



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Katarina Jerin

POLIELEKTROLITNI VIŠESLOJEVI: PRIMJENA I METODE KARAKTERIZACIJE

Zhao, S., Caruso, F., Dahne, L., Decher, G., De Geest, B. G., Fan, J., Feliu, N., Gogotsi, Y., Hammond, P. T., Hersam, M.C., Khademhosseini, A., Kotov, N., Loporatti, S., Li, Y., Lisdar, F., Liz-Marzán, L. M., Moya, S., Mulvaney, P., Rogach, A. L., Roy, S., Shchukin, D. G., Skirtach, A. G., Stevens, M. M., Sukhorukov, G. B., Weiss, P. S., Yue, Z., Zhu, D., Parak, W. J. *ACS Nano* **13(6)** (2019) 6151-6169.

Kemijski seminar I

Mentor rada: prof. dr. sc. Davor Kovačević

Zagreb, 2020

SADRŽAJ

§ 1. UVOD.....	1
§ 2. POLIELEKTROLITNI VIŠESLOJEVI	2
2.1. Sloj-po-sloj metoda	2
2.2. Različite primjene površina nastalih sloj-po-sloj metodom	3
2.2.1. Antikorozivni višeslojevi	3
2.2.2. Antibakterijski višeslojevi.....	3
2.2.3. Sustavi za dostavu terapija	5
2.2.4. Višeslojevi koji kontroliraju interakcije stanica i supstrata.....	6
§ 3. METODE KARAKTERIZACIJE POLIELEKTROLITNIH VIŠESLOJEVA	8
3.1. Spektroskopske metode	8
3.1.2. Spektroskopija ultraljubičastog i vidljivog zračenja.....	9
3.1.3. Optička reflektometrija	10
3.2. Strukturne metode	12
3.2.1. Kvarc-kristalna mikrovaga	12
3.2.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti	13
3.2.3. Mikroelektroforeza.....	15
3.2.4. Mikroskopija atomskih sila	18
§ 4. ZAKLJUČAK	XX
§ 5. LITERATURNI IZVORI.....	XXI

§ 1. UVOD

Sloj-po-sloj metoda (SPS, eng. *Layer-by-Layer*, LbL) je stara tridesetak godina, ali je i dalje od velikog interesa. Jednostavnost pripreme dobro definiranih površina kao i velika raznolikost sintetiziranih materijala razlozi su zašto se u današnje vrijeme dnevno objavljuju radovi na temu SLS metode. Neke od uloga višeslojnih presvlaka su zaštita od korozije ili bakterija, imobilizacija biomolekula unutar višeslojeva, a mogu se koristiti i kao biomimetički sustavi, biološke membrane i sl. Buduća istraživanja u ovom području vrlo će se vjerojatno baviti funkcionalizacijom višeslojnih presvlaka, osmišljavanjem i proizvodnjom membrana i enkapsulirajućim dostavnim sustavima u terapijske i dijagnostičke svrhe.¹ Važno je za napomenuti da SPS metoda nije isključivo primjenjiva na ravnim i glatkim površinama već se koristi i na vrlo zakrivljenim površinama, nanočesticama.

Navedene primjene moguće su samo uz prethodna detaljna istraživanja i karakterizaciju koja pak ovisi o obliku, vrsti i namjeni višeslojnog sustava. U ovom radu prikazane su metode karakterizacije koje se najčešće koriste u suvremenim istraživanjima višeslojeva.² Svakoj opisanoj metodi pridruženo je nekoliko primjera koji će predstaviti široku primjenu ovakvih sustava.

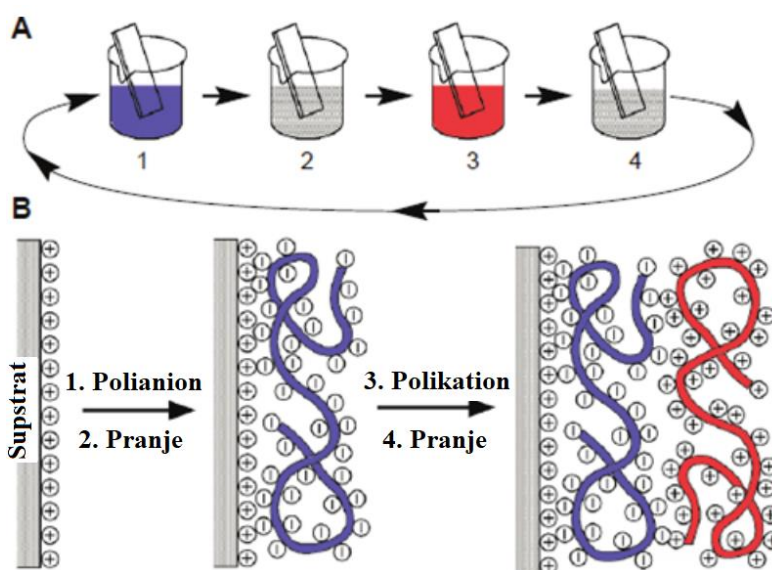
§ 2. POLIELEKTROLITNI VIŠESLOJEVI

2.1. Sloj-po-sloj metoda

Polielektroliti su dugolančane makromolekule sastavljene od ponavljajućih jedinica, monomera koji su u vodenoj otopini električki nabijeni. Homopolimeri sadrže samo jednu vrstu ponavljajućih jedinica, dok kopolimeri sadrže više od jedne ponavljajuće jedinice. Ovisno o disocijaciji monomernih jedinica, polielektroliti mogu biti jaki ili slabi. Zbog električnog naboja, polielektrolite je moguće adsorbirati na površinu suprotnog naboja i time promijeniti naboj i karakteristike površine. Površina (supstrat) na koju se polielektrolit adsorbira može biti ravna (pločica silicijeva ili titanijeva oksida) ili zakrivljena (nanočestice). Sloj polielektrolita na pločici ili nanočestici nova je površina na koju se ponovo može adsorbirati novi polielektrolit, naravno suprotnog naboja. Jasno je da polielektrolitni višeslojevi nastaju primarno zbog elektrostatske interakcije između suprotno nabijenih konstituenata.² Međutim, njihova morfologija, debljina, stabilnost i slične karakteristike mogu se razlikovati ovisno o udjelu vodikovih veza, van der Waalsovih sila ili hidrofobnih interakcija.

Uzastopno ponavljanje adsorpcije uz ispiranje između pojedine presvlake naziva se sloj-po-sloj metoda i shematski je prikazana na slici 1.³ SPS metoda ima nekoliko prednost nad drugim metodama za prekrivanje i funkcionalizaciju površina: jednostavnost protokola i opreme, prikladnost za presvlačenje gotovo svih površina, širok izbor prirodnih i sintetičkih koloida i polielektrolita, neovisnost o obliku ili veličini supstrata i kontrola debljine višesloja. Jer se polielektroliti mogu vezati na nabijenu površinu neovisno o njoj geometriji moguće je sintetizirati polielektrolitne višeslojeve na nanočestice, a potom ukloniti nanočesticu iz središta. Preostali višesloj je šuplja sfera.

