Warszawa, dn. 27.06.2016

mgr Agnieszka Świetlikowska

Pracownia Elektrochemii

Zakład Chemii Fizycznej

Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Autoreferat rozprawy doktorskiej

***„Redukowany tlenek grafenu jako podłoże dla enzymów”***

Tytuł w języku angielskim: “Reduced graphene oxide as a support for enzymes”

Promotor: dr hab. Barbara Pałys, prof. UW

Współczesny świat wykorzystuje najnowocześniejsze technologie elektroniczne i staje się coraz bardziej uzależniony od nowych źródeł energii. Rozwój innowacyjnych technologii wiąże się z nieustannym poszukiwaniem materiałów o coraz lepszych właściwościach. Duże zainteresowanie wzbudza grafen, ze względu na swoje nieprzeciętne właściwości fizykochemiczne.

Warstwa grafenowa zbudowana jest z sześcioczłonowych pierścieni aromatycznych i jednocześnie jest substancją przeźroczystą, która nie przepuszcza gazów. Elektrony w grafenie posiadają w temperaturze pokojowej bardzo wysoką ruchliwość. Grafen jest sto razy twardszy od stali i bardzo elastyczny.

W pracy doktorskiej pt. „Redukowany tlenek grafenu jako podłoże dla enzymów” przedstawiłam problematykę, dotyczącą zastosowania różnych from tlenku grafenu (GO), na którego warstwach unieruchamiałam enzymy. Tematyka rozprawy obejmuje przedstawienie współczesnego stanu wiedzy na temat GO, ze szczególnym uwzględnieniem biosensorów, opartych na podłożu grafenowym. Problematyka pracy dotyczy możliwości zastosowania redukowanego GO do konstrukcji biosensorów. Praca przedstawia potencjalne metody wpływania na skład chemiczny warstw redukowanego GO przez jego częściową redukcję lub kondycjonowanie w wodzie amoniakalnej. Warstwy GO, redukowane w różnym stopniu, zostały zastosowane jako podłoża do unieruchomienia enzymów modelowych – lakazy (Lac) i peroksydazy chrzanowej (HRP).

Podstawowymi technikami pomiarowymi, stosowanymi w niniejszej pracy były techniki woltamperometryczne, uzupełnione przez wyniki otrzymane za pomocą spektroskopii oraz mikroskopii w podczerwieni. Zmiany struktury i morfologia powierzchni próbek obrazowana była z zastosowaniem mikroskopii elektronowej oraz spektroskopii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS).

W części literaturowej rozprawy opisałam strukturę i właściwości grafenu oraz GO. Przytoczyłam przykłady metod otrzymywania grafenu, jak na przykład otrzymywanie grafenu z zastosowaniem epitaksji z fazy gazowej. Poruszyłam temat proponowanych zastosowań grafenu, zarówno komercyjnych jak i opisywanych w literaturze naukowej.

Istotnym elementem literaturowej części rozprawy jest opis technik otrzymywania tlenku grafitu, prekursora GO. Próbę wytłumaczenia struktury i otrzymania prekursora GO opracowywali m.in.: Brodie, Staudenmaier, Hofmann, Ruess, Scholz-Boehm, Nakajima-Matsuo, Lerf-Klinowski, Dekany, Tour oraz Hummers i Offeman. Hummers i Offeman zaprezentowali jedną z najbezpieczniejszych i najprostszych metod otrzymywania tlenku grafitu. Obecnie, modyfikowana metoda Hummera-Offemana, jest szeroko stosowana w badaniach naukowych.

W przeprowadzonych doświadczeniach, opisanych w rozprawie, posługiwałam się zmodyfikowaną metodą Hummera-Offemana w celu otrzymania GO. Synteza zmodyfikowaną metodą Hummersa – Offemana pozwoliła wprowadzić ugrupowania zawierające tlen, na powierzchnię warstw grafenowych. Powstałymi na powierzchni warstw grafenowych grupami tlenowymi były grupy: hydroksylowe, karbonylowe i epoksydowe.

Porównałam dwie metody redukcji GO – metodę chemiczną, wykorzystującą substancje silnie redukujące np. borowodorek sodu (NaBH4) lub hydrazynę (N2H4), z metodą elektrochemiczną. Metoda elektrochemiczna, wykorzystująca techniki woltamperometrii cyklicznej i liniowej, okazała się procesem szybkim, prowadzącym do całkowitej lub częściowej redukcji GO.

