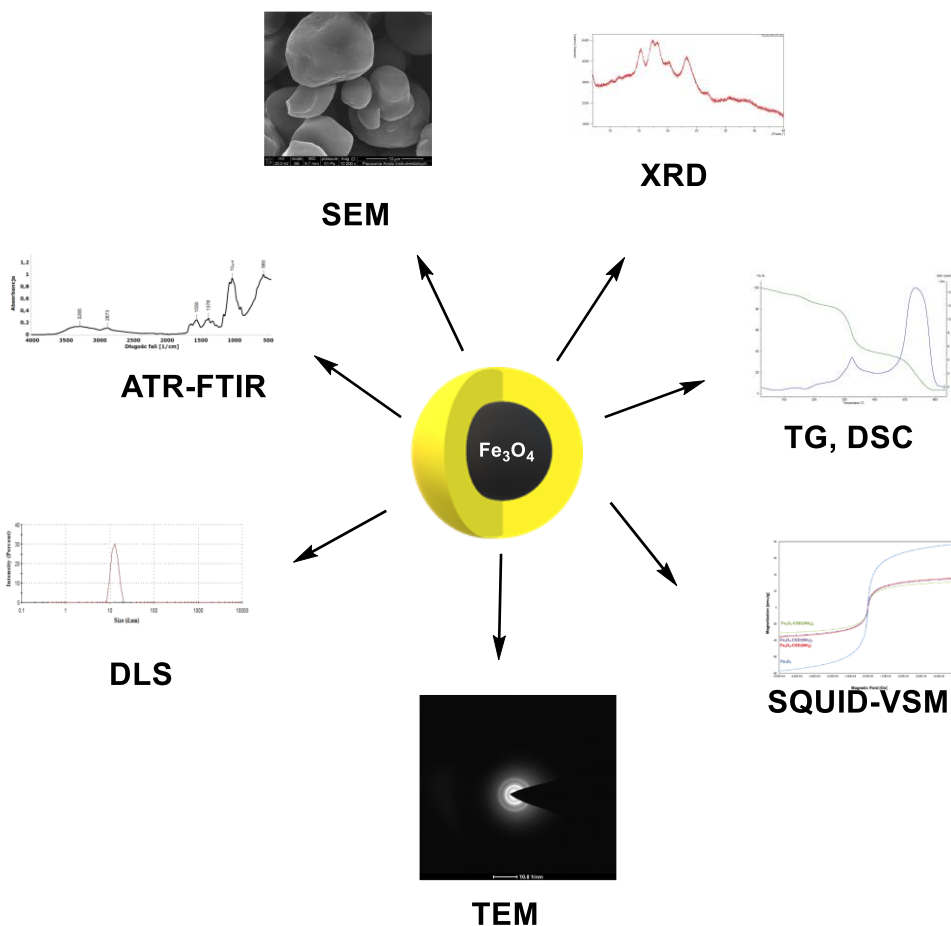
Do charakterystyki właściwości nanocząstek stosowana jest również dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD, *X-ray Diffraction*), która dostarcza informacji na temat struktury krystalicznej, natury fazy, parametrów sieci krystalicznej i wielkości ziaren krystalicznych [136].

Techniki takie jak: analiza termogravimetryczna (TGA, *Thermogravimetric Analysis*) oraz różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) opisują stabilność termiczną nanocząstek magnetycznych i powłok stabilizujących ich powierzchnię, a także umożliwiają rejestrowanie przejść fazowych. Za pomocą tych analiz określa się również zawartość magnetytu w stosunku do powłoki stabilizującej, w układach rdzeń-otoczka. [137].

Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR, *Fourier Transform Infrared* oraz ATR-FTIR, *Attenuated Total Reflectance*) dostarcza informacji na temat struktury chemicznej powierzchni funkcjonalizującej nanocząstkę, co pozwala na potwierdzenie pokrycia rdzenia powłoką w przypadku syntezy stabilizowanych nanocząstek. W ten sposób można również potwierdzić dalszą modyfikację nanocząstek np.: w procesie immobilizacji czy wychwyty ligandu.

Właściwości magnetyczne nanocząstek określa się przez pomiar namagnesowania próbki w funkcji przyłożonego pola. W przypadku superparamagnetyków, namagnesowanie w przyłożonym polu jest bliskie zeru. Najczęściej wykorzystywaną aparaturą służącą do badania magnetyzacji jest magnetometr SQUID-VSM, w którym zasadniczym elementem jest interferometr kwantowy SQUID (*Quantum Interference Device*) [138].

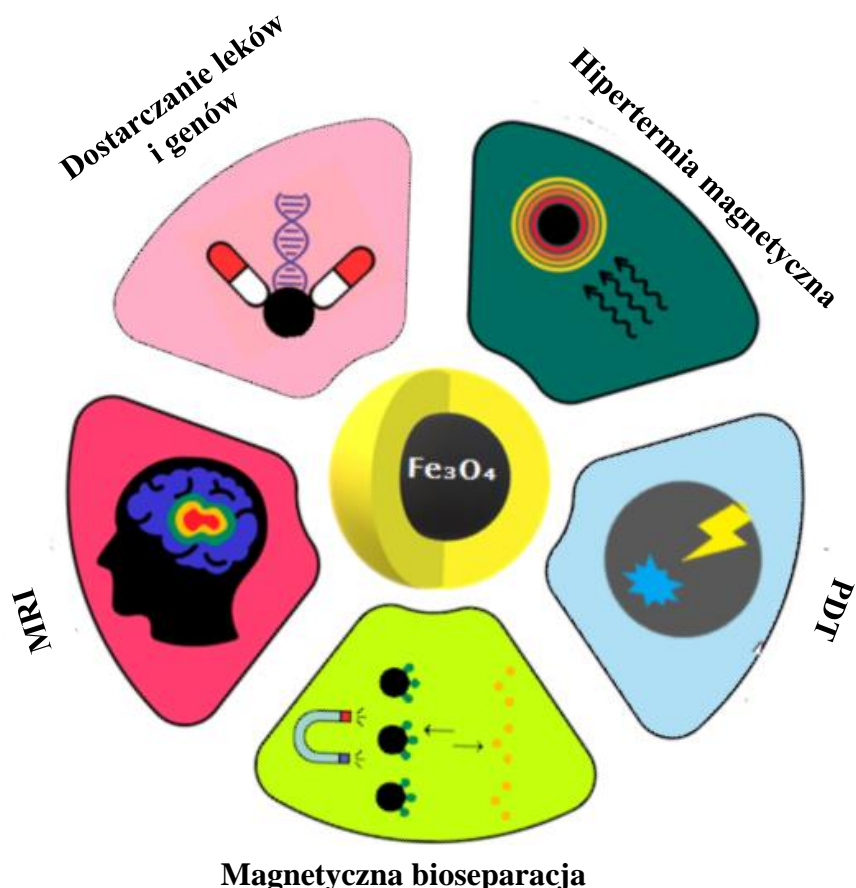
Ze względu na właściwości magnetyczne nanocząstek, nie jest możliwa ich analiza za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*).



Rysunek 23. Metody charakterystyki magnetycznych nanocząstek

2.4. Zastosowanie magnetycznych nanocząstek

Nanocząstki magnetyczne są od dłuższego czasu szeroko stosowane w przemyśle i analityce. Ze względu na ich biokompatybilność i niską toksyczność zastosowanie tych materiałów w naukach biomedycznych wzrosło w ciągu ostatnich dwóch dekad [138]. Dla przykładu, nanocząstki mogą być stosowane jako czynnik kontrastowy w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI), a także jako terapeutyczne narzędzie w kontekście pola magnetycznego/lub hipertermii, a także w terapii fotodynamicznej (PDT) (Rysunek 24).



Rysunek 24. Biomedyczne zastosowanie magnetycznych nanocząstek

Funkcjonalizowane nanocząstki magneytu znalazły zastosowanie, w badaniach *in vitro* m.in. w izolacji i oczyszczaniu związków naturalnych (w tym peptydów i białek) oraz jako nośniki do immobilizacji enzymów. Zastosowanie tego typu nanomateriałów do oczyszczania peptydów i białek oparte jest na wykorzystaniu powinowactwa funkcjonalizowanego tlenku żelaza do struktur białkowych zawartych w próbkach krwi, moczu, płynów ustrojowych, serwatki, mleka, czy odpadach pochodzenia fermentacyjnego. Funkcjonalizacja zazwyczaj przebiega na drodze pokrywania nanocząstek tlenku żelaza związkami organicznymi, zawierającymi podstawniki, które wykazują dużą reaktywność w stosunku do peptydów lub białek zawartych w próbkach biologicznych. Po określonym czasie inkubacji, wymaganym do całkowitego wytworzenia kompleksów nanocząstka-białko/peptyd, materiał oddzielany jest z wykorzystaniem zewnętrznego pola magnetycznego (najczęściej magnezu neodymowego), a następnie poddawany dalszemu oczyszczeniu. Całkowity czas potrzebny do przeprowadzenia procesu rozdziału substancji jest krótki, dzięki łatwej magnetycznej separacji nanocząstek

powiązanych z wybranymi substancjami. Dodatkowo, stężenie analitów ma znikomy wpływ na przebieg procesu, co w odróżnieniu od metod chromatograficznych pozwala na znaczne ograniczenie zużycia rozpuszczalników i reagentów.

Proces separacji magnetycznej z wykorzystaniem funkcjonalizowanych tlenków żelaza zastosowano do izolacji przeciwciał, enzymów i hormonów [139]. Pierwsza tego typu aplikacja została opracowana przez zespół Chena [140], który przeprowadził proces adsorpcji bromelainy (enzymu proteolitycznego, pozyskiwanego z owoców ananasa) na nanocząstkach magnetytu pokrytych poli(kwasem akrylowym). Adsorpcja tego związku zachodziła z prawie 100% wydajnością, w roztworze wodnym o pH 3–5. Enzym ten desorbowany był roztworem KCl przy pH=7, a uzyskana bromelaina wykazywała aktywność na poziomie 87,4% [141].

W 1996 roku pojawiły się badania izolacji bydłczej hemoglobiny przy użyciu nanocząstek tlenku żelaza pokrytych kwasem imidoocetowym [142]. W roku 2007 Liang i Zhang [143] przeprowadzili immobilizację papain z melonowca właściwego (*Carica papaya*) na nanocząstkach magnetycznych pokrytych karboksymetylowanym chitozanem. W tym przypadku nanocząstki magnetytu otrzymano metodą współwytrącania, a chitozan, przed ich pokryciem, zmodyfikowano za pomocą kwasu monochloroocetowego. Przeprowadzona immobilizacja miała charakter chemiczny; do sprzęgnięcia enzymu z polimerem użyto 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC) i *N*-hydroksysulfosukcynoimidu (Sulfo-NHS). Zauważono, że skoniugowana papaina, w porównaniu z jej formą natywną, wykazuje zwiększoną aktywność enzymatyczną, lepszą tolerancję na zmiany pH i temperatury oraz większą stabilność podczas przechowywania. Biorąc pod uwagę, zalety techniki separacji magnetycznej, takie jak duża szybkość procesu, wysoka wydajność i opłacalność oraz brak negatywnego wpływu na aktywność biologiczną białek, taki system biokoniugatów może mieć potencjalne zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, skórzanym, kosmetycznym i tekstylnym [143]. Analogiczna zasada wiązania związków naturalnych z nanocząstkami magnetycznymi stosowana jest przy oczyszczaniu lub izolacji, takich składników komórkowych, jak fosfolipidy, polisacharydy czy kwasy nukleinowe [144,145].

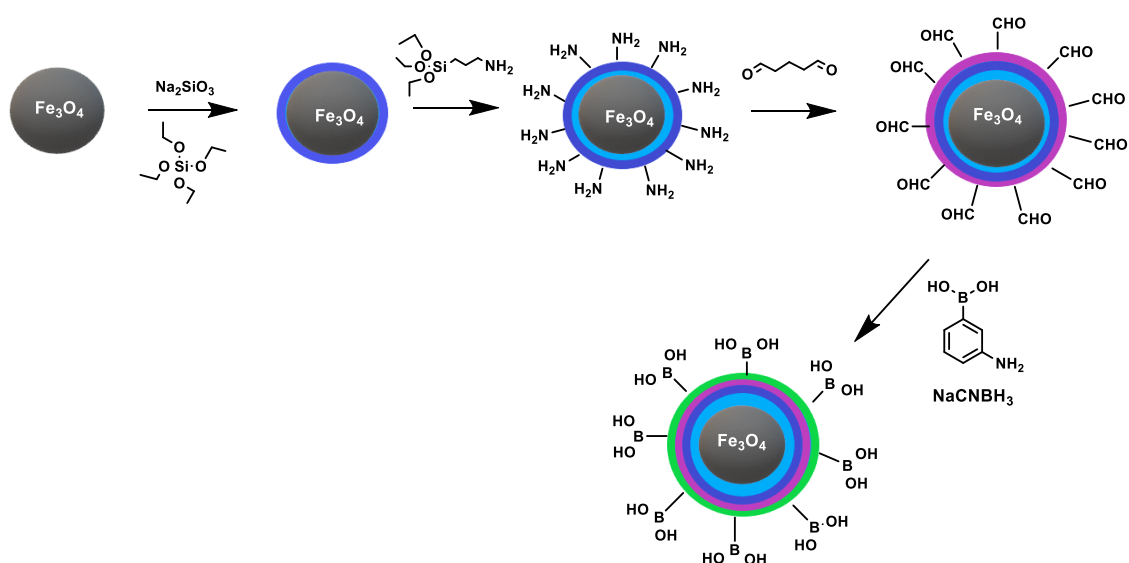
3. Magnetyczne nanocząstki modyfikowane kwasami boronowymi do wiązania glikoprotein

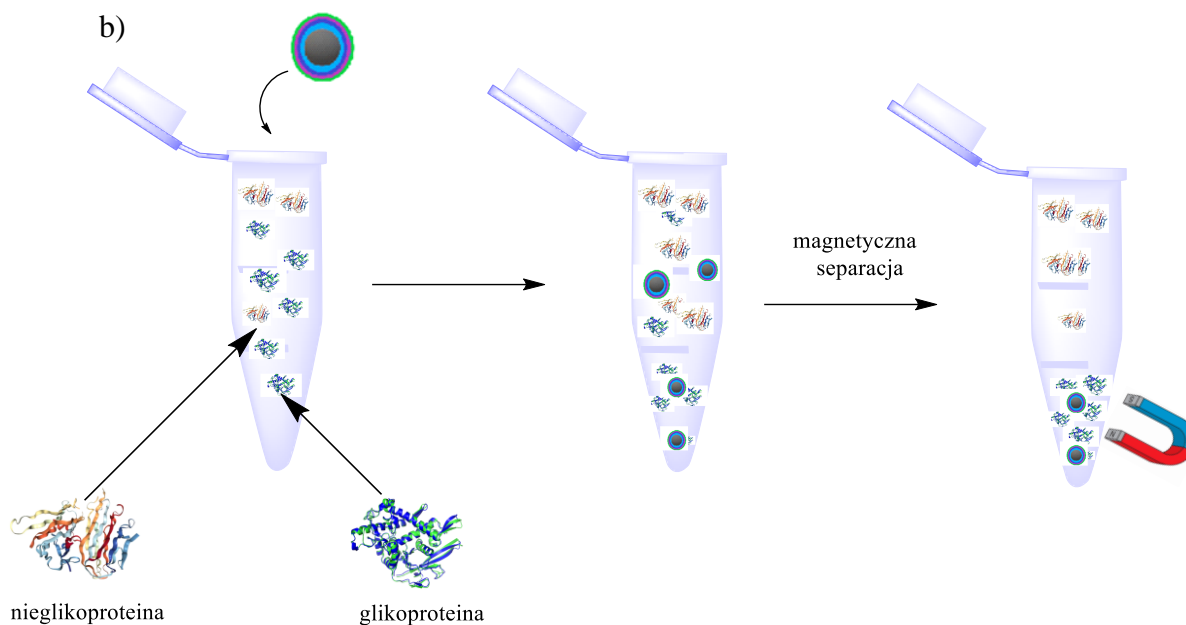
3.1. Magnetyczne nanocząstki pokryte związkami nieorganicznymi modyfikowane kwasami boronowymi

Jedną z pierwszych prac dotyczących magnetycznych nanocząstek funkcjonalizowanych kwasami boronowymi, jest publikacja z 2010 roku napisana przez Zi-An Lin i współpracowników [146]. Opublikowali oni syntezę nanocząstek magnetycznych tlenku żelaza funkcjonalizowanych kwasem 3-aminofenyloboronowym (PBA) w celu selektywnego wychwytu glikoprotein z niefrakcjonowanych mieszanin białek.

Pierwszy etap badań polegał na syntezie magnetycznych nanocząstek metodą współwytrącania, które następnie poddano wieloetapowej modyfikacji z użyciem Na_2SiO_3 , TEOS (Tetraetoksylan), APTES ((3-aminopropyl)trietoksylan) i aldehydu glutarowego, otrzymując magnetyczne nanocząstki, które na swojej powierzchni miały wolne grupy aldehydowe. W końcowym etapie magnetyczne nanocząstki poddano reakcji z kwasem 3-aminofenyloboronowym (Rysunek 25). Selektywność i zdolność wiązania magnetycznych nanocząstek pokrywanych kwasem boronowym oceniono badając zdolność do wiązania standardowych glikoprotein: białka jaja kurzego (OVA) i nieglikoprotein: hemoglobiny bydlęcej (BHb), albuminy surowicy bydlęcej (BSA) oraz lizozymu (Lyz). Badania pokazały, że nanocząstki te miały wyższą zdolność wiązania i selektywność dla glikoproteiny w porównaniu z pozostałymi białkami.

a)

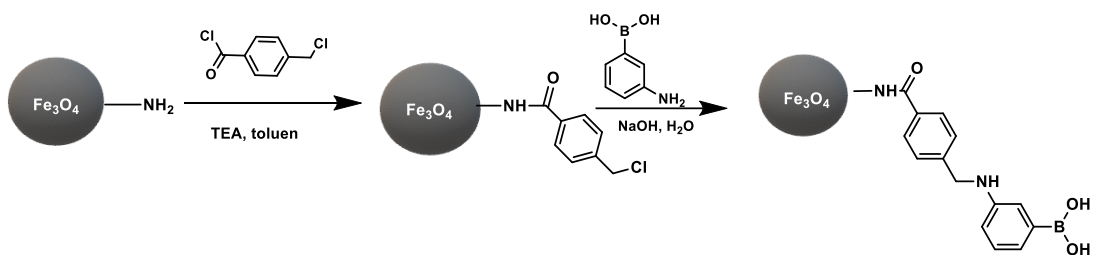




Rysunek 25. Schematyczne przedstawienie (a) syntezy nanocząstek magnetytu funkcjonalizowanych PBA i (b) zastosowania magnetycznych nanocząstek w selektywnym wychwytywaniu glikoprotein [146]

Ilość związanej OVA wynosiła 450 mg/g, co znacznie przewyższało wartości uzyskane dla pozostałych białek: 200 mg/g, 130 mg/g i 80 mg/g odpowiednio, dla bydlęcej hemoglobiny, lizozymu i bydlęcej albuminy (pH 10,0).

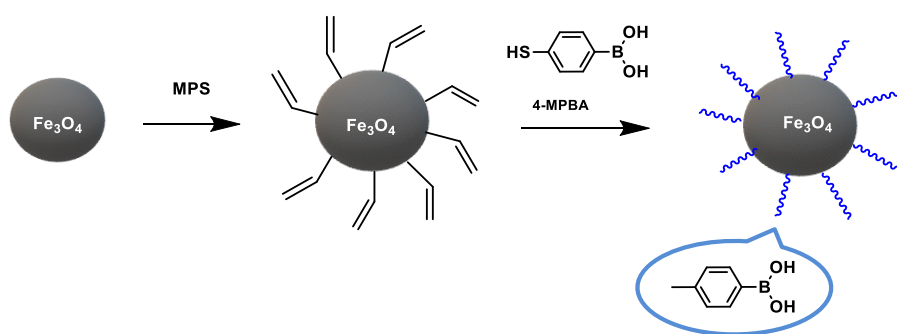
W 2012 roku Xihao Zhang wraz ze współpracownikami [147] opublikowali również syntezę nanocząstek magnetycznych funkcjonalizowanych kwasem 3-aminofenyloboronowym, z zastosowaniem reakcji „klik” - cykloaddycji azydkowo-alkinowej (CuAAC). Syntezę magnetycznych nanocząstek z azydkami przeprowadzono na drodze dwuetapowej modyfikacji chemicznej z zastosowaniem metody hydrotermalnej. Następnie cząsteczki kwasu alkinowo-fenyloboronowego zostały połączone z powierzchnią magnetytu za pomocą reakcji CuAAC. Do badań wybrano pięć białek, w tym albuminę jaja kurzego (OVA) i transferynę (Trf) (stanowiące matryce glikoproteinowe) oraz lizozym (Lyz), albuminę surowicy bydlęcej (BSA) i cytochrom c pozyskany z serca konia (Cyt C) (będące matrycami nieglikoproteinowymi) (Rysunek 26).

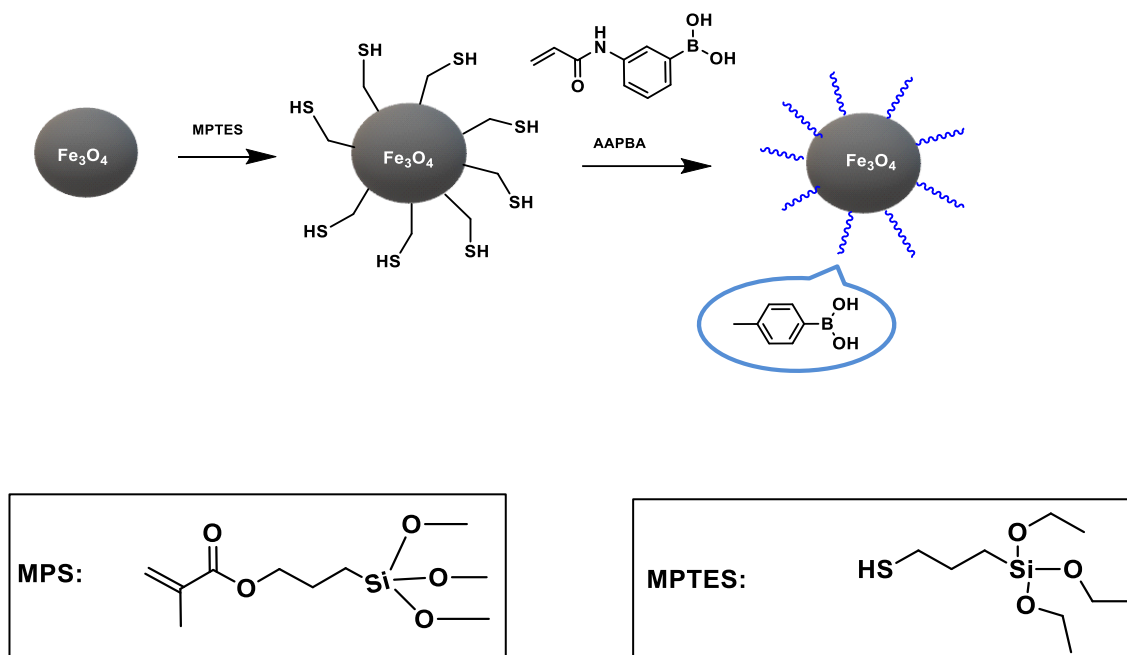


Rysunek 26. Metoda syntezy nanocząstek magnetycznych funkcjonalizowanych kwasem 3-aminonenyloboronowym (PBA) z zastosowaniem reakcji „klik” (cykloaddycji azydowo-alkinowej katalizowanej jonami Cu (I)) [147]

Nanocząstki opisane przez Xihao Zhang i współpracowników wykazywały zdolność do adsorpcji glikoprotein OVA i Trf. Ilość związanych glikoprotein wynosiła 490,4 i 293,8 mg/g, odpowiednio dla OVA i Trf. Z kolei adsorpcja nieglikoprotein była znacznie niższa i wynosiła 20 mg/g dla Lyz; 10 mg/g dla Cyt C i 51,10 mg/g dla BSA (pH 9.0).

W 2014 roku pojawiła się praca zespołu Sitong Zhang’a [148], dotycząca syntezy magnetycznych nanocząstek funkcjonalizowanych kwasem boronowym poprzez reakcję „thiol-ene (TE) klik”. W pracy tej, funkcjonalizowano dwa rodzaje magnetycznych nanocząstek z ugrupowaniami alkenowymi i tiolowymi. Reaktywne w tej reakcji „klik”, pokryte alkenem lub tiolem, magnetyczne nanocząstki przygotowano przy pomocy reakcji zol-żel z krzemoorganicznym środkiem sprzęgającym: 3-(metakryloiloxy)propylotrimetoksylosilanem (MPS) lub 3-merkaptopropylotrietoksylosilan (MPTES). Podwójne wiązania węgiel-węgiel lub grupy tiolowe na powierzchni nanocząstek służyły jako miejsca do reakcji z kwasem 4-merkaptofenyloboronowym (4-MPBA) i kwasem-3-akryloamidofenyloboronowy (AAPBA) (Rysunek 27).

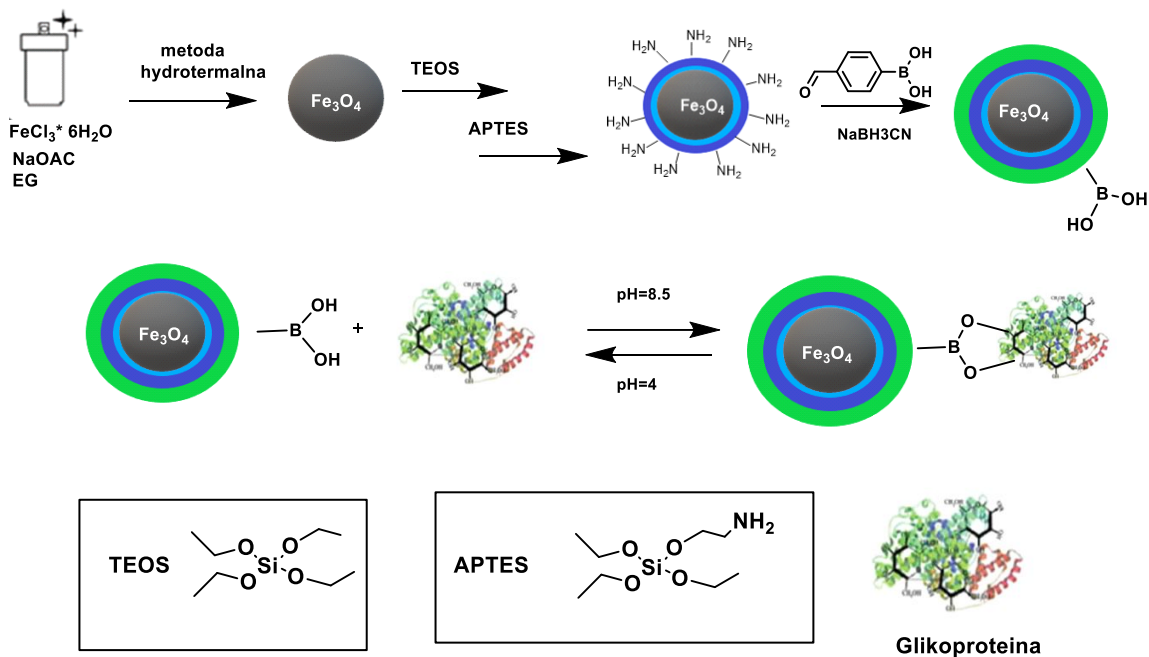




Rysunek 27. Schemat syntezy nanocząstek magnetycznych modyfikowanych kwasem boronowym poprzez reakcję „klik” tiolowo-enowego [148]

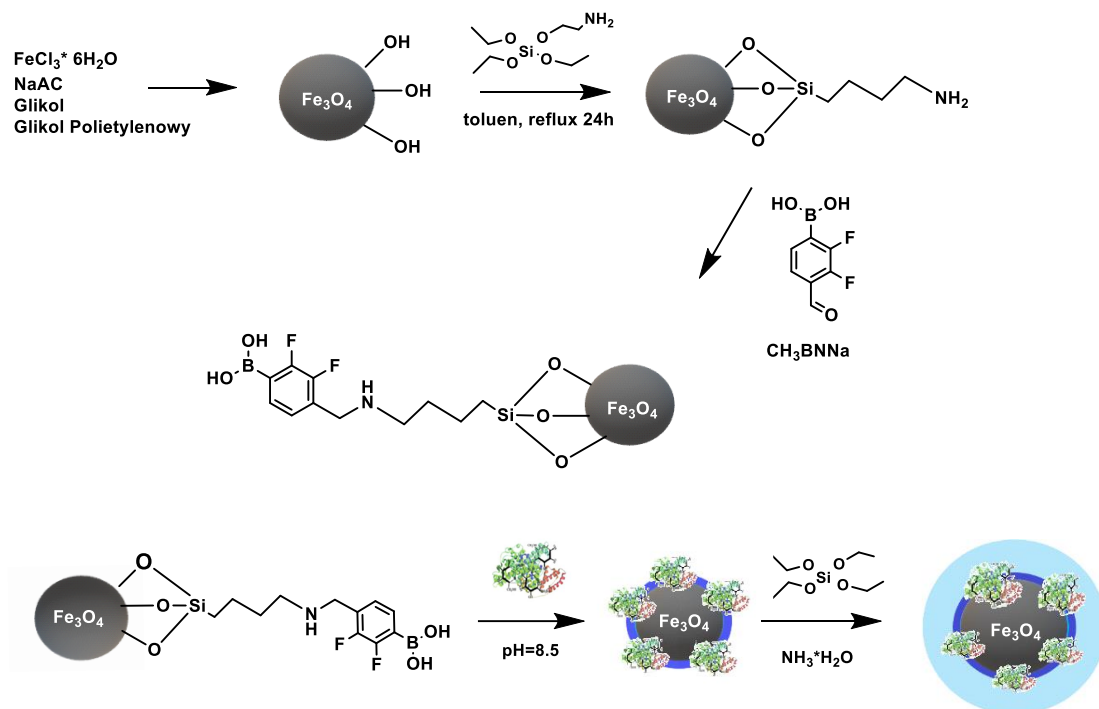
Następnie przeprowadzono badania zdolności otrzymanych nanocząstek do wiązania glikoprotein OVA i Trf oraz nieglikoprotein, takich jak Lyz i Cyt C. Zdolności adsorpcyjne białek były badane w pH 9,0. Ilość związanych glikoprotein OVA i Trf wynosiły odpowiednio 777,9 i 145,7 mg/g dla nanocząstek $Fe_3O_4@MPS@PBA$ i 899,1 i 159,2 mg/g dla nanocząstek $Fe_3O_4@SH@AAPB$. Z kolei białka nieglikoproteinowe dla obu typów nanocząstek wiązały się znacznie słabiej, a maksymalne wartości wynosiły 33,6 i 22,6 mg/g dla Lyz i Cyt C.

Xiaoting Xue wraz ze współpracownikami [149] opublikowali w roku 2019 syntezę magnetycznych nanocząstek metodą hydrotermalną, które następnie poddano reakcji z ortokrzemianem tetraetylu (TEOS) i 3-aminopropylotrietoksyilanem (APTES), a w końcowym etapie, z kwasem 4-formylofenyloboronowym, otrzymując $Fe_3O_4@SiO_2-BA$ (Rysunek 28). Podobnie do wcześniejszych badań otrzymany nanomateriał wykorzystano do adsorpcji OVA, Trf, BSA oraz Cyt C. Uzyskane wyniki w tym przypadku również potwierdziły istotną różnicę w powinowactwie do glikoprotein i nieglikoprotein. Adsorpcja $Fe_3O_4@SiO_2-BA$ do OVA i Trf wynosiła odpowiednio 8,78 i 5,46 mg/g, natomiast do BSA i Cyt C - 2,69 i 0,04 mg/g (pH 8,5). Wyniki te sugerują, że $Fe_3O_4@SiO_2-BA$ wykazywały specyficzną w stosunku do glikoprotein.



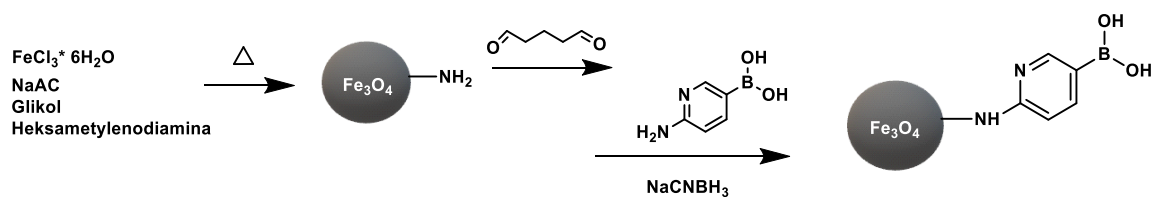
Rysunek 28. Schemat syntezy nanocząstek funkcjonalizowanych kwasem boronowym [149]

Zespół Bangjin Wang [150] przedstawił swoje badania, dotyczące magnetycznych nanocząstek przeznaczonych do selektywnego rozpoznawania i izolacji glikoprotein. Nanomateriał otrzymano metodami solwotermiczną i bezpośredniej silanizacji poprzez polimeryzację kondensacyjną aminopropylotrietoksylanu (APTES). Następnie, nanocząstki poddano działaniu kwasu fenylboronowego, wykorzystując reakcję redukcyjnego aminowania między kwasem 2,3-difluoro-4-formylofenyloboronowym (DFFPBA) a grupą amidową. Powstały materiał $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2\text{-DFFPBA}$ został wykorzystany do selektywnej adsorpcji glikoproteiny. Finalnie powierzchnię nanocząstek pokryto warstwą zawierającą polimer z „odciskiem molekularnym” uzyskany w wyniku polimeryzacji kondensacyjnej ortokrzemianu tetraetylu (TEOS) (Rysunek 29). Zdolności adsorpcyjne powstałych MNPs@MIP-HRP i MNPs@MIP-OVA peroksydazy chrzanowej (HRP) i albuminy jaja kurzego (OVA) były znacznie lepsze niż dla materiałów bez „odcisku molekularnego” (MNPs@NIP). Wartość adsorpcji HRP dla MNPs@MIP-HRP wynosiła 25,2 mg/g, a OVA dla MNPs@MIP-OVA 26,1 mg/g (pH 8,5).



Rysunek 29. Schemat syntezy nanocząstek magnetycznych pokrytych warstwą zawierającą polimer z „odciskiem molekularnym” [140]

W innej pracy [151] autorzy opisują syntezę nanocząstek magnetycznych funkcjonalizowanych kwasem 6-aminopirydyno-3-boronowym. Pierwszy etap polegał na syntezie nanocząstek metodą hydrotermalną, które następnie wzbogacono w wolne grupy aldehydowe oraz zastosowano reakcję z kwasem boronowym (Rysunek 30).



Rysunek 30. Schemat syntezy nanocząstek magnetycznych funkcjonalizowanych kwasem 6-aminopirydyno-3-boronowym [151]

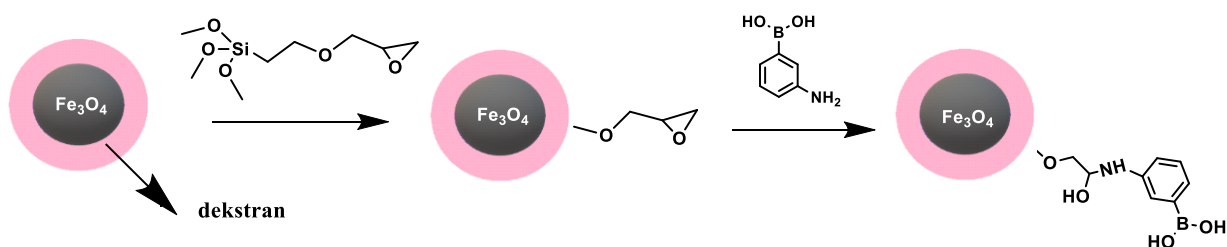
Autorzy badali zdolność wiązania dwóch glikoprotein (HRP oraz OVA) przez otrzymane nanomateriały. Ilość związanego HRP przy pH 7.0 wynosiła około 11 mg/g, a OVA 7 mg/g. Zbadano również ilość związanego HRP przy różnych wartościach pH

(w zakresie 4-8). Ze wzrostem pH wzrastała ilość związanej glikoproteiny, a różnica przy pH 4 i 8 wynosiła 10 mg/g.

3.2. Magnetyczne nanocząstki pokryte polimerami funkcjonalizowanymi kwasami boronowymi

Tak jak wspomniano wcześniej, magnetyczne nanocząstki bardzo często pokrywane są polimerami, które chronią rdzeń przed utlenianiem oraz zapewniają im stabilność koloidalną.

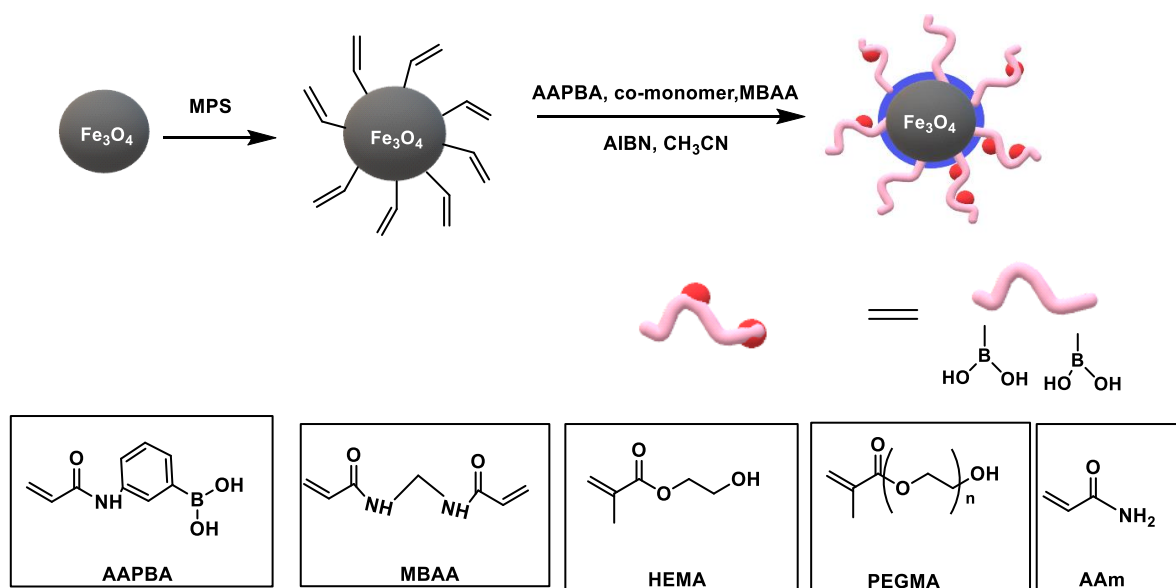
Vijaykumar Dhadge wraz ze współpracownikami [152] opisali nanocząstki magnetyczne pokryte dekstranem funkcjonalizowanym kwasem aminofenyloboronowym (PBA), wykorzystując je do separacji przeciwciał. Nanomateriały otrzymano metodą współwytrącania, a następnie pokryto je dekstranem i 3-glicydoksypropylotrimetoksysilanem (GLYMO), aby umożliwić dalsze kowalencyjne wiązanie z kwasem aminofenyloboronowym (PBA) (Rysunek 31).



Rysunek 31. Modyfikacja magnetycznych nanocząstek powlekanych dekstranem z zastosowaniem GLYMO [152]

Powłoka GLYMO posiadała reaktywne ugrupowanie epoksydowe, które następnie poddano reakcji z kwasem 3-aminofenyloboronowym (3-PBA) w celu uzyskania produktu niejonizowanego PBA. W kontakcie z roztworami czystego białka ludzkiej IgG (hIgG) i albuminy surowicy bydlęcej (BSA), adsorpcji uległo około 170 mg/g hIgG i około 15 mg/g BSA (pH 8,5).

Xihao Zhang i inni [75] opublikowali w 2015 roku syntezę kwasu fenyloboronowego i kopolimeru wielofunkcyjnych nanocząstek magnetycznych przy użyciu techniki polimeryzacji destylacyjno-strąceniowej (DPP). Otoczkę polimerową magnetytu otrzymano przez kopolimeryzację dwóch ligandów wykazujących powinowactwo do monomernego kwasu 3-akryloaminofenyloboronowego (AAPBA) i hydrofilowego monomeru funkcjonalnego (Rysunek 32).

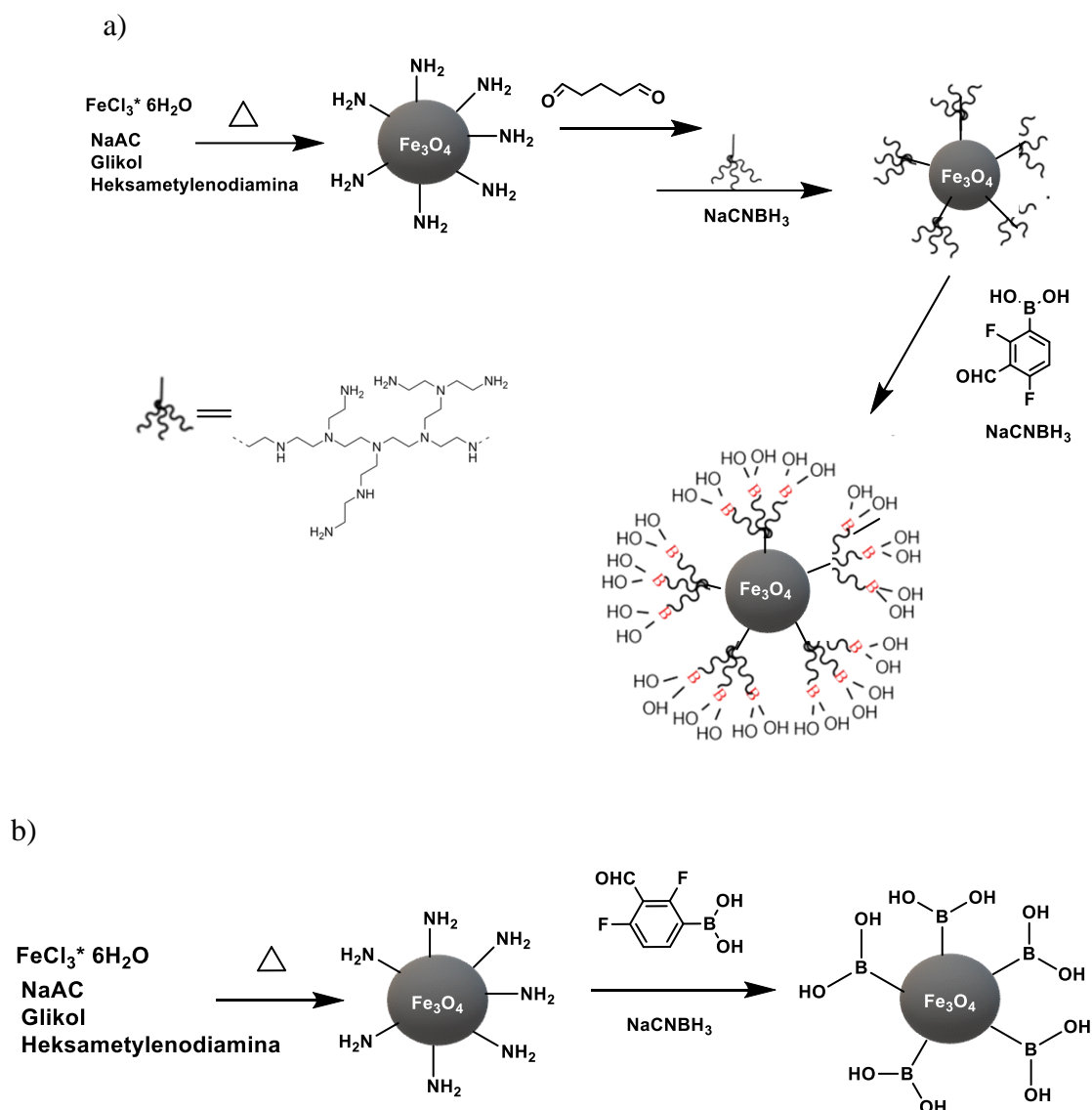


Rysunek 32. a) Schemat syntezy nanocząstek Fe_3O_4 @P(komonomer AAPBA). (b) Monomery (i ich skróty) stosowane do syntezy nanocząstek magnetycznych [75]

Na tak otrzymanych materiałach zbadano adsorpcję takich białek jak: OVA, Trf, Lyz, BSA, Cyt C, przy pH 7,4 i 9,0. Największą ilość białka zaadsorbowanego na Fe_3O_4 @P(AAPBAco- PEGMA) zaobserwowano dla białka OVA, która przy pH=9 wynosiła około 340 mg/g oraz 320 mg/g przy pH 7,4.

Daojin Li wraz z zespołem [77], w 2016 roku opublikowali syntezę dwóch rodzajów nanocząstek funkcjonalizowanych kwasem boronowym, nazwanych PEIPBA-MNP i PBA-MNP. Procedura syntezy PEIPBA-MNP obejmowała trzy etapy. Pierwszy etap dotyczył otrzymywania nanocząstek magnetycznych funkcjonalizowanych grupami aminowymi (AMNP), natomiast drugi związany był z przygotowaniem nanocząstek magnetycznych modyfikowanych PEI (polietylenoimina). Ostatni etap obejmował funkcjonalizację kwasem boronowym DFFPBA (2, 4- kwas difluoro-3-formylo-fenyloboronowy) (Rysunek 33 a).

Z kolei PBA-MNP uzyskano w dwóch etapach, z których pierwszym była synteza nanocząstek magnetycznych funkcjonalizowanych grupami aminowymi (AMNP), a drugim - funkcjonalizacja AMNP z DFFPBA (Rysunek 33 b).

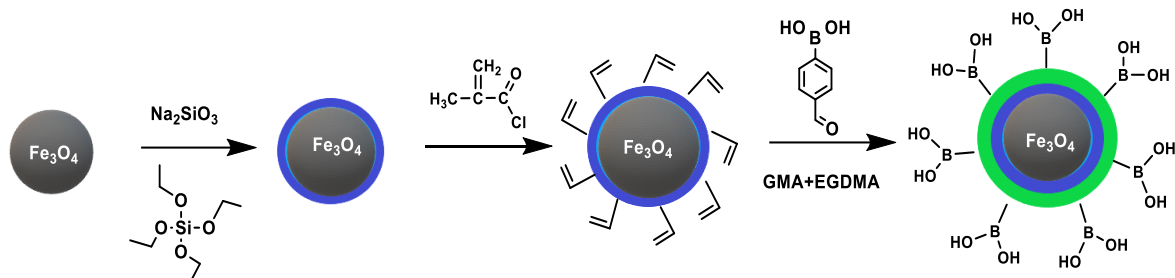


Rysunek 33. Synteza nanocząstek magnetycznych funkcjonalizowanych związkami boronowymi: a) PEIPBA-MNP i b) PBA-MNP [77]

Zbadano m.in. ilość związanej glikoproteiny HRP przy pH 8,0, 7,0, 6,0 i 5,0, uzyskując największą wartość około 15mg/g i 17 mg/g przy pH 8,0 odpowiednio dla PEIPBA-MNP i PBA-MNP.

Sanaz Mansouri Gharaghoush i współpracownicy [153], opublikowali w 2021 roku syntezę nanocząstek $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2@ \text{Poly}(\text{DEMA-EGDMA-CO-VPBA})$, jako wrażliwych na pH nanokompozytów do adsorpcji glikoprotein. W pierwszym etapie, nanocząstki magnetyczne otrzymano metodą współwytrącania, a następnie pokryto je cienką warstwą SiO_2 , aby zapobiec ich agregacji. Powierzchnia nanocząstek była modyfikowana przez polimeryzację DEMA (monomer przygotowany z metakrylan glicydyłu (GMA)

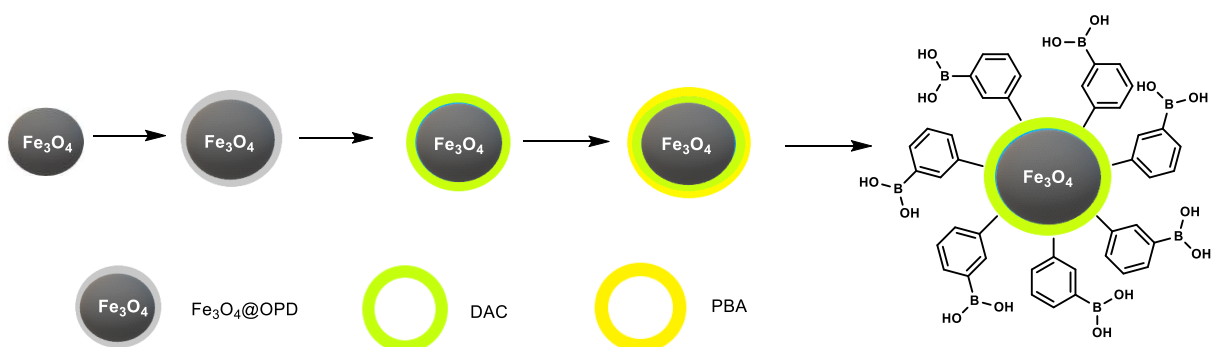
z dietanoloaminą (DEA)), EGDMA (dimetakrylan glikolu etylenowego) i FPBA (kwas 4-formylofenyloboronowy) (Rysunek 34).



Rysunek 34. Schemat syntezy nanocząstek Fe₃O₄@SiO₂@Poly(DEMA-EGDMA-CO-FPBA) [153]

Wyniki badań pokazały, że obecność grup kwasu 4-formylofenyloboronowego zwiększyła zdolność nanocząstek do adsorpcji glikoprotein HRP (peroksydaza chrzanowa). Maksymalna zdolność adsorpcyjna nanokompozytu dla peroksydazy chrzanowej wynosiła około 129,8 mg/g (pH 9.3).

W 2020 roku Jiaying Zhang i inni [154] przeprowadzili syntezę magnetycznych nanocząstek metodą reakcji solwotermicznej. Otrzymane nanocząstki zostały sieciowane za pomocą *O*-fenylenodiaminy (OPD) i formaldehydu, a następnie pokryte nanokrystaliczną 2,3-dialdehydową otoczką celulozową (DAC). W kolejnym etapie, wolne grupy aldehydowe na powierzchni materiału zostały poddane reakcji z kwasem 3-aminofenyloboronowym, prowadząc do otrzymania nanokompozytów magnetycznych Fe₃O₄@DAC-PBA (Rysunek 35).



Rysunek 35. Schemat syntezy nanokompozytów magnetycznych Fe₃O₄@DAC-PBA [154]

Zdolność adsorpcji OVA na nanocząstkach Fe₃O₄@DAC–PBA zbadano przy pH w zakresie od 4,5 do 8,5. Większą zdolność adsorpcji - 9,65 mg/g zaobserwowano, gdy pH wyniosło 8,5. Zdolność adsorpcji zmalała do 2,33 mg/g przy pH 4,5.

W Tabeli 4 zestawiono wcześniej opisane nanocząstki funkcjonalizowane kwasami boronowymi z ilościami związanych glikoprotein oraz zastosowanym pH.

Tabela 4. Ilości glikoprotein związanych z nanocząstkami magnetycznymi funkcjonalizowanymi kwasami boronowymi przy danym pH.

Nanocząstki	Glikoproteina	Ilość mg/g (pH)	Literatura
Fe ₃ O ₄ @-	OVA	450,0 (10,0)	[146]
SiO ₂ @APTES@GA@PBA			
Fe ₃ O ₄ @PBA “klik”	OVA	490,4 (9,0)	[147]
	Trf	293,8 (9,0)	
Fe ₃ O ₄ @MPS@PBA	OVA	777,9 (9,0)	[148]
	Trf	145,7 (9,0)	
Fe ₃ O ₄ @SH@AAPB	OVA	899,1 (9,0)	[148]
	Trf	159,2 (9,0)	
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @BA	OVA	8,78 (8,5)	[149]
	Trf	5,46 (8,5)	
MNPs@MIP–HRP	HRP	25,2 (8,5)	[150]
MNPs@MIP–OVA	OVA	26,1(8,5)	[150]
Fe ₃ O ₄ @kwas-6-aminopirydyno-3-boronowy	HRP	12,0 (8,0)	[151]
	OVA	8,0 (8,0)	
Fe ₃ O ₄ @dekstran@PBA	hIgG	170,0 (8,5)	[152]
Fe ₃ O ₄ @P(AAPBAco-PEGMA)	OVA	340,0 (9,0)	[75]
		320,0 (7,4)	
PEIBA-MNP	HRP	15,0 (8,0)	[77]
PBA-MNP	HRP	17,0 (8,0)	[77]
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @Poly(DEMA-EGDMA-CO-FPBA)	HRP	129,8 (9,3)	[153]
Fe ₃ O ₄ @DAC-PBA	OVA	9,65 (8,5)	[154]

Opisane dotychczas nanocząstki magnetyczne wykazywały bardzo różną zdolność do wiązania glikoprotein. Najbardziej efektywnie glikoproteiny wychwytywały nanocząstki syntetyzowane przez S. Zhang'a i współpracowników [138]. Ilość związanej glikoproteiny OVA przy pH 9,0 na nanocząstkach Fe₃O₄@SH@AAPB wynosiła aż 899,1 mg/g.

Na podstawie dokonanego przeglądu materiałów wiążących glikoproteiny można wywnioskować, że rodzaj powłoki pokrywającej magnetyczne nanocząstki oraz wartość pH środowiska ma duży wpływ na ilość związanych glikoprotein. Dotychczas celuloza i dekstran to jedyne naturalne polimery, które zostały opisane w literaturze jako powłoki magnetycznych nanocząstek, modyfikowane kwasami boronowymi w celu wiązania glikoprotein [152,154]. Należy jednak podkreślić, że brak jakichkolwiek doniesień literaturowych dotyczących materiałów zdolnych do wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny.

4. Cel i zakres pracy

Biomarkery to substancje związane z obecnością, rozwojem lub przebiegiem choroby, które można wykryć i oznaczyć ilościowo w organizmie. Biomarkerami są również białka osocza, takie jak albumina surowicy krwi ludzkiej (HSA), czy α -1-kwaśna glikoproteina (AGP). Badania zawartości HSA i AGP w surowicy są często wykonywane w laboratoriach diagnostycznych w celu oceny stanu zdrowia pacjentów, diagnozowania chorób i monitorowania skuteczności stosowanych terapii. Głównym problemem w pracy z wolnym, nieunieruchomionym białkiem jest trudność jego oddzielenia od supernatantu, co wymaga zastosowania takich technik, jak ultrafiltracja, ultrawirowanie i mikrodializa. W ostatnim czasie w literaturze pojawiło się bardzo wiele prac dotyczących nośników, które mogą być wykorzystywane do izolacji, identyfikacji i oznaczenia stężenia białek w próbkach biologicznych.

Przykładem tego typu nośników są magnetyczne nanocząstki. Nanomateriały te są bardzo często wykorzystywane do unieruchamiania białek enzymatycznych zarówno na drodze immobilizacji fizycznej, jak i kowalencyjnej. Przy doborze nośnika magnetycznego ważne jest, aby zastosować powłokę stabilizującą rdzeń magnetytu, która jest zdolna do wiązania bioligandu do konkretnego rodzaju białka. W literaturze znanych i opisanych jest wiele nośników do immobilizacji lub wychwytu HSA, jednak w dalszym ciągu brak jest prac dotyczących wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny, która obok HSA, jest kolejnym ważnym białkiem osocza biorącym udział w wiązaniu substancji aktywnych, oraz jest swojego rodzaju markerem stanu zapalnego jako białko ostrej fazy.

W związku z powyższym, uznałam za słuszne zaprojektowanie i otrzymanie nośników, które będą zdolne do wiązania tego białka. Pierwsze zastosowanie przeze mnie podejście, było klasyczne. Postanowiłam otrzymać materiały zawierające na swojej powierzchni grupy aminowe, a następnie związać AGP kowalencyjnie w sposób analogiczny do metody wiązania HSA. Jako łącznik w immobilizacji zastosowałam aldehyd glutarowy i alternatywnie układ sulfo-NHS i EDC. Niestety, zastosowanie klasycznej metody wiązania białka z wykorzystaniem jego grup karboksylowych lub aminowych obecnych w strukturze, w przypadku AGP nie przyniosło pożądanego rezultatu. Ilość glikoproteiny związanej na nośniku była w granicach błędu statystycznego. Dlatego uznałam, że być może rozwiązaniem będzie wiązanie AGP, przez część cukrową, nie wykorzystując tym samym części białkowej. W tym celu, zwróciłam szczególną uwagę na reaktywność łańcuchów cukrowych. Jak już wspomniałam w części teoretycznej pracy, w literaturze opisane są reakcje kwasów boronowych z diolami, a co za tym idzie

z węglowodanami. Dzięki obecności łańcuchów cukrowych, glikoproteiny tworzą z kwasami boronowymi trwałe i stabilne połączenia kowalencyjne, a reakcje te zachodzą szybko i wydajnie (co opisano w literaturze) co też postanowiłam wykorzystać w swojej pracy.

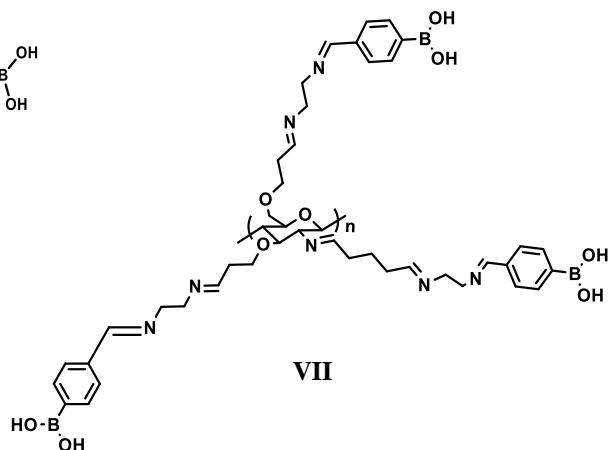
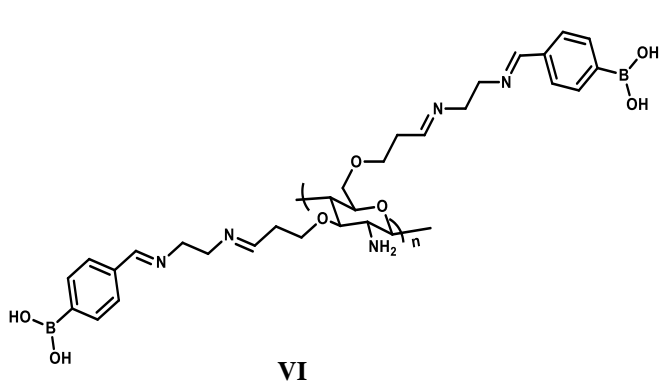
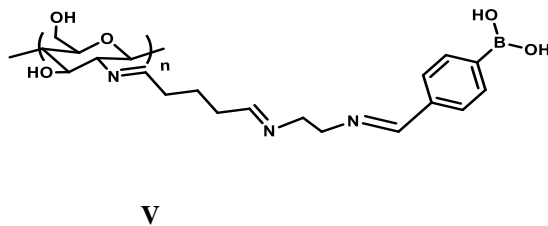
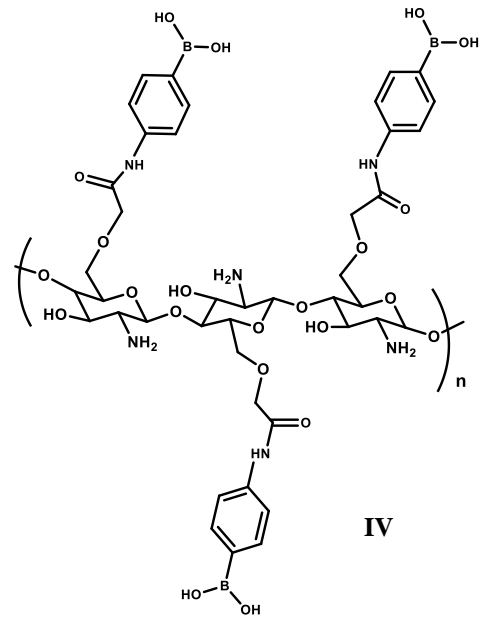
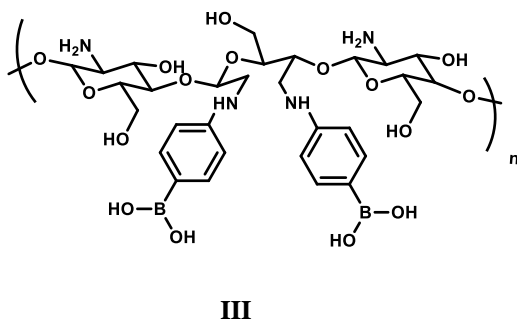
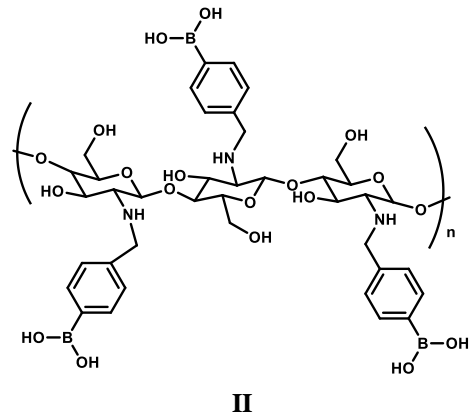
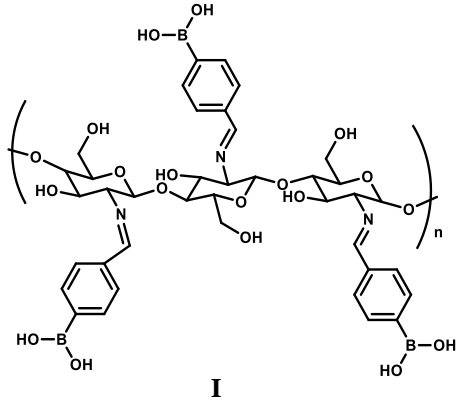
Zatem kluczowym celem mojej pracy było zaplanowanie struktury materiałów powstałych przez modyfikację polisacharydów powszechnie stosowanych w naukach medycznych i farmaceutycznych, takich jak chitozan i skrobia, a także ich chemiczna modyfikacja w kierunku materiałów zawierających ugrupowania kwasów boronowych z wolnymi grupami dihydroksyborylowymi. Biorąc pod uwagę wcześniejsze wyniki otrzymane w naszym zespole, dotyczące wpływu budowy i geometrii cząsteczki polisacharydu na efektywność wiązania HSA, postanowiłam również sprawdzić, czy modyfikacje w obrębie polisacharydu, polegające na: zwiększeniu ilości grup funkcyjnych oraz ich odsunięciu przez fragment alkilowy od łańcucha głównego polisacharydu, otwarciu struktury pierścieni glukopiranozowych czy karboksymetylowaniu wpłyną na zdolność materiału do wiązania AGP. W związku z tym do modyfikacji kwasami boronowymi wybrałam następujące polimery:

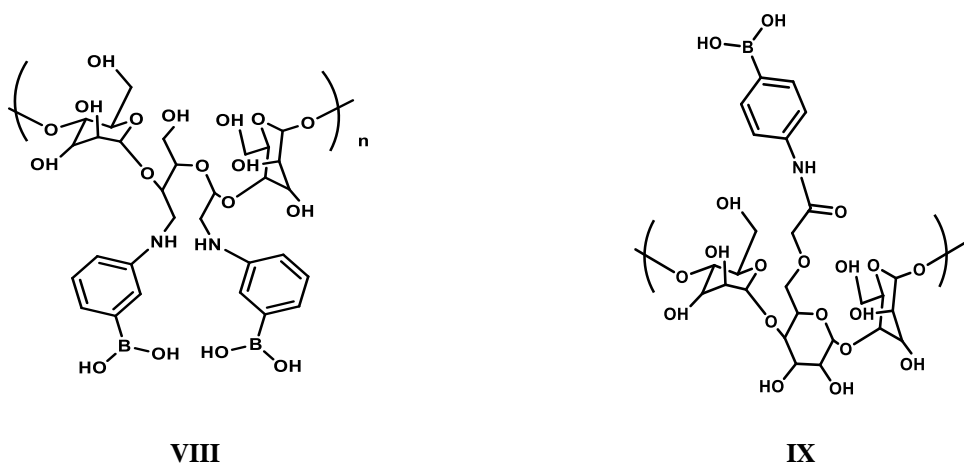
- (i) chitozan niemodyfikowany;
- (ii) chitozan z różną ilością pierwszorzędowych grup aminowych odsuniętych od łańcucha głównego polimeru;
- (iii) chitozanem dialdehydowym;
- (iv) karboksymetylochitozan;
- (v) skrobię dialdehydową;
- (vi) karboksymetyloskrobię.

Kwasami boronowymi, które wybrałam do reakcji z ww. polimerami były: kwas 3-aminofenyloboronowy i kwas 4-formylofenyloboronowy, w zależności od sposobu wprowadzenia ugrupowania kwasu boronowego do polimeru: z wykorzystaniem grup aminowych lub amidowych. Wybór skrobi i chitozanu jak już wspomniałam, podyktowany był biokompatybilnością tych biopolimerów, ich znanym zastosowaniem w przemyśle farmaceutycznym i medycznym, a także łatwą dostępnością i niską ceną. Poprzez funkcjonalizację kwasami boronowymi otrzymałam materiały o różnej zawartości wolnych grup dihydroksyborylowych i różnym stopniu odsunięcia tych grup od łańcucha głównego

polimeru, a także różnym sposobie połączenia ugrupowania kwasu boronowego z łańcuchem polimerowym co schematycznie przedstawiłam na Rysunku 36.

W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymałam następujące materiały (I-IX):





VIII

IX

Rysunek 36. Materiały funkcjonalizowane kwasami boronowymi oparte na chitozanie i skrobi

W związku z tym, że moim celem było otrzymanie nośników do efektywnego wiązania AGP, które jednocześnie znacznie ułatwiłyby pracę z białkiem, dalsze etapy polegały na charakterystyce otrzymanych polimerów i sprawdzeniu ich potencjalnej zdolności do tworzenia wiązania z węglowodanami, a następnie otrzymania nanocząstek magnetycznych pokrywanych tymi makrocząsteczkami. Dlatego też konieczna była wstępna ocena zdolności otrzymanych przez mnie polimerów do tworzenia wiązań z modelowym sacharydem, którym była glukoza. Badania wiązania glukozy przeprowadziłam przy dwóch różnych wartościach pH: fizjologicznym (pH 7,4) i zasadowym (pH 9). Jak wspomniałam w części poglądowej pracy, wiązanie diolu przez kwasy borowe jest preferowane w środowisku alkalicznym. Ilość związanej glukozy oznaczono metodą DNS (kwas 3,5 dinitrosalicylowy), uzyskując pozytywny wynik dla wszystkich otrzymanych polimerów. Dlatego kolejnym etapem była synteza nanocząstek magnetytu (Fe_3O_4) z modyfikowanymi powłokami polimerowymi zdolnymi do wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny w oparciu o opracowane procedury, a następnie charakterystyka ich właściwości. Dla otrzymanych nanocząstek magnetycznych zbadałam ich zdolność do wiązania AGP uzyskując pozytywne wyniki dla wszystkich materiałów. W ostatnim etapie postanowiłam porównać otrzymane wyniki wiązania AGP oraz takie właściwości jak hydrofilowość-hydrofobowość, porowatość, stabilność termiczna, i przede wszystkim strukturę polimeru, z ilością związanego przez materiał białka.

Materiały zdolne do wiązania kwaśnej glikoproteiny, poza wykorzystaniem ich jako nośniki AGP, mogą być użyte w wielu innych zastosowaniach, takich jak: wychwytywanie ligandów lub tworzenie testów diagnostycznych oraz wyznaczanie parametrów farmakokinetycznych substancji czynnych. Ponadto, ze względu na fakt, że wirusy w swojej budowie posiadają białka powierzchniowe (zwane glikoproteinami otoczki), umożliwiające wniknięcie wirusa do komórki gospodarza, prowadząc tym samym do zakażenia, można próbować znaleźć zastosowanie dla tych materiałów również w tym obszarze. Pandemia COVID-19 pokazała, że diagnostyka i poszukiwanie nowych leków oraz materiałów odpornych na wirusy stanowi aktualnie szczególnie ważny nurt w naukach medycznych i materiałowych. Syntetyzowane w niniejszej pracy materiały mogą zatem wykazywać zdolność do dezaktywacji patogenów na drodze selektywnego i szybkiego wiązania glikoprotein. Wirusy, których glikoproteiny otoczki zostałyby kowalencyjnie związane z powierzchnią materiału, nie będą zdolne do wywołania zakażenia, a także do przenoszenia się i namnażania. Jest to hipoteza, która wymaga potwierdzenia przez zbadanie oddziaływania materiału z glikoproteinami izolowanymi z wirusów.

Dodatkowo, otrzymane materiały, ze względu na obecność wolnych grup dihydroksyborylowych, mogą znaleźć potencjalne zastosowanie jako czynniki sieciujące w innych dziedzinach współczesnych technologii.

Część eksperymentalna

5. Aparatura

Do syntezy polimerów i nanocząstek używano mieszadła mechanicznego Heidolph RZR 2020 oraz mieszadła magnetycznego z grzaniem RCT basic IKAMAG® firmy VWR. Otrzymane nanocząstki suszono w suszarce próżniowej BINDER, seria VD, firmy VWR.

Wielkość nanocząstek oznaczono metodą dyspersyjnego rozpraszania światła (DLS), za pomocą aparatu Zetasizer NANO-ZS90 oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej przy użyciu mikroskopu produkcji FEI Europe, model Tecnai F20 X-Twin, o atomowej zdolności rozdzielczej.

Widma ATR-FTIR zarejestrowano za pomocą spektrometru ATR-FTIR Spectrum 2000 firmy Perkin Elmer, używając przystawki ATR do ciał stałych, z kryształem diamentowym. Widmo rejestrowano w zakresie 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} przy rozdzielczości 4 cm^{-1} w temperaturze pokojowej i liczbie 64 skanów; stosowano korekcję linii bazowej i normalizację porównywanych widm.

Zdjęcia SEM wykonano przy użyciu mikroskopu 1430 VP LEO Electron Microscopy Ltd (wszystkie próbki były w postaci proszków);

Pomiary kąta zwilżania wykonano za pomocą Goniometru (DSA 10, Kruss, Niemcy), wyposażonego w kamerę oraz oprogramowanie do analizy kształtu kropli i wyznaczania swobodnej energii powierzchniowej.

Analizę rentgenograficzną XRD przeprowadzono za pomocą dyfraktometru X'PERT firmy Pro Philips ($\text{CuK}\alpha 1$, długość fali $1,54056\text{ \AA}$). Wszystkie próbki rejestrowano w zakresie $2\theta\ 5\text{--}120^\circ$, przy $0,020^\circ$ i temperaturze pokojowej.

Analizę termiczną wykonano za pomocą termoanalyzera Simultaneous TGA-DTA Thermal Analysis TA Instruments typ SDT 2960 (atmosfera azotu oraz powietrza, szybkość grzania $10^\circ\text{C}/\text{min}$, grzanie do 600°C dla powietrza i 800°C dla azotu).

Parametry struktury porowatej oznaczono przy użyciu analizatora ASAP 2010 firmy Micromeritics, USA.

Widma ^{13}C NMR zarejestrowano za pomocą spektrometru NMR Bruker 700 MHz, a widma ^{11}B NMR za pomocą spektrometru NMR Bruker 400 MHz.

Toksyczność ostrą przygotowanych materiałów zbadano z wykorzystaniem aparatu Microtox® M500 (Modern Water, Cambridge, UK).

Immobilizację α -1-glikoproteiny kwaśnej przeprowadzono w termomikserze Heat MHR11 Easy Control, firmy VWR. Ilość związanej glikoproteiny oznaczono za pomocą spektrofluorymetru Jasco FP-8300 zaopatrzonego w przystawkę temperaturową.

