

Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

## **Diplomová práce**

Modifikácia grafénového materiálu pre biomedicínske využitie

Modification of graphene material for biomedical applications

Študent:

Bc. Eva Martinčeková

Vedúci diplomovej práce:

doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.

Sídlo školy:

Ostrava

Dátum zadania diplomovej práce:

10.11. 2017

Dátum odovzdania diplomovej práce:

21.5. 2018

## Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Eva Martinčková**

Studijní program: N3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942T001 Nanotechnologie

Téma: **Modifikace grafenového materiálu pro biomedicínské využití**  
**Modification of graphene material for biomedical applications**

Jazyk vypracování: slovenština

### Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce je studium modifikace povrchu grafenového materiálu s využitím kovalentních a nekovalentních funkcionalizací. V Teoretické části bude studován grafen a jeho deriváty a význam funkcionalizací pro jeho aplikace zejména v přípravě polymerních nanokompozitů nebo nosičů lékových forem. V Praktické části budou provedeny funkcionalizace grafenového materiálu s využitím několika polymerů (chitosan, polyethylen glykol) a kyseliny listové. Připravené materiály budou charakterizovány s využitím metod chemické, fázové a strukturní analýzy.

### Seznam doporučené odborné literatury:

- 1) J. Liu, L. Cui, D. Losic, Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications, *Acta Biomaterialia* 9, 2013, 9243–9257.
- 2) Q. Zhang, Z. Wu, N. Li, Y. Pu, B. Wang, T. Zhang, J. Tao, Advanced review of graphene-based nanomaterials in drug delivery systems: Synthesis, modification, toxicity and application, *Materials Science and Engineering C* 77, 2017, 1363–1375.
- 3) S. Mohamadi, M. Hamidi, The new nanocarriers based on graphene and graphene oxide for drug delivery applications. In *Nanostructures for Drug Delivery*, Ed. Ecaterina Andronescu and Alexandru Mihai Grumezescu, 2017, ISBN: 978-0-323-46143-6.
- 4) H. Zhang, X. Luo, X. Lin, X. Lu, Y. Tang, The molecular understanding of interfacial interactions of functionalized graphene and chitosan. *Applied Surface Science*, 360, Part B, 2016, 715-721.
- 5) Y. H. Park, S. Y. Park, I. In, Direct noncovalent conjugation of folic acid on reduced graphene oxide as anticancer drug carrier. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 30, 2015, 190-196.


Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.**


Konzultant diplomové práce: Ing. Ondřej Dutko

Datum zadání: 10.11.2017

Datum odevzdání: 21.05.2018

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.  
vedoucí katedry



  
\_\_\_\_\_  
Ing. Zdeňka Chmelíková, Ph.D.  
prorektorka pro studium

### **Miestoprísahné prehlásenie**

Prehlasujem, že som celú diplomovú prácu vypracovala samostatne a uviedla som všetky použité podklady a literatúru. Súhlasím s tým, že s výsledkami mojej diplomovej práce môže byť naložené podľa uváženia vedúceho diplomovej práce ako jej spoluautora a doporučenia vedúceho inštitútu.

V Ostrave dňa: 21.5. 2018

  
podpis .....

## Prehlásenie

- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména §35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a §60 – školní dílo
- beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB-TUO) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě diplomovou práci užít (§35 odst. 3)
- souhlasím s tím, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB-TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o diplomové práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO
- bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu §12 odst. 4 autorského zákona
- bylo sjednáno, že užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše)
- beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostrave dňa: 21.5. 2018

Podpis: .....

Meno a priezvisko autora práce:

Eva Martinčeková

Adresa trvalého pobytu autora práce:

Stará Bystrica 503, 023 04 Stará Bystrica  
Slovenská republika

### **Pod'akovanie:**

Predovšetkým chcem poďakovať svojej vedúcej diplomovej práce pani doc. Ing. Daniele Plachej, Ph.D. za odborný prístup, poskytnuté konzultácie a pomoc pri príprave diplomovej práce. Ďalej chcem poďakovať Ing. Ondřejovi Dutkovi za konzultácie a pracovníkom VŠB – TUO, presnejšie doc. Ing. Gražyne Simhe Martynkovej, Ph.D., Mgr. Pavlíne Peikertovej, Ph.D., doc. Ing. Michalovi Ritzovi, Ph.D., Ing. Ľubomíre Kuzníkovej, Márii Heliovej a z Výskumného centra Žilinskej univerzity v Žiline Ing. Liborovi Trškovi, Ph.D. za pomoc a prevedenie analýz. Práca bola prevedená za podpory projektu SGS SP2018/114 Příprava uhlíkatých nanomateriálů, jejich charakterizace a modifikace II .

## **Anotácia**

Cieľom diplomovej práce je štúdium modifikácie grafénového materiálu kovalentnou a nekovalentnou funkcionalizáciou s jeho potenciálnym využitím v medicíne ako nosič liekových foriem. V praktickej časti diplomovej práce je prevedená príprava grafénoxidu Hummersovou metódou s následným modifikovaním chitosanom, polyetylén glykolom a kyselinou listovou. Pripravené vzorky sú charakterizované Ramanovou spektroskopiou, infračervenou spektroskopiou s Fourierovou transformáciou, rentgenovou difrakčnou analýzou, rentgenovou fotoelektrónovou spektroskopiou a skenovacou elektrónovou mikroskopiou. Grafénové štruktúry sú po modifikácii zmiešané s protinádorovým liečivom kamptotecín a charakterizované infračervenou spektroskopiou s Fourierovou transformáciou.

Kľúčové slová: grafén, grafénoxid, kovalentná a nekovalentná funkcionalizácia, systém prenosu liečiva, biomedicína.

## **Abstract**

The aim of the diploma thesis is to study the modification of the graphene based material by covalent and non-covalent functionalization with its potential use in medicine as a carrier of drug forms. In the practical part of the diploma thesis is contained preparation of grapheneoxide by Hummers method and subsequent modification with chitosan, polyethylene glycol and folic acid. The prepared samples are characterized by Raman spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction analysis, X-ray photoelectron spectroscopy and scanning electron microscopy. The graphene based structures are mixed with the camptothecin anticancer drug after modification and characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy.

Key words: graphene, graphene oxide, covalent and non-covalent functionalization, drug delivery system, biomedicine.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Grafén .....</b>	<b>12</b>
2.1	Príprava grafénu.....	13
2.2	Štruktúra.....	14
2.3	Elektrické a optické vlastnosti.....	16
2.4	Mechanické, chemické a tepelné vlastnosti.....	18
3.1	Aplikácie použitia grafénových štruktúr v biomedicíne.....	20
<b>4</b>	<b>Povrchová modifikácia a funkcionalizácia grafénu.....</b>	<b>22</b>
4.1	Kovalentná modifikácia.....	23
4.2	Nekovalentná modifikácia.....	24
4.3	Modifikácia grafénoxidu chitosanom.....	27
4.4	Modifikácia grafénoxidu polyetylén glykolom.....	33
4.5	Modifikácia grafénoxidu kyselinou listovou.....	37
<b>5</b>	<b>Toxicita grafénových štruktúr .....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>Praktická časť .....</b>	<b>42</b>
6.1	Príprava grafénoxidu Hummersovou metódou.....	42
6.1.1	<i>Použité chemikálie .....</i>	<i>42</i>
6.1.2	<i>Pomôcky a prístroje .....</i>	<i>42</i>
6.1.3	<i>Postup .....</i>	<i>42</i>
6.2	Modifikácia grafénoxidu chitosanom.....	43
6.2.1	<i>Použité chemikálie .....</i>	<i>43</i>
6.2.2	<i>Postup .....</i>	<i>43</i>
6.2.3	<i>Pomôcky a prístroje .....</i>	<i>43</i>
6.3	Modifikácia grafénoxidu polyetylén glykolom.....	44
6.3.1	<i>Použité chemikálie .....</i>	<i>44</i>
6.3.2	<i>Postup .....</i>	<i>44</i>
6.3.3	<i>Pomôcky a prístroje .....</i>	<i>44</i>
6.4	Modifikácia grafénoxidu kyselinou listovou.....	44
6.4.1	<i>Použité chemikálie .....</i>	<i>44</i>
6.4.2	<i>Postup .....</i>	<i>44</i>
6.4.3	<i>Pomôcky a prístroje .....</i>	<i>45</i>
6.5	Meranie a analýzy vzoriek.....	46
6.6	Výsledky a diskusia.....	49



6.6.1	<i>Ramanova spektroskopia</i> .....	49
6.6.2	<i>Infračervená spektroskopia</i> .....	52
6.6.3	<i>Rentgenová difrakčná analýza</i> .....	56
6.6.4	<i>Rentgenová fotoelektrónová spektroskopia</i> .....	59
6.6.5	<i>Skenovacia elektrónová mikroskopia</i> .....	62
6.6.6	<i>Naviazanie liečiva kamptotecín a charakterizácia FTIR spektroskopiou</i> ...	72
6.7	<i>Celkové zhodnotenie</i> .....	73
<b>7</b>	<b>Záver</b> .....	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Literatúra</b> .....	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Zoznam obrázkov</b> .....	<b>80</b>
<b>10</b>	<b>Zoznam tabuliek</b> .....	<b>82</b>

## Zoznam použitých značiek a symbolov

5-FU	5-fluorouracil
CPS	counts per seconds
CPT	kamptotecín
CVD	chemická depozícia z plynnej fázy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicín
EDC	1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)
eV	elektrónvolt
FA	kyselina listová
FTIR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
GO	grafénoxid
GOFA	grafénoxid modifikovaný kyselinou listovou
GOCH	grafénoxid modifikovaný chitosanom
GOPEG	grafénoxid modifikovaný polyetylén glykolom
CH	chitosan
IBU	ibuprofen
iGO	grafitový oxid
NHS	N-hydroxysukcinimid
NIR	blízke infračervené žiarenie
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PEG	polyetylén glykol
rGO	redukovaný grafénoxid
RNA	ribonukleová kyselina
SEM	skenovací elektrónový mikroskop
TGA	termogravimetrická analýza
UHV	ultravysoké vákuum
XPS	rentgenová fotoelektrónová spektroskopia
XRD	rentgenová difrakčná analýza

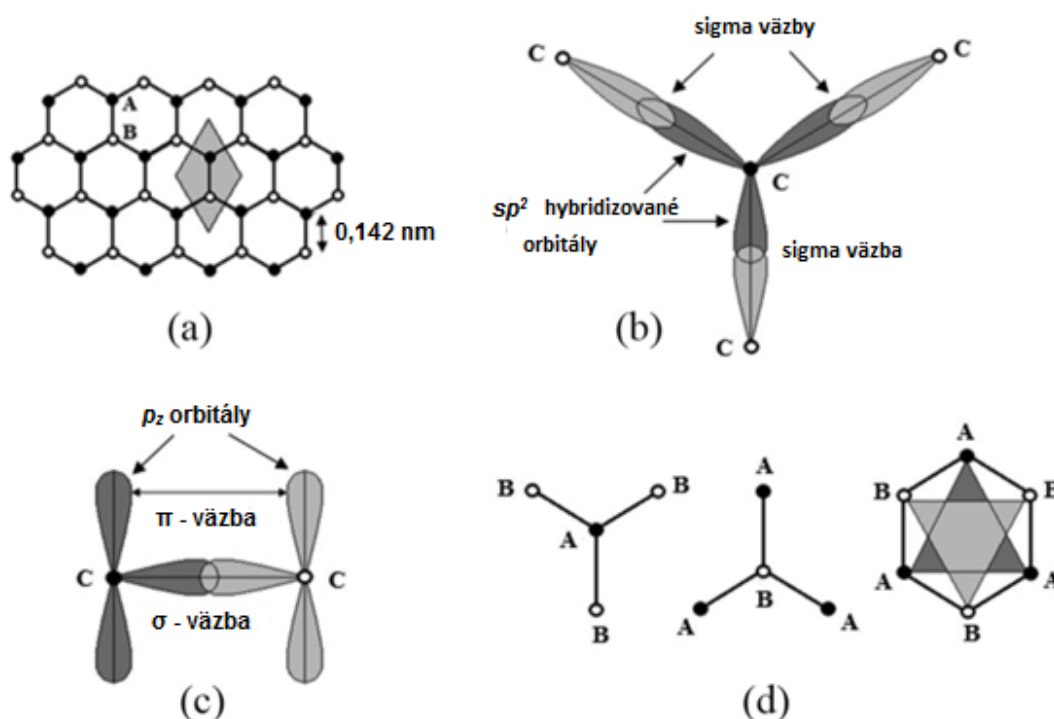
# 1 Úvod

V súčasnej dobe sa rýchlo rozšírila možnosť použitia grafénu a materiálov na báze grafénu v biomedicínskych aplikáciách. Rovinná štruktúra grafénu ponúka vynikajúcu schopnosť imobilizovať veľké množstvo látok a má vysokú hodnotu špecifického povrchu. Aby sa materiály na báze grafénovej štruktúry mohli použiť na biomedicínske aplikácie, dôležitým faktorom je prevedenie modifikácie nanomateriálu s optimálnymi štruktúrnymi vlastnosťami, biokompatibilita a minimálna toxicita. Pokiaľ má štruktúra za úlohu dodať liečivo, je potrebné navyše diskutovať o návrhu systému schopného uvoľňovať liečivo kontrolovateľným spôsobom s optimalizovanou dávkou lieku.

Cieľom diplomovej práce je štúdium funkcionalizácie grafénových štruktúr. Najskôr bol prevedený rešerš o štruktúrnych, mechanických, tepelných a optických vlastnostiach grafénu spolu s metódami prípravy a následne je práca venovaná charakterizácii funkcionalizovaných grafénových štruktúr kovalentnou a nekovalentnou cestou. Taktiež je v práci diskutované potenciálne využitie funkcionalizovaných grafénových štruktúr v medicíne spolu s toxicitou. V praktickej časti diplomovej práce je obsiahnutá príprava modifikovaných grafénových štruktúr, konkrétnejšie grafénoxid a jeho funkcionalizácia chitosanom, polyetylénglykolom a kyselinou listovou s následným charakterizovaním SEM mikroskopiou, XRD analýzou, Ramanovou, FTIR a XPS spektroskopiou. Modifikované grafénové štruktúry boli následne zmiešané s protinádorovým liečivom kamptotecín a charakterizované FTIR spektroskopiou.

## 2 Grafén

Grafén, monoatomárna tenká plocha tvorená atómami uhlíka usporiadaných do hexagonálnej siete (angl. honeycomb lattice) je považovaná za vôbec prvú izolovanú 2D kryštalickú štruktúru. Hrúbka tejto štruktúry je približne 0,345 nm. Medzi atómami uhlíka sú rozložené kovalentné  $\sigma$  (sigma) väzby vytvorené použitím hybridných  $sp^2$  orbitálov (orbitály  $s$ ,  $p_x$  a  $p_y$ ), ktoré vytvárajú ultrapevnú štruktúru grafénu. Nehybridizované a prekrývajúce sa  $p_z$  orbitály, smerujúce kolmo na grafénovú vrstvu vytvárajú delokalizovanú sieť elektrónov  $\pi$  (pi) väzby, ktoré vďaka ich mobilite spôsobujú vysokú vodivosť celej štruktúry (Obrázok 1). Na jednotkovú bunku pripadajú dva atómy uhlíka s plochou 0,052 nm<sup>2</sup> a tým je hodnota špecifického povrchu okolo 2600 – 2700 m<sup>2</sup>/g [1, 2].



**Obrázok 1:** a) hexagonálna mriežka atómov uhlíka, sivá časť predstavuje jednotkovú bunku; b) schéma  $sp^2$  hybridizácie; c) znázornenie hybridizovaných a nehybridizovaných orbitálov a ich prekryv; d) dve rozdielne orientácie usporiadania uhlíkových atómov a vznik dvoch prekrývajúcich sa trojuholníkových mriežok A a B [2].

Grafén je základnou jednotkou grafitovej štruktúry. Jednotlivé grafénové vrstvy sú v grafitu usporiadané s určitou periodicitou a medzi vrstvami pôsobiace slabé Van der Waalsove interakcie spôsobujú mäkkosť a mazivosť grafitu. Grafén je považovaný za základný materiál pri

stavbe iných uhlíkatých nanomateriálov, keďže jeho zrolovaním je možné pripraviť 0D štruktúru fullerenu alebo 1D štruktúru uhlíkatej nanotrubičky [1, 2].

Objavenie a izolovanie grafénovej štruktúry sa prvýkrát podarilo v roku 2004 pracovníkom univerzity v Manchestru Andre Geimovi a jeho kolegovi Konstantinovi Novoselovovi, ktorí dostali v roku 2010 Nobelovu cenu za prelomové experimenty týkajúce sa objavu tohto dvojdimenziálneho materiálu [3].

## 2.1 Príprava grafénu

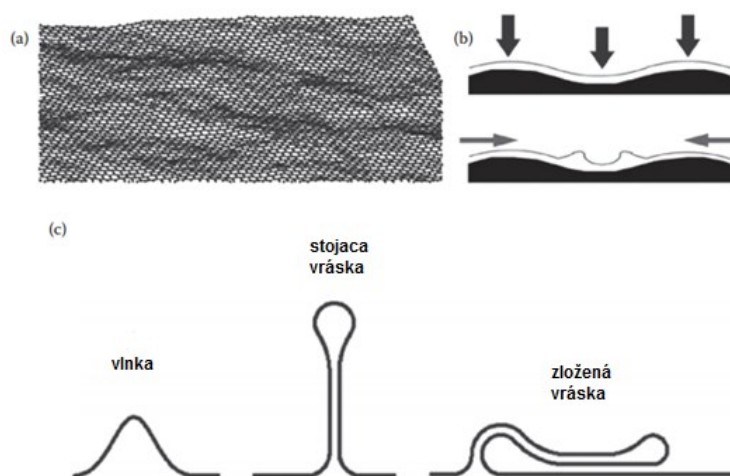
Grafén je možné pripraviť dvomi základnými typmi syntézy, a to buď príprava z grafitu alebo iným spôsobom z negrafitických zdrojov. Konkrétnejšie sa syntézy grafénu rozlišujú do štyroch kategórií:

- (1) mechanické štiepenie grafitových kryštálov,
- (2) exfoliácia grafitu,
- (3) metóda chemickej depozície z plynnej fáze (CVD) na rôznych substrátoch,
- (4) epitaxný rast na SiC.

Mechanické štiepenie grafitových kryštálov (exfoliácia vrstiev) je najjednoduchšou možnosťou prípravy grafénu, no nevýhodou je ohraničenosť plošnej veľkosti grafénu, ktorá je obmedzená veľkosťou pôvodného kryštálu grafitu. Na výrobu grafénu touto metódou sa používa vysokoorientovaný pyrolytický grafit (HOPG), ktorý obsahuje omnoho hrubšie grafitové kryštály a je s ním ľahšia manipulácia. Exfoliáciu vrstiev grafitu je možné prevádzať mechanickou (metóda lepiacej pásky) aj chemickou cestou (použitie interkalačných zlúčenín alebo oxidovadiel). Príprava grafénu pomocou epitaxného rastu, spočíva v zahriatí substrátu z karbidu kremíka na teplotu okolo 1200 °C pri podmienkach UHV (ultra high vacuum). Atómy Si vymiznú v dôsledku termickej desorpcie a zanechávajú za sebou atómy uhlíka, ktoré sa vďaka regulovanej teplote a tlaku usadzujú na substrát v podobe grafénu. Pri metóde CVD sa syntéza grafénu vykonáva na substráte prechodných kovov (slúžia aj ako katalyzátor) a zdrojom uhlíka sú uhl'ovodíkové plyny. Po vložení substrátu do pece a po jeho zahriatí sa uhl'ovodíkový plyn vpúšťa do pece a rozkladá sa na atómy uhlíka a vodíka. Z dôvodu nízkej rozpustnosti uhlíka v substráte sa na danom substráte vytvára súvislá vrstva grafénu [3].

## 2.2 Štruktúra

Dvojrozmerné štruktúry boli študované ešte pred objavením grafénu, no vedci sa domnievali, že sú termodynamicky nestále z dôvodu silných tepelných kmitov kryštálovej mriežky a následného premiestňovania atómov. Táto myšlienka bola po objavení grafénu vyvrátená, no samostatná vrstva grafénu vždy vibruje a tým sa vytvára na povrchu množstvo vlniek (viď Obrázok 2), čo indikuje silnú tendenciu transformovania sa z 2D na 3D materiál. Predpokladá sa, že táto deformácia vrstvy môže ovplyvňovať balistickú elektrickú vodivosť, ktorá je charakterizovaná ako ideálny bezstratový prenos elektrickej energie [1, 2].



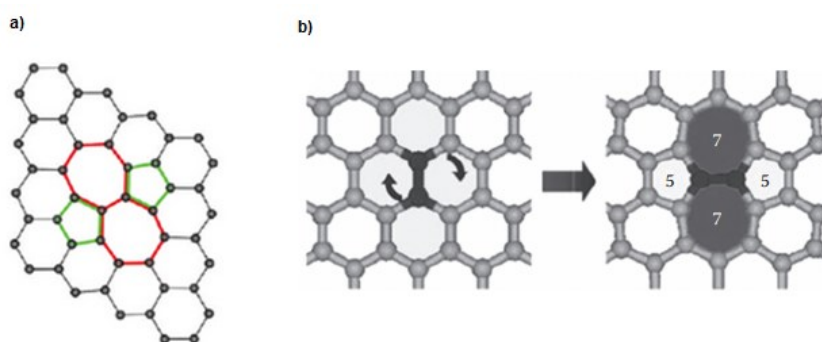
**Obrázok 2:** a) typická konfigurácia grafénu pri izbovej teplote s charakteristickými vlnkami (Macmillan Publishers Ltd., Nat. Mater., 6, Fasolino, A. et al.); b) tvorba vlniek na grafénovej štruktúre vložennej na substráte (Solid State Commun., 149, Guinea, F. et al.); c) schéma štruktúrnych defektov (vlnky) [1].

Vďaka tepelným fluktuáciám, reakciám so substrátom a adsorbentami podlieha grafén ľahko štruktúrnym defektom, čo ovplyvňuje jeho mechanické a chemické vlastnosti. Prítomnosť alebo tvorba vakancií, prítomnosť  $sp^3$  väzieb dokážu poškodiť konjugáciu. Ohýbanie grafénového listu vedie k zmenám vzdialenosti medzi atómami uhlíka a následne k ovplyvneniu hybridizácie (dochádza k rehybridizácii  $\sigma$  a  $\pi$  orbitálov) a k otáčaniu  $p_z$  orbitálov. Napätie vyvolané ohýbaním vrstvy vytvára miesta so zvýšenou reaktivitou. Pomocou tepelnej manipulácie je možné ovplyvniť zvlnenie grafénovej štruktúry a tým potenciálne vytvoriť riadenú funkcionalizáciu. Štruktúrne defekty sú normálnym javom a sú prítomné v každom materiáli. Defekty hexagonálnej mriežky modifikujú trajektórie elektrónov a vedú k ich rozptylu. Štruktúrne defekty grafénu (alebo tvorba defektov – napríklad zavedenie prímiesí iných atómov

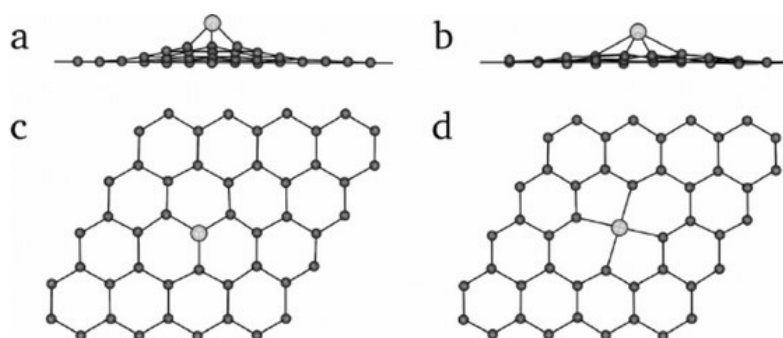
alebo funkčných skupín) vytvárajú nové zaujímavé vlastnosti grafénu a jeho následné využitie na rôzne aplikácie. Prítomnosť štruktúrnych defektov spôsobuje vznik aktívnych miest na chemické reakcie a uľahčujú funkcionalizáciu [1].

Defekty v štruktúre grafénu sa klasifikujú do štyroch základných skupín :

- (1) *Štruktúrne defekty* – prítomnosť heptagónov alebo pentagónov v hexagonálnej štruktúre, ktoré ovplyvňujú zakrivenie vrstvy (Obrázok 3a).
- (2) *Topologické defekty* – štyri hexagóny sú transformované do dvoch pentagónov a dvoch heptagónov kvôli rotácii jednej C-C väzby o 90°. Tento typ defektu sa vyznačuje tým, že jeho vznik nie je podmienený prítomnosťou alebo vakanciou iného atómu (Obrázok 3b).
- (3) *Defekty vznikajúce dopovaním* – nahradenie atómu uhlíku iným atómom (Obrázok 4).
- (4) *Nehybridizované  $sp^2$  uhlíkaté defekty* – defekty spôsobené prítomnosťou vakancií, hrán, intersticií a dopovaním prímiesí [1].

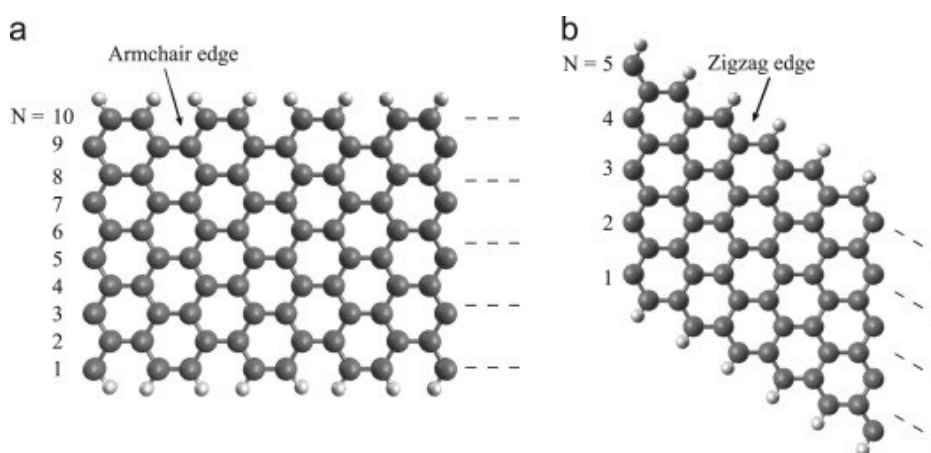


**Obrázok 3:** a) prítomnosť heptagónov a pentagónov v grafénovej štruktúre; b) znázornenie topologického defektu [1, 4].



**Obrázok 4:** Znázornenie nahradenia jednoduchaj vakancie kovovým atómom; a) pohľad z boku, c) pohľad zhora; Znázornenie nahradenia dvojitej vakancie kovovým atómom; b) pohľad zhora, d) pohľad z boku [4].

Grafénové nanostuhy sú alternatívnou formou grafénu, ktorých štruktúra má jasne definované okraje. Okrajové zakončenia grafénových nanostúh rozlišujeme na *armchair* a *zigzag* (viď Obrázok 5). Teoretické prognózy a experimentálne výsledky objasnili, že elektrické vlastnosti silne závisia od typu okrajového zakončenia a geometrie hrán grafénovej štruktúry. Zakončenie *zigzag* je energeticky stabilnejšie než *armchair*. Vplyv okrajového zakončenia vzhľadom na celkovú plochu grafénu sa promptne znižuje so zväčšujúcou sa veľkosťou plochy. Okraje grafénu poskytujú veľké množstvo aktívnych miest na vznik chemických reakcií, pretože sa vo všeobecnosti ľahšie uskutočňujú na okrajoch než na bazálnej rovine. Okrajové zakončenia umožňujú chemickú funkcionalizáciu a tým vznik nových vlastností grafénu pre vývoj aplikácií v oblasti elektroniky, spintroniky a optoelektroniky [1, 5].



**Obrázok 5:** Znázornenie typov okrajového zakončenia grafénových nanostúh, a) „armchair”, b) „zigzag” [5].

### 2.3 Elektrické a optické vlastnosti

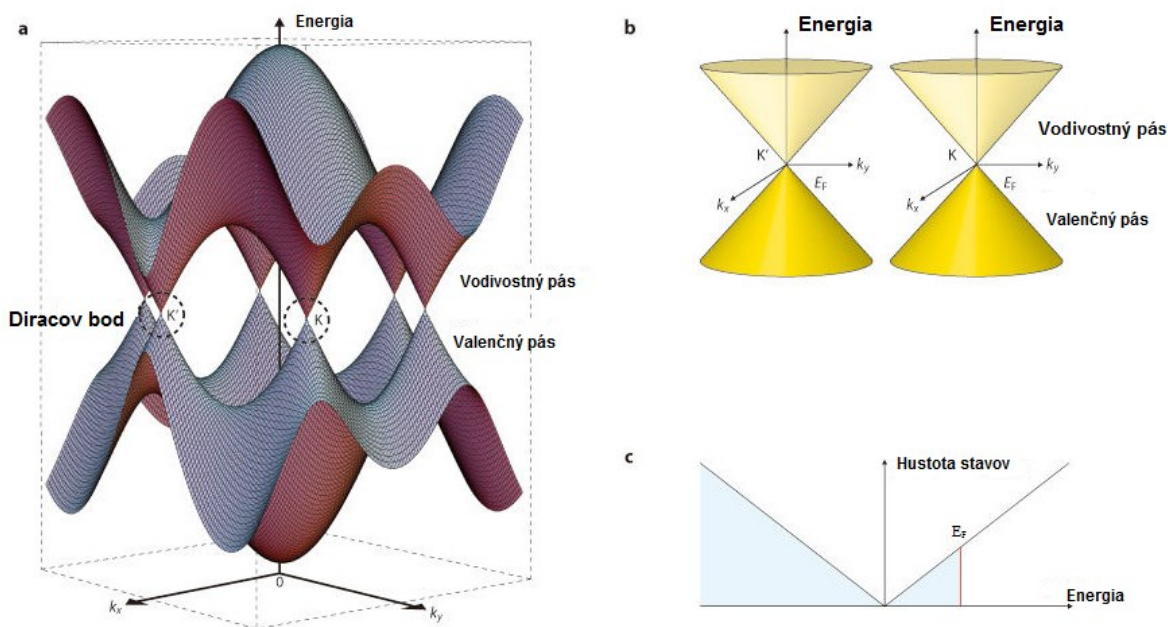
Grafén má unikátne elektrické vlastnosti. Delokalizované elektróny nad a pod rovinou vrstvy sú vysoko mobilné a sú schopné cestovať v submikrónových vzdialenostiach bez rozptylu (balistická elektrická vodivosť). Mobilita býva obmedzená substrátom, teplotou, štruktúrnymi defektami a funkcionizáciou grafénovej štruktúry. Hodnota mobility elektrónov sa pohybuje v rozmedzí 200 000 – 250 000  $\text{cm}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$  [1, 6].