Kontrola procesu elektroredukcji GO, podczas wykonywania eksperymentów przedstawionych w rozprawie, stanowiła istotną zaletę wobec redukcji chemicznej. Elektroredukcja GO prowadziła do bezpośredniego otrzymania elektrody o podłożu z redukowanego GO i przebiegała w łagodnych warunkach pomiarowych. W części doświadczalnej metoda elektrochemicznej redukcji pozwoliła otrzymać redukowany GO, co usprawniło realizację kolejnych etapów projektowania, wytwarzania oraz optymalizacji biosensorów opartych na enzymach takich, jak lakaza oraz peroksydaza chrzanowa. Opracowane metody detekcji przeznaczone były do wykrywania tlenu (lakaza) oraz nadtlenku wodoru (peroksydaza chrzanowa), które są szczególnie ważne w medycynie w diagnostyce nowotworów. Tkanka, w której rozwija się nowotwór, wydziela nieprawidłowe ilości tlenu oraz jego pochodnych. Sensor wykrywający obecność tlenu czy nadtlenku wodoru pozwala na wczesne zdiagnozowanie zmian patologicznych zachodzących np. w wątrobie.

Peroksydaza chrzanowa jest alfa-helikalnym białkiem z centrum aktywnym w postaci grupy hemowej, w której atom żelaza zawarty jest pośrodku pierścienia porfirynowego. W badaniach opisanych w rozprawie wykorzystywałam peroksydazę chrzanową typu *Amoracia rusticana*, która katalizuje redukcje nadtlenku wodoru do wody. Peroksydaza chrzanowa zawarta w biosensorach może być wysoce reaktywna wobec ludzkich komórek nowotworowych. Peroksydaza chrzanowa uczestniczy w unieczynnianiu reaktywnych form tlenu, które powstają w komórce żywej jako produkt metabolizmu tlenowego. Nadmierne ich generowanie prowadzi do uszkodzenia m.in. białek i kwasów nukleinowych.

Biosensorem opisanym w części doświadczalnej rozprawy, jest układ bazujący na peroksydazie chrzanowej unieruchomionej na redukowanym GO w celu stworzenia bioczujnika dla nadtlenku wodoru. HRP bezpośrednio, bez użycia mediatora, katalizowała redukcję nadtlenku wodoru zarówno dla całkowicie zredukowanego GO, jak również dla częściowo zredukowanego GO zaadsorbowanego na powierzchni węgla szklistego. Enzym unieruchomiony na powierzchni częściowo zredukowanego GO pozwalał na otrzymanie wyższych sygnałów prądowych w porównaniu z powierzchnią całkowicie zredukowaną.

W części eksperymentalnej wykorzystywałam lakazę typu *Trametes versicolor*, która redukuje molekularny tlen do dwóch cząsteczek wody, przy czym, zdolna jest wymieniać elektrony bezpośrednio z powierzchnią elektrody. Katalityczna aktywność lakazy, względem odpowiednich substratów, jest tym wyższa, im wyższy jest potencjał redoks centrum T1 enzymu. Dla większości lakaz, wartość potencjału redoks centrum T1 znajduje się w przedziale 430 - 780 mV względem normalnej elektrody wodorowej.

Lakaza, unieruchomiona na podłożu z elektrochemicznie redukowanego tlenku grafenu (ERGO) zaadsorbowanego na powierzchni elektrody z węgla szklistego (GC), katalizowała redukcję tlenu, bez udziału mediatora, przy potencjale +0,6 V vs Ag / AgCl. Enzym rozpuszczony w roztworze elektrolitu podstawowego katalizował redukcję tlenu przy 0,25V. Częściowo zredukowany GO pozwala na osiągnięcie wyższych prądów katalitycznych enzymatycznej redukcji tlenu dzięki obecności części grup hydroksylowych, pozostających na powierzchni po elektrochemicznej redukcji. Powierzchniowe grupy hydroksylowe są w stanie pośredniczyć w transporcie elektronów pomiędzy centrum aktywnym lakazy a powierzchnią elektrody.

Powierzchniowe grupy tlenowe obecne w GO i ERGO ułatwiły dalsze modyfikacje powierzchni tych materiałów poprzez ich kondycjonowanie w wodzie amoniakalnej celem wprowadzenia na powierzchnię aminowych grup funkcyjnych. Kondycjonowanie w wodzie amoniakalnej poprawiało trwałość zaadsorbowanej na powierzchni GC warstwy GO, a także usprawniało proces elektroredukcji tej warstwy.