Važno je napomenuti i da osim dva polielektrolita, višesloj mogu činiti i mnoge druge vrste poput nabijenih čestica, malih molekula ili različitih makromolekula. Na taj način nastaju nanokompoziti čiji se sastav mijenja i vertikalno na normalu supstrata. Osim kemijskog sastava, takvim se nanokompozitima mijenjaju mehanička, optička i električna svojstva u vertikalnom smjeru.



Slika 1. Sloj-po-sloj metoda pripreve polielektrolitnih višeslojeva. A Prikaz ciklusa sinteze, B modelni prikaz površine na koju se adsorbiraju polielektroliti.³

2.2. Različite primjene površina nastalih sloj-po-sloj metodom

Desetci, ako ne i stotine različitih vrsta materijala mogu se kombinirati u jedan kompleksan sustav sloj-po-sloj metodom. Različiti materijali, spojeni na uređen i vrlo precizan način, omogućuju širok spektar potencijalnih primjena. Površine prekrivene takvim presvlakama primjenjuju se u industriji i znanosti. Funkcija pametne presvlake na granici čvrste faze materijala i tekuće ili plinovite faze okoline ovisi o odabiru materijala od kojih je napravljena. Samo neke od uloga višeslojnih presvlakana, prikazane su u slijedećim odlomcima.

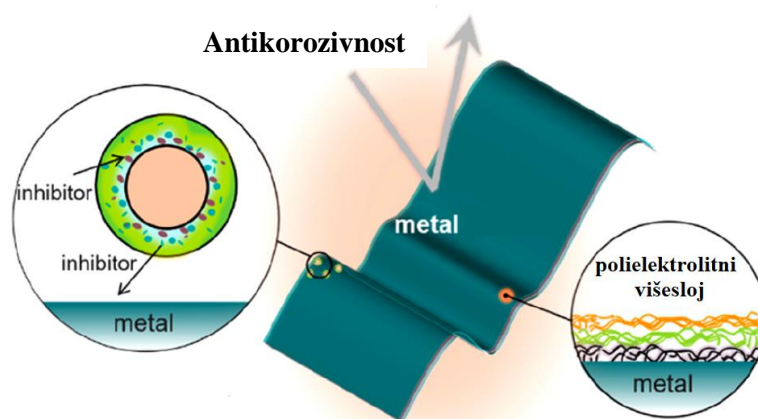
2.2.1. Antikorozivni višeslojevi

Zaštita proizvoda omogućava njihovu dugotrajnosti i smanjuje ekonomsku štetu pa i ne čudi da se isti premazuju zaštitnim slojevima. Sloj-po-sloj metodom već su napravljene antikorozivne premazi.⁴⁻⁶ Andreeva⁴ i suradnici istraživali su antikorozivna svojstva polielektrolitnih (poli(etilenamin), PEI i poli(stiren sulfonat), PSS) višeslojeva na površini aluminijske. Antikorozivna svojstva su pripisana puferskom svojstvu tog višesloja. Korozija nastaje zbog

lokalne promjene pH koju ovakav višesloj neutralizira. Osim puferskog svojstva upravo taj par polielektrolita ima i svojstvo samozacjeljivanja te nakon mehaničkog oštećenja i dalje djeluje štiteću površinu aluminija.

Mogućnost uključivanja nanomaterijala iskoristili su Shchukin⁵ i suradnici inkorporirajući šuplje halozitne nanocjevčice u hibridni sol-gel sloj. Halozitne nanocjevčice dopirali su korozivnim inhibitorima (2-mercaptobenzotiazol) te prekrili SPS metodom polielektrolitima (PSS, i PAH). Takav sloj pokazao je dugoročnu zaštitu od korozije.

Cilj zaštitnih materijala je samostalno se obnoviti te inhibirati daljnju koroziju. Glavne komponente takvih slojeva su kapsule deponirane u ravni sloj.⁶ Nanokapsule pružaju kontrolirano otpuštanje inhibitora korozije u trenutku vanjskog podražaja, na točno određenom mjestu. Sloj-po-sloj pristup je učinkovita metoda pripreme takvih nanomaterijala prikazanih na slici 2.

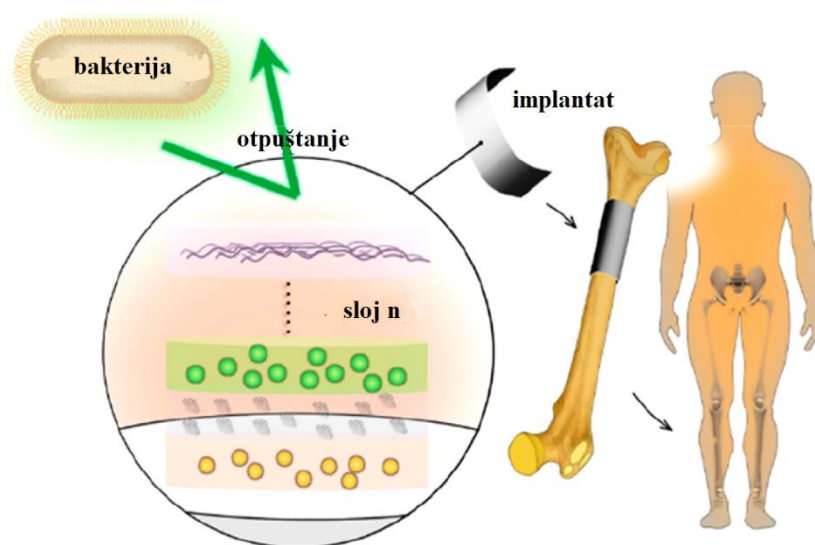


Slika 2. Modelni prikaz antikorozivnih višeslojeva na metalu.¹

2.2.2. Antibakterijski višeslojevi

Sloj-po-sloj metoda nudi nekoliko pristupa antiseptičkom djelovanju površina te se antibakterijski premazi pripremanju na više načina. Neki od njih su: priprava višeslojeva s kationskim polimerima koji oštećuju membrane bakterija⁷, enkapsuliranje antibiotika u višeslojeve⁸ ili kombinacija više njih. Zaštita površina od bakterija moguća je SPS metodom

jer se unutar nekoliko slojeva mogu smjestiti različiti nanomaterijala ili uključiti antibiotici između slojeva (slika 3).



Slika 3. Modelni prikaz višesloja s antibakterijskim učinkom na glatkoj površini i implantatu u ljudskom organizmu.¹

Mnogi antibiotici imaju električki nabijene skupine koje mogu kompleksirati s polielektrolitima u višesloju ili u potpunosti zamijenit jedan sloj polielektrolita. Prednost SPS metode je što se polielektrolitni višeslojevi mogu stvarati na gotovo bilo kojoj nabijenoj površini. Antibakterijski slojevi mogli bi se proizvesti u medicinske svrhe kao premazi na implantatima. Idealno, polielektrolitni višeslojni premaz na implantatu bi u prvih par tjedana nakon operacije trebao otpustiti veću količinu antibiotika, a potom otpuštati manje količine ovisno o signalu tijela pri odgovoru na strano tijelo.