Oznaczanie glukozy metodą DNS (kwasem 3,5 dinitrosalicylowym) wykonano przy użyciu spektrofotometru UV-Vis UV-1601 PC, firmy Shimadzu.

6. Materiały

Chitozan (o masie cząsteczkowej 50 000-190 000 Da i stopniu deacetylacji 70%), sześciowodny chlorek żelaza(III), etylenodiamina, nadjodan sodu, epichlorohydryna, chlorowodorek-(3-dimetyloaminopropyl)-3-etylokarbodiimidu (EDC), gliceryna, dijdometan, odczynnik ninhydrynowy, kwas monochlorooctowy oraz α -1- kwaśna glikoproteina zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (Niemcy). Czterowodny chlorek żelaza(II), kwas octowy, wodorowęglan sodu, wodorotlenek sodu, węglan sodu, kwas 3,5 dinitrosalicylowy, aldehyd glutarowy oraz metanol kupiono w firmie POCh (Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice). Skrobia kukurydziana pochodziła z firmy Vitargo®. Kwas 3-aminofenyloboronowy i kwas 4-formylofenyloboronowy zakupiono w firmie Fluorochem. Do przygotowania roztworów użyto wody dejonizowanej.

7. Wyznaczanie stopnia deacetylacji chitozanu

Stopień deacetylacji chitozanu (DA) wyznaczono na podstawie widma NMR ^{13}C , wykonanego w ciele stałym i obliczono na podstawie równania (1) [155]:

$$DA = \frac{\int N-CH_3}{\frac{1}{6}(\int C1 + \int C2 + \int C3 + \int C4 + \int C5 + \int C6)} * 100 \quad (1)$$

Gdzie: $\int N - CH_3$ jest całką węgla metylowego,

$\int C1 + \int C2 + \int C3 + \int C4 + \int C5 + \int C6$ - jest sumą całek atomów węgla pierścienia glukopiranozylowego.

8. Wyznaczanie zawartości amylozy i amylopektyny w skrobi

Oznaczanie procentowej zawartości amylozy i amylopektyny zostało przeprowadzone za pomocą testu Amylose/Amylopectin Assay Kit zakupionego w firmie Megazyme [179,180].

9. Określenie ilości pierwszorzędowych grup aminowych na powierzchni modyfikowanych polimerów

Ilość grup aminowych na powierzchni otrzymanych polimerów określono wykorzystując standardową metodę ninhydrynową [156, 157]. W tym celu przygotowano krzywą wzorcową, rejestrując widma absorpcyjne siedmiu roztworów glicyny o stężeniach 0,6-2 mM. Do probówek pobrano po 2 mL każdego z przygotowanych roztworów oraz dodano 2 mL odczynnika ninhydrynowego. Próbkę odniesienia stanowił roztwór, zawierający po 2 mL wody dejonizowanej i reagentu ninhydrynowego. Chitozan z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej (Cs1), chitozan z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs2) i chitozan z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs3) rozpuszczono w buforze octanowym (2 mL 0,1 mM o pH=5,5), a następnie dodano odczynnik ninhydrynowy (2 mL).

Wszystkie próbki wytrząsano ręcznie oraz ogrzewano we wrzącej wodzie przez 30 minut. Po tym czasie, roztwory ochłodzono i dodano 50% roztworu alkoholu etylenowego (3 mL).

Ilość pierwszorzędowych grup aminowych określono spektrofotometrycznie, mierząc absorbancję przy długości fali równej 570 nm. Dla każdej próby wykonano trzy powtórzenia.

10. Określenie zawartości grup aldehydowych na powierzchni modyfikowanych polimerów

Ilość grup aldehydowych na powierzchni utlenionych polimerów określono metodą miareczkowania alkacymetrycznego. Do kolby Erlenmeyera odważono skrobię dialdehydową (0,1 g) i dodano roztwór NaOH (5 mL, 0,2503 M). Całość ogrzewano w temperaturze 70°C na łaźni wodnej do całkowitego rozpuszczenia próbki. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, dodano roztwór HCl (7,5 mL, 0,2508 M), wodę dejonizowaną (15 mL) i 2 krople roztworu fenoloftaleiny, po czym rozpoczęto miareczkowanie roztworem NaOH (0,2503 M). Dla każdej próby wykonano trzy powtórzenia. Zawartość grup aldehydowych obliczono ze wzoru:

$$ALD (\%) = \frac{C_1V_1 - C_2V_2}{m/M} \cdot 100 \% \quad (2)$$

gdzie: C_1 i V_1 to stężenie (mol/L) i objętość (L) roztworu NaOH; C_2 i V_2 to stężenie (mol/L) i objętość (L) roztworu HCl; m to masa próbki (g), M to masa cząsteczkowa powtarzającej się jednostki w skrobi dialdehydowej ($M = 160$ g/mol).

W analogiczny sposób obliczono ilość grup aldehydowych na powierzchni chitozanu dialdehydowego.

11. Określenie stopnia podstawienia grupami karboksylowymi na powierzchni modyfikowanych polimerów (DS)

Stopień podstawienia (DS) w karboksymetylowanych polimerach oznaczono za pomocą metody miareczkowania alkacymetrycznego [148]. Do kolby Erlenmeyera odważono modyfikowany polimer (0,2 g), po czym dodano roztwór NaOH (20 mL, 0,0503 M) i mieszano przez 1 godzinę za pomocą mieszadła magnetycznego w temperaturze pokojowej. Następnie dodano roztwór fenoloftaleiny (2 krople) i próbkę miareczkowano roztworem HCl (0,0605 M). Każdą próbę wykonano trzykrotnie. Stopień podstawienia wyliczono na podstawie wzoru:

Dla karboksymetyloskrobii:

$$DS = \frac{162 \cdot (C_1V_1 - C_2V_2)}{m - (58 \cdot (C_1V_1 - C_2V_2))} \quad (3)$$

gdzie $C_1 V_1$ to stężenie (mol/L) i objętość (L) roztworu NaOH; $C_2 V_2$ to stężenie (mol/L) i objętość (L) roztworu HCl; m masa próbki (g), 162 -masa molowa jednostki glukozy (g/mol), 58 masa molowa grupy karboksymetylowej (g/mol)

Dla karboksymetylochitozanu:

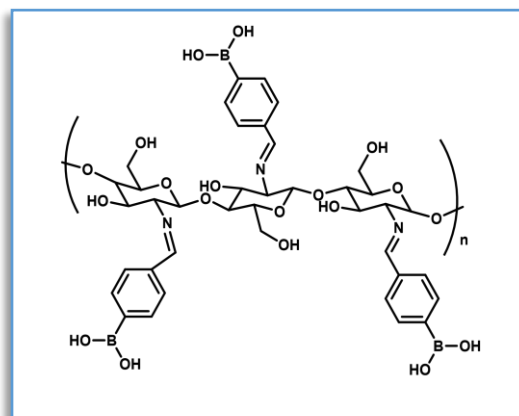
$$DS = \frac{161 \cdot (C_1 V_1 - C_2 V_2)}{m - (58 \cdot (C_1 V_1 - C_2 V_2))} \quad (4)$$

gdzie C_1 i V_1 to stężenie (mol/L) i objętość (L) roztworu NaOH; C_2 i V_2 to stężenie (mol/L) i objętość (L) roztworu HCl; m masa próbki (g), 161 -masa molowa jednostki glukozaminowej (g/mol), 58 masa molowa grupy karboksymetylowej (g/mol)

12. Modyfikacja chitozanu

12.1. Chitozan modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzonym wiązaniem iminowym (Cs-4FPBA) (1)

Syntezę tego materiału przeprowadzono modyfikując opisaną w literaturze procedurę [191]. W kolbie okrągłodennej (250 mL) umieszczono chitozan (1.0 g) i metanol (30 mL). Następnie dodano kwas 4-formylofenyloboronowy (0.8 g, 5.3mmol) rozpuszczony w metanolu (25 mL) i całość mieszano przez 24 godziny w temperaturze 55°C. Następnie mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej. Osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym przemyto wodą dejonizowaną (20 mL) i metanolem (50 mL). Produkt suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.



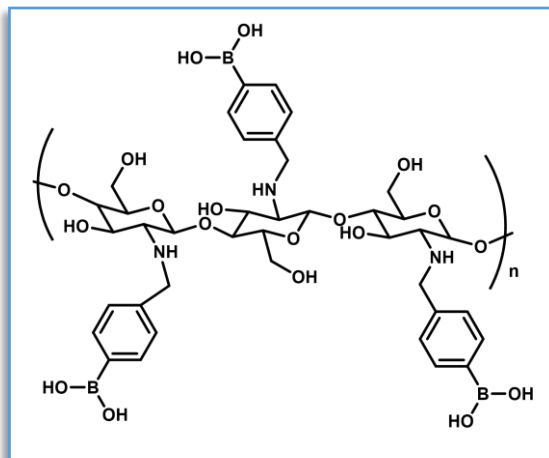
^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm; 15,2 (C8); 61,5 (C2,C6); 72,4 (C3, C5); 82,0 (C4); 101,9 (C1); 130,3 (C_{AR}); 171,5 (C7, C=N)

^{11}B NMR (ciało stałe), δ ppm; 2,1

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3350 (-OH), 1640 (C=N), 1410 (C-B), 1370 (B-O), 814 (C-H), 700 (C-H)

12.2. Chitozan modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzonym wiązaniem aminowym (Cs-4FPBA-R) (2)

Syntezę tego materiału przeprowadzono modyfikując metodę opisaną w literaturze [192]. Pierwszy etap syntezy tego związku był analogiczny jak opisano w punkcie 13.1. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej, dodano porcjami metanolewy roztwór NaBH_4 (0,44 M, 30 mL). Mieszaninę ponownie ogrzano do temperatury 55°C i kontynuowano mieszanie w tej temperaturze przez 12 godzin. Następnie mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej, a osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto wodą dejonizowaną (20 mL) oraz metanolem (50 mL). Produkt suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.



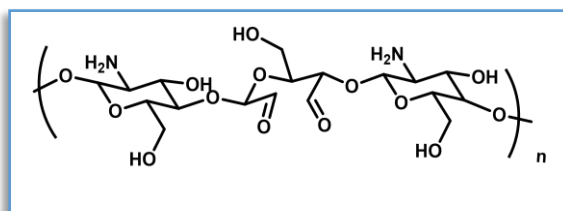
^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm; 22,5 (C8); 58,1 (C2,C6, C-N); 74,4 (C3, C5); 82,2 (C4); 104,5 (C1); 135,2 (C_{AR}); 174,3 (C7)

^{11}B NMR (ciało stałe), δ ppm; 2,2

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3350 (-OH), 1556 (-NH-), 1411 (C-B), 1370 (B-O), 814 (C-H), 700 (C-H)

12.3. Chitozan dialdehydowy (DACs) (3)

Syntezę chitozanu dialdehydowego przeprowadzono w sposób analogiczny do procedury opracowanej i opisanej przez nasz zespół [181]. W kolbie okrągłodennej (250 mL)



rozpuszczono chitozan (1,0g) w roztworze kwasu octowego ($\text{C} = 1\%$, 100 mL). Następnie dodano wodny roztwór nadjodanu sodu (0,7 M, 10 mL). Aby zapobiec rozkładowi NaIO_4 pod wpływem światła, kolbę natychmiast owinięto folią aluminiową, a jej zawartość mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego w temperaturze 40°C przez 3 godziny. Po tym czasie mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej, a produkt wytrącono przez

dodanie acetonu (100 mL). Następnie osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto wodą dejonizowaną (3x15mL) i acetonem (50mL). Produkt suszono w atmosferze powietrza w temperaturze pokojowej przez 24 godziny.

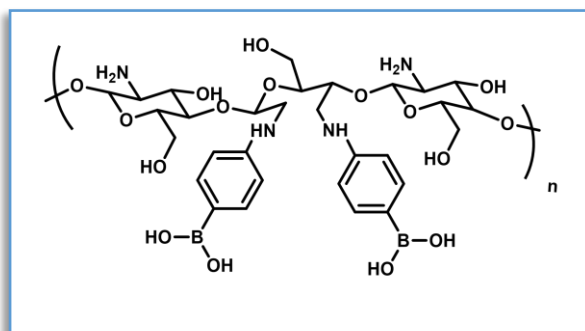
^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm; 22,6 (C8); 54,8 i 59,0 (C2,C6); 72,6 (C3, C5); 82,4 (C4); 98,3 (C1); 175,8 (C8, C=O)

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3355 (-OH), 1742 (C=O), 1630 (C=O), 1400 (-O-C-O-), 767 (C-H), 722 (C-H)

Oznaczona zawartość grup aldehydowych: 29%

12.4. Chitozan dialdehydowy modyfikowany kwasem 3-aminofenyloboronowym (DACs-PBA) (4)

W kolbie okrągłodennej (50mL) rozpuszczono kwas 3-aminofenyloboronowy (0,1 g; 0,73 mmola) w metanolu (3mL), następnie dodano zawiesinę chitozanu dialdehydowego (1.0 g) w metanolu (10 mL) i mieszano przez 24 godziny w 55°C



za pomocą mieszadła magnetycznego. Mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej i dodano metanолоwый roztwór NaBH_4 (0,013 M, 3 mL). Kontynuowano mieszanie w temperaturze 55°C przez 6 godzin. Następnie układ ochłodzono do temperatury pokojowej, osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

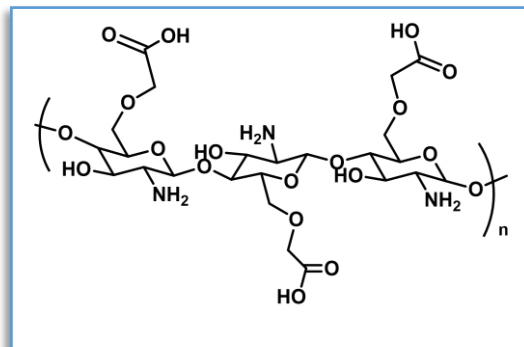
^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm; 22,6 (C8); 54,5 i 61,1 (C2,C6, C-N); 74,6 (C3, C5); 82,9 (C4); 104,6 (C1); 137,8 (C_{AR}); 177,0 (C7)

^{11}B NMR (ciało stałe), δ ppm; 5,3

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3310 (-OH), 1632 (N-H), 1419 (C-B), 1372 (B-O), 792 (C-H), 760 (C-H)

12.5. Karboksymetylochitozan (CMCs) (5)

Syntezę karboksymetylochitozanu przeprowadzono w sposób analogiczny do procedury opisanej w literaturze [177]. W kolbie okrągłodennej (100 mL) umieszczono chitozan (1 g) w wodnym roztworze wodorotlenku sodu (10 M, 10mL) i mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego przez 30 min w temperaturze



pokojojej. Następnie dodawano porcjami wodny roztwór kwasu monochlorooctowego (7 M, 3 mL). Układ reakcyjny ogrzano do temperatury 60°C i mieszano w tej przez 5 godzin. Następnie mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej i dodano 70% alkohol etylowy (25 mL). Osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto 70% alkoholem etylowym (25 mL), a następnie suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 50°C przez 24h. Uzyskaną sól sodową karboksymetylochitozanu (CMCs(Na)) (1g) rozpuszczono w wodzie dejonizowanej (100mL) i dodano stężonego kwasu chlorowodorowego (3 mL), do momentu uzyskania roztworu o pH = 2. Następnie porcjami dodawano 99% alkoholu etylowego do momentu wytrącenia produktu (około 50 mL). Uzyskany osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto 99% alkoholem etylowym (5x5 mL). Produkt suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

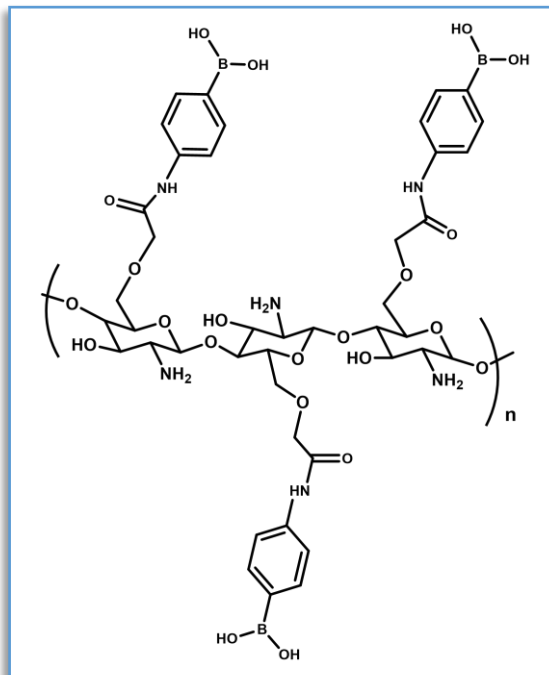
¹³C NMR (ciało stałe), δ ppm; 24,2(C8); 55,5 (C2,C6); 74,5 (C3, C5,CH₂-O-); 97,4 (C4); 97,4 (C1); 175,3 (C7, -COOH)

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3300 (-OH), 1733 (C=O), 1612 (C=O), 1508 (N-H), 1314 (C-N), 1064 (C-O-), 900 (C-H)

Stopień podstawienia grupami karboksylowymi: 0,29

12.6. Karboksylometylochitozan modyfikowany kwasem 3-aminofenyloboronowym (CMCs-PBA) (6)

W kolbie okrągłodennej (50 mL) rozpuszczono kwas 3-aminofenyloboronowy (0,1 g; 0,73 mmola) w metanolu (3mL). Następnie dodano karboksylometylochitozan CMCs (1,0 g) zawieszony w tym samym rozpuszczalniku (10 mL). Całość mieszano przez 24 godziny w temperaturze 55°C za pomocą mieszadła magnetycznego. Po tym czasie mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej, osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto metanolem (3x5 mL), a następnie suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.



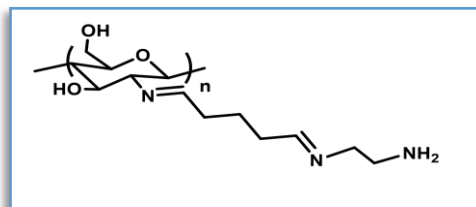
¹³C NMR (ciało stałe), δ ppm: 59,4 i 61,5 (C₂,C₆); 74,5 (C₃, C₅); 82,4 (C₄); 103,5 (C₁); 135,9 (C_{AR}); 171,5 (-CO-NHR)

¹¹B NMR (ciało stałe), δ ppm; 1,3

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3350 (-OH), 1600 (N-H), 1515 (C-N), 1413 (C-B), 1374 (B-O), 897 (C-H), 646 (C-H)

12.7. Chitozan z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej Cs1 (7)

Syntezę Cs1 wykonano w sposób analogiczny do procedury opracowanej w zespole i opisanej w literaturze [159]. W kolbie okrągłodennej (250 mL) umieszczono chitozan (0,5 g) w buforze wodorowęglanowym (50,0 mM; pH=10, 25 mL). Następnie dodano 5% wodny roztwór aldehydu glutarowego (25 mL) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę za pomocą mieszadła magnetycznego. Dodano wodnego roztworu etylenodiaminy (2 M, 50 mL) i kontynuowano



mieszanie w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Otrzymany osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto wodą dejonizowaną (5x10 mL) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

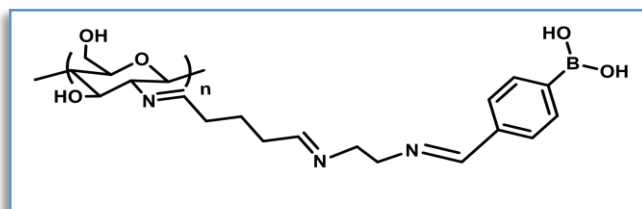
^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm; 56,8 (C2, C6, CH₂); 74,9 (C3, C5); 82,9 (C4); 104,4 (C1); 177,6 (C=N)

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3350 (-OH, -NH₂), 2872 (C-H), 1640 (C=N), 1552 (N-H), 1141 (C-N)

Ilość pierwszorzędowych grup aminowych: 3,24 mM/g

12.8. Chitozan z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym Cs1-FPBA (8)

W kolbie okrągłodennej (50 mL) rozpuszczono kwas 4-formylofenyloboronowy (0,250 g; 1,67 mmola) w metanolu (3 mL).



Następnie dodano chitozan z jedną

odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej (Cs1) (1,0 g) i metanol (10 mL), po czym całość mieszano przez 24 godziny w temperaturze 55°C za pomocą mieszadła magnetycznego. Roztwór ochłodzono do temperatury pokojowej, odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

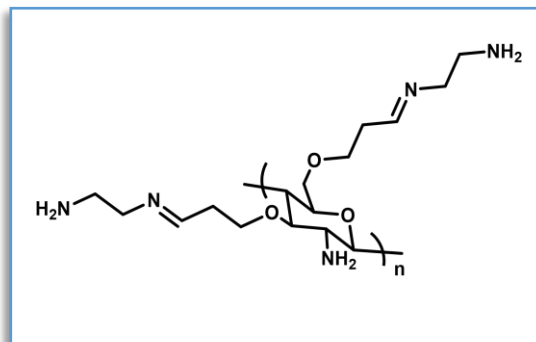
^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm: 58,9 (C2,C6, CH₂); 74,3 (C3, C5); 82,9 (C4); 104,3 (C1); 137,5 (C_{AR}); 174,8 (C=N)

^{11}B NMR (ciało stałe), δ ppm; 8,8

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3350 (-OH), 2872 (C-H), 1641 (C=N), 1549 (N-H), 1403 (C-B), 1362 (B-O), 827 (C-H), 736 (C-H)

12.9.. Chitozan z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej Cs2 (9)

Syntezę Cs2 przeprowadzono w sposób analogiczny do procedury opracowanej w zespole i opisanej w literaturze [159]. W kolbie okrągłodennej (250mL) umieszczono chitozan (0,5 g) w 30% wodnym roztworze wodorotlenku sodu (50 mL) i całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 20 minut.



Następnie dodano epichlorohydrynę (0,5 mL; 6,25 mmola) i ogrzewano w 50°C przez 2 godziny. Po ochłodzeniu, wprowadzono wodny roztwór nadjodanu sodu (0,37 M, 5 mL) i kontynuowano reakcję przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie dodano wodny roztwór etylenodiaminy (2 M, 50 mL) i mieszano w tych samych warunkach przez 2 godziny. Otrzymany osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto wodą dejonizowaną (5x10 mL) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

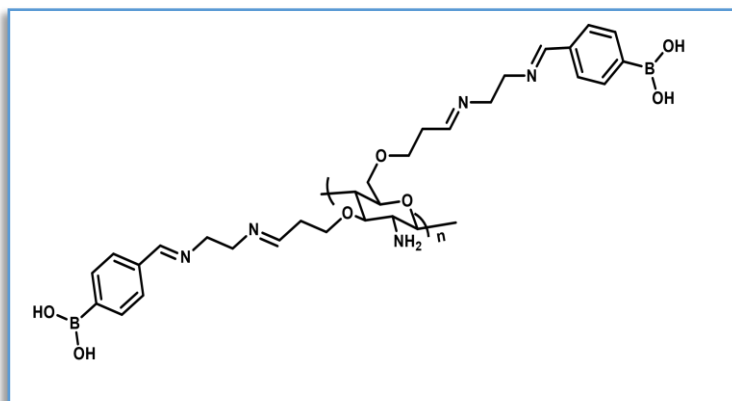
¹³C NMR (ciało stałe), δ ppm; 58,1 (C2,C6, CH₂); 74,0-78,2 (C3,C5,C4); 104,4 (C1); 172,1 (C=N)

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3354 (-OH, -NH₂), 2895 (C-H), 1650 (C=N), 1582 (N-H), 1032 (C-N)

Ilość pierwszorzędowych grup aminowych: 6,03 mM/g

12.10. Chitozan z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym Cs2-FPBA (10)

Syntezę Cs2-FPBA przeprowadzono w sposób analogiczny do procedury opisanej w punkcie 13.8., z użyciem jako substratu chitozanu z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs2).



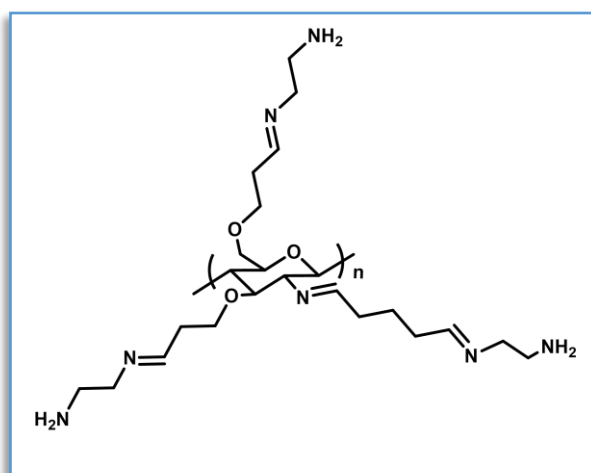
^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm: 56,3 (C2, C6, CH₂); 74,5 (C3, C5); 83,2 (C4); 104,6 (C1); 136,9 (C_{AR}); 176,3 (C=N)

^{11}B NMR (ciało stałe), δ ppm; 9,7

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3350 (-OH), 2866 (C-H), 1634 (C=N), 1593 (N-H), 1432(C-B), 1367 (B-O), 830 (C-H), 716 (C-H)

12.11. Chitozan z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej Cs3 (11)

Syntezę Cs3 otrzymano w sposób analogiczny do procedury opracowanej w zespole i opisanej w literaturze [159]. W kolbie okrągłodennej (250 mL) umieszczono chitozan (0,5 g) w wodnym roztworze wodorotlenku sodu (C=30%, 50 mL) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie dodano epichlorohydrynę (0,5 mL; 6,25 mmola), ogrzano do temperatury 50°C



i kontynuowano mieszanie przez 2 godziny. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej

dodano wodnego roztworu nadjodanu sodu (0,37 M, 5 mL) i mieszano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Osad odsączono, przemyto wodą dejonizowaną (5x10 mL) i przeniesiono do kolby o pojemności 250 mL. Dodano bufor wodorowęglanowy (50,0 mM, pH=10, 25 mL) oraz wodny roztwór aldehydu glutarowego (C= 5%, 25 mL). Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie wprowadzono wodny roztwór etylenodiaminy (2 M, 50 mL) i kontynuowano mieszanie w tych samych warunkach. Otrzymany osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto wodą dejonizowaną (5x10mL) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

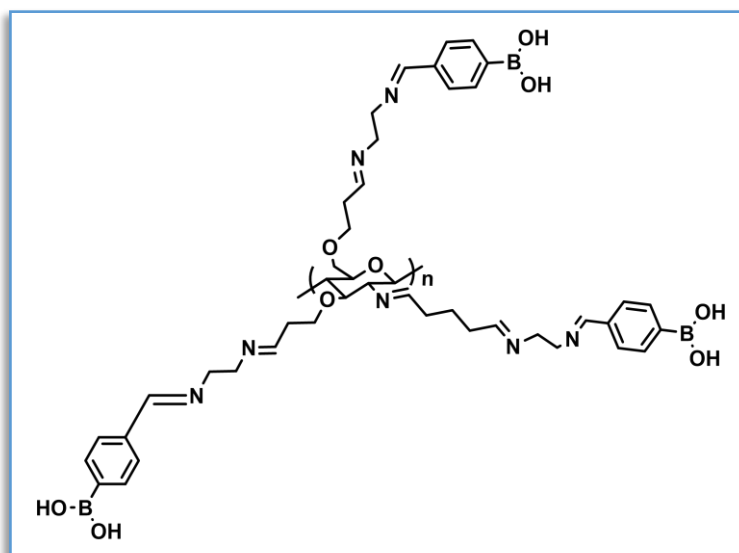
^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm; 56,8 (C2, C6, CH₂); 59,7 (C2, C6, CH₂); 74,9 (C3, C5); 82,0 (C4); 105,6 (C1); 175,4 (C=N)

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3315 (-OH, -NH₂), 2881 (C-H), 1631 (C=N), 1476 (N-H), 1081 (C-N)

Ilość pierwszorzędowych grup aminowych: 8,75 mM/g

12.12.Chitozan z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowany kwasem 4-formylofenyloboronowym Cs3-FPBA (12)

Syntezę Cs3-FPBA przeprowadzono w sposób analogiczny do procedury opisanej w punkcie 13.8. z użyciem jako substratu chitozanu z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs3).



^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm: 57,6 i 60,9 (C2,C6, CH₂); 74,3 (C3, C5); 83,5 (C4); 104,4 (C1); 133,8 (C_{AR}); 171,4 (C=N)

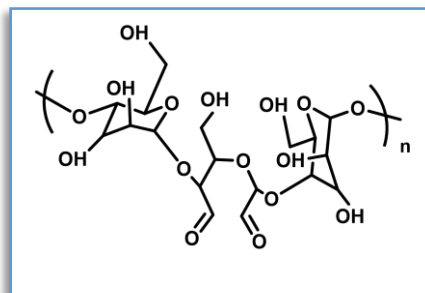
^{11}B NMR (ciało stałe), δ ppm; 8,1

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3350 (-OH), 1643 (C=N), 1550 (N-H), 1407 (C-B), 1320 (B-O), 824 (C-H), 744 (C-H)

13. Modyfikacja skrobi

13.1. Skrobia dialdehydowa DAS (13)

Syntezę skrobi dialdehydowej przeprowadzono w sposób analogiczny do procedury opracowanej w zespole i opisanej w literaturze [127]. W kolbie okrągłodennej (100 mL) rozpuszczono skrobię kukurydzianą (1,5 g) w wodzie dejonizowanej (30 mL). Dalsza procedura tj. ilość nadjodanu sodu, czas i temperatura reakcji oraz wytrącenie i suszenie produktu, przeprowadzono w sposób analogiczny jak w przypadku otrzymywania chitozanu dialdehydowego (DACs) (punkt 13.3).



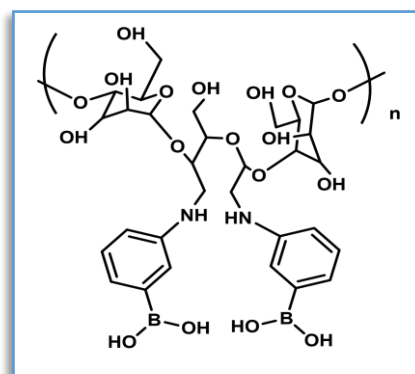
^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm; 59,9 (C6); 71,9 (C5), 85,2 i 89,7 (C2 i C3); 95,2 (C4); 100,0 (C1)

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3458 (-OH), 3392 (-OH), 1631 (C=O), 1156 (C-C), 1026 (C-O-C)

Zawartość grup aldehydowych: 29%

13.2. Skrobia dialdehydowa modyfikowana kwasem 3-aminofenyloboronowym (DAS-PBA) (14)

Syntezę DAS-PBA przeprowadzono w podobny sposób do procedury opisanej w punkcie 13.4. z użyciem jako substratu skrobi dialdehydowej (DAS). Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej. Ilość substratów, rozpuszczalników i czas prowadzonej reakcji nie uległ zmianie.



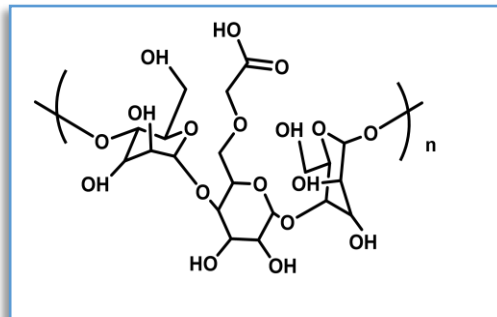
^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm; 60,24 (C6, C-N); 68,7 (C2, C3,C5); 90,4 (C4); 99,5 (C1), 130,1 (C_{AR})

^{11}B NMR (ciało stałe), δ ppm; 6,9

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3310 (-OH), 1641 (N-H), 1438 (C-B), 1337 (B-O), 1080 (C-O-C), 1030 (C-C), 794 (C-H), 765 (C-H)

13.3. Karboksymetyloskrobia (CMS) (15)

Syntezę przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [158]. W kolbie okrągłodennej (100 mL) umieszczono zawiesinę skrobi (3 g) w alkoholu etylowym (C=99%, 10 mL). Następnie dodawano porcjami wodny roztwór wodorotlenku sodu (5 M, 5 mL), przy ciągłym mieszaniu przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Do mieszaniny reakcyjnej dodano etanolowy roztwór kwasu monochlorooctowego (6,25 M, 2 mL) i kontynuowano mieszanie w temperaturze 60°C przez 5 godzin. Następnie wytrącony osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto alkoholem etylowym (C=70%, 5x5 mL). Produkt suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 50°C przez 24 godziny. Z uzyskaną solą sodową karboksymetyloskrobi CMS(Na) postępowano analogicznie, jak w przypadku soli sodowej karboksymetylochitozanu CMCs(Na), opisanej w punkcie 13.5.



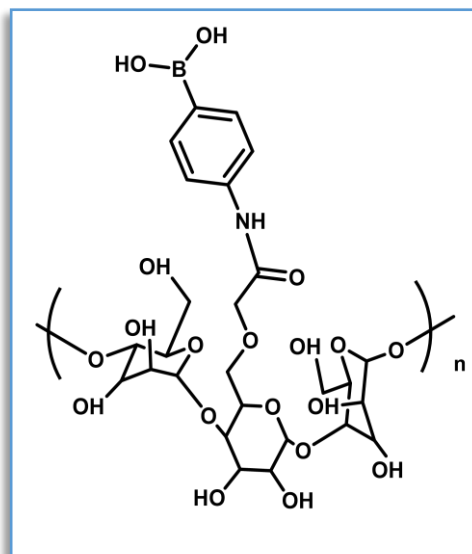
¹³C NMR (ciało stałe), δ ppm; 13,4 (-CH₂-), 60,7 (C6); 71,5 (C2, C3,C5); 80,9 (C4); 102,7 (C1), 174,8 (-COOH)

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3367 (-OH), 1729 (C=O), 1644 (C=O) 1229 (C-H), 1131 (C-C), 1087(C-O-C), 1004 (C-C), 719 (C-H)

Stopień podstawienia grupami karboksylowymi: 0,31

13.4. Karboksymetyloskrobia modyfikowana kwasem 3-aminofenyloboronowym CMS-PBA (16)

W kolbie okrągłodennej (50 mL) umieszczono zawiesinę karboksymetyloskrobi (CMS) (1.0g) w wodzie dejonizowanej (20mL) i dodano 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC) (10,0 mg; 0,06 mmol) rozpuszczonego w wodzie destylowanej (2mL). Całość mieszano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano rozpuszczony w wodzie (3mL) kwas 3-aminofenyloboronowy (0,1 g; 0,73 mmola) i kontynuowano mieszanie przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto wodą dejonizowaną (3x5mL). Produkt suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.



¹³C NMR (ciało stałe), δ ppm; 13,3 (-CH₂-), 61,3 (C₆); 71,7 (C₂, C₃, C₅); 81,8 (C₄); 102,6 (C₁), 131,3 (C_{AR}) 173,0 (-CO-NHR)

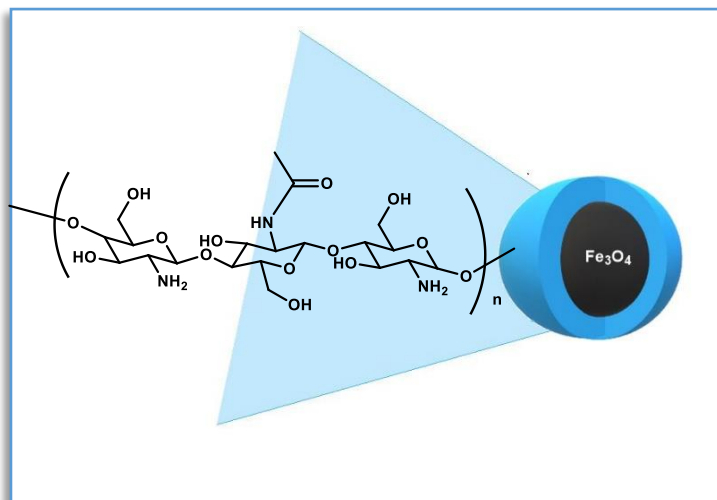
¹¹B NMR (ciało stałe), δ ppm; 6,9

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3350 (-OH), 1726 (C=O), 1557 (N-H, C-N) 1429 (C-B), 1366 (B-O), 1131 (C-O-C), 1007 (C-C), 862 (C-H), 757 (C-H)

14. Synteza nanocząstek magnetycznych

14. 1. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozaniem Cs-MNPs (17)

Syntezę przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [122]. W kolbie dwuszyjnej (250 mL) rozpuszczono chitozan (1,0 g) w kwasie octowym (C=1% 100 mL). Następnie dodano tetrahydrat chlorku żelaza(II) (0,74 g; 3,7 mmol) i heksahydrat chlorku żelaza(III) (2,03g; 7,5

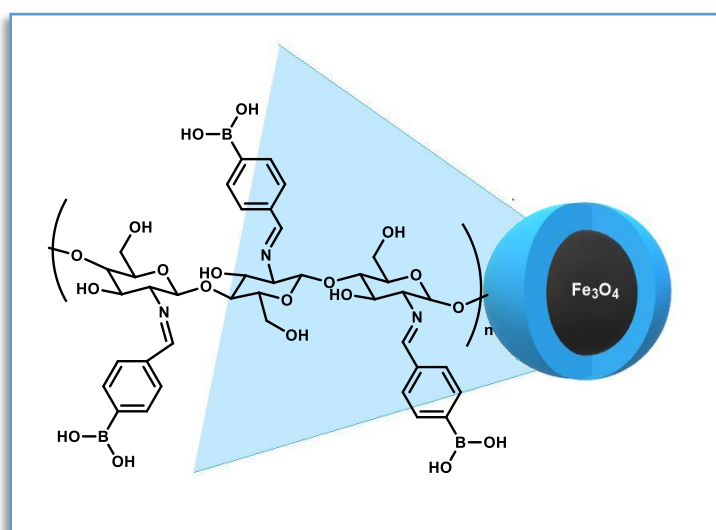


mmol), po czym wkroplono 30% wodny roztwór wodorotlenku sodu (30 mL) do uzyskania pH=13. Utworzony czarny osad nanocząstek oddzielono za pomocą magnesu, przemyto wodą dejonizowaną (5x10 mL) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3265 (-OH, -NH-), 2958 (-CH-), 1647 (N-H), 1558 (N-H), 1432 (C-H), 1391 (C-H), 1109 (C-N, C=O), 865 (C-H), 560 (Fe-O)

14.2. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozaniem modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania iminowego (Cs-FPBA-MNPs) (18)

W kolbie okrągłodennej (250 mL) umieszczono nanocząstki magnetyczne pokryte chitozaniem (1,0 g) oraz metanol (20 mL). Następnie dodano kwas 4-formylofenyloboronowy (0,3 g; 2,00 mmol) rozpuszczony w metanolu (20 mL). Całość mieszano w temperaturze 55°C przez 24 h. Następnie mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej, a otrzymane nanocząstki magnetyczne oddzielono

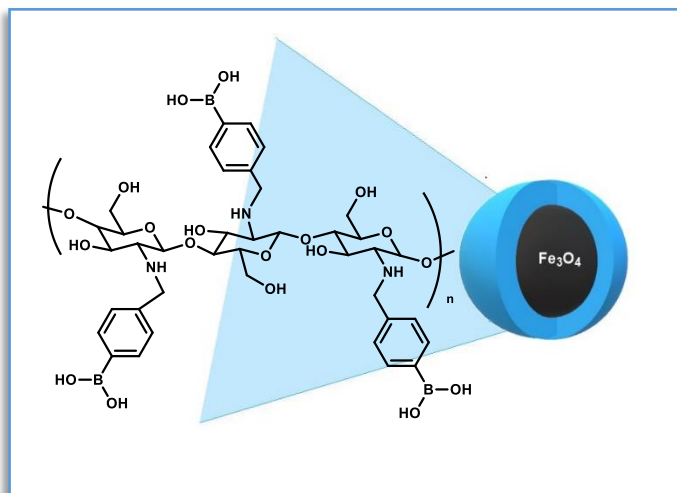


za pomocą magnezu i przemyto wodą dejonizowaną (5x5 mL) i metanolem (20 mL). Produkt suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3293 (-OH), 1644 (C=N), 1410 (C-B), 1368 (B-O), 893 (C-H), 558 (Fe-O)

14.3. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania aminowego (Cs-FPBA-R-MNPs) (19)

Pierwszy etap syntezy tego materiału był analogiczny do opisanego w punkcie 15.2. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej do mieszaniny dodano porcjami metanolowy roztwór NaBH_4 (0,61 M, 10 mL). Mieszaninę ponownie podgrzano do temperatury 55°C i kontynuowano reakcję w tej

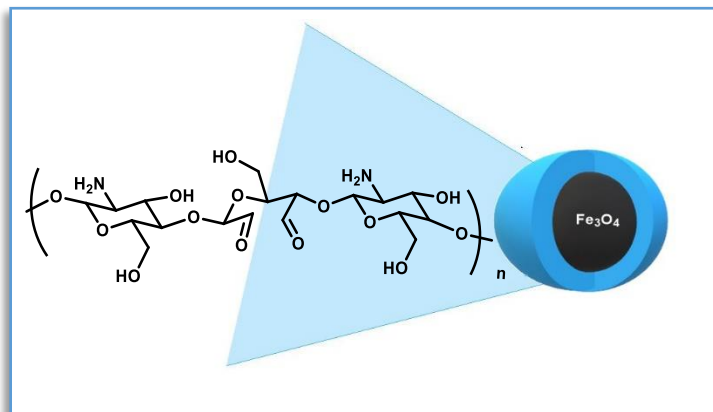


temperaturze przez 12 h. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej, magnetyczne nanocząstki oddzielono, przemyto i suszono w sposób analogiczny, jak opisano w punkcie 15.2.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3287 (-OH), 1577 (N-H), 1460 (C-B), 1342 (B-O), 570 (Fe-O)

14.4. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem dialdehydowym DACs-MNPs (20)

W kolbie okrągłodennej (50 mL) umieszczono nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem (1,0 g) oraz wodę dejonizowaną (10 mL). Następnie dodano wodnego roztworu nadjodanu sodu (0,7 M, 5 mL).

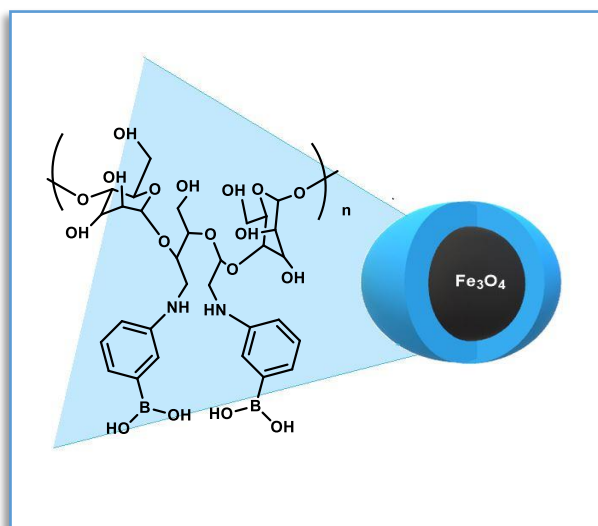


Aby zapobiec degradacji NaIO_4 pod wpływem światła, kolbę natychmiast owinięto folią aluminiową. Zawartość kolby ogrzano do temperatury 40°C i mieszano w tej temperaturze przez 3 godziny. Po ochłodzeniu układu do temperatury pokojowej, postępowano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 15.2.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3309 (-OH), 1743 (C=O), 1647 (C=O), 1071 (-O-C-O-), 575 (Fe-O)

14.5. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem dialdehydowym modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym DACs-PBA-MNPs (21)

W kolbie okrągłodennej (100 mL) umieszczono nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem dialdehydowym (DAC-MNPs) oraz metanol (15 mL). Następnie dodano kwas 3-aminofenyloboronowy (0,15 g, 1 mmol) rozpuszczony w metanolu (3 mL). Całość mieszano przez 24 godziny w temperaturze 50°C . Następnie ochłodzono do temperatury pokojowej,

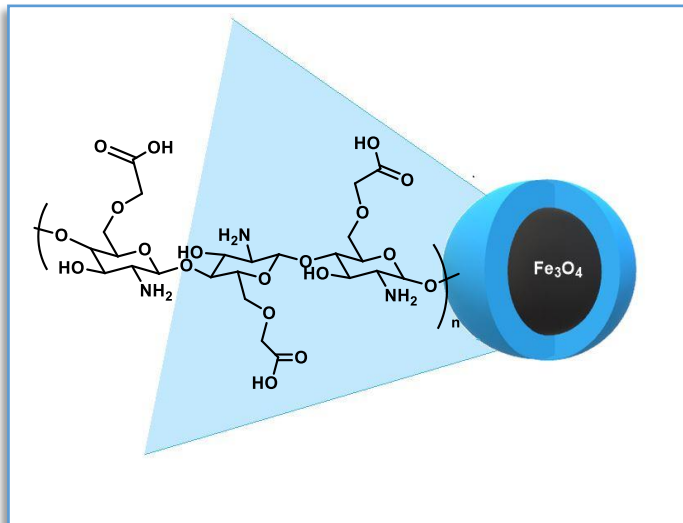


dodano metanolowy roztwór NaBH_4 (26,5 mM, 2 mL) i ponownie ogrzano do temperatury 50°C . Kontynuowano mieszanie w tej temperaturze przez 6 h. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej. Nanocząstki magnetyczne oddzielono za pomocą magnesu, przemyto metanolem (3×10 mL) i suszono w sposób analogiczny, jak w procedurze opisaną w punkcie 15.2.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3322 (-OH), 1638 (N-H), 1419 (C-B), 1378 (B-O), 570 (Fe-O)

14.6. Nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetylochitozanem CMCs-MNPs (22)

W kolbie okrągłodennej (100 mL) umieszczono nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem (3 g) oraz alkohol etylowy (10 mL). Następnie, w temperaturze pokojowej dodawano porcjami wodny roztwór wodorotlenku sodu (5.0 M, 2 mL) przez 30 minut, ciągle mieszając. W kolejnym etapie, do mieszaniny reakcyjnej

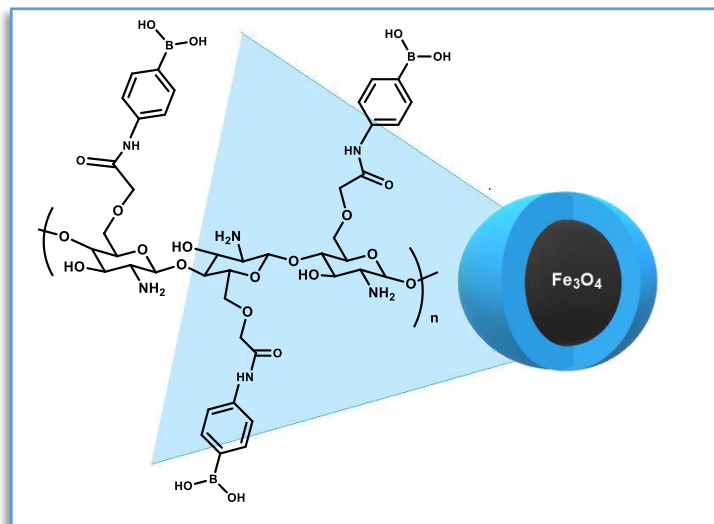


do mieszaniny reakcyjnej dodano etanolowy roztwór kwasu monochlorooctowego (5,08 M, 1mL) i kontynuowano mieszanie w temperaturze 60°C przez 5 godzin. Nanocząstki magnetyczne oddzielono za pomocą magnesu, przemyto alkoholem etylowym (3x10 mL) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3280 (-OH), 1588 (C=O), 1444 (C-H), 1058 (-C-O-), 894 (C-H), 794 (C-H), 568 (Fe-O)

14.7. Nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetylochitozanem modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym CMCs- PBA-MNPs (23)

W kolbie okrągłodennej (50 mL) umieszczono magnetyczne nanocząstki pokryte solą sodową karboksymetylochitozanu (CMCs) (2.5 g) w wodzie dejonizowanej (20 mL). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano rozpuszczony w wodzie (3 mL) kwas 3-

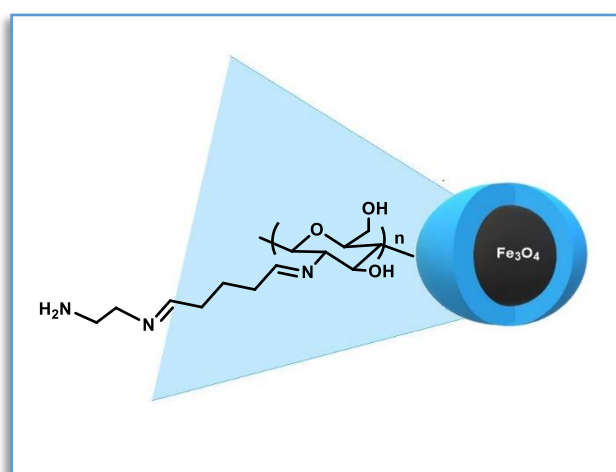


aminofenyloboronowy (0,1 g; 0,73 mmola). Całość mieszano za pomocą mieszadła mechanicznego przez 24 godzin w temperaturze pokojowej. Nanocząstki magnetyczne oddzielono za pomocą magnezu, przemyto wodą dejonizowaną (3x10mL) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3255 (-OH), 1587 (C-N), 1403 (C-B). 1327 (B-O), 710 (C-H), 574 (Fe-O)

14.8. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej (Cs1-MNPs) (24)

Syntezę przeprowadzono zgodnie z procedurą opracowaną w zespole i opisaną w literaturze [122]. W kolbie dwuszyjnej (250 mL) rozpuszczono chitozan (1,0 g) w kwasie octowym (C=1% 100 mL), mieszając za pomocą mieszadła mechanicznego. Następnie dodano tetrahydrat chlorku żelaza(II) (0,74g; 3,75 mmol)

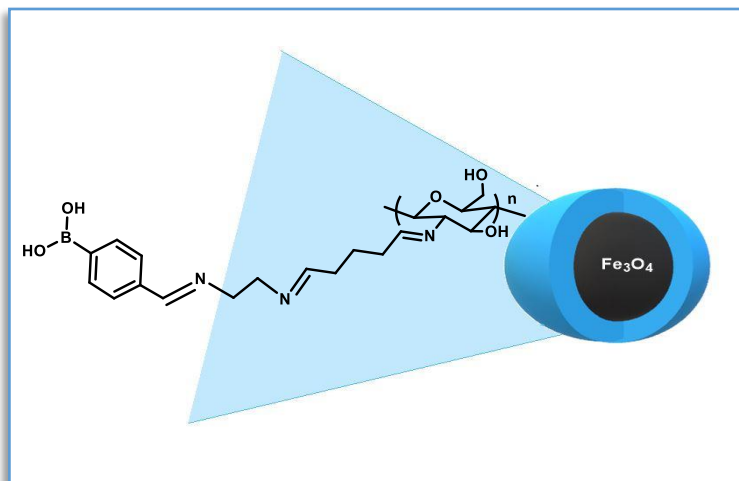


i heksahydrat chlorku żelaza(III) (2,03g; 7,5 mmol, po czym wkroplono 30% wodny roztworu NaOH (10 mL) do uzyskania pH=13. Uzyskane magnetyczne nanocząstki oddzielono za pomocą magnezu, przemyto wodą dejonizowaną (5x5 mL) i przeniesiono do kolby o pojemności 100 mL. Dodano buforu wodorowęglanowego (50 mM pH = 10, 10 mL) i 5% wodnego roztworu aldehydu glutarowego (C=5%, 10 mL). Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie dodano wodnego roztworu etylenodiaminy (2 M, 20 mL) i kontynuowano mieszanie w temperaturze pokojowej przez następne 2 godziny. Otrzymane nanocząstki magnetyczne oddzielono za pomocą magnezu, przemyto wodą dejonizowaną (5x5 mL) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3353(-OH), 3288 (-NH₂), 2866 (C-H), 1653 (C=N), 1584 (N-H) 1062 (C-N), 577 (Fe-O)

14.9. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozaniem z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs1-FPBA-MNPs) (25)

W kolbie okrągłodennej (50 mL) umieszczono nanocząstki magnetyczne pokryte chitozaniem z jedną odsuniętą grupą aminową w jednostce glikozydowej (Cs1-MNP) (1,0 g) oraz dodano metanol (20 mL) i kwas 4-formylofenyloboronowy (0,150 g; 1,0 mmola)

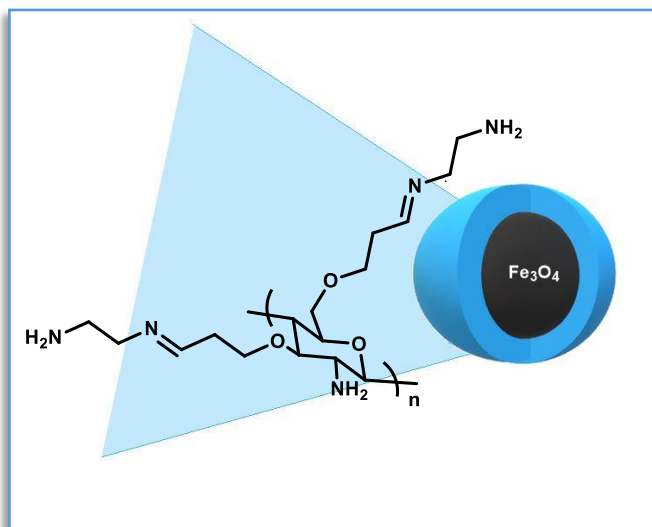


rozpuszczony w metanolu (2 mL). Mieszaninę ogrzano do temperatury 55°C i mieszano w tej temperaturze przez 24 godziny, po czym całość ochłodzono do temperatury pokojowej. Nanocząstki magnetyczne oddzielono za pomocą magnesu i przemyto metanolem (3x5 mL). Produkt suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3259 (-OH), 2882 (C-H), 1641 (C=N), 1406 (B-C), 1322 (B-O), 570 (Fe-O)

14.10. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej Cs2-MNPs (26)

Syntezę przeprowadzono zgodnie z procedurą opracowaną w zespole i opisaną w literaturze [122]. W kolbie dwuszyjnej (250 mL) rozpuszczono chitozan (1,0 g) w kwasie octowym (C=1%, 100mL) mieszając rozwór za pomocą mieszadła mechanicznego. Następnie dodano tetrahydrat chlorku

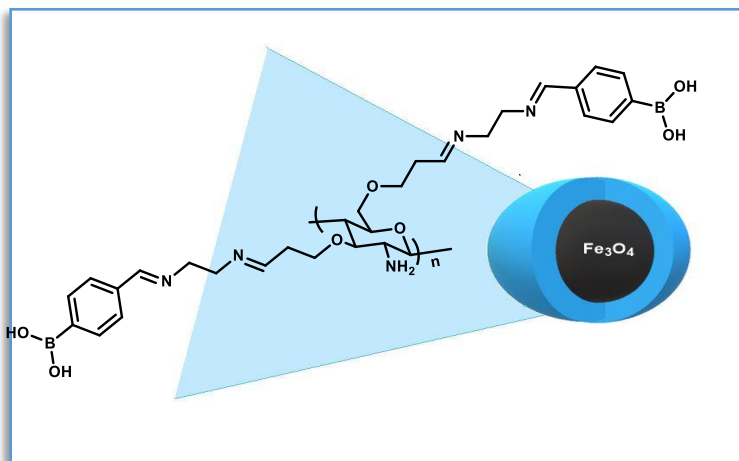


żelaza(II) (0,74g; 3,75 mmol) i heksahydrat chlorku żelaza(III) (2,03g; 7,5 mmol), po czym wkroplono 30% wodny roztwór NaOH (10 mL) do uzyskania pH=13. Następnie dodano epichlorohydrynę (0,2 mL, 2,5 mmola), a całość ogrzano do temperatury 50°C i mieszano za pomocą mieszadła mechanicznego przez 2 godziny. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano wodny roztwór nadjodanu sodu (0,3 M, 2,5 mL) i mieszano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie dodano wodny roztworu etylenodiaminy (2 M, 20 mL) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Nanocząstki magnetyczne oddzielono za pomocą magnesu, przemyto wodą dejonizowaną (5x5 mL) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 h.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3348 (-OH), 3285 (-NH₂), 2863 (C-H), 1650 (C=N), 1556 (N-H), 1029 (C-N), 562 (Fe-O)

14.11. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs2-FPBA-MNPs) (27)

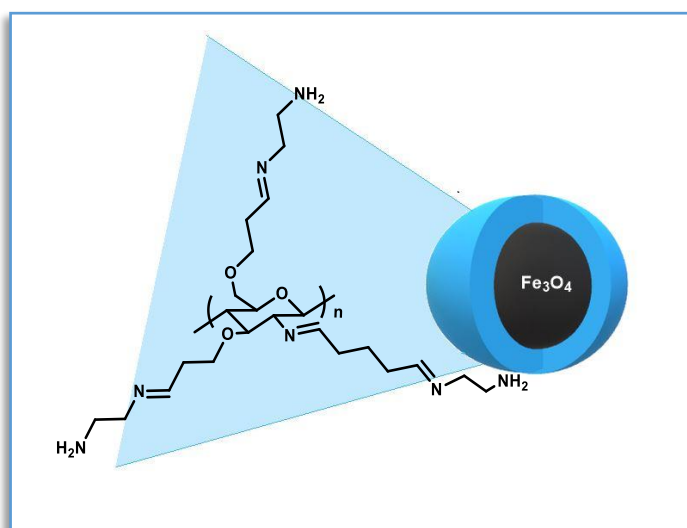
Syntezę Cs2-FPBA-MNPs przeprowadzono w sposób analogiczny do procedury opisanej w punkcie 15.9., z użyciem jako substratu nanocząstek magnetycznych pokrytych chitozanem z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs2-MNPs).



ATR-FTIR (cm^{-1}): 3227 (-OH), 2857 (C-H), 1683 (C=N), 1575 (N-H), 1444 (C-B), 1330 (B-O), 570 (Fe-O)

14.12. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs3-MNPs) (28)

Syntezę przeprowadzono zgodnie z procedurą opracowaną w zespole i opisaną w literaturze [122]. W kolbie dwuszyjnej (250 mL) rozpuszczono chitozan (1,0 g) w kwasie octowym (C=1%, 100mL) mieszając za pomocą mieszadła mechanicznego. Następnie dodano tetrahydrat chlorku żelaza(II) (0,74 g; 3,75 mmol) i heksahydrat chlorku



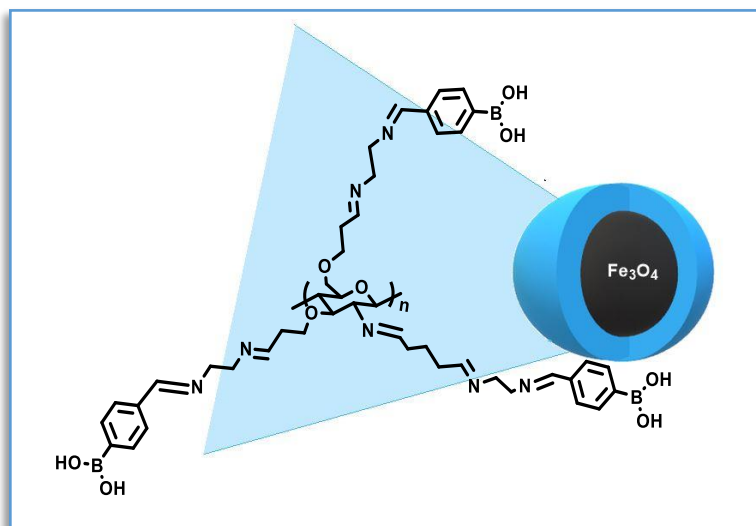
żelaza(III) (2,03 g; 7,5 mmol), po czym wkroplono 30% wodny roztwór NaOH (10 mL) do uzyskania pH=13. Następnie dodano epichlorohydrynę (0,2 mL, 2,5 mmola), ogrzano do temperatury 50°C i mieszano przez 2 godziny. Po ochłodzeniu do temperatury

pokojuj dodano wodny roztwór nadjodanu sodu (0,3 M, 2,5 mL). Całość mieszano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Nanocząstki magnetyczne oddzielono za pomocą magnesu i przemyto wodą dejonizowaną (5x5 mL). Następnie przeniesiono do kolby okrągłodennej (100 mL), dodano buforu wodorowęglanowego (50 mM, pH = 10, 10 mL) i 5% wodny roztwór aldehydu glutarowego (10 mL). Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę za pomocą mieszadła mechanicznego. Następnie dodano wodnego roztworu etylenodiaminy (2 M, 20 mL) i kontynuowano mieszanie w temperaturze pokojowej przez następne 2 godziny. Otrzymane nanocząstki magnetyczne oddzielono za pomocą magnesu, przemyto wodą dejonizowaną (5x5 mL) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30 °C przez 24 godziny.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3350 (-OH), 3281 (-NH₂), 2869(C-H), 1657 (C=N), 1594 (N-H), 1061 (C-N), 573 (Fe-O)

14.13. Nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowane kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs3-FPBA-MNPs) (28)

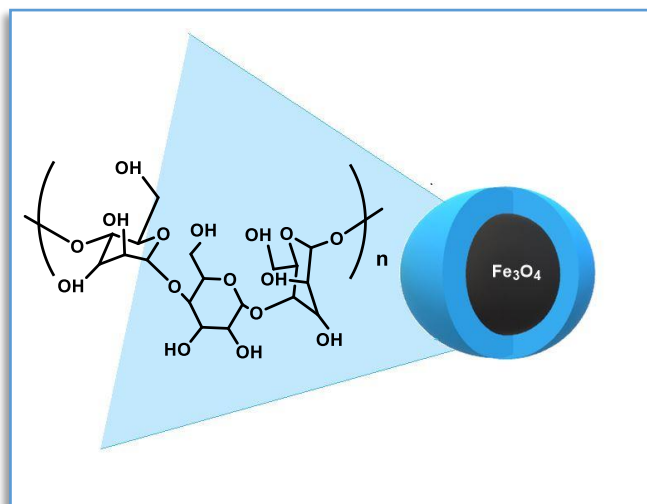
Syntezę Cs3-FPBA-MNPs przeprowadzono w sposób analogiczny do procedury opisanej w punkcie 15.9., z użyciem jako substratu nanocząstek magnetycznych pokrytych chitozanem z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs3-MNPs).



ATR-FTIR (cm^{-1}): 3233 (-OH), 2914 (C-H), 1641 (C=N), 1410 (C-B), 1362 (B-O), 870 (C-H), 570 (Fe-O)

14.14. Nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią (S-MNPs) (29)

Syntezę przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [178]. W kolbie dwuszyjnej (250 mL) umieszczono skrobię kukurydzianą (2,0 g) rozpuszczoną w wodzie dejonizowanej (100 mL). Całość mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego w temperaturze 40°C do momentu rozpuszczenia skrobi.

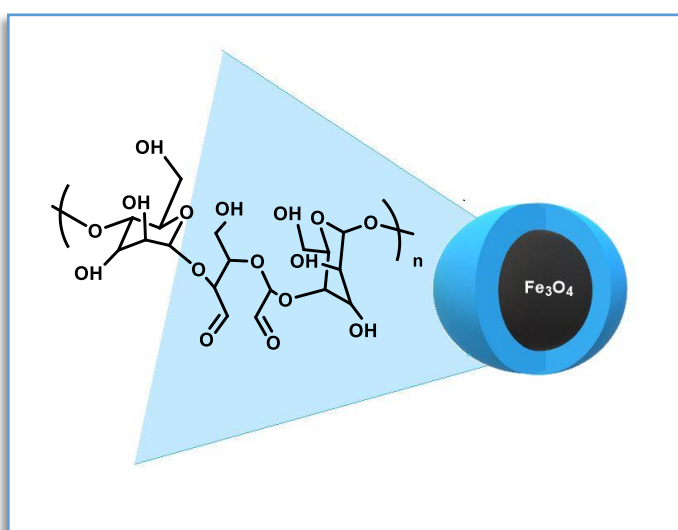


Następnie dodano tetrahydrat chlorku żelaza(II) (1,14 g; 7,4 mmol) i heksahydrat chlorku żelaza(III) (4,06g; 15,0 mmol), po czym wkroplono 30% wodny roztwór wodorotlenku sodu (30 mL) do uzyskania pH=13. Utworzony czarny osad nanocząstek oddzielono za pomocą magnesu, przemyto wodą dejonizowaną (5x10 mL) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3142(-OH), 1232 (C-C), 1099 (C-H), 1080 (C-H), 1023 (C-C), 574 (Fe-O)

14.15. Nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią dialdehydową (DAS-MNPs) (30)

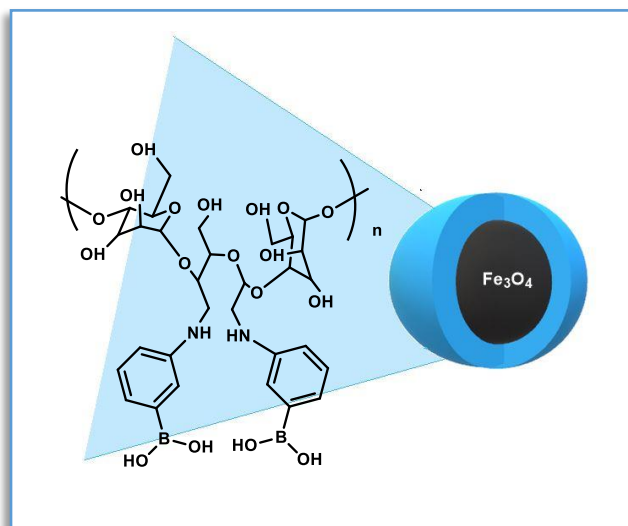
Syntezę przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [178]. W kolbie okrągłodennej (50 mL) umieszczono nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią (1,0 g) i dodano wodę dejonizowaną (10 mL). Następnie dodano wodnego roztworu nadjodanu sodu (0,7 M, 10 mL). Dalsza procedura była analogiczna jak w przypadku otrzymywania DACs-MNPs, opisanych w punkcie 15.4.



ATR-FTIR (cm^{-1}): 3198 (-OH), 1638 (C=O), 1150 (C-C), 1037 (C-O-C), 580 (Fe-O)

14.16. Nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią dialdehydową modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym (DAS-PBA-MNPs) (31)

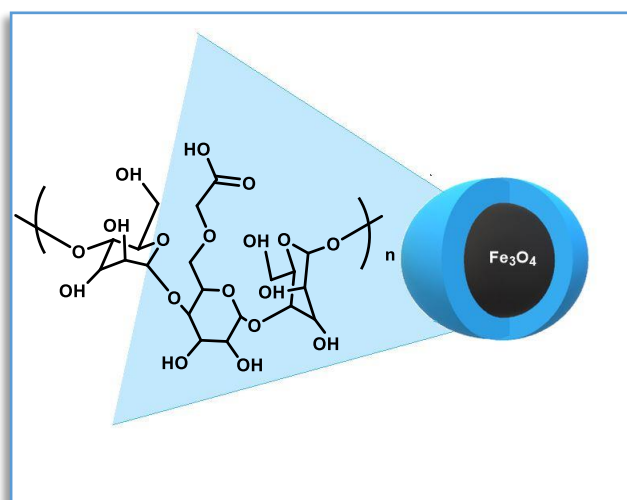
Syntezę DAS-PBA-MNPs przeprowadzono w podobny sposób do procedury opisanej w punkcie 15.5., z użyciem jako substratu DAS-MNPs. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej. Ilość substratów, rozpuszczalników i czas prowadzonej reakcji nie uległ zmianie.



ATR-FTIR (cm^{-1}): 3350 (-OH), 1634 (N-H), 1419 (C-B), 1375 (B-O), 1052 (C-O-C), 551 (Fe-O)

14.17. Nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetyloskrobią (CMS-MNPs) (32)

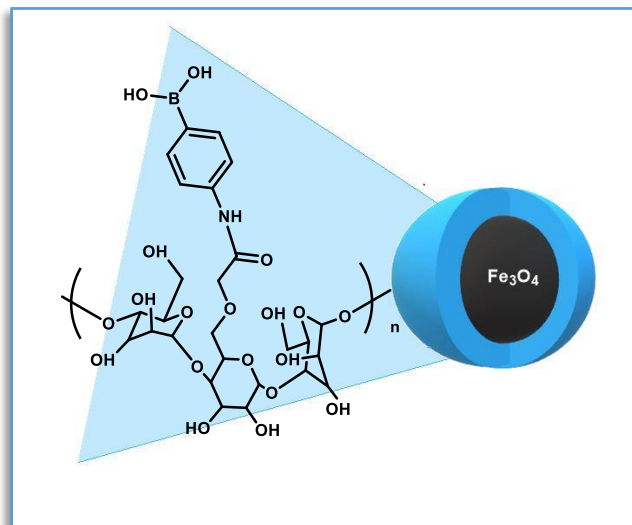
W kolbie okrągłodennej (100 mL) umieszczono nanocząstki magnetyczne pokryte skrobią (3g) oraz alkohol etylowy (C=99%, 10 mL). Następnie porcjami dodawano przez 30 minut wodny roztwór wodorotlenku sodu (C=5,0 M, 2 mL), mieszając za pomocą mieszadła mechanicznego w temperaturze pokojowej. Następnie dodano etanolowy roztwór kwasu monochlorooctowego (C=5,1 M, 2 mL). Temperatura, czas reakcji oraz izolacja otrzymanego produktu była analogiczna, jak w punkcie 15.6.



ATR-FTIR (cm^{-1}): 3248 (-OH), 2929 (C-H), 1586 (C=O), 1410 (C-H), 1229 (C-H), 1152 (C-C), 1047 (C-O-C), 895 (C-H), 559 (Fe-O)

14.18. Nanocząstki magnetyczne pokryte karboksymetyloskrobią modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym CMS- PBA-MNPs (33)

W kolbie okrągłodennej (50 mL) umieszczono nanocząstki magnetyczne pokryte solą sodową karboksymetyloskrobi (CMS-MNP) (2.5 g) w wodzie destylowanej (20mL), a następnie dodano 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid EDC (10,0 mg; 0,06 mmol) rozpuszczony w wodzie dejonizowanej (2 mL). Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez



15 min. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano rozpuszczony w wodzie (3mL) kwas 3-aminofenyloboronowy (0,1 g; 0,73 mmola) i kontynuowano mieszanie przez 24 godziny w tych samych warunkach. Nanocząstki magnetyczne oddzielono za pomocą magnesu i przemyto wodą dejonizowaną (5x5 mL). Produkt suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

ATR-FTIR (cm^{-1}): 3281 (-OH), 1625 (C=O), 1584 (N-H,C-N) 1435 (C-B), 1366 (B-O), 1153 (C-O-C), 1029 (C-C), 795 (C-H), 558 (Fe-O)

15.Charakterystyka właściwości fizykochemicznych otrzymanych materiałów

15.1.Pomiar kąta zwilżania

Próbki do pomiaru kąta zwilżania przygotowano w postaci folii lub pastylek. Folie uzyskano przez wylewanie roztworów polimerów o stężeniu 1% (m/v) na wy poziomowane szkiełka mikroskopowe i odparowanie rozpuszczalnika (w temperaturze pokojowej), po uprzednim przesączeniu na lejku Büchnera pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia nierozpuszczalnych pozostałości. W przypadku Cs, Cs-4-FPBA, Cs-4-FPBA-R, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA, Cs3-FPBA; i CMS-PBA rozpuszczalnikiem był 1% kwas octowy, a w przypadku S, CMCs-PBA – woda dejonizowana.

Ze względu na słabą rozpuszczalność próbek DACs-PBA i DAS-PBA, przygotowano pastylki za pomocą prasy hydraulicznej z firmy Perkin Elmer.

