

SISTEME NANOSTRUCTURATE PENTRU IDENTIFICAREA DE ANTIGENE VIRALE CU UTILIZARI IN DIAGNOSTICUL MEDICAL

Acronim: VIRNANO, Contract nr. D1 1034 /2007

Etapa III

Prezentarea și optimizarea modelelor experimentale propuse în scopul evidențierii unor complecși moleculari

REZUMAT

Au fost realizate sisteme de aur (Cr-Au) nanostructurat pe suport de sticla, cu depuneri de PMMA. Structurile realizate experimental au fost vizualizate prin SEM, observandu-se un chip cu patru nanostructuri. Prin difracție de raze X au fost caracterizate filme subțiri de aur pe substraturi diferite (Si, PS, Si poros, sticla). Din datele de reflectivitate s-a determinat variația rugozității funcție de grosimea filmului de aur depus.

Au fost stabilite condițiile optime de realizare a straturilor autoasamblate. Acestea au implicat depunerea de tioli pe 3 tipuri de straturi: straturi de aur depuse pe suport de sticla, straturi de aur depuse pe suport de sticla acoperita cu polistiren, sticla. Au fost obtinute structuri moleculare functionalizate pe strat de sticla silanizata cu 2 aminosilani: (3-aminopropil) trietoxisilan și [3(2-aminoetil) aminopropil] trimetoxisilan; utilizarea celui de-al doilea aminosilan pentru functionalizarea sticlei nu este citata in literatura de specialitate. Sinteza unui tiol, cu structura originala, a fost realizata prin reactia dintre monoclorotriazinil- β -ciclodextrina (sare de sodiu) și 11-mercaptoundecanamina. S-a facut caracterizarea fizico-chimica a 28 de structuri moleculare realizate, din care 4 au fost verificate in protocolul uzual de evidentiere a interactiunii ligand-receptor cu izotiocianat de fluoresceina.

Caracterizarea compusilor CI ai β -CD și MCT- β -CD cu biotină s-a efectuat prin spectroscopie UV-VIS, analiză termică și probe de solubilitate. În urma analizei termice, se observă că mecanismul de degradare a martorilor și a compușilor de incluziune este complex și se desfășoară în două până la cinci etape. Degradarea nu este completă, rămânând cantități diferite de reziduu. Valorile apropiate ale energiilor de activare și a ordinelor de reacție obținute la viteza de încălzire de 10°C, confirmă faptul că mecanismul de degradare a compușilor de incluziune cu biotină este asemănător. Producții studiate nu vor fi afectați de solicitările termice din timpul tratamentelor de grefare, complexare, solubilizare, spălare, uscare. Cunoașterea solubilității gazdelor și a compușilor de incluziune cu biotina este necesară (in special pentru MCT- β -CD și MCT- β -CD- biotina) pentru realizarea practică a unor pelicule polimere reactive. In studiile ulterioare se recomanda ca solubilizarea acestor substante sa se faca in apa, DMSO și DMF.

Pentru evidentierea interacțiunilor de tip biotina-avidina au fost folosite mai multe tipuri de suporturi. Acestea constau din lame de sticla tratate diferit (filme de Cr-Au, SiOx la unghi de 60° sau 82°, polistiren). Au mai fost utilizate lame de sticla tratate cu APES, AEAPES (5-10%) sau cistamina. Determinările au fost efectuate prin observarea probelor la microscopul de fluorescență și captarea imaginilor cu o camera de luat vederi. S-a pus la punct o metoda numerica de procesare a imaginilor de microscopie, pentru evidentierea interacțiunilor specifice și a celor nespecifice.

In vederea realizarii celulelor de proba, au fost realizate urmatoarele tratamente aplicate placi de sticla: curatirea sticlei, depunere de SiOx la unghi de 60 o fata de normala la suprafata (mic fata de suprafata) și grosime aprox. 25 nm; depunere de polistiren prin spin coating; depunere de aur la unghi mic (fata de suprafata); depunere

de alcool polivinilic prin spin coating; tratare cu alcantioli; tratare in plasma de oxigen; tratare cu amida (DSS); tratare cu amina (APES); tratare cu albumina (BSA). Aceste tratamente s-au aplicat pe rand, partial sau in totalitate. De aceea, au rezultat multe tipuri de placi de sticla. Cu placile depuse mai sus, au fost realizate celule cu cristal lichid care sa permita observarea orientarii cristalului lichid in urma interactiei cu diferitele substraturi. Au fost obtinute si alte tipuri de celule cu cristal lichid, pentru observare/testare, a complexilor moleculari pentru o serie de placute cu substrat nanostructurat, in care functionalizarea s-a facut pe portiuni diferite ale placutelor (depuneri/reactii in picatura). Pentru celulele formate cu placute cu depuneri/reactii in picatura, au fost facute placute pereche cu alcoolpolivinilic frecat, care permitea o aliniere binecunoscuta. Astfel s-au putut pune in evidenta orientari/dzorientari datorate diferitelor portiuni din celula.

In toate cazurile de mai sus, identificarea prezentei complexilor moleculari s-a facut prin observarea comportarii celulelor cu cristal lichid prin metode specifice: vizualizare directa in lumina polarizata, conosopic, cu inregistrarea imaginilor cu camera de luat vederi a ansamblului experimental. Observatiile s-au facut la temperatura camerei. In acest fel, au fost realizate numeroase fotografii care urmareau observarea la microscop a gradului de dezordine indus de complexii moleculari in celulele de testare.

Au fost adaptate si optimizate tehnici de depunere de straturi subtiri in vid pentru obtinerea de suprafete cu topografie controlata de SiOx, ceea ce reprezinta o extindere fata de rezultatele fazelor precedente. S-a folosit tot tehnica depunerii la unghi mic. A fost experimentata si functionalizarea prin depuneri in plasma. Aceasta a condus la hidroxilarea straturilor superficiale si depunerea unor grupari reactive.

Au fost folosite metode aditionale, spectroscopice, pentru urmarirea formarii staturilor de functionalizare si a complexilor moleculari: spectroscopie IR de reflexie, spectroscopie de fluorescenta in domeniul UV. Spectrele de reflexie au fost prelucrate prin aplicarea relatiilor Kramers Kronig, in vederea extragerii informatiilor privind spectrul de absorbtie datorat componentelor straturilor depuse pe sticla. Aceste spectre au fost atribuite, ceea ce a permis interpretarea depunerilor realizate.