Elektrické vlastnosti grafénu je možné vidieť v grafickom zobrazení pásovej štruktúry na Obrázku 6. Vodivostný a valenčný pás sa dotýkajú na úrovni Fermiho hladiny v šiestich bodoch na hraniciach Brillouinovej zóny, ktoré sa nazývajú Diracove body. Valenčný a vodivostný pás sa dotýkajú v dvoch symetrických bodoch na Brillouinovej zóne  $K$  a  $K'$ . Pre energie pod 1 eV

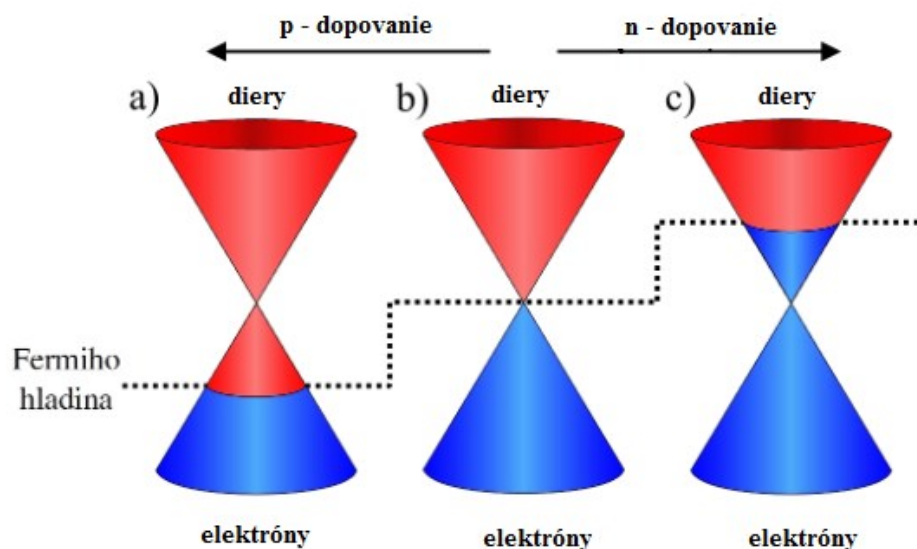


býva pásová štruktúra aproximovaná dvomi symetrickými kužeľmi, ktoré predstavujú valenčný a vodivostný pás, dotýkajúce sa v Diracovom bode (viď Obrázok 6 b) [6, 7].

Grafén sa považuje za polovodič s nulovou šírkou zakázaného pásu a v prípade dokonalej vrstvy leží Fermiho hladina priamo medzi vodivostným a valenčným pásom. Materiál s takouto fenomenálnou kvantovofyzikálnou vlastnosťou ale nemá praktické využitie v elektronických aplikáciách. Napríklad časté zapínanie a vypínanie vyžadované v zariadeniach ako sú tranzistory nie je možné dosiahnuť v štruktúrach s nulovou šírkou zakázaného pásu. Grafén však môže byť modifikovaný (napríklad úmyselnými kontrolovateľnými štruktúrnymi defektami, dopovaním), čo sa prejaví posunom Fermiho hladiny voči Diracovmu bodu (Obrázok 7) a tým je možné regulovať šírku zakázaného pásu, čo je rozhodujúcim faktorom na použitie v elektronike. Dopovaním typu  $n$  sa zvyšuje Fermiho hladina a vzniká elektrónová vodivosť, dopovaním typu  $p$  sa Fermiho hladina znižuje a získava sa dierová vodivosť. Šírku zakázaného pásu ovplyvňuje aj počet grafénových vrstiev. Na celkovú vodivosť vplyva aj celková grafénová štruktúra a jej typ okrajového zakončenia. Grafénová nanostuha typu *armchair* má kovový aj polovodičový charakter, zatiaľ čo typ *zigzag* má iba kovový charakter [1, 6, 7].



**Obrázok 6:** a) Energetické hladiny blízko Fermiho hladiny v graféne. Vodivostný a valenčný pás sa prekrývajú v bodoch  $K$  a  $K'$ ; b) Kónické energetické pásma v blízkosti bodov  $K$  a  $K'$ ; c) hustota stavov blízko Fermiho hladiny s Fermiho energiou  $E_F$  [6].



**Obrázok 7:** Znázornenie vplyvu polohy Fermiho hladiny na typ vodivosti. a) p – dopovanie; b) Fermiho hladina leží presne v Diracovom bode; c) n – dopovanie [7].

Unikátna grafénová vrstva sa vyznačuje pozoruhodnými optickými vlastnosťami. Monovrstva grafénu absorbuje 2,3% dopadajúceho bieleho svetla so zanedbateľnou reflektanciou (<0,1%). Absorpčná spektroskopia je najvýhodnejšou a najschopnejšou metódou charakterizácie grafénových štruktúr. Optické vlastnosti môžu byť ovplyvniteľné dopovaním štruktúry alebo aplikovaním vonkajšieho elektrického poľa. Grafén môže byť použitý ako nelineárny optický materiál vďaka univerzálnej absorpcii svetla a nelineárnemu Kerrovmu efektu (kubický nelineárny jav, pri ktorom je veličina index lomu materiálu závislá na intenzite dopadajúceho svetla). V jednej štúdii (Loh et al.) bol grafén modifikovaný organickými molekulami preukázaný ako vynikajúci absorber pre ultrarýchle lasery. V inej štúdii (Liu et al.) bol vytvorený kompozit na báze grafénu, ktorý vykazuje optickú limitnú vlastnosť s potenciálnym využitím na ochranu zraku [1].

## 2.4 Mechanické, chemické a tepelné vlastnosti

Mimoriadne mechanické vlastnosti grafénu vyplývajú z extrémne silných sigma ( $\sigma$ ) väzieb (670 kJ/mol). Youngov modul pružnosti grafénu je 1 TPa a mez pevnosti v ťahu má hodnotu 130 GPa. Jeho elastické vlastnosti sú vysoko flexibilné a je schopný regenerácie so stabilnou elektrickou vodivosťou [1].

Výkony integrovaných obvodov sa so zvyšujúcou teplotou zhoršujú, preto je kľúčový výskum materiálov s vysokovýkonnou tepelne vodivou štruktúrou. Grafitická štruktúra tvorená niekoľkými navrstvenými grafénovými štruktúrami vykazuje vysokú tepelnú vodivosť, kvôli silným  $sp^2$  väzbám, čo vedie k rozptylu tepla cez mriežkové vibrácie. Tepelná vodivosť grafénu je preukázateľne lepšia (teoreticky aj experimentálne) než u nanotrubičiek, diamantu alebo grafitu. Hodnota tepelnej vodivosti grafénu závisí od substrátu, na ktorom je grafén uložený a od typu syntézy grafénu, čo súvisí s prítomnosťou štruktúrnych defektov. Grafén uložený na  $SiO_2/Si$  substráte má hodnotu tepelnej vodivosti okolo 600 W/mK, u samostatného grafénu sa hodnota vodivosti pohybuje v okolí 2500 W/mK, predpokladaná hodnota je 6000 W/mK [1].

Grafén je hydrofóbnym materiálom s chemicky inertným povrchom, čím je jeho rozpúšťanie v roztokoch náročným procesom. Modifikáciou povrchu grafénu je možné zlepšiť rozpustnosť a disperziu grafénu, čo je kľúčové na praktické aplikácie v rôznych oblastiach. Bolo vyvinutých niekoľko možností metód na vytvorenie derivátov grafénu, medzi ktoré patrí hydrogenácia, fluorinácia, funkcionalizácia malými organickými molekulami, pri ktorých vzniká veľké množstvo typov grafénových štruktúr s rôznymi vlastnosťami [1, 3].

### **3 Použitie grafénových štruktúr v biomedicínskych aplikáciach**

V posledných rokoch sa rýchlo rozšírila možnosť použitia grafénu a materiálov na báze grafénu v biomedicínskych aplikáciach. Rovinná štruktúra grafénu ponúka vynikajúcu schopnosť imobilizovať veľké množstvo látok (kovy, lieky, biomolekuly atď.) a ohrozila dominanciu nanotrubičiek v použití na prenos liečiva. V porovnaní s nanotrubičkami má grafén omnoho vyššiu hodnotu špecifického povrchu a jeho pomer zaťaženia (hmotnostný pomer vloženého liečiva na nosiči) môže dosiahnuť až 200%, čo je podstatne vyššia hodnota v porovnaní s nanočasticami a inými látkami použitými na prenos liečiva. Povrchová (plošná) hustota grafénu je o štyri rády vyššia ( $2600 \text{ m}^2/\text{g}$ ) než u iných nanomateriálov, pretože jednotlivý atóm grafénu je v podstate vystavený na povrchu, čo zvyšuje kapacitu množstva ukotveného lieku. Vyšší počet vrstiev grafénu naukladaných na seba spôsobuje zníženie plošnej hustoty a zvýšenie tuhosti nosiča, čo je vhodné na penetráciu liečiva, no môže viesť k poškodeniu bunky. Preto je dôležitým faktorom aj rigidita grafénovej štruktúry (zachovanie štruktúrálnej integrity nosiča), no je potrebné dbať na tuhosť štruktúry. Bočné rozmery grafénových štruktúr nemajú veľký vplyv na obsah účinnej látky, no môžu spôsobiť obmedzenia týkajúce sa príjmu bunky, transport

hematoencefalitickou bariérou, procesy v obličkách a iných biologických javov závislých na rozmeroch častíc [8].

Aby sa materiály na báze grafénovej štruktúry mohli použiť ako transportér na prenos liečiva, je potrebné diskutovať tri základné problematiky [8]:

- (1) Musí byť prevedená modifikácia nanomateriálu s cieľom vytvoriť účinný nosič lieku s výhodnou kapacitou a optimálnymi štruktúrnymi vlastnosťami.
- (2) Potvrdenie biokompatibility a minimálnej toxicity, pri ktorých sú nevyhnutné rozsiahle in vitro a in vivo štúdie.
- (3) Návrh systému, ktorý je schopný uvoľňovať liečivo kontrolovateľným spôsobom s optimalizovanou dávkou lieku na konkrétnom mieste. Systém na dodávanie liečiva je všeobecne navrhnutý tak, aby zlepšoval farmakologický a terapeutický profil molekuly liečiva [8].

### **3.1 Aplikácie použitia grafénových štruktúr v biomedicíne**

#### *(1) Cielené a riadené dodávanie liečiva*

Modifikované grafénové štruktúry umožňujú rozpustenie liečiva a predĺženie jeho existencie v krvnom obeh, no problémom býva vysoká koncentrácia liečiva a jeho cielený transport napríklad v mieste nádoru. Tieto nedostatky vznikajú kvôli nedostatočnej nosnosti, funkcionalizácii, absorpcii atď. Preto je dôležité vyvinúť špeciálny dodávací systém s cieleným inteligentným a riadeným uvoľňovaním liečiva. Najúčinnjšou možnosťou na dosiahnutie cieleného dodávania liečiva je použitie nosiča so špecifickými ligandami, ktoré dokážu rozpoznať receptory na povrchu nádorových buniek alebo reagovať na špecifické podnety v mikroprostredí (zmena pH, teploty). Tieto cieľové ligandy môžu byť kyselina listová, peptidy, polysacharidy, polyméry, proteíny [8].

#### *(2) Fototermálna antirakovinová terapia*

Nevýhodou chemoterapie je jej obmedzená špecifickosť k nádorovým bunkám, čo vedie k poškodzujúcim vedľajším účinkom na tkanivá a orgány. Fototermálna technológia je výhodnou pre jej špecifickosť a selektivitu a schopnosť zabíjania nádorových buniek bez vedľajších účinkov. V predošlých rokoch sa fototermálna terapia prevádzala s nanočasticami zlata, ktoré sa vložili do nádorových buniek a následne sa rakovinové bunky ožiarili špecifickým svetelným žiarením, čo spôsobilo absorpciu energie žiarenia nanočasticami Au a premenu energie žiarenia

na tepelnú. Táto technológia sa v súčasnosti vyvíja použitím grafénu a blízkeho infračerveného žiarenia (NIR: 700 – 1100 nm), ktoré poskytujú sľubné výsledky a vyvolávajú rastúci záujem. Grafén sa vyznačuje absorpciou svetla v rozmedzí od UV po NIR oblasť a modifikovaný polyetylén glykolom vykazuje veľmi vysoké in vivo vnímanie tumoru a účinné vlastnosti pri fototermálnej terapii použitím NIR žiarenia. Ešte lepšie výsledky sú preukázané pri použití redukovaného grafénoxidu namiesto grafénu [8, 11].

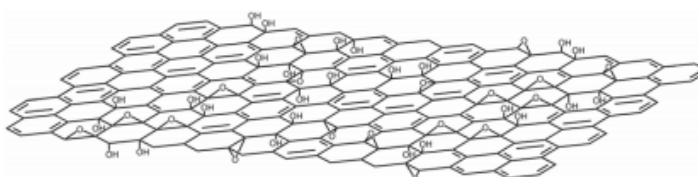
### *(3) Transport génov*

Génová terapia je sľubným prístupom na liečbu ochorení spôsobených genetickými vadami, vrátane rakoviny. Táto terapia je založená na génových vektoroch (pojem vektor je v genetike akákoľvek častica DNA, ktorú je možné cielene vnášať do bunky príjemcu a slúži ako prenášač genetickej informácie do bunky, všeobecne je tvorený vloženou sekvenciou DNA a väčšou sekvenciou DNA, ktorá slúži ako nosná konštrukcia). Tieto génové vektory chránia DNA pred rozkladom nukleázou a uľahčujú bunkovú absorpciu DNA s vysokou účinnosťou transakcie. Keďže je nedostatok účinných a bezpečných génových vektorov alebo zariadení na dodávanie génov, boli skúmané rôzne nanomateriály. Najsľubnejším materiálom je polyetylénimín - polymér, ktorý vykazuje silnú väzbu na nukleové kyseliny, no je vysoko toxický a nemá dobrú biokompatibilitu. Použitím grafénoxidu, na ktorom je naviazaný polyetylénimín sa znižuje toxicita, zvyšuje biokompatibilita a zvyšuje účinnosť transfekcie (vkladanie DNA do bunky). Preto sa tento nanomateriál s grafénovou štruktúrou považuje za najľubnejší materiál na génovú terapiu [8].

## 4 Povrchová modifikácia a funkcionálna grafénu

Čistý grafén je vysoko hydrofóbny a veľmi slabo dispergovateľný vo vode, čo je nevýhodnou vlastnosťou, preto je potrebná určitá modifikácia štruktúry. Najčastejšou modifikáciou grafénu je grafénoxid obsahujúci rôzne funkčné skupiny, ktoré spôsobujú značné zníženie vodivých vlastností. Grafén a grafénoxid patria medzi najslubnejšie biomateriály na použitie v medicíne z dôvodu ich špecifických vlastností (planárna dvojrozmerná štruktúra, veľký povrch, chemická a mechanická stabilita, vynikajúca elektrická a tepelná vodivosť, dobrá biokompatibilita). Tieto vlastnosti otvárajú nové možnosti podávania a transportu širokého spektra liečiv [8].

Grafénoxid je modifikovaný grafén obsahujúci rôzne funkčné skupiny, ktoré bránia transportu elektrónov (Obrázok 8). Funkčné skupiny zapríčiňujú rozpustnosť grafénoxidu vo vode a predstavujú aktívne body pre funkcionálnu a chemickú modifikáciu. Grafénoxid sa najčastejšie pripravuje pomocou Hummersovej metódy, ktorá zahŕňa exfoliáciu grafitu za vzniku grafénových vrstiev pôsobením oxidovadiel  $\text{KMnO}_4$  a  $\text{NaNO}_3$  v koncentrovanej  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Nesie hydroxy-, epoxy-, karbonylové a karboxylové skupiny, ktoré spôsobujú jeho hydrofilnosť [3].



**Obrázok 8:** Štruktúra grafénoxidu s naviazanými funkčnými skupinami [3].

Grafénoxid je hydrofilný a dispergovateľný vo vode za vzniku stabilného koloidu, no aj táto slubnejšia modifikácia grafénu musí byť špeciálne upravovaná. Hoci je grafénoxid rozpustný vo vode, vo fyziologických pufoch agreguje v dôsledku prítomnosti solí. Povrchová chémia nanomateriálov je kľúčovou vlastnosťou k vytvoreniu kvalitného nosiča lieku s dobrou biokompatibilitou a kontrolovateľným správaním v biologických systémoch. Preto je významná modifikácia grafénových štruktúr na vytvorenie nosičov liečiva s požadovanými vlastnosťami.

Existujú a sú preskúvané dva základné spôsoby povrchových úprav – kovalentná a nekovalentná úprava. Kovalentná úprava zahŕňa dopovanie grafénovej štruktúry atómom alebo reakciu s kyslíkatými skupinami, ktoré vedú k ovplyvneniu až deštrukcii grafénu. Nekovalentná úprava zahŕňa Van der Waalove a elektrostatické sily bez ovplyvnenia základnej grafénovej štruktúry. Najdôležitejšie príklady povrchových modifikácii grafénu a grafénoxidu sú obsiahnuté v Tabuľke 1 [8].

Tabuľka 1 - Súhrn typických kovalentných a nekovalentných modifikácii grafénových štruktúr používaných na systém prenosu liečiva [8].

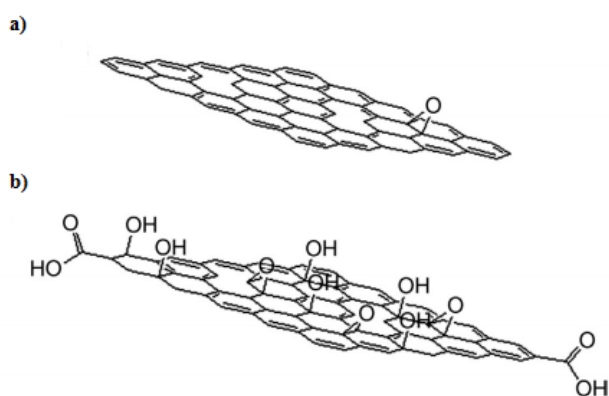
Metóda modifikácie	Prekurzory/mechanizmus
<b>Kovalentná</b>	Polyetylén glykol (PEG)
	Polyakrylová kyselina (PAA)
	Poly-L-lyzín (PLL)
	Polyvinylalkohol (PVA)
	Polyetylénimín (PEI)
	Poly(N-izopropylakrylamid) (PNIPAM)
	Poly (anhydrid kys. sebakovej) (PSA)
	Amfifilné kopolyméry
	Kyselina listová (FA)
	Kyselina sulfónová a amino skupiny
	Dextran
	Chitosan
	Želatína
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
<b>Nekovalentná</b>	$\pi$ - $\pi$ interakcie
	Van der Waalsove interakcie
	Elektrostatické sily
	Vodíkové mostíky
	Koordinačné väzby

#### 4.1 Kovalentná modifikácia

Povrchová modifikácia grafénovej štruktúry kovalentnou cestou je možná v dôsledku prítomnosti štruktúrnych defektov a reaktívnych kyslíkových funkčných skupín. Kovalentné modifikácie môžu byť prevedené nukleofilnou substitúciou, elektrofilnou adíciou, radikálovou adíciou a kondenzáciou. Hlavnými reaktívnymi miestami u nukleofilnej substitúcie sú epoxy skupiny obsiahnuté v štruktúre grafénoxidu, ktoré umožňujú naviazanie aminoskupín (-NH<sub>2</sub>) v dôsledku prítomnosti voľného elektrónového páru. Jedná sa o veľmi jednoduchú reakciu prebiehajúcu pri izbovej teplote vo vodnom prostredí, čím sa považuje za sľubnú metódu

modifikácie grafénových štruktúr s použitím širokého spektra molekúl (alifatické a aromatické amíny, aminokyseliny, silany, polyméry, enzýmy, iónové kvapaliny a nanočastice). Polyméry PVA, PEI, PNIPAM a amfifilné kopolyméry zlepšujú biokompatibilitu grafénoxidu. Je možné kovalentne modifikovať aj čistý grafén, no jeho štruktúra obsahuje omnoho menší počet funkčných skupín [8, 9].

Elektrofilná substitučná reakcia s grafénom zahŕňa výmenu atómu vodíka elektrofilom a môže byť prevedená použitím diazóniovej soli. Diazóniová soľ p-nitroanilínu sa vstúpi na povrch grafénu, čím sa vytvára jeho organicky rozpustná modifikácia. Modifikácia grafénovej štruktúry kondenzáciou sa prevádza použitím izokyanatanových zlúčenín a vykazuje ľahkú disperziu modifikovaného grafénu. Taktiež je táto reakcia vhodná aj pre modifikáciu grafénoxidu. Je potrebné brať do úvahy, že mnohé z kovalentných modifikácií grafénoxidu môžu viesť k redukcii na redukovaný grafénoxid (rGO), čím sa menia medzifázové vlastnosti východiskového materiálu (viď Obrázok 9) [8].



**Obrázok 9:** a) štruktúra redukovaného grafénoxidu, b) štruktúra grafénoxidu [10].

Stankovichovi a jeho kolegom sa ako prvým podarilo modifikovať grafén pomocou kovalentnej metódy v roku 2006. Izokyanáty reagovali s hydroxylovými a karboxylovými skupinami syntetického grafénoxidu a boli získané izokyanátom modifikované grafitové oxidy (iGO). Tieto iGO môžu byť homogénne a stabilne dispergované v rôznych typoch polárnych aprotických rozpúšťadlách. Táto zjednodušená a efektívna metóda predstavuje nový prístup pre ďalšie spracovanie a aplikácie [11].

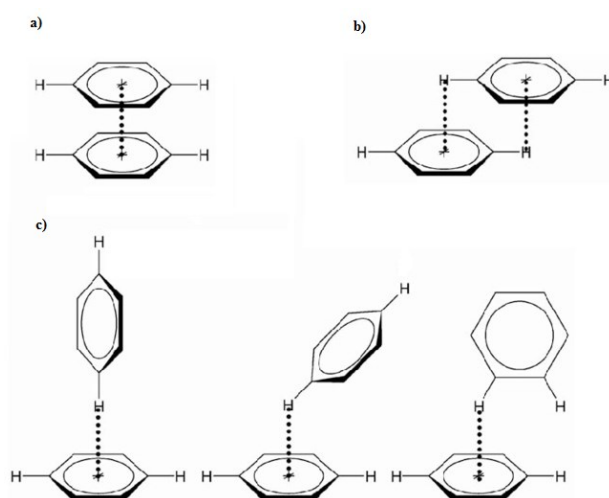
## 4.2 Nekovalentná modifikácia

Pri nekovalentnom modifikovaní grafénu a grafénoxidu dochádza k vzniku Van der Waalsových síl, elektrostatických interakcií, vodíkových mostíkov, koordinačných väzieb a  $\pi$ - $\pi$  interakcií. Prvá nekovalentná modifikácia bola taktiež prevedená Stankovichom a spol., ktorí



chemikáliou poly(4-styrénsulfonát sodný) modifikovali grafénoxid (redukovaný *in situ* redukciou alebo exfoliáciou). Táto silná nekovalentná interakcia medzi redukovaným grafénoxidom a poly(4-styrénsulfonátom sodným) vedie k zamedzeniu agregácie grafénovej štruktúry [11].

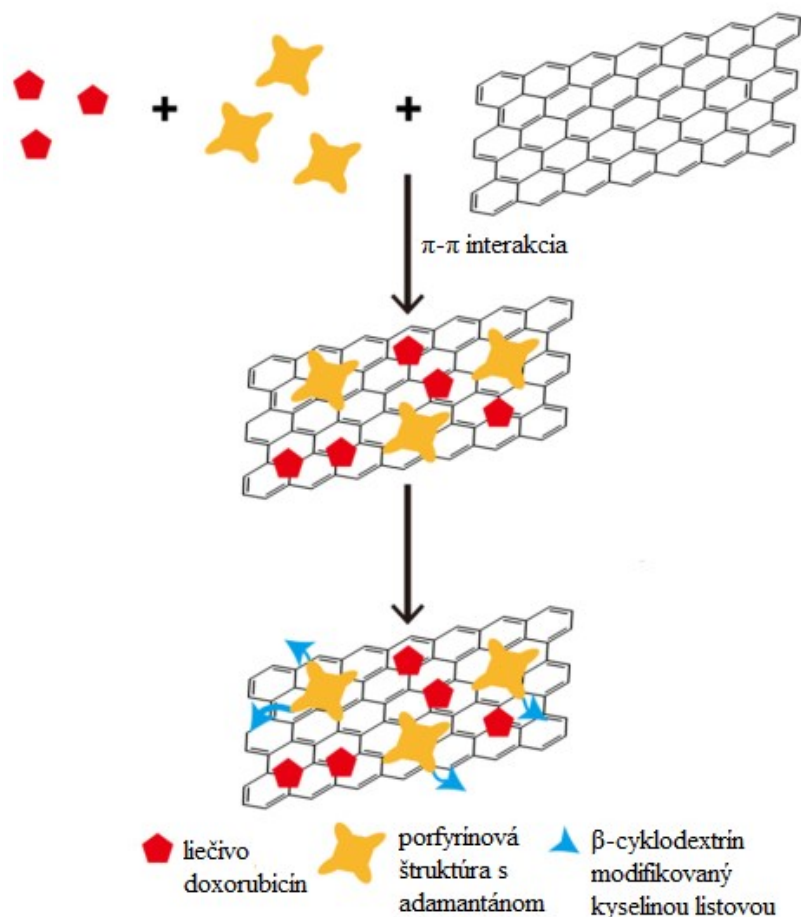
Najefektívnejšou nekovalentnou modifikáciou sú  $\pi$ - $\pi$  interakcie, ktoré spočívajú v interakcii medzi aromatickými a heterocyklickými molekulami (viď Obrázok 10). Tieto interakcie sú nekovalentné, medzimolekulové a sú významné pre stabilizáciu DNA, RNA a v rôznych iných štruktúrach [12].



**Obrázok 10:** Znázornenie možných orientácií pre dvojicu benzénových jadier u  $\pi$ - $\pi$  interakcií. a) sendvičová orientácia, b) „parallel - displaced” orientácia, c) tri typy orientácií „T-shaped” [12].

Grafénová  $sp^2$  štruktúra poskytuje možnosti  $\pi$ - $\pi$  interakcií s konjugovanými polymérmi či aromatickými zlúčeninami, ako napríklad poly(4-styrénsulfonát sodný), sulfonovaný polyanilín, poly(3-hexyltiofén), 7,7,8,8-tetrakyanochinodimetánový anión, tetrasulfonátová soľ ftalokyanínu meďnatého, porfyrín, pyrény a mnoho ďalších. Tieto molekuly môžu slúžiť ako stabilizátory grafénovej štruktúry, na zlepšenie kovalentnej imobilizácie biomolekúl alebo liečiv. Príkladom je spojenie porfyrínovej štruktúry s adamantánom nekovalentnou  $\pi$ - $\pi$  interakciou s grafénom, ktorá je schématicky znázornená na Obrázku 11. K takto modifikovanému grafénu bol pridaný  $\beta$ -cyklodextrín modifikovaný kyselinou listovou a použitím protinádorového liečiva doxorubicín je možné túto štruktúru použiť na vyhľadanie a odstránenie rakovinových buniek. Na schopnosť vyhľadania rakovinových buniek slúži štruktúra  $\beta$ -cyklodextrínu modifikovaná kyselinou listovou, kvôli omnoho vyššiemu počtu receptorov u rakovinových buniek pre kyselinu listovú než u normálnych buniek. Takto modifikovaná štruktúra  $\beta$ -cyklodextrínu môže rozpoznať

receptory kyseliny listovej v nádorových bunkách. Výsledná supramolekulárna štruktúra vykazuje omnoho nižšiu toxicitu a vyššiu účinnosť liečiva, než u čistého doxorubicínu [11] [13].



**Obrázok 11:** Schématické znázornenie porfyrínovej štruktúry modifikovanej adamantánom nekovalentnou  $\pi$ - $\pi$  interakciou s grafénom,  $\beta$ -cyklodextrínu modifikovaného kyselinou listovou a liečiva doxorubicín na liečbu rakoviny [11].

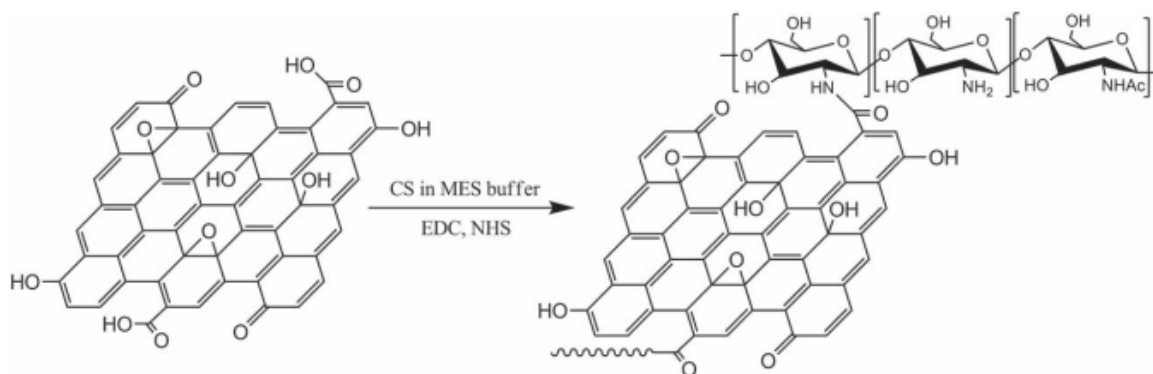
Redukovaný grafénoxid a grafénoxid s naviazanými nanočasticami zlata, striebra, paládia, platiny, niklu, medi,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  priťahujú pozornosť svojimi výhodnými magnetickými a optickými vlastnosťami so schopnosťou kombinácie cieleného dodávania liečiva a funkcie biosenzorovania [8].

Nekovalentné modifikácie majú mnoho výhod, no absorpcia materiálu na grafén a grafénoxid býva omnoho slabšia, než u kovalentných modifikácií. Výsledná štruktúra vytvorená nekovalentnou modifikáciou je často nestabilná pri rôznych zmenách vonkajšieho prostredia. Pri aplikácii takýchto štruktúr na prenos a dodávanie liečiva môže byť dodávací systém s liekom nestabilný pri interakcii s biologickým systémom [8, 11].