Pomiary kąta zwilżania (Θ , °) wykonano za pomocą automatycznego goniometru G10 firmy Krüss GmbH (Niemcy). Stosowano dwie cieczy pomiarowe o różnej polarności (glicerynę i diiodometan). Na powierzchni każdej próbki, osadzono co najmniej 10 kropli o objętości 3 μL , po czym wyznaczono kąty zwilżania, które następnie posłużyły do obliczenia swobodnej energii powierzchniowej (γ_s), a także jej składowej polarnej (γ_{sp}) i dyspersyjnej (γ_{sd}). Do obliczeń wykorzystano oprogramowanie Drop Shape Analyzer (wersja 1.90.0.14). Temperatura pomiaru wynosiła 20°C, dokładność pomiaru Θ –2°.

15.2. Określenie porowatości materiałów magnetycznych

Parametry porowatości nanocząstek magnetycznych: Cs-FPBA-MNPs, Cs-FPBA-R-MNPs, CMCs-PBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs, Cs3-FPBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs oznaczono metodą adsorpcji i desorpcji azotu przy użyciu analizatora ASAP 2010 firmy Micromeritics, USA. Przed pomiarem wszystkie próbki odgazowano w temperaturze 180°C w ciągu ok. 8 h. Pomiary wykonano w temperaturze -196°C, w zakresie ciśnienia względnego 1×10^{-6} -0.999. Na podstawie uzyskanych izoterm wykonane zostały obliczenia powierzchni właściwej metodą BET (Brunauer-Emmett-Teller).

Badanie zostało wykonane przez dr hab. Annę Ilnicką, prof. UMK z Katedry Chemii Materiałów, Adsorpcji i Katalizy Wydziału Chemii, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

16. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej

Przygotowane w badaniach materiały zostały następnie ocenione pod kątem toksyczności ostrej w teście Microtox. Po zarejestrowaniu bioluminescencji bakterii *A. fischeri* bezpośrednio przed dodaniem próbki, dodano 900 μ l 2% roztworu chlorku sodu (Microtox Diluent; Modern Water, Cambridge, UK) wstępnie schłodzonego do 15 °C i do tak powstałej zawiesiny bakteryjnej dodano badany materiał. Następnie rejestrowano bioluminescencję emitowaną przez bakterie przy 490 nm za pomocą Microtox M500 po 5 minut i 15 minutach po dodaniu badanych próbek. Do obliczenia procentowego efektu (toksyczności) wywieranego przez materiały wykorzystano oprogramowanie Modern Water MicrotoxOmni 4.2 (Modern Water, Cambridge, UK). Wszystkie materiały zostały przetestowane w trzech powtórzeniach.

Badanie zostało wykonane przez dr n. farm. Dariusza Młynarczyka z Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

17. Badanie zdolności wiązania glukozy przez otrzymane materiały

Ilość związanej glukozy zbadano metodą spektroskopii absorpcyjnej z użyciem kwasu 3,5 dinitrosalicylowego (DNS).

Zastosowano dwa różne bufony: fosforanowy o pH=7,4 (50 mM) i wodorowęglanowy o pH=9,0 (50 mM), dla których wykonano dwie krzywe wzorcowe dla glukozy.

17.1. Krzywa wzorcowa glukozy w buforze fosforanowym o pH=7,4 (50 mM)

Roztwór podstawowy glukozy o stężeniu 100 mM w buforze fosforanowym (pH=7,4; 50 mM) przygotowano przez odważenie do kolbki miarowej (100 mL) 1,8016 g glukozy. Kolbę uzupełniono buforem fosforanowym (pH 7.4; 50 mM). Następnie z roztworu podstawowego pobrano do kolbek miarowych o objętości 10 mL odpowiednio 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 mL i uzupełniono buforem fosforanowym (pH 7.4; 50 mM). Otrzymano roztwory o następujących stężeniach: 10, 15, 20, 25, 30 i 35 mM. W nowej kolbie miarowej (250 mL) przygotowano 1% (w/v) roztwór kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) w 0,4 M NaOH. Do sześciu probówek typu Falcon o pojemności 25 mL dodano po 1 mL roztworu glukozy w/w stężeniach 1 mL 1% [w/v] roztworu kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) w 0,4 M NaOH i 5 mL wody dejonizowanej. Próbę odniesienia stanowił roztwór zawierający 1 mL buforu fosforanowego (pH 7.4; 50 mM), 5 mL wody dejonizowanej i 1 mL 1% (w/v) roztworu kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) w 0,4 M NaOH. Wszystkie próbki ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 15 minut, mieszając ich zawartość co minutę. Po ochłodzeniu prób do temperatury pokojowej (łaźnia z zimną wodą), zmierzono absorbancję przy długości fali 540 nm i wykreślono zależność absorbancji od stężenia glukozy.

17.1.1. Ilościowe oznaczanie związanej glukozy przez otrzymane materiały w buforze fosforanowym o pH 7,4 (50 mM)

Do probówek typu Falcon o pojemności 25 mL odważono modyfikowany polisacharyd (100-300 mg), a następnie dodano 5 mL glukozy o stężeniu 29,85 mM w buforze fosforanowym (pH =7,4; 50 mM). Całość wytrząsano w termomikserze (600 rpm) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Pozostawiono na około 5 min. Znad osadu pobrano 1 mL roztworu glukozy za pomocą strzykawki i mikrofiltra i przeniesiono do kolejnych probówek typu Falcon (25 mL). Następnie dodano 1 mL 1% (w/v) roztworu kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) w 0,4 M NaOH i 5 mL wody dejonizowanej. Wszystkie próbki ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 15 minut, mieszając ręcznie

ich zawartość co minutę. Próbę odniesienia stanowiły polimery wytrąsane w termomikserze (600 rpm) z 5 mL buforu fosforanowego (pH=7,4; 50 mM) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po schłodzeniu prób do temperatury pokojowej, zmierzono absorbancję przy długości fali 540 nm. Dla każdej próby wykonano trzy powtórzenia.

17.2. Krzywa wzorcowa glukozy w buforze wodorowęglanowym o pH= 9,0 (50 mM)

W analogiczny sposób opisany w punkcie 18.1., przygotowano krzywą wzorcową glukozy w buforze wodorowęglanowym o pH= 9,0. Stosowano takie same stężenia roztworu glukozy, buforu, DNS i identyczne rozcieńczenia.

17.2.1. Ilościowe oznaczanie związanej glukozy przez otrzymane materiały w buforze wodorowęglanowym o pH=9,0 (50 mM)

Oznaczenie związanej glukozy w buforze wodorowęglanowym o pH=9,0 (50 mM) przeprowadzono w sposób analogiczny, jak przy zastosowaniu buforu fosforanowego o pH 7,4 (50 mM) (punkt 18.1.1.). Czas reakcji, tj. ogrzewanie we wrzącej łaźni wodnej, również wynosił 15 min.

18. Badanie zdolności wiązania glikoproteiny przez otrzymane materiały

Ilość związanej α -1-kwaśnej glikoproteiny wyznaczono metodą spektroskopii emisyjnej w dwóch różnych środowiskach: w buforze fosforanowym o pH=7,4 i buforze wodorowęglanowym o pH= 9,0. W tym celu wykonano dwie krzywe wzorcowe.

18.1. Krzywa wzorcowa α -1- kwaśnej glikoproteiny w buforze fosforanowym pH 7,4 (50 mM)

Roztwór podstawowy α -1-kwaśnej glikoproteiny o stężeniu 10 μ M uzyskano rozpuszczając w kolbie miarowej o pojemności 100 mL 0,0446 g tej glikoproteiny w buforze fosforanowym o pH 7.4 (50 mM). Następnie z roztworu podstawowego pobrano do kolbek miarowych o objętości 10 mL, odpowiednio 1,2,3,4,5,6,7,8,9 i 10 mL i uzupełniono buforem fosforanowym, otrzymując roztwory o stężeniach: 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 μ M. Widma fluorescencyjne roztworów rejestrowano w 25°C, w zakresie od 300 do 400 nm przy długości fali wzbudzenia 289 nm. Zastosowano następujące parametry: zakres rejestracji widma 300 - 400 nm, prędkość skanowania 100 nm/min, szerokość szczeliny spektralnej Em/Ex 2,5 nm/5 nm.

18.1.1. Wiązanie α -1-kwaśnej glikoproteiny przez otrzymane materiały w buforze fosforanowym pH 7.4 (50 mM)

Wiązanie α -1-kwaśnej glikoproteiny w buforze fosforanowym o pH=7,4 (50 mM) określono ilościowo z wykorzystaniem spektrofluorometru. Przygotowano roztwór α -1-kwaśnej glikoproteiny o stężeniu 6,65 μ M w buforze fosforanowym (pH=7,4; 50 mM). W probówce Eppendorfa (2 mL) umieszczono naważki otrzymanych materiałów (50-100 mg), a następnie dodano 2 mL świeżo przygotowanego roztworu α -1-kwaśnej glikoproteiny. Tak przygotowane próby inkubowano w termomikserze (600 rpm) w temperaturze 36°C przez 15 min. Po tym czasie, pobrano roztwory w następujący sposób: roztwory glikoproteiny pobrano z nanocząstek magnetycznych pokrywanych modyfikowanymi polisacharydami za pomocą przyłożenia magnesu, a w przypadku samych modyfikowanych polisacharydów za pomocą filtra strzykawkowego. Próba odniesienia były materiały zawierające 2 mL buforu fosforanowego pH=7,4 (50 mM) inkubowane w tych samych warunkach. Widma fluorescencyjne roztworów rejestrowano w 25°C w zakresie od 300 do 400 nm przy długości fali wzbudzenia 289 nm. Zastosowano następujące parametry: zakres rejestracji widma 300 - 400 nm, prędkość skanowania 100 nm/min, szerokość szczeliny spektralnej Em/Ex 2,5 nm/5 nm. Dla każdej próby wykonano trzy powtórzenia.

18.2. Krzywa wzorcowa α -1-kwaśnej glikoproteiny w buforze wodorowęglanowym pH= 9,0 (50 mM)

Analogicznie przygotowano roztwory α -1-kwaśnej glikoproteiny (roztwór podstawowy i jego rozcieńczenia) w buforze wodorowęglanowym pH= 9,0 (50 mM). Również widma fluorescencyjne tych roztworów uzyskano stosując takie same warunki, jak w przypadku roztworów przygotowanych w buforze fosforanowym (punkt 19.1.).

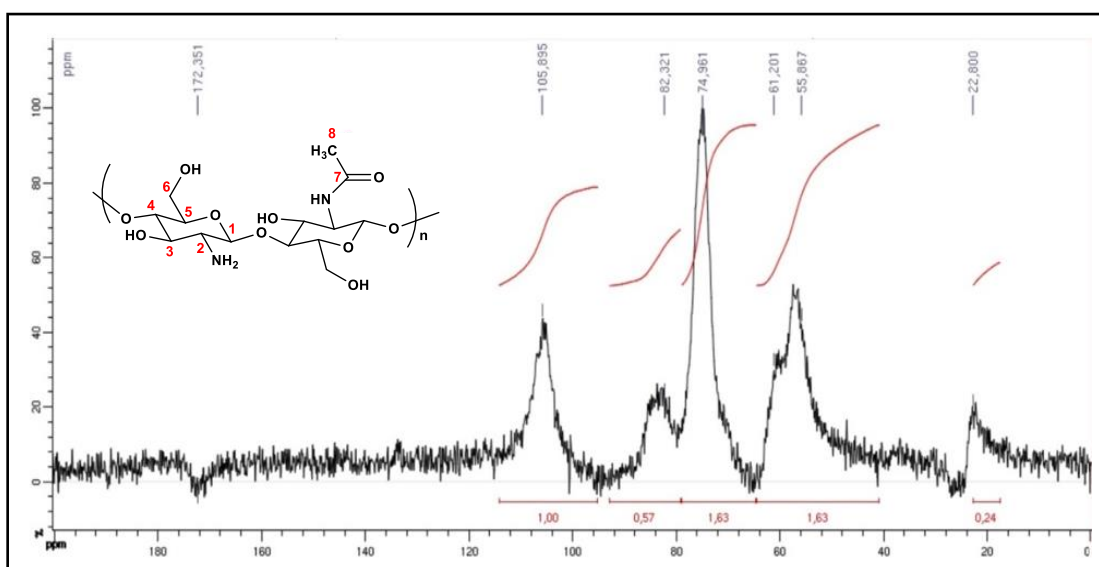
18.2.1. Wiązanie α -1-kwaśnej glikoproteiny przez otrzymane materiały w buforze wodorowęglanowym o pH 9.0 (50 mM)

Podobnie jak w punkcie 19.1.1 wykonano oznaczenie ilościowej zawartości α -1-kwaśnej glikoproteiny związanej przez otrzymane materiały w środowisku alkalicznym, czyli w buforze wodorowęglanowym. Uzyskany wynik jest średnią z trzech pomiarów.

Wyniki i dyskusja

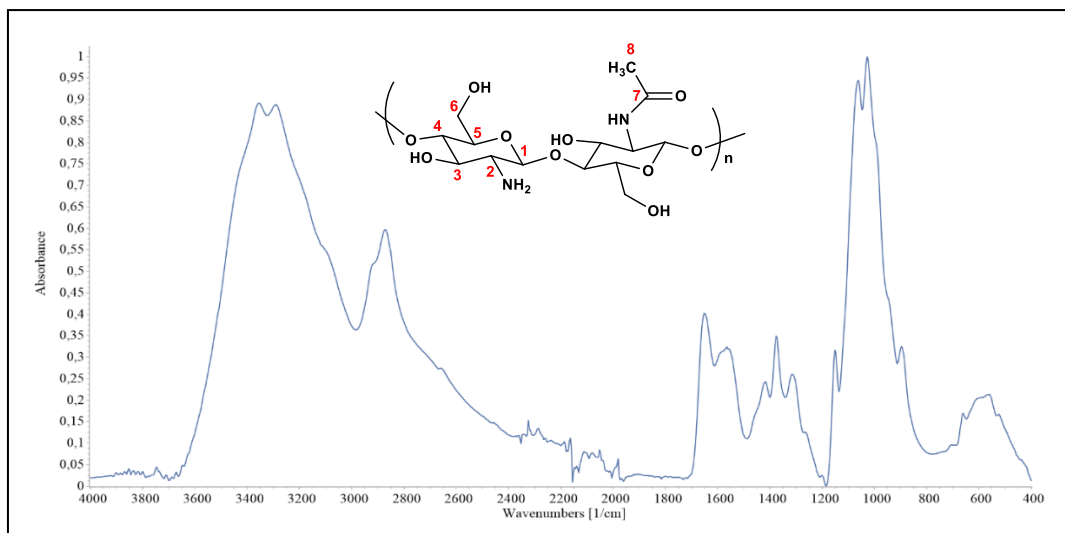
19. Struktura chitozanu i jego pochodnych

W celu zbadania struktury chemicznej wyjściowego chitozanu oraz materiałów otrzymanych w wyniku jego modyfikacji, wykonano widma NMR w ciele stałym (^{13}C i ^{11}B). Struktury potwierdzono również metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera z osłabionym całkowitym odbiciem (ATR-FTIR). W celu oceny morfologii chitozanu niemodyfikowanego i modyfikowanego kwasami boronowymi wykonano zdjęcia SEM.



Rysunek 37. Widmo ^{13}C NMR chitozanu wyjściowego (^{13}C NMR (ciało stałe), δ ppm; 22,8 (C8); 55,8 (C2,C6); 61,2 (C2,C6); 74,9 (C3, C5); 82,3 (C4); 105,9 (C1); 172,3 (C7))

Obecność sygnałów o przesunięciu 22,3 i 172,1 ppm w widmie ^{13}C NMR wyjściowego chitozanu wskazuje na niekompletną deacetylację (Rysunek 37). Na tej podstawie tego widma i korzystając z równania (1), wyznaczono stopień deacetylacji chitozanu (DA) [155], uzyskując wartość 70,19 %. Obecność grup funkcyjnych w chitozanie potwierdzono za pomocą spektroskopii w podczerwieni (Rysunek 38).



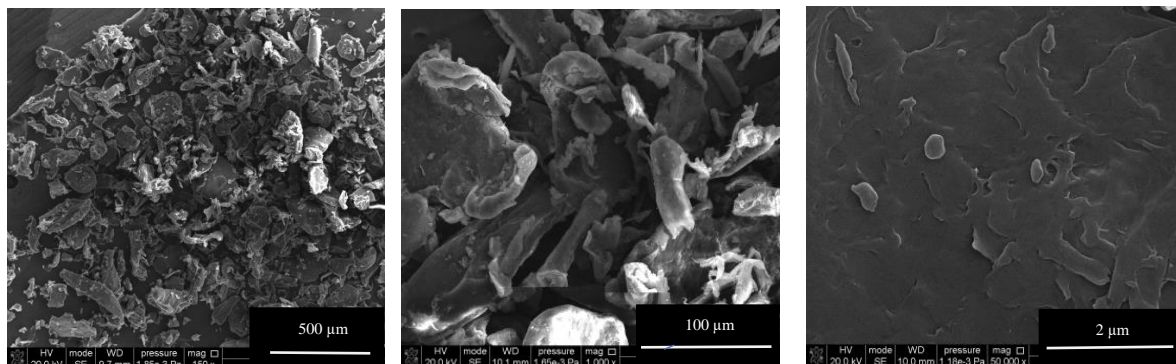
Rysunek 38. Widmo ATR-FTIR chitozanu wyjściowego

Na zarejestrowanym widmie widoczne są charakterystyczne pasma chitozanu, pochodzące między innymi od grup hydroksylowych (3331 cm^{-1}) i aminowych (3287 cm^{-1}). Rodzaje drgań poszczególnych wiązań i odpowiadające im pasma absorpcyjne zestawiono w Tabeli 5. Opisane widmo odpowiada danym literaturowym dla czystego chitozanu o stopniu deacetylacji 77% [160].

Tabela 5. Rodzaje drgań i odpowiadające im pasma absorpcyjne dla grup funkcyjnych chitozanu [160].

Rodzaj wiązania	Liczba falowa [cm^{-1}]	Rodzaj drgań
-O-H	3360	rozciągające
-N-H	3287	rozciągające
-C-H	2882	rozciągające
-C=O	1650	rozciągające
-N-H	1574	zginające
-C-H	1414	deformacyjne
-C-H	1375	deformacyjne
-C-N	1314	walencyjne
-C-N, -C-O	1059	rozciągające
-C-N, -C-O	1027	rozciągające
-C-H	894	deformacyjne
-C-H	661	deformacyjne

Morfologię chitozanu scharakteryzowano za pomocą Skaningowej Mikroskopii Elektronowej.

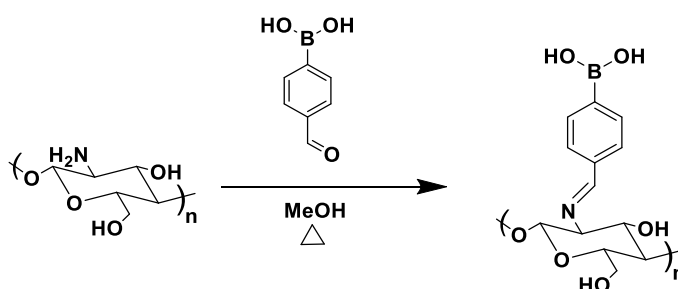


Rysunek 39. Zdjęcia SEM chitozanu (proszek)

Obrazy SEM wyjściowego chitozanu ilustrują niejednorodną strukturę składającą się z nieregularnych aglomeratów (Rysunek 39).

Chitozan wyjściowy został zmodyfikowany kwasem boronowym na dwa sposoby. Pierwsze podejście dotyczyło funkcjonalizowania kwasami boronowymi niemodyfikowanego polimeru, natomiast drugie, wprowadzenia tych ugrupowań do polisacharydu poddanego wstępnym modyfikacjom.

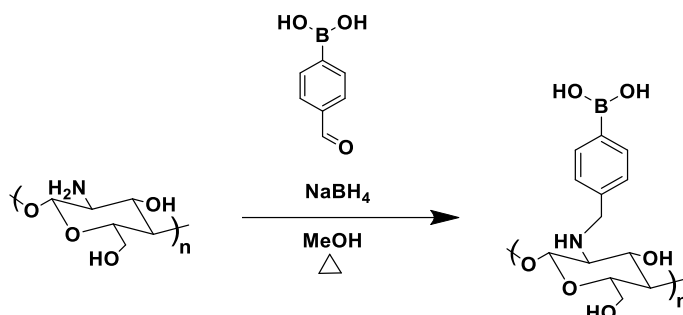
Pierwszy sposób polegał na reakcji niemodyfikowanego chitozanu z kwasem 4-formylofenyloboronowym, co doprowadziło do otrzymania polisacharydu modyfikowanego kwasem boronowym przez wiązanie iminowe (Rysunek 40).



Rysunek 40. Schemat modyfikacji chitozanu kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania iminowego (Cs-4FPBA)

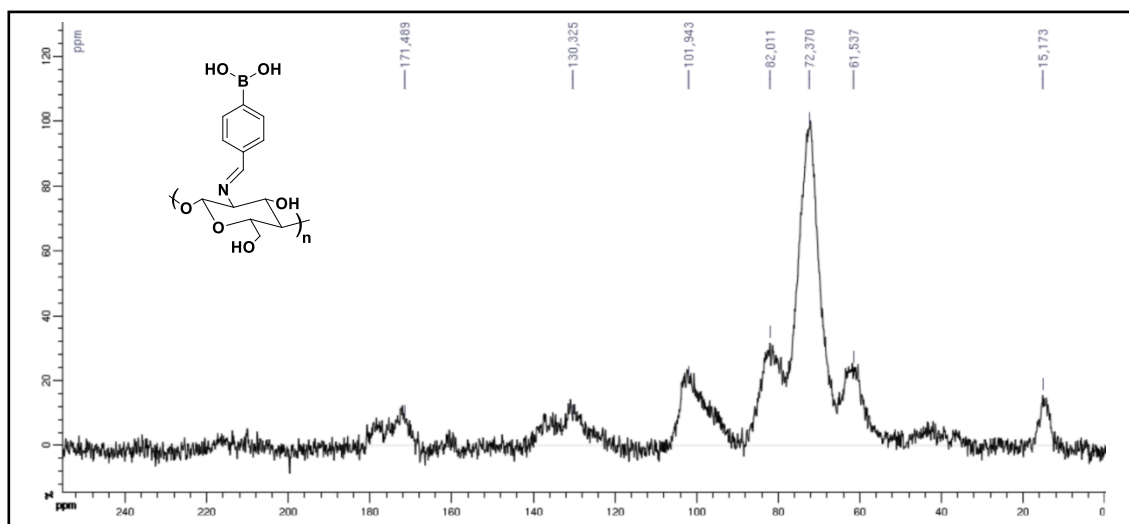
Drugim sposobem była modyfikacja chitozanu kwasem 4-formylofenyloboronowym w obecności czynnika redukującego (NaBH₄), co pozwoliło na zredukowanie wiązania iminowego do wiązania aminowego i otrzymanie kolejnego modyfikowanego polisacharydu (Rysunek 41). Otrzymanie tego typu materiałów:

nieredukowany i zredukowany miało na celu w końcowym etapie wiązania glikoproteiny ocenę, czy wolny proton w formie zredukowanej wpłynie na zdolność i efektywność materiału do wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny np. przez możliwość tworzenia wiązań wodorowych.



Rysunek 41. Schemat reakcji modyfikacji chitozanu kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania aminowego (Cs-4-FPBA-R)

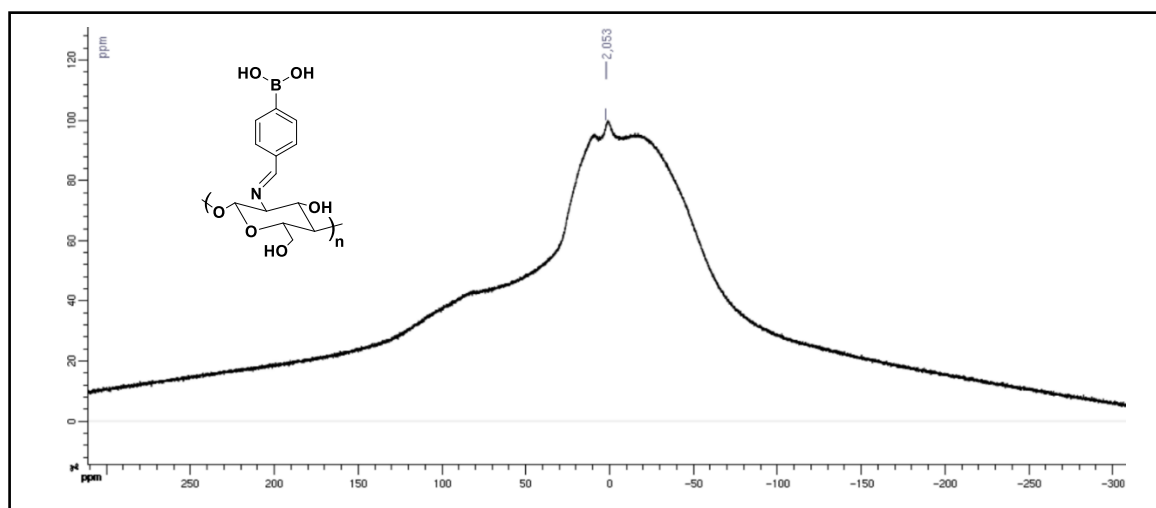
Reakcje kondensacji grupy aldehydowej kwasu 4-formylofenyloboronowego z wolną grupą aminową chitozanu prowadzono w metanolu, w temperaturze 55°C. Strukturę otrzymanych modyfikowanych chitozanów Cs-4FPBA i Cs-4FPBA-R potwierdzono za pomocą spektroskopii NMR i ATR-FTIR.



Rysunek 42. Widmo ^{13}C NMR chitozanu modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym z wiązaniem iminowym (Cs-4FPBA)

Oba wyżej wymienione materiały zostały w trakcie prowadzenia badań w ramach mojej pracy doktorskiej opisane w literaturze [191] i [192]. Są to jedyne znane materiały.

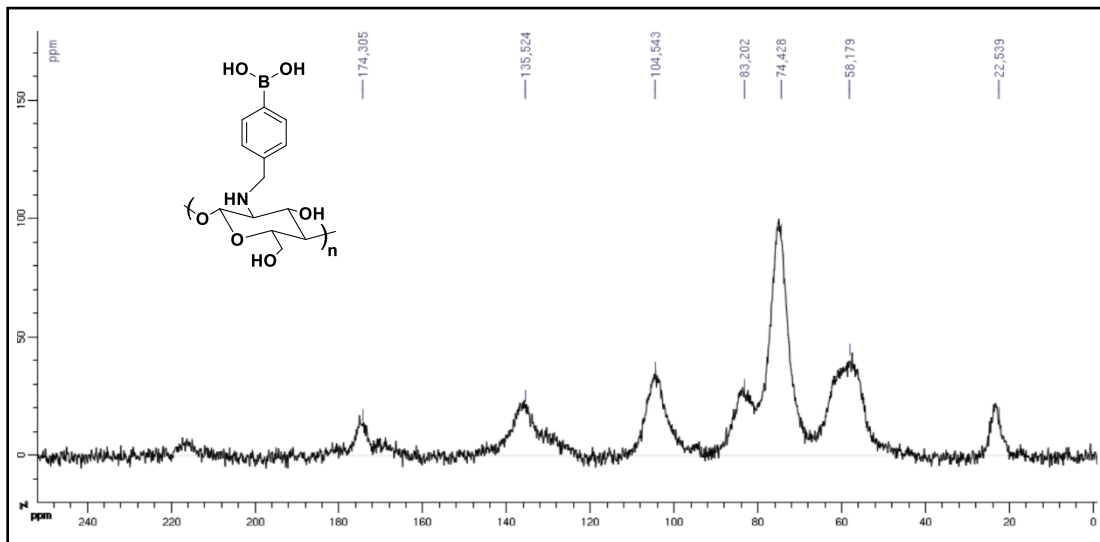
W widmie ^{13}C NMR chitozanu modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzonym wiązaniem iminowym (Cs-4FPBA) można zauważyć sygnały charakterystyczne dla wyjściowego chitozanu (DA 70,19%): 15,7 ppm (C8), 61,5 ppm (C2, C6); 72,4 ppm (C3, C5); 82,0 ppm (C4); 101,9 ppm (C1), i 171,5 ppm (C7, C=N). Modyfikację struktury potwierdza obecność nowego sygnału, którego nie obserwowano w widmie czystego chitozanu przy 130,3 ppm. Sygnał, ten pochodzi od atomów węgla aromatycznego kwasu boronowego użytego do reakcji. Sygnał pochodzący od atomów węgla powstałej grupy iminowej (C=N), prawdopodobnie jest przysłonięty przez szeroki sygnał o przesunięciu 171,5 ppm pochodzący od grupy acylowej. Ponadto, obecność wprowadzonej do polimeru jednostki kwasu boronowego potwierdzona została za pomocą spektroskopii ^{11}B NMR (Rysunek 43). W tym widmie obecność sygnału o przesunięciu 2,05 ppm odpowiada grupie dihydroksyborylowej kwasu boronowego przyłączonego do polisacharydu, co jest zgodne z literaturą [192].



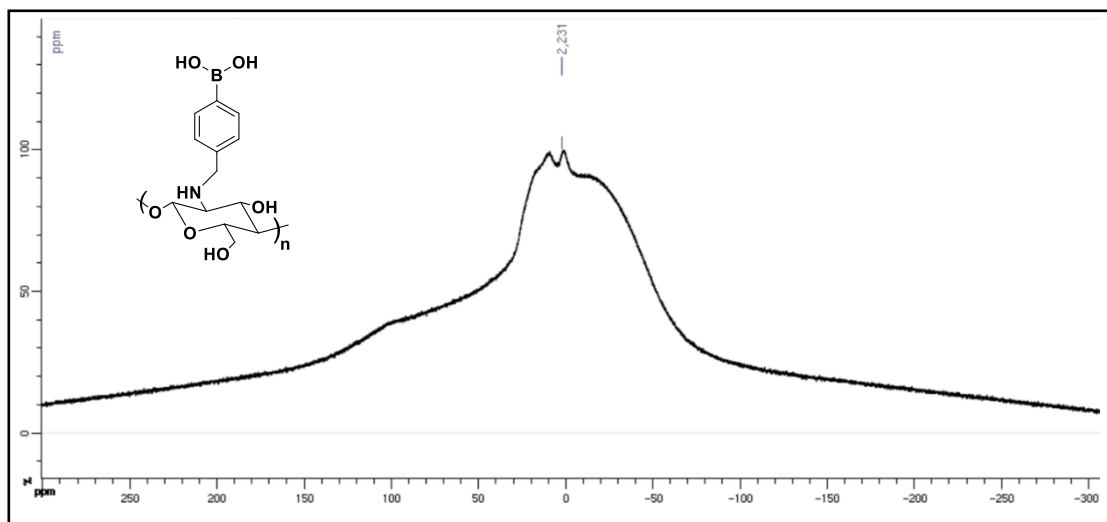
Rysunek 43. Widmo ^{11}B NMR chitozanu modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania iminowego (Cs-4FPBA)

W widmie ^{13}C NMR drugiego nowego materiału z wiązaniem aminowym (Cs-4FPBA-R), poza sygnałami pochodzącymi od łańcucha polisacharydowego, obecny jest sygnał, od węgli aromatycznych kwasu boronowego przy 130,3 ppm. Sygnał, pochodzący od utworzonego wiązania aminowego, potwierdzający redukcję wiązania iminowego, prawdopodobnie jest przysłonięty przez szeroki sygnał o przesunięciu 58,1 ppm (Rysunek 44). Obecność grup dihydroksyborylowych potwierdza obecność sygnału o przesunięciu 2,23 ppm w widmie ^{11}B NMR (Rysunek 45), co jest zgodne z literaturą [192], gdzie również obserwowany był jeden sygnał przy 19,5 ppm. Różnice w wartościach

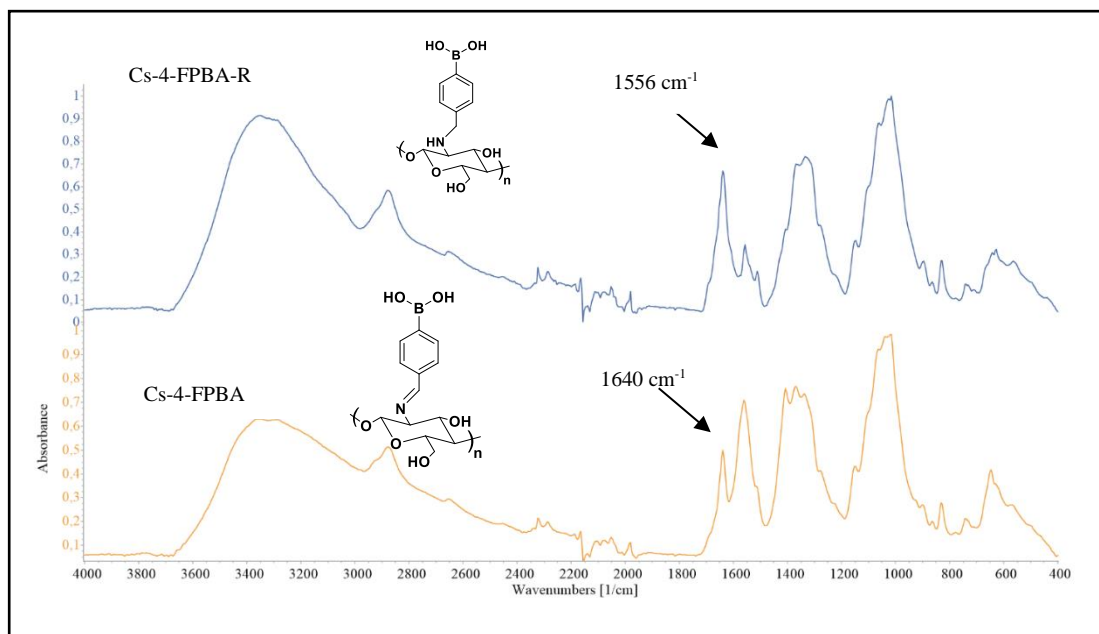
przesunięć sygnałów w widmie ^{11}B NMR rejestrowanych dla moich materiałów i materiałów opisanych w literaturze wynika z faktu zastosowania podczas rejestracji widm innych wzorców.



Rysunek 44. Widmo ^{13}C NMR chitozanu modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania aminowego (Cs-4FPBA-R)



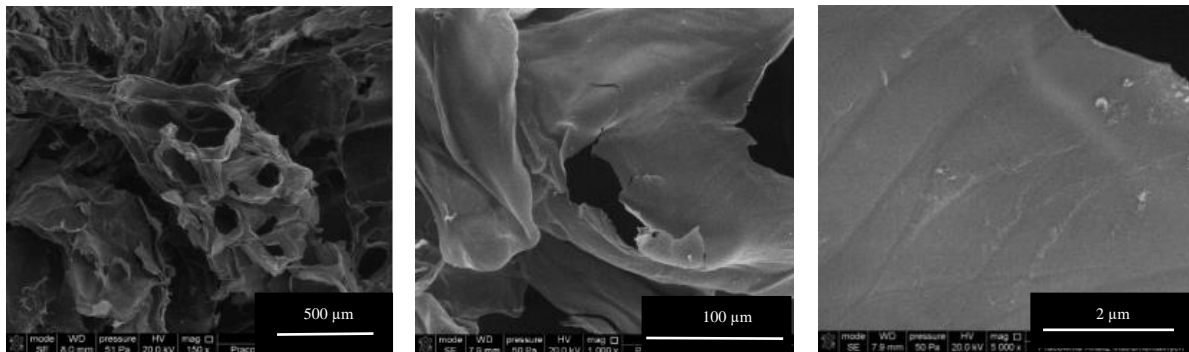
Rysunek 45. Widmo ^{11}B NMR chitozanu modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym z utworzeniem wiązania aminowego (Cs-4FPBA-R)



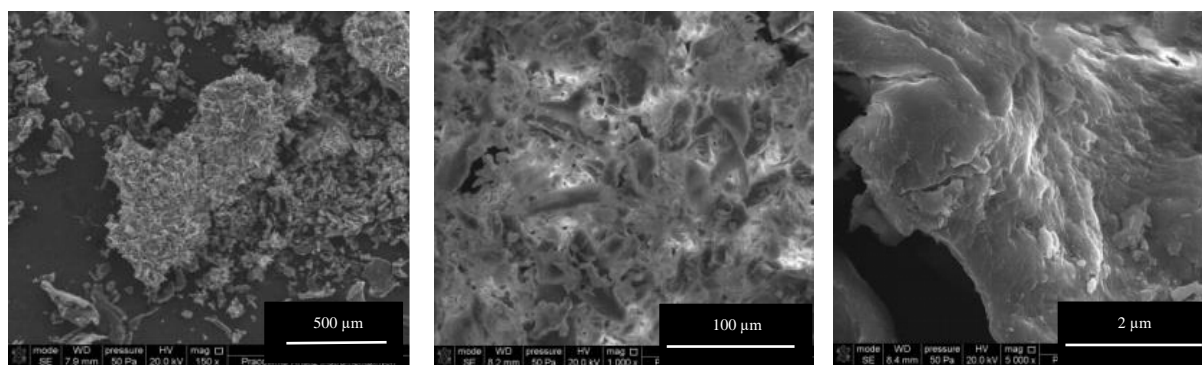
Rysunek 46. Widma ATR-FTIR Cs-4-FPBA i Cs-4-FPBA-R

Dodatkowego potwierdzenia skutecznej modyfikacji chitozanu dostarcza spektroskopia ATR-FTIR (Rysunek 46). Po reakcji chitozanu z kwasem 4-formylofenyloboronowym bez użycia reduktora (NaBH_4) utworzyło się nowe pasmo przy 1640 cm^{-1} , co wskazuje na obecność wiązania iminowego ($\text{C}=\text{N}$). Obecność ugrupowania kwasu boronowego można również potwierdzić obecnością pasm o niskiej intensywności, pochodzących od drgań C-H przypisywanych pierścieniowi aromatycznemu: 814 cm^{-1} i 700 cm^{-1} . Pasma potwierdzające wiązanie B-C i B-O i można zaobserwować odpowiednio przy 1410 cm^{-1} i 1370 cm^{-1} . W reakcji z użyciem reduktora (NaBH_4) obserwuje się zanik pasma przy 1640 cm^{-1} przy jednoczesnym pojawieniu się pasma przy 1556 cm^{-1} , pochodzącego od drgań deformacyjnych -NH, co sugeruje utworzenie aminy drugorzędowej. Szerokie pasmo przy 3352 cm^{-1} związane jest z obecnością grup hydroksylowych kwasu boronowego i chitozanu.

Scharakteryzowano również morfologię otrzymanych materiałów Cs-4FPBA i Cs-4FPBA-R, co przedstawiono na Rysunku 47 i 48.



Rysunek 47. Zdjęcia SEM chitozanu modyfikowanego: Cs-4FPBA

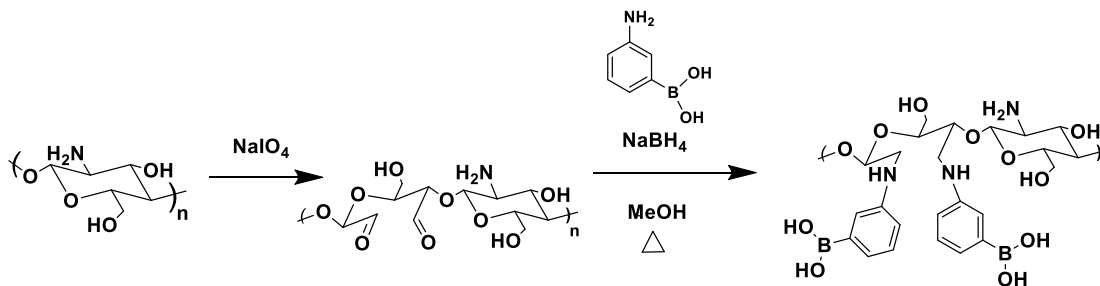


Rysunek 48. Zdjęcia SEM chitozanu modyfikowanego: Cs-4FPBA-R

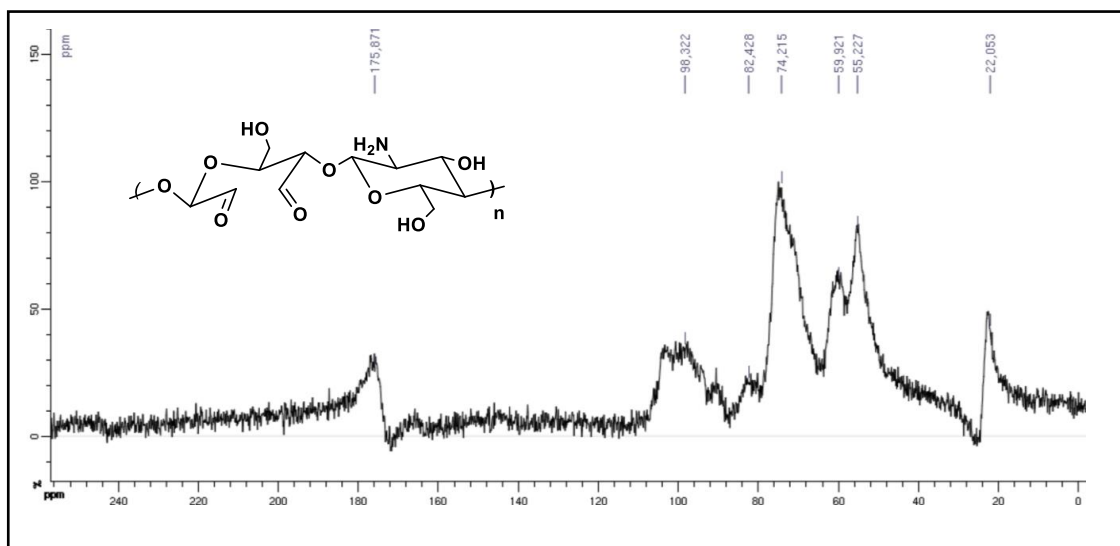
Po modyfikacji chitozanu kwasem 4-formyloboronowym chitozanu, nastąpiła zmiana morfologii materiału, co również obserwowano w literaturze [191, 192]. Na zdjęciach SEM próbki Cs-4FPBA można zauważyć, że polimer ten ma stosunkowo gładką, regularną strukturę, z dużymi porami, podczas gdy Cs-4-PBPA-R wykazuje morfologię zbliżoną do gąbczastej struktury.

Jak już zaznaczono w celu pracy, modyfikacje polisacharydów miały na celu otrzymanie materiałów, zawierających jak największą ilość grup dihydroksyborylowych, zdolnych do wiązania części cukrowej obecnej w AGP. Dlatego też postanowiłam wykonać kolejną modyfikację chitozanu, w celu otrzymania jego pochodnej dialdehydowej [127]. Chitozan poddano reakcji utlenienia za pomocą nadjodanu sodu, która doprowadziła do pęknięcia wiązania w pierścieniach glukozydowych powodując ich otwarcie i utlenienie w pozycjach C2 i C3. Następnie, powstałe grupy aldehydowe poddano reakcji z kwasem 3-aminofenyloboronowym. Utworzone wiązanie iminowe poddano redukcji za pomocą

borowodoru sodu, prowadząc do utworzenia wiązania aminowego (Rysunek 49). Porównanie zdolności do wiązania AGP przez materiał posiadający w strukturze wyłącznie pierścienie glukozaminowe i przez strukturę otwartą, pozwoli również na ocenę czy swego rodzaju "sztywność" struktury ma wpływ na efektywność oddziaływania z glikoproteina.

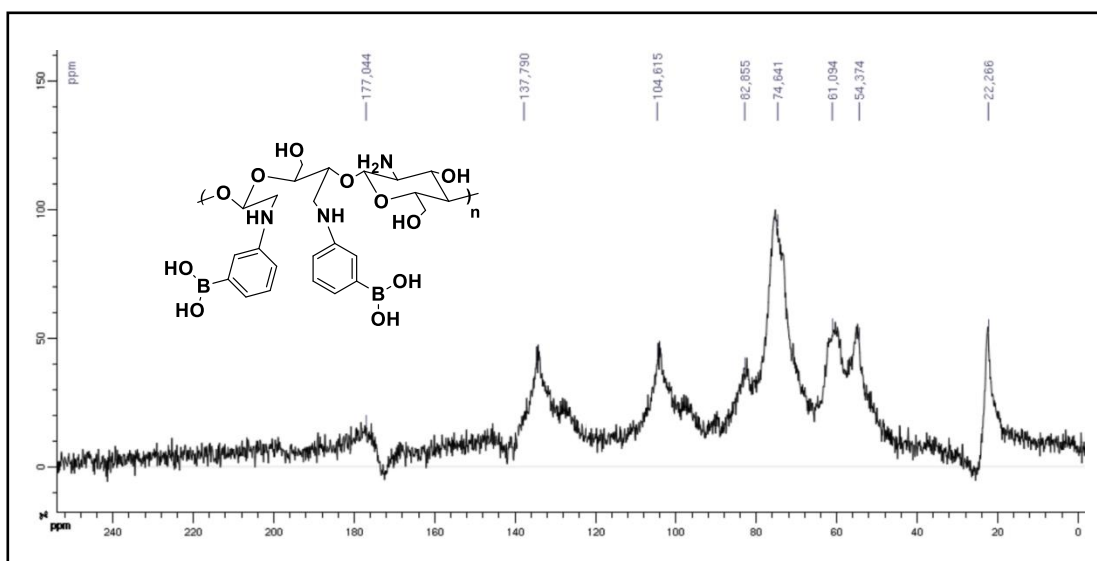


Rysunek 49. Schemat modyfikacji chitozanu prowadzącej do otrzymania DACs-PBA



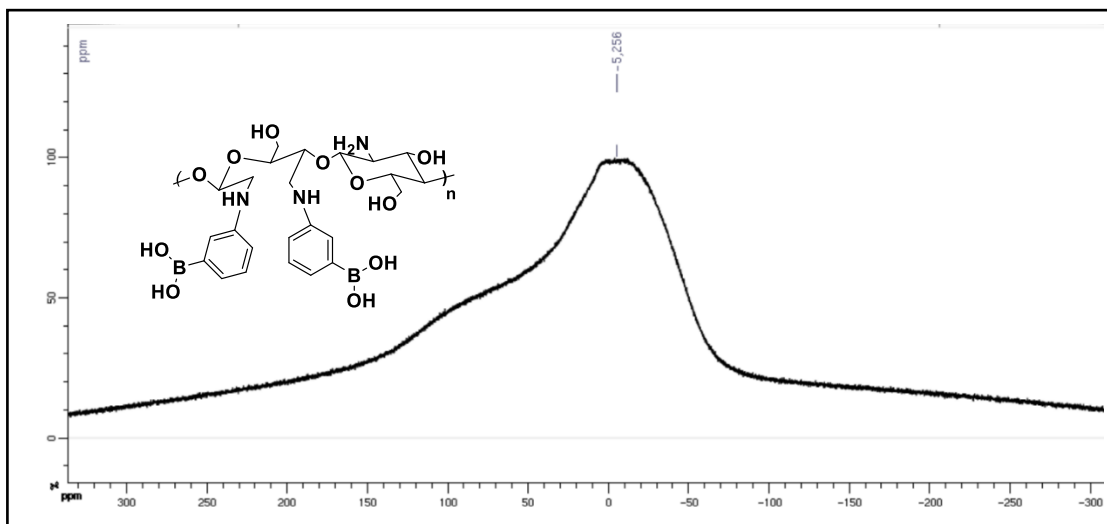
Rysunek 50. Widmo ^{13}C NMR chitozanu dialdehydowego (DACs)

Utworzenie chitozanu dialdehydowego, potwierdza zanik sygnału przy 56,5 ppm (C2, C6) w widmie ^{13}C NMR (Rysunek 50). Można zauważyć pojawienie się dwóch nowych sygnałów, odpowiednio przy 54,8 ppm i 59,0 ppm (C2 i C6). Sygnał pochodzący od powstałych grup aldehydowych nakłada się na sygnał od węgla grupy acetylowej obecnej w jednostkach chitozanu (DA = 70%) przy 176,4 ppm.

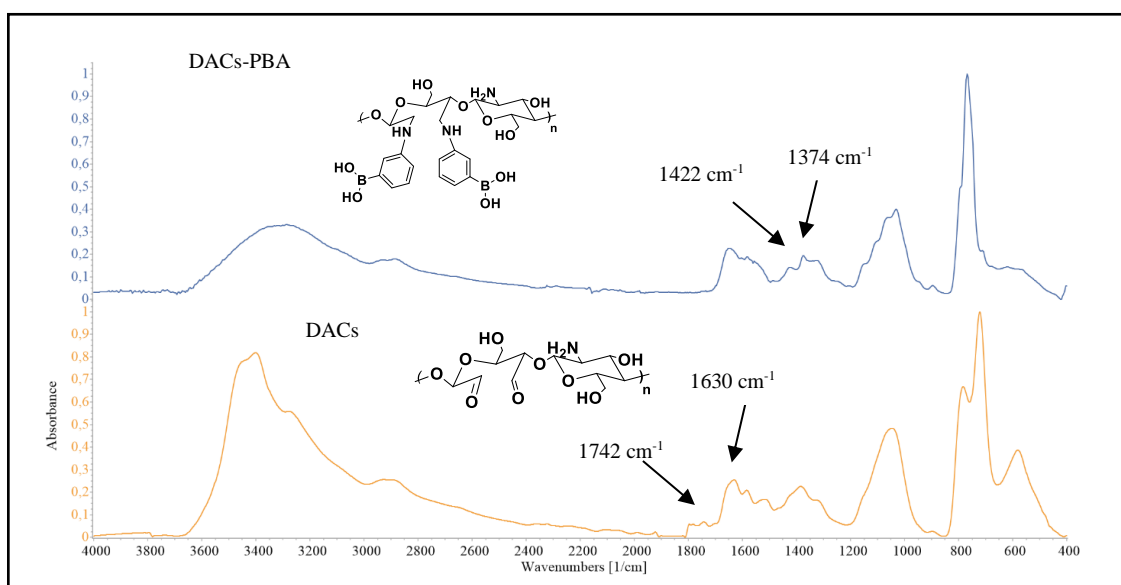


Rysunek 51. Widmo NMR ^{13}C chitozanu dialdehydowego modyfikowanego kwasem 3-aminofenyloboronowym (DACs-PBA)

Zajście reakcji, pomiędzy chitozaniem dialdehydowym, a kwasem 3-aminofenyloboronowym, potwierdza obecność sygnału o przesunięciu 137,8 ppm. Sygnał ten pochodzi od atomów węgla pierścienia aromatycznego kwasu boronowego (Rysunek 51). Obecność grup dihydroksyborylowych potwierdza sygnał przy 5,25 ppm obecny w widmie ^{11}B NMR (Rysunek 52).



Rysunek 52. Widmo ^{11}B NMR chitozanu dialdehydowego modyfikowanego kwasem 3-aminofenyloboronowym (DACs-PBA)

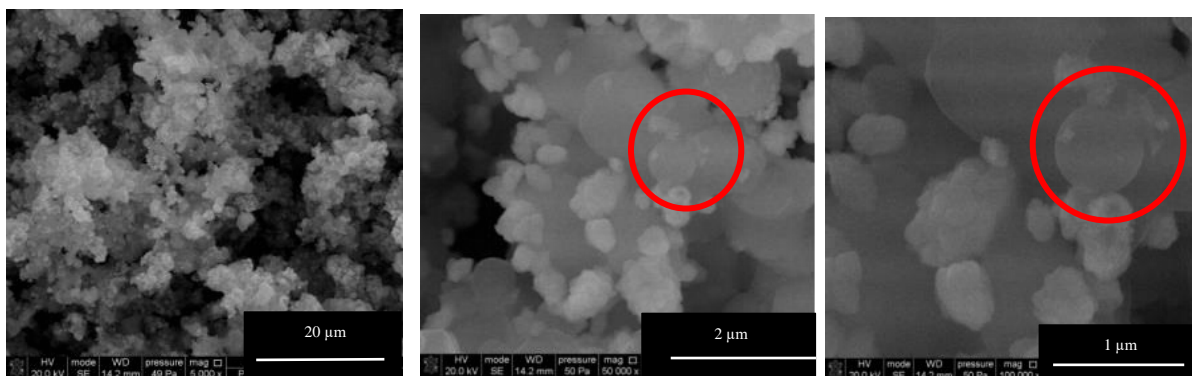


Rysunek 53. Widma ATR-FTIR DACs i DACs-PBA

Kolejne dowody, potwierdzające modyfikację, dostarczają widma ATR-FTIR (Rysunek 53). W widmie chitozanu dialdehydowego pasma przy 1742 cm^{-1} i 1630 cm^{-1} pochodzą od grupy karbonylowej i są potwierdzeniem skutecznie przeprowadzonej reakcji utlenienia. Zmiany kształtu i intensywności pasma hydroksylowego (3355 cm^{-1}), w porównaniu z chitozaniem niemodyfikowanym, można wytłumaczyć otwarciem pierścienia glikozydowego i utlenieniem do $\text{C}=\text{O}$. Ponadto, można zauważyć zmniejszenie

intensywności pasm absorpcyjnych w widmie DACs, przypisywanym pierścieniom piranozowym. Obserwuje się również znaczne zmiany w zakresie drgań grup C–O–C ($1400\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$), co świadczy o zajściu reakcji utleniania w pozycjach C2 i C3 w pierścieniu glikozydowym [161].

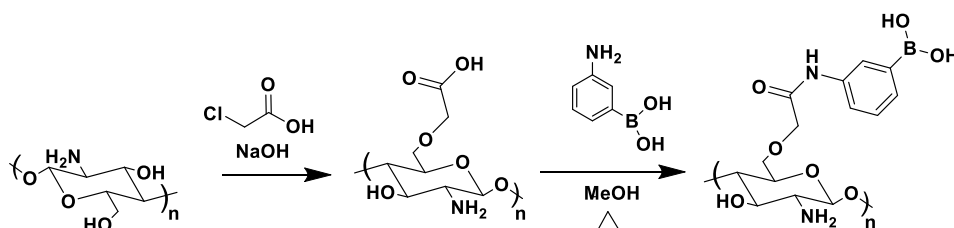
Spodziewany przebieg reakcji DACs z kwasem 3-aminofenyloboronowym z użyciem reduktora (NaBH_4) potwierdza pojawienie się pasm przy 1422 cm^{-1} i 1374 cm^{-1} , które przypisuje się odpowiednio, drganiom grup B–C i B–O. Jednocześnie, w widmie obserwuje się zanik pasma, pochodzącego od grup karbonylowej, co również jest potwierdzeniem skutecznego przeprowadzenia reakcji między DACs i kwasem 3-aminofenyloboronowym. Dodatkowo zanik tego pasma sugeruje, że wszystkie grupy aldehydowe przereagowały z PBA.



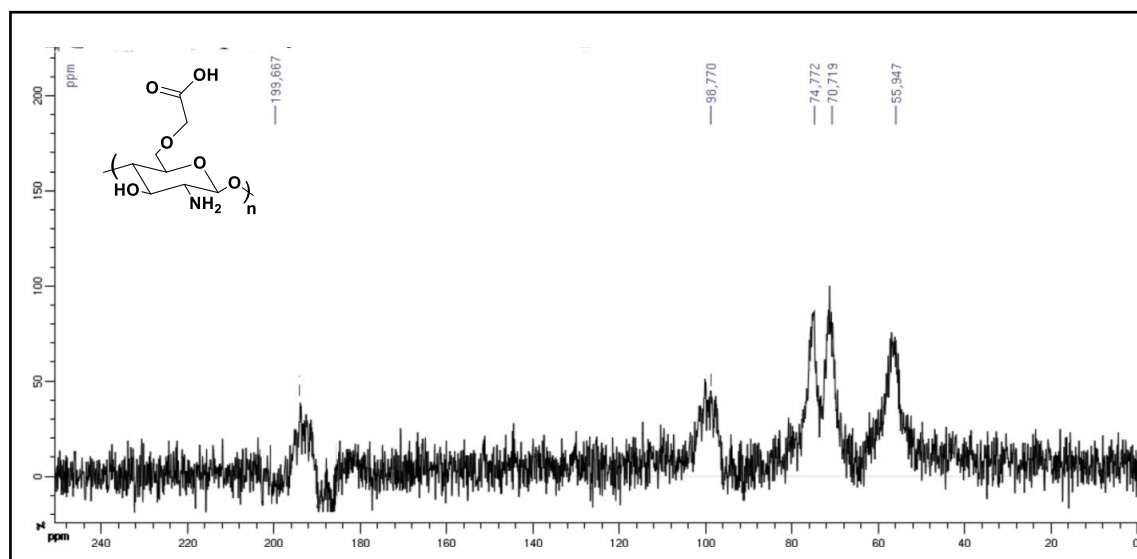
Rysunek 54. Zdjęcia SEM próbki DACs-PBA

Na zdjęciach SEM próbki DACs-PBA można zauważyć zmiany w morfologii tego modyfikowanego polisacharydu. DACs-PBA, przyjmuje postać sferycznych ziaren (Rysunek 54).

Kolejnym substratem do modyfikacji był karboksymetylochitozan, który otrzymano w reakcji chitozanu z kwasem monochlorooctowym [177]. Obecność w tej strukturze grup karboksylowych daje możliwość utworzenia wiązania amidowego z kwasem boronowym (Rysunek 55).



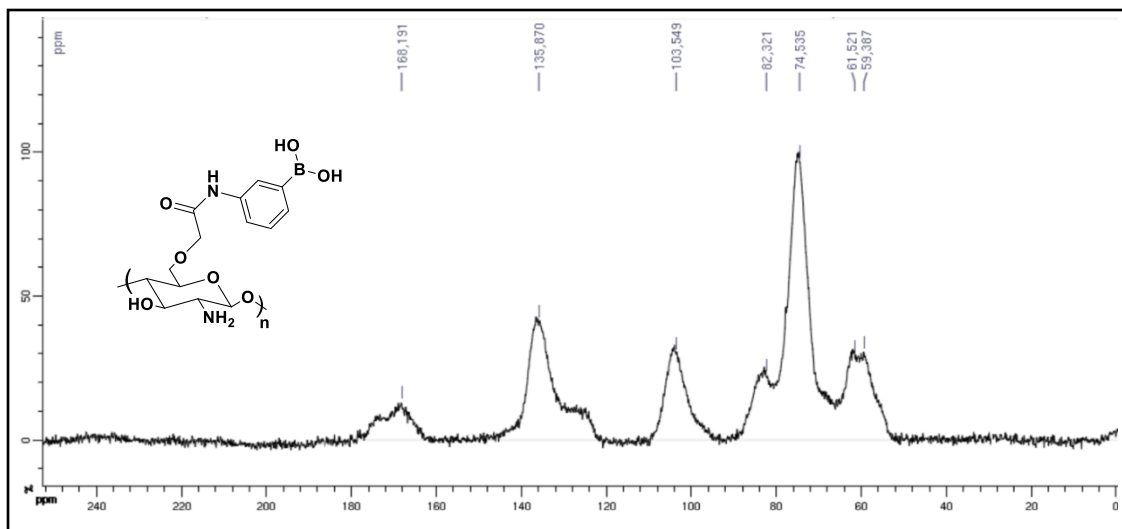
Rysunek 55. Schemat modyfikacji chitozanu prowadzącej do otrzymania CMCs-PBA



Rysunek 56. Widmo ^{13}C NMR karboksymetylochitozanu (CMCs)

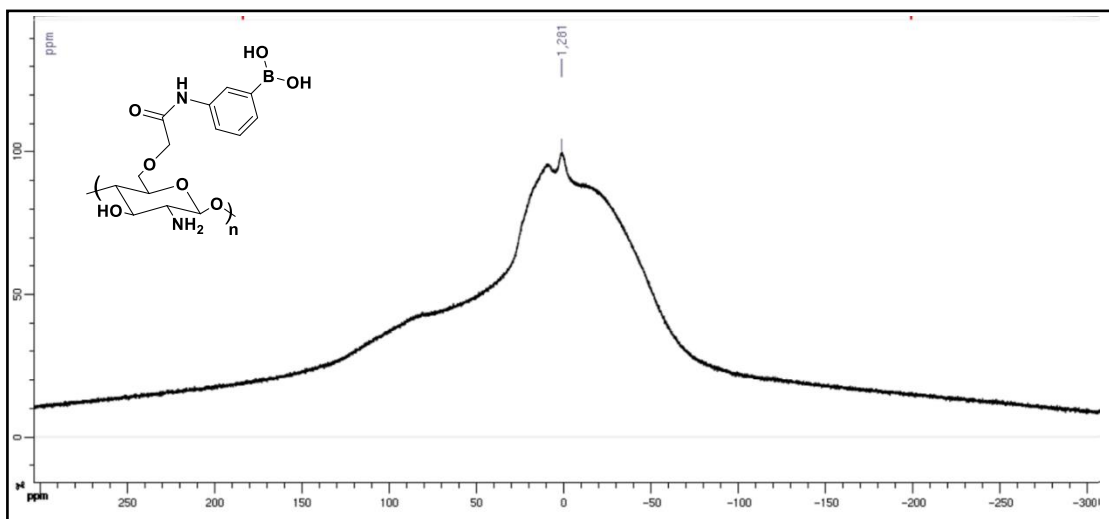
Strukturę karboksymetylochitozanu (CMCs) potwierdzono za pomocą spektroskopii ^{13}C NMR w ciele stałym (Rysunek 56). Sygnał obecny w widmie przy 199,7 ppm, odpowiada utworzonej grupie karboksylowej. Jak można zauważyć, w widmie ^{13}C NMR CMCs nie pojawiają się sygnały od grup acetylowych z niepełnej deacetylacji chitozanu. Prawdopodobnie jest to związane z tym, że podczas syntezy karboksymetylochitozanu używano stężonego roztworu wodorotlenku sodu, co doprowadziło do całkowitej deacetylacji chitozanu.

Karboksymetylochitozan poddano reakcji z kwasem 3-aminofenyloboronowym, otrzymując kolejny nowy polisacharyd, nieopisany dotąd w literaturze. Ugrupowanie kwasu boronowego zostało wprowadzone przez wiązanie amidowe w modyfikacji karboksymetylochitozanu. To kolejny materiał różniący się elementami strukturalnymi od pozostałych do tej pory przeze mnie otrzymanych.



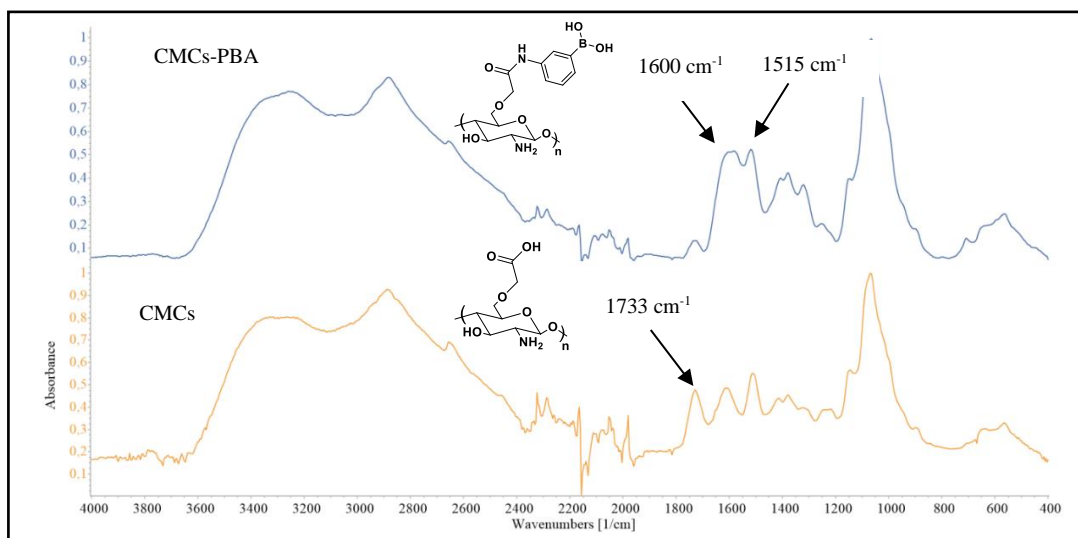
Rysunek 57. Widmo ^{13}C NMR karboksymetylochitozanu modyfikowanego kwasem 3-aminofenyloboronowym (CMCs-PBA)

W widmie ^{13}C NMR CMCs-PBA obecne są sygnały, które potwierdzają zajście reakcji między karboksymetylochitozanem i kwasem 3-aminofenyloboronowym (Rysunek 57). Są to m.in. sygnał przy 135,9 ppm, pochodzący od atomów węgla pierścienia aromatycznego kwasu boronowego (C_{AR}), oraz sygnał przy 169,2 ppm, który przypisany jest atomowi węgla przy grupie amidowej. Obecność grup dihydroksyborylowych potwierdza obecność sygnału o przesunięciu 1,281 ppm w widmie ^{11}B (Rysunek 58).



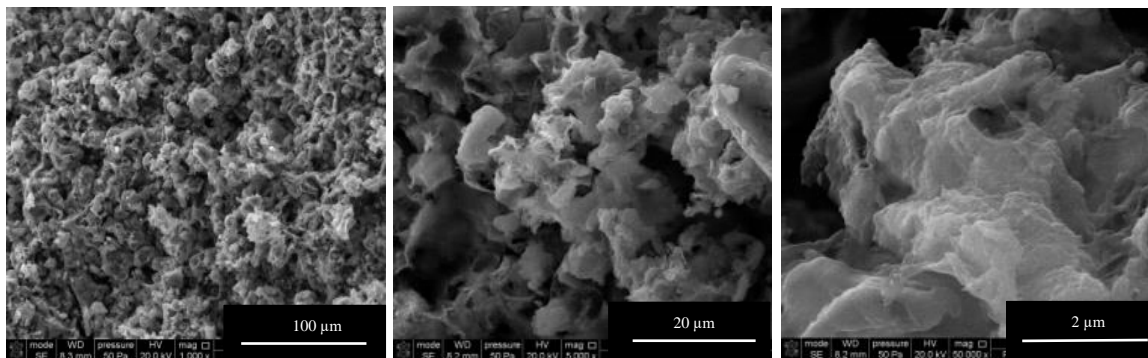
Rysunek 58. Widmo ^{11}B NMR karboksymetylochitozanu modyfikowanego kwasem 3-aminofenyloboronowym (CMCs-PBA)

Strukturę otrzymanego produktu potwierdzono również za pomocą ATR-FTIR (Rysunek 58).



Rysunek 59. Widma ATR-FTIR próbek CMCs i CMCs-PBA

W widmie ATR-FTIR karboksymetylochitozanu można zaobserwować obecność pasma przy 1733 cm⁻¹, pochodzącego od drgań rozciągających powstałej grupy karboksylowej (-COOH). Dodatkowo, można zaobserwować znaczną różnicę w widmie ATR-FTIR w zakresie 3600–2600 cm⁻¹, w porównaniu z chitozanem niemodyfikowanym, co związane jest z karboksymetylacją chitozanu. Obecność niewielkiego pasma przy 1733 cm⁻¹ w widmie materiału otrzymanego w wyniku reakcji karboksymetylochitozanu z kwasem 3-aminofenyloboronowym wynika z faktu, że najprawdopodobniej nie wszystkie grupy karboksylowe uległy reakcji z PBA. W widmie ¹³C NMR CMCs-PBA sygnały wolnych grup karboksylowych prawdopodobnie zostały przysłonięte przez szeroki sygnał od węgla grupy amidowej. Pasma w widmie ATR-FTIR CMCs-PBA przy 1600 cm⁻¹ i 1515 cm⁻¹ potwierdzają utworzenie wiązania amidowego (drgania deformacyjne N-H i drgania rozciągające C-N) w strukturze CMCs-PBA.



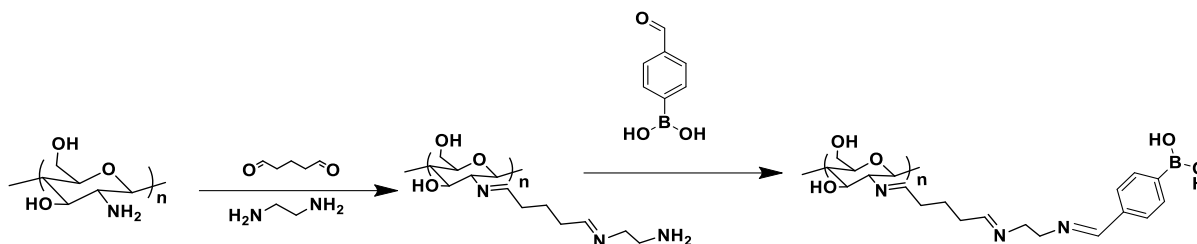
Rysunek 60. Zdjęcia SEM CMCs-PBA

Na zdjęciach SEM tego materiału (Rysunek 60) można zauważyć, że modyfikowany w ten sposób chitozan charakteryzuje się morfologią zbliżoną do morfologii chitozanu niemodyfikowanego.

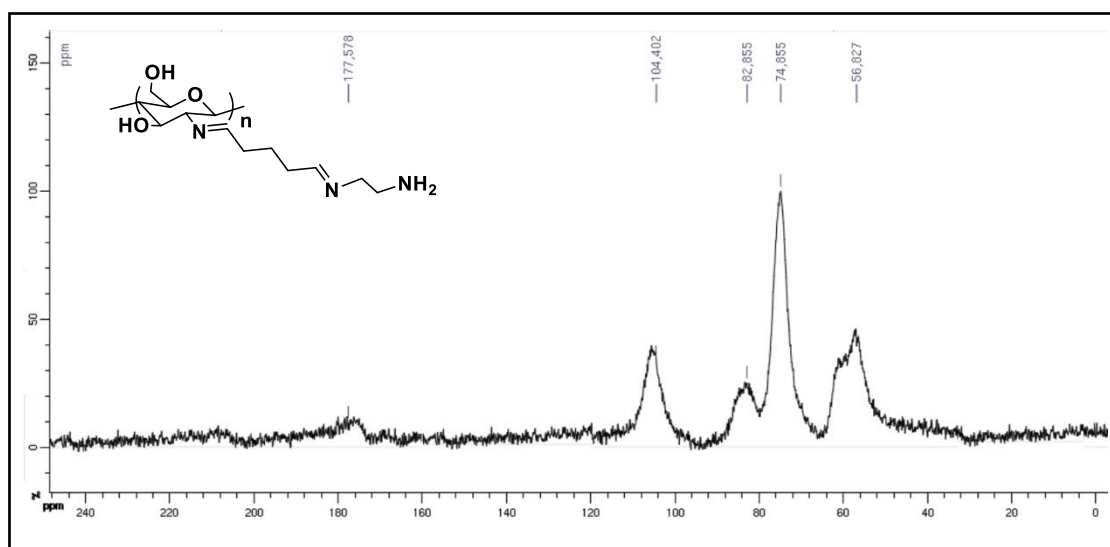
Przeprowadzono kolejne modyfikacje chitozanu, prowadzące do otrzymania polimeru zdolnego do reakcji z kwasami boronowymi. Jednym z powodów obniżających efektywność wiązania białek przez nośnik lub znacznie ją obniżających, może być zawada przestrzenna. W przypadku, gdy reaktywne grupy wiążące znajdują się zbyt blisko łańcucha polimerowego stosunkowo duże cząsteczki białka mogą mieć do nich utrudniony dostęp i w efekcie wydajność wiązania może być niska. W naszym zespole, podobny problem obserwowano przy immobilizacji enzymów na powierzchni chitozanu. Rozwiązaniem okazało się odsunięcie reaktywnych grup aminowych od łańcucha polimerowego. Było to również podejście bardzo korzystne w przypadku wiązania HSA [122]. Dlatego postanowiłam otrzymać modyfikowany chitozan z grupami aminowymi odsuniętymi od łańcucha głównego polimeru. Był to polisacharyd z jedną, dwoma i trzema grupami aminowymi w jednostce glikozydowej [159].

Modyfikacja chitozanu, polegająca na otrzymaniu jednej grupy aminowej odsuniętej od łańcucha polisacharydowego była dwuetapowa. W pierwszym etapie chitozan poddano działaniu aldehydu glutarowego, który reagując z grupami aminowymi polimeru, prowadzi do powstania grup karbonylowych. Zastosowanie odpowiednich warunków reakcji (takich jak: bufor węglanowy o pH=10,0), wykluczyło możliwość sieciowania łańcuchów polimerowych za pomocą aldehydu glutarowego. W drugim etapie, do powstałego związku dodano etylenodiaminę, która reagując z grupą karbonylową, doprowadziła do utworzenia wiązania iminowego, i w efekcie - zmodyfikowanego chitozanu Cs1.