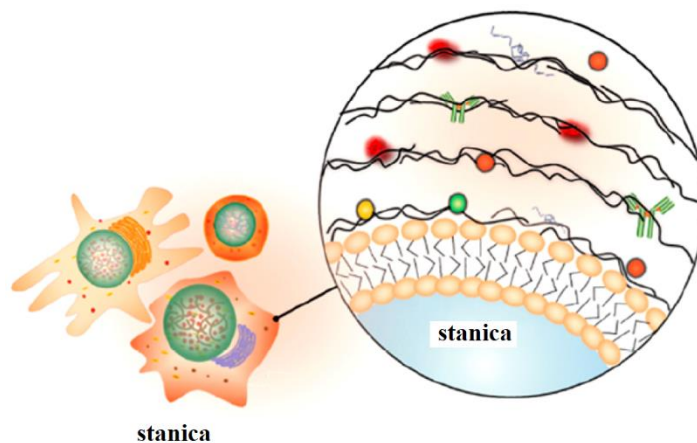
2.2.3. Sustavi za dostavu terapija

Sustavi za dostavu terapija (eng. *Drug delivery*) nisu još stvarnost, ali zbog velikog broja istraživanja nije ih moguće zaobići kad se spominje uporaba materijala dobivenih sloj-po-sloj metodom. Takvi sustavi moraju biti biokompatibilni i biorazgradivi u organizmu, dostavljati lijek na ciljano mjesto i u određenoj količini ga ispustiti. Ideja sustava za dostavu terapije je priprava nanokapsule sloj-po-sloj metodom koja bi unutar sebe ili unutar višesloja prenosila lijek na određeno mjesto u organizmu.

Unutarnji sloj nanokapsule ne smije utjecati na lijek koji prenosi, dok bi središnji slojevi bili odgovorni za otpuštanje lijeka. Otpuštanje lijeka mora biti kontrolirano, sporo ili brzo, ali pod utjecajem vanjskog podražaja kao što je promjena pH. Količina i vrsta lijeka mogla bi se kontrolirati odabirom redoslijeda otpuštanja. Pliće ugrađeni lijekovi otpuštali bi se ranije nego oni koji se nalaze dublje ili u šupljini nanokapsule. Važna karakteristika nanokapsula je da bi trebale imati vanjski sloj ne pokreće odgovor stranog tijela, odnosno neprepoznatljiv imunološkom sustavu. Istovremeno, vanjski sloj se mora specifično vezati na mjesto gdje treba otpustiti lijek.

2.2.4. Višeslojevi koji kontroliraju interakcije stanica i supstrata

Sloj-po-sloj metoda nudi priliku za kontrolu vezanja bioloških stanica na površinu i fino ugađanje interakcija između stanica i površina zbog širokog izbora vrsta slojeva. Tako SPS višeslojevi mogu sadržavati antitijela, plazmide, genetski materijal, antibiotike i druge biološke molekule, a moguće ih je konstruirati na stanici ili na supstratu. Shema višesloja na stanici prikazana je na slici 4.



Slika 4. Modelni prikaz stanice s funkcionaliziranom površinom.

Biološke komponente mogu se napraviti dostupnima vanjskim podražajem pri čemu bi došlo do otvaranja sloja i ispuštanja upravo tih komponenta. Vanjski podražaj zbog kojeg se slojevi otvaraju mogu biti različiti, a ovise i o mehaničkim svojstvima polielektrolita.⁹ Drugim riječima, moguće je napraviti površinu koja ima jednaka svojstva (sastav, hrapavost...) kao bilo

koja druga na kojoj stanice rastu, ali bi istovremeno prema potrebi mogla otpuštati biološke molekule. Takve površine bi bile izuzetno korisne za implantate s ciljem poboljšanja adhezije i pokretljivosti stanica.

Dok su takve površine u budućnosti, trenutno se proučava mnoštvo biomimetičkih kompozita dobivenih kombinacijom SPS metode s drugim metodama. Nastali kompoziti su veliki od tek nekoliko mikrometara pa sve do milimetra.¹⁰

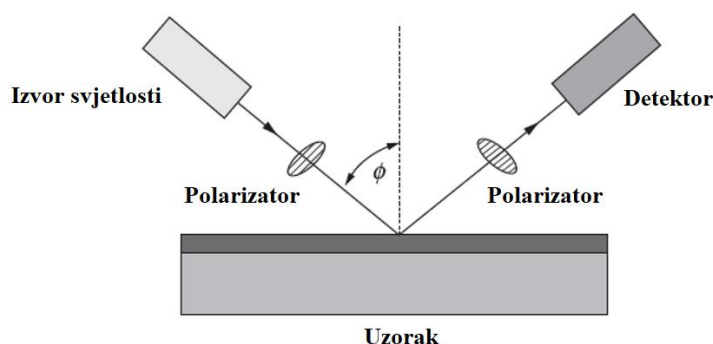
§ 3. METODE KARAKTERIZACIJE POLIELEKTROLITNIH VIŠESLOJEVA

3.1. Spektroskopske metode

Najčešće metode karakterizacije polielektrolitnih višeslojeva mogu se podijeliti na spektroskopske i strukturne.² Spektroskopske su: elipsometrija, spektroskopija ultraljubičastog i vidljivog zračenja i optička reflektometrija, dok su strukturne kvarc-kristalna mikrovaga, dinamičko raspršenje svjetlosti, mikroelektroforeza i mikroskopija atomskih sila.

3.1.1. Elipsometrija

Elipsometrija je optička metoda koja se temelji na mjerenju promjene stanja polarizacije eliptički polariziranog svjetla uslijed odbijanja od površine na kojoj se nalazi određeni sloj. Elipsometrijska mjerenja se provode tako da se upadna zraka svjetlosti polarizira i pusti da se reflektira, pod određenim kutom, o glatku površinu koju se promatra. Reflektirana svjetlost ponovo se polarizira te se mjeri intenzitet svjetlosti. U pravilu se linearno polarizirana svjetlost polarizira reflektiranjem o glatku površinu u eliptički polariziranu.¹¹ Osnovni dijelovi elipsometra prikazani su na slici 5.¹²



Slika 5. Princip elipsometra, polrizirana svjetlost upada na ravninu uzorka i dolazi do promjene polarizacije koja se analizira.¹²

Promjena polarizacije reflektirane svjetlosti mjeri se omjerom amplituda dviju međusobno okomitih komponenata zraka (s-okomita i p-paralelna komponenta ravnini upadne zrake). Omjer (ρ) se naziva kompleksni refleksi omjer i dobiva se jednadžbom:

$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \tan(\Psi) e^{i\Delta} \quad (1)$$

gdje su R_s i R_p amplitude, Ψ omjer amplituda nakon refleksije i Δ fazni pomak. Na temelju podataka dobivenih mjerenjem i odabirom odgovarajućeg modela, računaju se Ψ i Δ koji najbolje zadovoljavaju mjerenje, a potom i optički parametri i debljina uzorka. Metodom se određuju dielektrična svojstva kao što je indeks loma svjetlosti tankih slojeva, apsorpcijski koeficijent i debljina sloja.¹³

Važno je napomenuti da je elipsometrijom moguće prikupiti informacije o slojevima čija je debljina manja od valne duljine svjetlosti kojom se ispituje uzorak. Upravo zato koristi se za karakterizaciju biofunkcionalnih slojeva na supstratima čije su debljine od nekoliko angstrema do nekoliko mikrometra. Budući da se ovom metodom mjeri omjer intenziteta svjetlosti koja se reflektira o površinu tehnika nije destruktivna što ju čini korisnom za karakterizaciju mekih slojeva.

Blacklock¹⁴ i suradnici promatrali su rast polielektrolitnih višeslojeva, pripremljenih SPS metodom. Elipsometrijskim mjerenjima su pokazali linearan rast višeslojeva plazmidske DNA i hiperrazgranatog poli(amido amina) u otopinama niske koncentracije soli i eksponencijalni rast u otopina visoke koncentracije soli. Također, potvrdili su raspad slojeva u reducirajućim uvjetima *in situ* elipsometrijom. Cilj istraživanja je bio otvoriti put ka boljem razumijevanju stanične adhezije.

3.1.2. Spektroskopija ultraljubičastog i vidljivog zračenja

Spektroskopija ultraljubičastog i vidljivog zračenja (eng. *Ultraviolet-Visible Spectroscopy*, UV-Vis) je metoda kojom se karakteriziraju molekule koje apsorbiraju i mogu biti pobuđene energijom zračenja valnih duljina od približno 190 nm do 750 nm. Takve molekule imaju π -konjugirane sustave, odnosno elektrone u veznim (π) i neveznim (n) orbitalama.

UV-Vis spektroskopija najčešće se koristi kao analitička metoda za određivanje koncentracije pojedine vrste u vodenoj otopini. Koncentracija analita se određuje Beer-Lambertovim zakonom:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c L \quad (2)$$

gdje je A apsorbanacija, I_0 intenzitet upadnog zračenja za danu valnu duljinu, I intenzitet transmitiranog zračenja, L duljina kivete, c množinska koncentracija analita i ϵ molarni apsorpcijski koeficijent tvari koja se ispituje. U kvantitativnoj analizi se u pravilu uzima vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta pri maksimumu apsorpcije kako bi se smanjila nesigurnost valnih duljina kojima se obasjava uzorak. Osim kvantitativne analize, ova se spektroskopska metoda koristi za određivanje apsorpcijskih spektara za sustave čiji molarni apsorpcijski koeficijent nije poznat.¹³

UV-Vis spektroskopijom moguće je pratiti rast polielektrolitnih višeslojeva te optimizirati uvjete njihovog rasta. Kontrola debljine polielektrolitnih višeslojeva dobivenih sloj-po-sloj metodom je moguća jer se praćenjem apsorpcije može odrediti broj potrebnih ciklusa adsorpcije polielektrolita za željenu debljinu sloja.¹⁵ Osim debljine, O. Mermut i C. J. Barrett su istom metodom istražili utjecaj ispiranja, na stabilnost polielektrolitnih višeslojeva. A. Foster i M. C. DeRosa¹⁶ su UV-Vis metodom pokazale da polielektrolitni višeslojevi kitozan/hijaluronan rastu linearno, a ne eksponencijalno kao što se za taj sustav ranije mislilo.

3.1.3. Optička reflektometrija

Optička reflektometrija omogućuje kontinuirano i kvantitativno mjerenje količine adsorbiranih tvari na ravnoj i glatkoj površini. Reflektometrijom je moguće pratiti adsorpciju i desorpciju polielektrolitnih višeslojeva na pločici na koju pada linearno polarizirana svjetlosna zraka. Svjetlosna zraka se potom reflektira i dolazi do optičkog elementa koji rastavlja na paralelnu i okomitu komponentu. Intenziteti tih komponenti mogu se kontinuirano prati, a nakon adsorpcije sloja omjer intenziteta komponenata se mijenja zbog promjene indeksa loma svjetlosti. Promjena u fazi između upadne i reflektirane zrake posljedica je različitih indeksa loma svjetlosti na granicama otopina/sloj i sloj/pločica.

Promjena polarizacije mjeri se detekcijom intenziteta paralelne I_p i okomite I_p komponente reflektirane polarizirane svjetlosti. Omjer njihovih intenziteta naziva se signalom S_0 , a promjena ΔS je direktno proporcionalna masi adsorbiranoj na površini

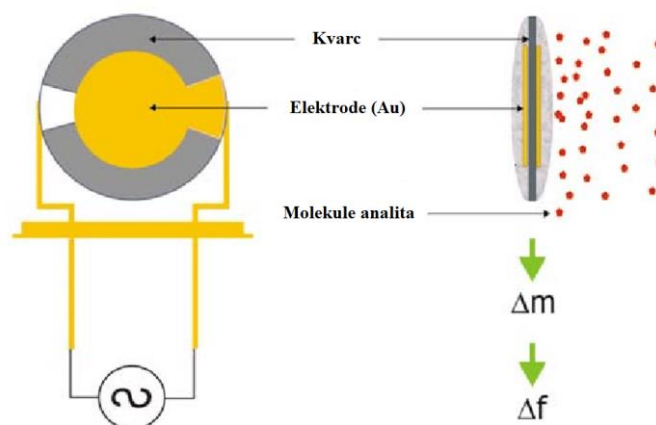
$$\Gamma = \frac{\Delta S}{S_0} \frac{1}{A_s} \quad (3)$$

A_s se naziva faktor osjetljivosti i ovisi o indeksima loma svjetlosti, Brewsterovom kutu, debljini sloja i indeksu refleksijskog pomaka. Važno je napomenuti da će osjetljivost metode biti to veća što je razlika u indeksima loma svjetlosti veća. Najjednostavniji način da se taj uvjet ostvari je odabir takve površine čiji je indeks loma svjetlosti velik, obično pločica silicijeva dioksida.

3.2. Strukturne metode

3.2.1. Kvarc-kristalna mikrovaga

Kvarc-kristalna mikrovaga (eng. *Quartz Crystal Microbalance*, QCM)² je tehnika kojom se prati promjena mase uslijed adsorpcije na površinu kristala kvarca, prikazano shemom na slici 6. Tehnika se temelji na piezoelektričnom efektu, odnosno električnom odgovoru kristala na mehanički podražaj. S druge strane primjenom električnog polja u kojem je kristal, izazivanju se mehaničke oscilacije koje stvaraju transverzalni akustični val karakteristične rezonantne frekvencije (f_0) kristala.