### 4.3 Modifikácia grafénoxidu chitosanom

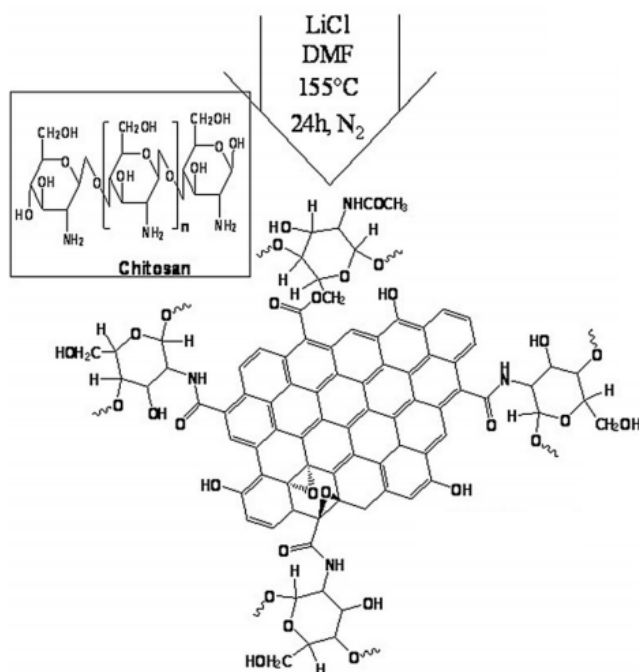
Chitosan je prirodzene sa vyskytujúci lineárny polysacharid tvorený D-glukosamínom a N-acetyl-D-glukosamínom, získavaný deacetyláciou chitínu zo schránok kôrovcov a vykazujúci množstvo vlastností atraktívnych v medicínskom, tkanivovom a farmaceutickom priemysle. Kvôli jeho dobrej biologickej kompatibilite, biologickej odbúrateľnosti, minimálnej toxicite, antibakteriálnej a imunogenicitnej vlastnosti nachádza uplatnenie ako výživový doplnok znižujúci hladinu cholesterolu v krvi a krvného tlaku, v oblasti dodávania liekov ako nosná látka, ktorá zlepšuje chuť a rozpustnosť liečiva [14, 15].

Modifikácia grafénoxidu chitosanom (GOCH) sa prevádza kovalentnou cestou, presnejšie amidáciou. Na Obrázku 12 je zobrazená syntéza grafénoxidu modifikovaného chitosanom s použitím organického činidla EDC (1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) karbodiimid) zabezpečujúce iniciáciu tvorby amidovej väzby medzi grafénoxidom a chitosanom. Následne vznikal aktívny medziprodukt, ktorý je stabilizovaný pomocou organického činidla NHS (N-hydroxysukcinimid) [15].



**Obrázok 12:** Syntéza modifikácie grafénoxidu chitosanom pomocou činidiel EDC a NHS [15].

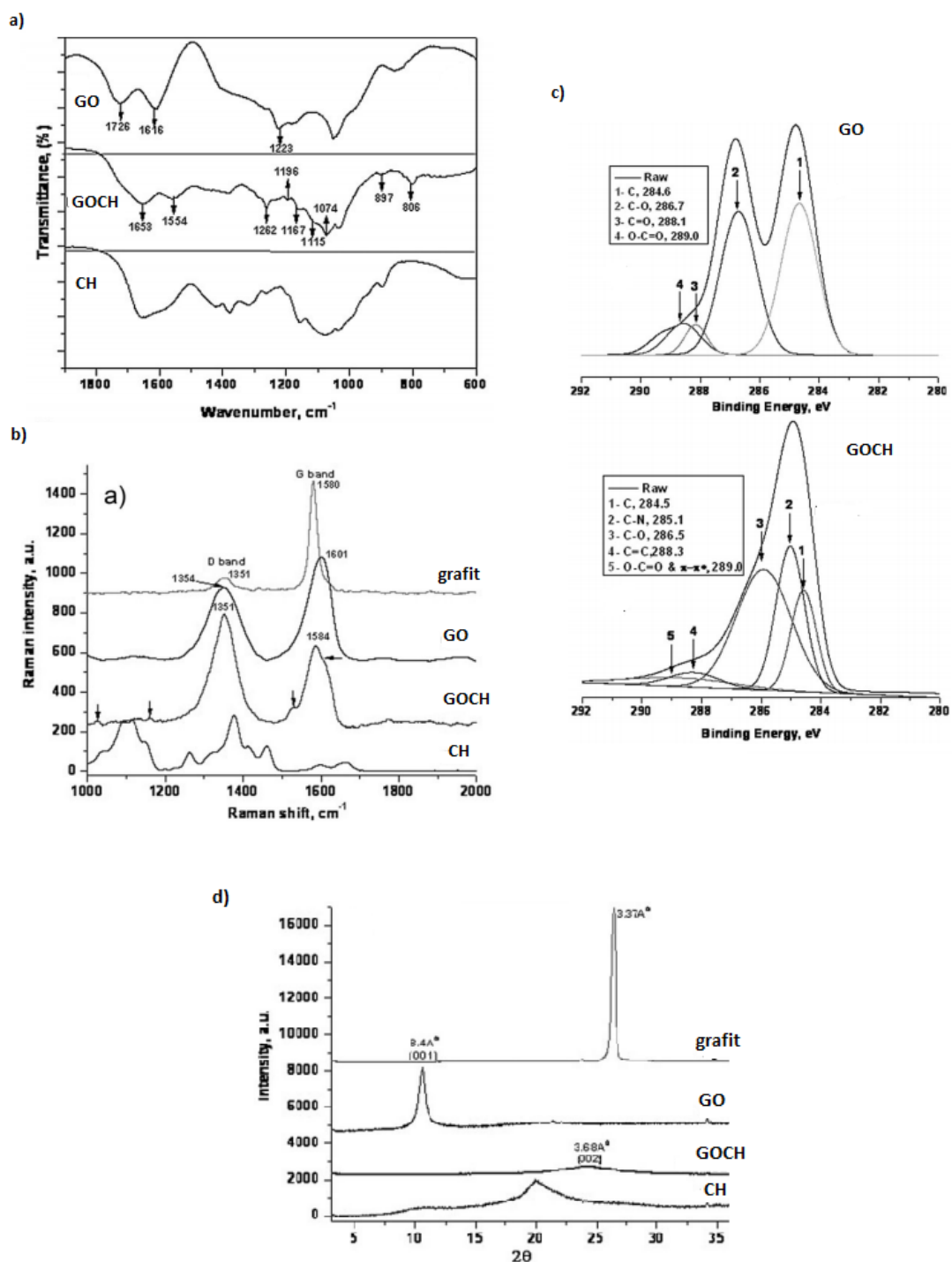
Existuje aj mnoho iných spôsobov prípravy grafénoxidu modifikovaného chitosanom. Na Obrázku 13 je zobrazená príprava tejto modifikácie použitím chloridu lítneho a dimetylformamidu. Karboxylické skupiny grafénoxidu boli prevedené na acylchloridové (CO-Cl) s následnou typickou funkcionalizáciou chitosanom [16].



**Obrázok 13:** Príprava grafénoxidu modifikovaného chitosanom použitím chloriu lítneho a dimetylformamidu [16].

Na Obrázku 14 sú zobrazené spektrá analýz rentgenovej fotoelektrónovej spektroskopie (XPS), infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou (FTIR) a Ramanovej spektroskopie modifikácie grafénoxidu chitosanom. XPS spektrá indikujú intenzitu emitovaných fotoelektrónov z rôznych atómov a analyzujú povrch vzorky. Väzbová energia pre  $sp^2$  hybridizovaný uhlík v graféne, grafénoxide a nanotrubičkách má hodnotu v rozmedzí od 284,5 – 284,6 eV, pričom väzby uhlík-kyslík sú vzhľadom k  $sp^2$  posunuté: 1,4 – 2,4 eV (hydroxylové a epoxidové skupiny), 2,6 – 3,5 eV (karbonylové skupiny), 4,3 – 5,4 eV (karboxyly a estery). Na Obrázku 14 c môžeme pozorovať, že po modifikácii grafénoxidu chitosanom zmizla väčšina epoxidových a hydroxylových skupín a bola pozorovaná väzba C-N [17, 18].

U FTIR analýzy grafénoxidu (Obrázok 14 a) boli pozorované píky  $1726\text{ cm}^{-1}$  a  $1223\text{ cm}^{-1}$  predstavujúce C=O (karboxyl) a C-O (epoxy) skupiny. Pík C=O po modifikácii chitosanom zmizol a bol pozorovaný pík  $1653\text{ cm}^{-1}$ , charakteristický pre pásmo amidových skupín. Dôkazom naviazania chitosanu bola aj prítomnosť píkov  $897\text{ cm}^{-1}$  a  $1115\text{ cm}^{-1}$  predstavujúce väzbu glukopyranózových kruhov chitosanu. V Ramanovom spektre grafénoxidu (Obrázok 14b) sú pozorované pásy G ( $1601\text{ cm}^{-1}$ ) a D ( $1354\text{ cm}^{-1}$ ). U jeho modifikácie chitosanom je pokles vlnočtu G pásu na hodnotu  $1584\text{ cm}^{-1}$  a menej výrazný pokles D pásu na hodnotu  $1351\text{ cm}^{-1}$ . Taktiež sú prítomné malé píky indikujúce prítomnosť chitosanu (vyznačené v Obrázku 14 b šípkami) [17].

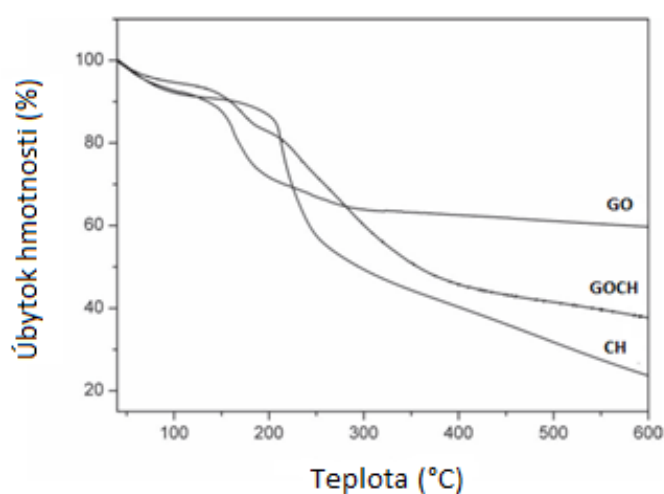


**Obrázok 14:** a) FTIR, b) Raman, c) XPS, d) XRD analýzy grafénoxidu (GO), chitosanu (CH) a grafénoxidu modifikovaného chitosanom (GOCH) [17].

U difraktogramov rentgenovej difrakčnej analýzy (Obrázok 14 d) vykazuje čistý grafit (002) difrakčný pík u  $2\theta = 26,45^\circ$ , zodpovedajúci medzirovinnej vzdialenosti  $d = 3,37 \text{ \AA}$ . U grafénoxidu pozorujeme (001) pík u  $2\theta = 10,84^\circ$ , zodpovedajúci  $d = 8,84 \text{ \AA}$  a u jeho modifikácie chitosanom vzniká široký difrakčný (002) pík na  $2\theta = 24,168^\circ$  s medzirovinnou

vzdialenosťou  $d = 3,68 \text{ \AA}$ . Zo XRD analýzy vyplýva, že modifikácia grafénoxidu chitosanom vykazuje amorfnú štruktúru [17].

Na skúmanie zmien tepelnej stability a zloženia sa používa termogravimetrická analýza (TGA). Na Obrázku 15 sú zobrazené TGA krivky čistého grafénoxidu, štruktúry GOCH a chitosanu u rýchlosti zahrievania  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  v atmosfére dusíku. Z kriviek vyplýva, že štruktúra GOCH začína byť nestabilná pod teplotou  $100^\circ\text{C}$  a stráca hmotnosť kvôli odparovaniu vody. Najvyššia strata hmotnosti je u teploty  $180^\circ\text{C}$ , ktorú spôsobuje pyrolýza skupín obsahujúce nestály kyslík. Modifikovaná štruktúra vykazuje 62% hmotnostnú stratu v dusíkovej atmosfére pri  $600^\circ\text{C}$ , zatiaľ čo GO a čistý chitosan majú hmotnostné straty 39% a 75% [15].



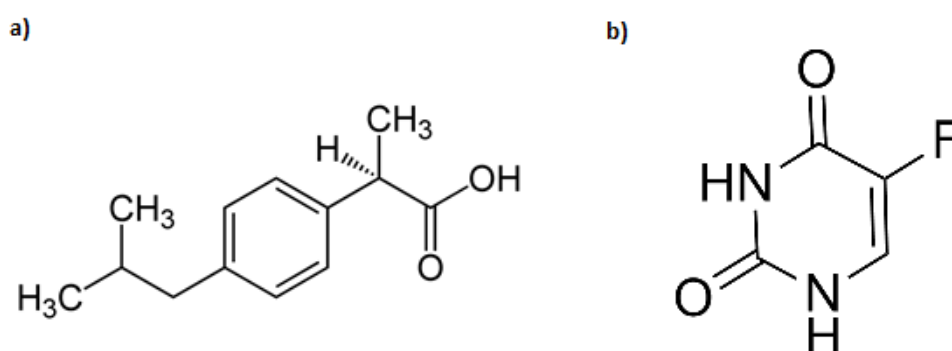
**Obrázok 15:** TGA krivky grafénoxidu, GOCH a chitosanu [15].

Kombináciou biokompatibilných, biodegradovateľných a netoxických vlastností chitosanu s vlastnosťami grafénoxidu ako planárnej štruktúry s vysokou plošnou hustotou je možné dosiahnuť kvalitný nosič liečiva na rôzne medicínske aplikácie. Chitosan vykazuje výhodné vlastnosti:

- (1) Mnohé povrchy sú negatívne nabité a chitosan vykazuje kladný náboj, čím dochádza k elektrostatickým interakciám, preto na jeho naviazanie na určitý nanomateriál alebo nanočasticu nie je potrebný vznik chemickej väzby.
- (2) Pripojenie ligandov na cielené dodanie liečiva je uľahčené prítomnosťou amino ( $-\text{NH}_2$ ) skupín.
- (3) Štruktúry na báze kationového chitosanu sa môžu ľahko a účinne pripojiť na negatívne nabitú fosfolipidovú dvojvrstvu bunkovej membrány.

- (4) Prítomnosť lyzozómov v bunkovej endocytóze môže uľahčiť degradáciu chitosanu a tým uvoľniť zapuzdrené liečivo.
- (5) Rozpustnosť chitosanu pri  $\text{pH} = 5,3$  (endozomálne  $\text{pH}$ ) a nerozpustnosť pri  $\text{pH} = 7,4$  (fyziologické  $\text{pH}$ ) zabraňuje skorému uvoľňovaniu liečiva pred dosiahnutím cieľového miesta.
- (6) Mukoadhezívne a baktériostatické vlastnosti chitosanu [10].

V jednej štúdií (*Rana et al.*) použili protizápalové liečivo ibuprofen (IBU) a protinádorové liečivo 5-fluorouracil (5-FU) ako modelové lieky, ktoré sú často v praxi používané. IBU je aromatické liečivo vytvárajúce hydrofóbne a  $\pi$ - $\pi$  interakcie, a 5-FU je hydrofilná, aromatická zlúčenina s amidovými funkčnými skupinami a fluórom (Obrázok 16) [17].

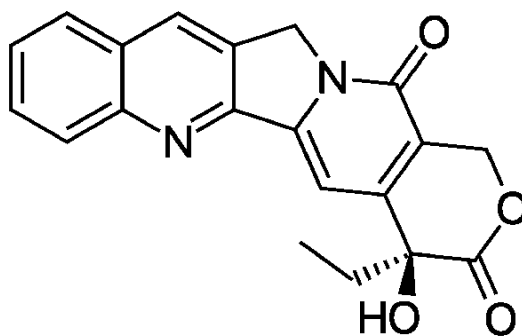


**Obrázok 16:** Štruktúra liečiva a) ibuprofen, b) 5-fluorouracil [19, 20].

Jednoduchou fyzisorpciou (nekovalentnou modifikáciou) boli tieto dve liečivá (rozpustené v roztoku hexánu a vody) naviazané na grafénoxid modifikovaný chitosanom. Prebytočné a nežiaduce zvyšky modifikovaného grafénoxidu boli odstránené centrifugáciou a zvyšky liečiv premytím a filtráciou. Bolo zistené, že pomer zaťaženia liečiva IBU mal z dôvodu rozdielnej chemickej štruktúry a interakcií vyššiu hodnotu ( $0,097 \text{ mg.mg}^{-1}$ ), než u 5-FU ( $0,053 \text{ mg.mg}^{-1}$ ). IBU vytvára hydrofóbne interakcie medzi jeho  $\text{COOH}$  skupinami a glukopyranózovými kruhmi chitosanu. Vytvorené štruktúry GOCH/IBU a GOCH/5-FU boli následne rozpustené v pufovanom fyziologickom roztoku (PBS,  $\text{pH} = 7,4$ ) a v tekutine simulujúcej žalúdočnú šťavu ( $\text{pH} = 1,4$ ), na pozorovanie uvoľňovania liečiv. IBU vykazoval nižšie uvoľňovanie (10% u PBS a 19% u tekutiny simulujúcej žalúdočnú šťavu) než 5-FU (70% u PBS a 50% u tekutiny simulujúcej žalúdočnú šťavu). Rozdielne uvoľňovanie liečiv spôsobujú rozdielne interakcie s modifikovaným grafénoxidom. IBU vykazuje s modifikovaným grafénoxidom silnejšiu a hydrofóbnejšiu  $\pi$ - $\pi$  interakciu než 5-FU. Chitosanom modifikovaná grafénoxidová štruktúra vykazovala dobrú a dlhodobú biokompatibilitu (5 dní) a účinnosť v boji proti CEM (ľudská lymfoblastická leukémia) a MCF7 (karcinóm prsníka). Bolo preukázané, že GOCH vykazuje

omnoho lepšiu biokompatibilitu, biodegradovateľnosť a nižšiu toxicitu než čistá grafénoxidová štruktúra. V budúcnosti by vedci chceli vyvinúť novú stratégiu funkcionalizácie GO s chitosanom so zahrnutím fluorescenčnej sondy na sledovanie bunkového príjmu materiálu a antibiotickú časť ako aktívnu molekulu [17].

V štúdiu *Hongqian et al.* použili ako modelové liečivo vo vode nerozpustné protinádorové liečivo kamptotecin (viď Obrázok 17) naviazaný hydrofóbnymi a  $\pi$ - $\pi$  interakciami na chitosanom modifikovaný grafénoxid. Výsledky poukázali na výhodnú kombináciu transfekčnej schopnosti nosiča s minimálnou toxicitou a účinnosťou liečiva. Navyše je štruktúra GOCH schopná účinne zapuzdriť plazmidovú DNA (krátka, do kruhu uzavretá molekula DNA) za vzniku kompaktných komplexov, ktoré vykazujú dobrú transfekčnú účinnosť v bunkách HeLa pri určitých koncentráciách dusíka alebo fosfátu. Tým sa stáva štruktúra GOCH adeptom v biologických aplikáciách na prenos nielen liečiva, ale aj génov. Podobne ako v predchádzajúcej štúdiu sa po naviazaní liečiva prevádzala filtrácia a premývanie na odstránenie nežiaducich zvyškov. Dokonca bolo zistené, že kapacita naviazania liečiva je u štruktúry GOCH dvakrát vyššia, než u modifikácii grafénoxidu s polyetylénglykolom a kyselinou listovou. Skúmanie uvoľňovania liečiva CPT sa prevádzalo v pufovanom fyziologickom roztoku (PBS) a po 72 hodinách bolo uvoľnených 17,5 % liečiva. Príčinou sú silné  $\pi$ - $\pi$  interakcie vznikajúce medzi CPT a GOCH, ktoré ale nie sú nevýhodné, pretože ich prítomnosťou je celá štruktúra spolu s liečivom omnoho stabilnejšia a je schopná fungovať v podmienkach organizmu. Štruktúra s liečivom vykazovala minimálnu toxicitu a vysokú účinnosť proti rakovinovým bunkám (v štúdiu bol použitý ľudský pečeneňový a cervikálny karcinóm) [15].

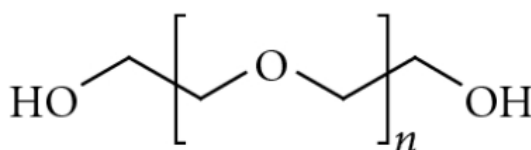


**Obrázok 17:** Štruktúra protinádorového liečiva kamptotecin [21].



#### 4.4 Modifikácia grafénoxidu polyetylén glykolom

Polyetylén glykol (PEG) je polymér alebo oligomér etylénoxidu. V závislosti od molárnej hmotnosti (dĺžky reťazca) je polyetylén glykol kvapalného aj pevného skupenstva. Polyetylén glykol je hydrofilný biokompatibilný, používaný na funkcionalizáciu rôznych nanomateriálov kvôli zlepšeniu ich biologickej kompatibility, zníženiu ich nešpecifickej adsorpcie na biomolekuly a bunky a zlepšeniu ich farmakokinetiky („osud“ liečiva po podaní do organizmu; štúdium o absorpcii, distribúcii v organizme a eliminácii lieku v určitom čase) [8, 9, 22].

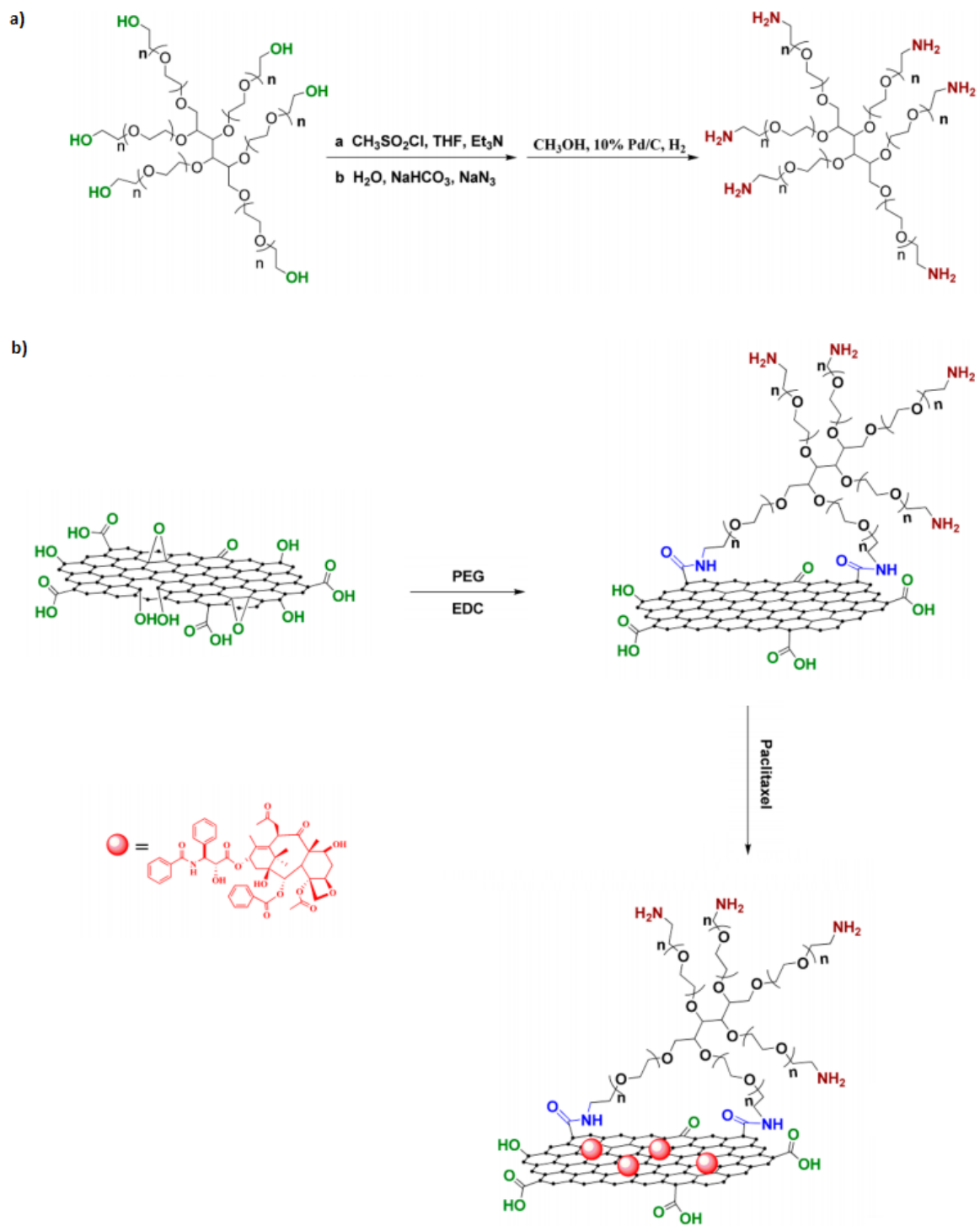


**Obrázok 18:** Štruktúra polyetylén glykolu [22].

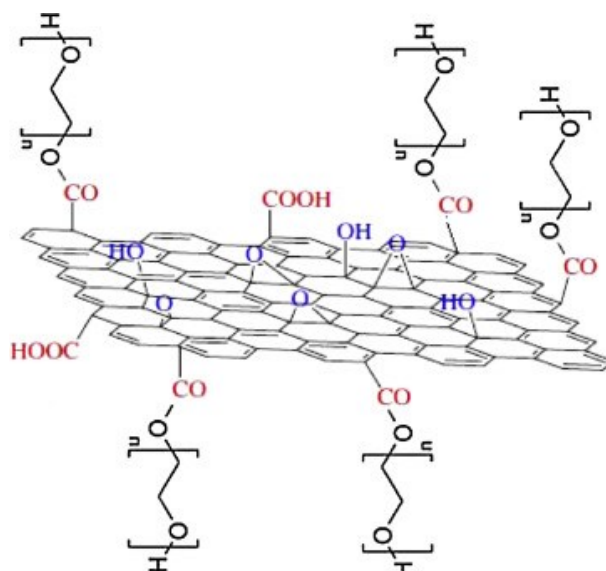
Pegylácia grafénoxidu sa prevádza rôznymi spôsobmi. V štúdiu *XU et al.* prevádzali kovalentnú modifikáciu grafénoxidu polyetylén glykolom. Najskôr previedli zmenu -OH skupín PEG na -NH<sub>2</sub>, ktorá ľahšie reagovala s epoxy a -OH skupinami grafénoxidu amidačnou reakciou za prítomnosti činidla EDC (viď Obrázok 19). V tejto štúdiu použili protinádorové liečivo paklitaxel, ktoré sa naviazalo na štruktúru GO-PEG pomocou  $\pi$ - $\pi$  interakcií, keďže liečivo vykazuje aromatickú štruktúru. Kompletná štruktúra dosahovala dobrej stability vo vode a v pufrovanom fyziologickom roztoku, dobrú biokompatibilitu a fyziologickú stabilitu [23].

Existujú aj mnohé iné spôsoby prípravy modifikácie grafénoxidu polyetylén glykolom. Väčšinou sa najskôr grafénoxid prevedie na jeho redukovanú formu (rGO) a formu obsahujúcu karboxylové skupiny (GO-COOH), ktoré sa považujú za silné interakčné miesta. Redukovaná forma GO bola pripravovaná za prítomnosti redukčného činidla tetrahydridoboritan sodný NaBH<sub>4</sub> a karboxylová forma pomocou chlóracetátu sodného ClCH<sub>2</sub>COONa a hydroxidu sodného. Následne prebiehala modifikácia polyetylén glykolom (Obrázok 20 a Obrázok 21). Niekedy sa u PEG prevádza zmena -OH skupín na -NH<sub>2</sub>, z dôvodu zlepšenia interakcie, čo môžeme pozorovať na Obrázku 21 [10, 24].

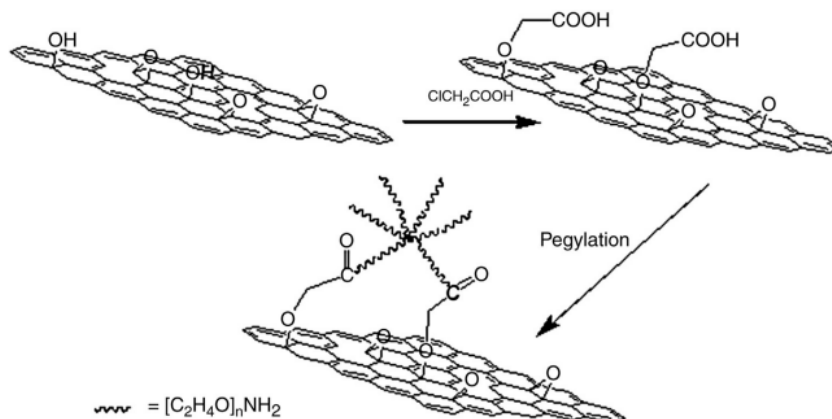
Na Obrázku 22 sú obsiahnuté FTIR spektrá grafénoxidu, redukovaného grafénoxidu, GO-COOH a ich modifikácie polyetylén glykolom. Porovnaním intenzít a polôh píkovej je usúdené, že absorpčné píky PEG sú zachované s miernym posunom polohy. Je teda možné, že sa polyetylén glykol dokázal naviazať okrem kovalentnej väzby aj neväzbovými interakciami (vodíkové mostíky) [24].



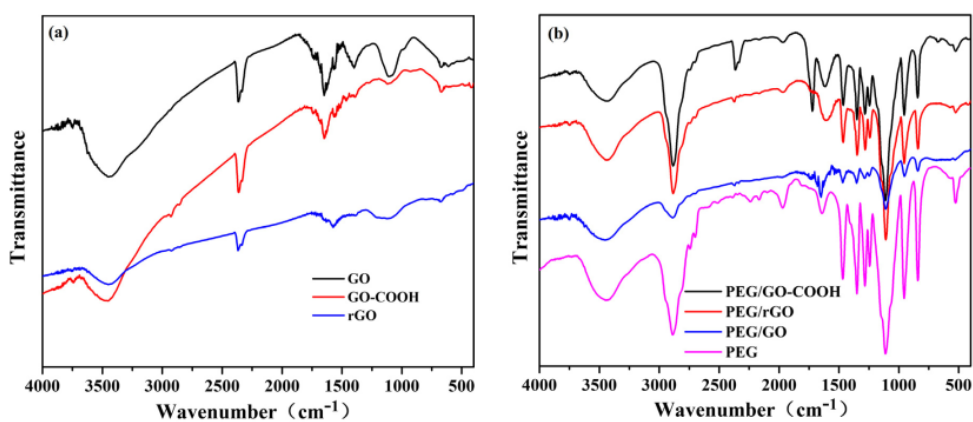
**Obrázok 19:** Schéma prípravy grafénoxidu modifikovaného polyetylén glykolom; a) prevod OH skupín na  $\text{NH}_2$  skupiny, b) naviazanie polyetylén glykolu a liečiva paklitaxel (ružová guľička) [23].