Tak otrzymany Cs1 poddano reakcji z kwasem 4-formylofenyloboronowym otrzymując materiał boronowany (Cs1-FPBA) (Rysunek 61).

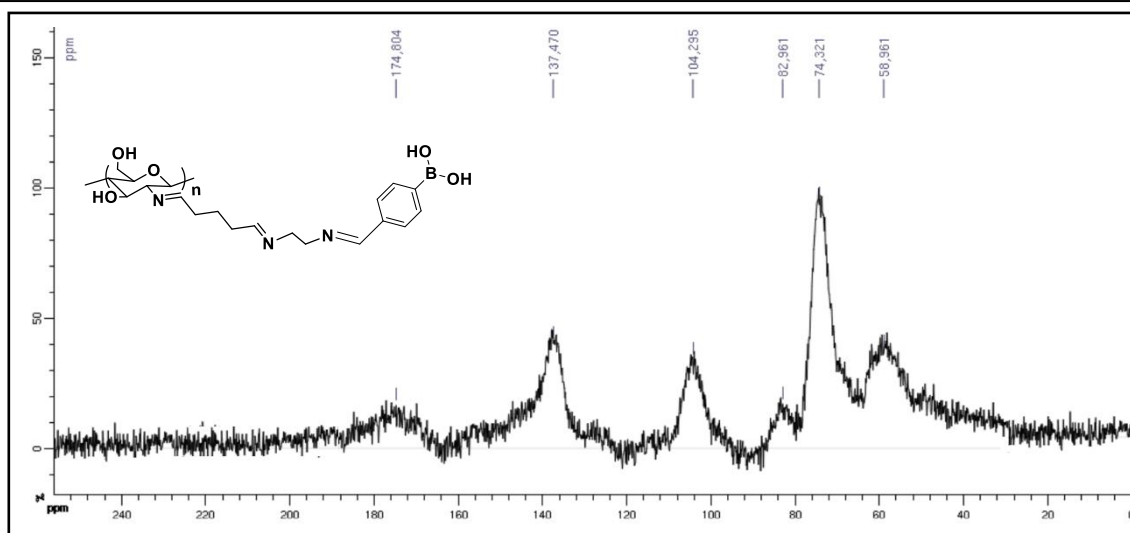


Rysunek 61. Schemat modyfikacji chitozanu prowadzącej do otrzymania Cs1-FPBA



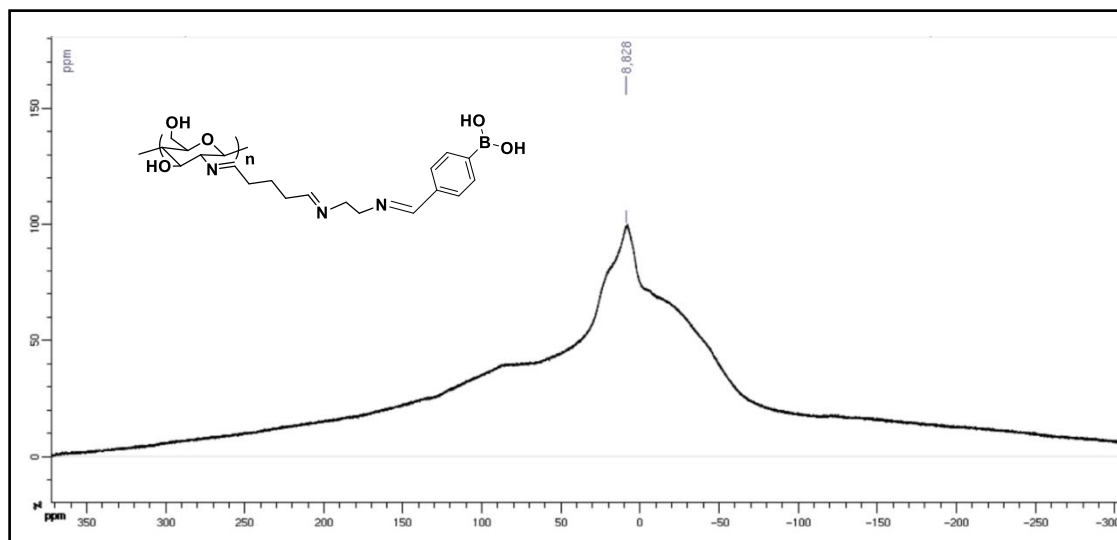
Rysunek 62. Widmo ^{13}C NMR chitozanu z jedną odsuniętą wolną grupą aminową w jednostce glikozydowej (Cs1)

W widmie ^{13}C NMR chitozanu z jedną odsuniętą wolną grupą aminową w jednostce glikozydowej (Cs1) obecne są pasma charakterystyczne dla chitozanu przy: 56,8, 74,9, 82,9, 104,4 ppm. Obecność nowego sygnału przy 177,6 ppm pochodzi od atomów węgla w utworzonych wiązaniach iminowych (C=N) (Rysunek 62).

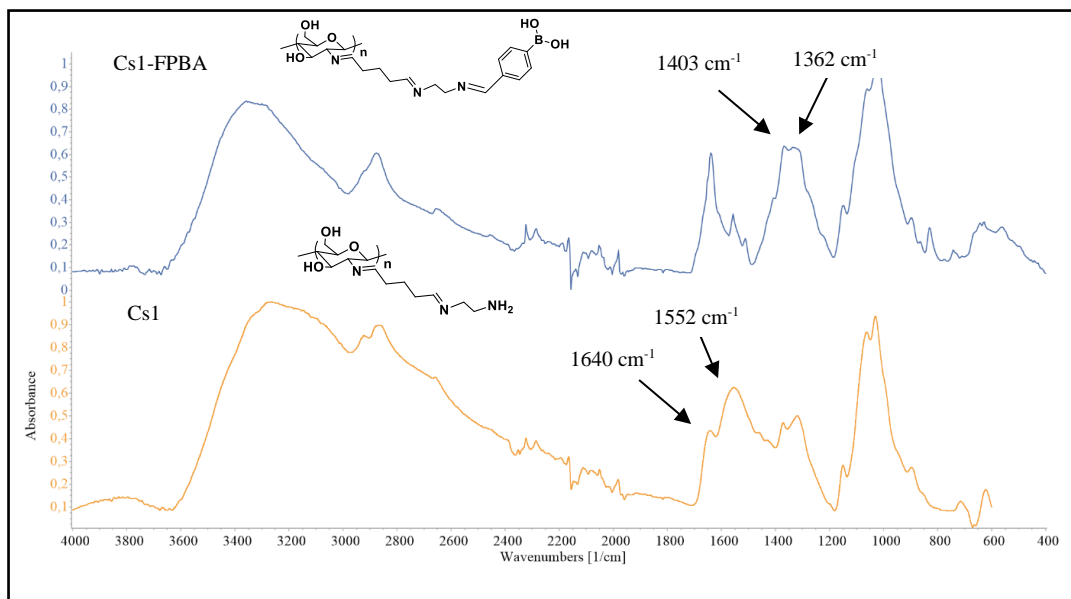


Rysunek 63. Widmo NMR ^{13}C chitozanu z jedną odsuniętą wolną grupą aminową w jednostce glikozydowej, modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs1-FPBA)

Sygnal 137,5 ppm pochodzi od atomów węgla pierścienia aromatycznego i potwierdza zajście reakcji między Cs1 i kwasem 4-formylofenyloboronowym (Rysunek 63). Dodatkowo, widmo ^{11}B potwierdza obecność atomu boru w strukturze otrzymanego materiału (Rysunek 64).

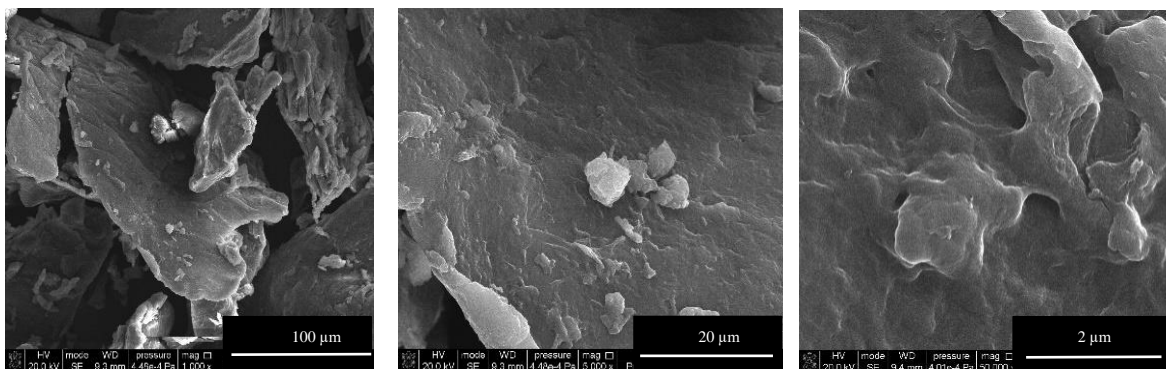


Rysunek 64. Widmo ^{11}B NMR chitozanu z jedną odsuniętą wolną grupą aminową w jednostce glikozydowej modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs1-FPBA)



Rysunek 65. Widma ATR-FTIR Cs1 i Cs1-FPBA

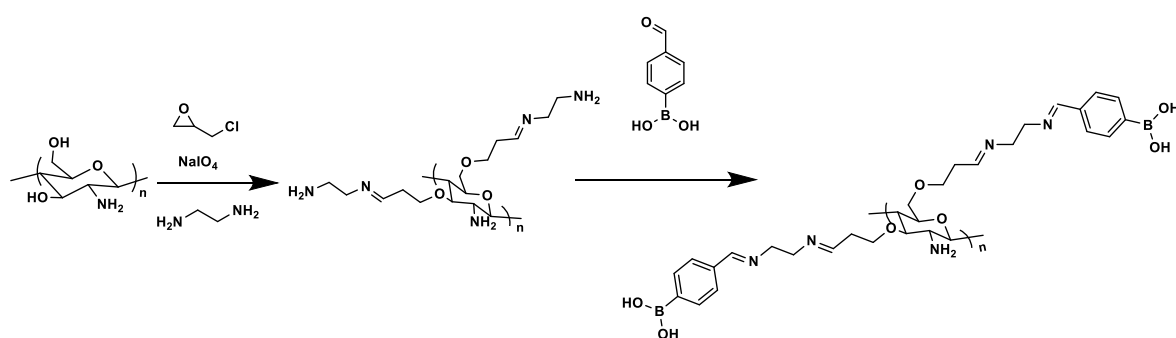
W widmie ATR-FTIR próbki Cs1, pasma przy 1640 cm⁻¹ i 1552 cm⁻¹ pochodzą, odpowiednio od drgań rozciągających C=N i drgań deformacyjnych N-H. Pomyślny przebieg reakcji, pomiędzy chitozaniem z jedną grupą aminową w jednostce glikozydowej, a kwasem 4-formylofenyloboronowym potwierdza obecność pasm przy 1403 i 1362 cm⁻¹, pochodzących od drgań B-C i B-O. Dodatkowo, pasma przy 827 i 736 cm⁻¹ pochodzą od drgań C-H, odpowiadających pierścieniowi aromatycznemu kwasu boronowego.



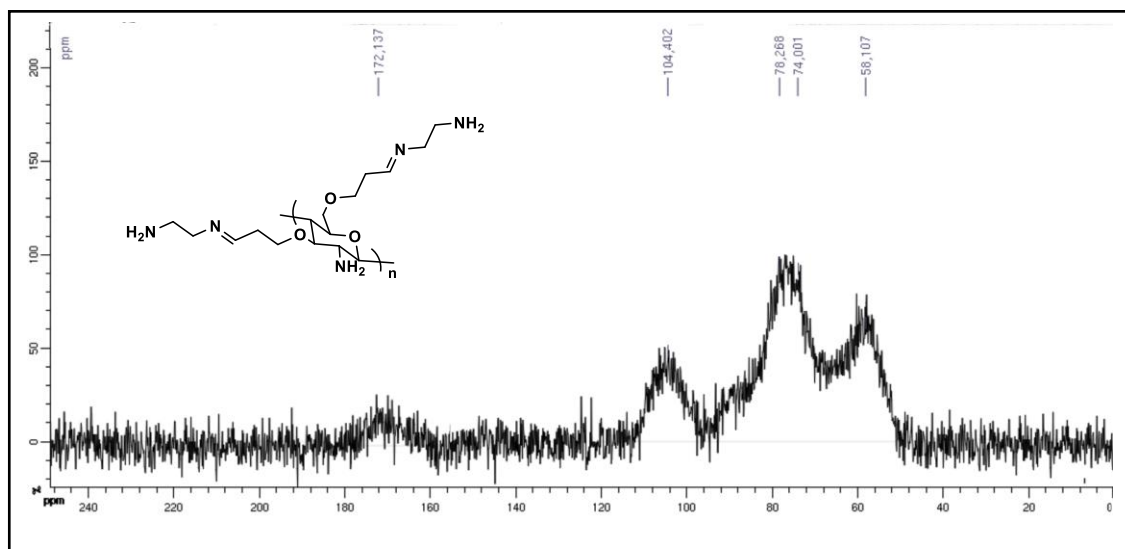
Rysunek 66. Zdjęcia SEM próbki Cs1-FPBA

Na zdjęciach SEM można zauważyć, że polimer Cs1-FPBA morfologią jest zbliżony do niemodyfikowanego chitozanu.

Modyfikacja chitozanu, prowadząca do otrzymania dwóch grup aminowych oddalonych od łańcucha głównego (Cs2), w pierwszym etapie polegała na poddaniu chitozanu reakcji jego drugorzędowych grup hydroksylowych, z utworzeniem odpowiedniego epoksydu. W drugim etapie, utworzony epoksyd, bez wydzielania z mieszaniny reakcyjnej, utleniono do grup aldehydowych, które następnie modyfikowano etylenodiaminą. Otrzymano w ten sposób chitozan z dwiema grupami aminowymi w jednostce glikozydowej oddalonymi od łańcucha głównego. Następnie, Cs2 poddano reakcji z kwasem 4-formylofenyloboronowym, otrzymując materiał, który na swojej powierzchni posiadał wolne grupy dihydroksyborylowe (Rysunek 67).

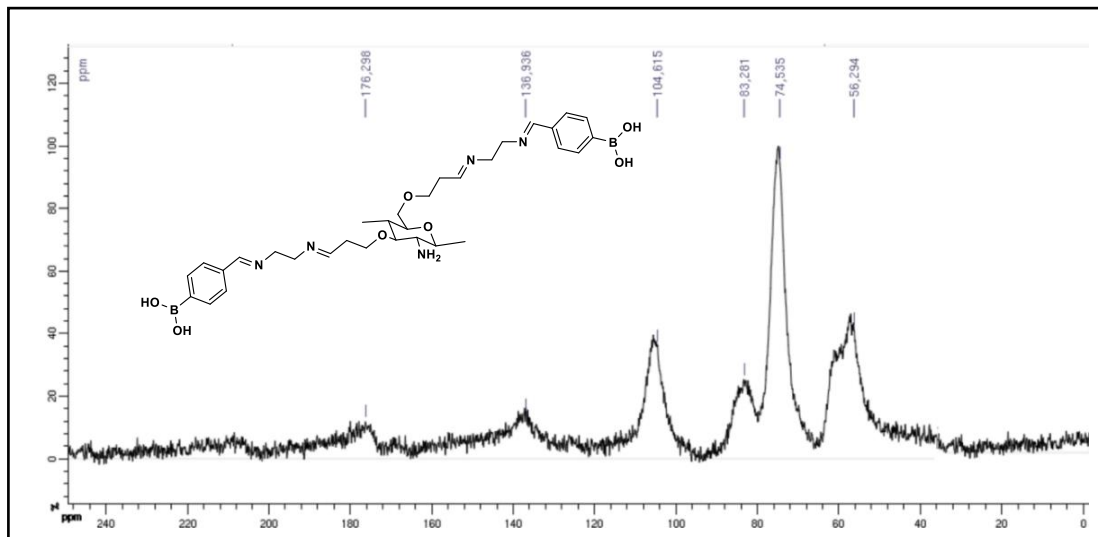


Rysunek 67. Schemat modyfikacji chitozanu, prowadzącej do otrzymania Cs2-FPBA



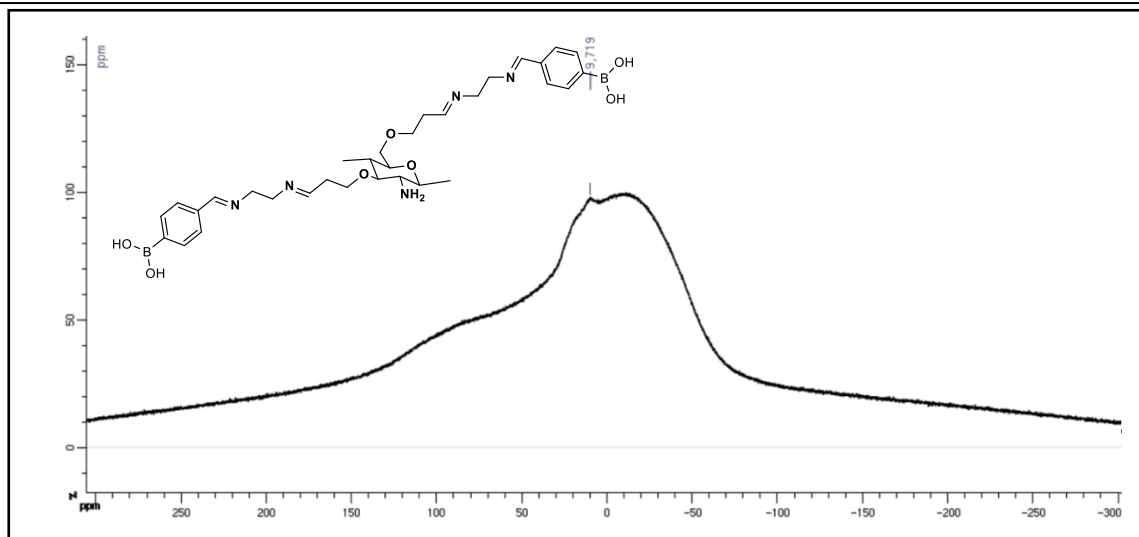
Rysunek 68. Widmo ^{13}C NMR chitozanu z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs2)

Podobnie jak, w widmie ^{13}C NMR próbki Cs1, w widmie ^{13}C NMR próbki Cs2 obecne są sygnały charakterystyczne dla chitozanu niemodyfikowanego oraz sygnał przy 172,1 ppm, pochodzący od atomu węgla przy wiązaniu iminowym.

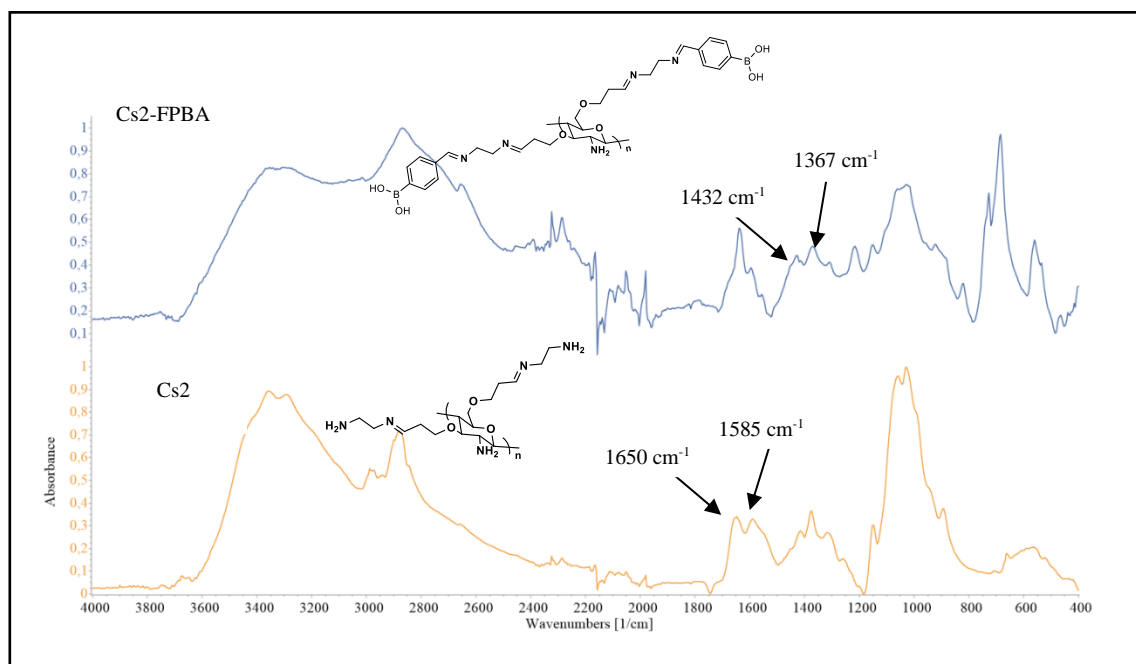


Rysunek 69. Widmo ^{13}C NMR chitozanu z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej, modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs2-FPBA)

O pomyślnym przebiegu reakcji między chitozanem z dwiema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs2), a kwasem 4-formylofenyloboronowym świadczy obecność sygnału w widmie ^{13}C NMR przy 136,9 ppm, pochodzącego od atomów węgla pierścienia aromatycznego kwasu boronowego, a także sygnał w widmie ^{11}B NMR przy 9,12 ppm.

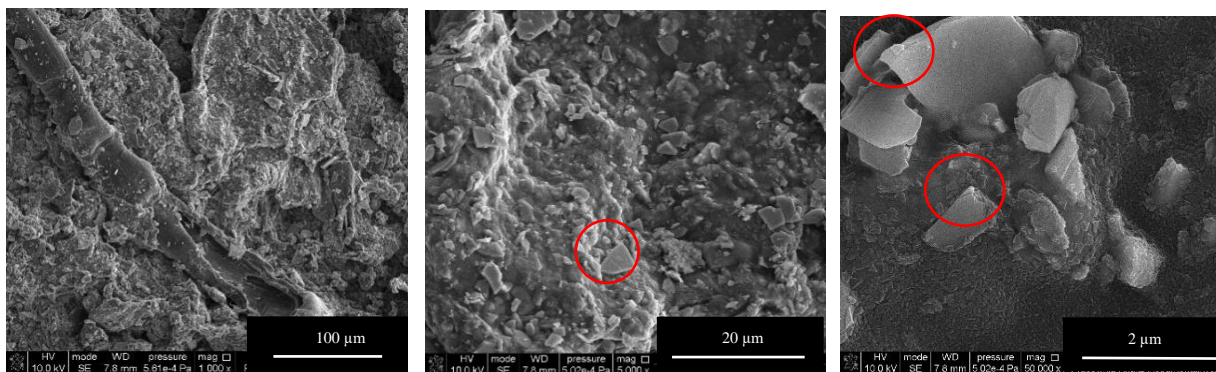


Rysunek 70. Widmo ^{11}B NMR chitozanu z dwoma odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs2-FPBA)



Rysunek 71. Widma ATR-FTIR Cs2 i Cs2-FPBA

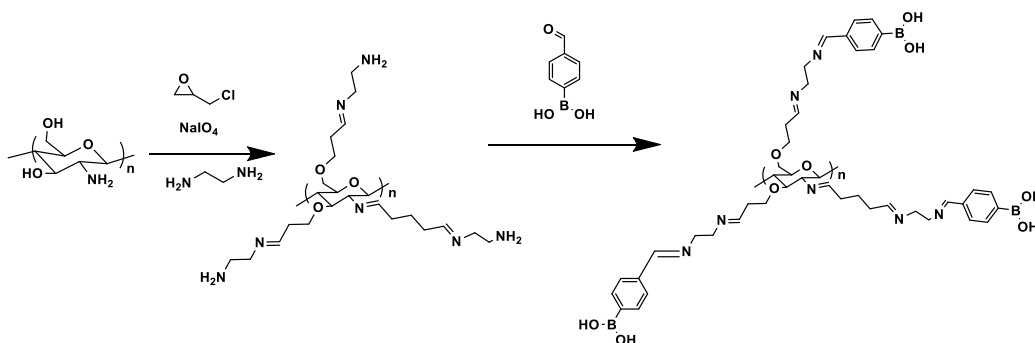
W widmie ATR-FTIR materiału Cs2, podobnie jak w przypadku Cs1, pasma przy 1650 cm^{-1} i 1585 cm^{-1} pochodzą, odpowiednio, od drgań rozciągających $\text{C}=\text{N}$ i drgań deformacyjnych $\text{N}-\text{H}$. Po reakcji z kwasem boronowym, w widmie można zaobserwować szerokie pasmo przy $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, przypisane grupom dihydroksylowym kwasu boronowego, a także pasma przy 1432 i 1367 cm^{-1} .



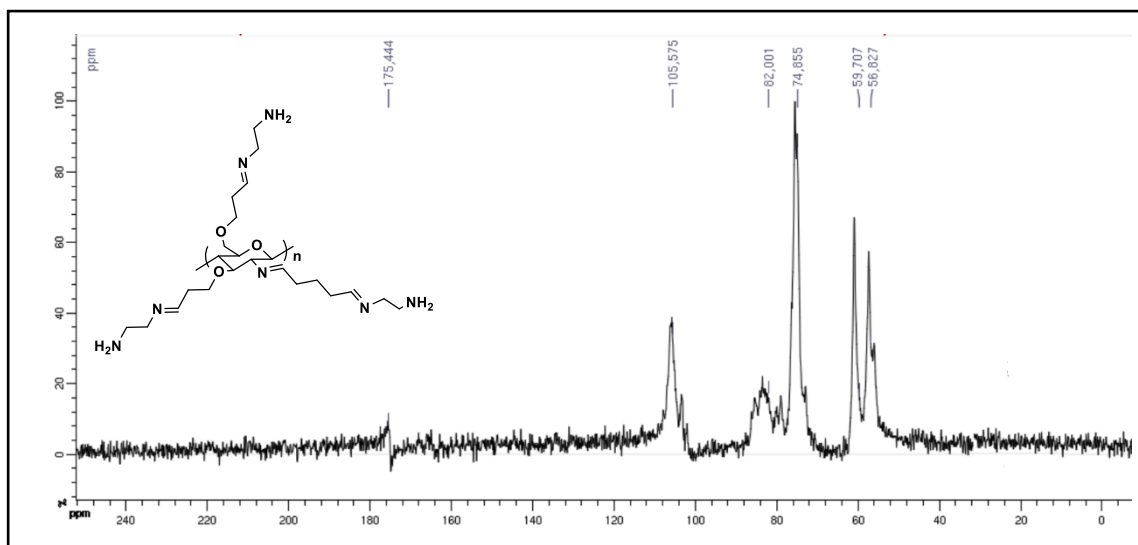
Rysunek 72. Zdjęcia SEM próbki Cs2-FPBA

Zdjęcia SEM próbki Cs2-FPBA pokazują charakterystyczną nieregularną powierzchnię zbudowaną z wielu aglomeratów z ostrymi krawędziami.

W celu otrzymania chitozanu posiadającego trzy grupy aminowe w jednostce glikozydowej, polimer natywny został poddany działaniu epichlorohydryny, aldehydu glutarowego oraz etylenodiaminy. W kolejnych etapach, w wyniku reakcji z epichlorohydryną oraz aldehydem glutarowym utworzone zostały grupy epoksydowe, pochodzące z epichlorohydryny, które w następnym kroku utleniono do grup karbonylowych za pomocą nadjodanu sodu. Do powstałego związku dodano etylenodiaminę (w obecności buforu węglanowego o pH=10), która reagując ze wszystkimi grupami karbonyłowymi, doprowadziła do utworzenia chitozanu z trzema grupami aminowymi oddalonymi od łańcucha głównego (Cs3). Materiał ten, podobnie jak w poprzednich modyfikacjach, poddano następnie reakcji z kwasem 4-formylofenyloborowym (Rysunek 73).

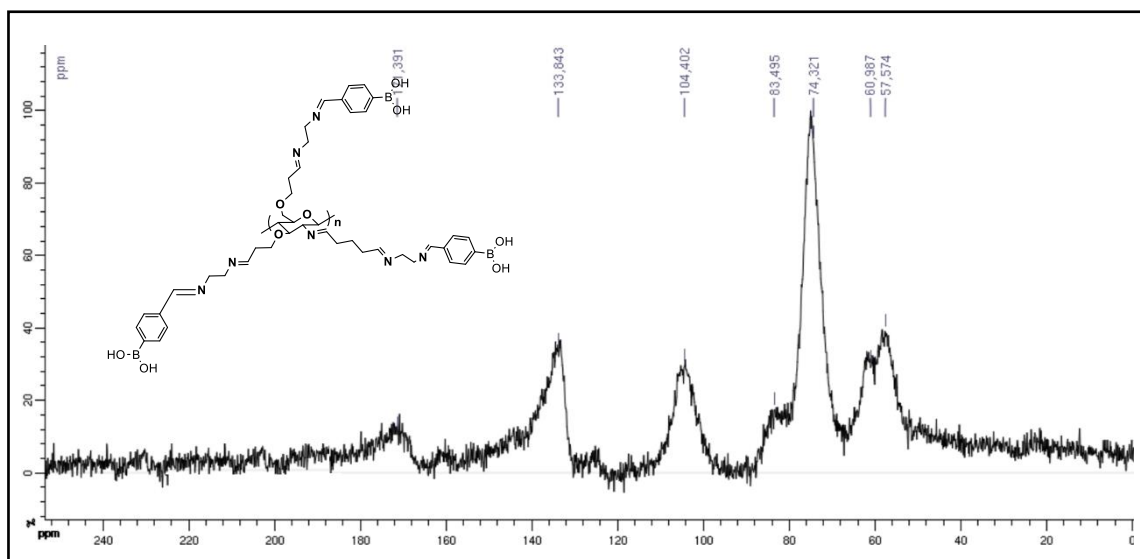


Rysunek 73. Schemat modyfikacji chitozanu prowadzącej do otrzymania Cs-3-FPBA



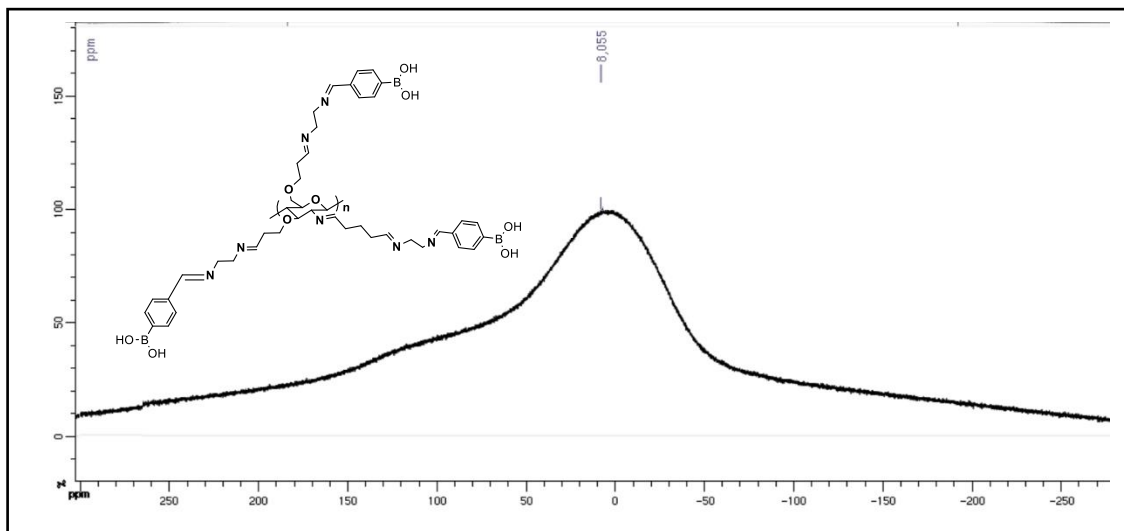
Rysunek 74. Widmo ^{13}C NMR chitozanu z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej (Cs3)

W widmie ^{13}C NMR materiału Cs3 zaobserwowano różnice między sygnałami atomów C2 i C6 (Rysunek 74), tj. dwa oddzielone sygnały przy 57,5 i 61,0 ppm, czego nie widać w widmach ^{13}C NMR Cs1 i Cs2. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi wynika to z obecności odmiennego otoczenia chemicznego [159].

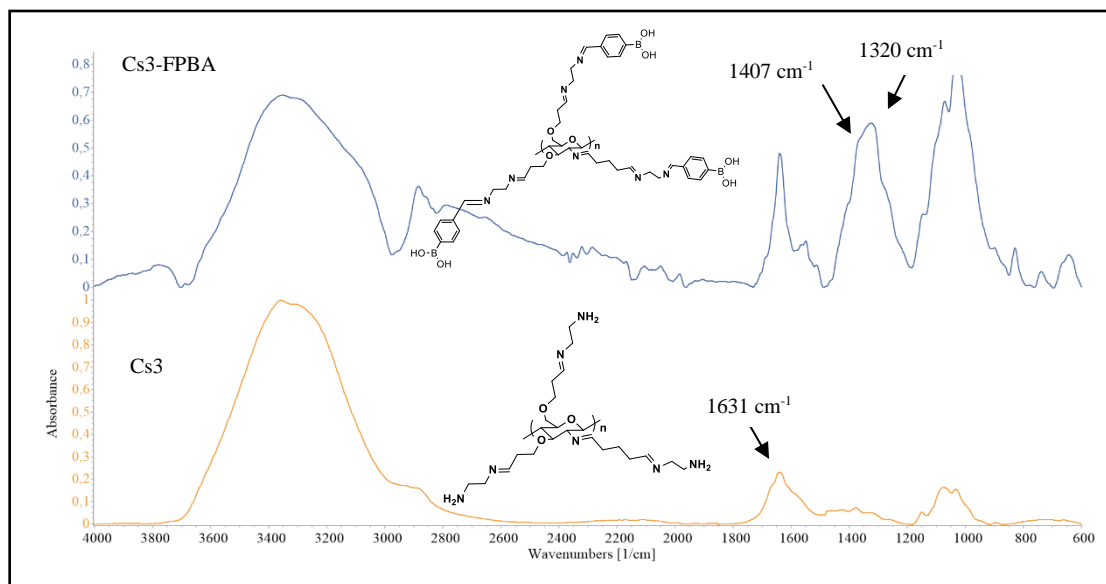


Rysunek 75. Widmo ^{13}C NMR chitozanu z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs3-FPBA)

Podobnie, jak w przypadku widm ^{13}C NMR dla Cs1-FPBA i Cs2-FPBA, w widmie ^{13}C NMR Cs3-FPBA obecny jest sygnał przy 133,8 ppm, pochodzący od atomów węgla pierścienia aromatycznego kwasu boronowego.



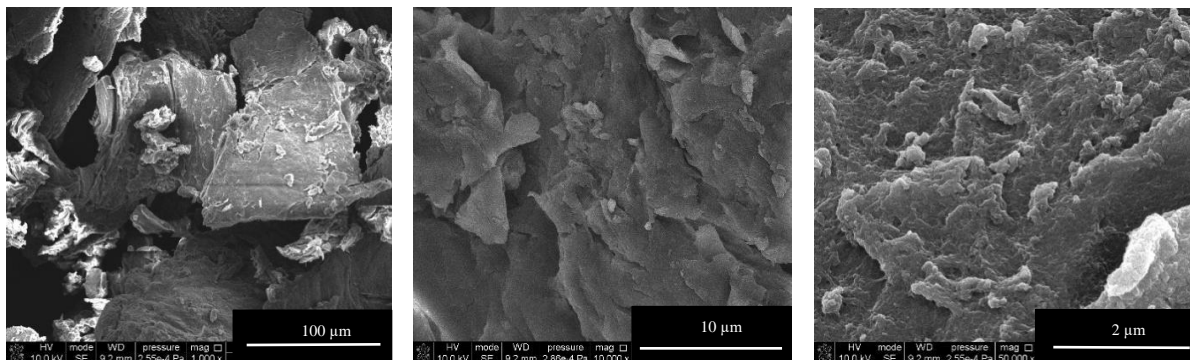
Rysunek 76. Widmo ^{11}B NMR chitozanu z trzema odsuniętymi grupami aminowymi w jednostce glikozydowej modyfikowanego kwasem 4-formylofenyloboronowym (Cs3-FPBA)



Rysunek 77. Widma ATR-FTIR Cs3 i Cs3-FPBA

W widmie Cs3, szerokie i bardzo intensywne pasmo przy 3600-3000 cm^{-1} związane jest z lokalizacją grup aminowych i wodorotlenowych na powierzchni chitozanu. Pasmo przy 1631 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym C=N, natomiast pasmo przy

1081 cm^{-1} związane jest z drganiami rozciągającymi C-N oraz C-O, występującymi we wszystkich sacharydach. Po reakcji Cs3 z kwasem 4-formylofenyloboronowym, w widmie pojawiło się intensywne pasmo przy 1643 cm^{-1} , (pochodzące od drgań C=N) oraz pasma przy 1407 cm^{-1} i 1320 cm^{-1} , odpowiadające drganiom C-B i B-O. Z kolei, pasma przy 824 i 744 cm^{-1} pochodzą od drgań oscylacyjnych C-H w pierścieniach aromatycznych kwasu boronowego użytego do reakcji.

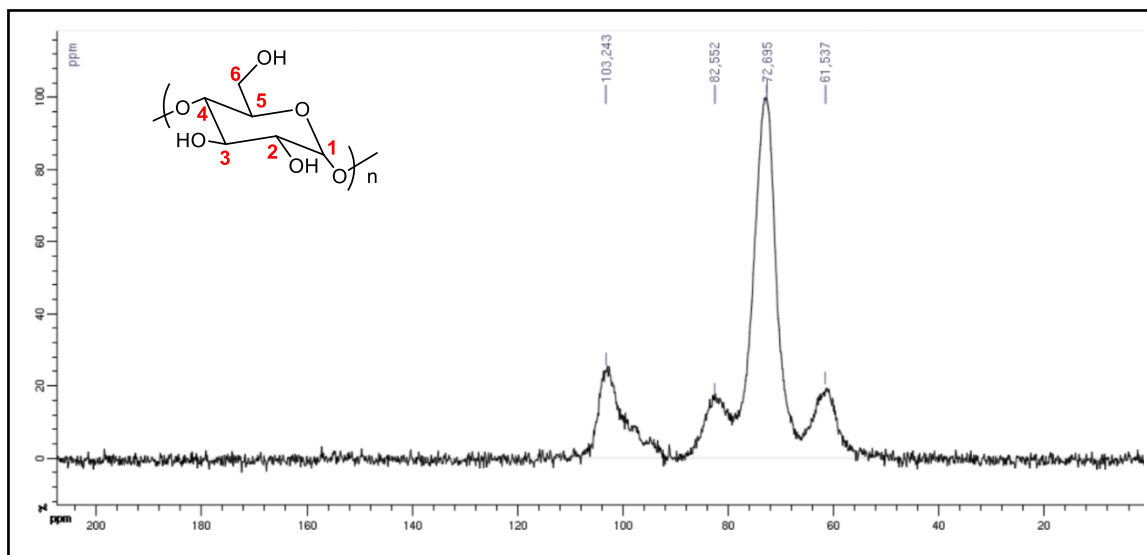


Rysunek 78. Zdjęcia SEM Cs3-FPBA

Na zdjęciach SEM tej próbki zaobserwować można znaczne zróżnicowanie powierzchni zmodyfikowanego chitozanu (Rysunek 78). Struktura polimeru jest bardzo nieregularna, a ponadto, ma on tendencje do tworzenia zwartych agregatów, składających się z licznych małych cząstek polimeru.

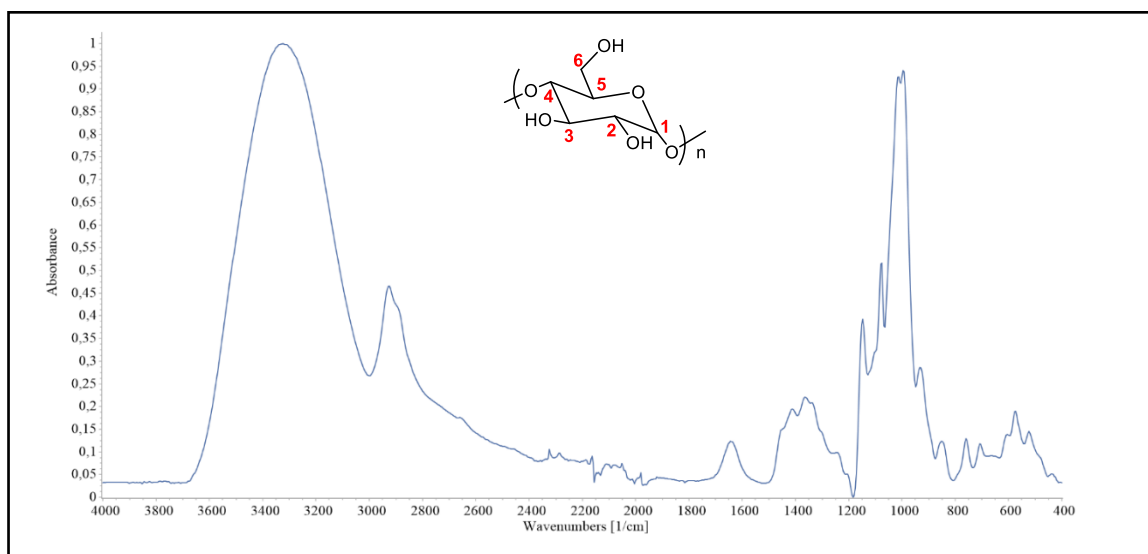
20. Modyfikacja skrobi kukurydzianej

Strukturę wyjściowej skrobi kukurydzianej scharakteryzowano za pomocą widm ^{13}C NMR oraz ATR-FTIR. Morfologię materiałów oceniono za pomocą zdjęć SEM. Procentowa zawartość amylozy w skrobi użytej do modyfikacji, wyznaczona za pomocą testu Amylose/Amylopectin Assay Kit, wynosiła 19,25 %.



Rysunek 79. Widmo ¹³C NMR skrobi kukurydzianej

W widmie ¹³C NMR skrobi kukurydzianej użytej do dalszych modyfikacji obecne są sygnały o przesunięciu 61,5 ppm (C6); szeroki sygnał przy 72,7 ppm (C2, C3, C5) oraz sygnał przy 82,5 ppm (C4) i 103,2 ppm (C1) (Rysunek 79) [199].



Rysunek 80. Widmo ATR-FTIR skrobi kukurydzianej

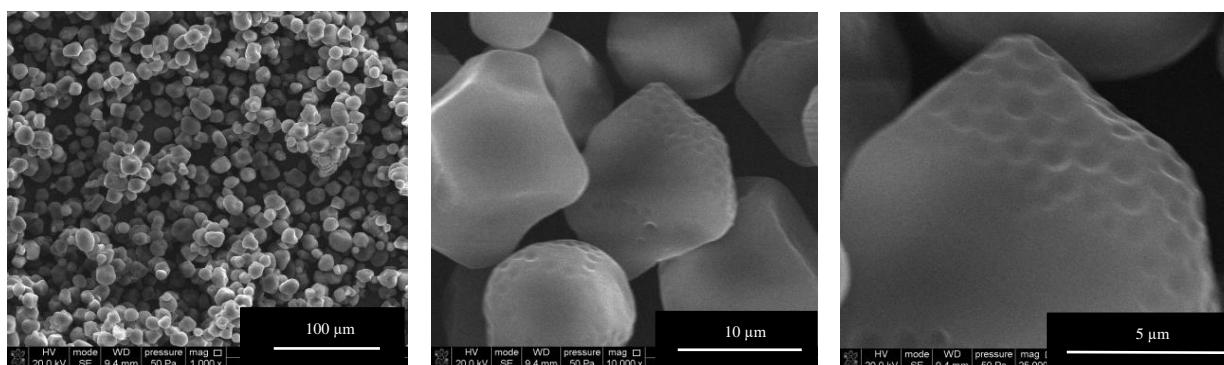
W widmie ATR-FTIR zarejestrowanym dla skrobi kukurydzianej (Rysunek 80) widoczne są charakterystyczne pasma dla drgań grup hydroksylowych, obecnych w strukturze skrobi (3300 cm⁻¹) oraz drgań rozciągających grup C-H przy 2880 cm⁻¹. Pasma przy 1330 cm⁻¹ oraz 1045 cm⁻¹ odpowiadają odpowiednio, drganiom wiązań C-H oraz C-C obecnym w pierścieniu glukozowym, a pasmo przy 1075 cm⁻¹ świadczy o obecności w strukturze połączeń C-O-C, charakterystycznych dla wiązań glikozydowych

skrobi [127]. Rodzaje drgań wiązań oraz odpowiadające im pasma absorpcyjne w widmie ATR-FTIR skrobi kukurydzianej przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Rodzaje drgań wiązań i odpowiadające im pasma absorpcyjne w widmie ATR-FTIR skrobi kukurydzianej [127].

Rodzaje wiązań	Liczba falowa [cm ⁻¹]	Rodzaj drgań
-O-H	3500	rozciągające
-C-H-	2900	rozciągające
-C-C-	1163	rozciągające
-C-O-C-	1080	rozciągające
-C-H-	1090	zginające
-C-C-	1050	deformacyjne
-C-O-	1015	rozciągające

Morfologię wyjściowej skrobi scharakteryzowano za pomocą SEM (Rysunek 80) [162].



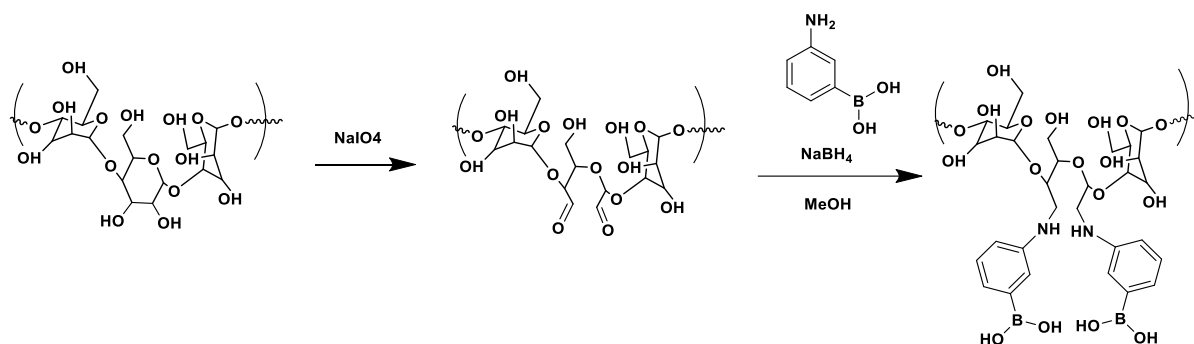
Rysunek 81. Zdjęcia SEM skrobi kukurydzianej

Na zdjęciach SEM skrobi kukurydzianej (Rysunek 81) można zauważyć, że posiada ona strukturę charakterystycznych ziaren o wielościennych lub kulistych kształtach i w miarę jednorodnych rozmiarach (ok. 10 µm).

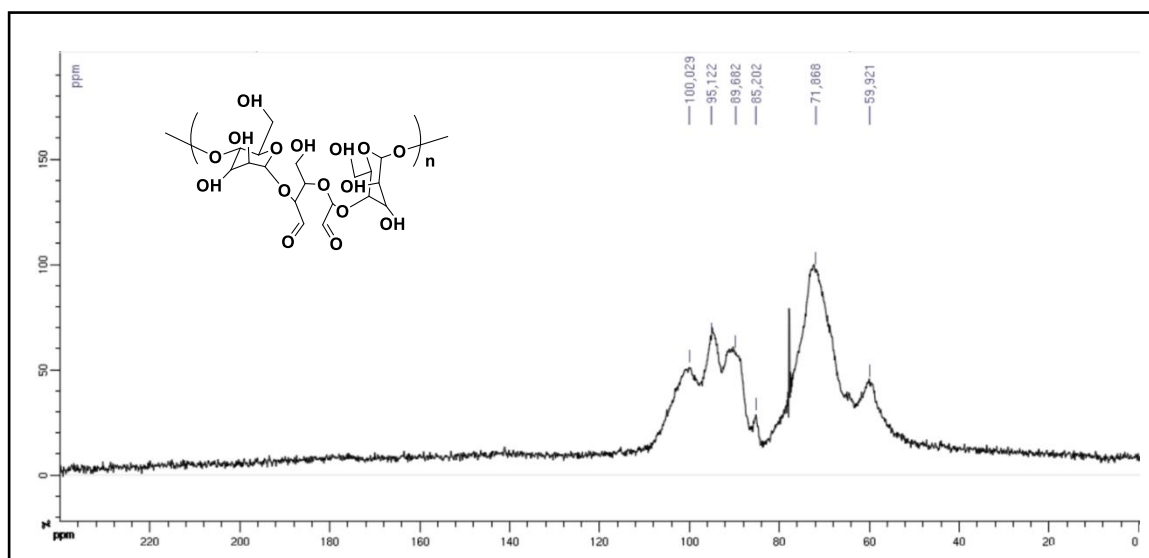
Podobnie, jak w przypadku chitozanu, modyfikacja skrobi miała na celu otrzymanie materiału zdolnego do reakcji z kwasami boronowymi. Ponieważ skrobia w swojej strukturze nie posiada grup funkcyjnych zdolnych do bezpośredniej modyfikacji kwasami boronowymi postanowiłam otrzymać materiał na bazie skrobi dialdehydowej. Następnie wolne grupy aldehydowe poddałam reakcji z kwasem 3-aminofenyloboronowym. W odróżnieniu od reakcji chitozanu dialdehydowego z kwasem 3-aminofenyloboronowym, reakcja skrobii dialdehydowej była prowadzona

w temperaturze pokojowej, ponieważ przy podwyższonej temperaturze, obecne w DAS wolne grupy aldehydowe ulegały sieciowaniu. W konsekwencji uniemożliwiało to reakcję z kwasem boronowym.

W kolejnym etapie, utworzone w temperaturze pokojowej wiązanie iminowe pomiędzy skrobią dialdehydową a kwasem 3- aminofenyloboronowym poddałam redukcji za pomocą NaBH_4 (Rysunek 82).

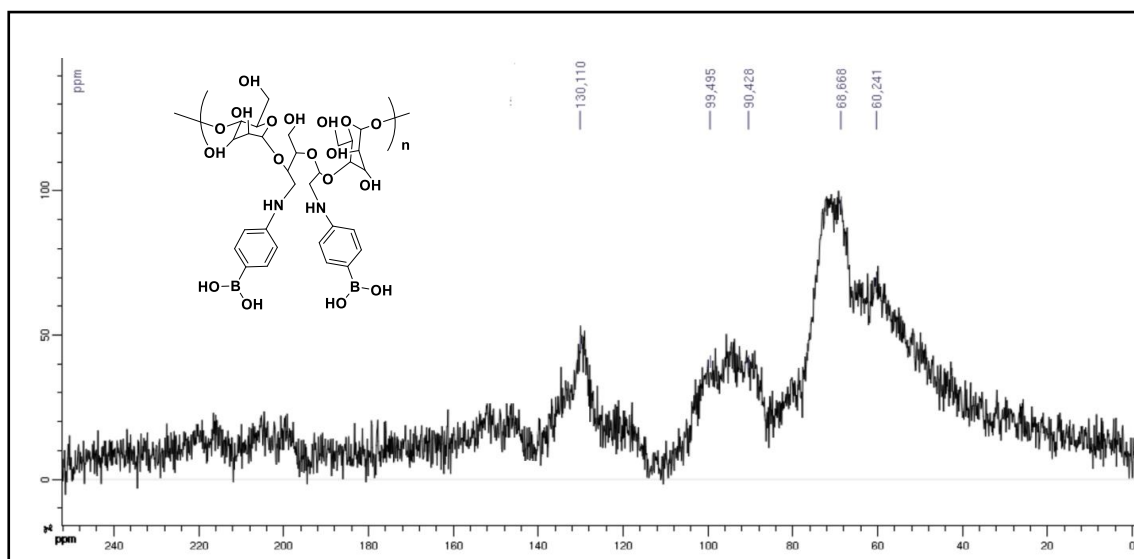


Rysunek 82. Schemat modyfikacji skrobi prowadzącej do otrzymania DAS-PBA



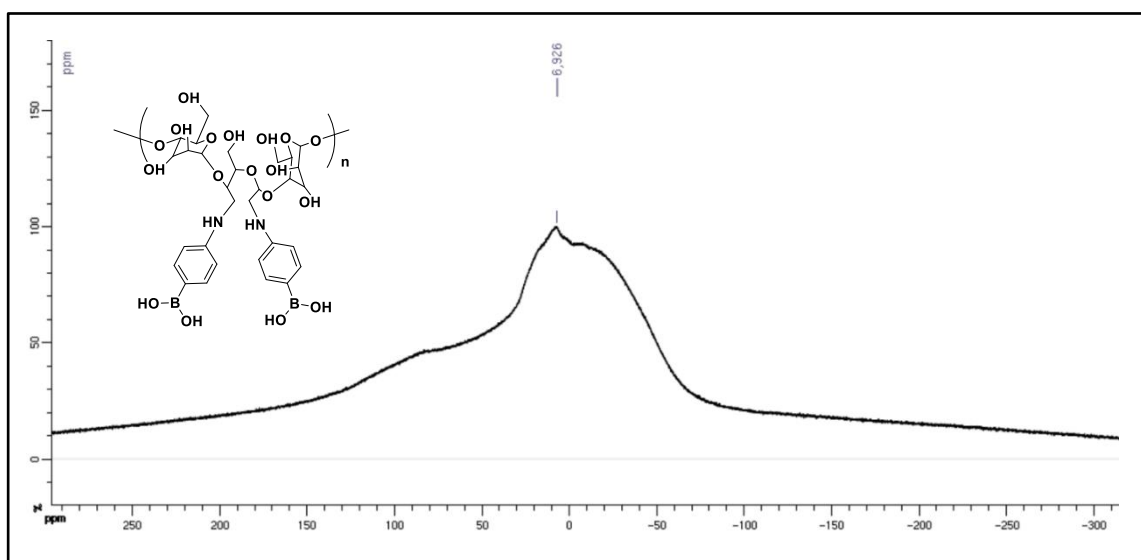
Rysunek 83. Widmo ^{13}C NMR skrobi dialdehydowej DAS

W widmie ^{13}C NMR skrobi dialdehydowej brakuje sygnału między 170-190 ppm, pochodzącego od węgla grupy aldehydowej. Sygnały, pochodzące od grup aldehydowych zazwyczaj mają niewielką intensywność, co w przypadku widm ^{13}C NMR w ciele stałym może powodować, że są niewidoczne. Dodatkowo, zgodnie z danymi literaturowymi, utworzone aldehydy są obecne w postaci półacetalu, a nie jako grupy $-\text{CHO}$ [163].

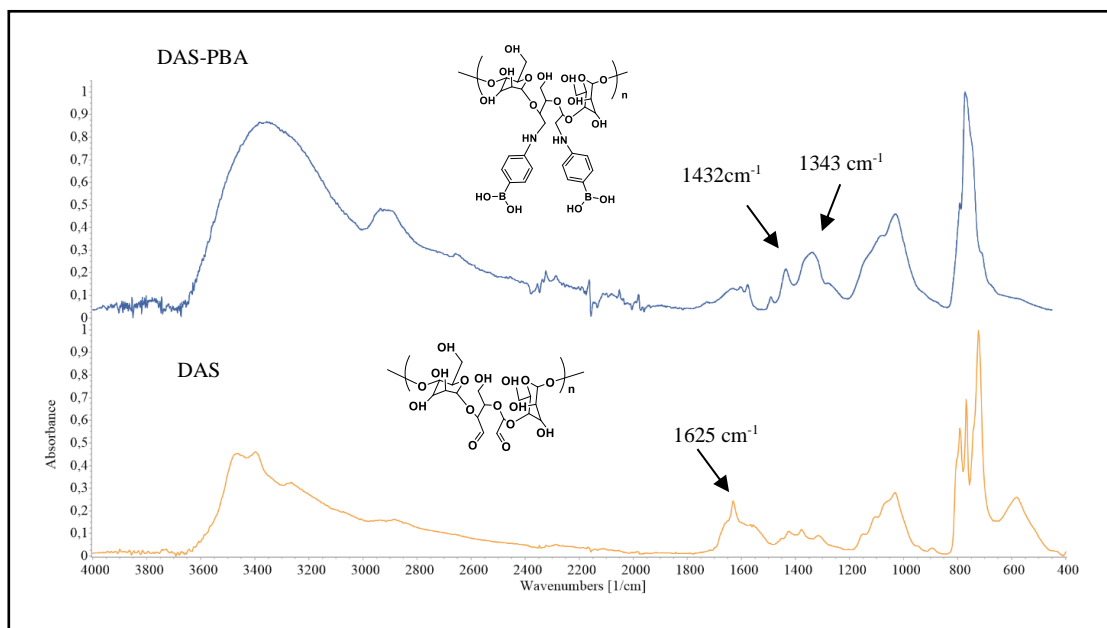


Rysunek 84. Widmo ^{13}C NMR skrobi dialdehydowej modyfikowanej kwasem 3-aminofenyloboronowym (DAS-PBA)

Pomyślne zajście reakcji, pomiędzy skrobią dialdehydową a kwasem 3- aminfenyloboronowym potwierdza obecność sygnału w widmie ^{13}C NMR próbki DAS-PBA sygnału o przesunięciu 130,1 ppm, pochodzącego od atomów węgla pierścieni aromatycznych kwasu boronowego użytego do reakcji. Dodatkowo, widmo ^{11}B NMR potwierdza obecność atomu boru.

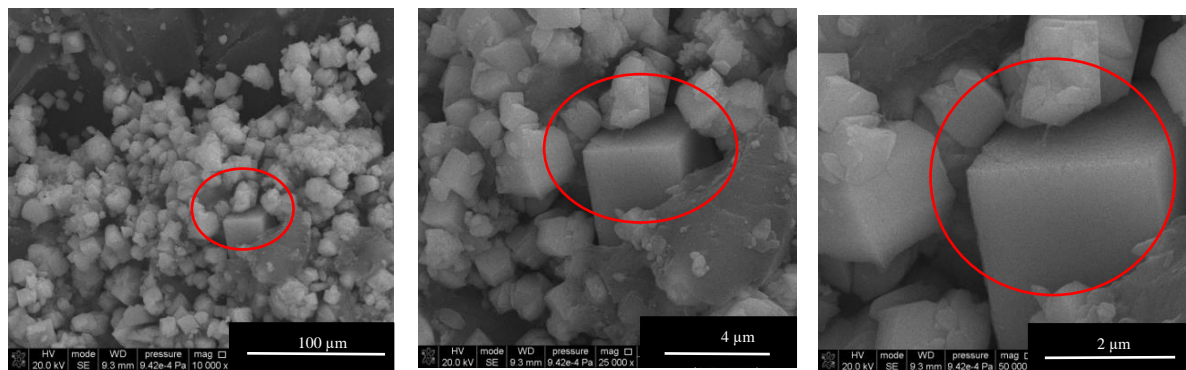


Rysunek 85. Widmo ^{11}B NMR skrobi dialdehydowej modyfikowanej kwasem 3-aminofenyloboronowym (DAS-PBA)



Rysunek 86. Widma ATR-FTIR DAS i DAS-PBA

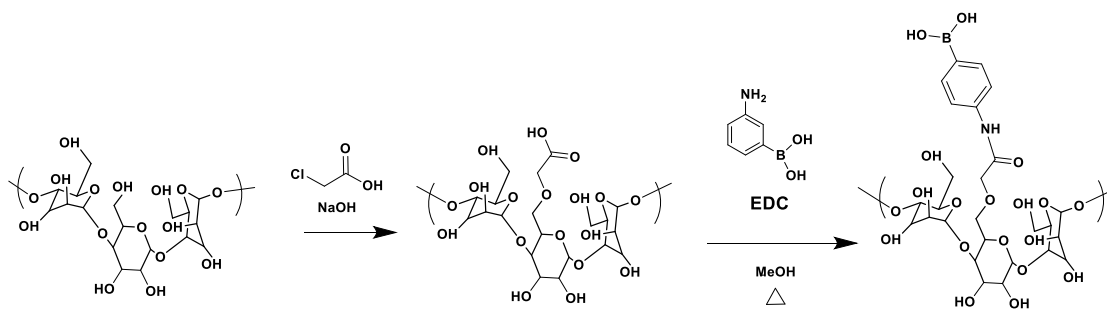
Dowodu utleniania skrobi dostarcza spektroskopia ATR-FTIR. Podczas reakcji utlenienia pęka wiązanie między C2 a C3 w pierścieniu piranozowym skrobi. W obrębie jednego meru powstają dwie grupy aldehydowe, co potwierdza obecność pasma przy 1625 cm⁻¹ w widmie skrobi dialdehydowej (DAS). Ponadto, intensywność pasm przy 700–800 cm⁻¹ oraz przy 996 cm⁻¹ w DAS, przypisywanych pierścieniom piranozowym, znacznie maleje, co też spowodowane jest ich otwarciem. Można również zaobserwować przesunięcie pasma hydroksylowego z 3306 cm⁻¹ do 3400 cm⁻¹, przy jednoczesnym wzroście jego intensywności i zmniejszeniu szerokości. Spowodowane jest to zmniejszeniem ilości grup hydroksylowych w skrobi dialdehydowej. Po reakcji skrobi dialdehydowej z kwasem 3-aminofenyloboronowym zaobserwowano zanik pasma przy 1625 cm⁻¹, pochodzącego od drgań grupy karbonylowej, co potwierdza zajście reakcji między skrobią a kwasem boronowym. Zanik tego pasma sugeruje również, że wszystkie wolne grupy aldehydowe przereagowały z kwasem PBA. Z kolei pasmo przy 1570 cm⁻¹ odpowiada za obecność wiązania aminowego (pasma amidowe II). Dodatkowo, pasma przy 1432 cm⁻¹ i 1343 cm⁻¹ przypisuje się odpowiednio, drganiom rozciągającym B-C i B-O, potwierdzając tym samym pomyślnie zajście reakcji. O wzroście ilości grup -OH przez wprowadzenie grup dihydroksyborylowych świadczy zwiększenie intensywności pasma hydroksylowego w widmie DAS-PBA, natomiast jego poszerzenie wskazuje na wzrost oddziaływań międzycząsteczkowych np. tworzenie nowych wiązań wodorowych.



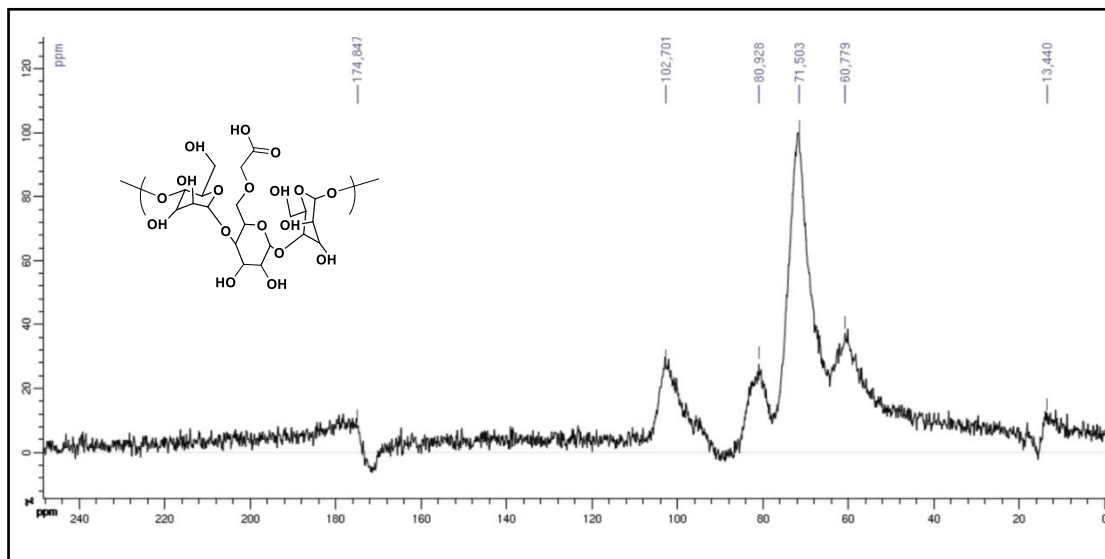
Rysunek 87. Zdjęcia SEM DAS-PBA

Na zdjęciach SEM próbki DAS-PBA (Rysunek 87) można zauważyć, że cząstki mają postać regularnych sześciątów z ostrymi krawędziami. Ich rozmiary są zróżnicowane, największe osiągają ok. 2 μm . Być może, tak regularne kształty są spowodowane silnymi oddziaływaniami międzycząsteczkowymi, co sugerowały widma ATR-FTIR.

Kolejna modyfikacja skrobi, podobnie jak w przypadku chitozanu polegała na przeprowadzeniu jej w karboksymetylowaną pochodną, wykorzystując do tego celu kwas monochlorooctowy. Utworzoną karboksymetyloskrobię, następnie poddałam reakcji z kwasem 3-aminofenyloboronowym. W odróżnieniu od karboksymetylochitozanu, ta reakcja wymagała obecności 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC), w celu aktywacji grup karboksylowych na powierzchni karboksymetyloskrobi (Rysunek 88). EDC to związek chemiczny, który jest powszechnie stosowany jako środek aktywujący grupę karboksylową do reakcji z aminami pierwszorzędowymi z wytworzeniem wiązań amidowych. [164]. Bez udziału EDC w widmie reakcja nie zachodziła - widma ^{13}C NMR i ATR-FTIR wskazywały jednoznacznie na obecność niemodyfikowanej karboksymetyloskrobi.

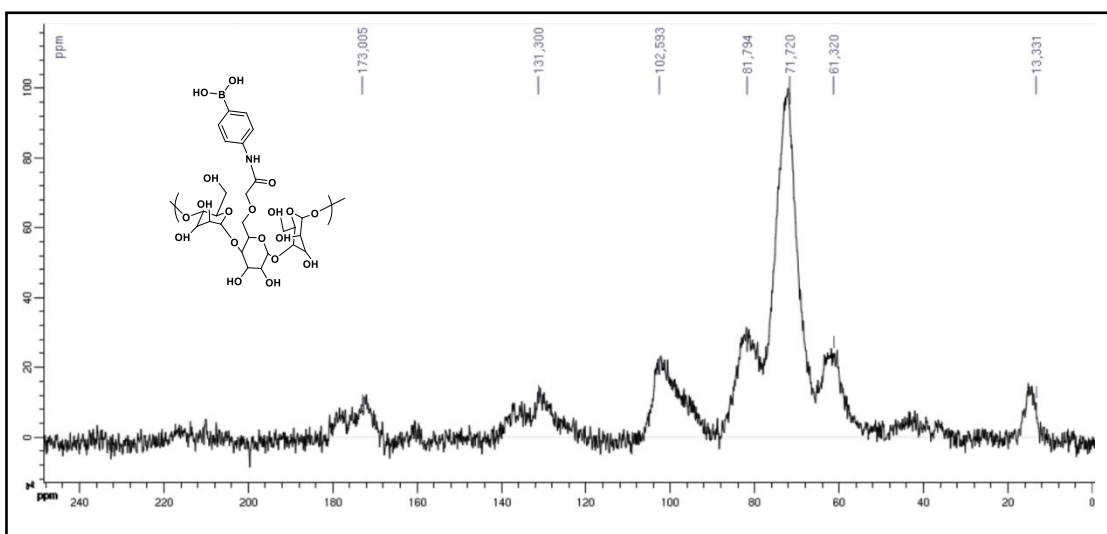


Rysunek 88. Schemat modyfikacji skrobi prowadzącej do otrzymywania CMS-PBA



Rysunek 89. Widmo ^{13}C NMR karboksymetyloskrobii (CMS)

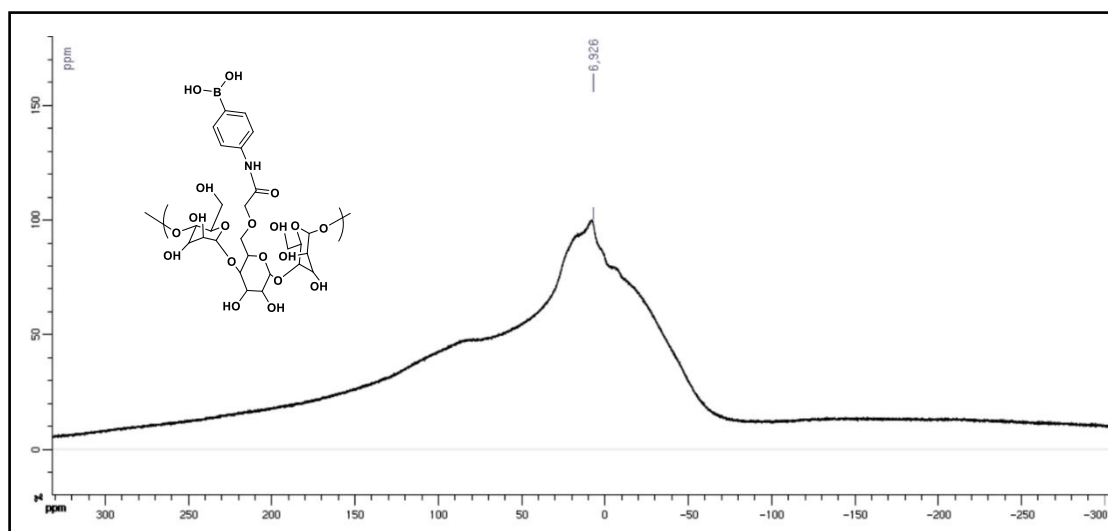
Utworzenie karboksymetyloskrobii potwierdza obecność w widmie ^{13}C NMR sygnału przy 174,8 ppm pochodzącego od atomu węgla powstałej grupy karboksylowej.



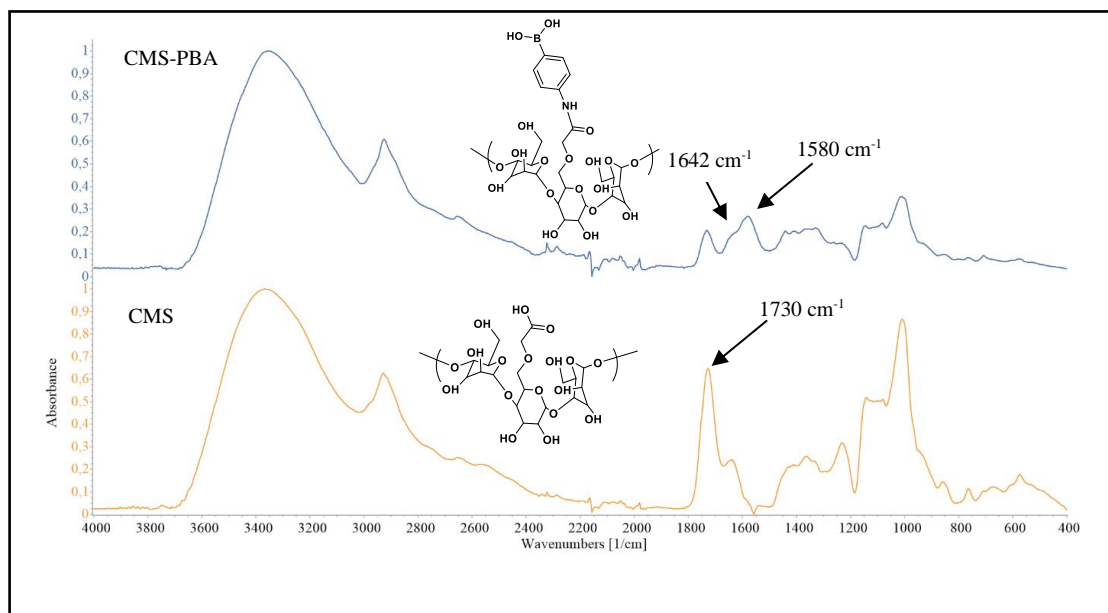
Rysunek 90. Widmo ^{13}C NMR karboksymetyloskrobii modyfikowanej kwasem 3-aminofenyloboronowym (CMS-PBA)

Pomyślny przebieg reakcji CMS z kwasem 3-aminofenyloboronowym w procesie aktywowanym EDC potwierdza sygnał przy 131,3 ppm, który można przypisać atomom węgla pierścienia aromatycznego kwasu boronowego, użytego do reakcji. Dodatkowo, sygnał przy 173 ppm potwierdza utworzone w reakcji wiązanie amidowe, między

modyfikowaną skrobią, a kwasem boronowym. Z kolei, sygnał w widmie ^{11}B NMR przy 6,93 ppm świadczy o obecność atomu boru w strukturze CMS-PBA.