Slika 6. Shema kvarc-kristalne mikrovage.¹⁷

Uslijed adsorpcije tankog sloja na površinu kristala akustični val propagira i u taj sloj, čime je rezonantna frekvencija promijenjena u odnosu na kristal bez tog sloja. Sustav nakon adsorpcije ima veću valnu duljinu rezonantnog vala i time manju rezonantnu frekvenciju u odnosu na kristal bez sloja. Promjena rezonantne frekvencije i debljina adsorbiranog sloja omogućuju određivanje promjene mase Sauerbreyevom jednadžbom:

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\mu_q \rho_q}} \quad (4)$$

gdje je Δf izmjerena promjena rezonantne frekvencije, f_0 je rezonantna frekvencija kristala, Δm promjena mase, A aktivna površina piezoelektričnog kristala, μ_q modul smicanja i ρ_q gustoća kristala kvarca.

Sauerbreyeva jednadžba vrijedi za takve sustave u kojima su na površini slojevi uniformno raspoređeni, neporozni i čvrsti. Meki filmovi guše rezonantnu frekvenciju te izmjerena promjena frekvencija postaje manja i sukladno s tim daje manju adsorbiranu masu. Također, otvoreno je i pitanje adsorpcije u otapalu. Solvatirana površina dat će veću promjenu u rezonantnoj frekvenciji, odnosno veću masu. Ipak, moguće je uvesti korekciju, faktor rasipanja za određenu debljinu sloja.

Deligöz i Tieke¹⁸ promatrali su pripremu polielektrolitnih višeslojeva i njihov unos/otpuštanje lijekova, kao što je ibuprofen (IBF), kvarc-kristalnom mikrovagom s disipacijom. Pokazali su da je uslijed 10 uzastopnih adsorpcija bislojeva kationskih i anionskih polielektrolita promjena frekvencije linearna što upućuje na linearni rast. Također su uspješno pratili unos IBF-a u slojeve te ovisnost unosa lijeka o pH pri kojem je višesloj pripravljan. Jasno je da je ova metoda korisna istraživanju dostave lijekova pomoću višeslojeva.

3.2.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti

Dinamičko raspršenje svjetlosti (eng. *Dynamic Light Scattering*, DLS)^{19,20} ili kvazielastično raspršenje svjetlosti je metoda kojom se određuje hidrodinamički promjer čestica od nekoliko nanometara do mikrona. Dispergirane čestice u otopini gibaju se Brownovim gibanjem. Uslijed sudara s molekulama otapala manje se čestice gibaju brže nego one većih dimenzija te imaju veće brzine. Ovisnost brzine i veličine čestice dan je Stokes-Einsteinovom jednadžbom:

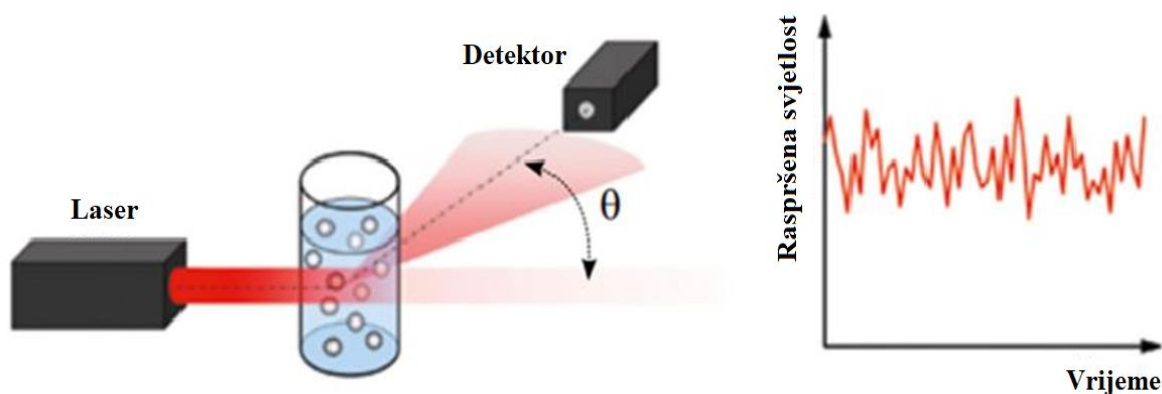
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (5)$$

gdje je D difuzijski koeficijent, k_B Boltzmannova konstanta, T termodinamička temperatura, η viskoznost otapala i R_H hidrodinamički promjer. Dinamičkim raspršenjem svjetlosti mjeri se difuzijski koeficijent koji se povezuje sa hidrodinamičkim promjerom. Hidrodinamički promjer je promjer hipotetske čvrste sfere koja se giba istom brzinom kao i čestica koja se u tom trenutku promatra. U koloidnoj kemiji rijetko je promatrani sustav sastavljen od čvrstih sfera jer su

koloidne čestice solvativirane. Slojevi adsorbiranih polielektrolitnih lanaca na tvrdoj sferi biti će u vodenoj otopini deblji nego kad su te čestice osušene.

Stokes-Einsteinova jednadžba primjenjiva je samo u slučajevima Brownovog gibanja. Čestice koje sedimentiraju imaju usmjereno, a ne više nasumično gibanje zbog čega je od velike važnosti da promatrani sustav bude stabilan. Također, male čestice ne raspršuju dovoljno svjetlosti pa ih ponekad nije moguće detektirati.

Osnovni postav DLS instrumenta prikazan je na slici 7. Monokromatska svjetlost lasera dolazi do kivete s uzorkom i raspršuje se na česticama u svim smjerovima. Raspršena svjetlost detektira se na pod određenim kutom tijekom vremena i taj se signal koristi za određivanje difuzijskog koeficijenta i hidrodinamičkog promjera.



Slika 7. Pojednostavljena shema mjerenja hidrodinamičkog promjera nanočestica i ovisnost raspršenja svjetlosti u vremenu.²¹

Intenzitet svjetlosti fluktuirao ovisno o veličini, odnosno brzini čestica. Veća fluktuacija intenziteta svjetlosti događa se refleksijom na manjim česticama. Signal na detektoru interpretira se pomoću korelacijske funkcije koja u suštini opisuje koliko je dugo neka čestica stajala na nekom mjestu. Korelacijska funkcija eksponencijalno iščezava kad postoji razlika u položaju čestice u odnosu na prethodni, početni položaj. Ako ne postoji razlika između početnog položaja, korelacijska funkcija pokazuje linearno ponašanje. Drugim riječima, korelacijska funkcija manje čestice brže iščezava.