**Obrázok 20:** Schéma naviazania PEG reťazcov na GO-COOH štruktúru [25].



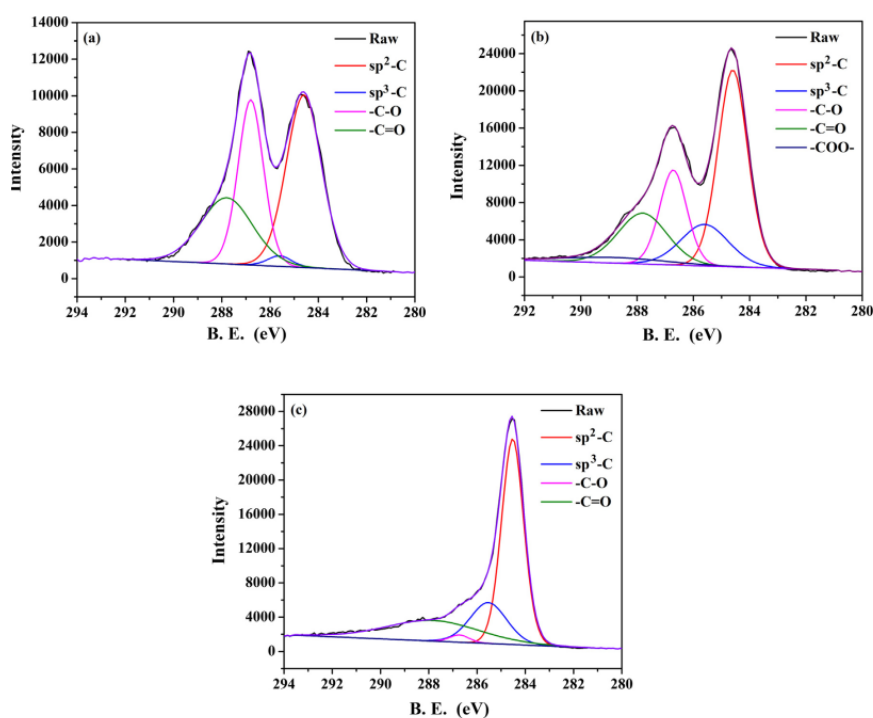
**Obrázok 21:** Schéma naviazania PEG reťazcov na redukovaný grafénoxid [10].



**Obrázok 22:** FTIR spektrá a) grafénoxidu, rGO a GO-COOH; b) modifikácie GO-COOH a rGO s PEG [24].

Na modifikácie GOPEG (buď GO-COOH alebo rGO cestou) je možné naviazať široké spektrum liečiv. Táto štruktúra sa ľahko viaže s protinádorovým liečivom doxorubicín, kamptotecín a SN-38 (liečivo s podobnou štruktúrou ako kamptotecín). Liečivá sa viažu Van der Waalsovými a  $\pi$ - $\pi$  interakciami. Pomer zaťaženia liečiva je u štruktúry GOPEG až 200 %, čo je omnoho vyššia hodnota, než u iných nosičov, u ktorých sa táto hodnota pohybuje pod 100 %. Štruktúry s naviazanými liečivami vykazujú dobrú biokompatibilitu a stabilitu vo fyziologických roztokoch. Nevýhodou nosiča GOPEG je jeho difúzia, ktorá môže nepriaznivo ovplyvniť uvoľňovanie liečiva. Pre účinnú terapiu by bolo vhodné po okamžitom príchode nosiča s liečivom rýchle uvoľňovanie liečiva, čo je možné vyriešiť určitým špecifickým stimulom [10].

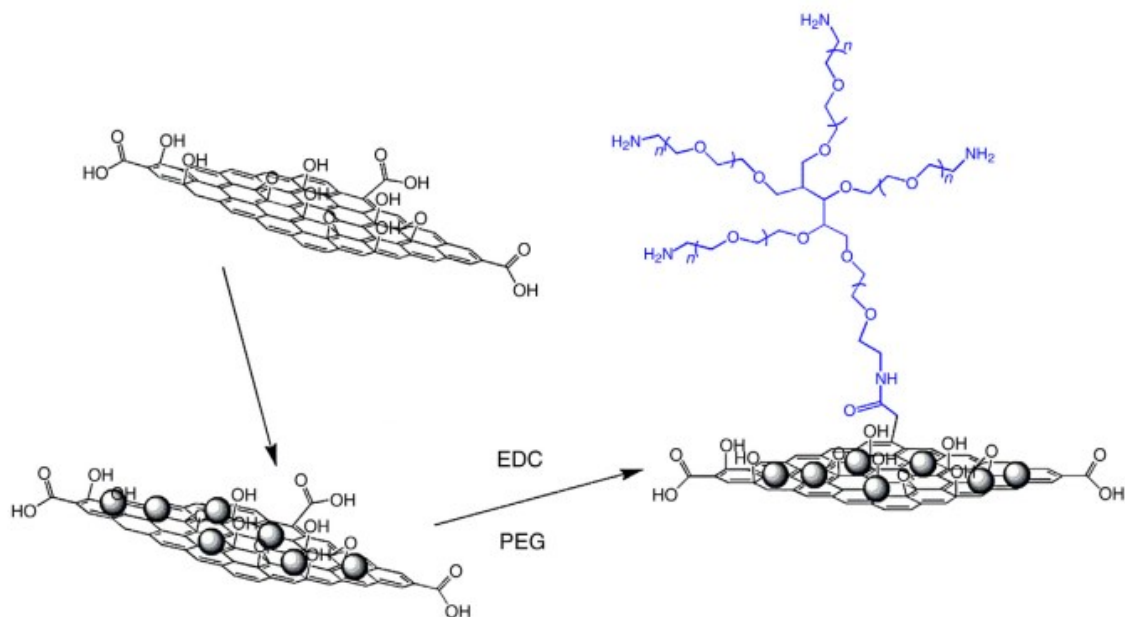
Na Obrázku 23 sú zobrazené spektrá XPS analýzy vzoriek GO, GO-COOH a rGO. Grafénoxid obsahuje hydroxylové, karbonylové skupiny a charakteristické píky odpovedajúce väzbám C-C a C=C. XPS spektrum grafénoxidu GO-COOH vykazuje prítomnosť karboxylových skupín, kvôli premene hydroxylových a epoxidových skupín karboxyláciou [24].



**Obrázok 23:** XPS spektrá a) grafénoxidu, b) grafénoxidu s COOH skupinami a c) redukovaného grafénoxidu [24].

V štúdií *Ma et al. (2012)* bola syntetizovaná multifunkčná modifikovaná grafénoxidová štruktúra obsahujúca magnetické nanočastice, liečivo (DOX) a naviazané reťazce PEG na zlepšenie rozpustnosti štruktúry vo fyziologickom roztoku a zlepšenie biokompatibility (viď Obrázok 24). Takáto hybridná štruktúra je ovládaná magnetickým poľom, a tým je ovládané

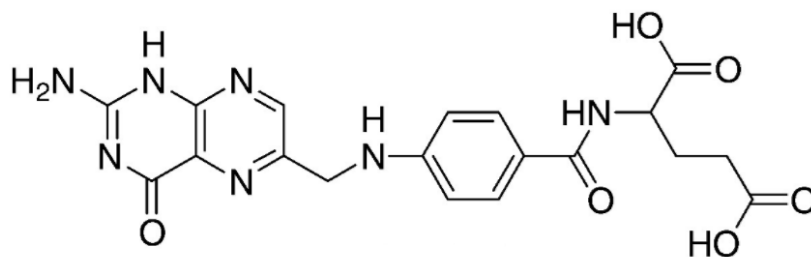
cielené dodanie liečiva. Použitím blízkeho infračerveného žiarenia počas 20 minút boli bunky blízko magnetu zničené, zatiaľ čo bunky mimo dosahu magnetického poľa boli neovplyvnené [10].



**Obrázok 24:** Schéma prípravy grafénoxidovej štruktúry obsahujúcej magnetické nanočastice a PEG [10].

#### 4.5 Modifikácia grafénoxidu kyselinou listovou

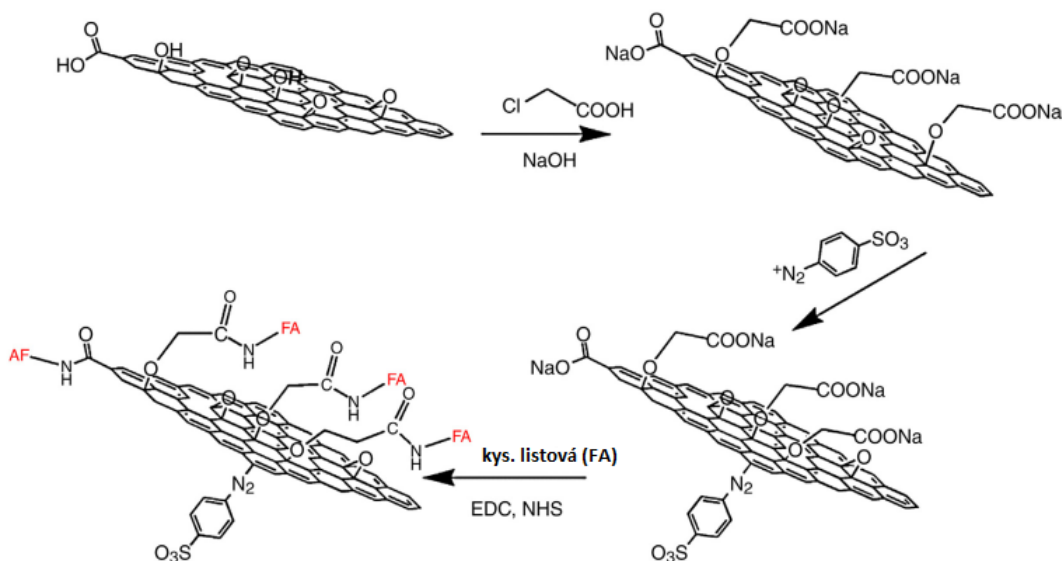
Kyselina listová (angl. folic acid, FA) je základným koenzýmom metabolizmu bielkovín a je to vo vode rozpustný vitamín. Je dôležitá pre tvorbu červených krviniek, syntézu DNA, rast tkaniva a funkciu buniek [26].



**Obrázok 25:** Štruktúra kyseliny listovej [26].

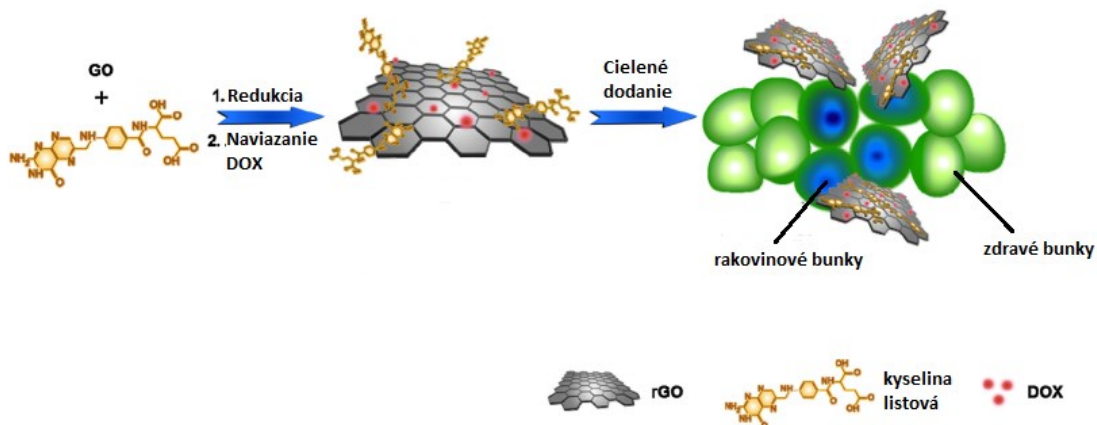
V štúdiu *Zhang et al.* bola pripravená kovalentná modifikácia grafénoxidu kyselinou listovou pomocou karboxylácie GO a následného zavedenia  $-SO_3$  funkčných skupín sulfonáciou

v prítomnosti činidiel EDC a NHS. Skupiny  $-SO_3$  slúžia na stabilizáciu štruktúry vo fyziologických roztokoch a molekuly kyseliny listovej na ciele dodanie liečiva do konkrétneho miesta, zlepšenie biokompatibility a rozpustnosti. K pripravenej modifikovanej štruktúre boli naviazané modelové protinádorové liečivá kamptotecín (CPT) a doxorubicín pomocou  $\pi$ - $\pi$  interakcií. Pomer zaťaženia liečiva mal vyššiu hodnotu u liečiva DOX (nad 400%) než u CPT (4.5%), z dôvodu rozdielnych štruktúr liečiv a ich rozdielnych hydrofóbných a  $\pi$ - $\pi$  interakcií [10, 27].



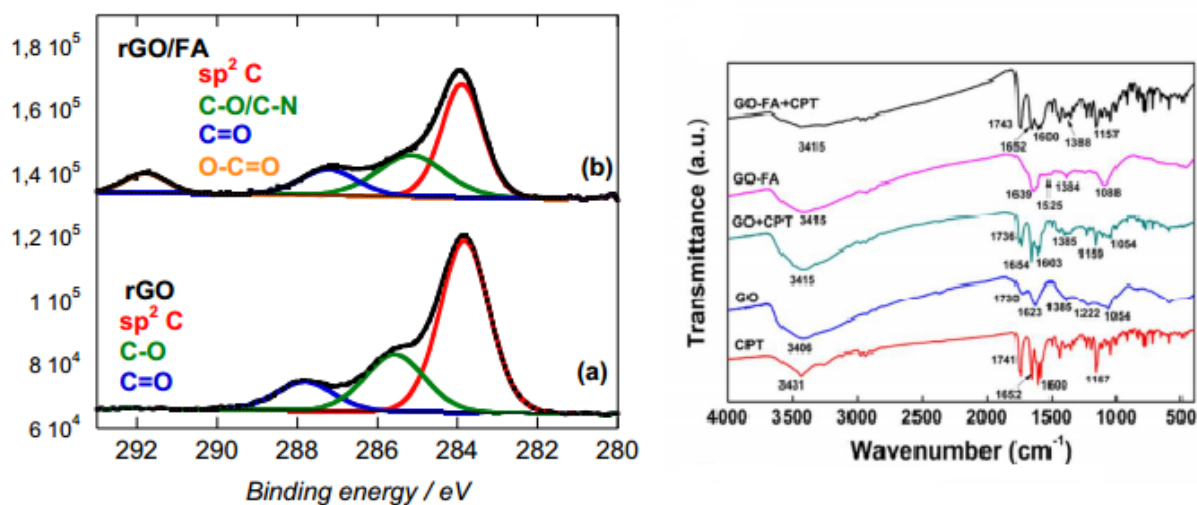
**Obrázok 26:** Schéma prípravy grafénoxidu modifikovaného kyselinou listovou [10].

Existuje aj nekovalentná modifikácia grafénoxidu kyselinou listovou, pričom takto pripravená modifikácia nachádza uplatnenie ako nosič liečiva. Syntéza sa prevádza zmiečaním roztokov grafénoxidu a kyseliny listovej v pomere 1:1 a následne sa aplikuje silne redukčné činidlo hydrazín monohydrát, ktorý prevedie GO na jeho redukovanú formu rGO. Kyselina listová sa na redukovanú formu grafénoxidu viazala Van der Waalsovými a  $\pi$ - $\pi$  interakciami. Protinádorové liečivo DOX bolo použité ako modelové liečivo a spolu s modifikovanou štruktúrou vykazovali dobrú biokompatibilitu a stabilitu v PBS (pufrovaný fyziologický roztok). Pomer zaťaženia liečiva vykazovalo hodnotu 67,5%. Schéma modifikácie štruktúry a následného zacielenia na rakovinové bunky (karcinóm prsníka) je zobrazená na Obrázku 27 [28].



**Obrázok 27:** Schéma modifikácie GO na rGO-FA-DOX a cielené dodanie k rakovinovým bunkám [28].

Na Obrázku 28 sú zobrazené analýzy XPS pre štruktúru redukovaného GO s kyselinou listovou a FTIR pre štruktúru GO s kyselinou listovou a liečivom CPT. U XPS spektra vedie integrácia FA k vzniku nového píku s väzbovou energiou od 290,3 eV z dôvodu prítomnosti  $-\text{COOH}$  skupín. U FTIR spektra GO je možné pozorovať široký pík  $3406\text{ cm}^{-1}$  predstavujúci OH skupiny,  $1730\text{ cm}^{-1}$ ,  $1623\text{ cm}^{-1}$ ,  $1222\text{ cm}^{-1}$  a  $1054\text{ cm}^{-1}$  predstavujúce C=O, C=C, CO a COC skupiny. Potvrdením funkcionalizácie kyseliny listovej je redukcia karboxylového píku pri  $1730\text{ cm}^{-1}$ , pozorovanie intenzívneho píku u  $1639\text{ cm}^{-1}$ , ktorý predstavuje amidové väzby a prítomnosť píku v okolí  $1088\text{ cm}^{-1}$  predstavujúci väzbu C-N [29, 30].



**Obrázok 28:** XPS spektrum štruktúry rGO-FA a FTIR spektrum štruktúry GOFA [29, 30].

## 5 Toxicita grafénových štruktúr

V dôsledku pozoruhodných štruktúrnych, chemických a mechanických vlastností grafénu, grafénoxidu a ich modifikácií sa ich použitie na prenos liečiva čoraz podrobnejšie skúma. Doposiaľ preukázané štúdie dokazujú, že tieto nanomateriály majú veľký potenciál v biomedicínskych aplikáciách. Prítomnosť vodíkových väzieb medzi polárnymi oxidatívnymi funkčnými skupinami spôsobuje zlepšenie koloidnej stability a zvýšenie rozpustnosti grafénových štruktúr. Viaceré štúdie naznačujú, že toxicita grafénových štruktúr závisí od komplexnej súhry viacerých fyziokemických vlastností, ako sú tvar, veľkosť, oxidačný stav, prítomnosť funkčných skupín, disperzný stav, metóda prípravy grafénovej štruktúry, spôsob podania a veľkosť dávky. Post-syntetické kroky spracovania môžu viesť k narušeniu grafénovej štruktúry a produkcii menších uhlíkatých zvyškov alebo začleneniu niekoľkých kovových nečistôt do konečného produktu [31].

Výroba modifikovaných grafénových štruktúr môže mať za následok výskyt nečistôt a zvyškov manganistanov, dusičnanov, síranov, peroxidov, ktoré môžu mať nepriaznivé biologické účinky a vplyv na toxicitu. Navyše ešte nie je do detailov preskúmaný vplyv rovinných grafénových štruktúr na toxicitu, ktorá je ovplyvniteľná celkovým tvarom grafénu a jeho modifikáciami. Rovinný 2D tvar totižto v biologických systémoch neexistuje a je odlišný od rúrkových (nanovláka, nanotrubičky) a guľových tvarov (nanočastice), ktorých toxicita je už preskúmaná. Morfológia, tvar a veľkosť grafénových štruktúr môže ovplyvniť bunkové vlastnosti, prítomnosť funkčných skupín môže viesť k zmene bunkových interakcií s proteínmi, biomolekulami a živinami. Ostré hrany grafénových štruktúr a ich modifikácií môžu vykonať fyzické poškodenie fosfolipidových dvojvrstiev bunkových membrán. Povrchovými úpravami je však možné tieto negatívne vlastnosti znížiť na minimum, prípadne eliminovať [8, 31].

Zo všetkých možných druhov uhlíkatých nanomateriálov vykazuje grafénoxid najvhodnejšie vlastnosti pre jeho využitie ako nosič liečiva. Cílené dodanie liečiva do oblastí tela, ktoré sú momentálne nedostupné pre súčasné techniky dodávania liečiv, sa použitím takto modifikovaných štruktúr značne uľahčia. Takýto unikátny prístup predstavuje enormné zlepšenie terapeutickú činnosti. Od štruktúr na prenos liečiva sa vyžadujú nekompromisné vlastnosti ako rozpustnosť, biokompatibilita, minimálna toxicita, stabilita a kontrolované fyzikálne a chemické vlastnosti.

Prevádzanie *in vivo* a *in vitro* cytotoxicity je základným hodnotením materiálu s potenciálnym využitím v biomedicínskych aplikáciách. Modifikáciou grafénoxidu hydrofilným



a biokompatibilným polyetylénglykolom sa znižuje toxicita na zanedbateľnú hodnotu pre rôzne bunkové línie. Pri testoch intravenózneho podania liečiva naviazaného na štruktúru PEG prevádzaných na myšiach bolo z histologických testov zistené, že sa systém prenosu liečiva nachádzal v pečeni a slezine a bol postupne vyčistený z organizmu bez vedľajších účinkov a toxicity. Množstvo dávky bolo 20 mg/kg a test sa prevádzal po dobu troch mesiacov. Čistý grafénoxid spôsobuje silnú agregáčnú schopnosť krvných doštičiek, naopak grafénoxid modifikovaný amino skupinami túto schopnosť nemá [8].

Štúdie o biologickej kompatibilite jasne naznačujú, že toxicita grafénu a grafénoxidu je úzko spätá s ich povrchovou funkcionalizáciou. Funkcionalizovaný grafén, GO a ich deriváty majú vo väčšine prípadov výrazne menšie toxické vlastnosti v porovnaní s ich nefunkcionalizovanými štruktúrami. Vzhľadom na to, že pokusy na zvieratách (hlodavce atď.) by mohli mať iné výsledky ako u primátov a ľudí, je dôležité uskutočniť príslušné dlhodobé štúdie toxicity na báze grafénových nanomateriálov. Predbežné výsledky zo súčasných štúdií toxicity poskytujú optimistický pohľad pre ich úspešné využitie v biomedicínskych aplikáciách [8, 10].

## 6 Praktická časť

### 6.1 Príprava grafénoxidu Hummersovou metódou

#### 6.1.1 Použité chemikálie

Grafitové vločky (99%), manganistan draselný (99%), dusičnan sodný (99%), kyselina sírová (96%), peroxid vodíka (30%), kyselina chlorovodíková (98%). Chemikálie sú dostupné zo Sigma Aldrich.

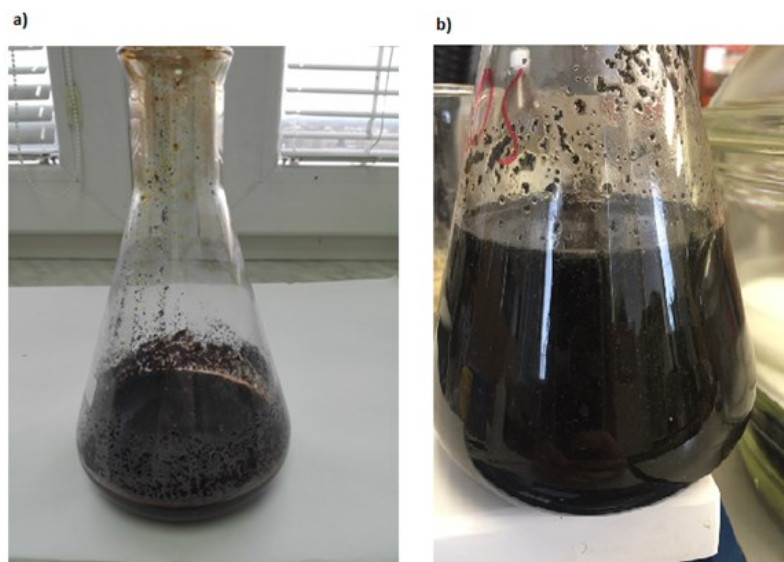
#### 6.1.2 Pomôcky a prístroje

Pomôcky: odmerná banka (1000 ml), odmerný valec, lyžička, kadičky, teplomer s rozsahom -35 až +110°C), ľad, magnetické miešadlo, indikačné papieriky na meranie pH.

Prístroje: analytické váhy, ohrievacia podložka, sušička, odstredivka Rotina 420 Hettich Zentrifugen, magnetická podložka.

#### 6.1.3 Postup

1. Naváženie 2 g grafitových vločiek a 2 g dusičnanu sodného a vmiešanie do 50 ml kyseliny sírovej v odmernej banke (1000 ml), ktorá je udržiavaná v ľadovom kúpeli za stáleho miešania. Teplota udržiavaná na 0 – 5 °C.
2. Následne je pridávaných 6 g manganistanu draselného a zmes je miešaná po dobu 2 hodín (teplota udržiavaná pod 15 °C).
3. Odstránenie ľadového kúpeľa a miešanie zmesi pri 35 °C po dobu 2 dni (vid' Obrázok 29 a).
4. Zriedenie zmesi pomalým pridávaním 100 ml demineralizovanej vody za stáleho miešania, pričom dochádza k zvýšeniu reakčnej teploty a k zmene farby na hnedú.
5. Postupné pridávanie 200 ml demineralizovanej vody a následne 10 ml peroxidu vodíka za stáleho miešania (Obrázok 29 b).
6. Striedavé niekoľkonásobné čistenie a premývanie 10% roztokom kyseliny chlorovodíkovej a demineralizovanou vodou a sušenie pri teplote 60 °C.



**Obrázok 29:** Príprava grafénoxidu (vzorka č. 4); a) zmes po odstránení ľadového kúpeľa, b) zmes po zriedení demineralizovanou vodou a peroxidom vodíka.

## 6.2 Modifikácia grafénoxidu chitosanom

### 6.2.1 Použité chemikálie

Grafénoxid (vzorka 1, vzorka 4), chitosan (stupeň deacetylácie 95%), kyselina octová (99%). Chemikálie sú dostupné zo Sigma Aldrich.

### 6.2.2 Postup

1. Príprava koloidného roztoku grafénoxidu (0,1 g v 20 ml demineralizovanej vody).
2. Naváženie 2,5 g chitosanu a rozpustenie v 250 ml 0,5% roztoku kyseliny octovej.
3. Spojenie 20 ml roztoku grafénoxidu a 20 ml roztoku chitosanu a intenzívne miešanie 24 hod.

### 6.2.3 Pomôcky a prístroje

Pomôcky: kadičky, lyžička, odmerný valec, odmerná banka (250 ml), indikačné papieriky na meranie pH.

Prístroje: analytické váhy, ultrazvuk, sušička, magnetická podložka, odstredivka Rotina 420 Hettich Zentrifugen.

### 6.3 Modifikácia grafénoxidu polyetylénglykolom

#### 6.3.1 Použité chemikálie

Grafénoxid (vzorka č. 1, vzorka č. 4), polyetylénglykol 6000, hydroxid sodný (98%), chloroctan sodný (98%), kyselina chlorovodíková (98%). Chemikálie sú dostupné zo Sigma Aldrich.

#### 6.3.2 Postup

1. Na prípravu grafénoxidu s funkčnými skupinami -COOH je potrebné vmiešanie 3,75 g hydroxidu sodného a 3,75 g chlóructanu sodného do 300 ml koloidného roztoku grafénoxidu (1 mg/ml).
2. Následné pôsobenie ultrazvukom na 2,5 hod.
3. Po ultrazvuku bola prevedená neutralizácia 10% roztokom kyseliny chlorovodíkovej.
4. Pevný prášok PEG bol zahriaty na 80 °C, skvapalnený a vmiešaný do koloidného roztoku GO-COOH.
5. Po preplachu a odstredení bol roztok GO-COOH-PEG intenzívne miešaný po dobu troch hodín a sušený pri teplote 80 °C.

#### 6.3.3 Pomôcky a prístroje

Pomôcky: kadičky, lyžička, odmerný valec, magnetické miešadlo,

Prístroje: analytické váhy, ultrazvuk, ohrievacia podložka, magnetická podložka, sušička, odstredivka Rotina 420 Hettich Zentrifugen.

### 6.4 Modifikácia grafénoxidu kyselinou listovou

#### 6.4.1 Použité chemikálie

Grafénoxid (vzorka č. 4), kyselina listová (97%), hydrazín monohydrát (98%). Chemikálie sú dostupné zo Sigma Aldrich.

#### 6.4.2 Postup

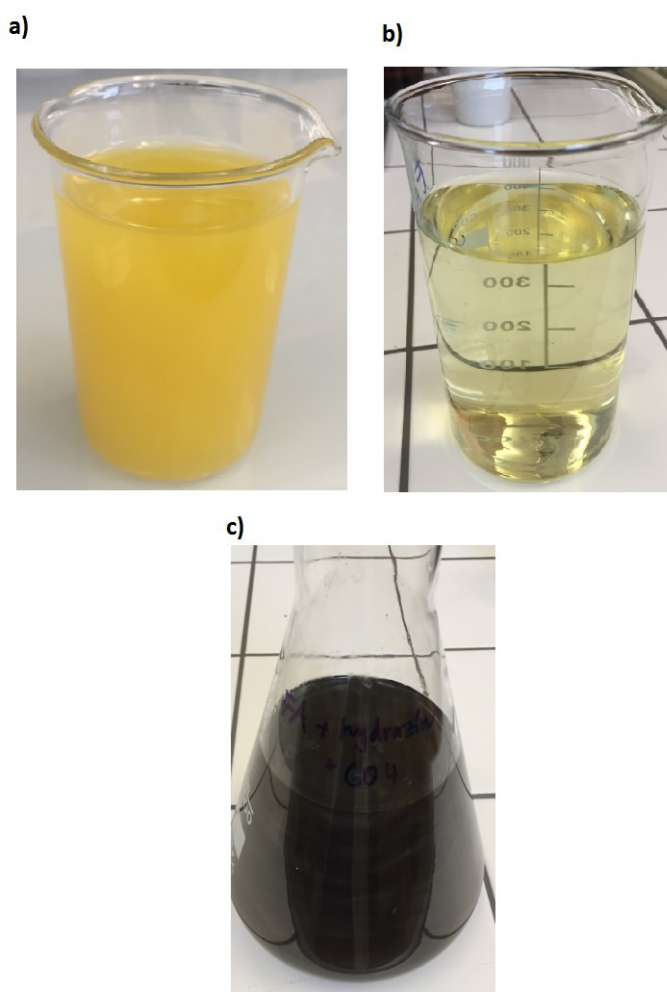
1. Naváženie 10 mg kyseliny listovej a vmiešanie do 100 ml demineralizovanej vody (Obrázok 30 a).
2. Do roztoku kyseliny listovej bolo následne nakvapkaných 20 kvapiek hydrazínu monohydrát (Obrázok 30 b).

3. Príprava roztoku grafénoxidu spočívala v navážení 10 mg grafénoxidu v 100 ml demineralizovanej vody.
4. Následne boli roztoky grafénoxidu a kyseliny listovej zmiešané a zahrievané po dobu 4 hodín na 80 °C (Obrázok 30 c).
5. Na odstránenie nečistôt a prebytočného hydrazínu bol vzniknutý roztok preplachovaný.

#### 6.4.3 Pomôcky a prístroje

Pomôcky: kadičky, lyžička, odmerný valec, magnetické miešadlo.

Prístroje: analytické váhy, ultrazvuk, ohrievacia podložka, magnetická podložka.