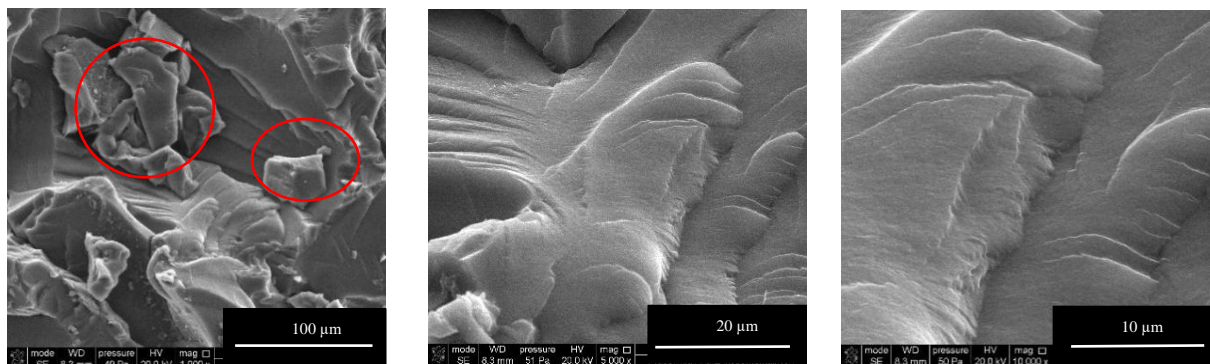
Rysunek 91. Widmo NMR ^{11}B karboksymetyloskrobi modyfikowanej kwasem 3-aminofenyloboronowym (CMS-PBA)



Rysunek 92. Widmo ATR-FTIR CMS i CMS-PBA

W widmie ATR-FTIR karboksymetyloskrobi (Rysunek 92), obecność utworzonej grupy karboksylowej potwierdza intensywne pasmo przy 1730 cm^{-1} . W przypadku związku CMS-PBA można zauważyć w widmie ATR-FTIR niewielkie pasmo przy 1733 cm^{-1} , co może świadczyć o niecałkowitym przereagowaniu grup karboksylowych z kwasem

boronowym. W widmie ^{13}C NMR CMS-PBA, sygnał pochodzący od nieprzereagowanych grup karboksylowych nałożył się prawdopodobnie z sygnałem, pochodzącym od węgla wiązania amidowego. Obecność pasm przy 1642 cm^{-1} i 1580 cm^{-1} odpowiada drganiom deformacyjnym N-H i drganiom rozciągającym C-N, co dodatkowo potwierdza powstanie wiązania amidowego w strukturze CMS-PBA.



Rysunek 93. Zdjęcia SEM CMS-PBA

Na zdjęciach SEM CMS-PBA można zauważyć strukturę składającą się z wielu pofałdowanych, nakładających się płatków o nieostrych krawędziach (Rysunek 93).

Podsumowując, otrzymano dziewięć rodzajów modyfikowanych kwasami boronowymi polisacharydów opartych na chitozanie i skrobi. Zastosowane procedury syntezy pozwoliły na wprowadzenie ugrupowania kwasu boronowego przez modyfikacje polisacharydu wzbogacanego o grupy aminowe, utlenianego z otwarciem pierścienia oraz karboksymetylowanie. Strukturę materiału boronowanego i pośrednich produktów polisacharydowych potwierdzono, zarówno za pomocą spektroskopii NMR, jak i ATR FTIR. Po modyfikacji zauważono zmiany w morfologii otrzymanych na każdym etapie materiałów, w porównaniu do polisacharydu wyjściowego. Otrzymane materiały stanowią pewną sekwencję modyfikowanych polimerów boronowanych, w których różnice strukturalne polegają na sposobie połączenia ugrupowania kwasu boronowego z łańcuchem polimerowym oraz strukturze samego polimeru.

21. Badanie kąta zwilżania materiałów

Kąt zwilżania jest jednym z parametrów, określających charakter powierzchni materiału. Wartość kąta zwilżania zależy od chemicznej budowy badanego związku, rodzaju cieczy pomiarowej oraz heterogeniczności warstwy wierzchniej. Materiał, którego kąt zwilżania cieczą polarną (np. wodą czy gliceryną) wynosi $\sim 0^\circ$, uznawany jest za bardzo hydrofilowy (naniesiona ciecz całkowicie rozplywa się, tworząc warstwę monomolekularną, wskutek silnych oddziaływań międzycząsteczkowych). Dopóki kąt zwilżania cieczą polarną wynosi mniej niż 90° , materiał uznawany jest za hydrofilowy. Wartości powyżej 90° wskazują na hydrofobowy charakter materiału, którego cząsteczki wykazują bardzo słabe oddziaływania z cząsteczkami cieczy polarnej.

Kąt zwilżania (Θ) otrzymanych materiałów polimerowych mierzono w temperaturze 24°C metodą kropli osadzonej na powierzchni, za pomocą goniometru. Do pomiaru zastosowano dwa rodzaje cieczy: glicerynę (ciecz polarna) i diiodometan (ciecz niepolarna). Dla każdego materiału wykonano dziesięć pomiarów, a swobodną energię powierzchniową (γ_s) obliczono standardową metodą Owensa-Wendta [165,166]. Na podstawie otrzymanych wyników dla otrzymanych materiałów polimerowych obliczono swobodną energię powierzchniową oraz ich składowe: polarną i dyspersyjną, stosując równanie (5):

$$\gamma_s = \gamma_{sp} + \gamma_{sd} \quad (5)$$

γ_s – swobodna energia powierzchniowa [mJ/m^2]

γ_{sp} – składowa polarna swobodnej energii powierzchniowej [mJ/m^2]

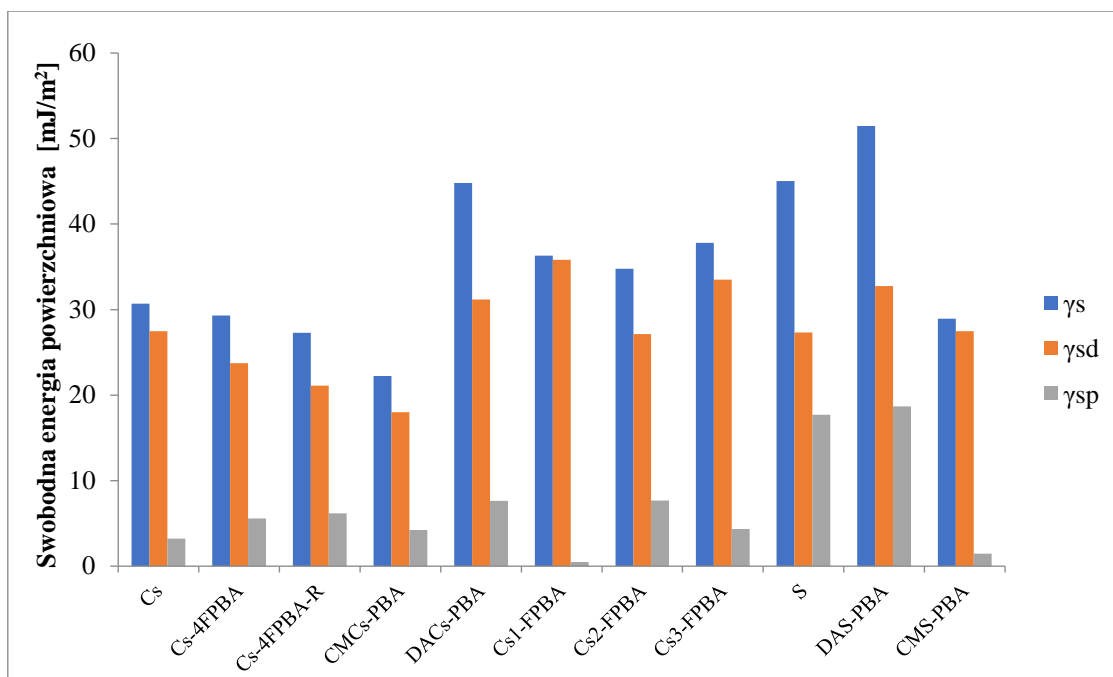
γ_{sd} – składowa dyspersyjna swobodnej energii powierzchniowej [mJ/m^2]

Otrzymane uśrednione wyniki z dziesięciu pomiarów przedstawiono w Tabeli 7

Tabela 7. Średnie wartości kąta zwilżania polimerów cieczami pomiarowymi dla cieczy pomiarowych oraz wyniki swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych: polarnej (γ_{sp}) i dyspersyjnej (γ_{sd})

Material polimerowy	Kąt zwilżania [θ ,°]		Swobodna energia powierzchniowa [mJ/m ²]		
	Ciecz pomiarowa		γ_s	γ_{sd}	γ_{sp}
	Gliceryna	Dijodometan			
Cs	82,0	56,0	30,70	27,46	3,23
Cs-FPBA	78,4	60,4	29,31	23,73	5,59
Cs-FPBA-R	79,3	64,8	27,29	21,12	6,18
CMCs-PBA	87,4	72,5	22,22	17,99	4,23
DACs-PBA	62,4	31,0	44,81	31,17	7,64
Cs1-FPBA	105,3	52,9	36,29	35,81	0,48
Cs2-FPBA	70,5	52,2	34,79	27,13	7,66
Cs3-FPBA	73,9	43,3	37,81	33,49	4,33
S	59,2	44,7	45,02	27,32	17,69
DAS-PBA	43,2	31,2	51,46	32,77	18,68
CMS-PBA	88,9	58,6	28,92	27,46	1,46

W celu porównania właściwości powierzchniowych otrzymanych materiałów, uzyskane wyniki swobodnej energii powierzchniowej (γ_s) i jej składowe polarna (γ_{sp}) i dyspersyjna (γ_{sd}) przedstawiono na wykresie poniżej (Rysunek 94). Przykładowe obrazy kropli cieczy pomiarowych na powierzchniach wybranych próbek przedstawiono na Rysunku 95.



Rysunek 94. Swobodna energia powierzchniowa (γ_s) i jej składowe: polarna (γ_{sp}) i dyspersyjna (γ_{sd}) otrzymanych materiałów

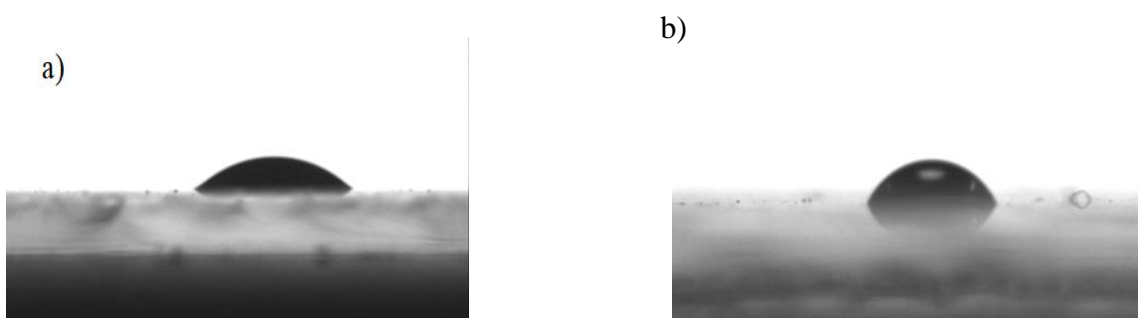
Kąt zwilżania diiodometanem (cieczą niepolarną) jest we wszystkich przypadkach mniejszy od kąta zwilżania gliceryną. Analizując średnie wartości zmierzonych kątów zwilżania, można stwierdzić, że w otrzymanych materiałach polimerowych przeważa charakter hydrofobowy. Potwierdzają to również wartości składowych dyspersyjnych (γ_{sd}), które są dużo większe niż składowe polarne (γ_{sp}) badanych materiałów [167]. W niemodyfikowanym chitozanie (Cs), wartość kąta zwilżania przez polarną glicerynę wynosi 82° , a przez diiodometan 56° . Zbliżone wartości do chitozanu wykazują próbki Cs-FPBA, Cs-FPBA-R, CMCs-PBA, Cs2-FPBA i Cs3-FPBA. Hydrofobowość chitozanu i materiałów, powstałych w wyniku jego modyfikacji, można tłumaczyć obecnością hydrofobowego charakteru szkieletu tego polimeru [158]. Cecha ta zależy również od stopnia deacetylacji chitozanu, ponieważ grupy aminowe są bardziej hydrofilowe niż grupy acetylowe [168]. Reakcja chitozanu z kwasem 4-formylofenyloboronowym doprowadziła do otrzymania materiałów, w których można zauważyć wzrost wartości składowej polarnej, co wskazuje na większą polarność powierzchni materiałów: Cs-FPBA i Cs-FPBA-R.

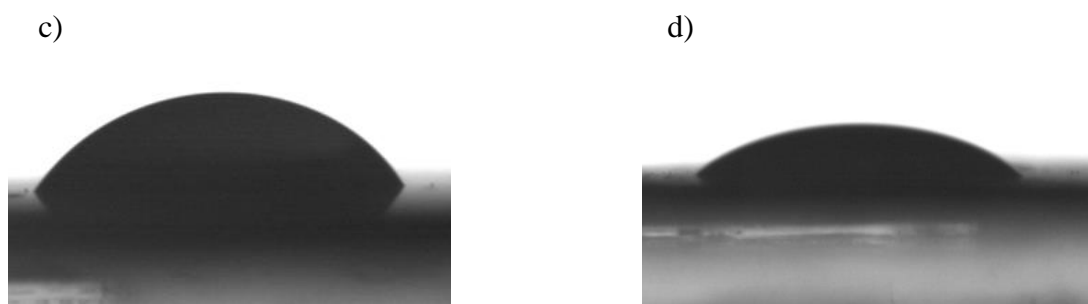
Najbardziej zwilżaną powierzchnię przez glicerynę wykazuje DACs-PBA (ponad dwukrotnie wyższa wartość składowej polarnej w porównaniu z niemodyfikowanym chitozaniem). Może to być spowodowane otwarciem struktury chitozanu podczas procesu utlenienia i tym, że grupy dihydroksyborylowe w strukturze utlenionego chitozanu

są ustawione w kierunku powierzchni błony polimerowej. Jest to szczególnie korzystne dla zastosowań biomedycznych i może skutkować łatwiejszą penetracją błon biologicznych oraz lepszą rozpuszczalnością w płynach ustrojowych. Spośród wszystkich otrzymanych materiałów, Cs1-FPBA wydaje się być najbardziej hydrofobowy (jego kąt zwilżania gliceryną wynosi 105°). W przypadku próbek Cs2-FPBA i Cs3-FPBA można zaobserwować wzrost hydrofilowości w stosunku do chitozanu. Najwyraźniej, w przypadku polimeru Cs1-FPBA struktura nie sprzyja oddziaływaniom pomiędzy tym polimerem a hydrofilową cieczą badaną (gliceryną).

W materiałach na bazie skrobi, DAS-PBA obserwuje się wyższą wartość swobodnej energii powierzchniowej i wyższą wartość składowej polarnej w stosunku do skrobi wyjściowej, co sugeruje większą polarność powierzchniową tej próbki. Podobnie, jak w przypadku DACs-PBA, zwiększenie hydrofilowości może być związane z otwarciem struktury polimeru. Z kolei, modyfikacja skrobi, prowadząca do utworzenia karboksymetyloskrobi, a następnie jej reakcja z kwasem 3-aminofenyloboronowym (CMS-PBA), spowodowała zmniejszenie wartości energii powierzchniowej i składowej polarnej, co wskazuje na zwiększenie charakteru hydrofobowego powierzchni tego materiału w stosunku do skrobi wyjściowej.

Podobnie, jak w przypadku chitozanu, ta modyfikacja (tj. utworzenie karboksymetylochitozanu), a następnie reakcja z kwasem 3-aminofenyloboronowym doprowadziła do zmniejszenia polarności powierzchniowej, w odniesieniu do chitozanu wyjściowego.

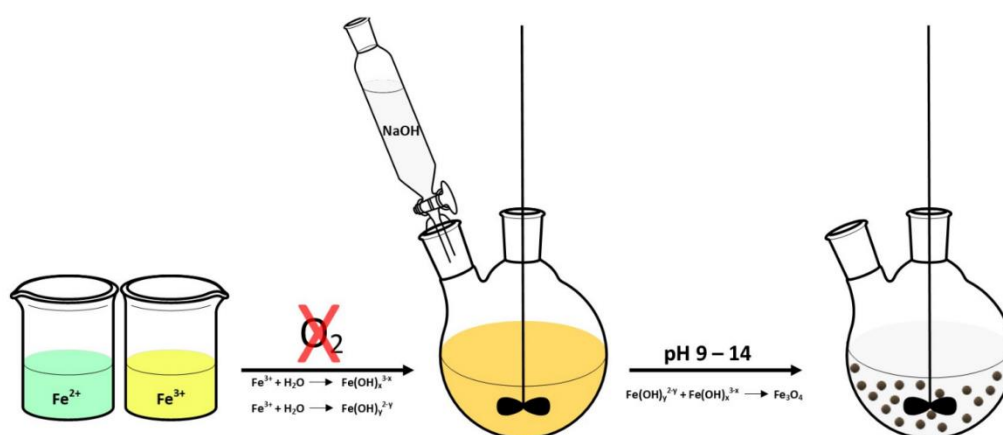




Rysunek 95. Zdjęcie kropli cieczy na powierzchni polimeru a) gliceryna na DAS-PBA; b) diiodometanu na DAS-PBA; c) gliceryny na CMCs-PBA; d) diiodometanu na CMCs-PBA

22. Charakterystyka nanocząstek magnetycznych pokrywanych modyfikowanymi polisacharydami

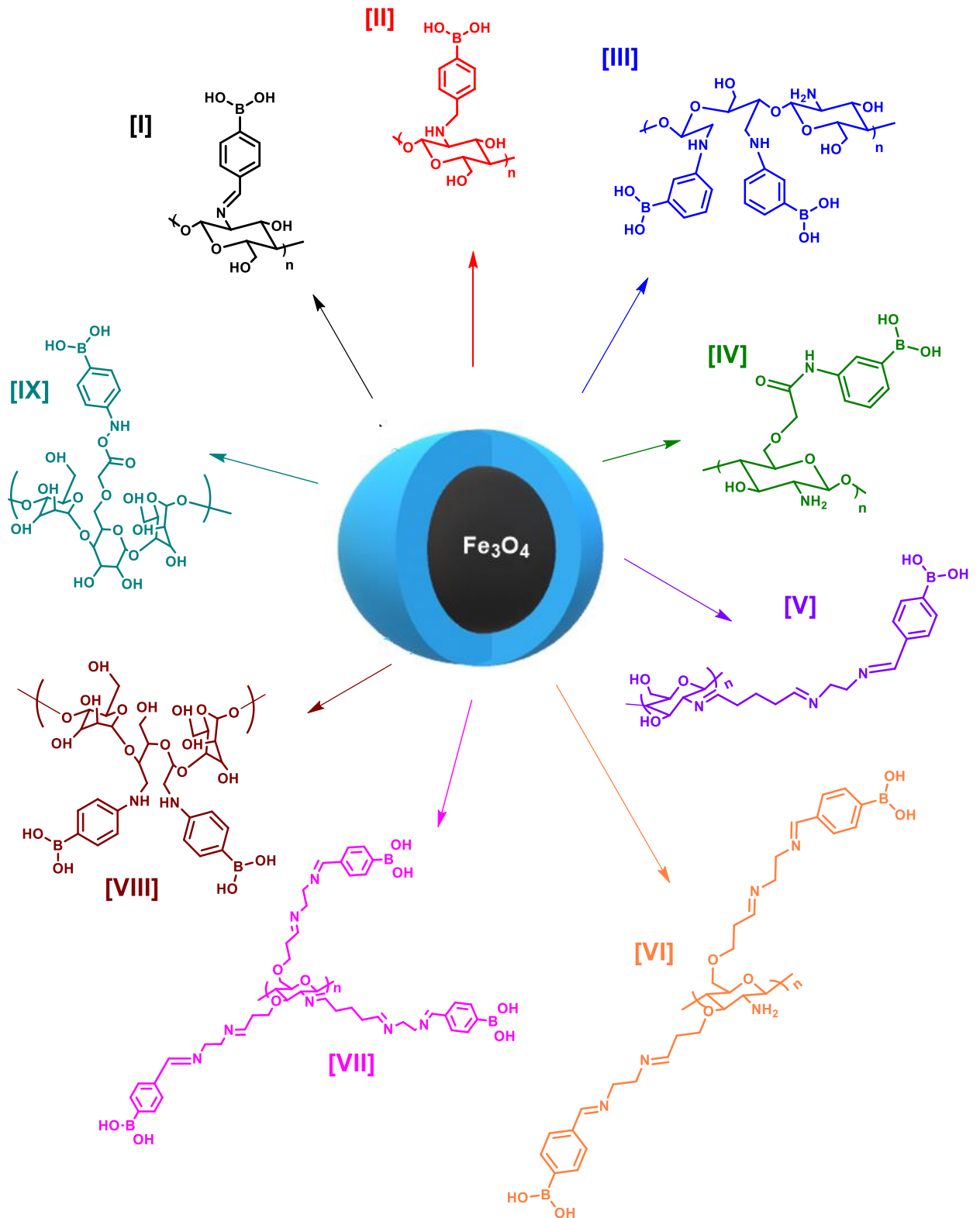
Otrzymane materiały boronowe zostały wykorzystane jako powłoki pokrywające rdzeń magnetyczny nanocząstek. Czyste nanocząstki magnetytu Fe_3O_4 otrzymano metodą współwytrącania *in situ*. Jak wspomniano w części teoretycznej, w metodzie tej wykorzystuje się reakcję tworzącego w środowisku zasadowym magnetytu. Jednakże aby można było zastosować metodę *in situ*, bardzo ważny jest dobór odpowiedniego polimeru ochronnego. W optymalnych warunkach powinien on rozpuszczać się w środowisku kwasowym, a wytrącać w zasadowym. Metoda współwytrącania *in situ* w obecności polimeru jest jednoetapowa, co jest bardzo korzystne dla aplikacji medycznych.



Rysunek 96. Synteza nanocząstek magnetytu metodą współwytrącania

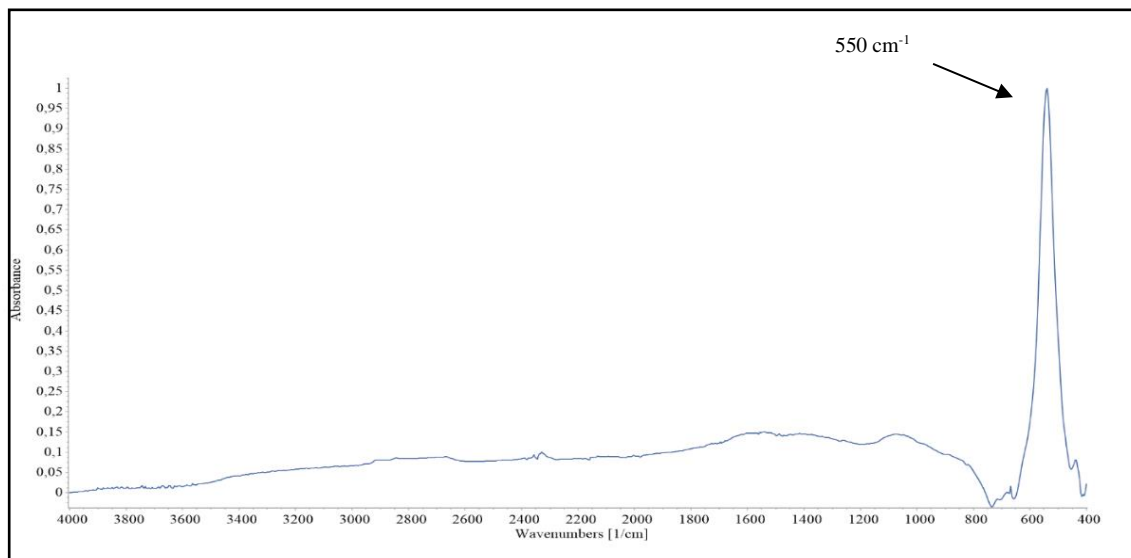
W ramach pracy otrzymano dziewięć rodzajów nanocząstek magnetycznych pokrytych wcześniej opisanymi polimerami: Cs-FPBA, Cs-FPBA-R, CMCs-PBA, DACs-PBA, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA, Cs3-FPBA, CMS-PBA i DAS-PBA.

W tym celu zastosowano reakcje otrzymania polimerów boronowanych, których szczegółowe warunki opracowano we wcześniejszym etapie pracy. W każdym przypadku, pierwszy etap reakcji polegał na otrzymaniu nanocząstek magnetycznych pokrywanych wyjściowym niemodyfikowanym polimerem: chitozanem lub skrobią. Kolejne modyfikacje prowadzono już na powierzchni nanocząstek, zgodnie z procedurami opracowanymi wcześniej dla polimerów. Ponieważ obecność rdzenia magnetycznego wyklucza wykonanie spektroskopii NMR, jedyną metodą pozwalającą na potwierdzenie powłoki pokrywającej nanocząstki była spektroskopia w podczerwieni.



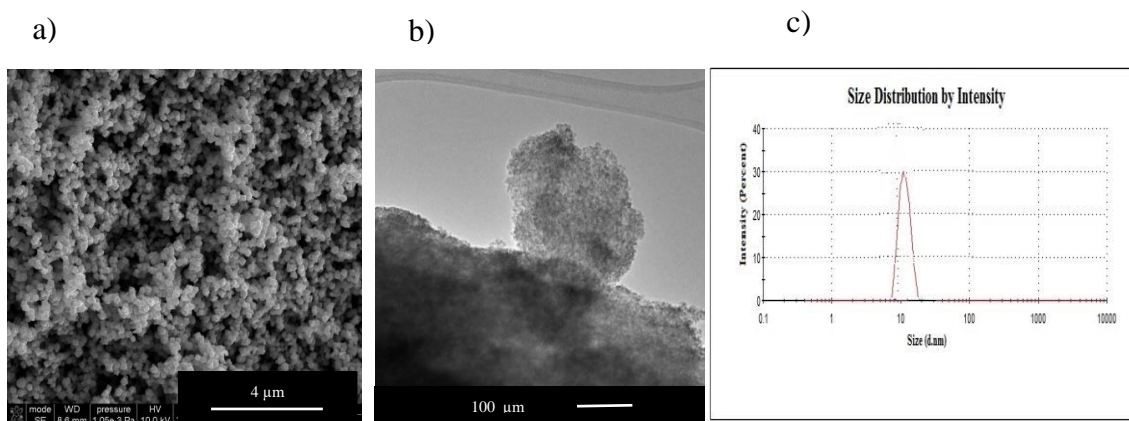
Rysunek 97. Struktury powłok polimerowych pokrywających nanocząstki magnetytu uzyskane w wyniku powierzchniowej modyfikacji chemicznej chitozanu i skrobi

Dla porównania, zarejestrowano widmo ATR-FTIR czystych nanocząstek magnetycznych (bez powłoki polimerowej). Wykonano również zdjęcia SEM, w celu określenia ich morfologii. Wielkość nanocząstek oznaczono dwoma metodami: dyspersyjnego rozpraszania światła (DLS) oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).



Rysunek 98. Widmo ATR-FTIR nanocząstek Fe₃O₄

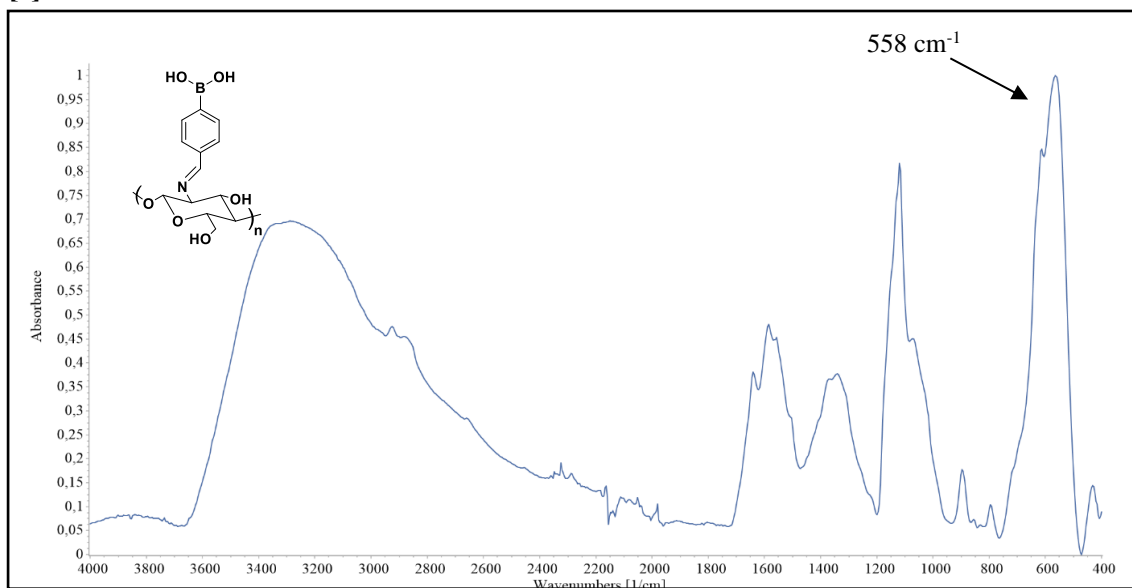
W widmie ATR-FTIR (Rysunek 98) czystych nanocząstek magnetytu obecne jest charakterystyczne pasmo przy 550 cm⁻¹, które przypisuje się drganiom Fe²⁺-O²⁻ i Fe³⁺-O²⁻ co świadczy o tym, że otrzymane nanocząstki zbudowane są z magnetytu - Fe₃O₄ [182].



Rysunek 99. a) Zdjęcie SEM Fe₃O₄; b) Zdjęcie TEM Fe₃O₄; c) rozkład wielkości cząstek Fe₃O₄ wyznaczony metodą DLS

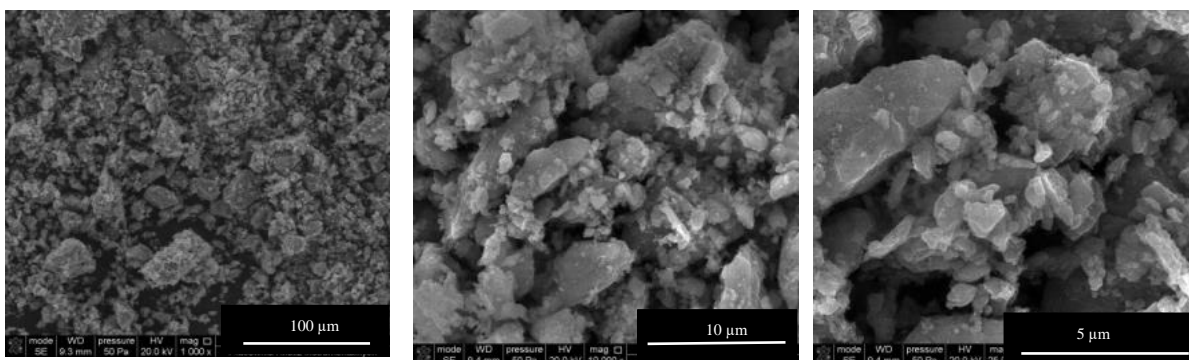
Na zdjęciach SEM czystych nanocząstek magnetycznych można zauważyć kulistą strukturę oraz tendencję do agregacji. Zdjęcia SEM są robione dla próbek stałych, w których agregacja jest nieunikniona. Zdjęcia TEM potwierdzają sferyczny kształt nanocząstek. Rozmiar nanocząstek magnetycznych, wyznaczony zarówno za pomocą DLS, jak i TEM wynosił 15 nm (Rysunek 99).

[I] Cs-FPBA-MNPs



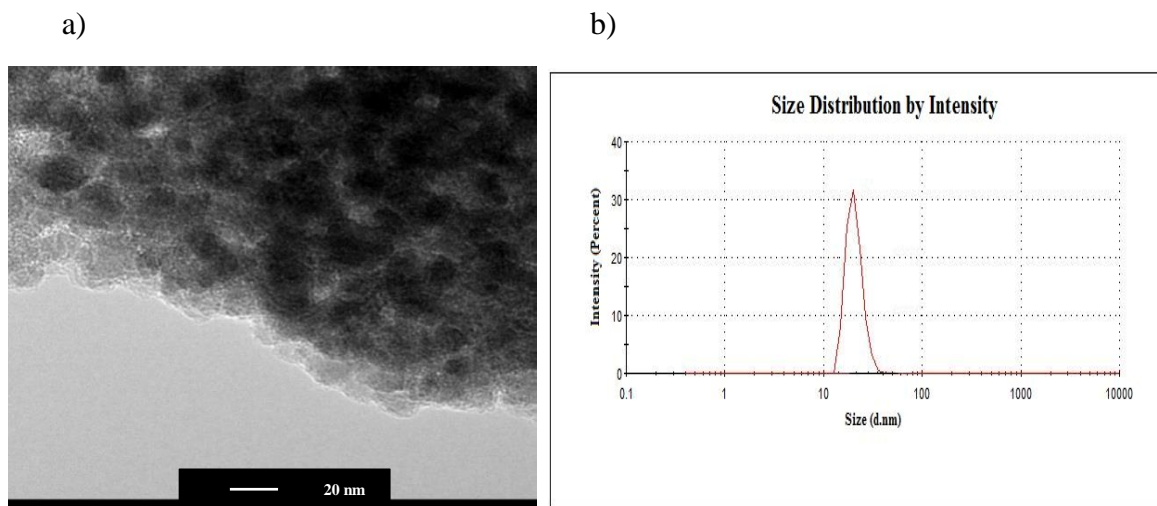
Rysunek 100. Widmo ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych Cs-FPBA-MNPs

W widmie ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych pokrytych Cs-FPBA (Rysunek 100) występują pasma, pochodzące od modyfikowanego chitozanu (takie jak pasmo przy 1644 cm⁻¹, charakterystyczne dla powstałej grupy iminowej). Pasma przy 1410 cm⁻¹ i 1368 cm⁻¹ pochodzą odpowiednio, od drgań C-B i B-O. W widmie obecne jest wąskie intensywne pasmo przy 558 cm⁻¹, które przypisano wcześniej wspomnianym drganiom Fe²⁺-O²⁻ i Fe³⁺-O²⁻.



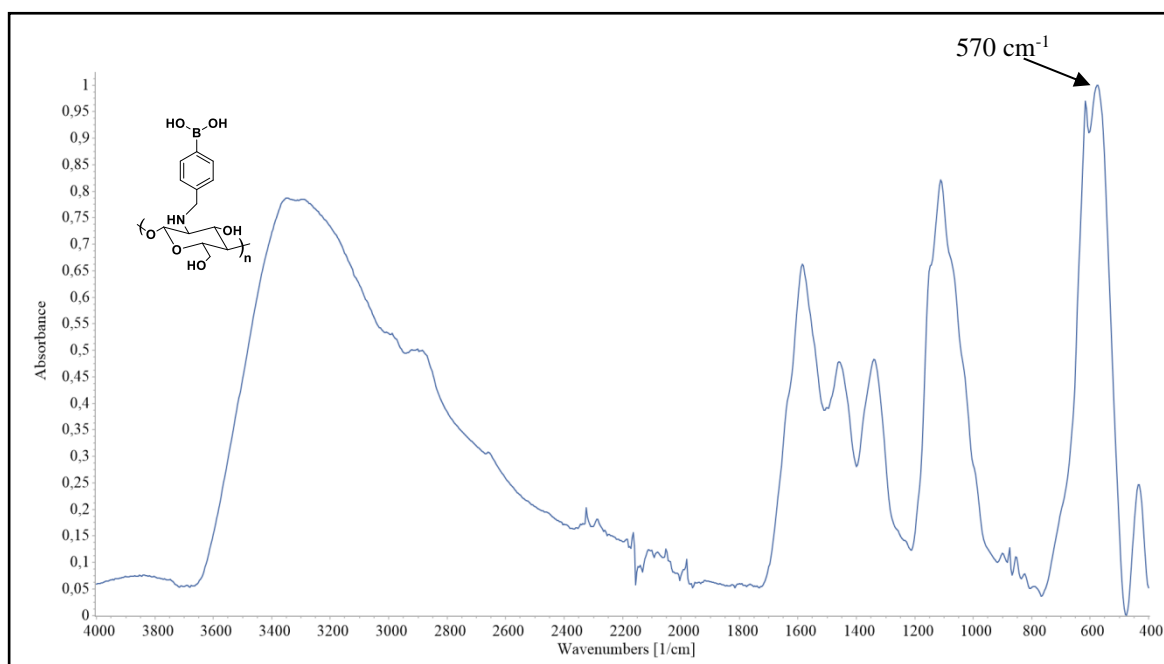
Rysunek 101. Zdjęcia SEM nanocząstek magnetycznych pokrytych Cs-FPBA (Cs-4FPBA-MNPs)

Na zdjęciach SEM tego materiału można zaobserwować, że Cs-4FPBA-MNPs wykazują bardzo nieregularny kształt. Rozmiar nanocząstek magnetycznych Cs-4FPBA-MNPs, wyznaczony zarówno metodą DLS jak i TEM wynosił 26 nm. Obserwowany wzrost wielkości nanocząstek spowodowany jest obecnością na powierzchni rdzenia magnetycznego powłoki polimerowej.



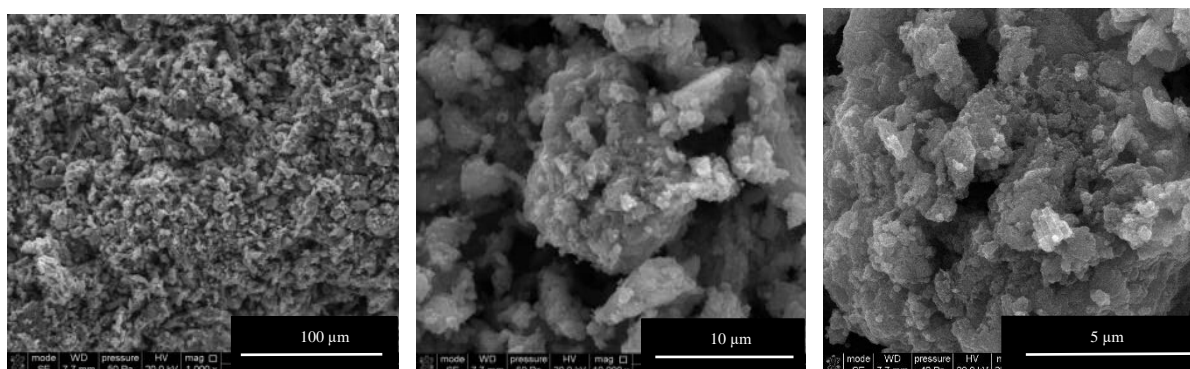
Rysunek 102. a) Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych pokrytych Cs-4FPBA; b) rozkład wielkości cząstek Cs-4FPBA-MNPs

[II] Cs-4FPBA-R-MNPs



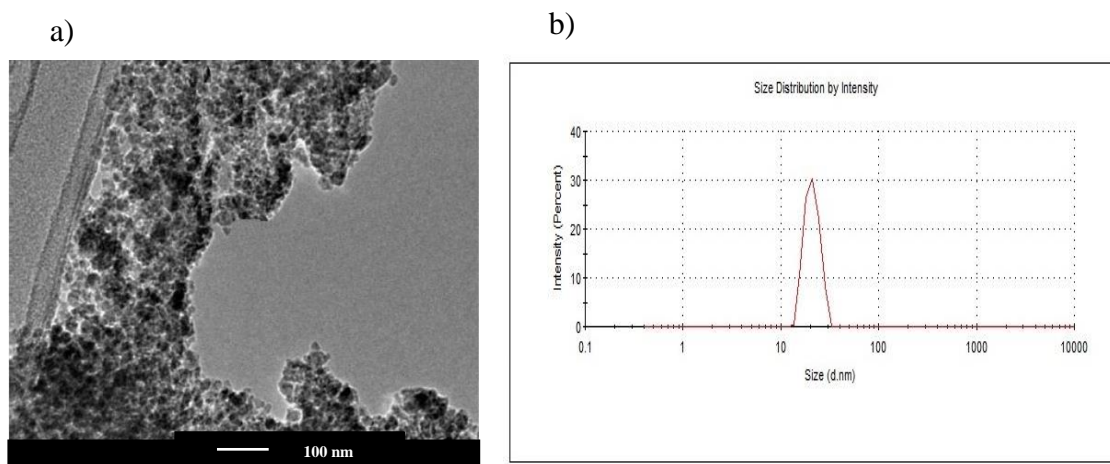
Rysunek 103. Widmo ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych Cs-4FPBA-R-MNPs

Pokrycie nanocząstek magnetycznych chitozanem modyfikowanym kwasem 4-formylofenyloboronowym (FPBA) związanym przez grupę aminową (Cs-FPBA-R-MNPs), powoduje pojawienie się w widmie IR niewielkiego pasma, pochodzącego od drgań C-H w pierścieniach aromatycznych przy 870 cm^{-1} . Pasma, potwierdzające wiązanie B-O i B-C, można zaobserwować odpowiednio przy 1342 cm^{-1} i 1460 cm^{-1} , natomiast drgania deformacyjne N-H widoczne są przy 1577 cm^{-1} . Intensywne pasmo przy 570 cm^{-1} potwierdza obecność rdzenia magnetytu.



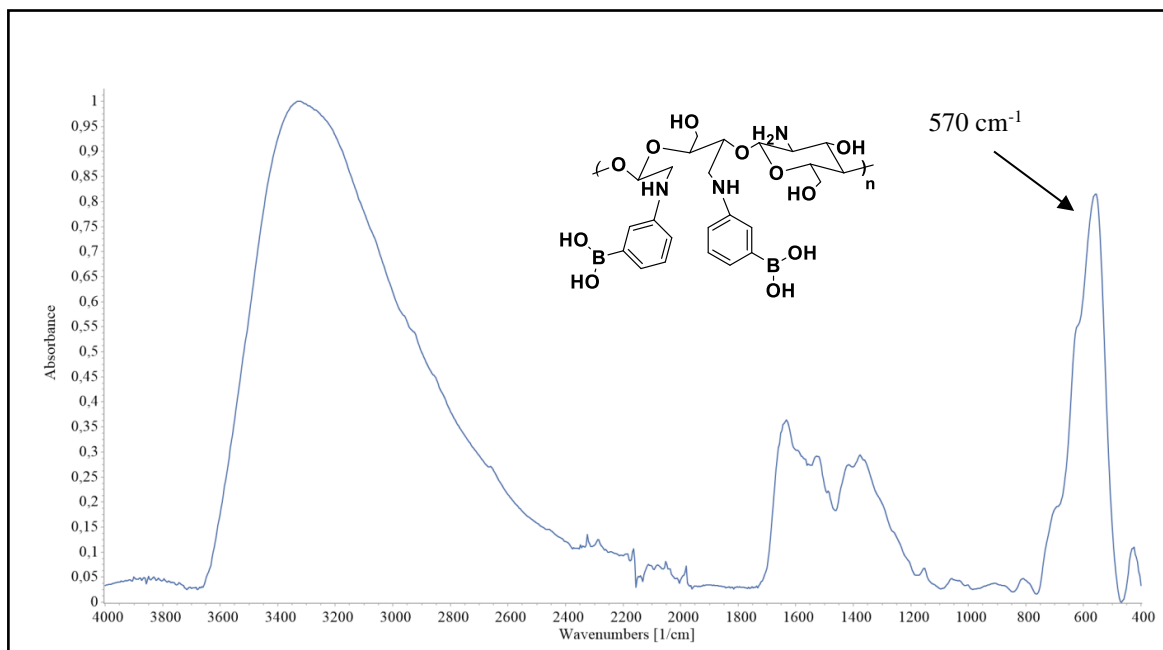
Rysunek 104. Zdjęcia SEM nanocząstek Cs-FPBA-R-MNPs

Zdjęcia SEM nanomateriału Cs-FPBA-R-MNPs pokazują, że nanomateriały te podobnie jak Cs-FPBA-MNPs, charakteryzują się nieregularnym kształtem. W tym przypadku średni rozmiar nanomateriału wynosi 24 nm i jest bardzo zbliżony do rozmiaru nanocząstek Cs-FPBA-MNPs.



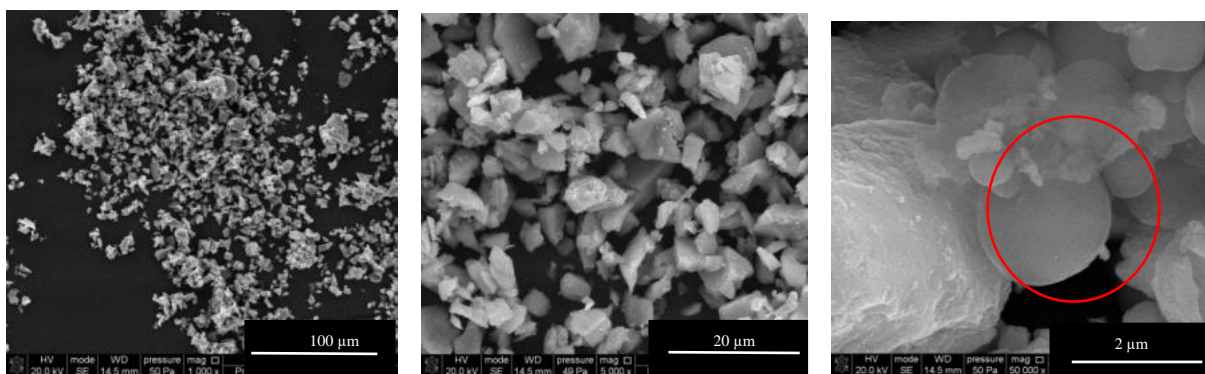
Rysunek 105. a) Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych pokrytych Cs-4FPBA-R; b) rozkład wielkości cząstek Cs-FPBA-R-MNPs

[III] DACs-PBA-MNPs



Rysunek 106. Widmo ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych DACs-PBA-MNPs

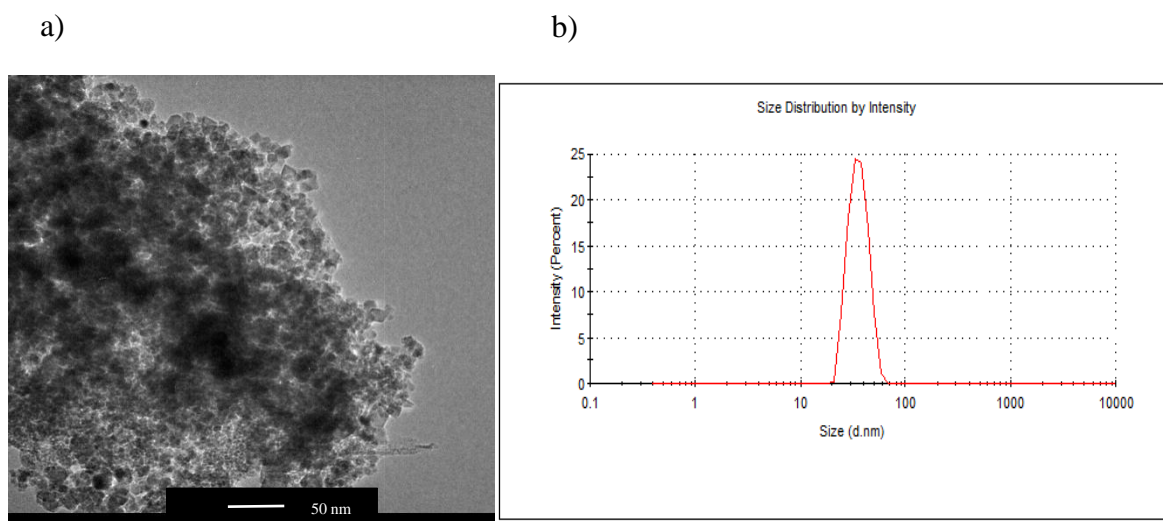
W widmie ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych pokrytych DACs-PBA, szerokie pasmo przy 3300 cm⁻¹ pochodzi od drgań grup hydroksylowych i aminowych obecnych w cząsteczce chitozanu oraz grup dihydroksyborylowych kwasu boronowego (Rysunek 106). Podobnie, jak w przypadku DACs-PBA, pasma przy 1419 cm⁻¹ i 1378 cm⁻¹ odpowiadają drganiom grup B-C i B-O. Jednocześnie, w widmie obecne jest również pasmo przy 570 cm⁻¹, charakterystyczne dla nanocząstek magnetytu.



Rysunek 107. Zdjęcia SEM DACs-PBA-MNPs

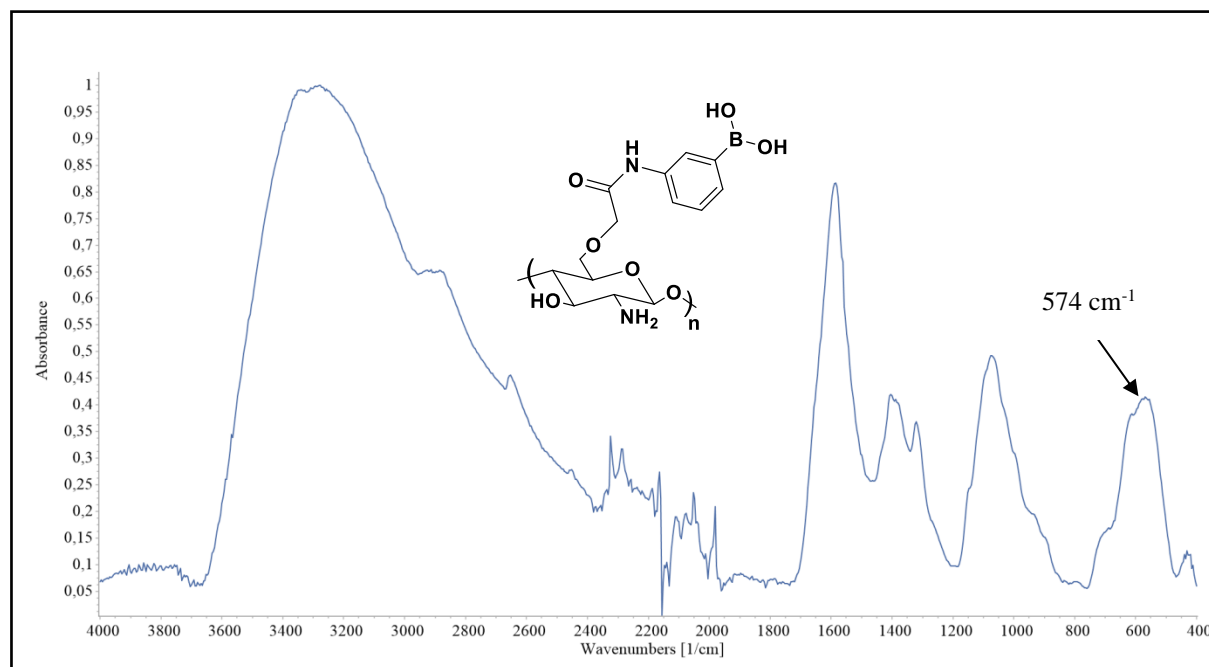
Nanocząstki magnetytu pokryte DACs-PBA, o średnicy 35 nm, podobnie jak czyste nanocząstki, charakteryzuje sferyczny kształt, co jest również charakterystyczne dla samego modyfikowanego polimeru DACs-PBA (Rysunek 107 i 108). Zwiększenie

rozmiaru nanocząstek może być związane ze strukturą przestrzenną warstwy polimerowej pokrywającej powierzchnię magnetytu.



Rysunek 108. a) Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych pokrytych DAS-PBA; b) rozkład wielkości cząstek DAS-PBA –MNPs

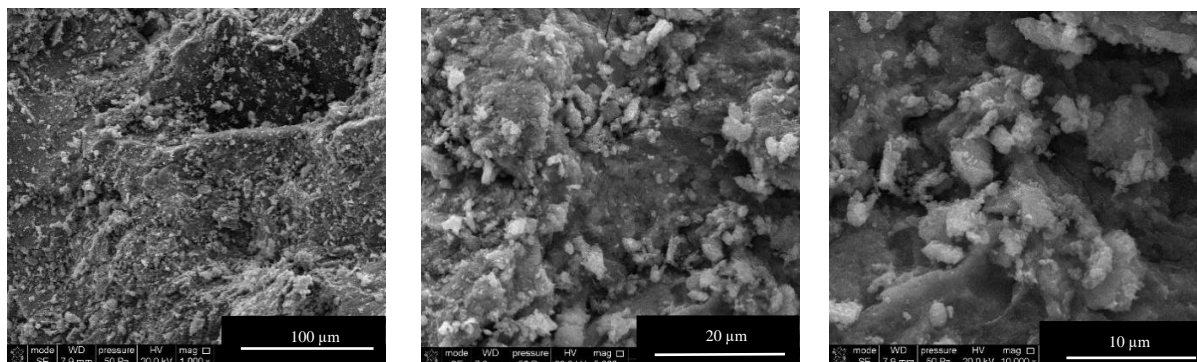
[IV] CMCs-PBA-MNPs



Rysunek 109. Widmo ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych CMCs-PBA-MNPs

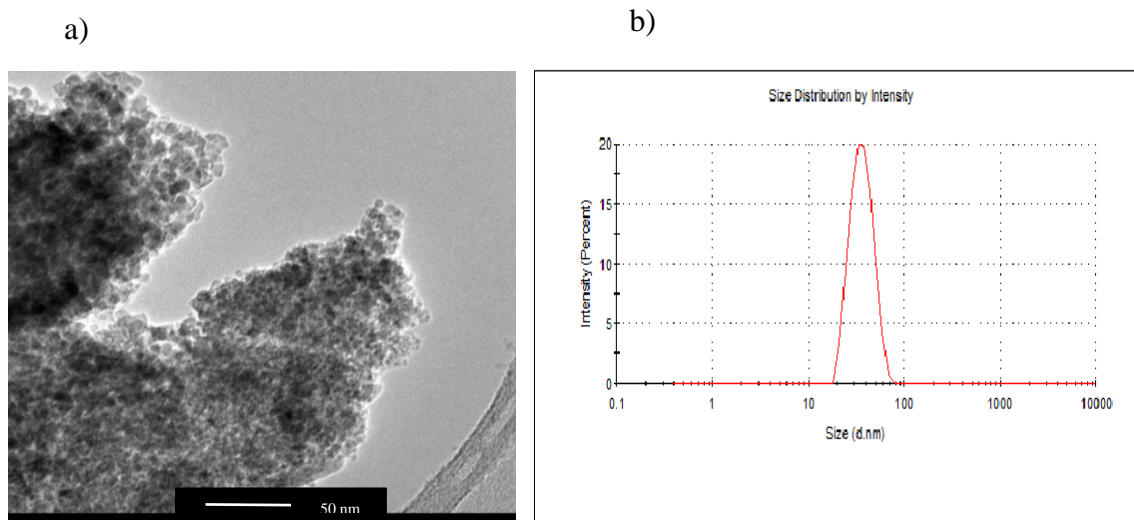
W widmie ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych pokrytych CMCs-PBA, szerokie pasmo przy 3250 cm^{-1} pochodzi od drgań grup hydroksylowych obecnych

w cząsteczce chitozanu oraz grup dihydroksyborylowych kwasu boronowego. Intensywne pasmo przy 1587 cm^{-1} , które jest również obecne w cząsteczce CMCs-PBA, potwierdza powstanie drugorzędowego amidu, a pasmo przy 574 cm^{-1} wskazuje na obecność drgań $\text{Fe}^{2+}\text{-O}^{2-}$ i $\text{Fe}^{3+}\text{-O}^{2-}$ (Rysunek 109).



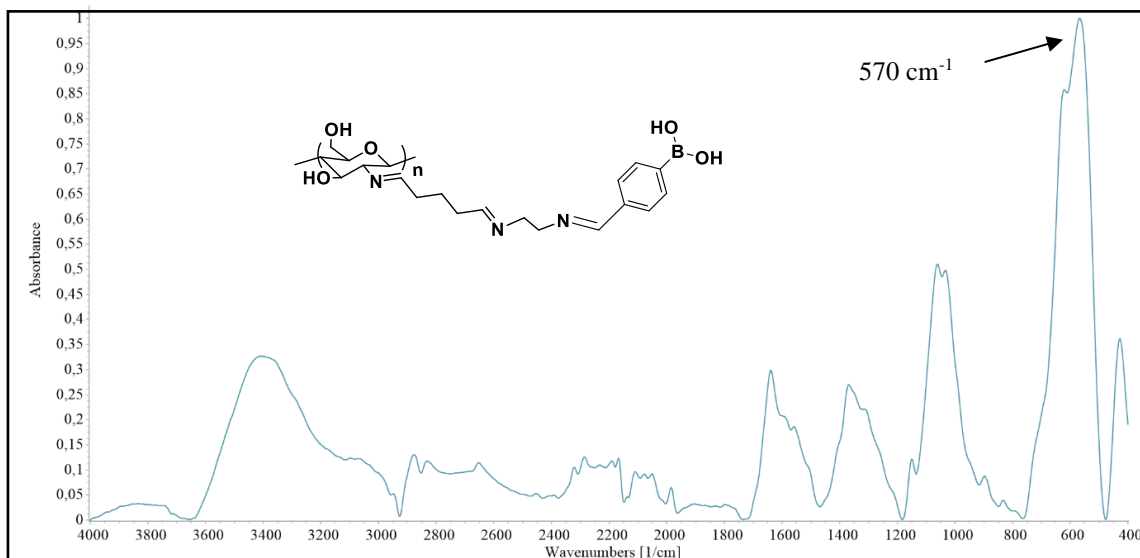
Rysunek 110. Zdjęcia SEM CMCs-PBA-MNPs

Nanocząstki CMCs-PBA-MNPs wykazują nieregularny kształt (Rysunek 110). Rozmiar nanocząstek wyznaczony na podstawie zdjęć TEM i potwierdzony za pomocą DLS wynosi 36 nm (Rysunek 111), podobnie jak rozmiar nanocząstek DACs-PBA-MNPs.



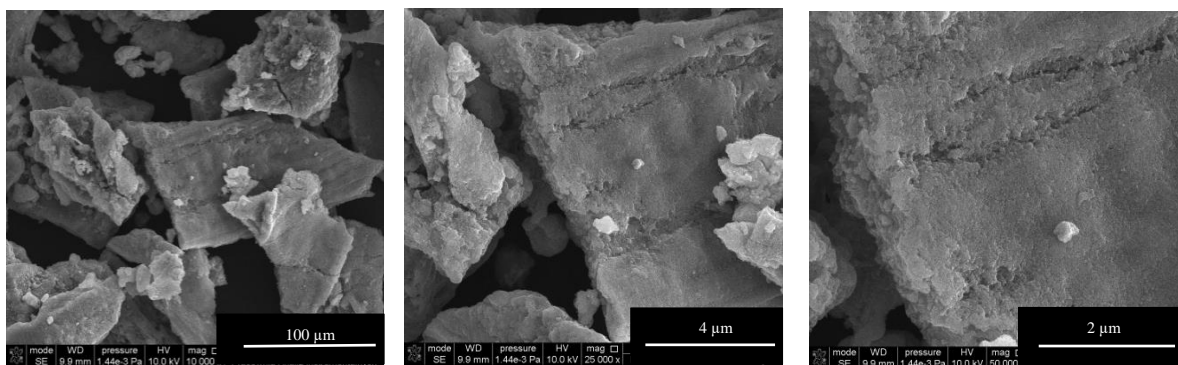
Rysunek 111. a) Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych pokrytych CMCs-PBA; b) rozkład wielkości cząstek CMCs-PBA-MNPs

[V] Cs1-FPBA-MNPs



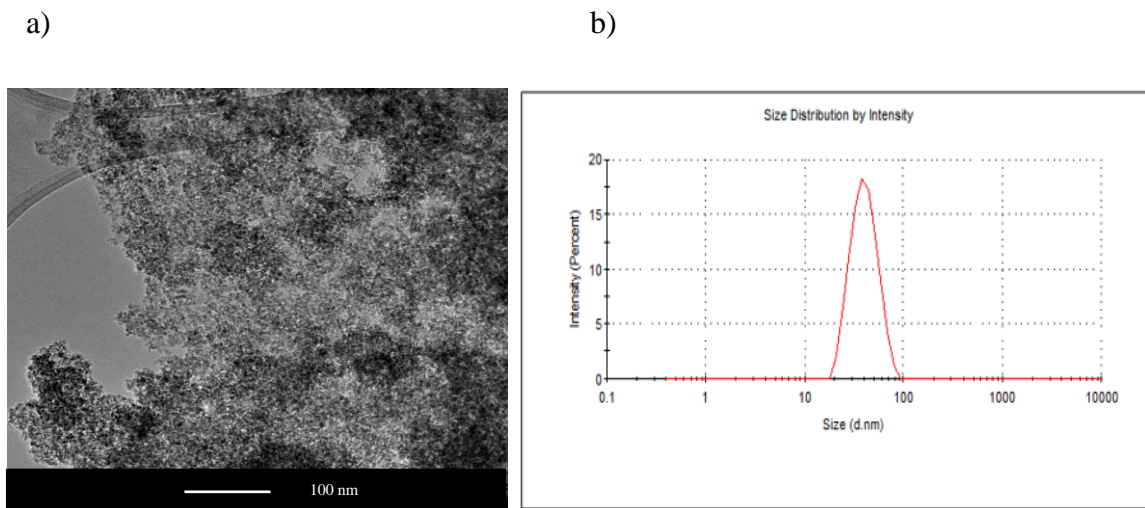
Rysunek 112. Widmo ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych Cs1-FPBA-MNPs

W widmie ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych pokrytych Cs1-FPBA, pasmo przy 1641 cm^{-1} pochodzi od drgań rozciągających C=N. Obecność ugrupowania boronowego potwierdzają pasma przy 1406 i 1322 cm^{-1} , pochodzące od drgań C-B i B-O, a intensywne pasmo przy 570 cm^{-1} świadczy o obecności drgań $\text{Fe}^{2+}\text{-O}^{2-}$ i $\text{Fe}^{3+}\text{-O}^{2-}$.



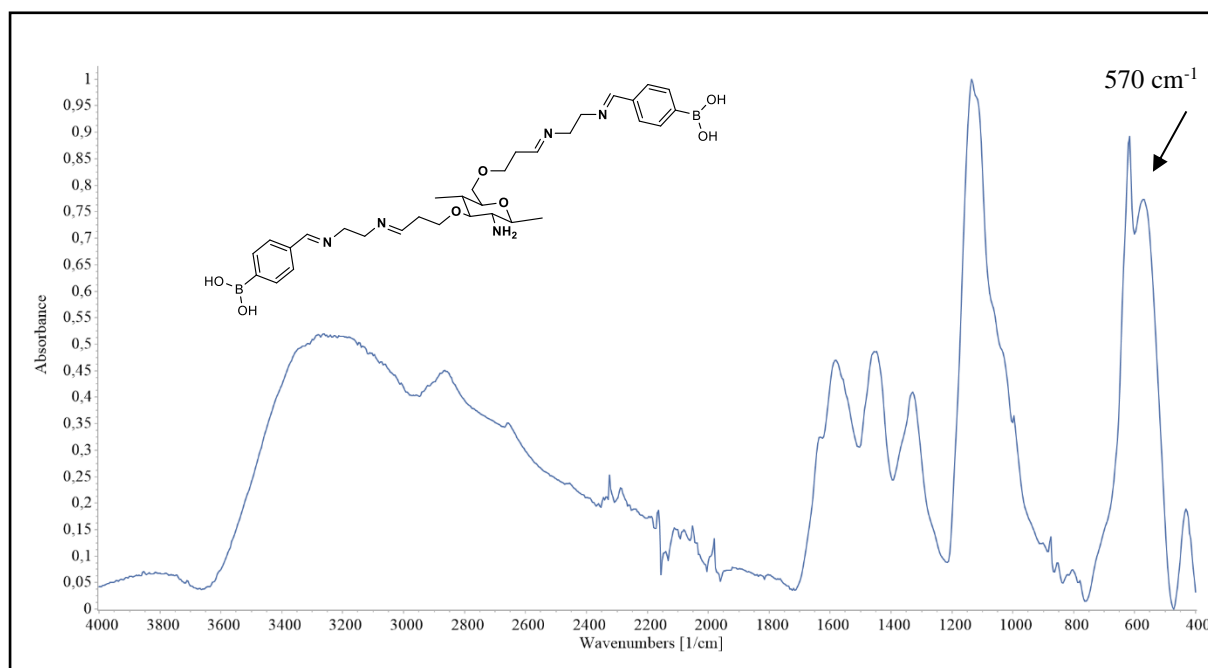
Rysunek 113. Zdjęcia SEM Cs1-FPBA-MNPs

Wyznaczony rozmiar tych nanocząstek wynosi 41 nm . Zwiększenie rozmiaru nanocząstek pokrywanych tym materiałem najprawdopodobniej wynika ze struktury powłoki polimerowej. Chitozan został poddany modyfikacji przez dobudowanie do pierścienia glukozaminowego fragmentu z odsuniętą grupą aminową.



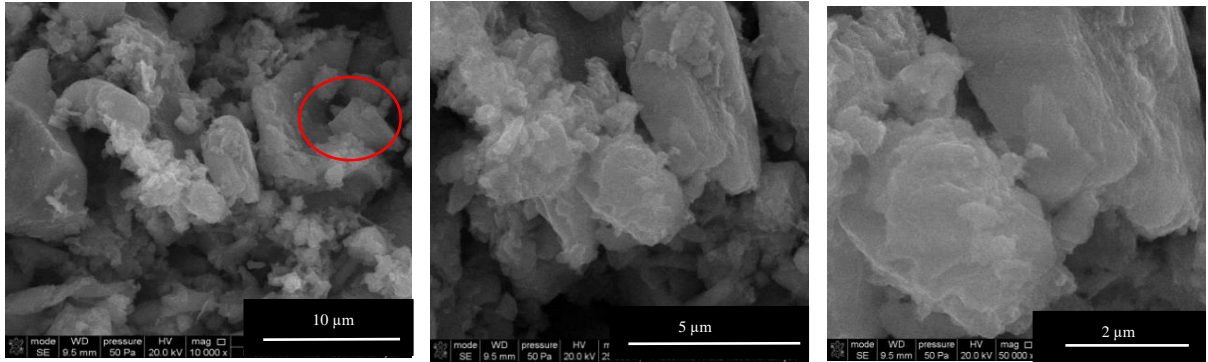
Rysunek 114. a) Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych pokrytych Cs1-FPBA; b) rozkład wielkości cząstek Cs1-FPBA-MNPs

[VI] Cs2-FPBA-MNPs



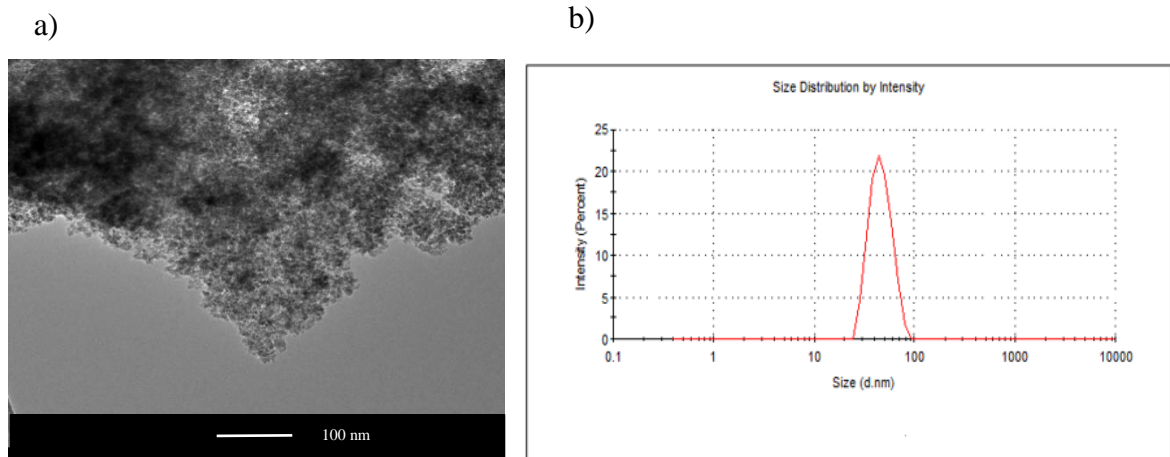
Rysunek 115. Widmo ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych Cs2-FPBA-MNPs

W widmie ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych pokrytych Cs2-FPBA, pasmo przy 1638cm⁻¹ pochodzi od drgań rozciągających C=N, pasmo przy 1444 cm⁻¹ od drgań wiązania C-B, a pasmo przy 1330 cm⁻¹ od drgań C-B (Rysunek 115). Podobnie, jak we wcześniejszych widmach nanocząstek, tu również występuje pasmo przy 570 cm⁻¹, pochodzące od wiązania Fe-O.



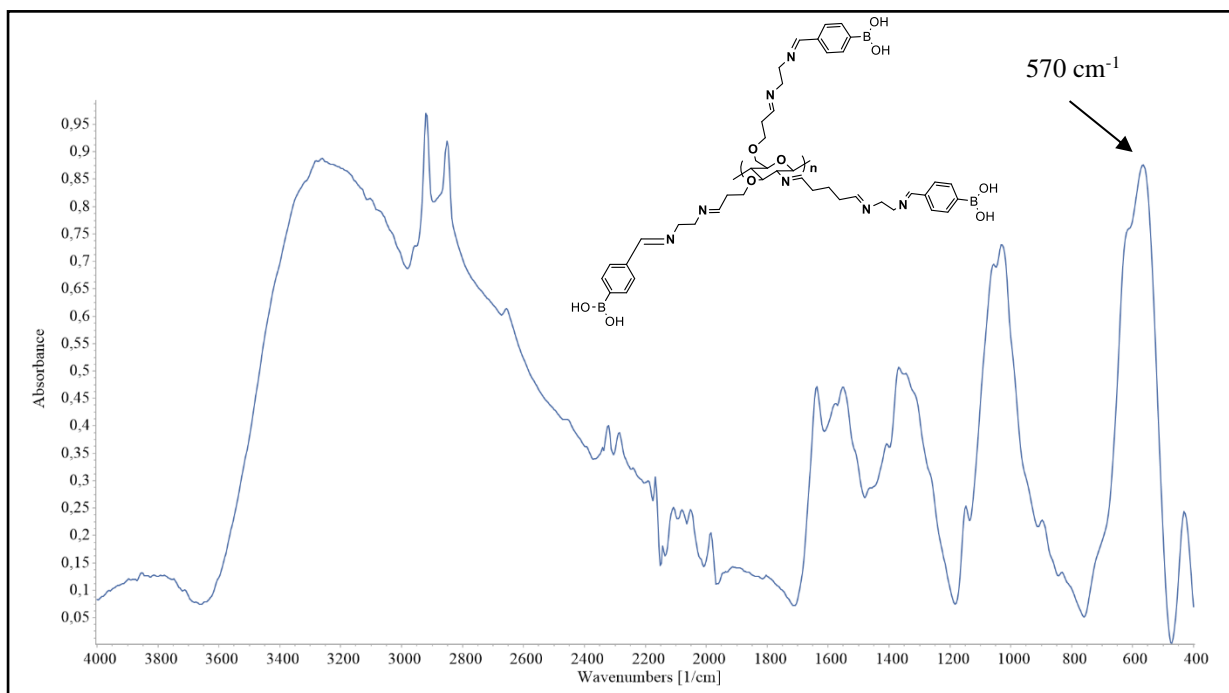
Rysunek 116. Zdjęcia SEM Cs2-FPBA-MNPs

Na zdjęciach SEM Cs2-FPBA-MNPs można zaobserwować ostre krawędzie nanocząstek pokrytych modyfikowanym chitozaniem (Rysunek 116), co również jest widoczne na zdjęciach SEM samego polimeru Cs2-FPBA (Rysunek 72). Wyznaczono rozmiar tego typu nanocząstek, który wynosi 46 nm, podobnie jak dla poprzedniego materiału.