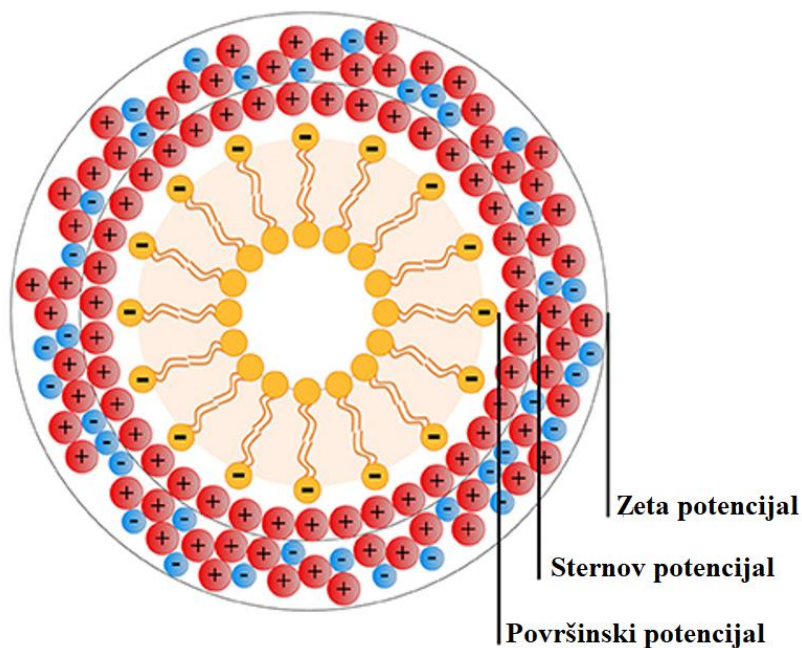
Lui²² i suradnici su DLS metodu koristili za karakterizaciju i optimizaciju procesa sinteze šupljih nanokapsula. Nanokapsule su sintetizirali naizmjeničnom adsorpcijom polisaharida, kitozana (polikationa) i karagena (polianion), na nanočestice silicijeva oksida.

Dobivena raspodjela veličina čestica ukazala je na agregaciju uslijed dodavanja polielektrolita u suspenziju čestica. Obrnuto, dodavanjem suspenzije čestica u otopinu polielektrolita, raspodjela veličine čestica znatno je uža. Lui²² i suradnici predlažu da je razlog šire raspodijele premošćivanje polielektrolita između više čestica. Nanokapsule su uspješno sintetizirane tek nakon što je primijenjen navedeni redoslijed miješanja otopina. Pokazano je i da hidrodinamički promjer nanokapsula sa 5 bislojeva, završno s polianionom, ovisi o pH.

Kovačević²³ i suradnici dinamičkim su raspršenjem pratili adsorpciju polielektrolita na nanočestice cerijeva oksida. Mjerenjem hidrodinamičkog promjera sa i bez polielektrolitne presvlake procijenjena je adsorpcijska gustoća Ohshima modelom.

3.2.3. Mikroelektroforeza

Mikroelektroforezom^{20,21} se određuje elektrokinetički ili zeta potencijal na kliznoj plohi koloidne čestice koja se giba u električnom polju. Ta ravnina nalazi se negdje u difuznom sloju koji se sastoji od unutarnjeg, Sternovog, sloja i vanjskog difuznog sloja. Sternov sloj sastoji se od iona suprotnog naboja od naboja čestice koja može biti npr. oksid metala ili čestica na koju je adsorbiran polielektrolit. Vanjski difuzni sloj sastoji se od iona i pozitivnog i negativnog naboja. Elektrostatski utjecaj površine se smanjuje prema kraju difuznog sloja prema Debyeovom zakonu, odnosno za svaku udaljenost od jedne Debayeve duljine potencijal se smanjuje za faktor $1/e$. Kako se ionska jakost povećava, Debayeve duljina postaje sve manja, a potencijal brže iščezava. Dakle, unutar difuznog sloja nalazi se hipotetska ploha koja djeluje kao međupovršina između čestice koja se giba u vanjskom električnom polju i disperznog sredstva. Tu plohu nazivamo kliznom plohom, a česticu okruženu disperznim sredstvom, elektrokinetičkom jedinicom.



Slika 8. Model elektrokinetičke jedinice u vanjskom električnom polju. Čestica je u vodenom mediju negativno nabijena. Ovdje je čestica negativnog naboja i predstavlja sustav negativno nabijenih fosfolipida.²⁴

Eksperimentalno, zeta potencijal nije moguće direktno izmjeriti nego ga se računa iz izmjerene elektroforetske pokretljivosti dane izrazom:

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (6)$$

gdje je v brzina čestice, a E jakost vanjskog električnog polja. Odnos elektroforetske pokretljivosti i zeta potencijala ovisi o modelu koji se koristi. Koji je model primjereno koristiti ovisiti će o umnošku radijusa zakrivljenosti čestice i Debyeve duljine. Hückelov model opisuje čestice kao vrlo mali sferni naboj, kad je κr puno manji od jedan pa je ovisnost zeta potencijala dana jednadžbom:

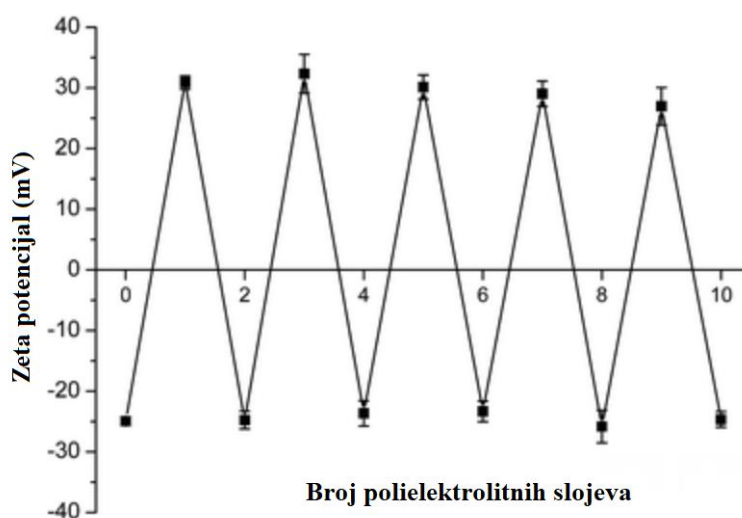
$$\mu = \frac{2\zeta\epsilon}{3\eta} \quad (7)$$

gdje je η viskoznost otapala, a ε permitivnost. Hückelova jednadžba vrijedi za čestice s debelim difuznim slojem. S druge strane kad je κr značajno veći od jedan, vrijedi aproksimacija Smoluchowskog. Veza zeta potencijala i elektroforetske pokretljivosti tada je dana izrazom:

$$\mu = \frac{\zeta \varepsilon}{\eta} \quad (8)$$

Za čestice prekrivene polielektrolitima u pravilu vrijedi aproksimacija Smoluchowskog.