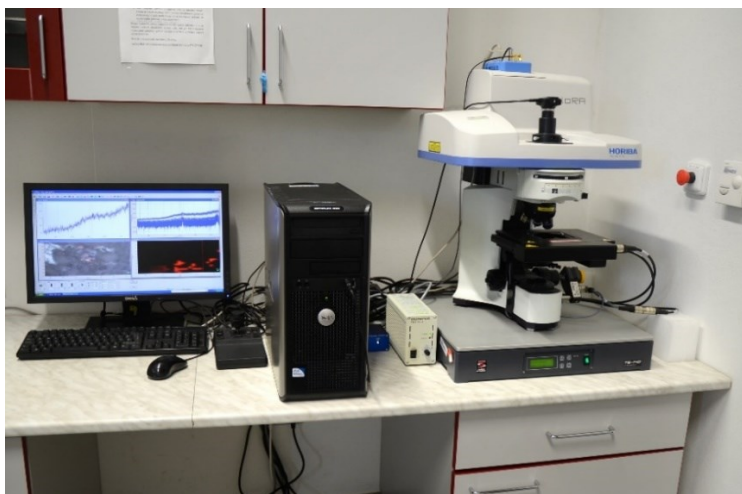
**Obrázok 30:** a) roztok kyseliny listovej, b) roztok kyseliny listovej po nakvapkaní hydrazínu monohydrát, c) zmiešanie roztoku GO a roztoku kyseliny listovej s hydrazínom.

## 6.5 Meranie a analýzy vzoriek

Analýzy pripravených vzoriek praktickej časti diplomovej práce boli prevádzané na nasledujúcich prístrojoch:

(1) *Ramanov konfokálny mikroskop XploRA™ (Horiba Jobin Yvon, France).*

Súčasťou prístroja je optický mikroskop Olympus BX41/51 s tromi objektívmi so zväčšeniami 10x, 50x a 100x. V tomto konkrétnom meraní bol využitý objektív so zväčšením 50x. Na meranie bol použitý laser s vlnovou dĺžkou 532 nm (s výkonom 20 – 25 mW). Intenzita laseru bola regulovaná na 1 – 10 % pôvodného laserového žiarenia, podľa odozvy vzorky. Prístroj je plne automaticky ovládaný pomocou počítačového software LabSpec, v ktorom boli prevádzané aj úpravy spektier (zrovnanie pozadia – baseline) [32].



**Obrázok 31:** Ramanov konfokálny mikroskop XploRA™ (Horiba Jobin Yvon, France) [32].

(2) *Infračervený spektrometer s Fourierovou transformáciou Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, USA).*

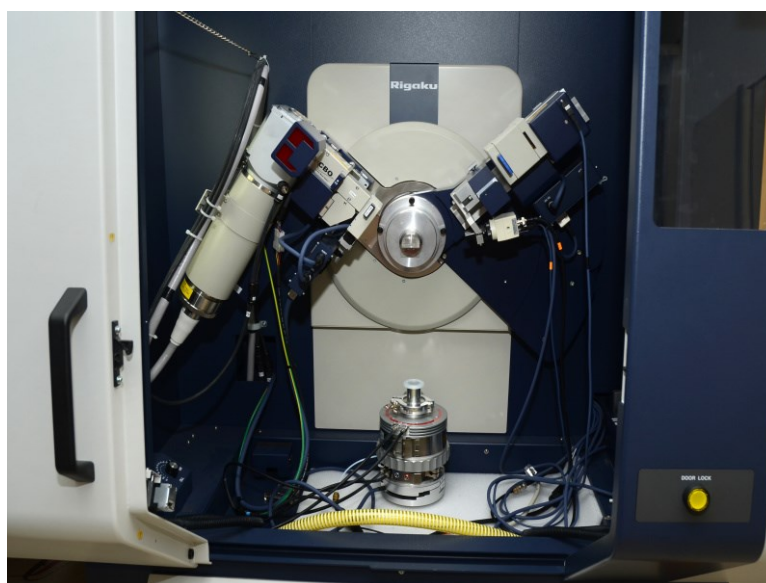
Infračervený spektrometer s Fourierovou transformáciou Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Nicolet, USA) obsahuje interferometer Vectra, ktorý dosahuje štandardného nominálneho spektrálneho rozlíšenia 0,4 cm<sup>-1</sup>. Vzorky boli merané metódou ATR (metóda zoslabenej totálnej reflektancie) s použitím diamantového ATR nástavca s diamantovým kryštálom. Obsluha prístroja je plne automatická a prebieha použitím počítačového software OMNIC. Spektrá boli upravované pomocou ATR korekcie s automaticky zrovnaním pozadia (baseline) [32].



**Obrázok 32:** Infračervený spektrometer s Fourierovou transformáciou Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Nicolet, USA) [32].

*(3) Rentgenový práškový difraktometer Rigaku Ultima IV*

Prístroj je vybavený rentgenovou lampou s Cu anódou, s vlnovou dĺžkou 1,5406 Å, scintilačným detektorom s Bragg-Brentano fokusačným usporiadaním. Pri meraní bol prítomný  $K\beta$  filter [32].



**Obrázok 33:** Rentgenový práškový difraktometer Rigaku Ultima IV [32].

#### (4) XPS Thermo Scientific K-Alpha

Pre XPS analýzu povrchov bolo využité zariadenie XPS Thermo Scientific K-Alpha z Výskumného centra Žilinskej univerzity v Žiline. Toto zariadenie využíva monochromatické žiarenie röntgenovej trubice s Al anódou. Oblasť merania bola definovaná elipsou s dĺžkou hlavnej polosi 400  $\mu\text{m}$  a dĺžkou vedľajšej polosi 200  $\mu\text{m}$  [33]. Parametre merania:

- pass energy (energia medzi dvoma hemisférami analyzátoru) = 50 eV,
- energetický krok = 0,1 eV.



**Obrázok 34:** XPS Thermo Scientific K-Alpha [33].

#### (5) Skenovací elektrónový mikroskop Quanta FEG 450 (FEI)

Vzorky boli upravené zariadením pre naprášenie povrchov kovom a uhlíkom POLARON SC 7640. Mikroskop je vybavený EDS analyzátorom APOLLO X (EDAX). Snímky boli vytvorené pri rôznych zväčšeniach pomocou detektoru BSE a SE pri urýchľovacom napätí 15 kV a šírke zväzku 5 (spot 5).



## 6.6 Výsledky a diskusia

V praktickej časti diplomovej práce bolo pripravených päť vzoriek grafénoxidu pomocou Hummersovej metódy. Presné podmienky syntéz sú obsiahnuté v Tabuľke 2. Vzorky grafénoxidov boli podrobené Ramanovej spektroskopii, XRD analýze, FTIR a XPS spektroskopii a SEM spolu s komerčne vyrábaným grafénoxidom od firmy Abalonyx použitým na porovnanie.

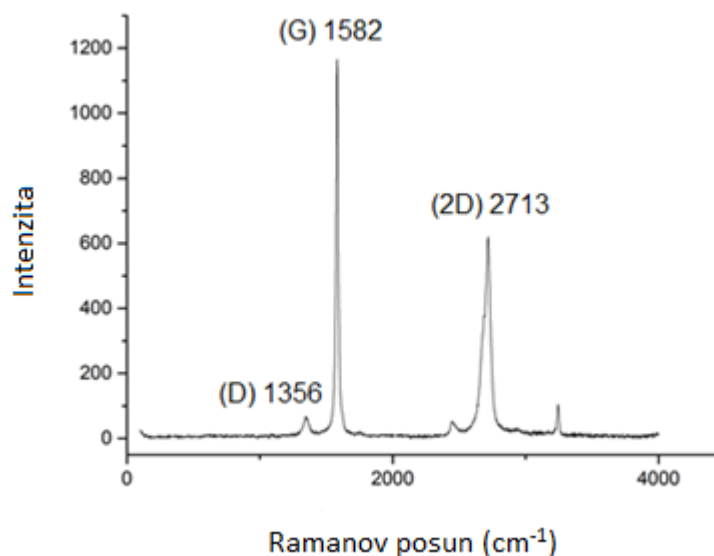
Tabuľka 2 – Podmienky prípravy vzoriek grafénoxidov.

Vzorky	Ohrev	Doba miešania
GO1	27°C	48 hod
GO2	37°C	18 hod
GO3	30°C	36 hod
GO4	30°C	48 hod
GO5	90°C	48 hod

Podľa výsledkov analýz boli následne vybrané dve vzorky grafénoxidov (č. 1 a č. 4), ktoré boli neskôr modifikované kyselinou listovou, polyetylén glykolom a chitosanom. Modifikácie boli následne charakterizované FTIR spektroskopiou a SEM. Modifikácie vzorky č. 4 (GO4CH, GO4PEG a GO4FA) boli zmiešané s protinádorovým liečivom kamptotecín a charakterizované FTIR spektroskopiou.

### 6.6.1 Ramanova spektroskopia

Pri interakcii svetla s látkou dochádza okrem disperzie, lomu, absorpcie aj k menej častému rozptylu. Ramanova spektroskopia je jednou z významných jednoduchých, nedeštruktívnych spektroskopických techník, ktorej základom je využitie javu neelastického rozptylu v látkach. Rozptýlené vlnenie môže mať rovnakú frekvenciu ako dopadajúci lúč a vtedy nastáva elastický (Rayleighov) rozptyl. V prípade, že sa frekvencia rozptýleného a dopadajúceho lúča líšia, dochádza k neelastickému rozptylu (Ramanov jav). Monochromatické žiarenie (laser) je po interakcii so vzorkou rozptýlené a na detektore sa registruje rozdiel energií rozptýleného žiarenia a zdroja s následným prevedením na spektrá. Spektrum obsahuje pásy s charakteristickým frekvenčným posunom reprezentujúce vibračné pásy. Vibrácie sú špecifické pre jednotlivé chemické väzby, atómovú hmotnosť viazaných prvkov, symetrie molekúl a i. [34, 35].



**Obrázok 35:** Ramanovo spektrum grafitových vločiek použitých na prípravu grafénoxidu.

Ramanova spektroskopia umožňuje rozpoznať alotropické modifikácie uhlíkatých materiálov. Pre  $sp^3$  viazaný uhlík (diamant) obsahuje Ramanovo spektrum jednoduchú líniu u  $1335\text{ cm}^{-1}$ . U  $sp^2$  (grafit) je línia v hodnote  $1575\text{ cm}^{-1}$ . Táto línia sa označuje ako G pás a je to jediný aktívny Ramanov mód nekonečnej grafitovej mriežky. Pozícia a šírka G pásu bývajú ovplyvnené deformáciou, dopovaním nábojom a defektami v kryštálovej štruktúre. U  $1355\text{ cm}^{-1}$  je pozorovaný D pás predstavujúci amorfný uhlík a poruchy štruktúry, preto Ramanovo spektrum grafénu nevykazuje D pík. Taktiež sa vyskytuje 2D pás (dvojnásobný D) u  $2700\text{ cm}^{-1}$ , ktorý má u grafitu nižšiu amplitúdu a jeho význam je vo vyhodnotení vzájomného usporiadania grafénových vrstiev v grafitu [1, 3, 34, 35].

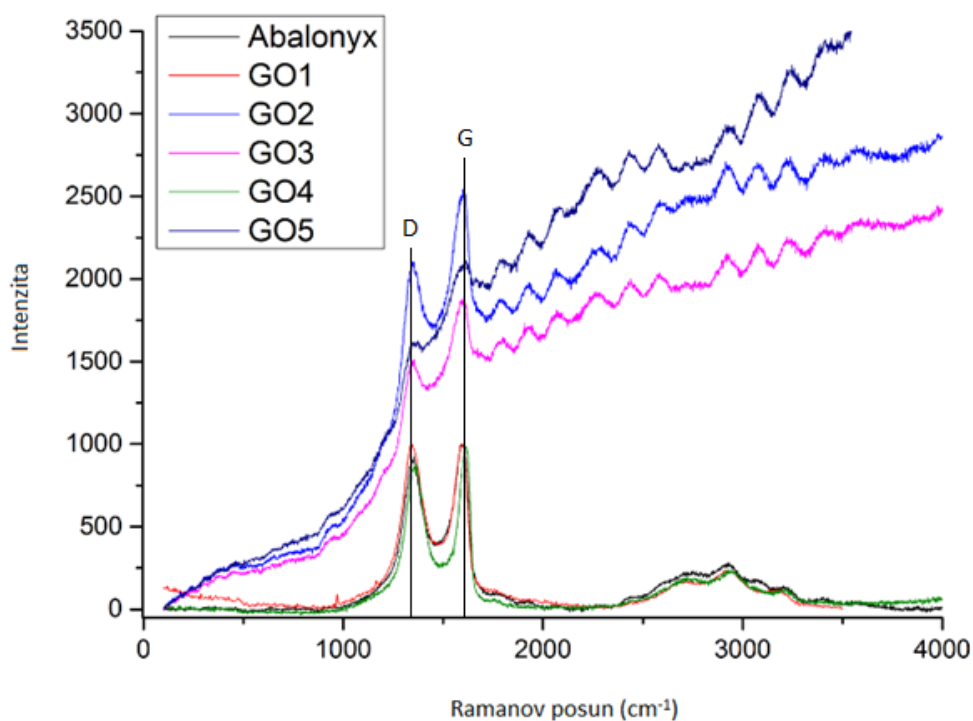
Porovnaním intenzít pásov  $I_{2D}/I_G$  je možné určiť odhad hrúbky grafénových štruktúr. Intenzita G pásu a šírka 2D pásu sa zvyšuje so zvyšujúcim sa počtom grafénových vrstiev. Jednovrstvový a dvojvrstvový grafén má  $(I_{2D}/I_G) > 1$ , zatiaľ čo viacvrstvový grafén vykazuje  $(I_{2D}/I_G) < 1$ . Avšak u grafénoxidu táto skutočnosť neplatí z dôvodu prítomnosti funkčných skupín. Porovnaním intenzít G a D pásov ( $I_D/I_G$ ) je možné určiť mieru defektnosti vzorky. Pásky D, G a 2D môžeme pozorovať na Obrázku 35 u Ramanovho spektra grafitových vločiek, ktoré boli použité na prípravu vzoriek grafénoxidov [1, 3, 34, 35].

Na Obrázku 36 sú obsiahnuté Ramanove spektrá vzoriek grafénoxidov pripravených Hummersovou metódou a komerčne dostupného grafénoxidu od firmy Abalonyx. V spektrách pozorujeme D a G pásky a v porovnaní so spektrom komerčne dostupného grafénoxidu sú mu najviac podobné spektrá vzoriek č. 1 a č. 4, ktoré boli vybrané na následné modifikácie.

Vo vzorkách č. 2, 3 a 5 je 2D pás málo viditeľný. G pás u vzorky č. 5 je taktiež slabo viditeľný. V Tabuľke 3 sú obsiahnuté hodnoty pomerov  $I_D/I_G$  a ich hodnoty sa pohybujú v okolí 0,85.

Tabuľka 3 – Hodnoty intenzít D, G a 2D pásov a príslušné pomery intenzít.

Vzorka	Intenzita D pásu [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Intenzita G pásu [ $\text{cm}^{-1}$ ]	$I_D/I_G$
Grafit	1356	1582	0,86
Abalonyx	1343	1591	0,84
GO1	1337	1593	0,84
GO2	1343	1598	0,85
GO3	1342	1585	0,85
GO4	1367	1606	0,85
GO5	1337	1634	0,82

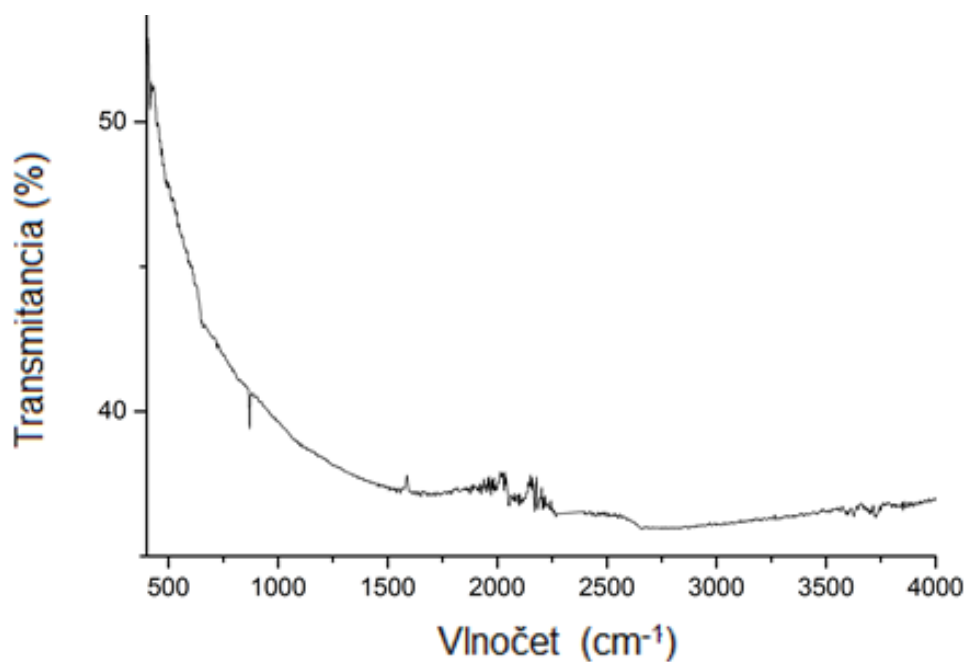


**Obrázok 36:** Ramanovo spektrum komerčne dostupného grafénoxidu od firmy Abalonyx a grafénoxidov (Vzorka 1 - 5).

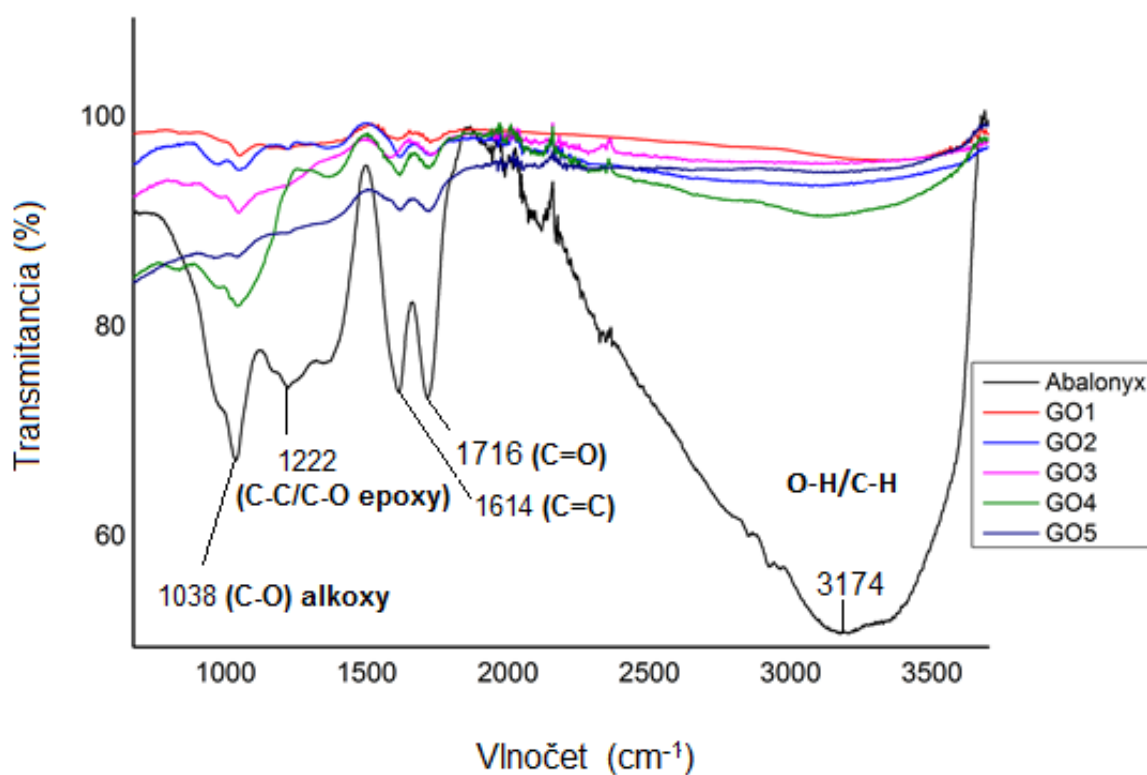
## 6.6.2 Infračervená spektroskopia

Infračervená spektroskopia je metóda založená na schopnosti látok absorbovať žiarenie z infračervenej oblasti ( $800 - 10^6$  nm) elektromagnetického spektra. Absorpciou určitého kvanta IR žiarenia dochádza k prechodu molekuly do vyššieho vibračného energetického stavu a závisí od štruktúry látky. K absorpcii IR žiarenia molekulou nastáva iba v prípade jej súčasnej zmeny dipólového momentu. K zmene dipólového momentu však dochádza len u asymetrických molekúl (HCl), symetrické molekuly ( $O_2$ ,  $N_2$ ) sú v IR oblasti neaktívne. Vzorky v diplomovej práci boli merané metódou zoslabenej totálnej reflektancie (ATR), ktorej podstatou je úplný vnútorný odraz IR žiarenia po priechode kryštálom s veľkým indexom lomu. Vzorka je umiestnená na povrchu a v tesnom kontakte s kryštálom. Následne dochádza k totálnemu odrazu na rozhraní opticky hustejšieho prostredia (kryštál) s opticky redším prostredím (vzorka). Pri tomto type odrazu nastáva k nepatrnému prenikaniu časti žiarenia do vzorky (evanescentná vlna) a k získaniu spektrálnej informácie. Analytickým výstupom je IR spektrum, ktoré je grafickým zobrazením funkčnej závislosti energie, vyjadrenej v percentách transmitancie ( $T$ ) alebo jednotkách absorbancie ( $A$ ) na vlnovej dĺžke dopadajúceho žiarenia. Transmitancia (priepustnosť) je definovaná ako pomer intenzity žiarenia, ktoré prešlo vzorkou ( $I$ ), k intenzite žiarenia zo zdroja ( $I_0$ ). Absorbancia je dekadický logaritmus  $I/I_0$ . Závislosť energie na vlnovej dĺžke je logaritmická, preto sa používa vlnočet, ktorý je prevrátenou hodnotou vlnovej dĺžky. V súčasnosti sa používajú spektrometry s Fourierovou transformáciou, u ktorých sú disperzné prvky nahradené interferometrom. V takýchto prístrojoch nedochádza k rozkladu žiarenia, ale k jeho skladaniu a rekombinácii [34, 35].

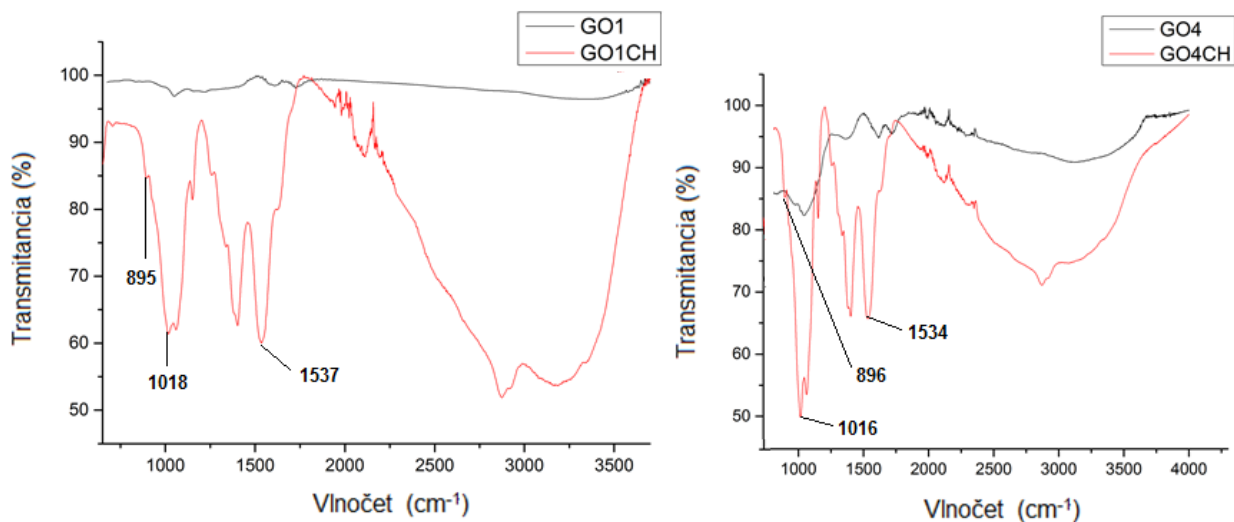
Keďže sú symetrické molekuly v IR oblasti neaktívne, IR spektrum grafitových vločiek (obsahujúce symetrické C-C a C=C väzby) je nevýrazné (Obrázok 37). IR spektrum komerčného grafénoxidu disponuje širokým píkum v rozmedzí od  $3500\text{ cm}^{-1}$  do  $2500\text{ cm}^{-1}$  predstavujúce C-H a O-H väzby. Od  $2000\text{ cm}^{-1}$  po  $1500\text{ cm}^{-1}$  sa nachádza oblasť dvojítých väzieb, predovšetkým C=C a C=O. Väzba C=C sa nachádza v okolí  $1650\text{ cm}^{-1}$  a C=O v okolí  $1730\text{ cm}^{-1}$ . C-O (epoxy) skupiny sú v oblasti  $1200\text{ cm}^{-1}$  a C-O (alkoxy) skupiny v oblasti  $1070\text{ cm}^{-1}$ . Od  $1500\text{ cm}^{-1}$  sa nachádza oblasť „odtlačku prstu“ (fingerprint region). Porovnaním vzoriek č. 1 až 5 s komerčne vyrábaným grafénoxidom (Obrázok 38) je možné usúdiť, že obsahujú karbonylové/karboxylové skupiny, alkoxy a epoxy skupiny a taktiež sú prítomné väzby C-C a C=C, no O-H väzby majú značne nižšie zastúpenie. U vzorky č. 5 nie sú viditeľné alkoxy, epoxy a O-H skupiny a minimálny náznak prítomnosti C-C a C=C skupín [17, 34 - 36].



**Obrázok 37:** IR spektrum grafitových vločiek použitých na prípravu grafénoxidu.

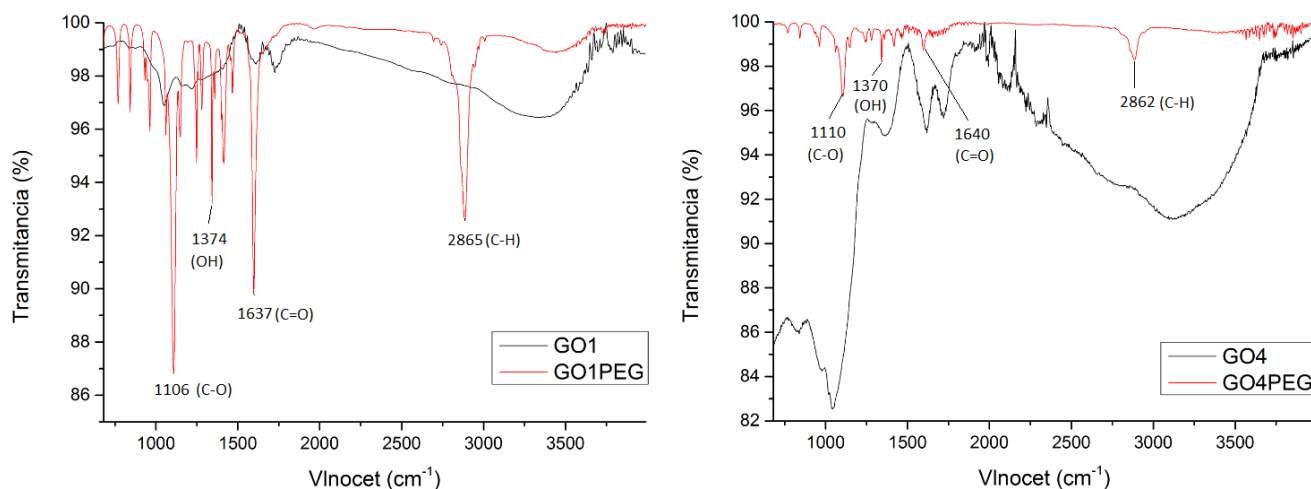


**Obrázok 38:** IR spektrum komerčne dostupného grafénoxidu od firmy Abalonyx a grafénoxidov (Vzorka 1 - 5).



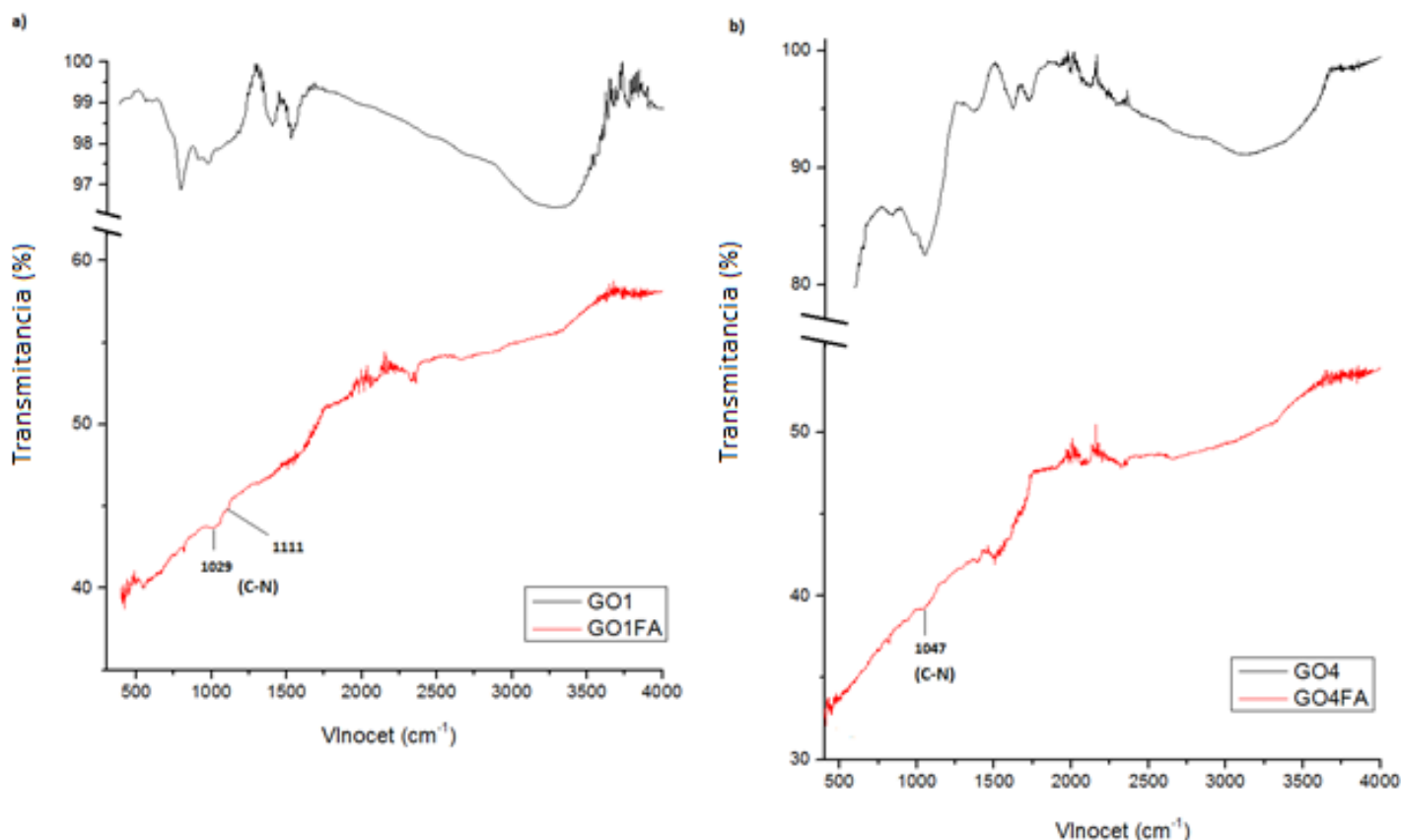
**Obrázok 39:** IR spektrum čistého grafénoxidu (vzorka č. 1 a 4) a modifikovaného chitosanom.