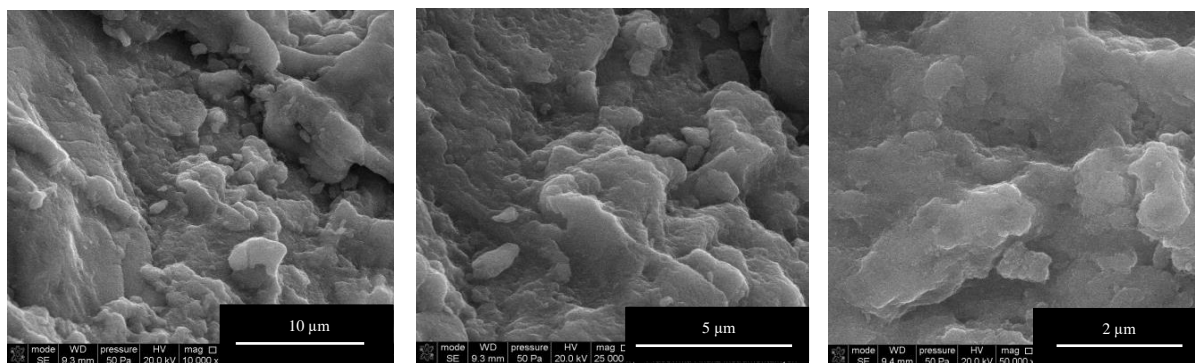
Rysunek 117. a) Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych pokrytych Cs2-FPBA; b) rozkład wielkości cząstek Cs2-FPBA-MNPs

[VII] Cs3-FPBA-MNPs



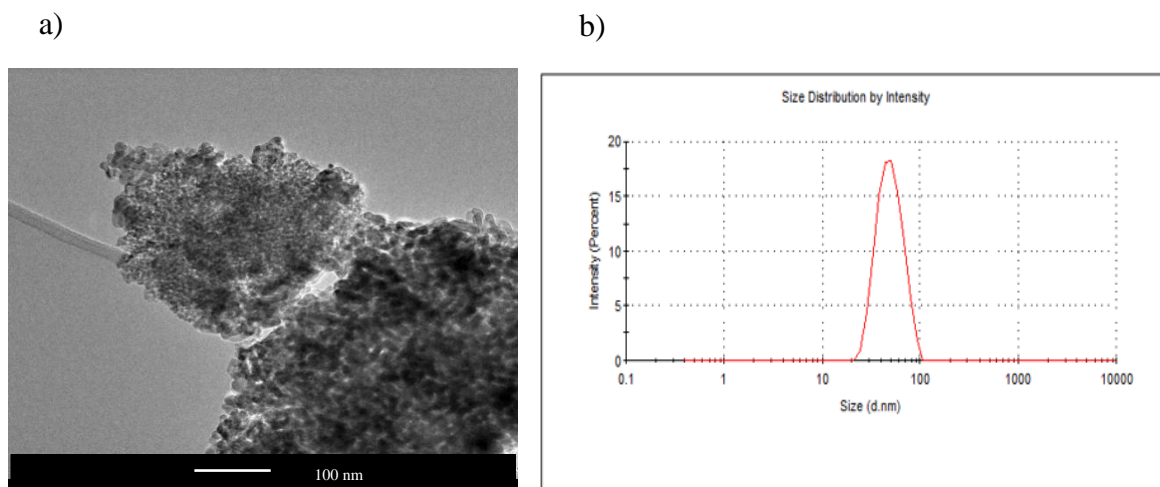
Rysunek 118. Widmo ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych Cs3-FPBA-MNPs

Na podstawie analizy ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych pokrytych Cs3-FPBA można potwierdzić, że zaplanowana modyfikacja była skuteczna, ponieważ w widmie obecne jest charakterystyczne szerokie pasmo przy 3233 cm^{-1} , pochodzące zarówno od grup OH i NH chitozanu jak i od drgań grup dihydroksyborylowych (Rysunek 118). Ponadto, w widmie obecne są pasma przy 2914 cm^{-1} (drgania rozciągające C-H), ostre pasmo przy 1641 cm^{-1} (od drgań grupy C=N) i pasma przy 1410 cm^{-1} i 1362 cm^{-1} pochodzące odpowiednio, od C-B i B-O. Ponadto, w widmie znajduje się również charakterystyczne pasmo przy 570 cm^{-1} , które przypisywane jest wcześniej wspomnianym drganiom $\text{Fe}^{2+}\text{-O}^{2-}$ i $\text{Fe}^{3+}\text{-O}^{2-}$.



Rysunek 119. Zdjęcia SEM Cs3-FPBA-MNPs

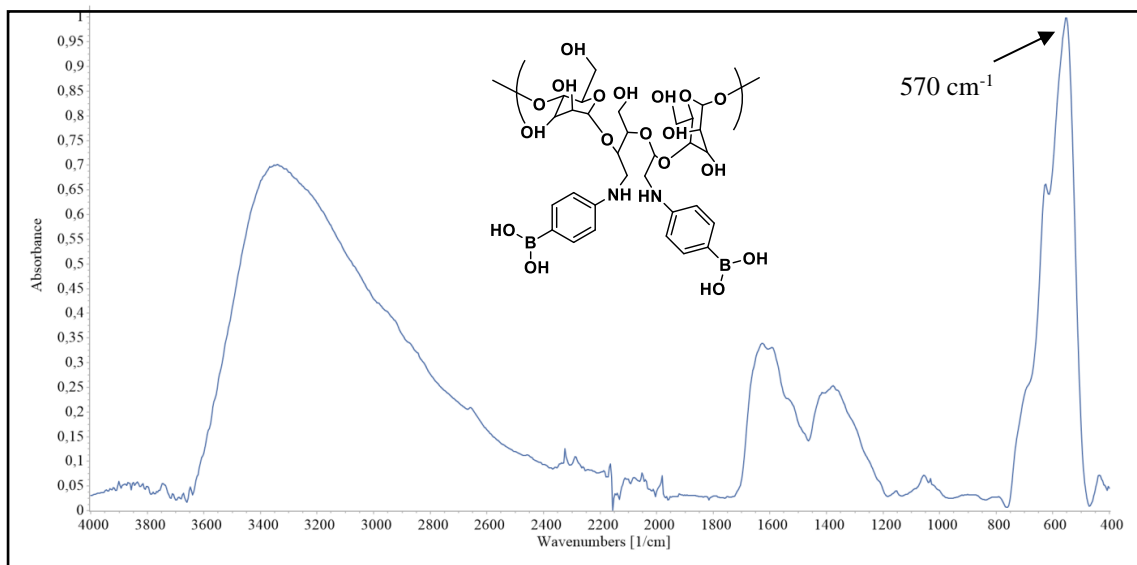
Zdjęcia SEM przedstawiają Cs3-FPBA-MNPs w postaci nieregularnych agregatów (Rysunek 119). Rozmiar tych nanocząstek wynosi 50 nm (Rysunek 120).



Rysunek 120. a) Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych pokrytych Cs3-FPBA; b) rozkład wielkości cząstek Cs3-FPBA-MNPs

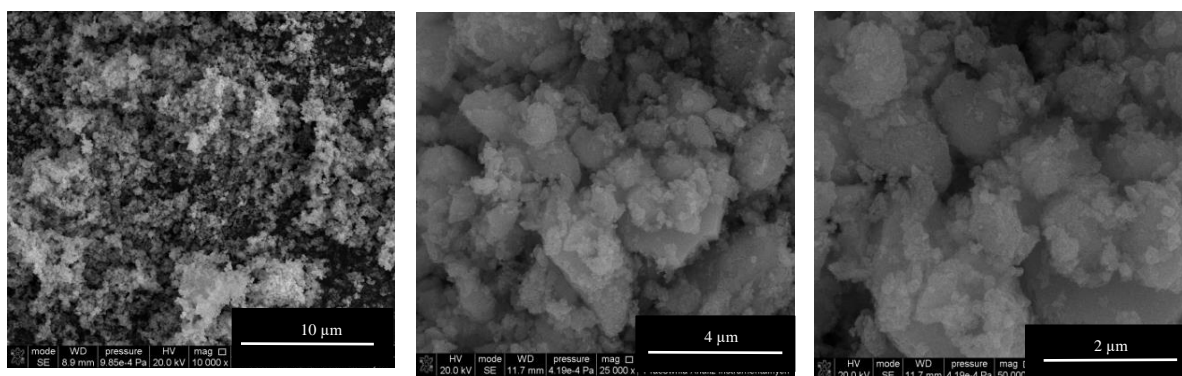
Porównując rozmiar nanocząstek magnetycznych pokrywanych modyfikowanym chitozaniem funkcjonalizowanym kwasem boronowym odsuniętym od pierścienia glukozaminowego można zauważyć, że rozmiar nanocząstek nieznacznie wzrasta wraz z ilością odsuniętych jednostek kwasu boronowego od pierścienia glukozaminowego. Jest to wynik, którego można było się spodziewać, ze względu na zmieniającą się strukturę polimeru prowadzącą najprawdopodobniej do różnych oddziaływań pomiędzy łańcuchami. Podobny efekt obserwowano już w poprzedniej pracy, gdzie porównywane były chitozany modyfikowane różną ilością odsuniętych grup aminowych, a które były produktami pośrednimi w tej syntezie [122].

[VIII] DAS-PBA-MNPs



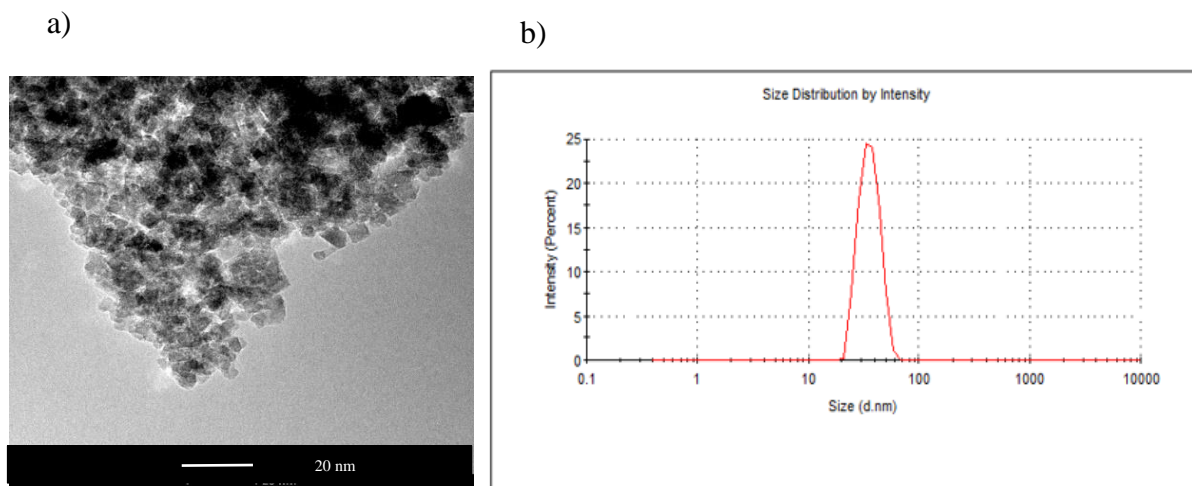
Rysunek 121. Widmo ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych DAS-PBA-MNPs

Po pokryciu nanocząstek magnetycznych polimerem DAS-PBA, w widmie ATR-FTIR można zaobserwować szerokie pasmo przy 3350 cm⁻¹ pochodzące od drgań grup dihydroksyborylowych, aminowych i hydroksylowych (Rysunek 121). Pasma przy 1419 cm⁻¹ i 1375 cm⁻¹ odpowiadają odpowiednio drganiom grup B-C i B-O. Jednocześnie, w widmie obecne jest pasmo przy 570 cm⁻¹, charakterystyczne dla magnetytu.



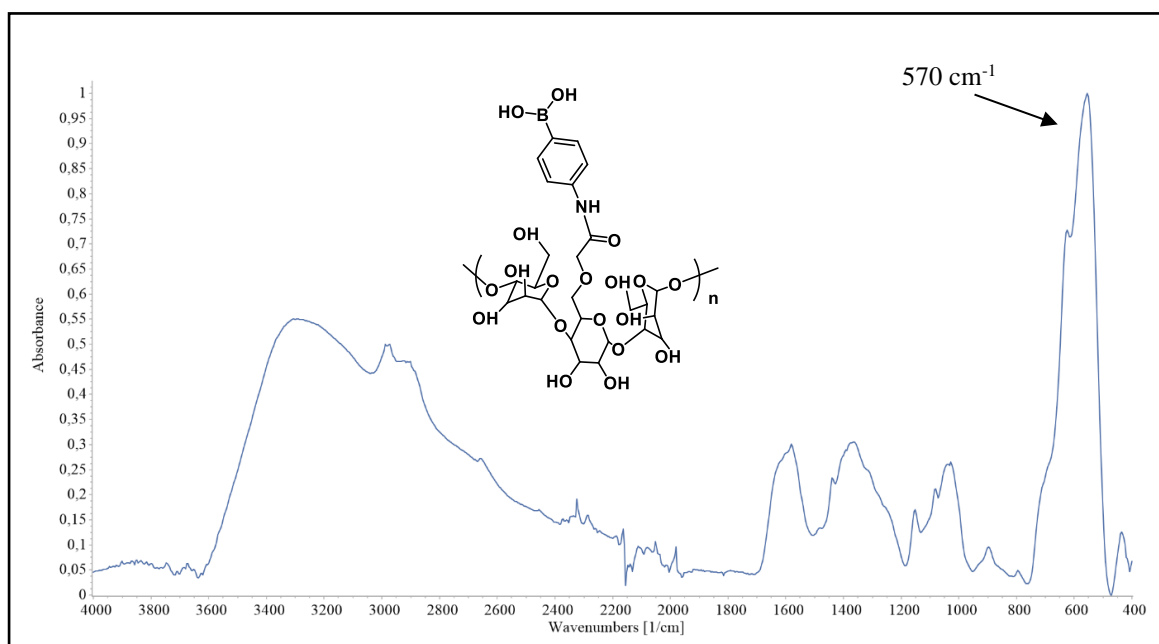
Rysunek 122. Zdjęcia SEM DAS-PBA-MNPs

Na zdjęciach SEM nanocząstek magnetycznych pokrytych modyfikowaną skrobią, podobnie jak w przypadku nanocząstek pokrytych modyfikowanym chitozaniem, widać charakterystyczne agregaty o różnorodnych kształtach (Rysunek 122). Średni rozmiar nanocząstek wynosi 36 nm (Rysunek 123).



Rysunek 123. a) Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych pokrytych DAS-PBA; b) rozkład wielkości cząstek DAS-PBA-MNPs

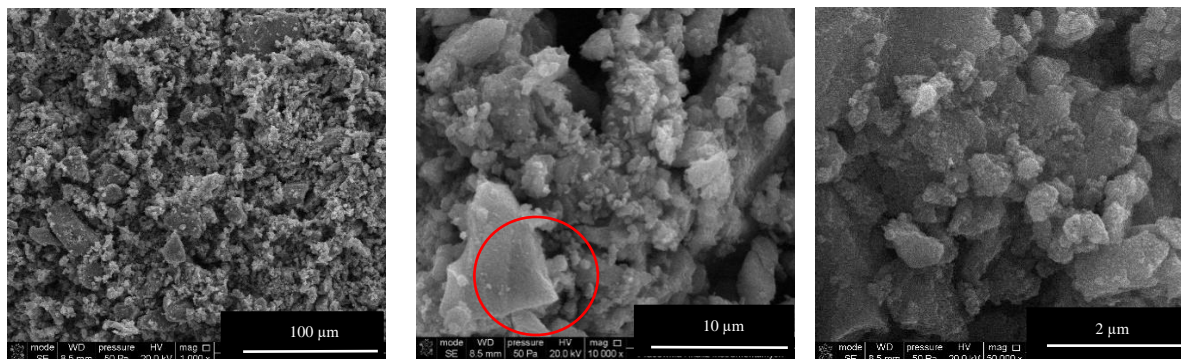
[IX] CMS-PBA-MNPs



Rysunek 124. Widmo ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych CMS-PBA-MNPs

W widmie ATR-FTIR nanocząstek magnetycznych pokrytych CMS-PBA, szerokie pasmo przy 3281 cm^{-1} pochodzi od drgań grup dihydroksyborylowych oraz grup hydroksylowych (Rysunek 124). Obecność wiązania amidowego, utworzonego pomiędzy karboksymetyloskrobią a kwasem boronowym, potwierdzają pasma przy 1625 cm^{-1} i 1584 cm^{-1} . Z kolei, pasma przy 1435 cm^{-1} i 1366 cm^{-1} odpowiadają, odpowiednio

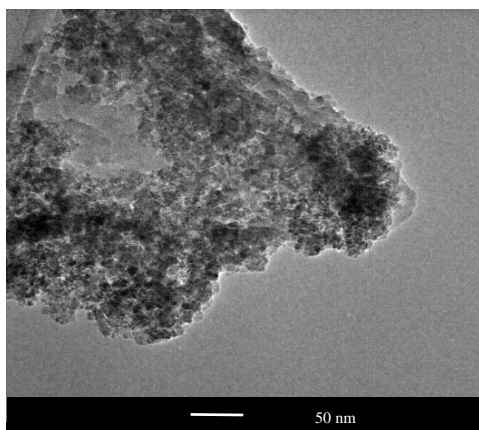
drzaniom grup B-C i B-O. Podobnie, jak w przypadku wcześniej opisanych widm nanocząstek, tak również w widmie CMS-PBA-MNPs obecne jest pasmo przy 570 cm^{-1} , charakterystyczne dla grupy Fe-O.



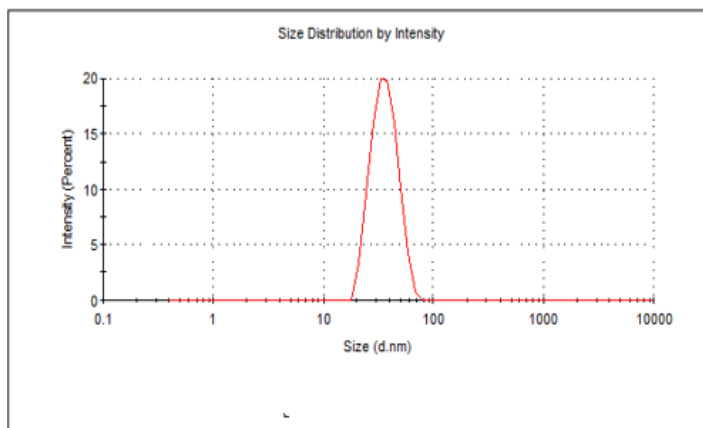
Rysunek 125. Zdjęcia SEM CMS-PBA-MNPs

Na zdjęciach SEM nanocząstek magnetycznych pokrytych CMS-PBA można zauważyć charakterystyczne ostre krawędzie, które również są zauważalne na zdjęciach samego polimeru (Rysunek 125). Średni rozmiar tych nanocząstek wynosi 37 nm (Rysunek 126).

a)



b)



Rysunek 126. a) Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych pokrytych CMS-PBA; b) rozkład wielkości cząstek CMS-PBA-MNPs

Zestawienie rozmiarów nanocząstek magnetytu pokrytych wszystkimi otrzymanymi polimerami oraz nanocząstek bez powłoki (MNPs) przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Rozmiary nanocząstek magnetycznych

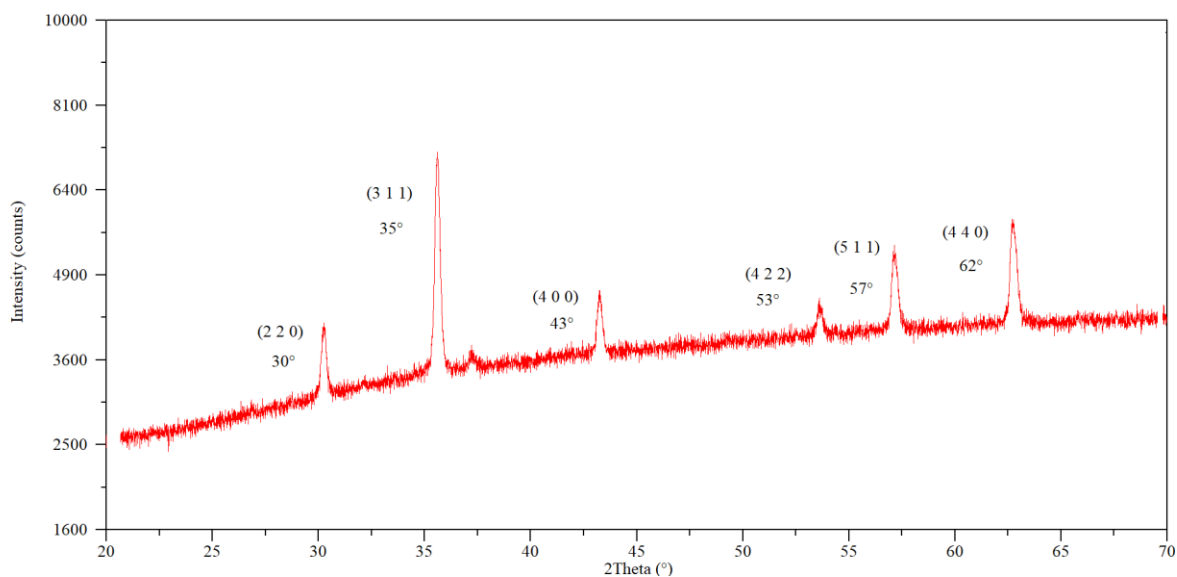
Rodzaj nanocząstek	Średni rozmiar [nm]
MNPs	15
Cs-FPBA-MNPs	26
Cs-FPBA-R-MNPs	27
DAS-PBA-MNPs	35
CMCs-PBA-MNPs	36
Cs1-FPBA-MNPs	41
Cs2-FPBA-MNPs	46
Cs3-FPBA-MNPs	50
DAS-PBA-MNPs	36
CMS-PBA-MNPs	37

Wszystkie nanocząstki z powłoką polimerową charakteryzują się większymi rozmiarami niż MNPs, co jest oczywiście związane z powstaniem warstwy powierzchniowej. Ponadto można stwierdzić, że pokrycie nanocząstek magnetycznych powłokami polimerowymi funkcjonalizowanymi kwasami boronowymi nie zmniejszyło ich zdolności do częściowej agregacji.

Rodzaj powłoki, pokrywającej nanocząstki wpłynął jednak znacząco na ich rozmiary. Najmniejszym rozmiarem charakteryzują się nanocząstki pokryte chitozaniem niemodyfikowanym funkcjonalizowanym kwasem boronowym (Cs-FPBA-MNPs i Cs-FPBA-R-MNPs). Największy rozmiar posiadają nanocząstki, które zostały pokryte modyfikowanym chitozaniem z odsuniętymi jedną, dwoma i trzema grupami aminowymi funkcjonalizowane kwasami boronowymi. Prawdopodobnie związane jest to z długimi łańcuchami polimerowymi obecnymi na rdzeniu nanocząstek. Modyfikacje mające na celu utlenienie polisacharydu, czy utworzenie karboksymetylo pochodnych polisacharydów, a następnie funkcjonalizacja kwasami boronowymi spowodowały, że nanocząstki pokryte tak modyfikowanym chitozaniem i skrobią posiadają zbliżone rozmiary. Z punktu widzenia zastosowań biomedycznych najważniejsze jest jednak to, że wszystkie układy są rzeczywiście nanomateriałami tj. mają rozmiary znacznie mniejsze niż 100 nm.

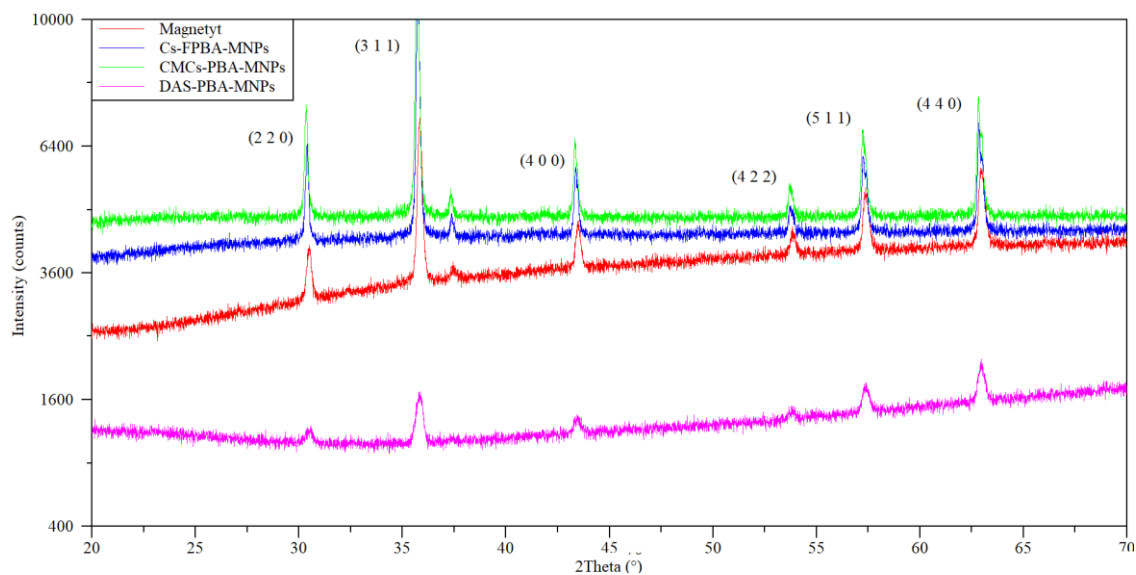
23. Analiza rentgenograficzna otrzymanych nanocząstek magnetycznych

W celu dodatkowego potwierdzenia obecności rdzenia nanocząstek zbudowanego z Fe_3O_4 wykonano również analizy rentgenograficzne otrzymanych próbek (Rysunek 127 i Rysunek 128). Dla wszystkich materiałów otrzymano sześć charakterystycznych sygnałów: (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), (4 4 0), przy wartościach kąta $2\theta = 30, 35, 43, 53, 57$ i 62° . Porównanie z danymi znajdującymi się w bazie X'Pert High Score potwierdziło, że rdzeń otrzymanych nanocząstek stanowi czysty magnetyt



Rysunek 127. Rentgenogram czystych nanocząstek magnetytu

Na Rysunku 128 przedstawiono przykładowe dyfraktogramy nanocząstek magnetytu pokrytych modyfikowanym chitozaniem Cs-FPBA i CMCs-PBA oraz modyfikowaną skrobią CMS-PBA-MNPs. W pozostałych materiałach różnice w dyfraktogramach rentgenowskich były nieznaczne.

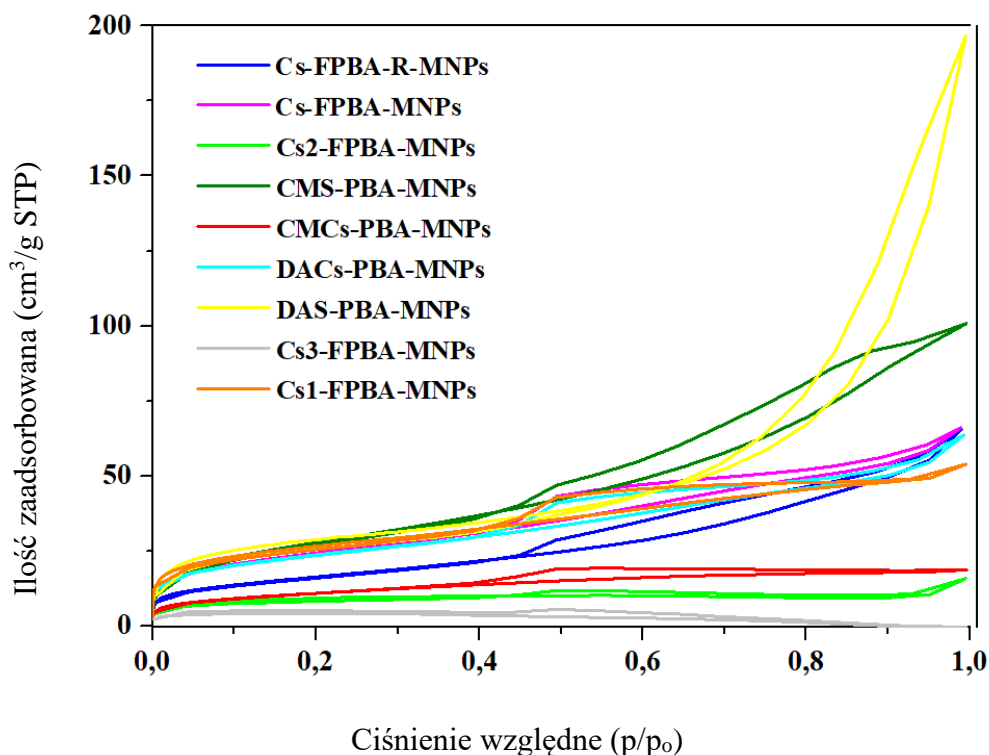


Rysunek 128. Rentgenogramy czystych nanocząstek magnetytu, nanocząstek magnetytu pokrytych: Cs-FPBA, CMCs-PBA, DAS-PBA

Analiza rentgenograficzna potwierdziła, że rdzeniem otrzymanych nanocząstek magnetycznych jest czysty magnetyt. Przeprowadzone modyfikacje na powierzchni nanocząstek nie spowodowały zmian w strukturze rdzenia.

24. Określenie porowatości materiałów magnetycznych

Stopień porowatości nanomateriałów magnetycznych Cs-FPBA-MNPs, Cs-FPBA-R-MNPs, CMCs-PBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs, Cs3-FPBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs, CMS-PBA-MNPs zbadano metodą adsorpcyjną (Rysunek 129). Na podstawie uzyskanych izoterm obliczono powierzchnię właściwą materiałów BET (Brunauer-Emmett-Teller).



Rysunek 129. Izoterma adsorpcji-desorpcji azotu nanocząstek pokrytych modyfikowanym chitozaniem i modyfikowaną skrobią

Pola powierzchni właściwej nanocząstek magnetycznych zestawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Wartości pola powierzchni właściwej nanocząstek magnetycznych pokrywanych modyfikowanym chitozaniem i modyfikowaną skrobią

Rodzaj nanocząstek	Pole powierzchni właściwej S_{BET} (m^2/g)
Cs-FPBA-MNPs	80
Cs-FPBA-R-MNPs	54
CMCs-PBA-MNPs	36
DACs-PBA-MNPs	80
Cs-1-FPBA-MNPs	91
Cs-2-FPBA-MNPs	33
Cs-3-FPBA-MNPs	16
DAS-PBA-MNPs	102
CMS-PBA-MNPs	91

Jak można zauważyć, największe pole powierzchni właściwej mają nanocząstki DAS-PBA-MNPs (wartość ta wynosi $102 \text{ m}^2/\text{g}$), podczas gdy najmniejsze pole powierzchni właściwej wynoszące $16 \text{ m}^2/\text{g}$ posiadają Cs-3-PBA-MNPs.

Według danych literaturowych, wartość pola powierzchni właściwej S_{BET} czystego magnetytu przyjmuje różne wartości m.in. $94,40 \text{ m}^2/\text{g}$ [169]; $71,314 \text{ m}^2/\text{g}$ [170]; $111 \text{ m}^2/\text{g}$ [171]. Na tak różną wartość może mieć wpływ proces przygotowania próbki do pomiaru. Można jednak wnioskować, że pokrycie nanocząstek modyfikowanymi chitozanami, w niektórych przypadkach powoduje zmniejszenie pola powierzchni właściwej.

Powierzchnia właściwa (S_{BET}) jest ważnym parametrem w charakteryzowaniu nanocząstek do różnych zastosowań, w tym badań biomedycznych. Większa powierzchnia może prowadzić do zwiększonych interakcji z biomolekułami, co jest korzystne w zastosowaniach takich jak ukierunkowane dostarczanie leków, gdzie nanocząstki muszą wiązać się ze specyficznymi receptorami komórkowymi. Dodatkowo większa powierzchnia właściwa pozwala na lepszą dyspersję nanocząstek w ośrodku biologicznym i poprawia potencjalnie efekt terapeutyczny [183]. Niemniej jednak nanocząstki magnetyczne o dużej powierzchni właściwej mogą wykazywać większą tendencję do agregacji, co jest ich niepożądaną właściwością [184].

25. Charakterystyka termiczna

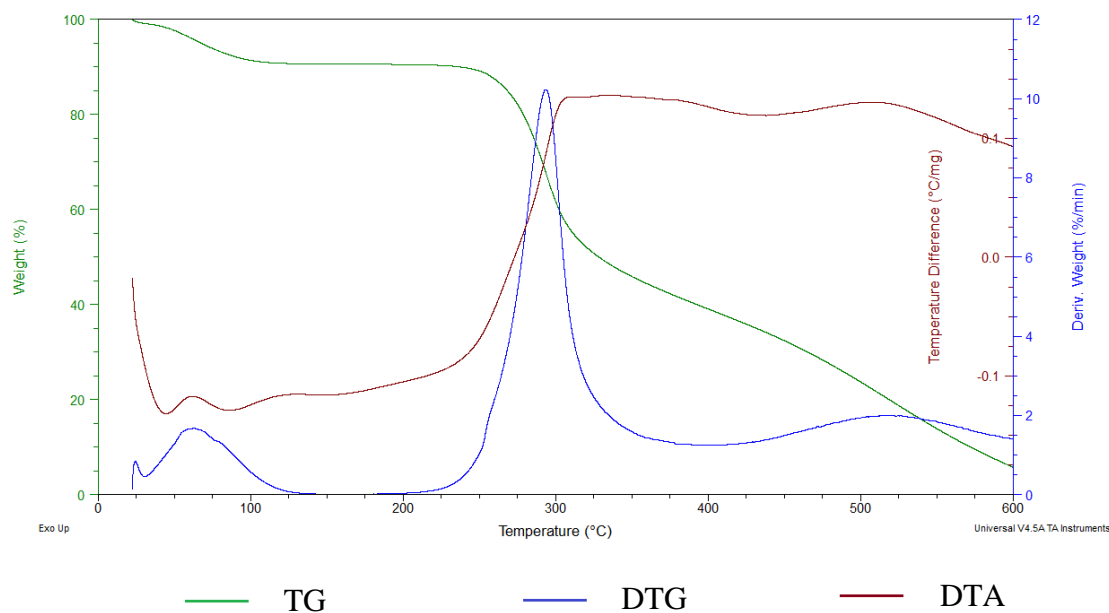
Charakterystyka termogravimetryczna substancji różnego pochodzenia, w tym również polimerów, pozwala określić, jak te materiały zachowują się w szerokich zakresach temperatur, a także jak bardzo odporne są na zmianę, i w którym momencie zachodzą przemiany chemiczne lub fizyczne. Analizę termiczną można prowadzić w różnych warunkach.

W zależności od metody, zmianie może ulegać również środowisko otaczające badaną próbkę (tj. skład chemiczny atmosfery, ciśnienie). Próbka może być dodatkowo poddawana działaniu różnych czynników chemicznych (chemicznie aktywna atmosfera) lub fizycznych (czynniki mechaniczne, działanie pól elektrycznych czy magnetycznych itp.). Oznacza to, że metody analizy termicznej umożliwiają określanie zmian stanu badanej substancji wraz ze zmianą temperatury w różnych warunkach pomiarowych.

Bardzo ważne jest określenie stabilności termicznej nowo syntetyzowanych materiałów, ponieważ ma to duży wpływ na możliwość ich dalszego zastosowania.

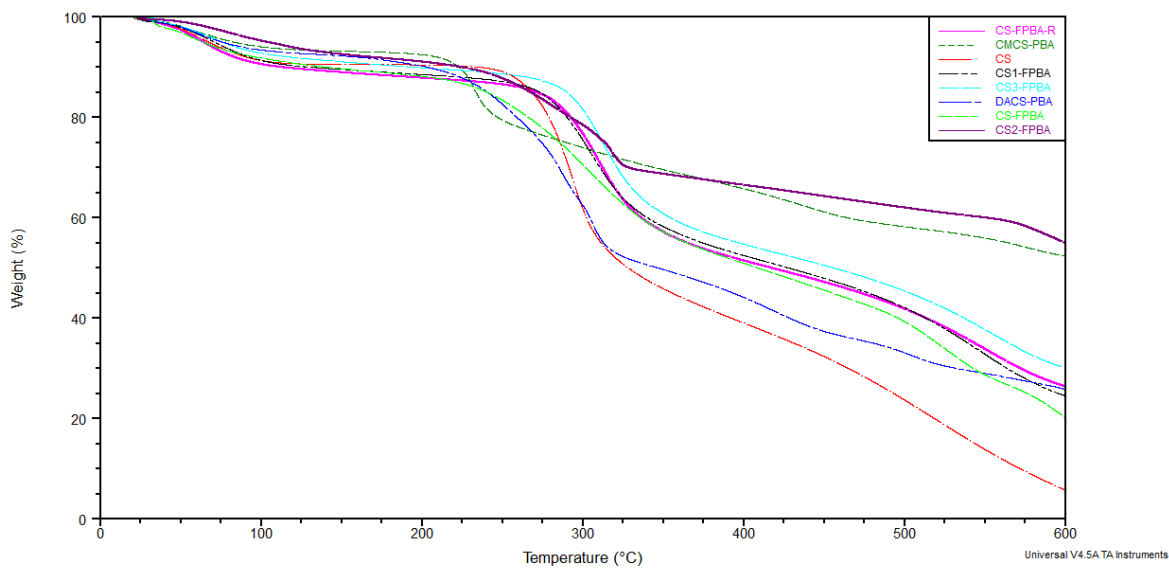
25.1. Charakterystyka termiczna natywnych i modyfikowanych polimerów w atmosferze powietrza

Rozkład termiczny chitozanu zachodzi w atmosferze powietrza w trzech etapach, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Rysunek 130) [159]. Pierwszy etap rozkładu obserwuje się w zakresie temperatur 20-160°C, z $T_{\max} = 61^{\circ}\text{C}$, który odpowiada ubytkowi masy około 9%. Proces ten związany jest z odparowaniem wody. Rozkład łańcuchów polimerowych chitozanu zachodzi w zakresie 271-400°C, z $T_{\max} = 292^{\circ}\text{C}$ i z ubytkiem masy około 55%. Ostatni etap obserwuje się w zakresie temperatur 400-600°C (z około 31% ubytkiem). Krzywa DTA chitozanu w atmosferze powietrza wykazuje obecność dwóch egzotermicznych procesów (są to reakcje utleniania towarzyszące rozkładowi termicznemu) oraz jednego procesu endotermicznego, zachodzącego na początku rozkładu (przy ok. 60°C związany z odparowaniem wody). Pozostałość chitozanu w 600°C wynosi 5%.

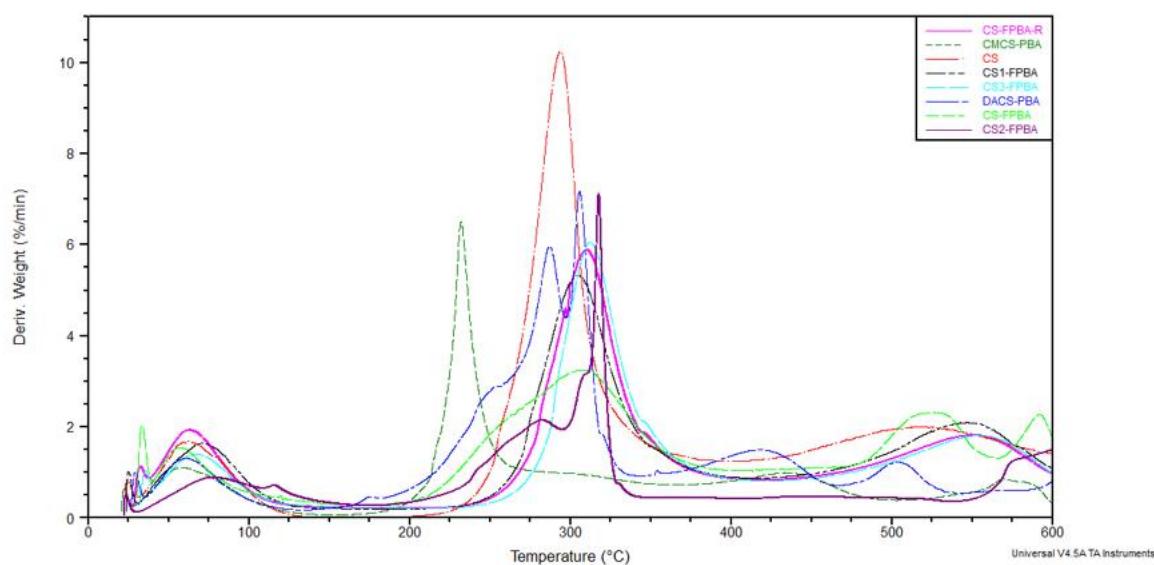


Rysunek 130. Krzywe TGA, DTG, DTA chitozanu w atmosferze powietrza

Na rysunku 131 i rysunku 132 zostały przedstawione termogramy chitozanu i chitozanu modyfikowanego kwasami boronowymi, a w Tabeli 10 parametry termiczne wyznaczone z krzywych TGA-DTA otrzymanych materiałów polimerowych: Cs, Cs-FPBA, Cs-FPBA-R, CMCs-PBA, DAS-PBA, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA i Cs3-FPBA.



Rysunek 131. Krzywe TGA: Cs, Cs-FPBA, Cs-FPBA-R, CMCs-PBA, DAS-PBA, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA, Cs3-FPBA w atmosferze powietrza.



Rysunek 132. Krzywe DTG: Cs, Cs-FPBA, Cs-FPBA-R, CMCs-PBA, DAS-PBA, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA i Cs3-FPBA w atmosferze powietrza

Tabela 10. Parametry termiczne polimerów: Cs, Cs-4FPBA, Cs-4FPBA-R, CMCs-PBA, DAS-PBA, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA i Cs3-FPBA wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze powietrza (T_o – temperatura początku rozkładu, T_{max} – temperatura przy maksymalnej szybkości rozkładu, Δm – ubytek masy danego etapu).

Material	I etap		II etap		III etap		IV etap		V etap		Pozostałość 600 °C				
	T_{max} (°C)	Δm (%)	T_o (°C)	T_{max} (°C)	Δm (%)	T_o (°C)	T_{max} (°C)	Δm (%)	T_o (°C)	T_{max} (°C)		Δm (%)			
Cs	61	9	271	292	55	423	527	31				5			
Cs-FPBA	57	10	250	310	43	425	520	22	564	593	8	17			
Cs-FPBA-R	62	11	285	310	40	434	552	23				26			
CMCs-PBA	57	7	223	232	24	359	434	12	515	574	5	52			
DACs-PBA	61	7	250	288	29	296	306	15	361	417	12	467	507	8	29
Cs1-FPBA	70	10	277	302	39	427	(*)	26						25	
Cs2-FPBA	75	8	268	320	28	461	(*)	10						54	
Cs3-FPBA	66	9	292	312	39	433	(*)	23						29	

* Brak wyraźnego punktu przegięcia na TG i brak maksimum na DTG; masa stopniowo maleje

We wszystkich badanych materiałach pierwszy etap rozkładu związany jest z uwolnieniem wody zaadsorbowanej na powierzchni polimeru i nie odnosi się do zmian chemicznych w jego strukturze, podobnie jak w przypadku niemodyfikowanych

polisacharydów. Wskazuje on na różną podatność pochodnych chitozanu na sorpcję wody. Pomimo tego, że wszystkie materiały były suszone w tych samych warunkach to ubytek masy ściśle związany z desorpcją wody zależy od sposobu modyfikacji polimeru. Największą zdolność wiązania wody wykazuje Cs-FPBA-R. Jednak zawartość wody we wszystkich próbkach polimerowych mieściła się w zakresie około 6-11%, co jest typowe dla polisacharydów [149].

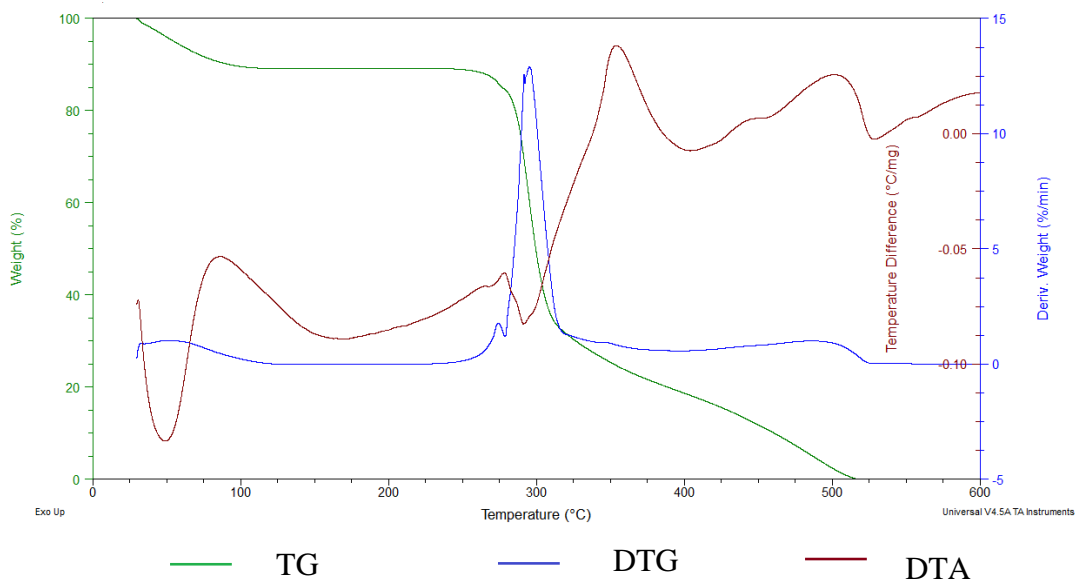
W przypadku modyfikowanych pochodnych chitozanu, najmniej stabilnym materiałem jest CMCS-PBA (jego główny rozkład zaczyna się już w 223°C), natomiast najbardziej stabilnym materiałem jest Cs3-FPBA, z T_0 w 292°C. Próbki Cs-FPBA i CMCS-PBA, w odróżnieniu do niemodyfikowanego chitozanu wykazują cztery etapy rozkładu, a DACs-PBA aż pięć etapów. Pozostałość pochodnych chitozanu w 600°C jest znacznie większa niż niemodyfikowanego chitozanu i mieści się w granicy od około 17 % do 54% (podczas gdy niemodyfikowanego chitozanu wartość ta wynosi zaledwie około 5%).

Polisacharydy są spalane w obecności tlenu z wydzielaniem CO₂ i H₂O, stąd wynika niewielka pozostałość chitozanu w 600°C w atmosferze powietrza. Stosunkowo duża pozostałość węgla pochodnych chitozanu w atmosferze powietrza może wskazywać, na obecność trwałych układów usieciowanych oraz poliaromatycznych, powstających w efekcie rekombinacji rodników i makrorodników (co było sugerowane w innych pracach naukowych [162]). Dodatkowo jest to związane z obecnością w strukturze atomów boru. Związki boru również ulegają sieciowaniu, co zostało opisane w literaturze [185-187].

Zgodnie z literaturą [159], rozkład termiczny niemodyfikowanego wyjściowego chitozanu zachodzi zgodnie z mechanizmem wolnorodnikowym, który polega głównie na pękaniu wiązań glikozydowych, otwieraniu pierścieni i odrywaniu podstawników bocznych. Procesy zachodzące w badanych pochodnych chitozanu są dużo bardziej zróżnicowane, ponieważ mogą zachodzić nie tylko w łańcuchach głównych, ale także w dużych podstawnikach bocznych. Oprócz typowych reakcji charakterystycznych dla chitozanu, takich jak rozszczepienie wiązań glikozydowych i otworzenie pierścieni, możliwe jest również niszczenie łańcuchów bocznych w różnych miejscach, stąd pojawiające się dodatkowe etapy (Tabela 10).

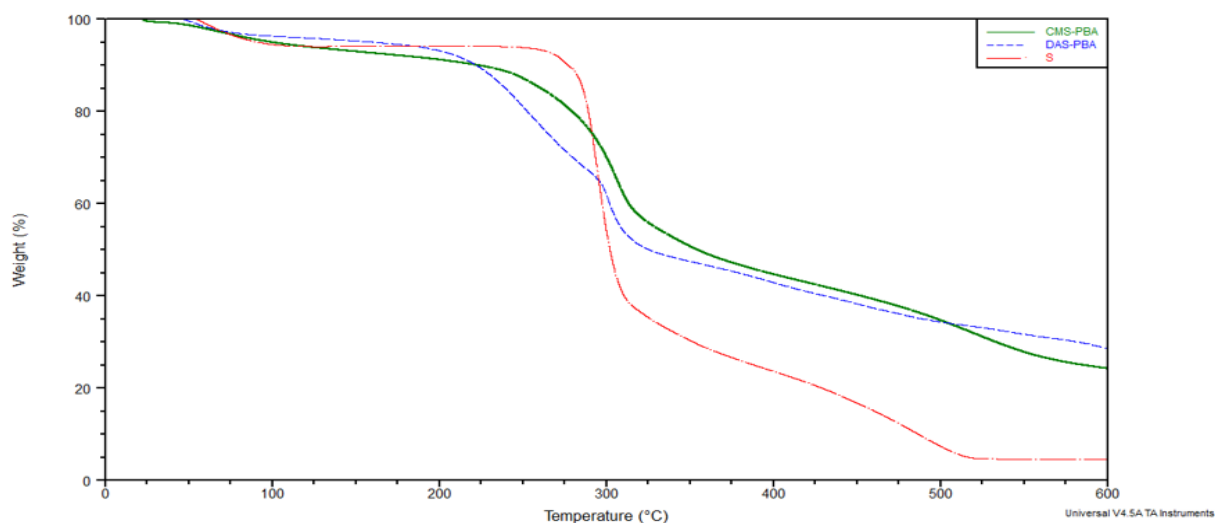
Rozkład termiczny skrobi niemodyfikowanej w atmosferze powietrza, podobnie jak w przypadku chitozanu, zachodzi w trzech etapach (Rysunek 133), co również jest zgodne z danymi literaturowymi [173]. Pierwszy etap rozkładu obserwuje się w zakresie 20-150°C, z T_{max} przy 56°C i około 11% ubytkiem masy. Proces ten jest spowodowany usuwaniem wody związanej i niezwiązanej. Właściwy rozkład łańcuchów polimerowych

skrobi zachodzi w zakresie temperatur 284-400°C, z $T_{\max} = 294^{\circ}\text{C}$ i ubytkiem masy około 70%. Ostatni etap przebiega w temperaturze 400-550°C, z około 19% ubytkiem masy.

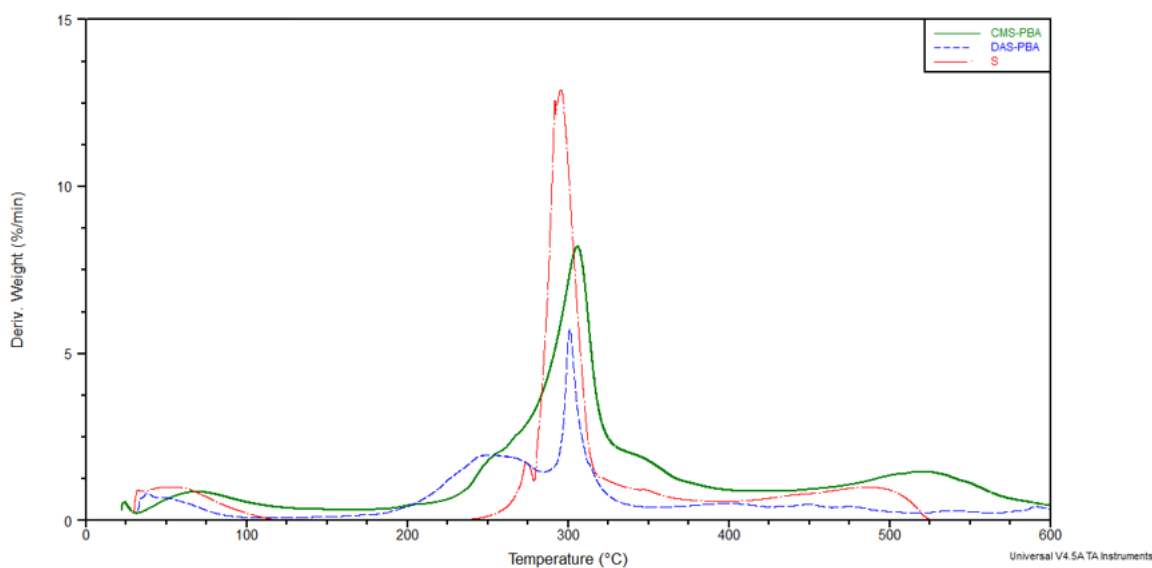


Rysunek 133. Krzywe TGA, DTA DTG skrobi w atmosferze powietrza

Na Rysunku 134 i Rysunku 135 zostały przedstawiono termogramy materiałów skrobiowych modyfikowanych kwasem boronowym, a w Tabeli 11 parametry termiczne wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze powietrza otrzymanych materiałów: S, DAS-PBA i CMS-PBA.



Rysunek 134. Krzywe TGA: S, DAS-PBA i CMS-PBA w atmosferze powietrza



Rysunek 135. Krzywe DTG: S, DAS-PBA, CMS-PBA w atmosferze powietrza

Tabela 11. Parametry termiczne polimerów: S, DAS-PBA, CMS-PBA wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze powietrza.

Material	I etap		II etap		III etap		Pozostałość		
	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	
S	56	11	284	294	70	400	(*)	19	0
DAS-PBA	47	7	265	251	27	286	301	28	38
CMS-PBA	66	7	281	306	52	439	520	17	24

* Brak wyraźnego punktu przegięcia na TG i brak maksimum na DTG; masa stopniowo maleje

Podobnie, jak w przypadku chitozanu, pierwszy etap rozkładu skrobi związanych jest z uwolnieniem wody zaadsorbowanej na powierzchni polimeru i nie odnosi się do zmian chemicznych w jego strukturze.

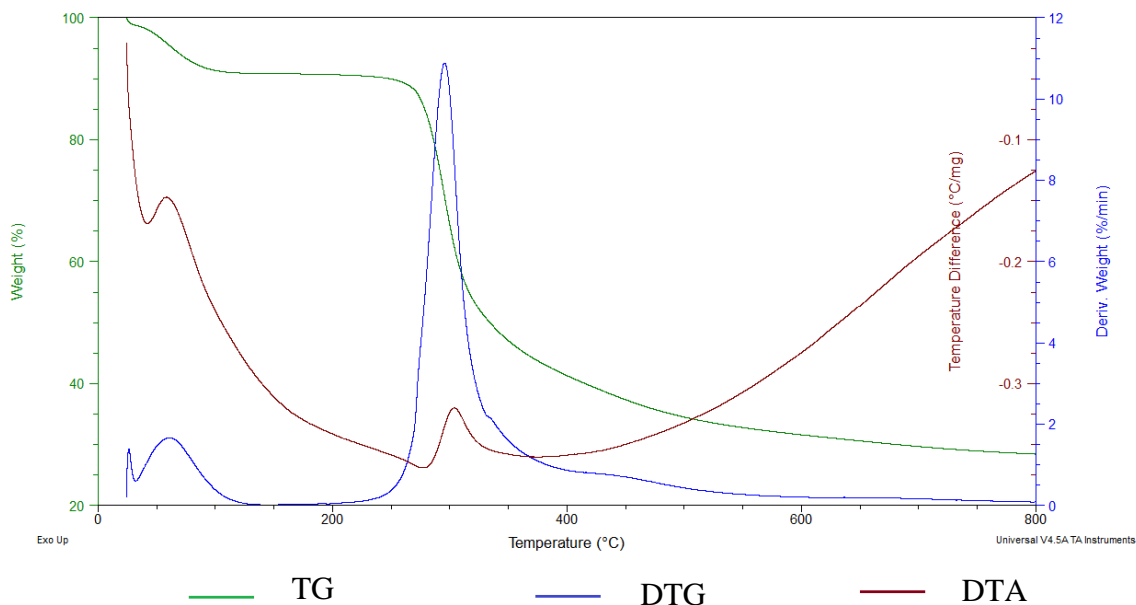
Pochodne skrobi DAS-PBA i CMS-PBA, podobnie jak skrobia niemodyfikowana wykazują trzy etapy rozkładu. Obie skrobie modyfikowane kwasem boronowym zmniejszyły swoją stabilność termiczną w porównaniu do wyjściowej skrobi. Pozostałość w 600°C dla niemodyfikowanej skrobi wynosi 0%, co sugeruje, że polimer ten ulega całkowitemu spaleniowi w obecności tlenu z wydzieleniem CO₂ i H₂O. Pozostałość w 600°C pochodnych skrobi wynosi 38% w DAS-PBA i 24% w CMS-PBA, co ewidentnie związane jest z obecnością w strukturze atomów boru.

25.2. Charakterystyka termiczna natywnych i modyfikowanych polimerów w atmosferze azotu

Jak wspomniano wcześniej, na rozkład termiczny mają wpływ różne czynniki zewnętrzne m.in. skład chemiczny atmosfery. Dlatego też wykonano analizę termiczną otrzymanych materiałów w atmosferze azotu w temperaturze 800°C, co pozwala na wyeliminowanie reakcji utleniania termicznego.

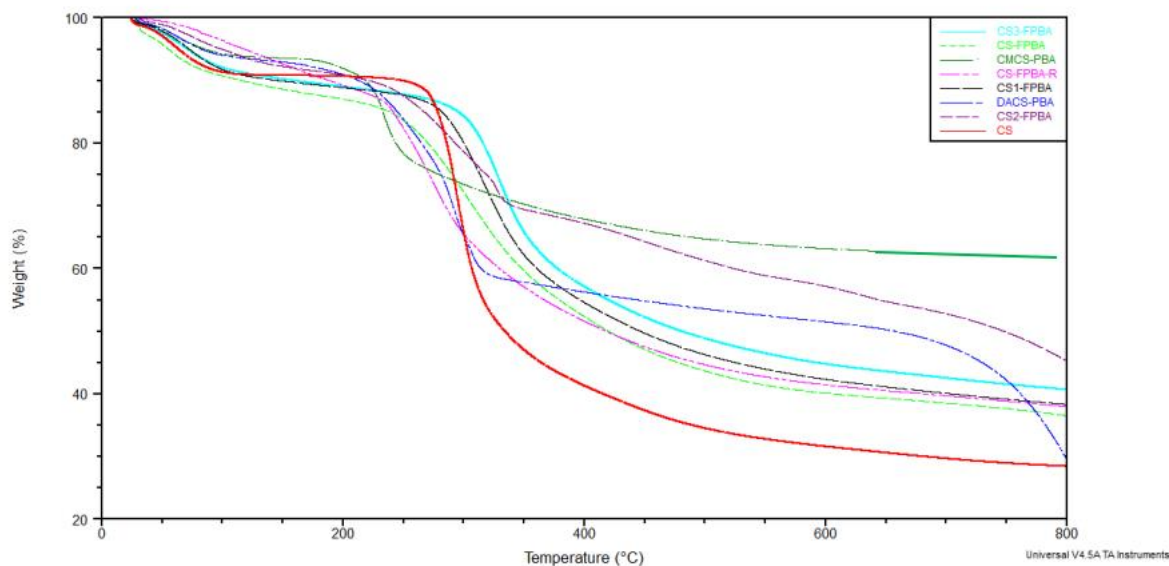
Chitozan w atmosferze azotu ulega dwuetapowemu rozkładowi termicznemu, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Rysunek 136) [174]. Pierwszy etap rozkładu obserwuje się w zakresie 20-160°C, któremu odpowiada ok. 9% utraty masy. Proces ten związany jest z odparowaniem wody ($T_{\max} = 60^{\circ}\text{C}$). Drugi etap, rozpoczyna się przy ok. 277°C, a maksimum szybkości T_{\max} przypada w 297°C. Ubytek masy w tym etapie wynosi około 57% i związany jest z pękaniem łańcuchów polisacharydowych (włączając w to dehydratację, deaminację, deacetylację, pęknięcie wiązań glikozydowych i otwarcie pierścienia piranozowego) oraz eliminacją małych cząsteczkowych produktów degradacji [174]. Dalsze powolne zmniejszenie masy obserwuje się powyżej 400°C (utrzymuje się ono do 800°C, bez maksimum na krzywej DTG).

Pierwszy etap rozkładu jest procesem endotermicznym, co może być związane z pękaniem wiązań wodorowych, drugi etap również jest endotermiczny z nakładającym się efektem egzotermicznym (którym może być np. proces sieciowania). Pozostałość chitozanu w 800°C wynosi 29%. W atmosferze powietrza w 600 °C wartość ta była znacznie niższa (około 5%). Stosunkowo duża pozostałość węglowa w atmosferze azotu wskazuje, na powstawanie trwałych układów usieciowanych oraz poliaromatycznych w efekcie rekombinacji rodników, co było sugerowane w literaturze [172].

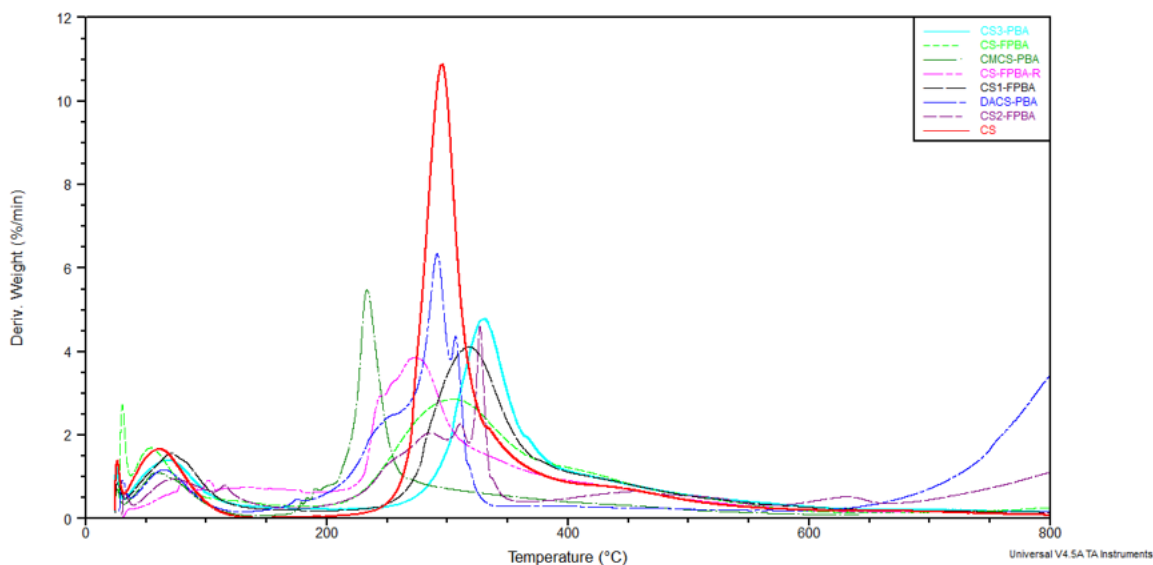


Rysunek 136. Krzywe TGA-DTA chitozanu w atmosferze azotu

Na Rysunku 137 i Rysunku 138 przedstawiono termogramy dla chitozanu i chitozanu modyfikowanego kwasami boronowymi, a w Tabeli 12 parametry termiczne wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze azotu dla otrzymanych materiałów: Cs, Cs-FPBA, Cs-FPBA-R, CMCs-PBA, DAS-PBA, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA, Cs3-FPBA.



Rysunek 137. Krzywe TGA: Cs, Cs-4FPBA, Cs-4FPBA-R, CMCs-PBA, DACs-PBA, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA i Cs3-FPBA w atmosferze azotu.



Rysunek 138. Krzywe DTG: Cs, Cs-4FPBA, Cs-4FPBA-R, CMCS-PBA, DACS-PBA, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA i Cs3-FPBA w atmosferze azotu.

Tabela 12. Parametry termiczne materiałów: Cs, Cs-4FPBA, Cs-4FPBA-R, CMCS-PBA, DAS-PBA, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA, Cs3-FPB wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze azotu.

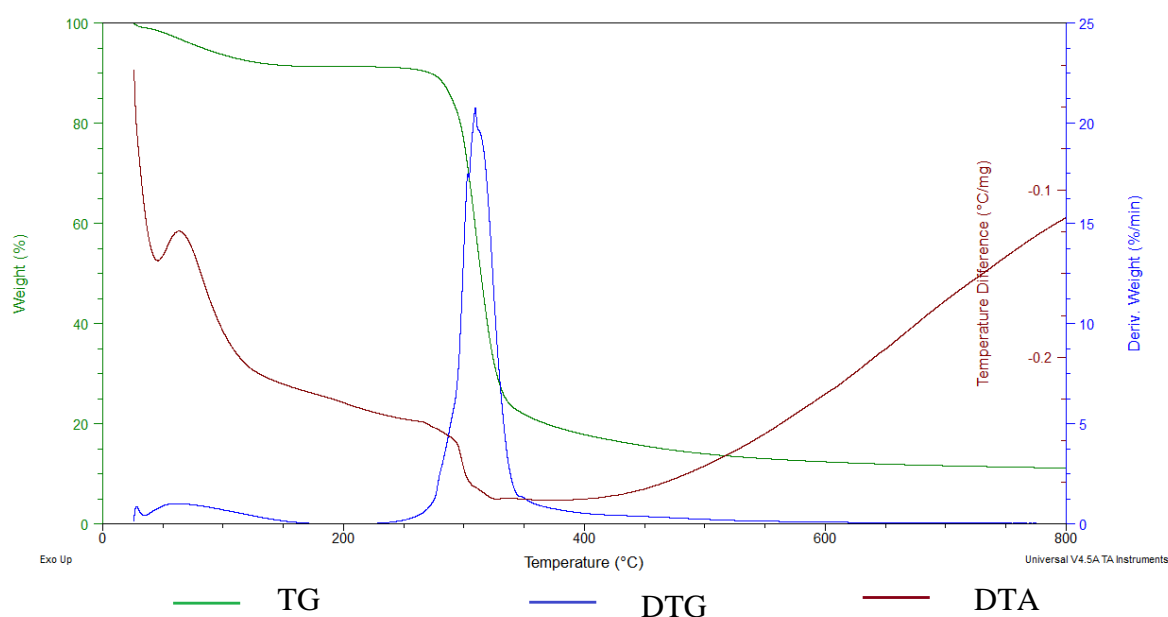
Material	I etap		II etap			III etap			Pozostałość 800 °C
	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	
Cs	60	9	277	297	57	-	(*)	5	29
Cs-4FPBA	57	12	254	308	48				40
Cs-4FPBA-R	83	7	242	271	49				44
CMCS-PBA	58	6	217	234	65				29
DACS-PBA	65	7	246	292	39	501	800	29	25
Cs1-FPBA	69	10	284	318	47				43
Cs2-FPBA	69	8	247	325	24	384	(*)	22	46
Cs3-FPBA	71	10	303	331	46				44

* Brak wyraźnego punktu przeięcia na TG i brak maksimum na DTG; masa stopniowo maleje

Można zaobserwować, że w zależności od struktury chemicznej zmodyfikowanego chitozanu przesuwają się T_o i T_{max}, zmienia się też Δm. W przypadku modyfikowanych pochodnych chitozanu, najmniej stabilnym materiałem w atmosferze azotu, tak samo jak w atmosferze powietrza, jest CMCS-PBA (jego główny rozkład zaczyna się już w 217°C), natomiast najbardziej stabilnym materiałem jest Cs3-FPBA, z T_o w 303°C. DACS-PBA

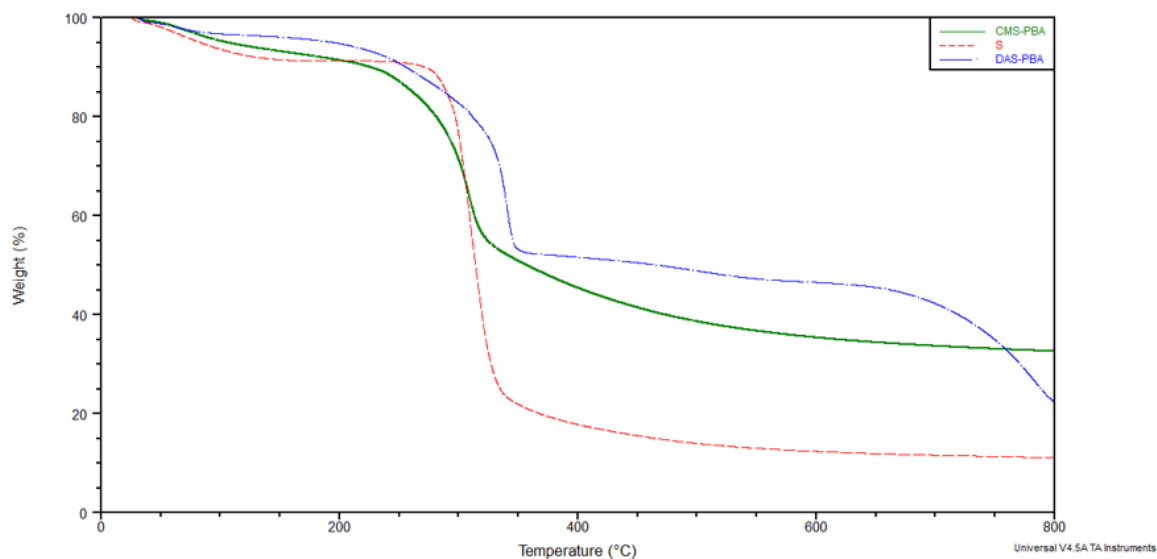
i Cs2-FPBA, tak jak niemodyfikowany chitozan wykazują trzy etapy rozkładu, a pozostałe pochodne chitozanu tylko dwa. Pozostałość pochodnych chitozanu w 800°C jest znacznie większa niż samego chitozanu, za wyjątkiem DACS-PBA.

Skrobia w atmosferze azotu ulega dwuetapowemu rozkładowi termicznemu (Rysunek 139). Podobnie dwuetapowy rozkład termiczny tego polimeru opisał Aggarwal w swojej pracy [173]. Oba etapy są procesami endotermicznymi. Pierwszy związany jest z utratą wody (około 11% ubytek masy), natomiast główny etap rozkładu zachodzi w temperaturze 290°C (T_{max} w 294°C), którego ubytek masy wynosi około 80% (Tabela 13).