Dvije su uloge zbog kojih je elektrokinetički potencijal važan parametar karakterizacije. Prvo, govori o predznaku naboja elektrokinetičke jedinice. Na temelju predznaka elektrokinetičkog potencijala može se zaključiti je li došlo do adsorpcije suprotno nabijenog polielektrolita. Uslijed uspješne adsorpcije polielektrolita, predznak elektrokinetičkog potencijala mora se promijeniti. Fan²⁵ i suradnici koristili su ovu metodu i pokazali uspješnu adsorpciju polielektrolitnih višeslojeva, a rezultat je prikazan na slici 9.

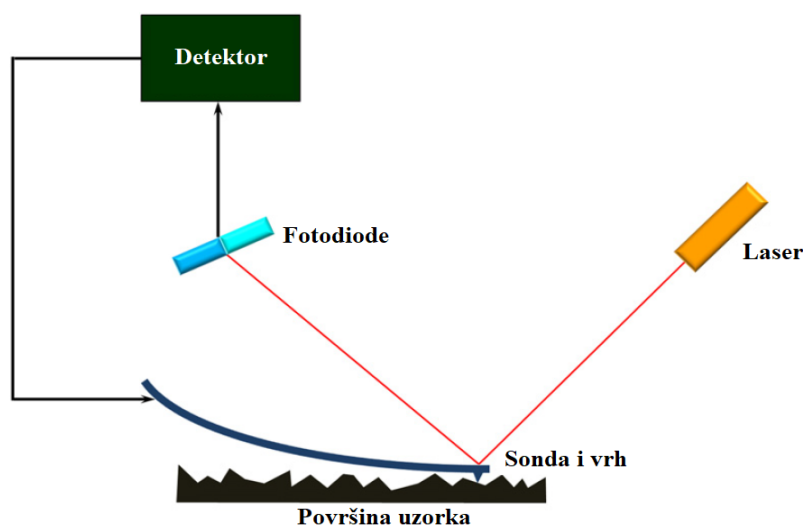


Slika 9. Ovisnost zeta potencijala o broju polielektrolitnih slojeva u višesloju.²⁵

Drugo, govori o stabilnosti koloidne otopine. Koloidni sustavi su u pravilu stabilni što im je apsolutni iznos elektrokinetičkog potencijala veći.

3.2.4. Mikroskopija atomskih sila

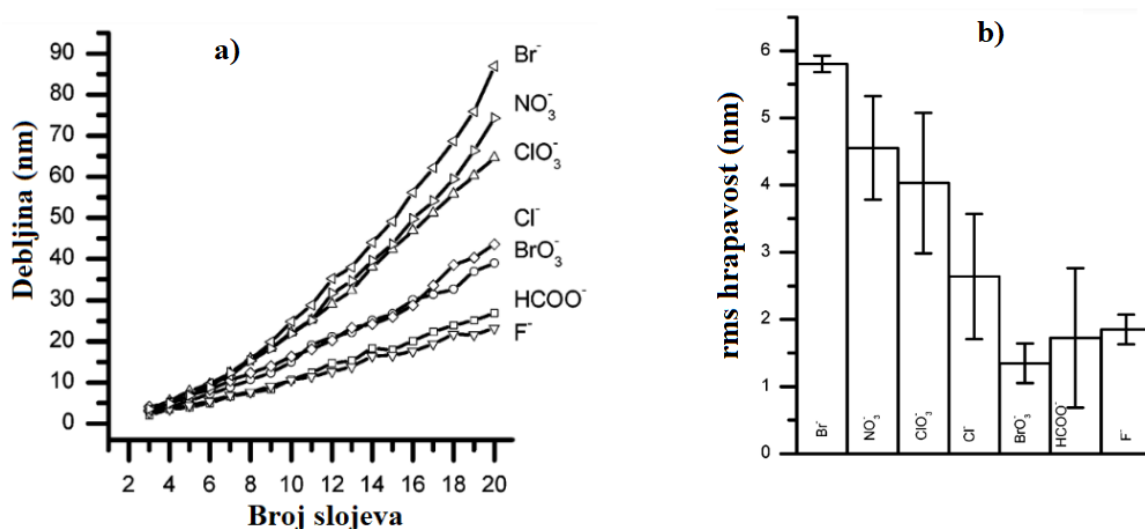
Mikroskopija atomskih sila (eng. *Atomic Force Microscopy*, AFM)¹³ koristi se za karakterizaciju materijala u kemijskoj, prehrambenoj, farmaceutskoj industriji, industriji plastike i poluvodiča. Informacije o uzorku prikupljaju se dodirivanjem uzorka mehaničkom sondom, oštrog vrha čiji je promjer velik tek nekoliko nanometara. Sonda se pomiče preko materijala i prikuplja informacije o termičkim, mehaničkim i morfološkim svojstvima kao i o hrapavosti površine. Za vrijeme karakterizacije materijala mjere se atomske sile između vrha sonde i uzorka od kud i naziv mikroskopija atomskih sila. Sile između vrha sonde i uzorka koji se ispituje tjeraju sondu na titranje prema Hookovom zakonu. Otklon od ravnotežnog položaja se mjeri laserom. Zraka svjetlosti reflektira se o površinu sonde prema fotodiodama i konačno u detektor kao što je prikazano na slici 10.



Slika 10. Pojednostavljeni shema rada mikroskopa atomskih sila.

Ovisno o informaciji koja se traži, odabire se koju silu se mjeri AFM-om. Ta sila može biti mehanička, van der Waalsova, kapilarna, elektrostatska, magnetna i tako dalje. Usprkos kratkoj povijesti AFM je postala esencijalna metoda za slikanje površine, poglavito na nanometarskoj skali.

Za polielektrolitne višeslojeve najvažniji podatak koji se dobiva ovom metodom je topološki opis, hrapavost površine i debljina sloja. Debljina tankih slojeva može se pratiti i *in situ* pri čemu se vrh sonde koristi za grebanje površine. Nakon što se površina zagrebe i nastane udubina u sloju, sonda se pomiče preko tog područja i određuje se dubina ogrebotine. Slično, ispitan je i utjecaj različitih iona na debljinu polielektrolitnih višeslojeva. Salomäki²⁶ i suradnici pokazali su da je debljina polielektrolitnih višeslojeva u skladu s pozicijom protuiona u Hofmeisterovoj seriji. Mjerenja AFM-om potvrdili su elipsometrijom i prikazana su na slici 11.