Sposób osadzania GO na powierzchni (np. poprzez „nakroplenie” GO na powierzchnie elektrody GC i wysuszenie) ma wpływ na przebieg odpowiedzi woltamperometrycznej w czasie procesu redukcji. Proces elektroredukcji cienkich warstw GO zachodził stopniowo, warstwa po warstwie grafenowej.

Widma w podczerwieni potwierdziły zmianę składu powierzchni GO po jej kondycjonowaniu w wodzie amoniakalnej. W wyniku kondycjonowania następuje reakcja chemiczna między zaadsorbowaną wodą amoniakalną a grupami epoksydowymi występującymi na powierzchni GO. W rezultacie na powierzchni GO tworzą się grupy funkcyjne, zawierające azot. W wyniku kondycjonowania GO w wodzie amoniakalnej zmalała ilość powierzchniowych grup tlenowych na powierzchni warstw GO. Obserwację tą potwierdziły wyniki analizy EDS. Po kondycjonowaniu GO w wodzie amoniakalnej wzrósł stosunek atomowy C:O. Woda amoniakalna, wchodząc w reakcję z podłożem, prawdopodobnie częściowo zredukowała powierzchniowe grupy tlenowe obecne na powierzchni warstwy GO. Pomiary technikami mikroskopii elektronowej pozwoliły stwierdzić, że silna adsorpcja wody amoniakalnej na powierzchni warstw GO nie niszczy struktury warstw.

Zaobserwowałam, że najlepszy, spośród badanych, układ do redukcji nadtlenku wodoru zawiera warstwy kondycjonowanego w wodzie amoniakalnej GO, na których zaadsorbowałam mieszaninę 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo)karbodiimidu (EDC) oraz imidu kwasu N-hydroksybursztynowego (NHS) (podłoże opisane skrótem: EDC/NHS/NH3/GO/GC). Początek fali redukcji nadtlenku wodoru na podłożu EDC/NHS/NH3/GO/GC zaczyna się w dodatnich wartościach potencjału przy 0,23 V vs Ag/AgCl. Proces redukcji jest stopniowy z wyraźną odpowiedzią prądową. Fakt ten, potwierdziły pomiary chronoamperometryczne. Pomiary w podczerwieni oraz techniką mikroskopii elektronowej wykazały, że woda amoniakalna zaadsorbowała się na powierzchni układu EDC/NHS/NH3/GO/GC, a kondycjonowanie nie spowodowało wystąpienia defektów strukturalnych.

Podłoże, zawierające warstwy redukowanego GO kondycjonowanego w wodzie amoniakalnej, na którym zaadsorbowałam mieszaninę EDC/NHS oraz peroksydazę chrzanową (podłoże opisane skrótem: HRP/EDC/NHS/NH3/ERGO/GC), wykazywało aktywność elektrochemiczną względem nadtlenku wodoru przy potencjale zależnym od stopnia redukcji GO. Najwyższe wartości natężenia prądu redukcji nadtlenku wodoru pojawiły się dla niecałkowicie zredukowanego GO w układzie HRP/EDC/NHS/NH3/ERGO/GC. Woltamperogramy cykliczne potwierdziły, że peroksydaza chrzanowa pozostaje elektrochemicznie aktywna na powierzchni EDC/NHS/NH3/ERGO/GC.

Przedstawione badania są szczególnie ważne dla stworzenia możliwości powtarzalnej produkcji elektrod do biosensorów czułych na obecność nadtlenku wodoru lub tlenu. Uzyskane w części eksperymentalnej wyniki mogą przyczynić się do wprowadzenia do powszechnego stosowania nowych, efektywnych czujników, bazujących na GO. Opracowane elektrody mogą być konkurencyjnymi narzędziami analitycznymi wobec technik wymagających kosztownej i skomplikowanej aparatury.

Należy podkreślić, że niniejsza praca wpisuje się w nowatorski nurt badań, dotyczących biosensorów z warstwami grafenowymi. Głównym elementem nowości naukowej w przeprowadzonych badaniach jest kondycjonowanie różnych form GO w wodzie amoniakalnej w celu wprowadzenia azotowych grup powierzchniowych na powierzchnię warstw grafenowych. Wykazałam ponadto, że stopień redukcji GO jest bardzo istotny dla działania enzymów unieruchomionych na powierzchni.

Wyniki, zawierające elementy mojej pracy doktorskiej, zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Należą do nich: Electrochimica Acta oraz Journal of Physical Chemistry C. Kolejną część badań zamierzam opublikować w najbliższym czasie.