Na Obrázku 39 sú obsiahnuté FTIR spektrá vybraných vzoriek grafénoxidov modifikovaných chitosanom. Dôkazom naviazania chitosanu je prítomnosť píkov v oblasti približne  $897\text{ cm}^{-1}$  a  $1115\text{ cm}^{-1}$  predstavujúce prítomnosť väzieb N-H a C-N. Vo vzorkách GO1CH a GO4CH je možné pozorovať tieto dva píky, čo dokazuje naviazanie chitosanu. Pík predstavujúci C=O skupiny u  $1716\text{ cm}^{-1}$  takmer zmizol a je prítomný pík u  $1534\text{--}1537\text{ cm}^{-1}$  predstavujúci pásmo amidových skupín. U vzorky GO1 je výraznejší pokles O-H skupín. Predpokladá sa, že naviazanie chitosanu bolo prevedené nekovalentnou cestou (vodíkovými mostíkmi a Van der Waalsovými interakciami), z dôvodu kationovej povahy chitosanu v kyslom prostredí a prítomnosti kyslíkatých funkčných skupín grafénoxidu [17, 34].



**Obrázok 40:** IR spektrum čistého grafénoxidu (vzorka č. 1 a 4) a modifikovaného polyetylénglykolom.

Na Obrázku 40 sú uvedené IR spektrá vzoriek grafénoxidov (GO1 a GO4) modifikovaných polyetylénglykolom. Čistý PEG vykazuje C-H skupiny u  $2887\text{ cm}^{-1}$ , C=O skupiny u  $1635\text{ cm}^{-1}$ , O-H skupiny u  $1385\text{ cm}^{-1}$  a C-O skupiny u  $1149\text{ cm}^{-1}$ . U modifikovaných štruktúr dochádza k miernym posunom polôh pík, čo naznačuje zachovalosť hlavných funkčných skupín. Keďže sa tu nachádzajú aj väzby C-O a O-H, je možné predpokladať, že sa PEG naviazal nielen kovalentne, ale aj pomocou nekovalentných vodíkových interakcií [35, 37].



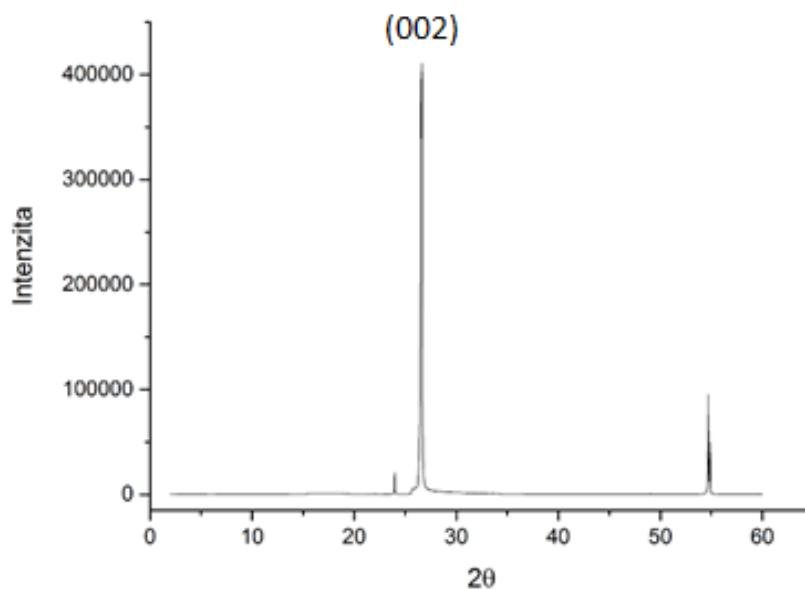
**Obrázok 41:** IR spektrum čistého grafénoxidu (vzorka č. 1 a 4) a modifikovaného kyselinou listovou.

Na Obrázku 41 sú obsiahnuté IR spektrá grafénoxidov GO1 a GO4 modifikovaných kyselinou listovou. Spektrá modifikácií vykazujú nižšiu intenzitu v porovnaní s čistými grafénoxidovými štruktúrami. Keďže bola kyselina listová viazaná na grafénoxid nekovalentnou cestou, spektrá nevykazujú členitosť ako u prípravy modifikácie GOFA pomocou činidiel EDC a NHS, no môžeme v nich pozorovať prítomnosť pík 1029  $\text{cm}^{-1}$ , 1111  $\text{cm}^{-1}$ , 1047  $\text{cm}^{-1}$  predstavujúce väzbu C-N. Taktiež môžeme pozorovať miernu prítomnosť OH skupín [30].

### 6.6.3 Rentgenová difrakčná analýza

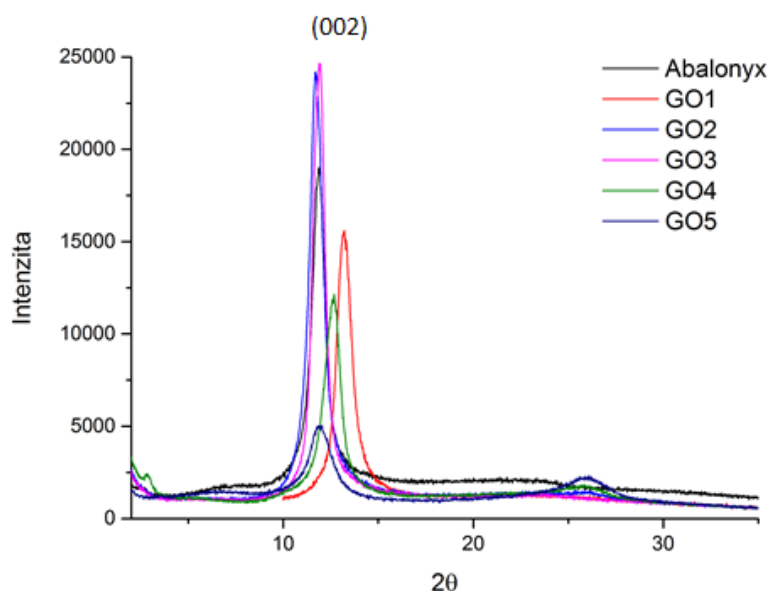
Rentgenová difrakčná analýza (XRD) je významnou a často používanou metódou poskytujúca kvalitatívnu a kvantitatívnu fázovú analýzu látok, informácie o mriežkových parametroch, veľkosti kryštálov a poruchách kryštálovej štruktúry. Táto metóda je založená na difrakcii rentgenového žiarenia na kryštálovej štruktúre. Difraktované lúče sú pozorované iba pri určitom uhle  $\theta$ , ktorý je daný Braggovou rovnicou  $2d \sin \theta = n\lambda$ . Difrakcia nastáva v prípade, že sa lúč odrazený od jednej roviny oneskorí voči lúču odrazenému od vedľajšej roviny o celý násobok jeho vlnovej dĺžky ( $n$  je rád reflexie,  $d$  je medzirovinná vzdialenosť) [35].

U difraktogramov rentgenovej difrakčnej analýzy vykazuje čistý grafit (002) difrakčný pík v okolí hodnoty  $2\theta$  v  $25-26^\circ$ , zodpovedajúci medzirovinnej vzdialenosti  $d = 3-4 \text{ \AA}$ . U grafénoxidu býva pozorovaný (002) pík u  $2\theta$  v okolí hodnoty  $10^\circ$  a medzirovinná vzdialenosť  $d = 8-9 \text{ \AA}$  [17] [18]. U difraktogramu grafitových vločiek (Obrázok 42) použitých na syntézu grafénoxidových vzoriek je možné pozorovať (002) pík v hodnote  $2\theta = 26,64^\circ$  a príslušná hodnota medzirovinnej vzdialenosti je  $d = 3,4 \text{ \AA}$ . Difraktogramy vzoriek grafénoxidov sú zobrazené na Obrázku 43. Príslušné hodnoty intenzít a medzirovinných vzdialeností sú obsiahnuté v Tabuľke 4. Najnižšiu hodnotu medzirovinnej vzdialenosti vykazuje vzorka č. 1, naopak najvyššiu obsahuje vzorka č. 2 [17, 18].



**Obrázok 42:** XRD difraktogram grafitových vločiek použitých na prípravu grafénoxidu.





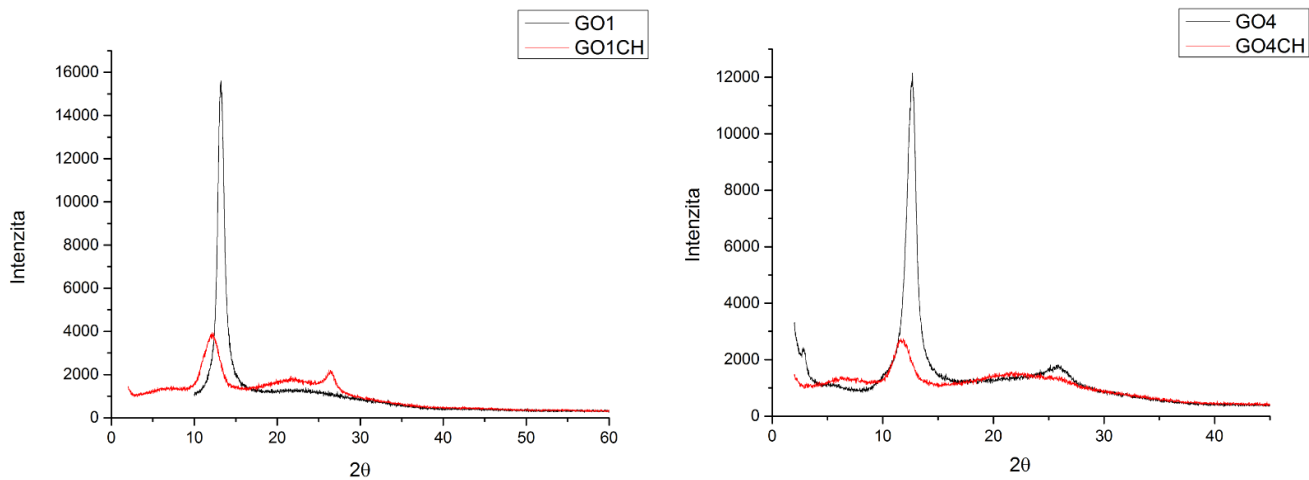
**Obrázok 43:** XRD difraktogram komerčne dostupného grafénoxidu od firmy Abalonyx a grafénoxidov (Vzorka 1 - 5).

Tabuľka 4 – Hodnoty intenzít (002) píkov a odpovedajúce medzirovinné vzdialenosti.

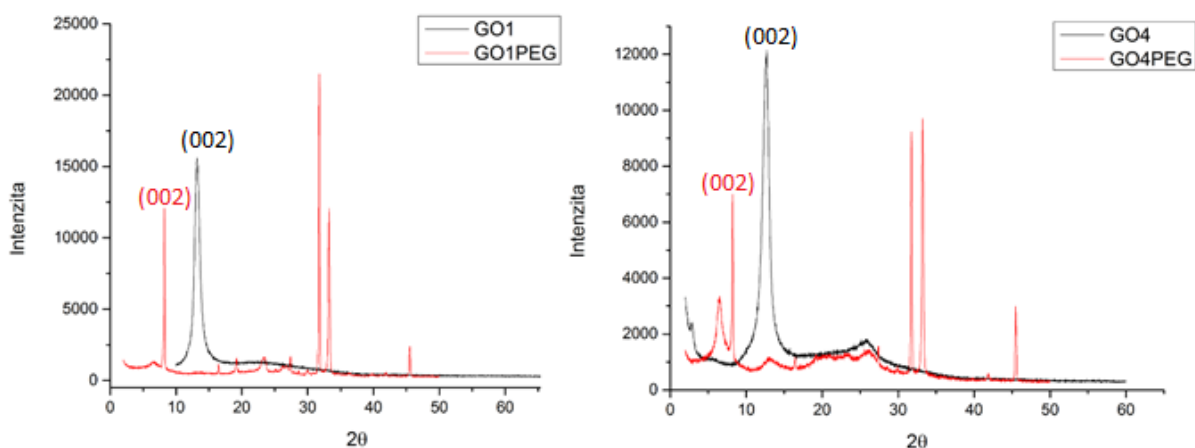
	<b>Poloha (002) píku [°]</b>	<b>Intenzita (002) píku</b>	<b>Medzirovinná vzdialenosť <math>d</math> [Å]</b>
<b>Grafit</b>	26,64	410550,0	3,43
<b>Abalonyx</b>	11,9	18983,3	7,48
<b>GO1</b>	13,2	15521,3	6,76
<b>GO2</b>	11,7	24150,0	7,59
<b>GO3</b>	11,9	24665,0	7,48
<b>GO4</b>	12,7	12153,3	7,04
<b>GO5</b>	12,1	5048,3	7,34

Na Obrázku 44 je znázornené porovnanie difraktogramov grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) a ich modifikácií chitosanom. Intenzita (002) píku bola značne znížená a dochádza aj k jeho miernemu rozšíreniu a posunu. Taktiež pozorujeme u oboch vzoriek náznak píku v okolí  $2\theta$  20 až 30°. Je možné pozorovať, že obe vzorky grafénoxidov modifikovaných chitosanom vykazujú amorfnú štruktúru. U štruktúr modifikovaných polyetylén glykolom (Obrázok 45) je zachovaný (002) pík s miernym posunom a znížením hodnoty  $2\theta$  na hodnotu 8,2° u oboch vzoriek, čo znamená, že pridaním PEG dochádza k zväčšeniu medzirovinnnej vzdialenosti na hodnotu 10,8 Å. Taktiež sú u oboch vzoriek prítomné píky charakteristické pre PEG v okolí  $2\theta$

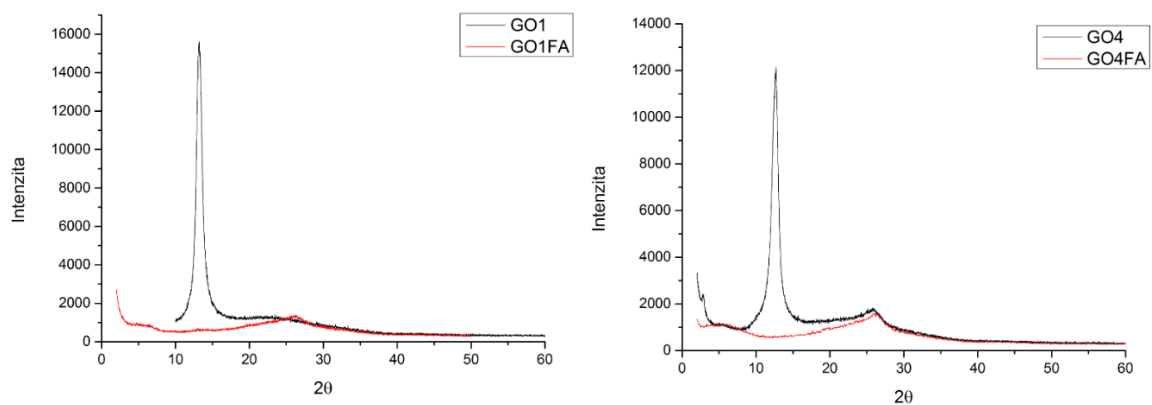
30 až 35°. Na Obrázku 46 sú difraktogramy grafénoxidov modifikovaných kyselinou listovou a je možné pozorovať, že štruktúry majú amorfný charakter a nevykazujú prítomnosť (002) píkov.



**Obrázok 44:** XRD difraktogramy grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných chitosanom.



**Obrázok 45:** XRD difraktogramy grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných polyetylénglykolom.



**Obrázok 46:** XRD difraktogramy grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných kyselinou listovou.

#### 6.6.4 Rentgenová fotoelektrónová spektroskopia

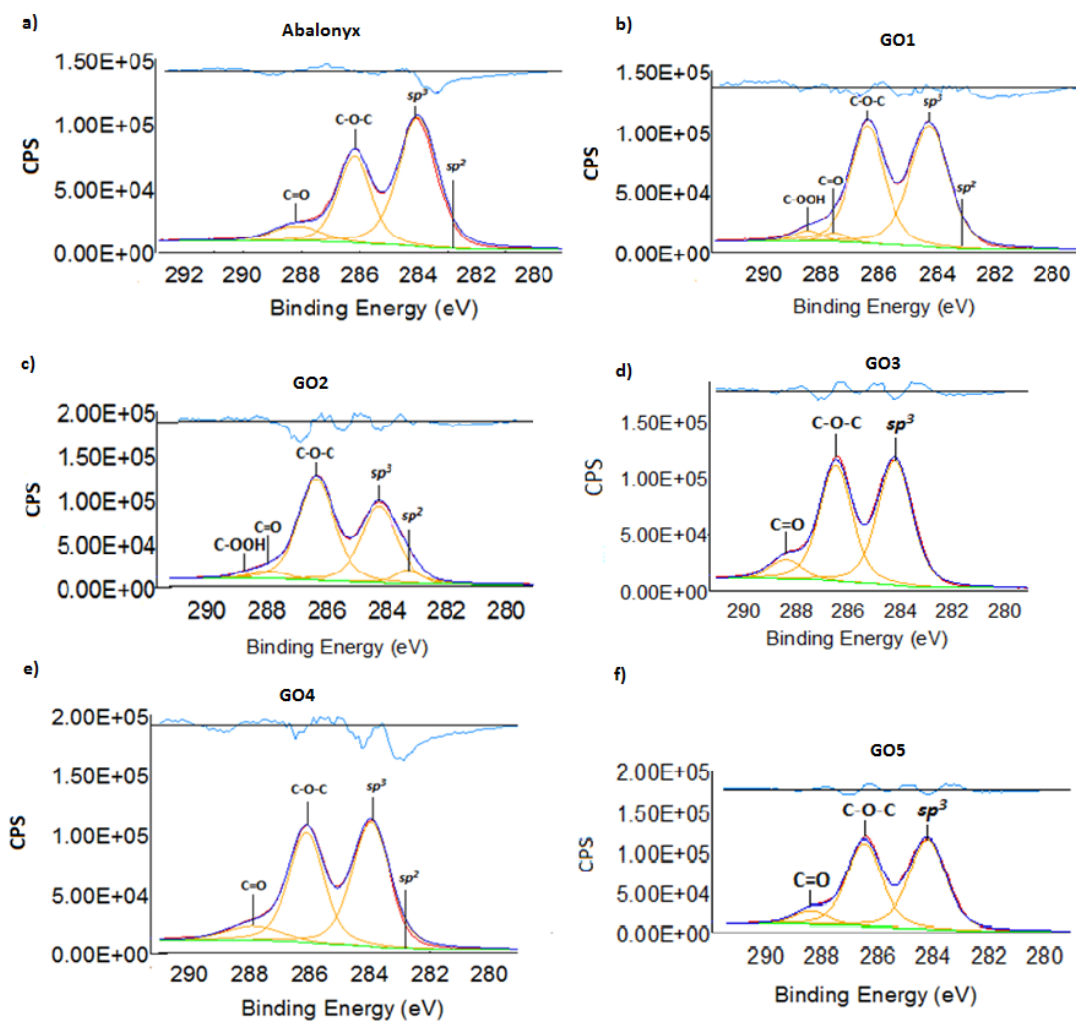
XPS je komplexná nedeštruktívna technika slúžiaca na charakterizáciu povrchov látok. Princípom metódy je meranie energetického rozdelenia elektrónov emitovaných povrchom meranej látky v dôsledku fotoelektrického javu. Skúmaná vzorka je ožarovaná rentgenovým žiarením, ktoré emituje z vnútorných hladín atómov elektróny (fotoelektróny) prestupujúce z miesta emisie do rôznych smerov. Fotoelektróny podstupujú pružné a nepružné zrážky. Pri nepružnej zrážke pokračuje fotoelektrón pôvodným smerom, no stráca časť svojej energie. Pri pružnej zrážke fotoelektrón nestráca energiu, no mení sa smer jeho letu. Fotoelektróny, ktoré opustili vzorku sú detekované analyzátorom, ktorý meria ich intenzitu v závislosti na ich kinetickej energii. Fotoelektrón získa kinetickú energiu z energie rentgenového žiarenia a ostatná časť energie je rozdelená na energiu nevyhnutnú na odštiepenie atómu (väzbová energia) a na výstupnú prácu analyzátora. Výsledkom je fotoelektrónové spektrum, čo predstavuje závislosť intenzity na väzbovej energii. Táto metóda slúži k presnej detekcii prvkov na povrchu, ich kvantitatívnej analýze a v akom chemickom stave sa prvky nachádzajú [34, 38].

Väzbová energia pre  $sp^2$  hybridizovaný uhlík (C-C) v graféne, grafénoxide a nanotrubičkách má hodnotu v rozmedzí od 284,5 – 284,6 eV, pričom väzby C~O sú vzhľadom k  $sp^2$  posunuté o: 1,3 – 2,4 eV (hydroxylové a epoxidové skupiny), 2,6 – 3,5 eV (karbonylové skupiny), 4,3 – 5,4 eV (karboxyly a estery). Na Obrázku 47 sú obsiahnuté XPS spektrá vzoriek grafénoxidov v porovnaní s komerčne vyrábaným grafénoxidom od firmy Abalonyx. Vzorky 1 až 5 obsahujú predovšetkým C-O-C skupiny (285 eV), karbonylové skupiny (v okolí 288 eV) a C-C (v okolí 284 eV). Karboxylové skupiny sa nachádzajú v minimálnom množstve u vzoriek GO1 a GO2 v okolí 288 eV. Porovnaním intenzít a polôh pík sa komerčnému grafénoxidu najviac podobajú vzorky č. 1 a 4 [18].

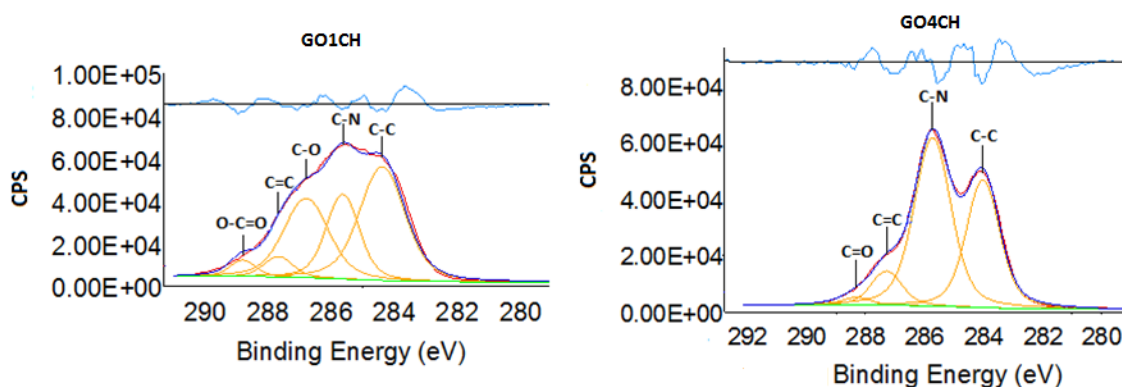
Na Obrázku 48 sú zobrazené XPS spektrá grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných chitosanom. Po modifikácii grafénoxidu chitosanom bola pozorovaná väzba C-N a zvýšil sa pík väzby C=O a C=C. Obrázok 49 obsahuje XPS spektrá grafénoxidov modifikovaných kyselinou listovou a sú v nich prítomné C-N a C=C väzby. Spektrum týchto modifikácii vykazuje jeden hlavný pík namiesto dvoch, v porovnaní s čistými grafénoxidovými štruktúrami. Je to z dôvodu použitia redukčného činidla v syntéze a tým prevod grafénoxidu na jeho redukovanú formu. Na Obrázku 50 sú XPS spektrá grafénoxidov modifikovaných polyetylénglykolom, ktoré vykazujú prítomnosť väzieb C-C, C=C, C-O a C=O.

V Tabuľkách 5 a 6 sú uvedené percentuálne zastúpenia funkčných skupín a prvkov u vzoriek grafénoxidov a ich modifikovaných foriem. Najvyšší percentuálny podiel uhlíku

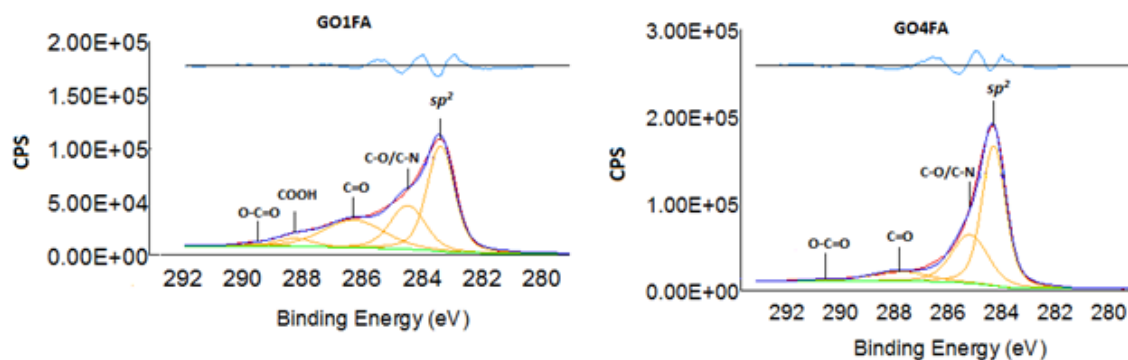
obsahujú vzorky grafénoxidov modifikovaných kyselinou listovou. Prvky chlóru a sodíka sa nachádzajú len u grafénoxidov modifikovaných PEG z dôvodu použitia hydroxidu sodného a chlórctanu sodného pri syntéze tejto modifikácie.



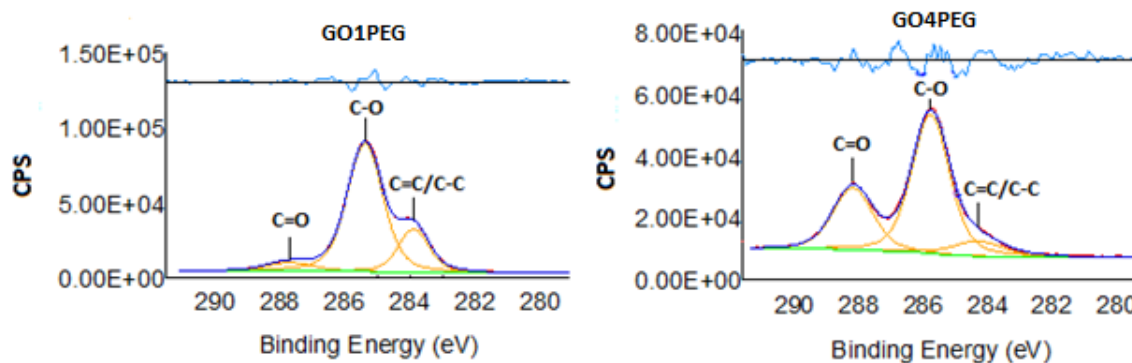
**Obrázok 47:** XPS spektrá vzoriek grafénoxidu; a) komerčne dostupný grafénoxid od firmy Abalonyx, b) vzorka č. 1, c) vzorka č. 2, d) vzorka č. 3, e) vzorka č. 4, f) vzorka č. 5.



**Obrázok 48:** XPS spektrá vzoriek grafénoxidu (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných chitosanom.



**Obrázok 49:** XPS spektrá vzoriek grafénoxidov (vzorka 1 a 4) modifikovaných kyselinou listovou.



**Obrázok 50:** XPS spektrá vzoriek grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných polyetylén glykolom.

Tabuľka 5 – Percentuálne zastúpenie funkčných skupín vzoriek z XPS analýzy.

[%]	sp <sup>3</sup> (C-C)	sp <sup>2</sup> (C=C)	C-O-C	C=O	O-C=O	CO-OH	C-N
Abalonyx	43,14	0,15	22,51	5,87	-	-	-
GO1	35,86	0,18	30,25	1,63	-	2,12	-
GO2	27,17	3,49	36,08	2,79	-	0,25	-
GO3	34,24	-	30,11	4,84	-	-	-
GO4	41,27	0,12	25,28	5,34	-	-	-
GO5	34,24	-	29,89	4,84	-	-	-
GO1CH	24,49	2,86	16,83	-	2,01	-	13,23
GO4CH	21,76	5,36	-	1,08	-	-	31,31
GO1FA	-	35,35	-	20,45	1,12	3,75	18,69
GO4FA	-	46,63	-	7,12	0,51	-	24,69
GO1PEG	13,56	-	46,76	3,77	-	-	-
GO4PEG	3,84	26,52	12,55	-	-	-	-

Tabuľka 6 – Percentuálne zastúpenie prvkov vzoriek z XPS analýzy.