Slika 11. a) Elipsometrijsko određivanje debljine polielektrolitnih slojeva ovisno o protuionima i b) određivanje hrapavosti površine AFM-om²⁶

AFM tehnika nije samo ograničena na karakterizaciju ravnih površina. Ovom metodom moguća je i karakterizacija mikrokapsula.²⁷ Ulazak u stanicu i potencijalna dostava terapije biti će lakša ako je deformacije mikrokapsule moguća. Konstantu elastičnosti mikrokapsula određuje se nakon njihove adsorpcije na neki supstrat. Sonda vrhom vrši silu na mikrokapsulu te se sila mjeri na temelju otklona sonde.¹

§ 4. ZAKLJUČAK

Pregledom primjena sloj-po-sloj metode jasno je da velik interes proizlazi iz jednostavnosti pripreme dobro definiranih površina te velike raznolikosti sintetiziranih materijala. Primjena višeslojne presvlake u svrhu zaštite od korozije omogućena je inhibitorima korozije koji su građevni elementi te presvlake dobivene SPS metodom. Antibakterijsko svojstvo polielektrolitnih presvlaka postiže se imobilizacijom antibiotika unutar višeslojeva. SPS metodom se također pripremaju se biomimetički sustavi zahvaljujući višeslojevima koji kontroliraju interakcije stanica s okolinom. Izgledan je razvoj budućih istraživanja u ovom području s ciljem optimiziranja pripreme šupljih nanosfera kao dostavnih sustava za terapije.

U ovom radu prikazane su metode karakterizacije koje se najčešće koriste u suvremenim istraživanjima višeslojeva, a podijeljene su na spektroskopske i strukturne. Od spektroskopski metoda odabrane su elipsometrija, reflektometrija i spektroskopija ultraljubičastog i vidljivog zračenja. Elipsometrija i reflektometrija se temeljene na promatranju promjene polarizacije svjetlost dok je za UV/Vis spektroskopiju važna apsorpcija svjetlosti. Strukturnim metodama određuje se primarno debljina višeslojeva, bilo na ravnim površinama (mikroskopijom atomskih sila i kvarc-kristalnom mikrovagom) ili na zakrivljenim nanočesticama (dinamičko raspršenje svjetlosti). Osim na temelju promjene veličine čestice, adsorpciju polielektrolitnog sloja na prethodni višesloj ili česticu moguće je potvrditi mikroelektroforezom. Od svih navedenih metoda, najvažnija je mikroskopija atomskih sila zbog velike raznolikosti oblika materijala koje se njome istražuju.

§ 5. LITERATURNI IZVORI

1. Zhao, S., Caruso, F., Dahne, L., Decher, G., De Geest, B. G., Fan, J., Feliu, N., Gogotsi, Y., Hammond, P. T., Hersam, M.C., Khademhosseini, A., Kotov, N., Loporatti, S., Li, Y., Lisdat, F., Liz-Marzán, L. M., Moya, S., Mulvaney, P., Rogach, A. L., Roy, S., Shchukin, D. G., Skirtach, A. G., Stevens, M. M., Sukhorukov, G. B., Weiss, P. S., Yue, Z., Zhu, D., Parak, W. J. *ACS Nano* **13**(6) (2019) 6151-6169.
2. De Villiers, M. M., Otto, D. P., Strydom, S. J., & Lvov, Y. M., *Adv. Drug Deliver Rev.* **63** (2011) 701-715.
3. Richardson, J. J., Cui, J., Björnmalm, M., Braunger, J. A., Ejima, H., Caruso, F., *Chem. Rev.*, **23** (2016) 14828-14867.
4. Andreeva, D. V., Fix, D., Möhwald, H., & Shchukin, D. G., *J. Mater. Chem.*, **18** (2008) 1738-1740.
5. Shchukin, D. G., Lamaka, S. V., Yasakau, K. A., Zheludkevich, M. L., Ferreira, M. G. S., & Möhwald, H., *J. Phys. Chem. C*, **112**(4) (2008) 958-964.
6. Shchukin, D. G., Shchukina, E., *Current Opinion in Pharmacology*, **18** (2014) 42–46.
7. Muzzio, N. E., Pasquale, M. A., Diamanti, E., Gregurec, D., Moro, M. M., Azzaroni, O., & Moya, S. E., *Mater. Sci. Eng. C*, **80** (2017) 677-687.
8. Moskowitz, J. S., Blaisse, M. R., Samuel, R. E., Hsu, H. P., Harris, M. B., Martin, S. D., Hammond, P. T. **31**(23) (2010) 6019-6030.
9. Muzzio, N. E.; Gregurec, D.; Diamanti, E.; Irigoyen, J.; Pasquale, M. A.; Azzaroni, O.; Moya, S. E. *Adv. Mater. Interfaces*, **4** (2017) 1600126.
10. Kotov, N. A.; Liu, Y. F.; Wang, S. P.; Cumming, C.; Eghtedari, M.; Vargas, G.; Motamedi, M.; Nichols, J.; Cortiella, J., *Langmuir*, **20** (2004) 7887–7892.
11. Lindon, J. C., Tranter, G. E., & Koppenaal, D. (2016). *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. Academic Press. str. 475.
12. Airaksinen, V. M., *Handbook of Silicon Based MEMS Materials and Technologies* William Andrew Publishing, str. 381-390.
13. H. Wang, P. K. Chu, *Surface Characterization of Biomaterials*, Elsevier, 2013, str 105-161.

14. Blacklock, J., Vetter, A., Lanckenau, A., Oupický, D., Möhwald, H. *Biomaterials*, **31**(27) (2010) 7167-7174.
15. Mermut, O., & Barrett, C. J. *Analyst*, **126**(11), (2001) 1861-1865.
16. Foster, A., & DeRosa, M. C., *Polymers*, **6**(5), (2014). 631-1654.
17. Saraoğlu, H. M., Selvi, A. O., Ebeoğlu, M. A., & Taşaltın, C., *IEEE Sensors Journal*, **13**(11), (2013) 4229-4235.
18. H. Deligöz, B. Tieke, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **441** (2014) 725– 736.
19. Carvalho, P. M., Felício, M. R., Santos, N. C., Gonçalves, S., & Domingues, M. M. (2018). *Front. Chem*, **6**, (2018) 237.
20. Bhattacharjee, S., *J. Control. Release*, **235**, (2016) 337-351
21. wiki.anton-paar.com preuzeto 25. 06. 2020.
22. Liu, Y., Yang, J., Zhao, Z., Li, J., Zhang, R., Yao, F., *J. Colloid Interface Sci*, **379**(1), (2012) 130-140.
23. Brkljača, Z., Lešić, N., Bertović, K., Dražić, G., Bohinc, K., & Kovačević, D. *J. Phys. Chem. C*, **122**(48), (2018) 27323-27330.
24. Carvalho, P. M., Felício, M. R., Santos, N. C., Gonçalves, S., Domingues, M. M. *Front. Chem*, **6**, (2018) 237.
25. Fan, J., Liu, Y., Wang, S., Liu, Y., Li, S., Long, R., Kankala, R. K., *RSC Advances*, **7**(52), (2017) 32786-32794.
26. D. J. Shaw, *Introduction to Colloid & Surface Chemistry*, Butterworth Heinemann, Oxford, 1992, str. 174–199.
27. Lobo, R. F. M., Pereira-da-Silva, M. A., Raposo, M., Faria, R. M., & Oliveira Jr, O. N., *Nanotechnology*, **10**(4), (1999) 389.