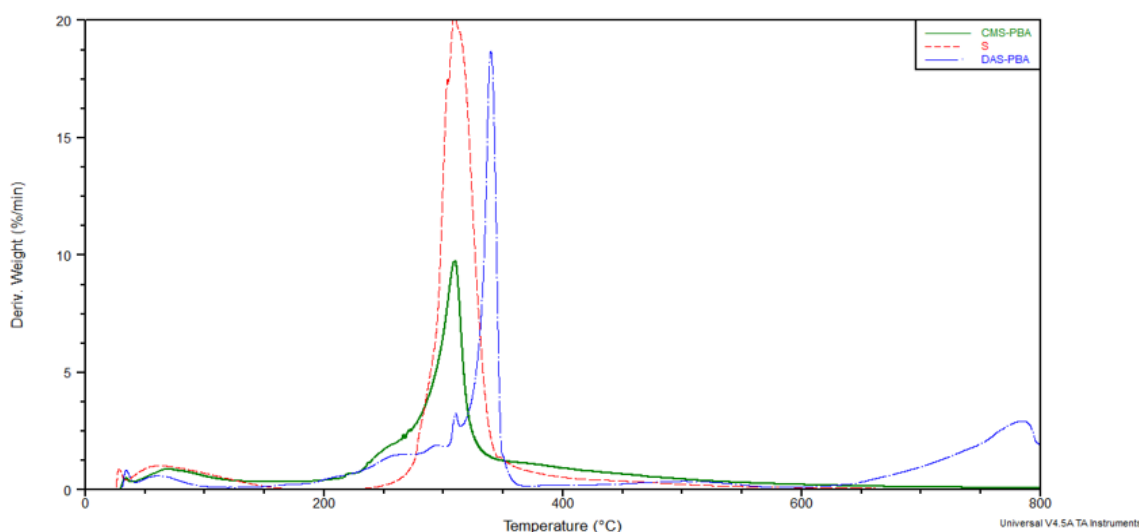


Rysunek 139. Krzywe TGA, DTA, DTG skrobi w atmosferze azotu

Na Rysunku 140 i Rysunku 141 zostały przedstawione termogramy skrobi i skrobi modyfikowanej kwasami boronowym (DAS-PBA, CMS-PBA), a w Tabeli 13 parametry termiczne wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze azotu



Rysunek 140. Krzywe TGA: S, DAS-PBA i CMS-PBA w atmosferze azotu.



Rysunek 141. Krzywe DTG: S, DAS-PBA i CMS-PBA w atmosferze azotu.

Tabela 13. Parametry termiczne materiałów: S, DAS-PBA, CMS-PBA wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze azotu.

Material	I etap		II etap			III etap			Pozostałość 800 °C
	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	
S	56	11	290	294	80				9
DAS-PBA	47	7	285	340	27	286	301	28	38
CMS-PBA	70	7	269	311	56				37

* Brak wyraźnego punktu przegięcia na TG i brak maksimum na DTG; masa stopniowo maleje

Biorąc pod uwagę T_0 , skrobia niemodyfikowana jest najbardziej stabilna, ale najwyższą T_{max} wykazuje DAS-PBA (340 °C). Analizując T_{max} , można stwierdzić, że modyfikacja chemiczna skrobi znacząco poprawiła jej stabilność termiczną: wzrost T_{max} w DAS-PBA wynosi 46 °C, a w CMS-PBA 57 °C w stosunku do skrobi niemodyfikowanej. Skrobia wyjściowa wykazuje największą szybkość reakcji (około 20%/min). Pozostałość w 800°C pochodnych skrobi jest znacznie większa niż samego niemodyfikowanego polimeru.

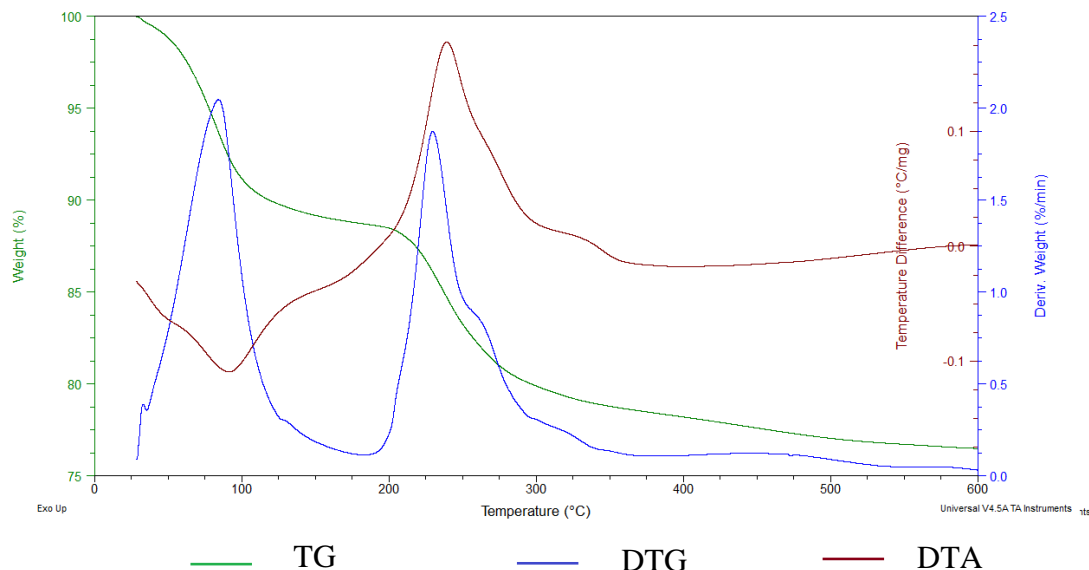
Można zauważyć znaczną różnicę między rozkładami termicznymi polimerów i ich pochodnych w atmosferze azotu i atmosferze powietrza. W atmosferze azotu występują maksymalnie trzy etapy rozkładu, ale większość polimerów w tej atmosferze ulega dwuetapowej degradacji. Uogólniając można jednak stwierdzić, że stabilność termiczna pochodnych polimerów nie uległa dużej zmianie. Temperatury początkowe T_0 (°C) drugich etapów są zbliżone wartościami do tych, w których rozkład był prowadzony w atmosferze powietrza.

Pozostałość w 800°C dla chitozanu w atmosferze azotu wynosi około 28 %. Wartość ta jest znacznie wyższa dla pochodnych chitozanu, takich jak: Cs1-FPBA, Cs2-FPBA i Cs3-FPBA. W przypadku skrobi modyfikowanej kwasami boronowymi pozostałość w 800°C jest prawie czterokrotnie wyższa, w porównaniu ze skrobią niemodyfikowaną, co świadczy o efektywnym procesie termicznego sieciowania. Dowodzi to udziału podstawnika zawierającego kwas boronowy w tym procesie.

25.3. Charakterystyka termiczna nanocząstek magnetycznych pokrywanych natywnymi i modyfikowanymi polimerami w atmosferze powietrza

Stabilność termiczną otrzymanych nanocząstek magnetycznych również zbadano za pomocą analizy termogravimetrycznej (TGA-DTA). Otrzymane wyniki pozwoliły, zarówno na określenie zawartości wody w badanych nanocząstkach magnetycznych, jak i wstępne oszacowanie procentowej zawartości polimeru pokrywającego rdzeń magnetyczny.

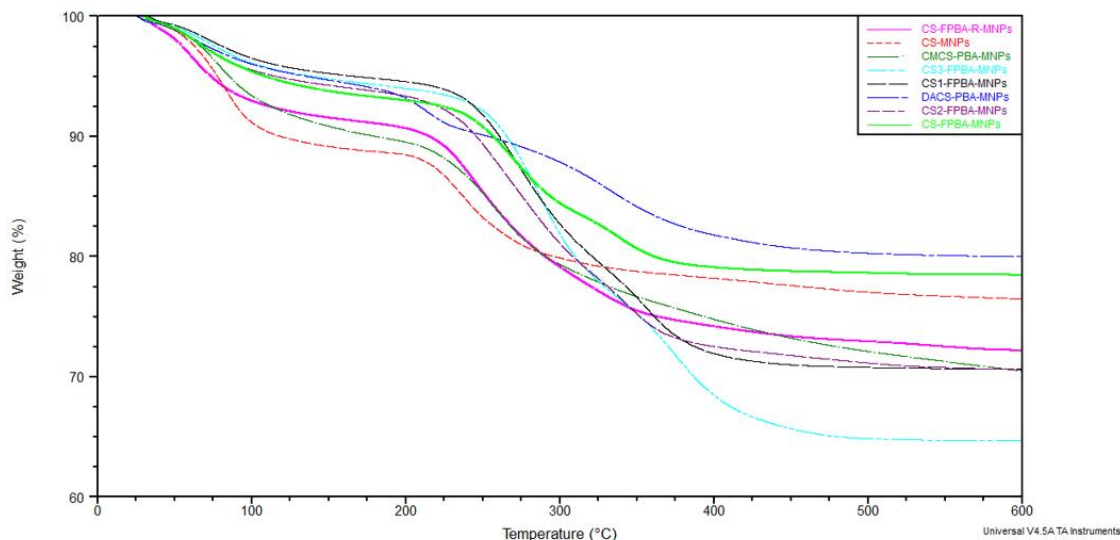
Rozkład termiczny magnetycznych nanocząstek pokrytych chitozanem w atmosferze powietrza następuje w dwóch etapach (Rysunek 142). Pierwszy etap obserwuje się w zakresie temperatur 20-160°C, z $T_{\max} = 84^{\circ}\text{C}$, co odpowiada około 11% ubytkowi masy. Proces ten jest związany z odparowaniem wody zaadsorbowanej przez materiał. Drugi etap zachodzi w zakresie 225-400°C z ubytkiem masy około 12%. Krzywa DTA dla tego typu materiału wykazuje obecność procesu egzo- i endotermicznego. Pierwszy etap rozkładu jest procesem endotermicznym, co może być związane z pękaniem wiązań wodorowych i uwalnianiem wody, natomiast drugi etap to egzotermiczny rozkład utleniający ($T_{\max}=230^{\circ}\text{C}$).



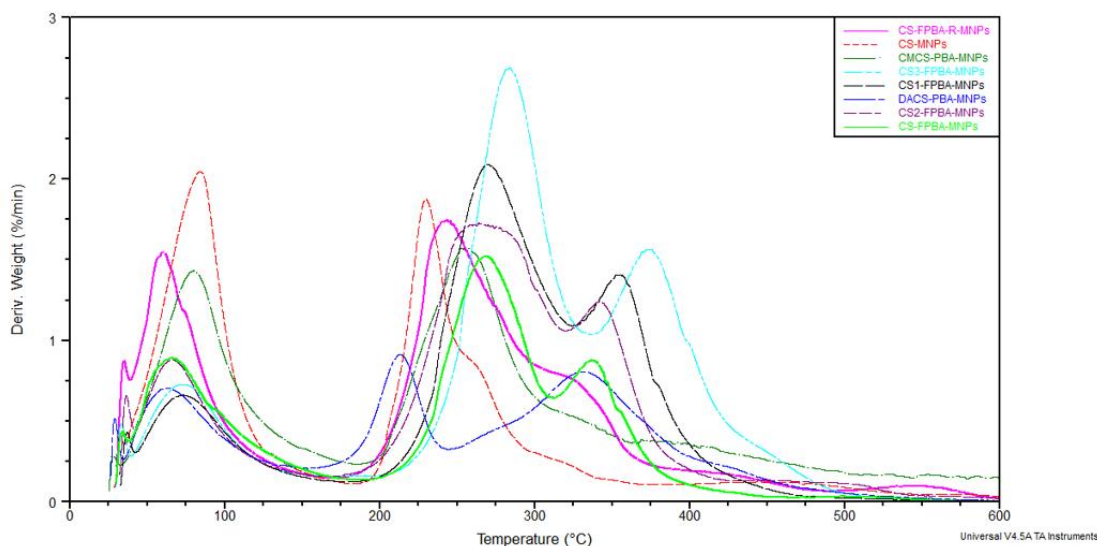
Rysunek 142. Krzywe TGA-DTA nanocząstek magnetycznych pokrytych chitozanem (Cs-MNPs) w atmosferze powietrza

Na Rysunku 143 i Rysunku 144 zostały przedstawione termogramy nanocząstek pokrytych chitozanem i modyfikowanym chitozanem, a w Tabeli 14 parametry termiczne tych

nanocząstek (Cs-MNPs, Cs-4FPBA-MNPs, Cs-4FPBA-R-MNPs, CMCs-PBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs i Cs3-FPBA-MNPs) wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze powietrza.



Rysunek 143. Krzywe TGA : Cs-MNPs, Cs-4FPBA-MNPs, Cs-4FPBA-R-MNPs, CMCs-PBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs i Cs3-FPBA-MNPs w atmosferze powietrza.



Rysunek 144. Krzywe DTG: Cs-MNPs, Cs-4FPBA-MNPs, Cs-4FPBA-R-MNPs, CMCs-PBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs i Cs3-FPBA-MNPs w atmosferze powietrza.

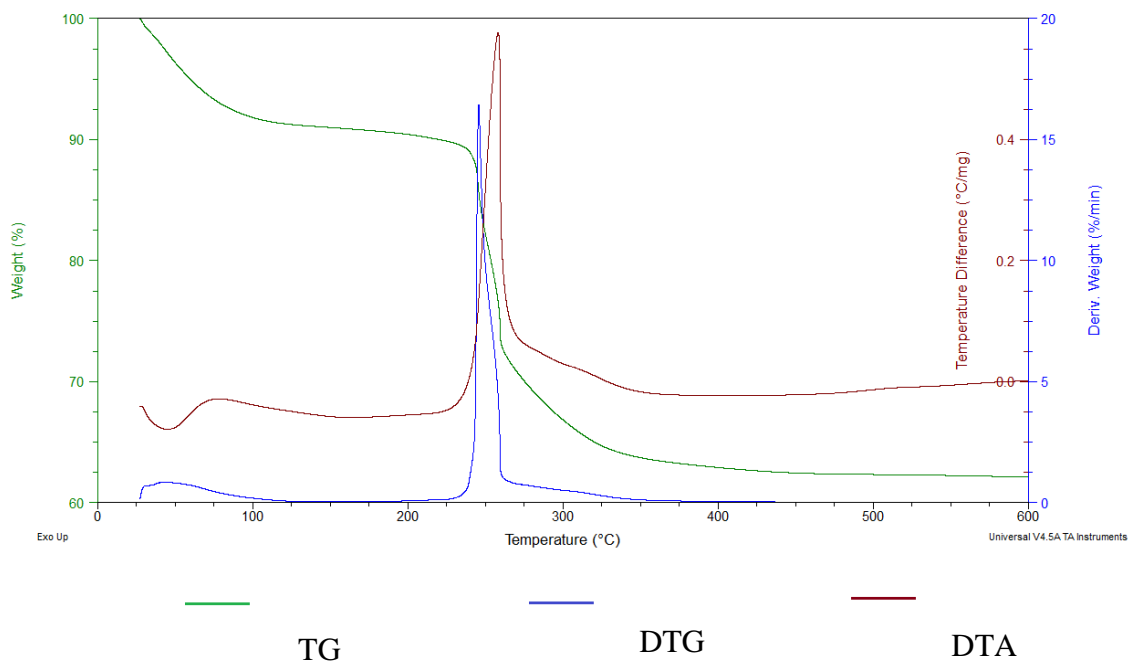
Tabela 14. Parametry termiczne materiałów: Cs-MNPs, Cs-4FPBA-MNPs, Cs-4FPBA-R-MNPs, CMCs-PBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs i Cs3-FPBA-MNPs wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze powietrza.

Material	I etap		II etap			III etap			Pozostałość 600 °C
	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	
Cs-MNPs	84	11	225	230	12				77
Cs-FPBA-MNPs	66	7	241	270	10	313	336	5	78
Cs-FPBA-R-MNPs	60	8	220	243	18	433	552	2	72
CMCs-PBA-MNPs	79	10	229	255	16	400	*	4	70
DACs-PBA-MNPs	62	5	198	215	4	247	332	10	81
Cs1-FPBA - MNPs	73	4	241	270	16	322	353	9	71
Cs2-FPBA - MNPs	65	6	229	264	15	318	341	7	72
Cs3-FPBA-MNPs	74	5	255	282	18	334	374	12	65

* Brak wyraźnego punktu przegięcia na TG i brak maksimum na DTG; masa stopniowo maleje

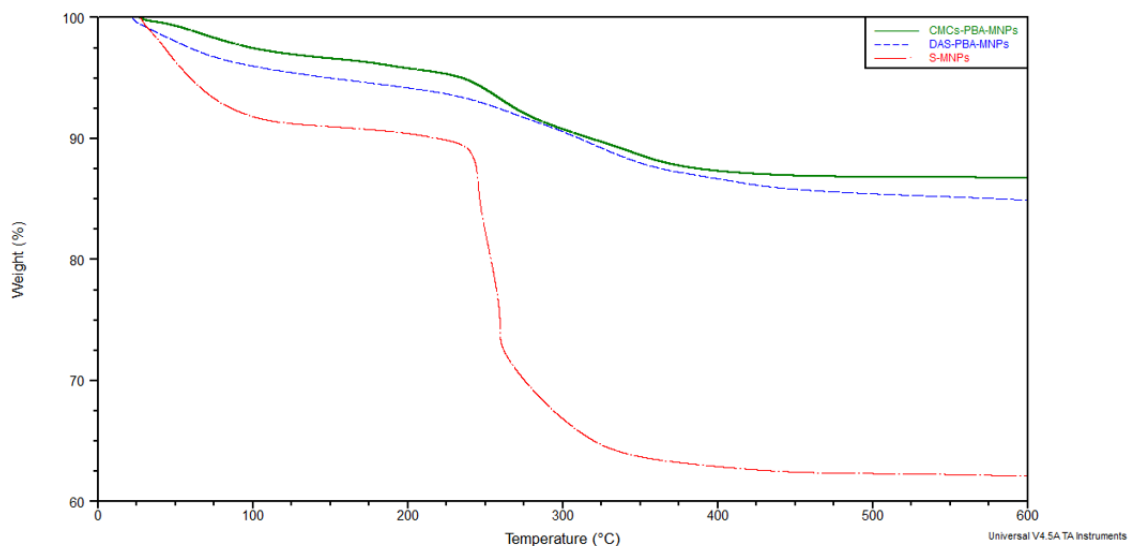
Magnetyczne nanocząstki pokryte modyfikowanym chitozaniem wykazują trój etapowy rozkład termiczny, a ich pozostałość w temperaturze 600°C mieści się w granicy od 65 do 81%. Najmniej stabilnymi układami są nanocząstki pokryte DACs-PBA - ich T_o wynosi 198°C. Z kolei najbardziej stabilne w tej atmosferze są nanocząstki pokryte Cs1-FPBA i Cs-FPBA - ich T_o wynosi 241 °C.

Rozkład termiczny nanocząstek magnetycznych pokrytych skrobią również zachodzi dwuetapowo. Pierwszy etap termicznego rozkładu jest procesem endotermicznym i obserwuje się go w zakresie 20-120°C (T_{max} = 60°C), z około 8% ubytkiem masy. Proces ten jest związany z odparowaniem wody z powierzchni nanocząstek. Drugi etap jest procesem egzotermicznym i zachodzi w zakresie 242-400°C (T_{max} = 257°C), z ubytkiem masy około 30%. Świadczy to o intensywnym utlenianiu połączonym z wydzielaniem małowcząsteczkowych produktów rozkładu.

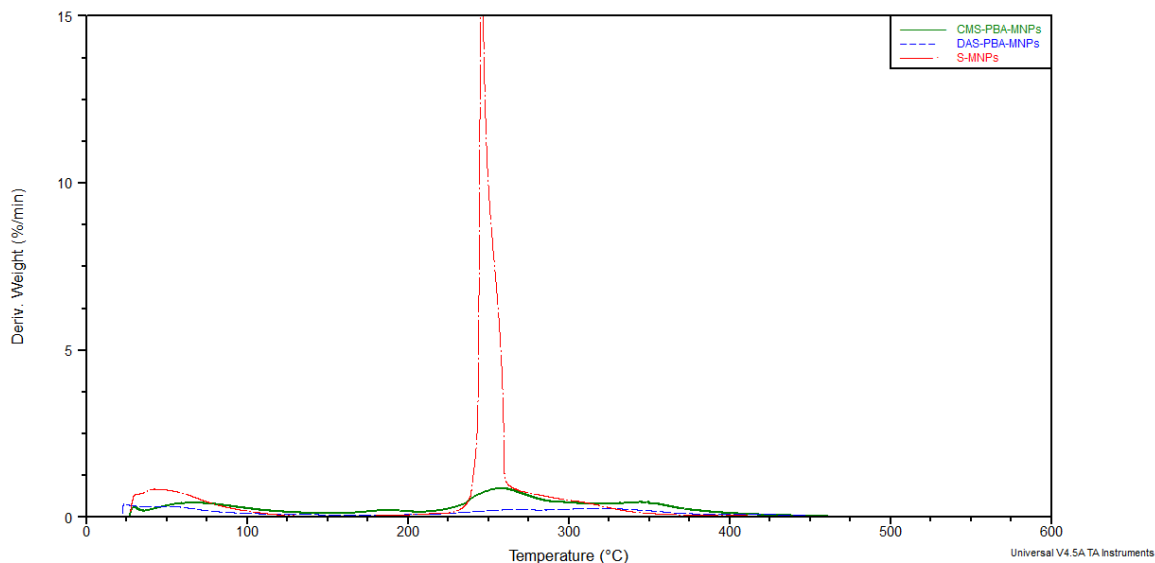


Rysunek 145. Krzywe TGA, DTA, DTG nanocząstek magnetycznych pokrytych skrobią w atmosferze powietrza

Na Rysunku 146 i Rysunku 147 zostały przedstawione termogramy nanocząstek pokrytych skrobią i modyfikowaną skrobią, a w Tabeli 15 parametry termiczne tych nanocząstek (S-MNPs, DA PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs) wyznaczone z krzywych TGA-DTA.



Rysunek 146. Krzywe TGA nanocząstek magnetycznych: S-MNPs, DAS-PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs w atmosferze powietrza.



Rysunek 147. Krzywe DTG nanocząstek magnetycznych: S-MNPs, DAS-PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs w atmosferze powietrza.

Tabela 15. Parametry termiczne nanocząstek: S-MNPs, DAS-PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze powietrza.

Material	I etap		II etap			III etap			IV etap		Pozostałość 600 °C	
	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)		Δm(%)
S-MNPs	50	8	242	257	30							62
DAS-PBA MNPs	50	5	260	296	4	293	319	6				85
CMS-PBA- MNPs	67	5	237	265	1	208	256	5	313	345	3	86

* Brak wyraźnego punktu przegięcia na TG i brak maksimum na DTG; masa stopniowo maleje

W przypadku nanocząstek pokrytych modyfikowaną skrobią można zauważyć, że ich pozostałość w temperaturze 600°C mieści się w granicy około 85%. Jest to znacznie więcej porównując do nanocząstek pokrytych natywnym polimerem, dla których pozostałość w tej temperaturze wynosi około 60%.

Nanocząstki magnetyczne pokryte niemodyfikowaną skrobią wykazują największą szybkość reakcji w porównaniu do nanocząstek pokrytych jej pochodnymi. Porównując ich stabilność, nanocząstki magnetyczne z powłoką DAS-PBA są stabilniejsze od nanocząstek magnetycznych powlekanych niemodyfikowaną skrobią.

Kształt krzywych termogravimetrycznych nanocząstek Fe_3O_4 pokrytych polimerami i ich pochodnymi różni się od krzywych zarejestrowanych dla polimerów badanych indywidualnie. Krzywa TG w układzie z magnezytem pokrytym modyfikowanym polimerem wykazuje trzy-cztery etapy rozkładu termicznego. Zasadnicza różnica spowodowana jest występowaniem większej pozostałości masy na końcu procesu degradacji termicznej (600°C), ze względu na obecność części nieorganicznej (Fe_3O_4). Podobnie, jak w przypadku samych polimerów, również w przypadku nanocząstek magnetycznych pokrytych modyfikowanymi polimerami pierwszy etap rozkładu związany jest z odparowaniem wody zaabsorbowanej na materiale.

Na podstawie różnic w pozostałości węglowej modyfikowanych polimerów i nanocząstek nimi pokrywanych oszacowano procentową zawartość polimeru na nanocząstkach (Tabela 16).

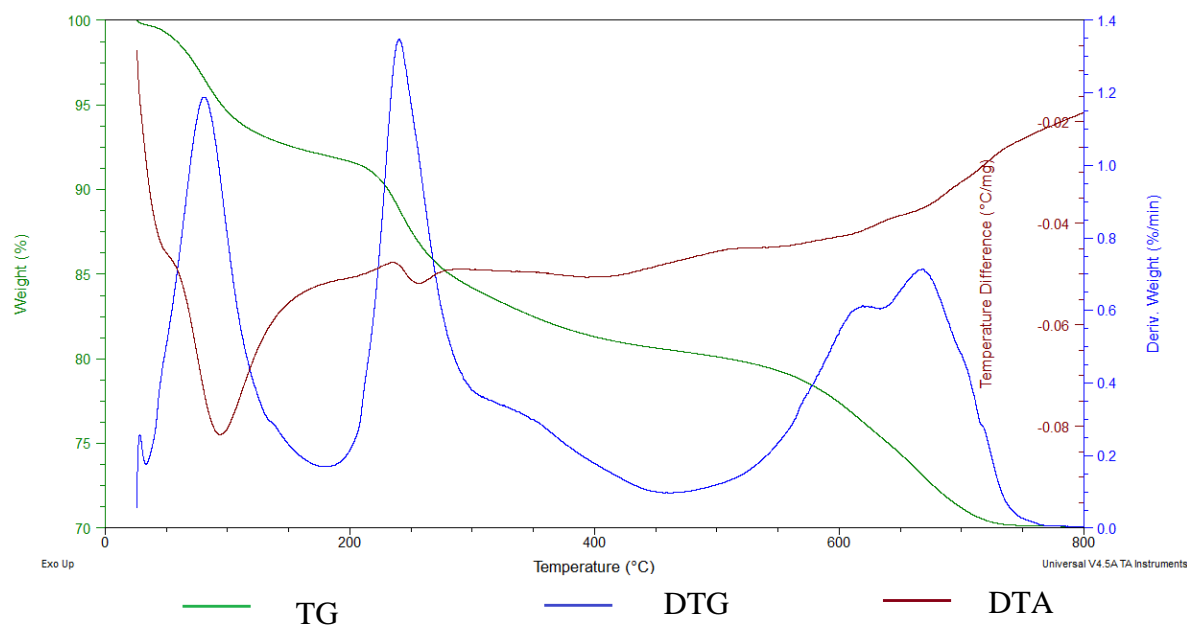
Tabela 16. Oszacowane wartości procentowej zawartości polimeru na nanocząstkach

Material	Procentowa zawartość powłoki polimerowej na nanocząstkach magnetycznych [%]
Cs-MNPs	28
Cs-FPBA-MNPs	39
Cs-FPBA-R-MNPs	54
CMCs-PBA-MNPs	82
DACs-PBA-MNPs	47
Cs1-FPBA -MNPs	54
Cs2-FPBA -MNPs	82
Cs3-FPBA -MNPs	64
S-MNPs	38
DAS-PBA MNPs	53
CMS-PBA-MNPs	38

Jak widać, chemiczna modyfikacja polimeru pokrywającego nanocząstki przyczynia się do wzrostu grubości tej powłoki. Szczególnie duży wzrost procentowej zawartości polimeru na nanocząstkach magnetycznych zaobserwowano w przypadku CMCs-PBA-MNPs i Cs2-FPBA –MNPs.

25.4. Charakterystyka termiczna nanocząstek magnetycznych pokrywanych natywnymi i modyfikowanymi polimerami w atmosferze azotu

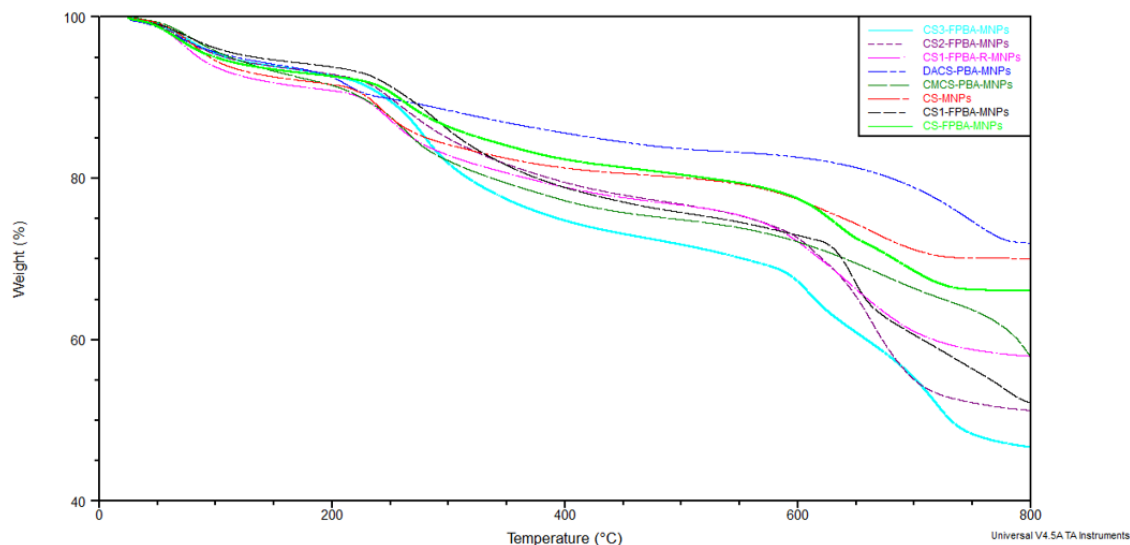
W przeciwieństwie do rozkładu termicznego nanocząstek magnetycznych pokrytych chitozaniem (Cs-MNPs) w atmosferze powietrza, rozkład termiczny tych materiałów w atmosferze azotu przebiega trój etapowo (Rysunek 148). Standardowo, pierwszy etap związany jest z odparowaniem wody i obserwuje się go w zakresie 20-160°C ($T_{max} = 80^{\circ}\text{C}$), co odpowiada około 8 % ubytkowi masy. Drugi etap zachodzi w zakresie temperatur 229-430°C z ubytkiem masy około 11%. Ostatni etap rozkładu Cs-MNPs obserwuje się powyżej 600°C. Ten etap związany jest ze zmianami, zachodzącymi w nieorganicznym rdzeniu. Magnetyt w tej temperaturze ulega przemianom w magnemit (Fe_2O_3) lub niestechiometryczny tlenek żelaza Fe_{1-x}O [159,175,176]. Mimo że, reakcja wydaje się być bardziej prawdopodobna w obecności powietrza (wymagana jest obecność utleniacza), można założyć, że w takim przekształceniu uczestniczą atomy tlenu, dostarczane z produktów rozkładającego się chitozanu.



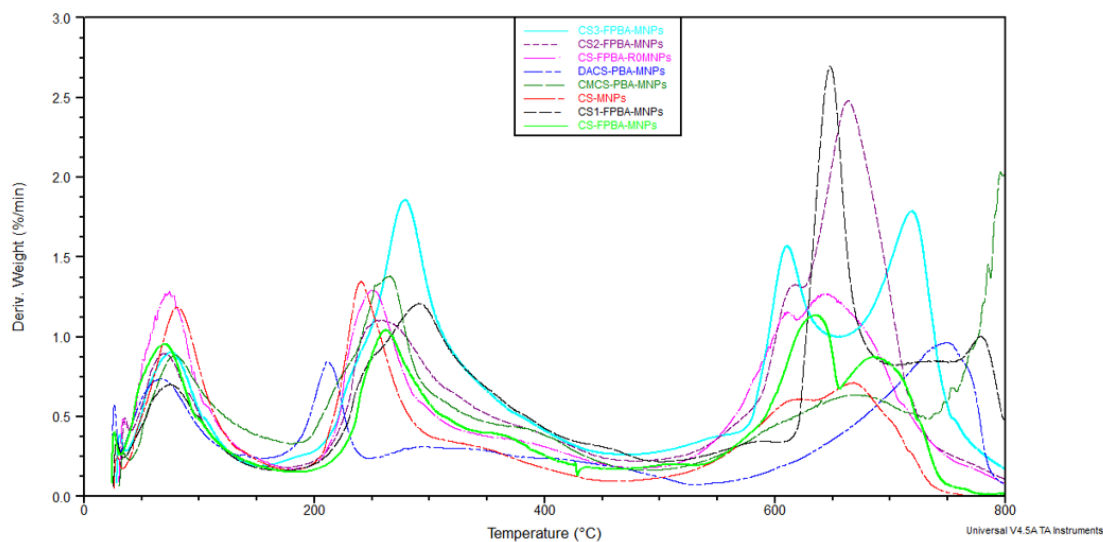
Rysunek 148. Krzywe TGA, DTA, DTG nanocząstek magnetycznych pokrytych chitozaniem w atmosferze azotu

Na Rysunku 149 i Rysunku 150 przedstawiono termogramy nanocząstek pokrytych chitozaniem i modyfikowanym chitozaniem, a w Tabeli 17 parametry termiczne tych nanocząstek (Cs-MNPs, Cs-4FPBA-MNPs, Cs-4FPBA-R-MNPs, CMCs-PBA-MNPs,

DAS-PBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs i Cs3-FPBA-MNPs) wyznaczone z krzywych TGA-DTA uzyskane w wyniku analizy termicznej wykonanej w atmosferze azotu.



Rysunek 149. Krzywe TGA: Cs-MNPs, Cs-FPBA-MNPs, Cs-FPBA-R-MNPs, CMCs-PBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs i Cs3-FPBA-MNPs w atmosferze azotu



Rysunek 150. Krzywe DTG: Cs-MNPs, Cs-FPBA-MNPs, Cs-FPBA-R-MNPs, CMCs-PBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs i Cs3-FPBA-MNPs w atmosferze azotu

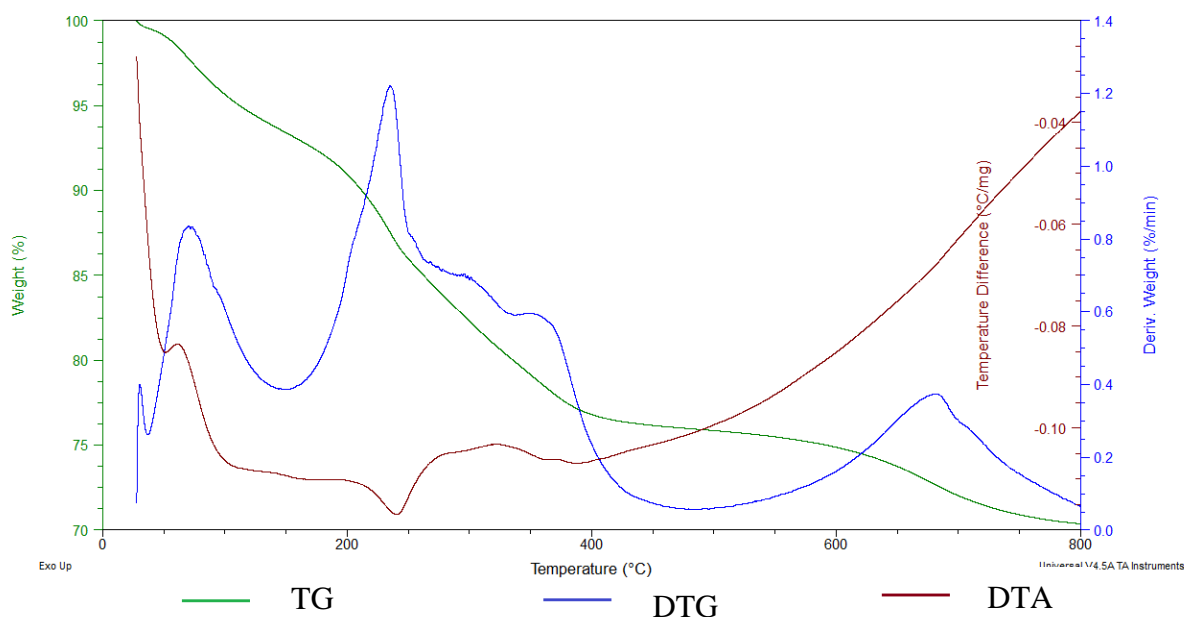
Tabela 17. Parametry termiczne nanocząstek: Cs-MNPs, Cs-FPBA-MNPs, Cs-FPBA-R-MNPs, CMCs-PBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs, Cs3-FPBA-MNPs wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze azotu

Material	I etap		II etap			III etap			IV etap			Pozostałość 800 °C
	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	
Cs-MNPs	80	8	229	239	11	449	665	11				70
Cs-4FPBA-MNPs	70	7	239	263	12	457	637	9	656	686	6	66
Cs-4FPBA-R-MNPs	74	8	226	248	14	442	646	20				58
CMCs-PBA-MNPs	79	8	236	269	16	452	662	11	733	797	9	56
DCs-PBA-MNPs	64	6	205	210	4	248	*	6	535	747	11	73
Cs1-FPBA-MNPs	75	6	242	290	19	491	649	17	725	781	6	52
Cs2-FPBA-MNPs	70	7	230	257	16	464	664	26				51
Cs3-FPBA-MNPs	78	6	243	278	21	442	611	13	655	721	13	47

* Brak wyraźnego punktu przegięcia na TG i brak maksimum na DTG; masa stopniowo maleje

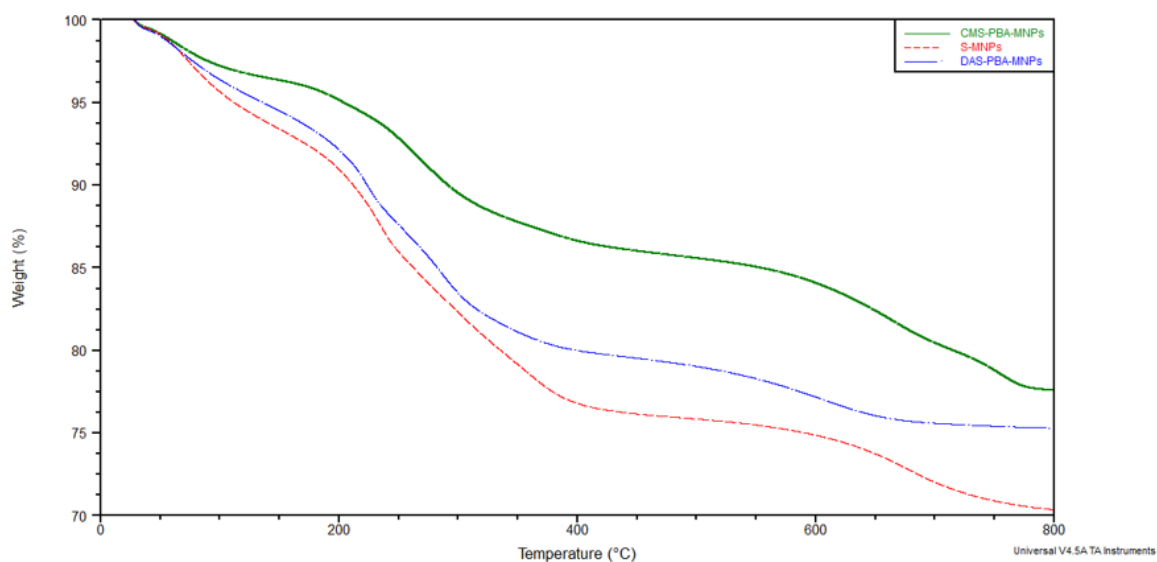
Pokrycie nanocząstek magnetycznych pochodnymi chitozanu wpłynęło na ich stabilność termiczną. W Cs-4FPBA, CMCs-PBA, Cs1-FPBA, Cs2-FPBA, Cs3-FPBA zaobserwowano wzrost stabilności tych materiałów w stosunku do nanocząstek pokrytych chitozaniem wyjściowym.

Podobnie, jak w przypadku nanocząstek magnetycznych pokrytych chitozaniem, dla nanocząstek magnetycznych pokrytych skrobią (S-MNPs) obserwuje się trzyetapowy rozkład termiczny (Rysunek 150). Pierwszy etap zachodzi w zakresie 20-160°C (T_{max}=69°C), co odpowiada około 7% ubytkowi masy. Jest to proces endotermiczny. Drugi etap obserwuje się w zakresie 203-420°C z ubytkiem masy około 17%, natomiast trzeci etap, dla którego T_{max} przypada powyżej 600°, związany jest ze zmianami, zachodzącymi w nieorganicznym rdzeniu.

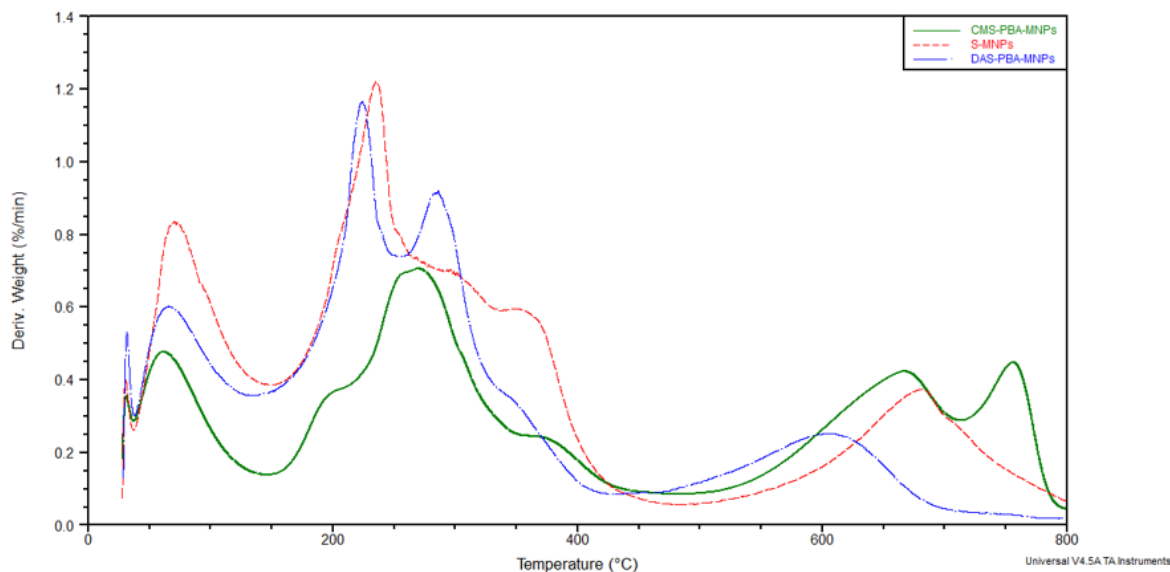


Rysunek 151. Krzywe TGA, DTA i DTG nanocząstek magnetycznych pokrytych skrobią w atmosferze azotu

Na Rysunku 152 i Rysunku 153 zostały przedstawione termogramy nanocząstek pokrytych skrobią i pochodnymi skrobi, a w Tabeli 18 parametry termiczne tych nanocząstek: S-MNPs, DAS-PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze azotu.



Rysunek 152. Krzywe TGA: S-MNPs, DAS-PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs w atmosferze azotu.



Rysunek 153. Krzywe DTG: S-MNPs, DAS-PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs w atmosferze azotu.

Tabela 18. Parametry termiczne materiałów S-MNPs, DAS-PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs wyznaczone z krzywych TGA-DTA w atmosferze azotu

Material	I etap			II etap			III etap			IV etap			Pozostałość 800 °C
	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)	T _o (°C)	T _{max} (°C)	Δm(%)		
S-MNPs	69	7	203	236	17	472	680	5				71	
DAS-PBA-MNPs	66	5	201	223	8	251	284	8	456	604	4	75	
CMS-PBA-MNPs	63	4	223	266	11	472	666	6	712	756	3	76	

* Brak wyraźnego punktu przegięcia na TG i brak maksimum na DTG; masa stopniowo maleje

Nanocząstki magnetyczne pokryte DAS-PBA wykazują podobną stabilność termiczną do nanocząstek magnetycznych pokrytych niemodyfikowaną skrobią. Z kolei nanocząstki CMS-PBA-MNPs, charakteryzują się większą stabilnością niż nanocząstki DAS-PBA MNPs i S-MNPs.

Porównując wyniki analizy termogawimetrycznej w różnych atmosferach można stwierdzić, że rozkład termiczny magnetycznych materiałów w atmosferze azotu zachodzi zazwyczaj w czterech etapach, a w obecności atmosferycznego tlenu rozkład był na ogół trzyetapowy (tylko CMS-PBA-MNPs wykazywały czteroetapowy rozkład). Należy jednak zwrócić uwagę, że T_{max} czwartego etapu rozkładu zachodzi powyżej 600°C, co związane jest jak wcześniej wspomniano, ze zmianami zachodzącymi w nieorganicznym rdzeniu.

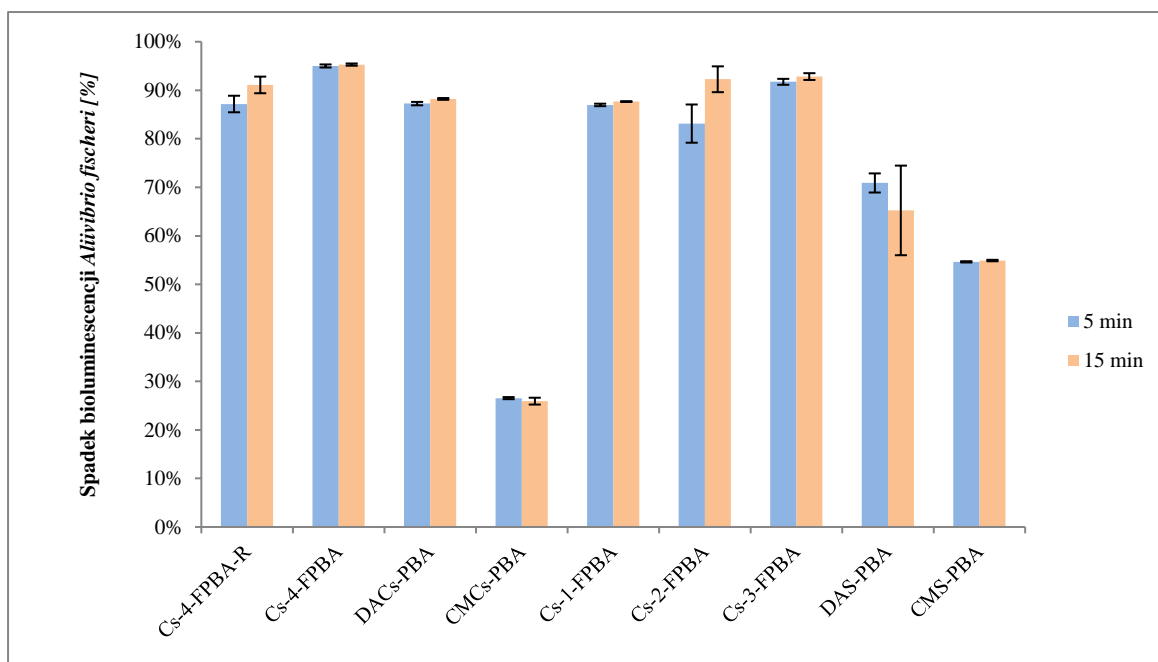
Podsumowując, można zaproponować ogólny przebieg degradacji termicznej badanych układów opierając się na opublikowanych pracach dotyczących chitozanu i skrobi. Podczas rozkładu termicznego nowych, funkcjonalizowanych pochodnych chitozanu i skrobi oraz ich układów z nanocząstkami magnetycznymi należy wziąć pod uwagę następujące reakcje:

- a) w atmosferze gazu obojętnego (N₂) - pękanie łańcucha głównego i destrukcja grup bocznych, sieciowanie skarbonizowanej pozostałości odpornej na rozkład w wysokich temperaturach;
- b) w atmosferze powietrza – dominująca jest reakcja utleniania, prowadząca do powstawania lotnych produktów, zawierających wszystkie pierwiastki tworzące polisacharyd, to jest węgiel, azot, tlen i wodór (występują tu zarówno procesy endotermiczne, jak i egzotermiczne);
- c) w przypadku układów, zawierających magnetyt (w obydwu atmosferach) – oprócz lotnych produktów degradacji typowych dla samych polisacharydów, w pozostałości w temperaturze 800°C występuje też tlenek żelaza.

26. Badania Microtox

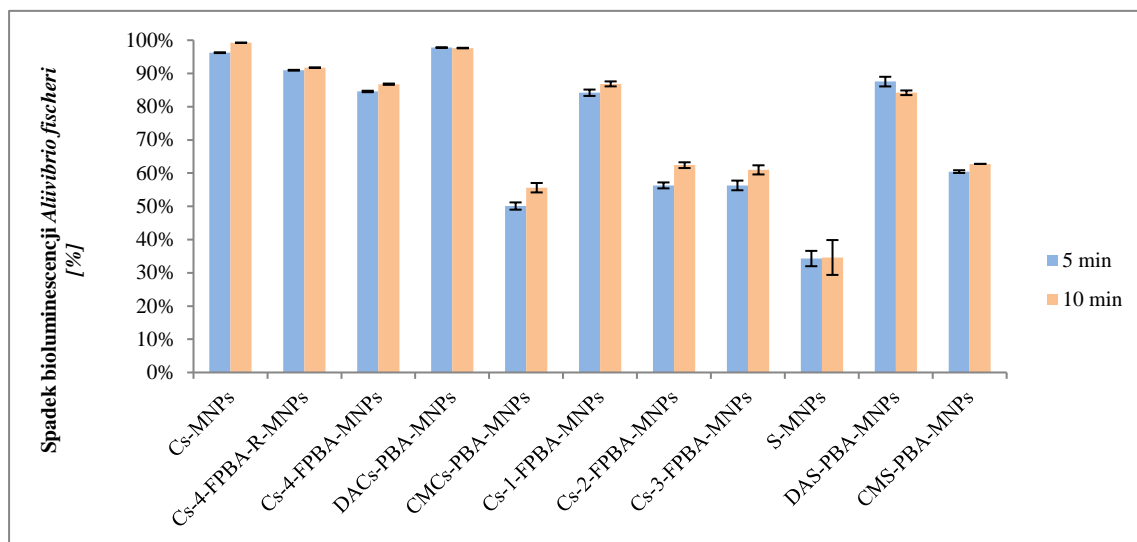
Wyniki badań przeprowadzonych za pomocą testu Microtox dostarczają informacji o toksyczności ostrej wywoływanej przez badaną substancję na bakterie. Test ten polega na podaniu roztworu lub zawiesiny związków chemicznych do hodowli komórek bakterii *Aliivibrio fischeri* (dawniej *Vibrio fischeri*) o popękanych ścianach komórkowych, a następnie pomiarze ich przeżywalności bakterii. Bioluminescencja *Aliivibrio fischeri*, zmniejsza się liniowo po kontakcie z substancją toksyczną [193]. Test Microtox jest stosowany do oceny toksyczności gleb i zanieczyszczeń wód, ale z uwagi na fakt, że mikroorganizmy użyte w tym teście to bakterie Gram-ujemne, może być również użyty do wstępnej oceny cytotoxyczności związków chemicznych, w tym układów biopolimerowych.

Ogólnie przyjętą wartością graniczną obniżenia przeżywalności *Aliivibrio fischeri* jest poziom 20%. Wyniki poniżej tej wartości wskazują na to, że badana próbka jest nietoksyczna. Uzyskanie wartości równej 100% świadczy o tym, że wszystkie komórki bakterii obumarły i nie emitują światła. Może to wynikać z wysokiej toksyczności badanej substancji. W teście tym, standardowo wykonuje się pomiar luminescencji po 5 i 15 minutach od dodania badanej próbki. Zmiany tych wartości są ważne podczas badań mieszanin związków lub próbek środowiskowych i wskazują na to jaki typ substancji wywołuje efekt toksyczny. Jeżeli wartości te są zbliżone lub efekt jest wyższy po 15 minutach – toksyczność związana jest z obecnością związków organicznych. Dla związków nieorganicznych obserwuje się wyższą wartość obniżenia przeżywalności po 5 minutach, która następnie dalej maleje po 15 minutach.



Rysunek 154. Wykres spadku bioluminescencji *Aliivibrio fischeri* [%] dla polimerów

Wszystkie materiały wykazują spadek żywotności bakterii powyżej 20% (Rysunek 154). Można by zatem stwierdzić, że wszystkie materiały posiadają toksyczne właściwości w stosunku do bakterii. Takie wartości wynikają prawdopodobnie z wprowadzonego do struktury tych materiałów ugrupowania dihydroksyborylowego. Istnieje wiele prac [196-198], które potwierdzają właściwości przeciwbakteryjne kwasów boronowych. Według danych literaturowych, sam niemodyfikowany chitozan wykazuje spadek żywotności komórek bakteryjnych na poziomie 61% [194]. Tak duży spadek żywotności komórek w przypadku CS (61%) należy powiązać również z jego właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi wywieranymi na bakterie *A. fischeri* używanymi w teście, ponieważ, jak wiadomo, jest on nietoksyczny dla człowieka [195]. Wysokie wartości spadku luminescencji bakteryjnej modyfikowanych pochodnych chitozanu mogą wynikać częściowo z właściwości przeciwdrobnoustrojowych samego chitozanu i obecności grup dihydroksyborylowych, co predestynuje te materiały jako materiały o właściwościach bakteriobójczych



Rysunek 155. Wykres spadku bioluminescencji *Aliivibrio fischeri* [%] w nanocząstkach magnetycznych pokrytych polimerami

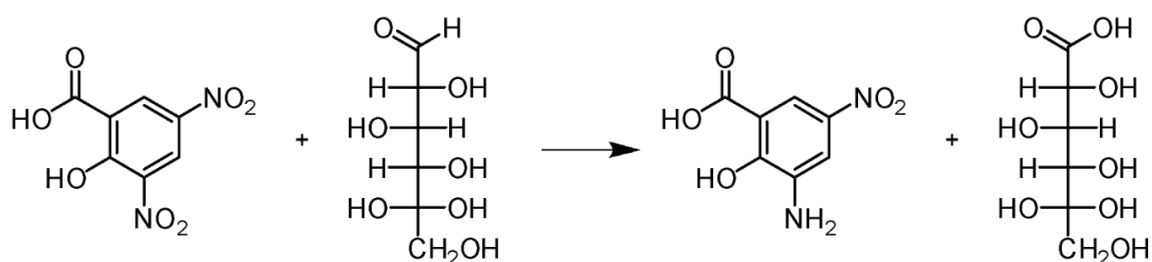
Toksyczność materiałów magnetycznych pokrytych modyfikowanymi polimerami różni się nieznacznie od samych polimerów. Najmniejszy spadek żywotności bakterii można zaobserwować dla CMCs-PBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs.

W próbkach Cs-4-FPBA-R-MNPs, DAS-PBA-MNPs, CMCs-PBA-MNPs, DAS-PBA-MNPs i CMS-PBA-MNPs zaobserwowano niewielki wzrost toksyczności, porównując do samych polimerów bez rdzenia magnetycznego. Z kolei, w Cs-4-FPBA-MNPs, Cs1-FPBA-MNPs, Cs2-FPBA-MNPs i Cs3-FPBA-MNPs zaobserwowano spadek toksyczności, porównując do samych polimerów. Nie można zatem jednoznacznie określić wpływu obecności magnezytu na toksyczność materiałów.

Do zastosowań praktycznych w medycynie poszukiwane są materiały o właściwościach bakteriostatycznych lub bakteriobójczych, ponieważ ułatwiają zachowanie sterylnych warunków bez konieczności stosowania dodatkowych środków dezynfekujących. Z badań za pomocą Microtox wynika, że wszystkie modyfikowane polisacharydy mają takie właściwości, co otwiera nowe możliwości ich zastosowania w aplikacjach biomedycznych.

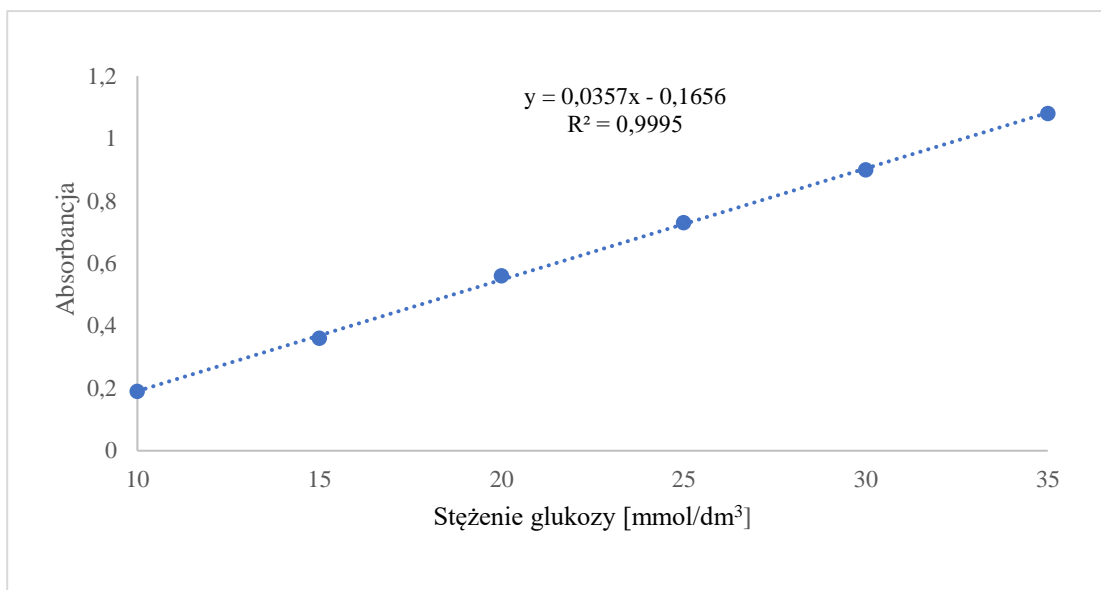
27. Wstępna ocena zdolności materiałów do wiązania cukrów

Metoda DNS, opiera się na wykrywaniu obecności wolnej grupy karbonylowej C=O cukrów redukujących. Podczas reakcji następuje utlenianie aldehydowej grupy funkcyjnej glukozy do grupy karboksylowej przez kwas 3,5-dinitrosalicylowy (kolor żółty), z utworzeniem kwasu 3-amino-5-nitrosalicylowego (pomarańczowo-czerwony) w środowisku obojętnym lub alkalicznym (Rysunek 156). W ramach poniższego testu, pomiar wykonano metodą spektrofotometryczną, mierząc absorbancję przy $\lambda=540$ nm, odpowiadającą kwasowi 3-amino-5-nitrosalicylowemu [188].

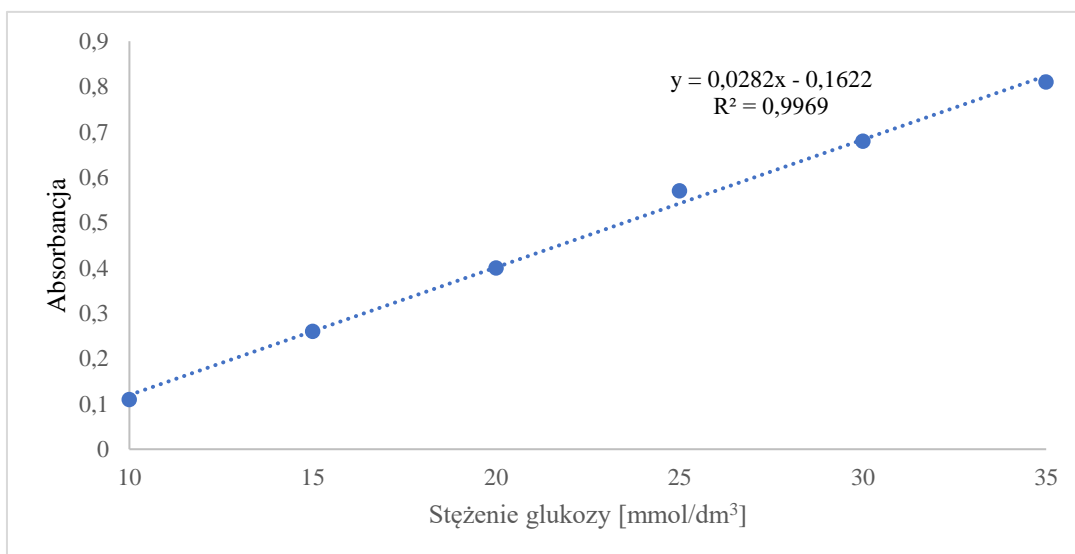


Rysunek 156. Konwersja glukozy do kwasu glukuronowego przez DNS

Do badań, jako związek modelowy wykorzystano glukozę, ze względu na jej cenę i dostępność. Zdolność wiązania glukozy przez badane polimery miała na celu wstępną ocenę przydatności tych materiałów do wiązania części cukrowych występujących w glikoproteinach. Ponadto, określono wpływ pH środowiska na ilość wiązanej glukozy. Tak jak wspomniano wcześniej, wykonano dwie krzywe wzorcowe glukozy: w buforze fosforanowym o pH 7,4 (50 mM) i w buforze wodorowęglanowym o pH 9,0 (50 mM) (Rysunek 157 i 158). Zależności te wykorzystano do odczytu stężenia glukozy w roztworze po związaniu przez badane materiały polimerowe, na podstawie zmierzonej absorbancji przy 540 nm.

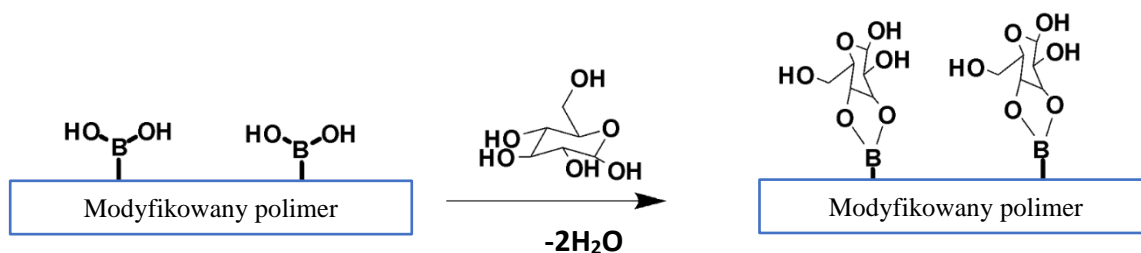


Rysunek 157. Krzywa wzorcową glukozy w buforze fosforanowym o pH 7,4 (50 mM) uzyskana metodą spektrofotometryczną (pomiar absorbancji przy $\lambda=540$ nm)



Rysunek 158. Krzywa wzorcową glukozy w buforze wodorowęglanowym o pH 9,0 (50 mM) uzyskana metodą spektrofotometryczną (pomiar absorbancji przy $\lambda = 540$ nm)

Następnie, wyznaczono ilość związanej glukozy przez otrzymane polimery z wolnymi grupami dihydroksyborylowymi. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 19.



Rysunek 159. Schematyczna ilustracja, przedstawiająca wiązanie glukozy przez modyfikowane polimery

Tabela 19. Ilość związanej glukozy przez modyfikowane polimery w dwóch różnych środowiskach

Polimer	Ilość związanej glukozy przez polimer	
	Bufor fosforanowy	Bufor wodorowęglanowy
	pH 7.4 (50 mM) [mg/g]	pH 9.0 (50 mM) [mg/g]
Cs-FPBA	42,36±1,05	51,7±1,95
Cs-FPBA-R	55,04 ± 1,20	67,20±1,80
CMCs-PBA	139,00±2,01	158±2,32
DACs-PBA	32,30±1,51	45,00±1,80
Cs1-FPBA	107,02±1,72	123,94±1,84
Cs2-FPBA	90,10±1,31	107,84±1,42
Cs3-FPBA	102,34±1,25	122,28±1,41
DAS-PBA	30,25±1,02	42,55±1,10
CMS-PBA	186,20±2,05	208,00±2,37

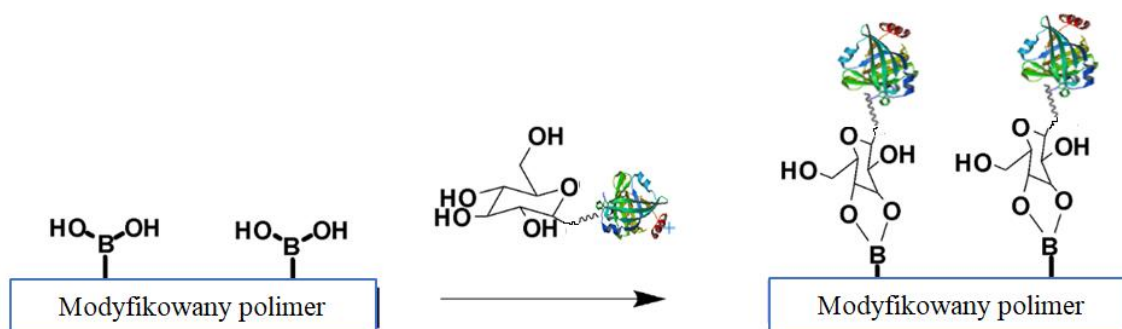
Można zauważyć, że dla wszystkich polimerów ilość związanej glukozy w buforze wodorowęglanowym jest znacznie większa od ilości glukozy związanej w buforze fosforanowym. Można to wytłumaczyć tym, że kwas boronowy służy do wychwytywania ugrupowania 1,2- i 1,3-diolowego glikopeptydów, poprzez utworzenie wiązania kowalencyjnego i tworzenie cyklicznego estru kwasu boronowego, co jest preferowane

przy wyższych wartościach pH [70]. Materiał, który najefektywniej wiązał glukozę, to modyfikowana skrobia CMS-PBA. Ilości związanej glukozy dla tego polimeru wynosiły około 186 mg/g w buforze fosforanowym i 208 mg/g, w buforze wodorowęglanowym. Kolejnym polimerem, który wykazywał największą zdolność do wiązania glukozy, był CMCs-PBA. Warto zwrócić uwagę, że oba polimery mają zbliżoną strukturę. Rdzeniem struktury jest karboksymetyloskrobia (CMS) i karboksymetylochitozan (CMCs), które były modyfikowane kwasem 3-aminofenyloboronowym. Polimery DAS-PBA i DACs-PBA otrzymane na bazie struktur dialdehydowych struktur wiązały najmniejszą ilość glukozy. Może to wynikać z zawady przestrzennej, która pojawia się w tych makrocząsteczkach. Oba wcześniej wspomniane materiały wykazują również najmniej hydrofobowy charakter, co powinno teoretycznie prowadzić do wykazywania większego powinowactwa tych polimerów do glukozy. Być może, grupy dihydroksyborylowe w tych materiałach zostały zaangażowane w oddziaływania międzymolekularne pomiędzy łańcuchami polimerów, co utrudniło dostęp cukru do miejsc wiązania. Stosunkowo duża ilość glukozy była również wiązana przez Cs1-FPBA, Cs2-FPBA i Cs3-FPBA. Najprawdopodobniej wynika to z tego, że w tych polimerach zostały wprowadzone największe ilości grup dihydroksyborylowych, które powinny być od siebie oddalone i nie tworzyć zawady przestrzennej. Można zauważyć różnicę w ilości związanej glukozy przez materiały Cs-FPBA i Cs-FPBA-R. Korzystniej na ilość związanej glukozy wpływa wiązanie kwasu boronowego przez aminę, czyli po redukcji.

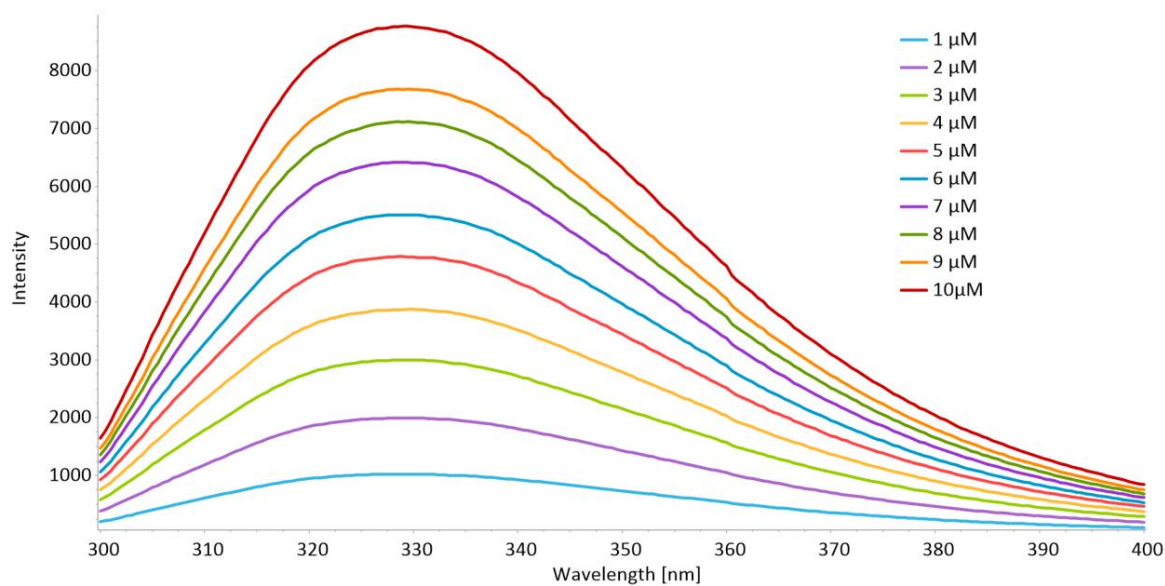
Niestety nie udało się określić ilości wolnych grup dihydroksyborylowych na powierzchni otrzymanych materiałów. Zgodnie z danymi literaturowymi, kwasy boronowe mogą ulegać międzycząsteczkowemu sieciowaniu [186], niemniej jednak wszystkie syntetyzowane polimery wykazywały zdolność do wiązania glukozy. Na podstawie uzyskanych wyników można było stwierdzić, że wszystkie otrzymane materiały będą posiadały zdolność do wiązania części cukrowej glikoproteiny, co jest zaletą w przypadku przewidywanych zastosowań. Ponadto, jako warunki sprzyjające wybrano środowisko alkaliczne.

28. Ocena zdolności materiałów do wiązania glikoproteiny

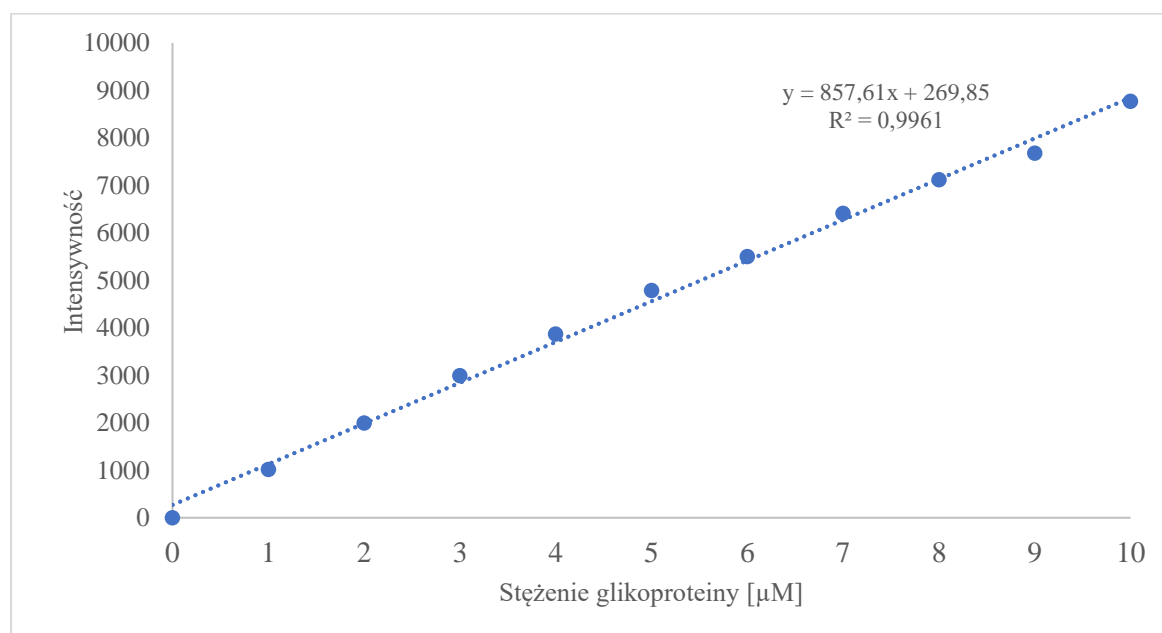
Z uwagi na to, że wszystkie otrzymane materiały wykazywały w mniejszym, bądź większym stopniu powinowactwo do glukozy, w kolejnym etapie zbadano zdolność wyżej wymienionych polimerów do wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny. Schemat reakcji przedstawiono na Rysunku 160. Pomiar wykonano metodą spektroskopii emisyjnej mierząc fluorescencję roztworów glikoproteiny w zakresie 300-400 nm (Rysunek 161 i 163). Oceniono również wpływ pH środowiska na ilość związanej glikoproteiny, wykonując pomiary w buforze fosforanowym o pH 7,4 (50 mM) i w buforze wodorowęglanowym o pH 9,0 (50 mM). W tym przypadku również wykonano dwie krzywe wzorcowe obu buforach (Rysunek 162 i 164). Jak można zauważyć na widmach przesunięcie maksimum na krzywej i jej kształt jest taki sam dla obu buforów. Można zatem stwierdzić, że zmiana pH w tym zakresie nie wpłynęła na zmiany strukturalne w AGP.