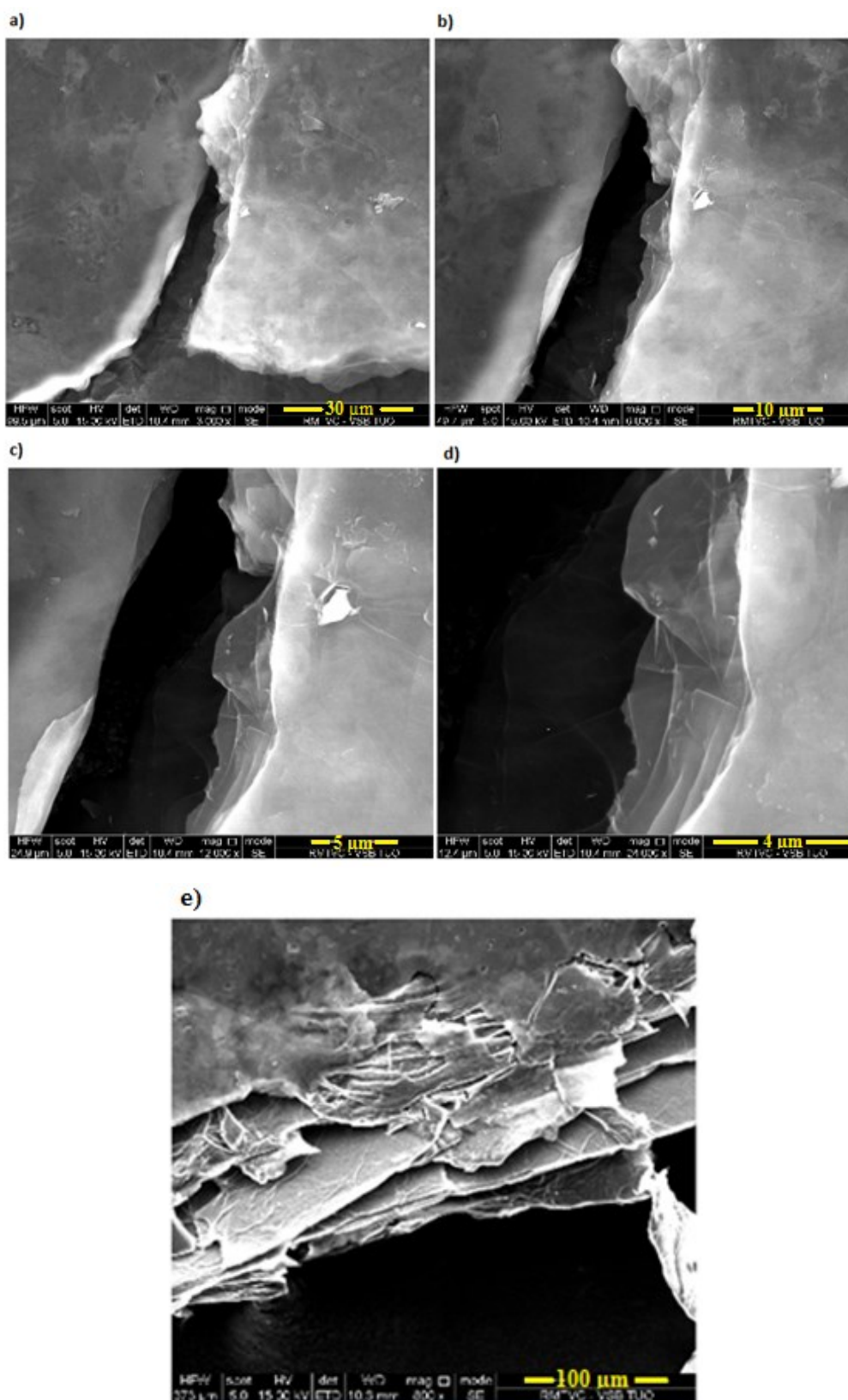
[%]	O	S	Si	N	C	Na	Cl
<b>Abalonyx</b>	26,63	0,44	1,26	-	71,67	-	-
<b>GO1</b>	28,72	0,63	0,61	-	67,92	-	-
<b>GO2</b>	29,46	0,50	0,26	-	69,78	-	-
<b>GO3</b>	29,76	0,76	0,29	-	69,19	-	-
<b>GO4</b>	25,60	0,79	-	1,60	72,01	-	-
<b>GO5</b>	30,10	0,39	0,54	-	68,97	-	-
<b>GO1CH</b>	30,50	-	6,67	3,41	59,42	-	-
<b>GO4CH</b>	31,36	-	3,60	5,53	59,51	-	-
<b>GO1FA</b>	10,29	-	1,25	9,10	79,36	-	-
<b>GO4FA</b>	12,12	-	3,08	5,85	78,95	-	-
<b>GO1PEG</b>	30,00	-	0,49	-	64,09	2,84	2,58
<b>GO4PEG</b>	34,75	-	-	-	42,91	11,90	10,44

#### 6.6.5 Skenovacia elektrónová mikroskopia

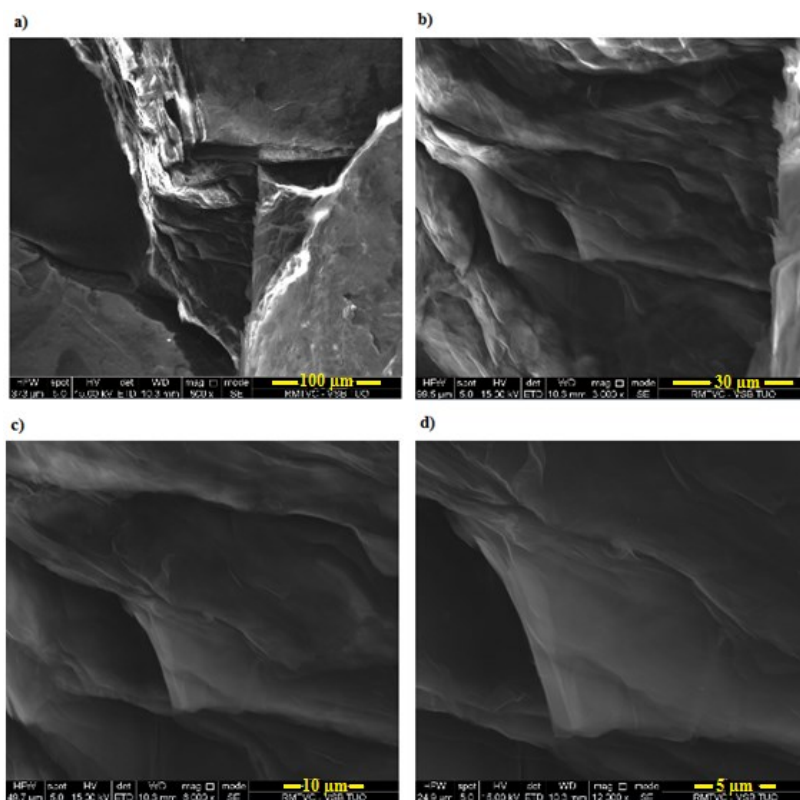
Princíp skenovacej elektrónovej mikroskopie spočíva v použití elektrónového lúča, ktorý skenuje povrch vzorky, dané elektróny so vzorkou interagujú a výsledný obraz je tvorený pomocou odrazených alebo sekundárnych elektrónov obsahujúce informácie o vzorke. Vzorky musia byť vodivé, nevodivé vzorky sa vákuovo naparujú alebo naprašujú kovom a uhlíkom [35].

Na Obrázkoch 51 až 55 sú zobrazené SEM snímky grafénoxidov (vzorka č. 1 až 5). Na snímkach je možné pozorovať vrstevnatú a šupinatú štruktúru grafénoxidu. Vzorky pozostávajú z tenkých listov spojených navzájom a majú zvlnený a zložitý tvar.

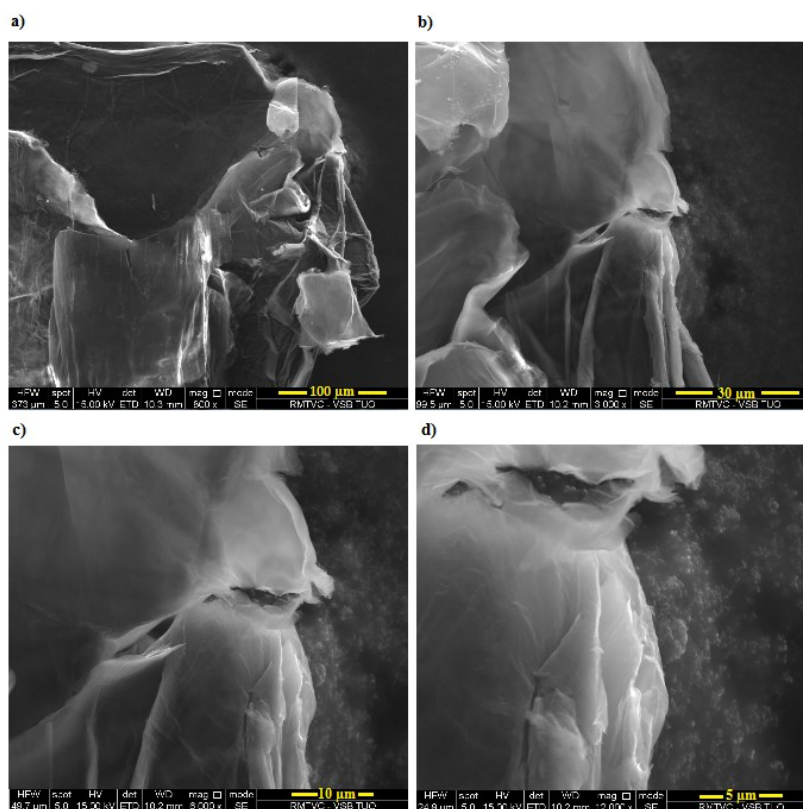
Obrázky 56 a 57 sú SEM snímkami grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných chitosanom. V porovnaní s čistými grafénoxidami nie je pozorovaná zmena v štruktúre, stále sú prítomné zvlnené listy štruktúr. U vzorky GO4CH môžeme pozorovať lepšiu disperziu chitosanu v porovnaní s GO1CH.



**Obrázok 51:** SEM snímky grafénoxidu - vzorka č.1; zväčšenie a) 3000x, b) 6000x, c) 12000x, d) 24000x, e) 800x.

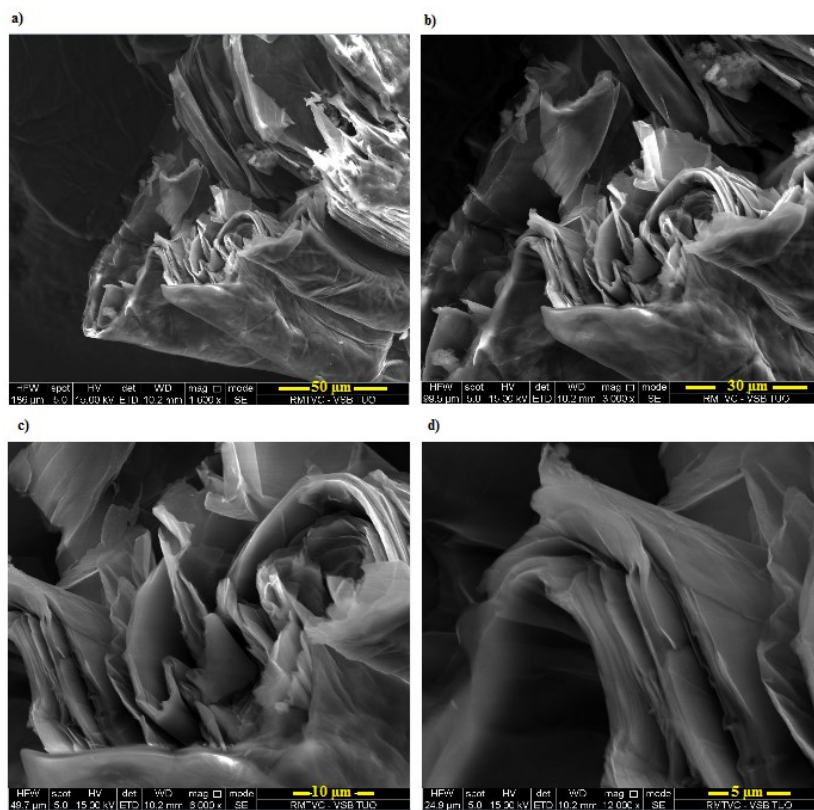


**Obrázok 52:** SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 2; zväčšenie a) 800x, b) 3000x, c) 6000x, 12000x.

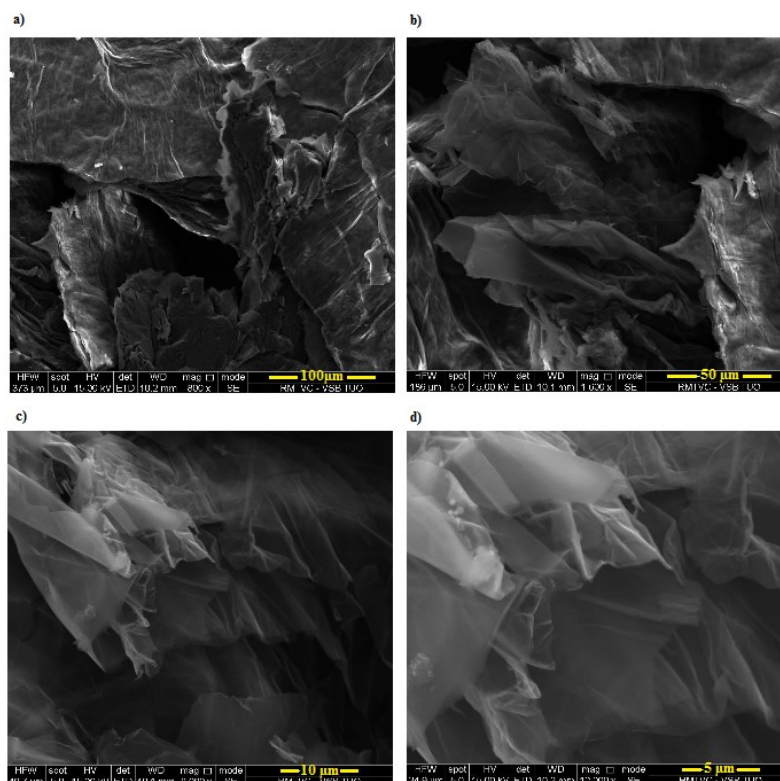


**Obrázok 53:** SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 3; zväčšenie a) 800x, b) 3000x, c) 6000x, d) 12000x.

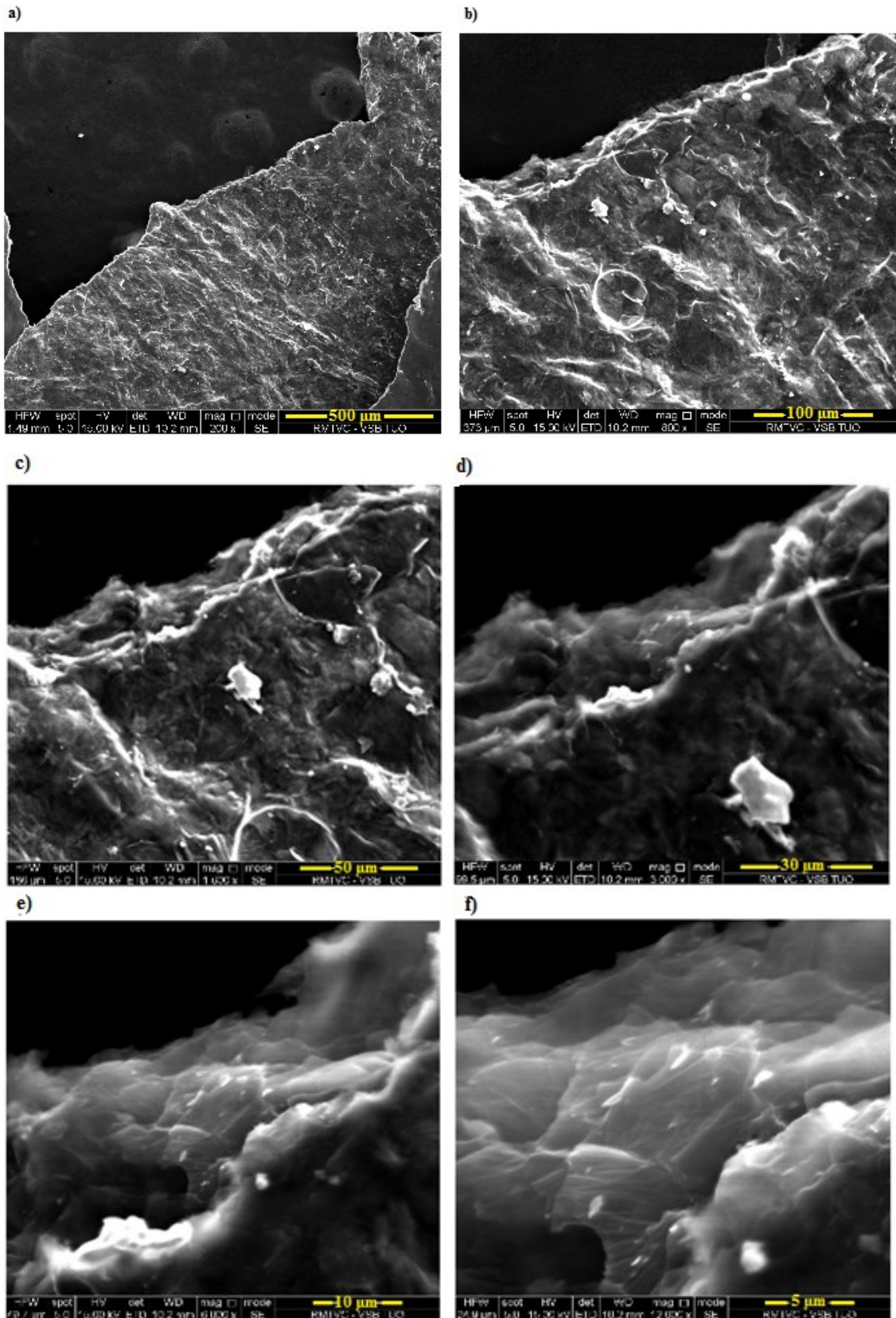




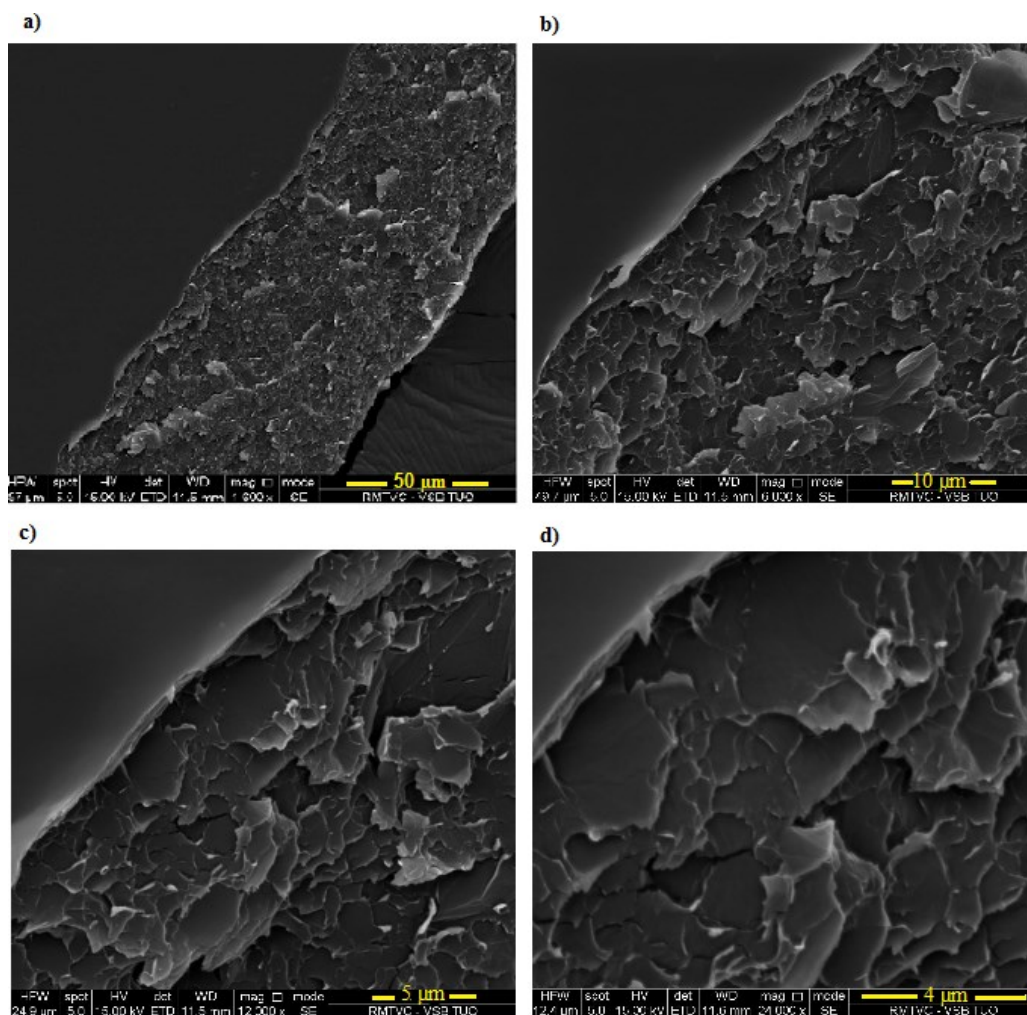
**Obrázok 54:** SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 4; zväčšenie a) 1600x, b) 3000x, c) 6000x, d) 12000x.



**Obrázok 55:** SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 5; zväčšenie a) 800x, b) 1600x, c) 6000x, d) 12000x.



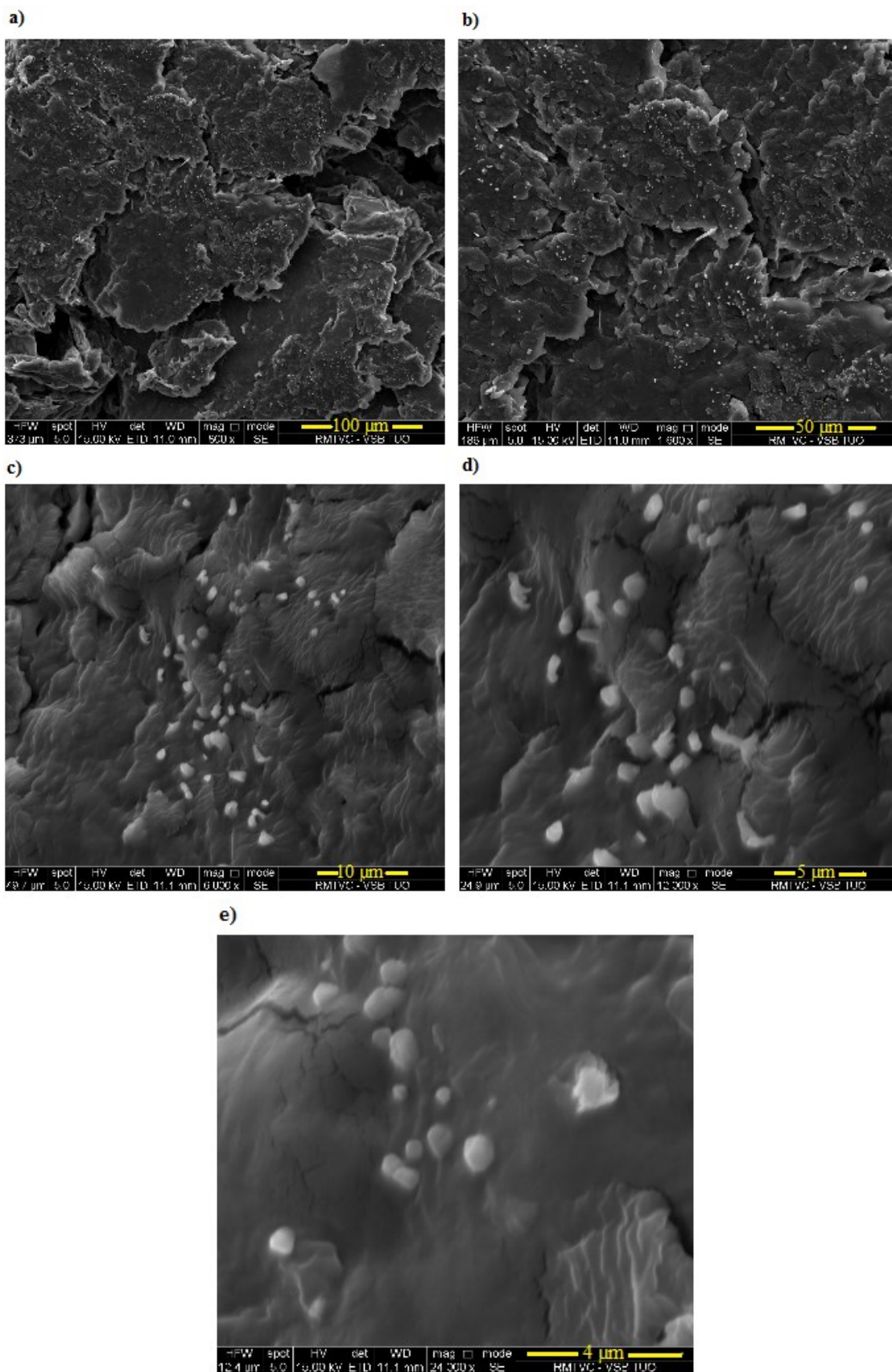
**Obrázok 56:** SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 1 modifikovaná chitosanom; zväčšenie a) 200x, b) 800x, c) 1600x, d) 3000x, e) 6000x, f) 12000x.



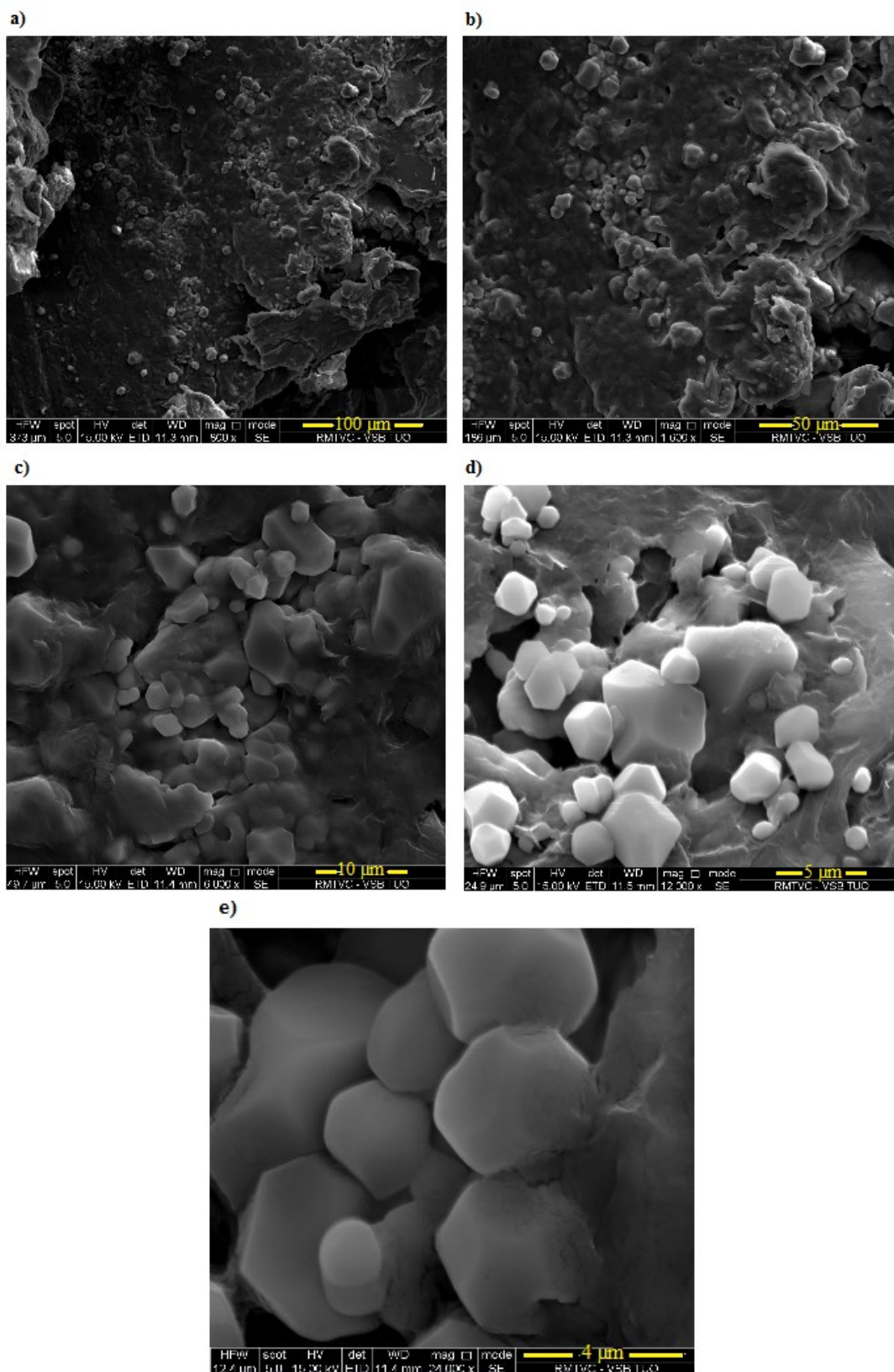
**Obrázok 57:** SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 4 modifikovaná chitosanom; zväčšenie a) 1600x, b) 6000x, c) 12000x, d) 24000x.

Na Obrázkoch 58 a 59 sú zobrazené SEM snímky grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných polyetylén glykolom. Modifikované vzorky vykazujú odlišnú štruktúru než čisté grafénoxidy. Šupinatý charakter mizne a vzorky majú súvislejší morfológický charakter z dôvodu obalenia grafénoxidu polymérom. Taktiež sú prítomné sférické štruktúry polyetylén glykolu rozptýlené po celej grafénoxidovej štruktúre.

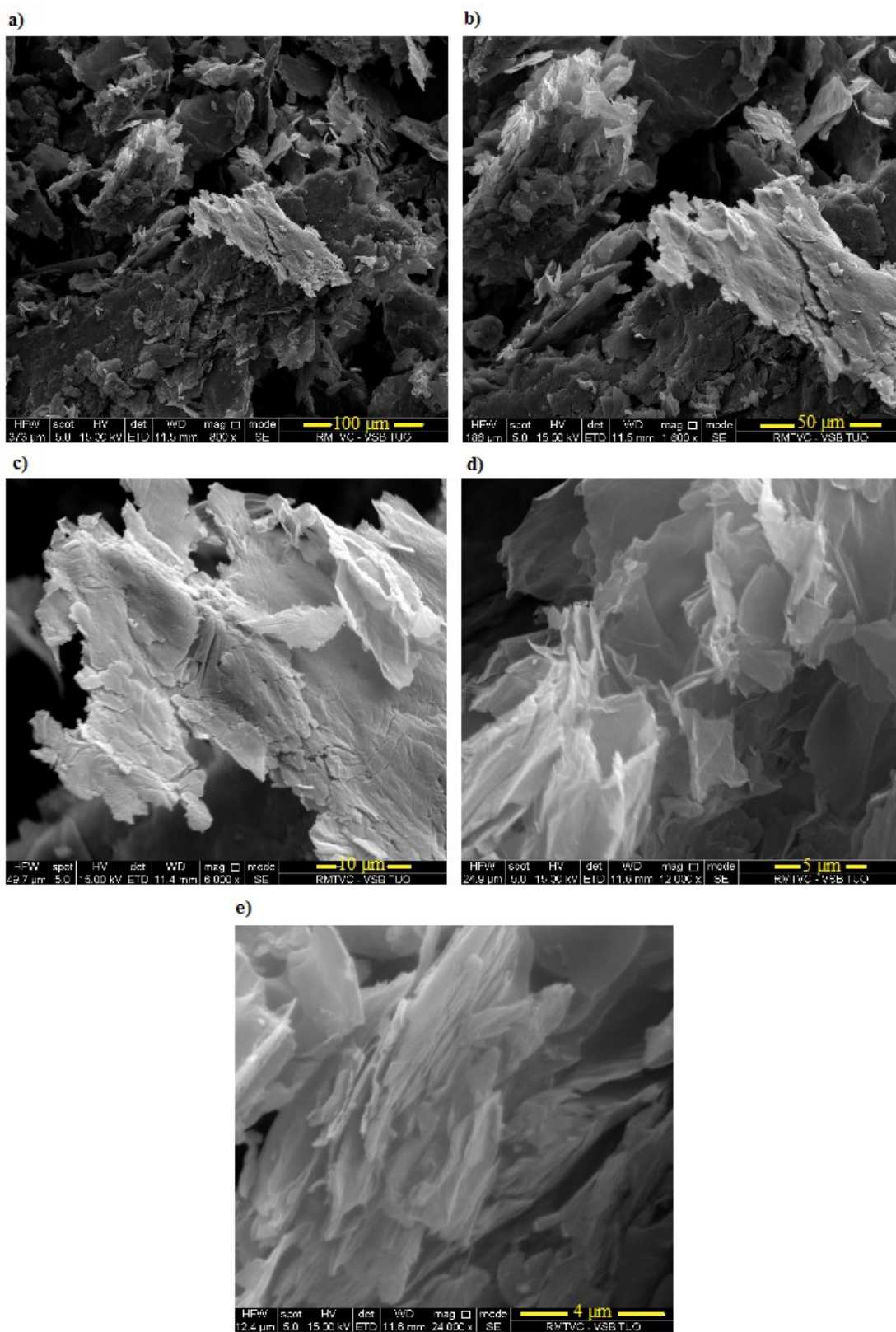
SEM snímky grafénoxidov modifikovaných kyselinou listovou sú zobrazené na Obrázkoch 60 a 61. Tieto modifikované štruktúry obsahujú jemné vlnité tenké listy poprehýbané do rôznych tvarov, no v porovnaní s čistým grafénoxidom sú tieto jemné listy menšie, členitejšie a smerujúce do rôznych smerov.