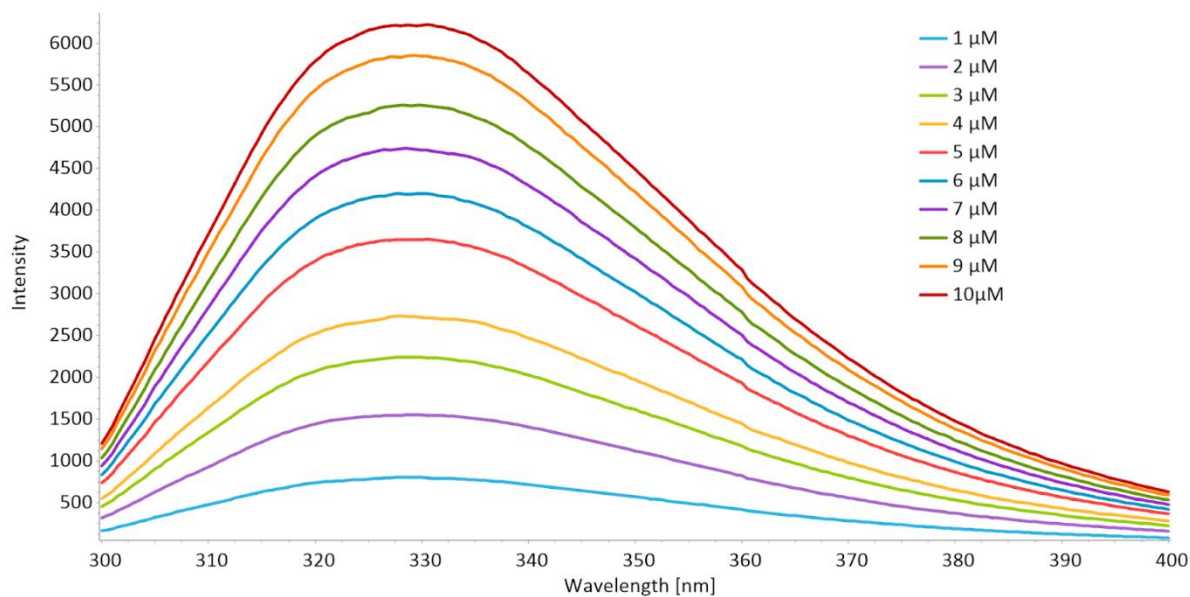
Rysunek 160. Schematyczna ilustracja przedstawiająca wiązanie glikoproteiny przez modyfikowane polimery



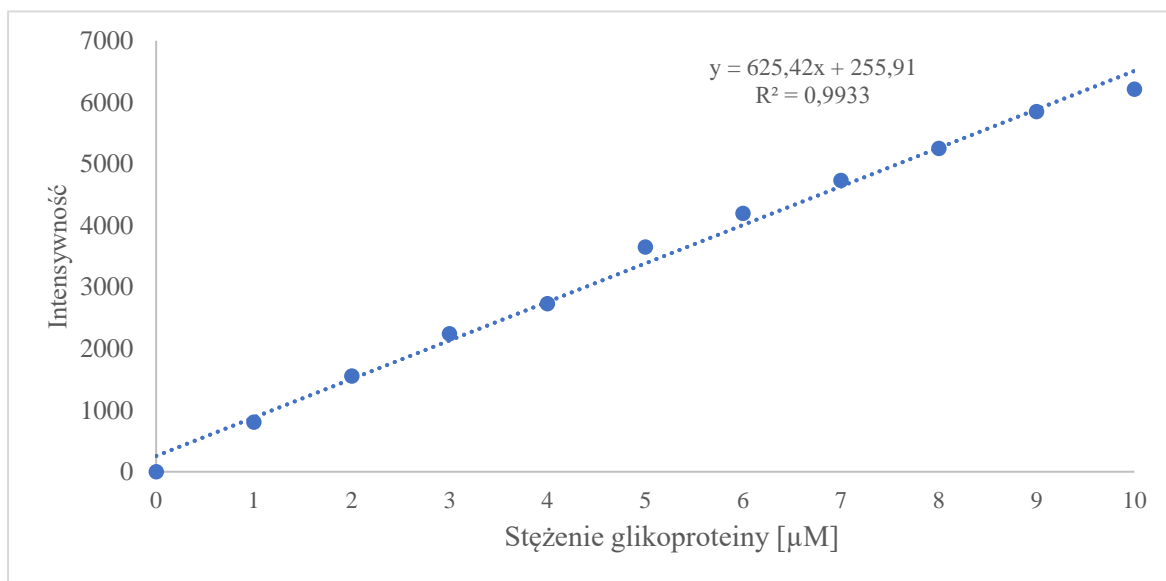
Rysunek 161. Widma emisyjne α -1- kwaśnej glikoproteiny w buforze fosforanowym pH 7,4 (50 mM)



Rysunek 162. Krzywa wzorcowa α -1- kwaśnej glikoproteiny w buforze fosforanowym pH 7,4 (50 mM) wyznaczona metodą fluorescencyjną



Rysunek 163. Widma emisyjne α -1- kwaśnej glikoproteiny w buforze wodorowęglanowym o pH 9,0 (50 mM)



Rysunek 164. Krzywa wzorcowa α -1- kwaśnej glikoproteiny w buforze wodorowęglanowym o pH 9,0 (50 mM) wyznaczona metodą fluorescencyjną

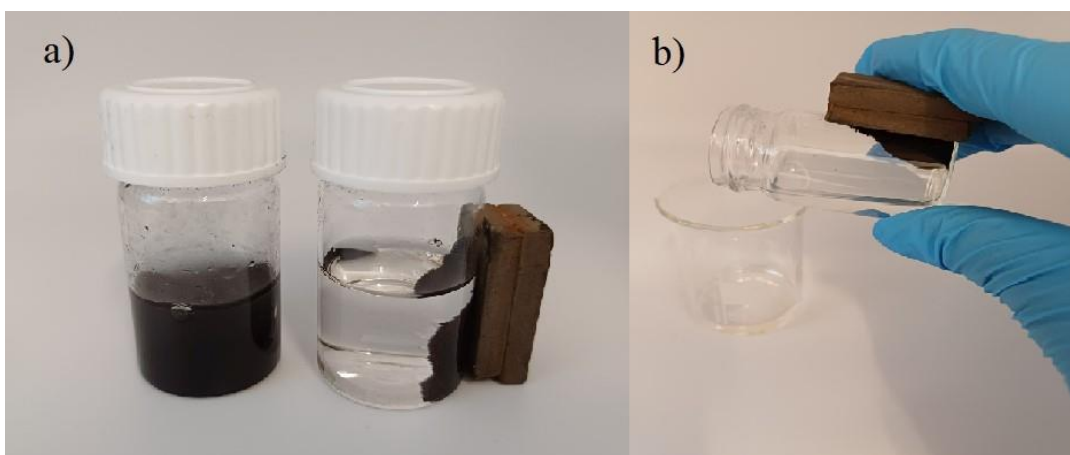
Otrzymane wyniki ilości związanej glikoproteiny przez modyfikowane polimery przedstawiono w Tabeli 20.

Tabela 20. Ilość związanej glikoproteiny przez modyfikowane polimery

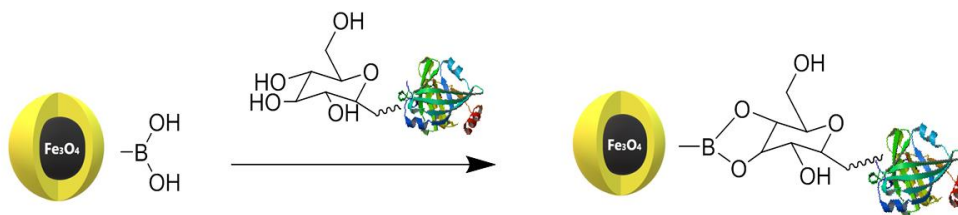
Polimer	Ilość związanej α -1- kwaśnej glikoproteiny	
	przez polimer	
	Bufor fosforanowy pH 7.4 (50 mM) [mg/g]	Bufor wodorowęglanowy pH 9.0 (50 mM) [mg/g]
Cs-FPBA	25,70±0,55	34,00±0,87
Cs-FPBA-R	28,82±0,62	36,23±0,75
CMCs-PBA	35,53±0,29	42,84±0,28
DCS-PBA	15,66±0,35	23,34±0,45
Cs1-FPBA	32,38±0,85	38,24±0,68
Cs2-FPBA	30,20±0,64	36,9±0,71
Cs3-FPBA	32,53±0,71	38,64±0,63
DAS-PBA	19,08±0,57	25,40±0,42
CMS-PBA	38,98±0,42	46,20±0,38

Podobnie, jak w przypadku wiązania glukozy przez polimery, na ilość związanej glikoproteiny w znaczący sposób wpływa pH środowiska. W buforze wodorowęglanowym o pH 9,0, otrzymane polimery wiązały większe ilości glikoproteiny, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi, i jak już wspomniałam, wynika to z charakteru grup dihydroksyborylowych. [146-154]. Największa ilość białka została związana na powierzchni CMS-PBA oraz CMCs-PBA, co również obserwowano w badaniach wiązania glukozy. Wartości związanej glikoproteiny przez CMS-PBA wynosiły 38,98 mg/g oraz 46,20 mg/g, a przez CMCs-PBA 35,53 mg/g i 42,84 mg/g odpowiednio przy pH 7,4 i 9,0. Porównywalne ilości białka zostały związane przez Cs1-FPBA, Cs2-FPBA i Cs3-FPBA. Najmniejsza ilość glikoproteiny została związana na powierzchni DCS-PBA (15,66 mg/g i 23,34 mg/g odpowiednio dla pH 7,4 i 9,0).

Badanie oddziaływania modyfikowanych polimerów z glukozą a następnie z glikoproteiną było dość skomplikowane, ze względu na trudności w oddzieleniu glukozy/białka od supernatantu. Ze względu na długi proces sedymentacji, aby zachować we wszystkich próbach jednakowy czas pomiaru, używano mikrofiltrów strzykawkowych. Zupełnie inaczej wyglądało to w przypadku badania oddziaływania z magnetycznymi nanocząstkami pokrytymi modyfikowanymi polimerami. Proces ten był znacznie szybszy i łatwiejszy. Oddzielenie nośnika ze związaną glikoproteiną od supernatantu następowało przez przyłożenie magnesu, a następnie zdekantowanie supernatantu znad powierzchni nanocząstek skupionych przy magnesie (Rysunek 165 i 166).



Rysunek 165. a) Próbką bez i z przyłożonym zewnętrznym polem magnetycznym, b) sedymentacja supernatantu znad próbki



Rysunek 166. Schematyczna ilustracja przedstawiająca wiązanie glikoproteiny przez nanocząstki magnetyczne pokryte modyfikowanymi polimerami

Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 21.

Tabela 21. Ilość związanej glikoproteiny przez nanocząstki

Rodzaj nanocząstek	Ilość związanej α -1- kwaśnej glikoproteiny	
	przez nanocząstki	
	Bufor fosforanowy pH 7.4 (50 mM) [mg/g]	Bufor wodorowęglanowy pH 9.0 (50 mM) [mg/g]
Cs-4FPBA-MNPs	12,75±0,25	14,35±0,21
Cs-4FPBA-R-MNPs	13,56±0,15	16,20±0,17
CMCs-PBA-MNPs	16,70±0,14	20,44±0,19
DCS-PBA-MNPs	7,22±0,09	10,49±0,10
Cs1-FPBA-MNPs	13,90±0,11	14,90±0,25
Cs2-FPBA-MNPs	10,79±0,15	11,96±0,21
Cs3-FPBA-MNPs	12,77±0,35	13,99±0,41
DAS-PBA-MNPs	7,50±0,10	10,89±0,21
CMS-PBA-MNPs	18,29±0,18	21,30±0,19

Materiały magnetyczne pokryte polimerami z grupami dihydroksyborylowymi również wykazują zdolność do wiązania glikoprotein. Na ilość związanej glikoproteiny przez magnetyczne nanocząstki również ma wpływ pH środowiska oraz rodzaj polimeru pokrywającego materiał. Największa ilość białka została związana przez CMS-PBA-MNPs w pH 9,0 (21,30 mg/g).

Ilości związanej glikoproteiny przez magnetyczne nanocząstki pokryte modyfikowanymi polimerami są mniejsze od ilości związanej glikoproteiny przez sam modyfikowany materiał. Wynika to z tego, że w wiązaniu glikoprotein biorą udział grupy dihydroksyborylowe obecne w strukturze otrzymanych polimerów, a na powierzchni nanocząstek powłoka polimerów stanowi jedynie procentowy udział w masie nanocząstki. W Tabeli 16 przedstawiono oszacowane na podstawie wyników analizy termogravimetrycznej w atmosferze powietrza, wartości procentowej zawartości polimeru na nanocząstce. Sam magnetyt, który stanowi pewien procent materiału użytego

do wiązania glikoprotein, nie bierze udziału w ich wiązaniu, stąd prawdopodobnie takie różnice w ilości związanego białka. Niemniej jednak praca z nanocząstkami magnetycznymi pokrytymi polimerami z kwasami boronowymi była nieporównywalnie dużo prostsza i szybsza ze względu na łatwe oddzielenie nośnika od supernatantu za pomocą magnesu, co potwierdziło zasadność podjętego tematu.

29. Podsumowanie i wnioski

Otrzymano dziewięć rodzajów materiałów polisacharydowych, zawierających ugrupowanie kwasu boronowego: siedem z nich to materiały nowe, nie opisane do tej poru w literaturze, natomiast pozostałe dwa (Cs-4FPBA i Cs-4FPBA-R) zostały opublikowane przez inne zespoły w trakcie realizacji moich badań.

Pozytywny przebieg zaplanowanych reakcji potwierdzono za pomocą spektroskopii NMR i ATR-FTIR (struktura, obecność grup funkcyjnych).

Materiały po modyfikacji charakteryzowały się odmienną morfologią w porównaniu z polisacharydami wyjściowymi co zaobserwowano na zdjęciach SEM.

Funkcjonalizacja materiałów kwasami boronowymi poskutkowała zmianą charakteru hydrofobowo-hydrofilowego powierzchni materiałów. Otwarcie pierścienia glikozydowego i dalsza modyfikacja kwasem boronowym zwiększyły hydrofilowość materiałów, przy czym większe różnice wykazuje materiał chitozanowy. W przypadku pozostałych materiałów trudno zauważyć regularność.

Otrzymane polimery scharakteryzowano pod kątem ich właściwości termicznych. Modyfikowane materiały nie wykazywały znaczących różnic w porównaniu z polisacharydami wyjściowymi. Można jednak zauważyć, że otwarcie pierścienia glikozydowego poskutkowało obniżeniem temperatury początkowego rozkładu polimerów opartych zarówno na chitozanie, jak i skrobi. Niemniej jednak największą zmianę zaobserwowano dla CMCs-PBA (obniżenie temperatury początkowego rozkładu o około 50°C).

Otrzymano dziewięć rodzajów nowych, nieopisanych w literaturze nanocząstek magnetycznych, których rdzeń stanowił magnetyt, pokrywanych syntetyzowanymi wcześniej materiałami zawierającymi ugrupowanie kwasu boronowego.

Podobnie, jak w przypadku materiałów polisacharydowych, skuteczność syntezy potwierdzono za pomocą spektroskopii ATR-FTIR. Kształt i rozmiar otrzymanych nanocząstek magnetycznych określono za pomocą technik SEM, TEM oraz DLS. Ich

rozmiary nie przekraczały 50 nm. Wyniki analizy XRD potwierdziły, że rdzeń nanocząstek magnetycznych stanowi czysty magnetyt.

Stwierdzono, że rodzaj powłoki wpływa na średnią wielkość nanocząstek magnetycznych. Spośród wszystkich badanych materiałów, nanocząstki pokryte Cs3-FPBA charakteryzują się największym rozmiarem (50 nm), co związane jest z trzema długimi podstawnikami bocznymi w chitozanie. Natomiast nanocząstki pokryte Cs-FPBA (bez dużych podstawników w polimerze powłokowym), wykazują najmniejszy średni rozmiar (26 nm).

Otrzymane nanocząstki scharakteryzowano pod względem ich stabilności termicznej. Na podstawie różnic w pozostałości węglowej modyfikowanych polimerów i nanocząstek nimi pokrywanych oszacowano procentową zawartość polimeru na nanocząstkach. Największą procentową zawartością polimeru charakteryzowały się nanocząstki CMCs-PBA-MNPs. Niemniej jednak, wszystkie otrzymane nanomateriały charakteryzują się dobrą stabilnością termiczną.

Wszystkie otrzymane polimery wykazują zdolność do wiązania glukozy, co potwierdzono metodą DNS. Największą zdolność do wiązania glukozy wykazuje CMS-PBA i CMCc-PBA. Z kolei polimery na bazie dialdehydowej skrobi i dialdehydowego chitozanu funkcjonalizowane kwasem 3-aminofenyloboronowym wiązały najmniejszą ilość węglowodanu.

Dla wszystkich otrzymanych nanocząstek magnetycznych, zbadano zdolność do wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny. Ilość związanej AGP oznaczono mierząc początkowe i końcowe stężenie białka w supernatancie.

Największa zdolność do wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny wykazują materiały polimerowe na bazie polisacharydu karboksymetylowanego: CMS-PBA i CMCs-PBA. Zależność ta jest analogiczna w przypadku otrzymanych nanocząstek magnetycznych. Można to wytłumaczyć różnicą w wartościach pola powierzchni właściwej, które wynoszą odpowiednio 91 i 36 m²/g. Same powłoki polimerowe CMS-PBA i CMCs-PBA również wiązały największe ilości glukozy i glikoproteiny.

Na ilość związanej glukozy oraz glikoproteiny przez modyfikowane polisacharydy ma wpływ pH środowiska.

Wszystkie otrzymane materiały przekazano do badań wstępnej oceny ich aktywności w teście Microtox. Wykonane badania Microtox potwierdzają, że wszystkie materiały polimerowe i pokrywane nimi magnetyczne nanocząstki wykazują spadek żywotności *Aliivibrio fischer* powyżej 20%, co predestynuje je jako materiały o właściwościach bakteriobójczych.

Na podstawie przeprowadzonych badań i powyższego posumowania można sformułować następujące wnioski:

- na drodze chemicznej modyfikacji polisacharydów możliwe jest otrzymanie materiałów polimerowych funkcjonalizowanych kwasami boronowymi;
- na właściwości materiałów polisacharydowych zawierających ugrupowanie kwasu boronowego, takie jak: stabilność termiczna, hydrofilowość-hydrofobowość, czy morfologia, ma wpływ struktura chemiczna głównego łańcucha polimerowego. Otwarcie pierścienia glikozydowego w łańcuchu głównym polimeru skutkuje obniżeniem jego stabilności termicznej oraz zwiększeniem charakteru hydrofilowego powierzchni;
- opracowane metody funkcjonalizacji materiałów polisacharydowych kwasami boronowymi można z powodzeniem zastosować do syntezy nanocząstek magnetycznych pokrytych tymi polimerami;
- rodzaj powłoki polimerowej pokrywającej rdzeń magnetyczny ma wpływ na rozmiar nanocząstek. Odsunięcie ugrupowania kwasu boronowego od łańcucha głównego polimeru skutkuje największym wzrostem rozmiaru nanocząstek;
- materiały polimerowe, zawierające ugrupowanie kwasu boronowego i pokrywane nimi nanocząstki wykazują zdolność do efektywnego i szybkiego wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny, bez zastosowania czynnika wiążącego;
- rodzaj pokrywającej rdzeń magnetyczny powłoki polimerowej wpływa na zdolność nanomateriału do wiązania AGP. Materiały otrzymane na drodze funkcjonalizacji karboksymetylowanych polisacharydów wiążą największą ilość glikoproteiny

w przeciwieństwie do tych, w których ugrupowanie kwasu boronowego wprowadzono z jednoczesnym otwarciem pierścienia glikozydowego;

- otrzymane materiały, ze względu na zdolność do wiązania glikoprotein mogłyby znaleźć wykorzystanie w testach diagnostycznych dla wychwytu glikoprotein. Dodatkowo mogłyby zostać użyte w wielu innych zastosowaniach takich jak: wychwytywanie ligandów czy tworzenie testów diagnostycznych. Ponadto, ze względu na fakt, że wirusy w swojej budowie posiadają glikoproteiny, materiały te mogą znaleźć potencjalne zastosowanie jako materiały do dezaktywacji patogenów, na drodze selektywnego i szybkiego wiązania glikoprotein.

30. Streszczenie

W ramach niniejszej pracy, przeprowadzono funkcjonalizacje kwasami boronowymi polimerów w formie niezmodyfikowanej i zmodyfikowanej, takich jak: (i) chitozan niemodyfikowany; (ii) chitozan z różną ilością pierwszorzędowych grup aminowych odsuniętych od łańcucha głównego polimeru; (iii) chitozan dialdehydowy; (iv) karboksymetylochitozan (v) skrobia dialdehydowa; (vi) karboksymetyloskrobia. W ten sposób otrzymano dziewięć nowych biopolimerów z wolnymi grupami dihydroksyborylowymi na powierzchni, a także nanocząstki magentytu (Fe_3O_4) pokryte tymi polimerami.

Strukturę chemiczną polimerów oraz ich układów z nanocząstkami, badano metodami spektroskopowymi (ATR-FTIR, ^{13}C i ^{11}B NMR), natomiast obecność rdzenia magnetytowego potwierdzono metodą rentgenografii dyfrakcyjnej (XRD). Wielkość nanocząstek wyznaczono metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Analiza SEM posłużyła do zbadania morfologii uzyskanych próbek.

Określono stabilność termiczną nanocząstek oraz polimerów stabilizujących ich powierzchnię, stosując analizę termogravimetryczną (TGA-DTA) w atmosferze azotu i powietrza.

Scharakteryzowano właściwości fizykochemiczne (hydrofobowość-hydrofilowość) modyfikowanych polimerów. Otrzymane modyfikowane polimery i nanocząstki magnetyczne pokryte tymi polimerami wykorzystano do wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny. Wiązanie glikoproteiny było możliwe dzięki obecności na powierzchni materiałów grup dihydroksyborylowych. Stwierdzono, że na ilość związanej glikoproteiny wpływ ma rodzaj modyfikowanego polimeru oraz pH środowiska.

Otrzymane funkcjonalizowane kwasami boronowymi polimery oraz nanomateriały, charakteryzują się korzystnymi właściwościami fizykochemicznymi, a także stabilnością termiczną, co umożliwia ich wykorzystanie jako materiały, przydatne w zarówno w zastosowaniach naukowych i medycznych.

Abstract

In the present work, boronic acid functionalization of polymers in unmodified and modified forms was carried out, such as (i) unmodified chitosan, (ii) chitosan with different amounts of primary amino groups shifted from the polymer backbone, (iii) dialdehyde chitosan, (iv) carboxymethyl chitosan, (v) dialdehyde starch, and (vi) carboxymethyl starch. Thus, nine new biopolymers with free dihydroxyboryl groups on the surface and magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles coated with these polymers were obtained.

The chemical structure of polymers and their systems with nanoparticles was studied by spectroscopic methods (ATR-FTIR, ^{13}C , and ^{11}B NMR). Moreover, the presence of the magnetite core was confirmed by X-ray diffraction (XRD). The size of the nanoparticles was determined by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). SEM analysis was used to study the morphology of the obtained samples. The thermal stability of nanoparticles and polymers stabilizing their surface was determined using thermogravimetric analysis (TGA-DTA) in nitrogen and air atmospheres.

The polar nature of the modified polymers was characterized. The modified polymers and magnetic nanoparticles coated with these polymers were used for α -1-acid glycoprotein binding. The binding of the glycoprotein was made possible by dihydroxyboryl groups on the surface of the materials. It has been found that the amount of bound glycoprotein depends on the type of modified polymer and the pH of the environment.

The obtained polymers and nanomaterials functionalized with boronic acids have favorable physicochemical properties and thermal stability, which allows their use as materials beneficial in scientific and medical applications.

31. Literatura

1. Rehse, K. Kurzmitteilung Vergleichende Untersuchungen zur Bindung nichtsteroidaler Antirheumatika an Humanserumalbumin und deren Interaktion mit Phenprocoumon. *Archiv der Pharmazie* **1989**, 7, 241–243
2. Nakai, D., Kumamoto, K., Sakikawa, C., Kosaka, T., Evaluation of the protein binding ratio of drugs by a micro-scale ultracentrifugation method., *J. Pharm. Sci.*, **2004.**, 93: 847-854. <https://doi.org/10.1002/jps.20012>
3. Holm, J., Babol, L.N., The interrelationship between ligand binding and thermal unfolding of the folate binding protein. the role of self-association and pH. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2014**, 1844, 512–519, doi:10.1016/j.bbapap.2013.12.009
4. Bornhorst J., Falke J.. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* **2000**;326:245-54. doi: 10.1016/s0076-6879(00)26058-8.
5. Murata H., Carmali S., Solid-phase synthesis of protein-polymers on reversible immobilization supports. *Nature Communications* **2018**, 9, 845, doi 10.1038/s41467-018-03153-8
6. Pei X., Luo Z., Putting precision and elegance in enzyme immobilisation with bio-orthogonal chemistry *Chem. Soc. Rev.*, **2022**, 51, 16 doi: 10.1039/D1CS01004B
7. Xu, J., Sun, J., Wang, Y., Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization, *Molecules* **2014**, 19, 11465–11486, doi:10.3390/molecules190811465
8. Berensmeier, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2006**, 73, 495–504, <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0675-0>
9. Zhang Y, Sun T, Jiang C. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering. *Acta Pharm Sin B.*, **2018**, 8, 1, 34-50, doi: 10.1016/j.apsb.2017.11.005.
10. Upadhyay A, Ekenna C. A, New Tool to Study the Binding Behavior of Intrinsically Disordered Proteins. *Int J Mol Sci.*, **2023**, 22; 24, 11785, doi: 10.3390/ijms241411785.

11. Granner Daryl K., Murray Robert K., V.W.R. Biochemia Harpera. *JPZWL Wydaw. Lek.* **2012**, wyd. 6, 19, 6755–6760, doi:Warszawa 2012.
12. Crichton, R.R. Structure and Function of Ferritin. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1973**, 12, 57–65, doi:10.1002/anie.197300571.
13. Stryer, L. Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
14. Nomura, K.; Maki, Y.; Okamoto, R.; Satoh, A.; Kajihara, Y. Glycoprotein Semisynthesis by Chemical Insertion of Glycosyl Asparagine Using a Bifunctional Thioacid-Mediated Strategy. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, doi:10.1021/jacs.1c02601.
15. Fernandes, C.L.; Ligabue-Braun, R.; Verli, H. Structural glycobiology of human α 1-acid glycoprotein and its implications for pharmacokinetics and inflammation. *Glycobiology* **2015**, 25, 1125–1133, doi:10.1093/glycob/cwv041.
16. Jarrell, K.F.; Ding, Y.; Meyer, B.H.; Albers, S.-V.; Kaminski, L.; Eichler, J. N-Linked Glycosylation in Archaea: a Structural, Functional, and Genetic Analysis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, 78, 304–341, doi:10.1128/membr.00052-13.
17. Zhang, Q.; Ames, J.M.; Smith, R.D.; Baynes, J.W.; Metz, T.O. A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *J. Proteome Res.* **2009**, 8, 754–769, doi:10.1021/pr800858h.
18. Fares, F. The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: Development of agonists and antagonists. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2006**, 1760, 560–567, doi:10.1016/j.bbagen.2005.12.022.
19. Dayanand, K. Simple Sugars to Complex Disease. *Physiol. Behav.* **2018**, 176, 139–148, doi:10.1016/bs.acr.2014.11.002
20. Baasanjav, S.; Al-Gazali, L.; Hashiguchi, T.; Mizumoto, S.; Fischer, B.; Horn, D.; Seelow, D.; Ali, B.R.; Aziz, S.A.A.; Langer, R.; et al. Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, 89, 15–27, doi:10.1016/j.ajhg.2011.05.021.
21. Perdivara, I.; Yamauchi, M.; Tomer, K.B. Molecular characterization of collagen

- hydroxylysine O-glycosylation by mass spectrometry: Current status. *Aust. J. Chem.* **2013**, *66*, 760–769, doi:10.1071/CH13174.
22. Comer, F.I.; Hart, G.W. O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29179–29182, doi:10.1074/jbc.R000010200.
23. Lu, Q.; Li, S.; Shao, F. Sweet Talk: Protein Glycosylation in Bacterial Interaction With the Host. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 630–641, doi:10.1016/j.tim.2015.07.003.
24. Mohanty, S.; Chaudhary, B.P.; Zoetewey, D. Structural insight into the mechanism of N-linked glycosylation by oligosaccharyltransferase. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1–20, doi:10.3390/biom10040624.
25. Adams, T.M.; Zhao, P.; Chapla, D.; Moremen, K.W.; Wells, L. Sequential in vitro enzymatic N-glycoprotein modification reveals site-specific rates of glycoenzyme processing. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 1–15, doi:10.1016/j.jbc.2022.102474.
26. Bagdonaite, I.; Malaker, S.A.; Polasky, D.A.; Riley, N.M.; Schjoldager, K.; Vakhrushev, S.Y.; Halim, A.; Aoki-Kinoshita, K.F.; Nesvizhskii, A.I.; Bertozzi, C.R.; et al. Glycoproteomics. *Nat. Rev. Methods Prim.* **2022**, *2*, doi:10.1038/s43586-022-00128-4.
27. Nagae, M.; Yamaguchi, Y. Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 8398–8429, doi:10.3390/ijms13078398.
28. Sjögren, J.; Collin, M. Bacterial glycosidases in pathogenesis and glycoengineering. *Future Microbiol.* **2014**, *9*, 1039–1051, doi:10.2217/fmb.14.71.
29. Pittet, M.; Conzelmann, A. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, *1771*, 405–420, doi:10.1016/j.bbalip.2006.05.015.
30. Yoshitake, H.; Araki, Y. Role of the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein tex101 and its related molecules in spermatogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–16, doi:10.3390/ijms21186628.
31. Kalia, M.; Jameel, S. Virus entry paradigms. *Amino Acids* **2011**, *41*, 1147–1157,

- doi:10.1007/s00726-009-0363-3.
32. Villanueva, R.A.; Rouillé, Y.; Dubuisson, J. Interactions between virus proteins and host cell membranes during the viral life cycle. *Int. Rev. Cytol.* **2005**, *245*, 171–244, doi:10.1016/S0074-7696(05)45006-8.
 33. Li, Y.; Liu, D.; Wang, Y.; Su, W.; Liu, G.; Dong, W. The Importance of Glycans of Viral and Host Proteins in Enveloped Virus Infection. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 1–12, doi:10.3389/fimmu.2021.638573.
 34. Miller, N.L.; Clark, T.; Raman, R.; Sasisekharan, R. Glycans in Virus-Host Interactions: A Structural Perspective. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 1–10, doi:10.3389/fmolb.2021.666756.
 35. Banerjee, N.; Mukhopadhyay, S. Viral glycoproteins: biological role and application in diagnosis. *VirusDisease* **2016**, *27*, 1–11, doi:10.1007/s13337-015-0293-5.
 36. Stobnicka, A.; Górny, J. *Koronawirusy – niewidzialne zagrożenie o globalnym zasięgu*; 2020; Vol. 36; ISBN 0000000167.
 37. Sochacka, J. Rola α 1-kwaśnej glikoproteiny surowicy krwi ludzkiej w procesie wiązania leków. *Pol. Tow. Farm.* **2020**, 3–62.
 38. Sarcione, J. Synthesis of m-Acid Glycoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1963**.
 39. Athineos, E.; Kukral, J.C.; Winzler, J. Incorporation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1964**, 338–342.
 40. Israili, Z.H.; Dayton, P.G. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab. Rev.* **2001**, *33*, 161–235, doi:10.1081/DMR-100104402.
 41. Hochepped, T.; Berger, F.G.; Baumann, H.; Libert, C. α 1-acid glycoprotein: An acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003**, *14*, 25–34, doi:10.1016/S1359-6101(02)00054-0.
 42. Imre, T.; Schlosser, G.; Pocsfalvi, G.; Siciliano, R.; Molnár-Szöllosi, É.; Kremmer, T.; Malorni, A.; Vékey, K. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography - Electrospray mass

- spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 1472–1483, doi:10.1002/jms.938.
43. Fournier, T.; Medjoubi-N, N.; Porquet, D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, *1482*, 157–171, doi:10.1016/S0167-4838(00)00153-9.
44. Eap, C.B.; Cuendet, C.; Baumann, P. Orosomucoid (alpha-1 acid glycoprotein) phenotyping by use of immobilized pH gradients with 8 M urea and immunoblotting - A new variant encountered in a population study. *Hum. Genet.* **1988**, *80*, 183–185, doi:10.1007/BF00702865.
45. Herve, F.; Gomas, E.; Duche, J.; Tillement, J. Evidence for differences in the binding of drugs to the two main genetic variants of human alpha 1-acid glycoprotein. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1993**, *36*, 241–249, doi:10.1111/j.1365-2125.1993.tb04224.x.
46. Kopecký, V.; Ettrich, R.; Hofbauerová, K.; Baumruk, V. Structure of human α 1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 41–46, doi:10.1016/S0006-291X(02)02765-1.
47. Taguchi, K.; Nishi, K.; Giam Chuang, V.T.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein — Structure and Function. *Acute Phase Proteins* **2013**, doi:10.5772/56101.
48. Bteich, M. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon* **2019**, *5*, e02879, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02879.
49. Ceciliani, F.; Pocacqua, V. The Acute Phase Protein 1-Acid Glycoprotein, A Model for Altered Glycosylation. *Curr Protein Pept Sci.* **2007**, 91–108.
50. Croce, M. V.; Sállice, V.C.; Lacunza, E.; Segal-Eiras, A. α 1-acid glycoprotein (AGP): A possible carrier of sialyl lewis X (slewis X) antigen in colorectal carcinoma. *Histol. Histopathol.* **2005**, *20*, 91–97.
51. Yazawa, S.; Takahashi, R.; Yokobori, T.; Sano, R.; Mogi, A.; Saniabadi, A.R.; Kuwano, H.; Asao, T. Fucosylated glycans in α 1-acid glycoprotein for monitoring treatment outcomes and prognosis of cancer patients. *PLoS One* **2016**, *11*,

- doi:10.1371/journal.pone.0156277.
52. Dage, J.L.; Ackermann, B.L.; Halsall, H.B. Site localization of sialyl Lewis(x) antigen on α 1-acid glycoprotein by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Glycobiology* **1998**, *8*, 755–760, doi:10.1093/glycob/8.8.755.
 53. Olewicz-Gawlik, A.; Korczowska-Łacka, I.; Łacki, J.K.; Klama, K.; Hrycaj, P. Fukozylacja A1-kwaśnej glikoproteiny i stężenie rozpuszczalnej selektyny E u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów i toczeń rumieniowaty układowy. *Clin. Rheumatol.* **2007**, *26*, 1679–1684.
 54. Lehmann, S.; Harris, D.A. Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21479–21487, doi:10.1074/jbc.272.34.21479.
 55. Fusetti, F.; Schröter, K.H.; Steiner, R.A.; Van Noort, P.I.; Pijning, T.; Rozeboom, H.J.; Kalk, K.H.; Egmond, M.R.; Dijkstra, B.W. Crystal Structure of the Copper-Containing Quercetin 2,3-Dioxygenase from *Aspergillus japonicus*. *Structure* **2002**, *10*, 259–268, doi:10.1016/S0969-2126(02)00704-9.
 56. Kwon, K.S.; Yu, M.H. Effect of glycosylation on the stability of α 1-antitrypsin toward urea denaturation and thermal deactivation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1997**, *1335*, 265–272, doi:10.1016/S0304-4165(96)00143-2.
 57. Mechref, Y.; Madera, M.; Novotny, M. V. Glycoprotein enrichment through lectin affinity techniques. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *424*, 373–396, doi:10.1007/978-1-60327-064-9_29.
 58. Ruiz-may, E.; Catalá, C.; Rose, J.K.C. Chapter 43 N -Glycoprotein Enrichment by Lectin Affinity. *Plant Proteomics Methods and Protocols*, **2014**, *1072*, 633–643, doi:10.1007/978-1-62703-631-3.
 59. Zhang, H.; Martin, D.B.; Aebersold, R. Identification and quantification of N-linked using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and MS. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 660–666.
 60. Huang, Y.C.; Fang, G.M.; Liu, L. Chemical synthesis of proteins using hydrazide

- intermediates. *Natl. Sci. Rev.* **2016**, 3, 107–116, doi:10.1093/nsr/nwv072.
61. Qing, G.; Yan, J.; He, X.; Li, X.; Liang, X. Recent advances in hydrophilic interaction liquid chromatography materials for glycopeptide enrichment and glycan separation. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2020**, 124, 115570, doi:10.1016/j.trac.2019.06.020.
62. Tengattini, S.; Domínguez-Vega, E.; Temporini, C.; Bavaro, T.; Rinaldi, F.; Piubelli, L.; Pollegioni, L.; Massolini, G.; Somsen, G.W. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry as a new tool for the characterization of intact semi-synthetic glycoproteins. *Anal. Chim. Acta* **2017**, 981, 94–105, doi:10.1016/j.aca.2017.05.020.
63. Wilson, J.W.; Bilbao, A.; Wang, J.; Liao, Y.C.; Velickovic, D.; Wojcik, R.; Passamonti, M.; Zhao, R.; Gargano, A.F.G.; Gerbasi, V.R.; et al. Online Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) Enhanced Top-Down Mass Spectrometry Characterization of the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain. *Anal. Chem.* **2022**, 94, 5909–5917, doi:10.1021/acs.analchem.2c00139.
64. Aung, Y.Y.; Kristanti, A.N.; Lee, H.V.; Fahmi, M.Z. Boronic-Acid-Modified Nanomaterials for Biomedical Applications. *ACS Omega* **2021**, 6, 17750–17765, doi:10.1021/acsomega.1c01352.
65. Goumenou, A.; Delaunay, N.; Pichon, V. Recent Advances in Lectin-Based Affinity Sorbents for Protein Glycosylation Studies. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, 8, doi:10.3389/fmolb.2021.746822.
66. Alla, A.J.; Stine, K.J. Recent Strategies for Using Monolithic Materials in Glycoprotein and Glycopeptide Analysis. *Separations* **2022**, 9, doi:10.3390/separations9020044.
67. Rui Zhu, Lauren Zacharias, Kerry M. Wooding, Wenjing Peng, and Y.M. CHAPTER 7: Glycoprotein Enrichment Analytical Techniques: Advantages. *Methods Enzym.* **2017**, 585, 397–429, doi:10.1016/bs.mie.2016.11.009.CHAPTER.
68. Buszewski, B.; Noga, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 231–247, doi:10.1007/s00216-011-5308-5.

69. Zhang, J.; Feng, X.; Wang, J.; Fang, G.; Liu, J.; Wang, S. Nano-crystalline cellulose-coated magnetic nanoparticles for affinity adsorption of glycoproteins. *Analyst* **2020**, *145*, 3407–3413, doi:10.1039/d0an00442a.
70. Hall, D.G. Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives. Overview of Their Reactions and Applications. *Boronic Acids Prep. Appl. Org. Synth. Med.* **2006**, 1–99, doi:10.1002/3527606548.ch1.
71. Siegel, D. Applications of reversible covalent chemistry in analytical sample preparation. *Analyst* **2012**, *137*, 5457–5482, doi:10.1039/c2an35697j.
72. Hall, D.G. Boronic acid catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3475–3496, doi:10.1039/c9cs00191c.
73. Nedunchezian, K.; Aswath, N.; Thirupathy, M.; Thirugnanamurthy, S. Boron neutron capture therapy - a literature review. *J. Clin. Diagnostic Res.* **2016**, *10*, ZE01–ZE04, doi:10.7860/JCDR/2016/19890.9024.
74. Núñez, C.; Chantada-Vázquez, M. del P.; Bravo, S.B.; Vázquez-Estévez, S. Novel functionalized nanomaterials for the effective enrichment of proteins and peptides with post-translational modifications. *J. Proteomics* **2018**, *181*, 170–189, doi:10.1016/j.jprot.2018.04.017.
75. Zhang, X.; Wang, J.; He, X.; Chen, L.; Zhang, Y. Tailor-Made Boronic Acid Functionalized Magnetic Nanoparticles with a Tunable Polymer Shell-Assisted for the Selective Enrichment of Glycoproteins/Glycopeptides. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 24576–24584, doi:10.1021/acsami.5b06445.
76. Zhou, W.; Yao, N.; Yao, G.; Deng, C.; Zhang, X.; Yang, P. Facile synthesis of aminophenylboronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for selective separation of glycopeptides and glycoproteins. *Chem. Commun.* **2008**, 5577–5579, doi:10.1039/b808800d.
77. Li, D.; Bie, Z. Branched polyethyleneimine-assisted boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for the selective enrichment of trace glycoproteins. *Analyst* **2017**, *142*, 4494–4502, doi:10.1039/c7an01174a.
78. Shabatina, T.I.; Vernaya, O.I.; Shabatin, V.P.; Melnikov, M.Y. Magnetic

- Nanoparticles for Biomedical Purposes: Modern Trends and Prospects. *Magnetochemistry* **2020**, *6*, 30, doi:10.3390/magnetochemistry6030030.
79. Lu, A.H.; Salabas, E.L.; Schüth, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222–1244, doi:10.1002/anie.200602866.
80. Wu, W.; Zhang, S.; Ren, F.; Xiao, X.; Zhou, J.; Jiang, C. Controlled synthesis of magnetic iron oxides@SnO₂ quasi-hollow core-shell heterostructures: Formation mechanism, and enhanced photocatalytic activity. *Nanoscale* **2011**, *3*, 4676–4684, doi:10.1039/c1nr10728c.
81. Zhang, Z.; Kong, J. Novel magnetic Fe₃O₄@C nanoparticles as adsorbents for removal of organic dyes from aqueous solution. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *193*, 325–329, doi:10.1016/j.jhazmat.2011.07.033.
82. Liu, X.; Zhang, L.; Zeng, J.; Gao, Y.; Tang, Z. Superparamagnetic nano-immunobeads toward food safety insurance. *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15*, doi:10.1007/s11051-013-1796-x.
83. Baker, I. *Magnetic nanoparticle synthesis*; Elsevier Ltd., 2018; ISBN 9780081007167.
84. Hachem, K.; Ansari, M.J.; Saleh, R.O.; Kzar, H.H.; Al-Gazally, M.E.; Altimari, U.S.; Hussein, S.A.; Mohammed, H.T.; Hammid, A.T.; Kianfar, E. Methods of Chemical Synthesis in the Synthesis of Nanomaterial and Nanoparticles by the Chemical Deposition Method: A Review. *Bionanoscience* **2022**, *12*, 1032–1057, doi:10.1007/s12668-022-00996-w.
85. Yusefi, M.; Shameli, K.; Jumaat, A.F. Preparation and Properties of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Brief Review. *J. Adv. Res. Mater. Sci.* **2020**, *75*, 10–18, doi:10.37934/arms.75.1.1018.
86. Majidi, S.; Sehrig, F.Z.; Farkhani, S.M.; Goloujeh, M.S.; Akbarzadeh, A. Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2016**, *44*, 722–734, doi:10.3109/21691401.2014.982802.
87. Mylkie, K.; Nowak, P.; Rybczynski, P.; Ziegler-Borowska, M. Polymer-coated

- magnetite nanoparticles for protein immobilization. *Materials (Basel)*. **2021**, *14*, 1–40, doi:10.3390/ma14020248.
88. F. Hasany, S.; Ahmed, I.; J, R.; Rehman, A. Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *2*, 148–158, doi:10.5923/j.nn.20120206.01.
89. Jiang, W.; Lai, K.L.; Hu, H.; Zeng, X.B.; Lan, F.; Liu, K.X.; Wu, Y.; Gu, Z.W. The effect of [Fe³⁺]/[Fe²⁺] molar ratio and iron salts concentration on the properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the water/ethanol/toluene system. *J. Nanoparticle Res.* **2011**, *13*, 5135–5145, doi:10.1007/s11051-011-0495-8.
90. McBain, S.C.; Yiu, H.H.P.; Dobson, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3*, 169–180, doi:10.2147/ijn.s1608.
91. Khurshid, H.; Li, W.; Chandra, S.; Phan, M.H.; Hadjipanayis, G.C.; Mukherjee, P.; Srikanth, H. Mechanism and controlled growth of shape and size variant core/shell FeO/Fe₃O₄ nanoparticles. *Nanoscale* **2013**, *5*, 7942–7952, doi:10.1039/c3nr02596a.
92. Ali, A.; Zafar, H.; Zia, M.; ul Haq, I.; Phull, A.R.; Ali, J.S.; Hussain, A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2016**, *9*, 49–67, doi:10.2147/NSA.S99986.
93. Niculescu, A.G.; Chircov, C.; Grumezescu, A.M. Magnetite nanoparticles: Synthesis methods – A comparative review. *Methods* **2022**, *199*, 16–27, doi:10.1016/j.ymeth.2021.04.018.
94. Pileni, M.P. Reverse micelles as microreactors. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6961–6973, doi:10.1021/j100129a008.
95. Wu, W.; He, Q.; Jiang, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3*, 397–415, doi:10.1007/s11671-008-9174-9.
96. Chin, A.B.; Yaacob, I.I. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. *J. Mater. Process. Technol.* **2007**, *191*, 235–237, doi:10.1016/j.jmatprotec.2007.03.011.

97. Alonso, J.; Barandiarán, J.M.; Fernández Barquín, L.; García-Arribas, A. *Magnetic Nanoparticles, Synthesis, Properties, and Applications*; 2018; ISBN 9780128139059.
98. Biehl, P.; von der Lühe, M.; Dutz, S.; Schacher, F.H. Synthesis, characterization, and applications of magnetic nanoparticles featuring polyzwitterionic coatings. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*, doi:10.3390/polym10010091.
99. Kritika, N.; Roy, I. Therapeutic applications of magnetic nanoparticles: recent advances. *Mater. Adv.* **2022**, *3*, 7425–7444, doi:10.1039/d2ma00444e.
100. Suslick, K.S. Sonochemistry, *Science*, **1990**, doi: 10.1126/science.247.4949.1439
101. J.H.Bang; K.S.Suslick Sonochemical Synthesis of Nanosized Hollow Hematite. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2242–2243.
102. Fajaroh, F.; Setyawan, H.; Sutrisno; Nazriati; Wonorahardjo, S. To enhance the purity and crystallinity of magnetite nanoparticles prepared by surfactant-free electrochemical method by imposing higher voltage. *AIP Conf. Proc.* **2014**, *1586*, 179–182, doi:10.1063/1.4866755.
103. Cabrera, L.; Gutierrez, S.; Menendez, N.; Morales, M.P.; Herrasti, P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 3436–3441, doi:10.1016/j.electacta.2007.12.006.
104. Marques, R.F.C.; Garcia, C.; Lecante, P.; Ribeiro, S.J.L.; Noé, L.; Silva, N.J.O.; Amaral, V.S.; Millán, A.; Verelst, M. Electro-precipitation of Fe₃O₄ nanoparticles in ethanol. *J. Magn. Mater.* **2008**, *320*, 2311–2315, doi:10.1016/j.jmmm.2008.04.165.
105. Ibrahim, M.; Serrano, K.G.; Noe, L.; Garcia, C.; Verelst, M. Electro-precipitation of magnetite nanoparticles: An electrochemical study. *Electrochim. Acta* **2009**, *55*, 155–158, doi:10.1016/j.electacta.2009.08.026.
106. Marín, T.; Ortega, D.; Montoya, P.; Arnache, O.; Calderón, J. A new contribution to the study of the electrosynthesis of magnetic nanoparticles: the influence of the supporting electrolyte. *J. Appl. Electrochem.* **2014**, *44*, 1401–1410, doi:10.1007/s10800-014-0766-z.

107. Xia, T.; Wang, J.; Wu, C.; Meng, F.; Shi, Z.; Lian, J.; Feng, J.; Meng, J. Novel complex-coprecipitation route to form high quality triethanolamine-coated Fe₃O₄ nanocrystals: Their high saturation magnetizations and excellent water treatment properties. *CrystEngComm* **2012**, *14*, 5741–5744, doi:10.1039/c2ce25813g.
108. Heinz, H.; Pramanik, C.; Heinz, O.; Ding, Y.; Mishra, R.K.; Marchon, D.; Flatt, R.J.; Estrela-Lopis, I.; Llop, J.; Moya, S.; et al. Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications. *Surf. Sci. Rep.* **2017**, *72*, 1–58, doi:10.1016/j.surfrep.2017.02.001.
109. Kydralieva, K.A.; Dzhardimalieva, G.I.; Yurishcheva, A.A.; Jorobekova, S.J. Nanoparticles of Magnetite in Polymer Matrices: Synthesis and Properties. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2016**, *26*, 1212–1230, doi:10.1007/s10904-016-0436-1.
110. Gautam, A.; Van Veggel, F.C.J.M. Synthesis of nanoparticles, their biocompatibility, and toxicity behavior for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 5186–5200, doi:10.1039/c3tb20738b.
111. Arias, L.S.; Pessan, J.P.; Vieira, A.P.M.; De Lima, T.M.T.; Delbem, A.C.B.; Monteiro, D.R. Iron oxide nanoparticles for biomedical applications: A perspective on synthesis, drugs, antimicrobial activity, and toxicity. *Antibiotics* **2018**, *7*, doi:10.3390/antibiotics7020046.
112. Dumontel, B.; Conejo-Rodríguez, V.; Vallet-Regí, M.; Manzano, M. Natural Biopolymers as Smart Coating Materials of Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, doi:10.3390/pharmaceutics15020447.
113. Cheung, R.C.F.; Ng, T.B.; Wong, J.H.; Chan, W.Y. *Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications*; 2015; Vol. 13; ISBN 8523943803.
114. Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 780–792, doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.
115. Logithkumar, R.; Keshavnarayan, A.; Dhivya, S.; Chawla, A.; Saravanan, S.; Selvamurugan, N. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 172–188, doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.049.

116. Ding, J.; Guo, Y. Recent Advances in Chitosan and its Derivatives in Cancer Treatment. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1–13, doi:10.3389/fphar.2022.888740.
117. Chirkov, S.N. The antiviral activity of chitosan (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **2002**, *38*, 1–8, doi:10.1023/A:1013206517442.
118. Qiao, T.; Wu, Y.; Jin, J.; Gao, W.; Xie, Q.; Wang, S.; Zhang, Y.; Deng, H. Conjugation of catecholamines on magnetic nanoparticles coated with sulfonated chitosan. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *380*, 169–174, doi:10.1016/j.colsurfa.2011.02.038.
119. Phan, T.T.V.; Phan, D.T.; Cao, X.T.; Huynh, T.C.; Oh, J. Roles of chitosan in green synthesis of metal nanoparticles for biomedical applications. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1–15, doi:10.3390/nano11020273.
120. Ziegler-Borowska, M.; Siódmiak, T.; Chełminiak, D.; Cyganiuk, A.; Marszałł, M.P. Magnetic nanoparticles with surfaces modified with chitosan-poly[N-benzyl-2-(methacryloxy)-N,N-dimethylethanaminium bromide] for lipase immobilization. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *288*, 641–648, doi:10.1016/j.apsusc.2013.10.088.
121. Siódmiak, T.; Ziegler-Borowska, M.; Marszałł, M.P. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (R,S)-ibuprofen. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, *94*, 7–14, doi:10.1016/j.molcatb.2013.04.008.
122. Ziegler-Borowska, M.; Mylkie, K.; Kozłowska, M.; Nowak, P.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Kozakiewicz, A.; Ilnicka, A.; Kaczmarek-Kedziera, A. Effect of geometrical structure, drying, and synthetic method on aminated chitosan-coated magnetic nanoparticles utility for HSA effective immobilization. *Molecules* **2019**, *24*, doi:10.3390/molecules24101925.
123. Ziegler-Borowska, M.; Mylkie, K.; Nowak, P.; Rybczynski, P.; Sikora, A.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Kaczmarek-Kedziera, A. Testing for ketoprofen binding to HSA coated magnetic nanoparticles under normal conditions and after oxidative stress. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25081945.
124. Klimaviciute, R.; Bendoraitiene, J.; Lekniute, E.; Zemaitaitis, A. Non-stoichiometric complexes of cationic starch and 4-sulfophthalic acid and their flocculation efficiency. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *457*, 180–188,

- doi:10.1016/j.colsurfa.2014.05.074.
125. Nakamura, Y. Starch: Metabolism and structure. *Starch Metab. Struct.* **2015**, 1–451, doi:10.1007/978-4-431-55495-0.
126. Uthaman, S.; Lee, S.J.; Cherukula, K.; Cho, C.S.; Park, I.K. Polysaccharide-coated magnetic nanoparticles for imaging and gene therapy. *Biomed Res. Int.* **2015**, 2015, doi:10.1155/2015/959175.
127. Ziegler-Borowska, M.; Wegrzynowska-Drzymalska, K.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Kowalonek, J.; Kaczmarek, H. Photochemical Reactions in Dialdehyde Starch. *Molecules* **2018**, 23, doi:10.3390/molecules23123358.
128. Adak, S.; Banerjee, R. A green approach for starch modification: Esterification by lipase and novel imidazolium surfactant. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 150, 359–368, doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.038.
129. Saikia, C.; Hussain, A.; Ramteke, A.; Sharma, H.K.; Deb, P.; Maji, T.K. Carboxymethyl starch-coated iron oxide magnetic nanoparticles: a potential drug delivery system for isoniazid. *Iran. Polym. J. (English Ed.)* **2015**, 24, 815–828, doi:10.1007/s13726-015-0370-z.
130. Dung, T.T.; Danh, T.M.; Hoa, L.T.M.; Chien, D.M.; Duc, N.H. Structural and magnetic properties of starch-coated magnetite nanoparticles. *J. Exp. Nanosci.* **2009**, 4, 259–267, doi:10.1080/17458080802570609.
131. Zheng, M.; Lu, J.; Zhao, D. Effects of starch-coating of magnetite nanoparticles on cellular uptake, toxicity and gene expression profiles in adult zebrafish. *Sci. Total Environ.* **2018**, 622–623, 930–941, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.018.
132. Babick, F. *Dynamic light scattering (DLS)*; Elsevier Inc., 2019; ISBN 9780128141830.
133. Darwish, M.S.A.; Nguyen, N.H.A.; Ševců, A.; Stibor, I. Functionalized magnetic nanoparticles and their effect on escherichia coli and staphylococcus aureus. *J. Nanomater.* **2015**, 2015, doi:10.1155/2015/416012.
134. Hurley, K.R.; Ring, H.L.; Kang, H.; Klein, N.D.; Haynes, C.L. Characterization of Magnetic Nanoparticles in Biological Matrices. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 11611–

- 11619, doi:10.1021/acs.analchem.5b02229.
135. Sagadevan, S. Analysis of Structure, Surface Morphology, Optical and Electrical Properties of Copper Nanoparticles. *J. Nanomedicine Res.* **2015**, *2*, 133–136, doi:10.15406/jnmr.2015.02.00040.
136. Mourdikoudis, S.; Pallares, R.M.; Thanh, N.T.K. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* **2018**, *10*, 12871–12934, doi:10.1039/c8nr02278j.
137. Rami, J.M.; Patel, C.D.; Patel, C.M.; Patel, M. V. Thermogravimetric analysis (TGA) of some synthesized metal oxide nanoparticles. *Mater. Today Proc.* **2020**, *43*, 655–659, doi:10.1016/j.matpr.2020.12.554.
138. Mittal, A.; Roy, I.; Gandhi, S. Magnetic Nanoparticles: An Overview for Biomedical Applications. *Magnetochemistry* **2022**, *8*, doi:10.3390/magnetochemistry8090107.
139. Safarik, I.; Safarikova, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagn. Res. Technol.* **2004**, *2*, 1–17, doi:10.1186/1477-044X-2-7.
140. Lu, W.; Ling, M.; Jia, M.; Huang, P.; Li, C.; Yan, B. Facile synthesis and characterization of polyethylenimine-coated Fe₃O₄ superparamagnetic nanoparticles for cancer cell separation. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *9*, 1080–1084, doi:10.3892/mmr.2014.1906.
141. Huang, S.H.; Liao, M.H.; Chen, D.H. Fast and efficient recovery of lipase by polyacrylic acid-coated magnetic nano-adsorbent with high activity retention. *Sep. Purif. Technol.* **2006**, *51*, 113–117, doi:10.1016/j.seppur.2006.01.003.
142. O'Brien, S.M.; Thomas, O.R.T.; Dunnill, P. Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption. *J. Biotechnol.* **1996**, *50*, 13–25, doi:10.1016/0168-1656(96)01544-1.
143. Liang, Y.Y.; Zhang, L.M. Bioconjugation of papain on superparamagnetic nanoparticles decorated with carboxymethylated chitosan. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1480–1486, doi:10.1021/bm061091g.
144. Corchero, J.L.; Villaverde, A. Biomedical applications of distally controlled

- magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 468–476, doi:10.1016/j.tibtech.2009.04.003.
145. Park, M.E.; Chang, J.H. High throughput human DNA purification with aminosilanes tailored silica-coated magnetic nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 1232–1235, doi:10.1016/j.msec.2006.09.008.
146. Lin, Z.A.; Zheng, J.N.; Lin, F.; Zhang, L.; Cai, Z.; Chen, G.N. Synthesis of magnetic nanoparticles with immobilized aminophenylboronic acid for selective capture of glycoproteins. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 518–524, doi:10.1039/c0jm02300k.
147. Zhang, X.; He, X.; Chen, L.; Zhang, Y. Boronic acid modified magnetic nanoparticles for enrichment of glycoproteins via azide and alkyne click chemistry. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 16520–16526, doi:10.1039/c2jm32987e.
148. Zhang, S.; He, X.; Chen, L.; Zhang, Y. Boronic acid functionalized magnetic nanoparticles via thiol-ene click chemistry for selective enrichment of glycoproteins. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 4212–4218, doi:10.1039/c4nj00424h.
149. Xue, X.; Lu, R.; Liu, M.; Li, Y.; Li, J.; Wang, L. A facile and general approach for the preparation of boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for the selective enrichment of glycoproteins. *Analyst* **2019**, *144*, 641–648, doi:10.1039/c8an01704b.
150. Wang, B.; Duan, A.; Xie, S.; Zhang, J.; Yuan, L.; Cao, Q. The molecular imprinting of magnetic nanoparticles with boric acid affinity for the selective recognition and isolation of glycoproteins. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 25524–25529, doi:10.1039/d1ra00716e.
151. Li, D.; Dong, S. 6-Aminopyridine-3-boronic acid functionalized magnetic nanoparticles for highly efficient enrichment of: Cis -diol-containing biomolecules. *Anal. Methods* **2021**, *13*, 2331–2337, doi:10.1039/d1ay00414j.
152. Dhadge, V.L.; Hussain, A.; Azevedo, A.M.; Aires-Barros, R.; Roque, A.C.A. Boronic acid-modified magnetic materials for antibody purification. *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, doi:10.1098/rsif.2013.0875.
153. Mansouri Gharaghoushi, S.; Nikpour Nezhati, M.; Baharvand, H.; Mohammadian,

- T.; Ahmad Panahi, H. Encapsulated magnetic nanoparticles with a polymer containing boronic acid groups for separation and enrichment of horseradish peroxidase glycoprotein. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2022**, *71*, 946–958, doi:10.1080/00914037.2021.1931208.
154. Zhang, J.; Feng, X.; Wang, J.; Fang, G.; Liu, J.; Wang, S. Nano-crystalline cellulose-coated magnetic nanoparticles for affinity adsorption of glycoproteins. *Analyst* **2020**, *145*, 3407–3413, doi:10.1039/d0an00442a.
155. Dutta, J.; Priyanka A facile approach for the determination of degree of deacetylation of chitosan using acid-base titration. *Heliyon* **2022**, *8*, e09924, doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09924.
156. Liu, L.; Xu, X.; Guo, S.; Han, W. Synthesis and self-assembly of chitosan-based copolymer with a pair of hydrophobic/hydrophilic grafts of polycaprolactone and poly(ethylene glycol). *Carbohydr. Polym.* **2009**, *75*, 401–407, doi:10.1016/j.carbpol.2008.07.038.
157. Chiu, Y.L.; Chen, S.C.; Su, C.J.; Hsiao, C.W.; Chen, Y.M.; Chen, H.L.; Sung, H.W. pH-triggered injectable hydrogels prepared from aqueous N-palmitoyl chitosan: In vitro characteristics and in vivo biocompatibility. *Biomaterials* **2009**, *30*, 4877–4888, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.052.
158. Pant, B.R.; Upadhyaya, J. Effect of degree of substitution of carboxyl groups on cross-linking of carboxymethyl starch. *Sci. World* **2022**, *15*, 18–25, doi:10.3126/sw.v15i15.45670.
159. Ziegler-Borowska, M.; Chełminiak, D.; Kaczmarek, H.; Kaczmarek-Kędziera, A. Effect of side substituents on thermal stability of the modified chitosan and its nanocomposites with magnetite. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2016**, *124*, 1267–1280, doi:10.1007/s10973-016-5260-x.
160. Bhardwaj, S.; Bhardwaj, N.K.; Negi, Y.S. Effect of degree of deacetylation of chitosan on its performance as surface application chemical for paper-based packaging. *Cellulose* **2020**, *27*, 5337–5352, doi:10.1007/s10570-020-03134-5.
161. Wegrzynowska-Drzymalska, K.; Grebicka, P.; Młynarczyk, D.T.; Chełminiak-Dudkiewicz, D.; Kaczmarek, H.; Goslinski, T.; Ziegler-Borowska, M. Crosslinking

- of chitosan with dialdehyde chitosan as a new approach for biomedical applications. *Materials (Basel)*. **2020**, *13*, 1–27, doi:10.3390/ma13153413.
162. Horovitz, O.; Cioica, N.; Jumate, N.; Pojar-Feneşan, M.; Balea, A.; Liteanu, V.; Mocanu, A.; Tomoaia-Cotişel, M. SEM characterization of starch granules. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.* **2011**, 211–219.
163. Chen, X.; Pizzi, A.; Zhang, B.; Zhou, X.; Fredon, E.; Gerardin, C.; Du, G. Particleboard bio-adhesive by glyoxalated lignin and oxidized dialdehyde starch crosslinked by urea. *Wood Sci. Technol.* **2022**, *56*, 63–85, doi:10.1007/s00226-021-01344-z.
164. Bart, J.; Tiggelaar, R.; Yang, M.; Schlautmann, S.; Zuilhof, H.; Gardeniers, H. Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. *Lab Chip* **2009**, *9*, 3481–3488, doi:10.1039/b914270c.
165. Owens, D.K.; Wendt, R.C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1969**, *13*, 1741–1747, doi:10.1002/app.1969.070130815.
166. Sun, T.; Wang, G.; Feng, L.; Liu, B.; Ma, Y.; Jiang, L.; Zhu, D. Reversible Switching between Superhydrophilicity and Superhydrophobicity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43*, 357–360, doi:10.1002/anie.200352565.
167. Chełminiak-Dudkiewicz, D.; Ziegler-Borowska, M.; Stolarska, M.; Sobotta, L.; Falkowski, M.; Mielcarek, J.; Goslinski, T.; Kowalonek, J.; Węgrzynowska-Drzymalska, K.; Kaczmarek, H. The chitosan – Porphyrine hybrid materials and their photochemical properties. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2018**, *181*, 1–13, doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.02.021.
168. Smolarkiewicz-Wyczachowski, A.; Kaczmarek, H.; Piskorz, J.; Nowak, P.; Ziegler-Borowska, M. Chitosan Composites Containing Boron-Dipyrromethene Derivatives for Biomedical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24021770.
169. Thy, L.T.M.; Cuong, P.M.; Tu, T.H.; Nam, H.M.; Hieu, N.H.; Phong, M.T. Fabrication of magnetic iron oxide/graphene oxide nanocomposites for removal of lead ions from water. *Chem. Eng. Trans.* **2020**, *78*, 277–282, doi:10.3303/CET2078047.

170. Muhammad, A.; Shah, A. ul H.A.; Bilal, S. Comparative study of the adsorption of acid blue 40 on polyaniline, magnetic oxide and their composites: Synthesis, characterization and application. *Materials (Basel)*. **2019**, *12*, doi:10.3390/ma12182854.
171. Dagher, S.; Soliman, A.; Ziout, A.; Tit, N.; Hilal-Alnaqbi, A.; Khashan, S.; Alnaimat, F.; Qudeiri, J.A. Photocatalytic removal of methylene blue using titania- and silica-coated magnetic nanoparticles. *Mater. Res. Express* **2018**, *5*, doi:10.1088/2053-1591/aacad4.
172. Kaczmarek, H.; Kosmalska, D.; Malinowski, R.; Bajer, K. Postępy w badaniach degradacji termicznej materiałów polimerowych Cz. I. Badania literaturowe. *Polimery* **2019**, *4*, 239–314.
173. Aggarwal, P.; Dollimore, D.; Heon, K. Comparative thermal analysis study of two biopolymers, starch and cellulose. *J. Therm. Anal.* **1997**, *50*, 7–17, doi:10.1007/bf01979545.
174. de Britto, D.; Campana-Filho, S.P. Kinetics of the thermal degradation of chitosan. *Thermochim. Acta* **2007**, *465*, 73–82, doi:10.1016/j.tca.2007.09.008.
175. Fajarah, F.; Setyawan, H.; Nur, A.; Lenggoro, I.W. Thermal stability of silica-coated magnetite nanoparticles prepared by an electrochemical method. *Adv. Powder Technol.* **2013**, *24*, 507–511, doi:10.1016/j.apt.2012.09.008.
176. Carp, O.; Patron, L.; Culita, D.C.; Budruga, P.; Feder, M.; Diamandescu, L. Thermal analysis of two types of dextran-coated magnetite. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2010**, *101*, 181–187, doi:10.1007/s10973-009-0593-3.
177. Thanakkasaranee, S.; Jantanasakulwong, K.; Phimolsiripol, Y.; Leksawasdi, N.; Seesuriyachan, P.; Chaiyaso, T.; Jantrawut, P.; Ruksiriwanich, W.; Sommano, S.R.; Punyodom, W.; et al. High substitution synthesis of carboxymethyl chitosan for properties improvement of carboxymethyl chitosan films depending on particle sizes. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26196013.
178. Ziegler-Borowska, M. Magnetic nanoparticles coated with aminated starch for HSA immobilization- simple and fast polymer surface functionalization. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *136*, 106–114, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.06.044.

179. Yun, S.; Matheson, N.K.; Aust, S. Estimation of Amylose Content of Starches after Precipitation of Amylopectin by Concanavalin-A. *Food and Nutrition Sciences*, **1990**, *42*, 0–3.
180. Morrison, W.R.; Laignelet, B. An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *J. Cereal Sci.* **1983**, *1*, 9–20, doi:10.1016/S0733-5210(83)80004-6.
181. Wegrzynowska-Drzymalska, K.; Grebicka, P.; Mlynarczyk, D.T.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Kaczmarek, H.; Goslinski, T.; Ziegler-Borowska, M. Crosslinking of chitosan with dialdehyde chitosan as a new approach for biomedical applications. *Materials (Basel)*. **2020**, *13*, 1–27, doi:10.3390/ma13153413.
182. Soltani, A.; Pakravan, P. Preparation and Characterization of Magnetic Solid Lipid Nanoparticles as a Targeted Drug Delivery System for Doxorubicin. *Adv. Pharm. Bull.* **2023**, *13*, 301–308, doi:10.34172/apb.2023.033.
183. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 908–931, doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
184. Khmara, I.; Kubovcikova, M.; Koneracka, M.; Kalska-Szostko, B.; Zavisova, V.; Antal, I.; Rajnak, M.; Dankova, Z.; Kavecansky, V.; Omastova, M.; et al. Preparation and characterization of magnetic nanoparticles. *Acta Phys. Pol. A* **2018**, *133*, 704–706, doi:10.12693/APhysPolA.133.704.
185. Gosecka, M.; Gosecki, M.; Kazmierski, S. DOSY NMR as a tool for predicting optimal conditions for hydrogel formation: The case of a hyperbranched polyglycidol cross-linked with boronic acids. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2016**, *54*, 2171–2178, doi:10.1002/polb.24126.
186. Gosecki, M.; Zgardzinska, B.; Gosecka, M. Temperature-Induced Changes in the Nanostructure of Hydrogels Based on Reversibly Cross-Linked Hyperbranched Polyglycidol with $B(OH)_4^-$ Ions. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 18323–18332, doi:10.1021/acs.jpcc.6b06365.
187. Vedelago, J.; Mattea, F.; Triviño, S.; Montesinos, M. del M.; Keil, W.; Valente, M.; Romero, M. Smart material based on boron crosslinked polymers with potential applications in cancer radiation therapy. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–14,

doi:10.1038/s41598-021-91413-x.

188. Priyanka S., Manish K. Arundhati K., M. Stimulation of Pithecellobium dulce (jungle jalebi) seed with electromagnetic exposure and its impact on biochemical parameter and growth, *Materials Today: Proceedings*, **2021**, 42, 1513-1518
189. Liber-Kneć A., Łagan, S., Zastosowanie pomiarów kąta zwilżania i swobodnej energii powierzchniowej do charakterystyki powierzchni polimerów wykorzystywanych w medycynie, *2014 I Polim.Med.*, ISSN 0370-0747
190. Marques A.P., Pirraco R.P., Reis R.L. 29 - Biocompatibility of starch-based polymers, **2008** *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications*, 738-760, ISBN 9781845692643
191. Damiri F., Bachra Y., Synthesis and characterization of 4-formylphenylboronic acid cross-linked chitosan hydrogel with dual action: Glucose-sensitivity and controlled insulin release, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **2022**, 50,7, 100092, <https://doi.org/10.1016/j.cjac.2022.100092>
192. Marie-Hélène T., Chloé C., Assessing the potential of boronic acid/chitosan/bioglass composite materials for tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering: C*, **2020**, 110, doi:10.1016/j.msec.2020.110674
193. Niemirycz, E.; Nichthausser, J.; Staniszevska, M.; Nałęcz-Jawecki, G.; Bolałek, J., The Microtox® biological test: Application in toxicity evaluation of surface waters and sediments in Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies* **2007**, 36, (4), 151-163
194. Wegrzynowska-Drzymalska, K.; Mylkie, K.; Nowak, P.; Młynarczyk, D.T.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Kaczmarek, H.; Goslinski, T.; Ziegler-Borowska, M. Dialdehyde Starch Nanocrystals as a Novel Cross-Linker for Biomaterials Able to Interact with Human Serum Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 7652. <https://doi.org/10.3390/ijms23147652>
195. Wang, C.-H.; Liu, W.-S.; Sun, J.-F.; Hou, G.-G.; Chen, Q.; Cong, W.; Zhao, F. Non-toxic O-quaternized chitosan materials with better water solubility and antimicrobial function. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 84, 418–427

196. Adamczyk-Woźniak A., Gozdalik J.T., Wieczorek D., 5-Trifluoromethyl-2-formylphenylboronic Acid. *Molecules*, **2020**, 12,25, 799, doi: 10.3390/molecules25040799

197. Olga Borokhov O., Schubert D., Antimicrobial Properties of Boron Derivatives, *American Chemical Society*, **2007**, 20, 412-435, DOI: 10.1021/bk-2007-0967.ch020

198. Plescia J., Moitessier N. ,Design and discovery of boronic acid drugs. *Eur J Med Chem*. **2020**,1,195,112270. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112270

199. Kumar B.V., Pulidindi,I.N., Selective conversion of starch to glucose using carbon based solid acid catalyst, *Renewable Energy*, **2015**, 18, 141-145, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.12.070>