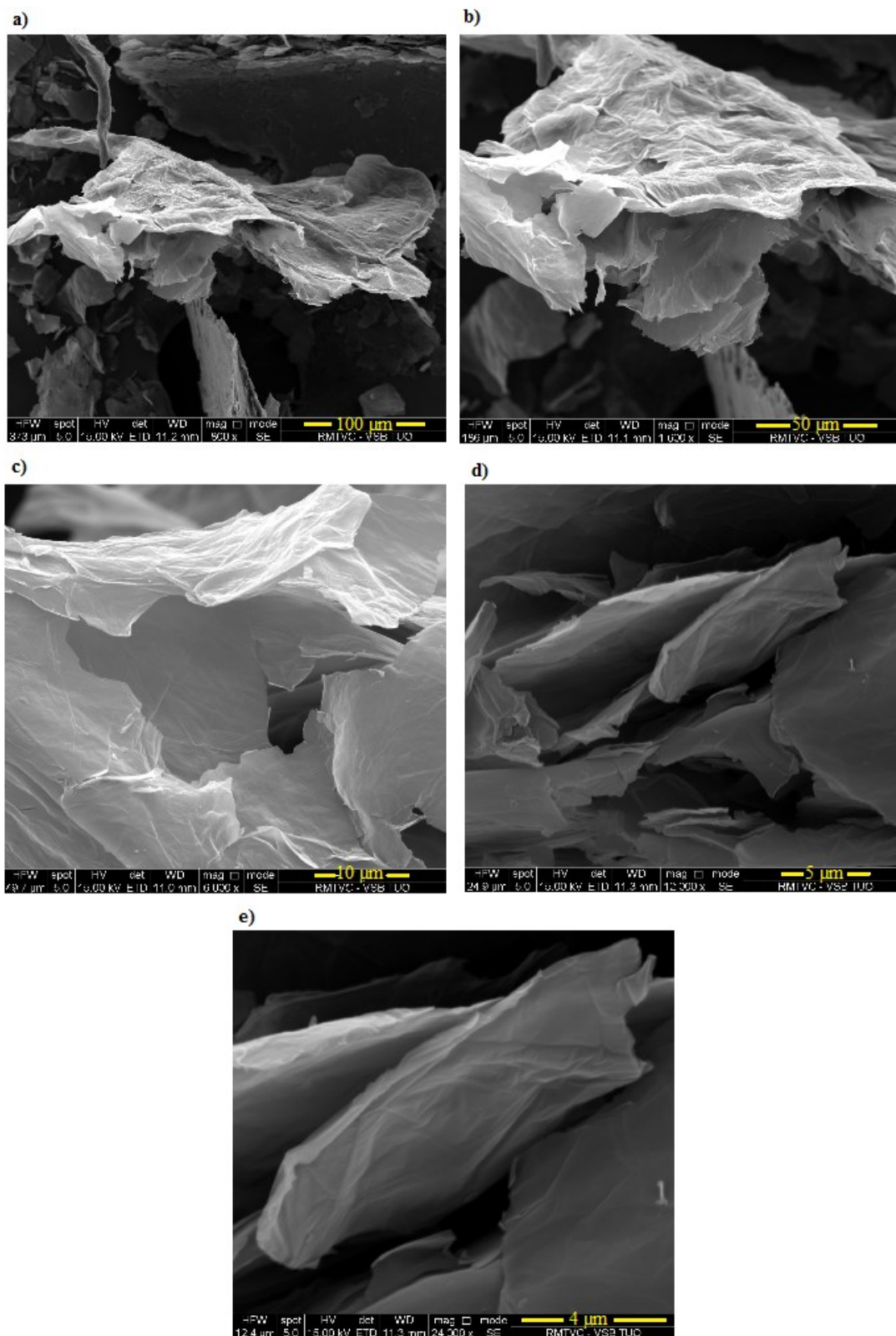
**Obrázok 58:** SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 1 modifikovaná polyetylén glykolom; zväčšenie a) 800x, b) 1600x, c) 6000x, d) 12000x, e) 24000x.



**Obrázok 59:** SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 4 modifikovaná polyetylén glykolom; zväčšenie a) 800x, b) 1600x, c) 6000x, d) 12000x, e) 24000x.



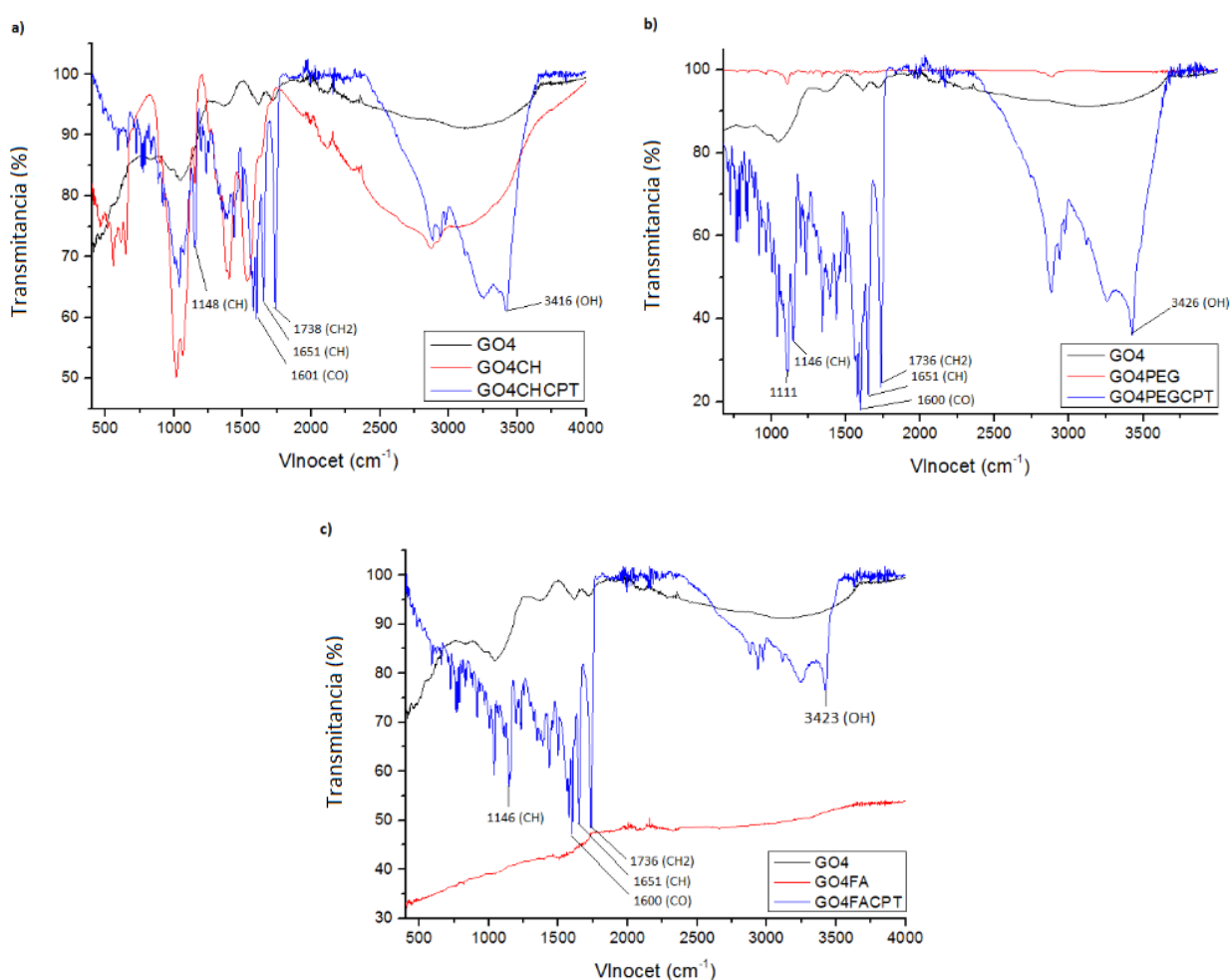
**Obrázok 60:** SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 1 modifikovaná kyselinou listovou; zväčšenie a) 800x, b) 1600x, c) 6000x, d) 12000x, e) 24000x.



**Obrázok 61:** SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 4 modifikovaná kyselinou listovou; zväčšenie a) 800x, b) 1600x, c) 6000x, d) 12000x, e) 24000x.

### 6.6.6 Naviazanie liečiva kamptotecín a charakterizácia FTIR spektroskopiou

Z modifikovaných vzoriek grafénoxidov boli vybrané grafénoxidové vzorky č. 4, pretože GO4 vykazovala lepšie výsledky FTIR analýzy, než vzorka GO1. Na Obrázku 62 sú uvedené spektrá grafénoxidu (vzorka č. 4) modifikovaného polyetylén glykolom, kyselinou listovou a chitosanom v porovnaní so spektrami týchto modifikácií s naviazaným liečivom kamptotecín. Liečivo kamptotecín (CPT) má O-H skupiny prítomné u  $3431\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2$  skupiny u  $1741\text{ cm}^{-1}$ , CH skupiny u  $1652\text{ cm}^{-1}$ , C-O skupiny u  $1600\text{ cm}^{-1}$  a C-H skupiny u  $1157\text{ cm}^{-1}$ . Spektrá s liečivom CPT vykazujú prítomnosť všetkých uvedených skupín, sú vyznačené v spektrách a dokazujú jeho úspešné naviazanie na modifikované grafénoxidové štruktúry [39].



**Obrázok 62:** IR spektrá grafénoxidov (vzorka č. 4) modifikovaných polyetylén glykolom, kyselinou listovou a chitosanom v porovnaní so spektrami týchto modifikácií s naviazaným liečivom kamptotecín.

Po naviazaní liečiva sa zvýšilo množstvo OH skupín a niektoré funkčné skupiny boli zachované, napríklad N-H a C-N väzby s vlnčotom  $897\text{ cm}^{-1}$  a  $1018\text{ cm}^{-1}$  ale s miernym



zvýšením transmitancie u GO4CHCPT. U tejto modifikácie nastalo mierne zúženie píku predstavujúci OH skupiny a zníženie transmitancie. U GO4PEGCPT bol zachovaný pík 1111  $\text{cm}^{-1}$  predstavujúci C-H väzbu PEG, ale s nižšou hodnotou transmitancie. U GO4FACPT nie je možné pozorovať zachovalosť funkčných skupín. Kvôli aromatickému charakteru liečiva a modifikácii grafénoxidových štruktúr je možné predpokladať naviazanie liečiva na modifikované štruktúry nekovalentnou cestou pomocou  $\pi$ - $\pi$  interakcií [39].

## 6.7 Celkové zhodnotenie

Praktická časť diplomovej práce zahŕňa prípravu vzoriek grafénoxidu pomocou Hummersovej metódy, ich charakterizáciu pomocou SEM mikroskopie, XRD analýzy, Ramanovej, FTIR a XPS spektroskopie. Všetky výsledky analýz boli porovnávané s komerčne vyrábaným grafénoxidom od firmy Abalonyx. Porovnaním podmienok Hummersovej metódy a výsledkov analýz bolo zistené, že miernejším ohrevom (27-30 °C) a dlhším miešaním (48 hod a viac) je možné pripraviť vzorky najviac podobné komerčnému grafénoxidu. Najvyššiu podobnosť spektier analýz v porovnaní s komerčným grafénoxidom vykazovali vzorky č. 1 a 4. Ramanove spektrá vykazovali prítomnosť charakteristických *D* a *G* pásov, FTIR a XPS poukázali na prítomnosť hlavne karbonylových, alkoxy a epoxy skupín s menším zastúpením OH skupín. XRD analýza určuje prítomnosť charakteristického (002) píku u  $2\theta = 11$  až  $12^\circ$  s odpovedajúcimi medzirovinnými vzdialenosťami 6 až 8 Å.

Následne boli vzorky grafénoxidov (č. 1 a 4) modifikované chitosanom, polyetylén glykolom a kyselinou listovou. Modifikácie boli prevedené v pomere 1:1 a podrobené SEM mikroskopii, XRD analýze, FTIR a XPS spektroskopii. Každá z analýz potvrdila prítomnosť charakteristických funkčných skupín pre danú štruktúru a tým prevedenú úspešnú modifikáciu grafénoxidových vzoriek. Chitosan sa na grafénoxid naviazal nekovalentne, polyetylén glykol čiastočne kovalentne aj nekovalentne a kyselina listová nekovalentne.

Z modifikovaných štruktúr boli vybrané vzorky č. 4 (GO4CH, GO4PEG a GO4FA) a zmiešané v pomere 1:1 s protinádorovým liečivom kamptotecín. Následne boli takto upravené štruktúry charakterizované FTIR spektroskopiou, ktorá dokazuje prítomnosť funkčných skupín u daných intenzít charakteristických pre kamptotecín, odlišnosť týchto upravených štruktúr v porovnaní s modifikovanými grafénoxidovými štruktúrami so zachovaním niektorých ich charakteristických funkčných skupín. Kvôli aromatickému charakteru liečiva a modifikácii grafénoxidových štruktúr je možné predpokladať naviazanie liečiva na modifikované štruktúry nekovalentnou cestou pomocou  $\pi$ - $\pi$  interakcií.

## 7 Záver

Štúdie preukázané v diplomovej práci dokazujú, že nanomateriály na báze grafénových štruktúr majú veľký potenciál v biomedicínskych aplikáciách. Aby sa grafén mohol použiť na medicínske aplikácie, musí byť špeciálne modifikovaný, aby dosiahol adekvátne mechanické a chemické vlastnosti so zaručenou biokompatibilitou a minimálnou toxicitou. Veľkou nevýhodou grafénu je jeho minimálna rozpustnosť vo vode a z toho dôvodu sa čoraz viac skúma jeho modifikácia grafénoxid. No aj táto sľubnejšia modifikácia grafénu na prenos liečiva musí byť špeciálne upravovaná. Výhodné optimálne vlastnosti a toxicita grafénových štruktúr závisia od viacerých fyzikálnych a chemických vlastností, ako sú tvar, veľkosť, oxidačný stav, prítomnosť funkčných skupín a metóda prípravy grafénovej štruktúry. Grafén a grafénoxid poskytujú vysokú nosnosť liečiva, zlepšujú biokompatibilitu, môžu sa použiť do systémov s riadeným transportom a dodávaním liečiva do špecifického miesta, na liečbu nádorových ochorení, ochorení spôsobených genetickými vadami a iné. Použitím rôznych iných nanomateriálov v kombinácii s grafénovými štruktúrami je možné vytvoriť obrovskú škálu multifunkčných systémov na prenos liečiv pre kombinované terapie. Nevýhodou je doposiaľ stále do detailov nepreskúmaná toxicita, u ktorej sú nevyhnutné rozsiahle *in vitro* a *in vivo* štúdie s použitím bunkových a zvieracích modelov. Ďalšou nevýhodou je nepreskúmaná riadená tvorba grafénu a vznik monovrstvy. Riadenie veľkosti a počtu vrstiev grafénu a ich hromadná produkcia je zatiaľ stále náročným problémom.

V diplomovej práci je úspešne prevedená modifikácia grafénovej štruktúry, konkrétne grafénoxidu pomocou Hummersovej metódy. Porovnaním podmienok syntézy a výsledkov analýz bolo zistené, že miernejším ohrevom (27-30 °C) a dlhším miešaním (48 hod a viac) je možné pripraviť vzorky najviac podobné komerčnému grafénoxidu. Najvyššiu podobnosť spektier analýz v porovnaní s komerčným grafénoxidom vykazovali vzorky č.1 a 4. Tieto vzorky grafénoxidu boli podrobené kovalentnej a nekovalentnej úprave pomocou chitosanu, polyetylénglykolu a kyseliny listovej. Vzorky sú charakterizované XRD analýzou, SEM, FTIR, XPS a Ramanovou spektroskopiou a porovnávané s komerčne dostupným grafénoxidom od firmy Abalonyx. Výsledky FTIR a XPS spektroskopii potvrdili prítomnosť charakteristických funkčných skupín pre danú štruktúru a tým prevedenú úspešnú modifikáciu grafénoxidových vzoriek. SEM mikroskopia ukázala morfológickú odlišnosť modifikovaných vzoriek grafénoxidov v porovnaní s nemodifikovanými vzorkami. K modifikovaným vzorkám je úspešne pridané protinádorové liečivo kamptotecín. Kvôli aromatickému charakteru liečiva a modifikácii grafénoxidových štruktúr je možné predpokladať naviazanie liečiva na modifikované štruktúry nekovalentnou cestou pomocou  $\pi$ - $\pi$  interakcií.

## 8 Literatúra

- [1] GOGOTSI, Yury G a Volker PRESSER. *Carbon nanomaterials*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2014, xv, 513 s. ISBN 978-1-4398-9781-2.
- [2] DASH, G. N., Satya R. PATTANAIK a Sriyanka BEHERA. Graphene for Electron Devices: The Panorama of a Decade. *IEEE Journal of the Electron Devices Society* [online]. 2014, **2**(5), 77-104 [cit. 2017-08-08]. DOI: 10.1109/JEDS.2014.2328032. ISSN 2168-6734. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6824734/>
- [3] MARTINČEKOVÁ, Eva. *Príprava a charakterizácia nanouhľikatých materiálov*. Ostrava, 2016. Bakalárska práca. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.
- [4] BANHART, Florian, Jani KOTAKOSKI a Arkady V. KRASHENINNIKOV. Structural Defects in Graphene. *ACS Nano* [online]. 2011, **5**(1), 26-41 [cit. 2017-08-10]. DOI: 10.1021/nn102598m. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn102598m>
- [5] GEORGAKILAS, Vasilios, Jason A. PERMAN, Jiri TUCEK a Radek ZBORIL. Broad Family of Carbon Nanoallotropes: Classification, Chemistry, and Applications of Fullerenes, Carbon Dots, Nanotubes, Graphene, Nanodiamonds, and Combined Superstructures. *Chemical Reviews* [online]. 2015, **115**(11), 4744-4822 [cit. 2017-08-10]. DOI: 10.1021/cr500304f. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr500304f>
- [6] ANDO, Tsuneya. The electronic properties of graphene and carbon nanotubes. *NPG Asia Materials* [online]. 2009, **1**(1), 17-21 [cit. 2017-08-11]. DOI: 10.1038/asiamat.2009.1. ISSN 1884-4049. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/asiamat.2009.1>
- [7] PIASTEK, Jakub. Bc. *PŘÍPRAVA GRAFENOVÝCH VRSTEV POKRYTÝCH GA ATOMY A CHARAKTERIZACE JEJICH ELEKTRICKÝCH VLASTNOSTÍ* [online]. Brno, 2015 [cit. 2017-08-11]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=106044](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=106044). Diplomová práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ, Fakulta strojního inženýrství. Vedoucí práce Ing. JINDŘICH MACH, Ph.D.
- [8] LIU, Jingquan, Liang CUI a Dusan LOSIC. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, **9**(12), 9243-9257 [cit. 2017-09-04]. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.016. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S174270611300408X>

- [9] Studijní materiály: Obecná Farmakologie. *Ústav organické technologie* [online]. VŠCHT Praha, 2010 [cit. 2017-10-21]. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/flog-p/obecnafarmakologie-ii.pdf>
- [10] MOHAMADI, Somayeh a Mehrdad HAMIDI. The new nanocarriers based on graphene and graphene oxide for drug delivery applications. *Nanostructures for Drug Delivery* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 107-147 [cit. 2018-02-26]. DOI: 10.1016/B978-0-323-46143-6.00003-8. ISBN 9780323461436. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032346143600038>
- [11] ZHANG, Qi, Zhuona WU, Ning LI, Yiqiong PU, Bing WANG, Tong ZHANG a Jiansheng TAO. Advanced review of graphene-based nanomaterials in drug delivery systems: Synthesis, modification, toxicity and application. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, 77, 1363-1375 [cit. 2017-11-02]. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.196. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117302631>
- [12] SUKALOVIC, Vladimir, ZLATOVIĆ, Mario, ROGLIC, Goran, KOSTIC-RAJACIC, Sladjana, ANDRIĆ, Deana. (2009). 1. Application of Hybrid Density Functional Theory in Calculation of Edge-to-Face Interactions of Receptor-Ligand System. *Acta Chimica Slovenica*. 56. 270-277.
- [13] KLUKOVÁ, Ľudmila, Tomáš BERTÓK a Ján TKÁČ. Vlastnosti a elektrochemické využitie grafénu. *Chemické Listy* [online]. Bratislava, 2013, 653–659 [cit. 2018-03-03]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014\\_07\\_653-659.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_07_653-659.pdf)
- [14] DUTTA, Pradip, DUTTA, Joydeep, S TRIPATHI, V. (2003). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J Sci Indus Res*. 63.
- [15] BAO, Hongqian, Yongzheng PAN, Yuan PING, Nanda Gopal SAHOO, Tongfei WU, Lin LI, Jun LI a Leong Huat GAN. Chitosan-Functionalized Graphene Oxide as a Nanocarrier for Drug and Gene Delivery. *Small*[online]. 2011, 7(11), 1569-1578 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1002/smll.201100191. ISSN 16136810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/smll.201100191>
- [16] RANA, Vijay Kumar, Myeon-Cheon CHOI, Jin-Yeon KONG, et al. Synthesis and Drug-Delivery Behavior of Chitosan-Functionalized Graphene Oxide Hybrid Nanosheets. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2011, 296(2), 131-140 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1002/mame.201000307. ISSN 14387492. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mame.201000307>

- [17] RANA, Vijay Kumar, Myeon-Cheon CHOI, Jin-Yeon KONG, et al. Synthesis and Drug-Delivery Behavior of Chitosan-Functionalized Graphene Oxide Hybrid Nanosheets. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2011, **296**(2), 131-140 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1002/mame.201000307. ISSN 14387492. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mame.201000307>
- [18] STOBINSKI, L., B. LESIAK, A. MALOLEPSZY, M. MAZURKIEWICZ, B. MIERZWA, J. ZEMEK, P. JIRICEK a I. BIELOSHAPKA. Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* [online]. 2014, **195**, 145-154 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.elspec.2014.07.003. ISSN 03682048. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0368204814001510>
- [19] ABUALHASAN, Murad, ASSALI, Mohyeddin, ZAID, Abdel naser, JARADAT, Nidal, TARAYRA, Rana, HAMDAN, Aseel, ARDAH, Rula. (2015). Synthesis and formulation of ibuprofen pro-drugs for enhanced transdermal absorption. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 7. 352-354.
- [20] BUKKITGAR, Shikandar D. a Nagaraj P. SHETTI. Electrochemical behavior of an anticancer drug 5-fluorouracil at methylene blue modified carbon paste electrode. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **65**, 262-268 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.04.045. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116303447>
- [21] CHAVAN, Subhash P. a Rasapalli SIVAPPA. A synthesis of camptothecin. *Tetrahedron Letters* [online]. 2004, **45**(15), 3113-3115 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/j.tetlet.2004.02.091. ISSN 00404039. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403904004162>
- [22] BITOUNIS, Dimitrios, FANCIULLINO, Raphaele, ILIADIS, Athanassios, CICCOLINI, Joseph. (2012). Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: *New Approaches to an Old Concept*. ISRN pharmaceutics. 2012. 738432. 10.5402/2012/738432.
- [23] XU, Zhiyuan, Song WANG, Yongjun LI, Mingwei WANG, Ping SHI a Xiaoyu HUANG. Covalent Functionalization of Graphene Oxide with Biocompatible Poly(ethylene glycol) for Delivery of Paclitaxel. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2014, **6**(19), 17268-17276 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1021/am505308f. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/am505308f>

- [24] WANG, Chongyun, Wei WANG, Gongbiao XIN, Guoling LI, Jie ZHENG, Wenhui TIAN a Xingguo LI. Phase change behaviors of PEG on modified graphene oxide mediated by surface functional groups. *European Polymer Journal* [online]. 2016, **74**, 43-50 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.10.027. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305715300331>
- [25] MANSOURPANAHI, Y., H. SHAHEBRAHIMI a E. KOLVARI. PEG-modified GO nanosheets, a desired additive to increase the rejection and antifouling characteristics of polyamide thin layer membranes. *Chemical Engineering Research and Design* [online]. 2015, **104**, 530-540 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1016/j.cherd.2015.09.002. ISSN 02638762. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263876215003445>
- [26] GAZZALI, Amirah Mohd, Mathilde LOBRY, Ludovic COLOMBEAU, et al. Stability of folic acid under several parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2016, **93**, 419-430 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.08.045. ISSN 09280987. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098716303347>
- [27] ZHANG, Liming, Jingguang XIA, Qinghuan ZHAO, Liwei LIU a Zhijun ZHANG. Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs. *Small* [online]. 2010, **6**(4), 537-544 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1002/sml.200901680. ISSN 16136810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.200901680>
- [28] PARK, Young Ho, Sung Young PARK a Insik IN. Direct noncovalent conjugation of folic acid on reduced graphene oxide as anticancer drug carrier. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2015, **30**, 190-196 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.jiec.2015.05.021. ISSN 1226086X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1226086X15002580>
- [29] HE, Lijie, Qian WANG, Daniel MANDLER, Musen LI, Rabah BOUKHERROUB a Sabine SZUNERITS. Detection of folic acid protein in human serum using reduced graphene oxide electrodes modified by folic-acid. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **75**, 389-395 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.bios.2015.08.060. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566315303857>
- [30] DE SOUSA, Marcelo, Luis Augusto VISANI DE LUNA, Leandro Carneiro FONSECA, Selma GIORGIO a Oswaldo Luiz ALVES. Folic-Acid-Functionalized Graphene Oxide Nanocarrier: Synthetic Approaches, Characterization, Drug Delivery Study, and Antitumor Screening. *ACS Applied Nano Materials* [online]. 2018, **1**(2), 922-932 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1021/acsanm.7b00324. ISSN 2574-0970. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsanm.7b00324>

- [31] LALWANI, Gaurav, Michael D'AGATI, Amit Mahmud KHAN a Balaji SITHARAMAN. Toxicology of graphene-based nanomaterials. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2016, **105**, 109-144 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.028. ISSN 0169409X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X16301387>
- [32] Přístrojové vybavení Centra nanotechnologií. *Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava* [online]. Ostrava [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <https://www.vsb.cz/9360/cs/pristrojove-vybaveni/>
- [33] *Pragolab* [online]. 2017 [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <https://www.pragolab.sk/analyza-povrchu/xps/k-alpha>
- [34] KUMAR, C. S. S. R. *Carbon nanomaterials*. Chichester: John Wiley [distributor], 2011. ISBN 978-3-527-32169-8.
- [35] ČECH BARABASZOVÁ, Karla. *Vybrané instrumentální metody analýzy materiálů a nanomateriálů*. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012. ISBN 978-80-7204-810-6.
- [36] ZHANG, Henan, Deon HINES a Daniel L. AKINS. Synthesis of a nanocomposite composed of reduced graphene oxide and gold nanoparticles. *Dalton Trans* [online]. 2014, **43**(6), 2670-2675 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1039/C3DT52573B. ISSN 1477-9226. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3DT52573B>
- [37] WANG, Chongyun, Lili FENG, Huazhe YANG, Gongbiao XIN, Wei LI, Jie ZHENG, Wenhui TIAN a Xingguo LI. Graphene oxide stabilized polyethylene glycol for heat storage. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2012, **14**(38), 13233- [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1039/c2cp41988b. ISSN 1463-9076. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cp41988b>
- [38] SEYAMA, H., M. SOMA a B.K.G. THENG. X-Ray Photoelectron Spectroscopy. *Handbook of Clay Science* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 161-176 [cit. 2018-05-10]. Developments in Clay Science. DOI: 10.1016/B978-0-08-098259-5.00007-X. ISBN 9780080993645. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978008098259500007X>
- [39] KANNAN, Krishnamoorthy. Compatibility studies of camptothecin with various pharmaceutical excipients used in the development of nanoparticle formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013, **5**. 315-321.

## 9 Zoznam obrázkov

Obrázok 1: a) hexagonálna mriežka atómov uhlíka, sivá časť predstavuje jednotkovú bunku; b) schéma $sp^2$ hybridizácie; c) znázornenie hybridizovaných a nehybridizovaných orbitálov a ich prekryv; d) dve rozdielne orientácie usporiadania uhlíkových atómov a vznik dvoch prekrývajúcich sa trojuholníkových mriežok A a B [2].	12
Obrázok 2: a) typická konfigurácia grafénu pri izbovej teplote s charakteristickými vlnkami (Macmillan Publishers Ltd., Nat. Mater., 6, Fasolino, A. et al.); b) tvorba vlniek na grafénovej štruktúre vlozenej na substráte (Solid State Commun., 149, Guinea, F. et al.);	14
Obrázok 3: a) prítomnosť heptagónov a pentagónov v grafénovej štruktúre; b) znázornenie topologického defektu [1] [4].	15
Obrázok 4: Znáznornenie nahradenia jednoduchej vakancie kovovým atómom; a) pohľad z boku, c) pohľad zhora;	15
Obrázok 5: Znáznornenie typov okrajového zakončenia grafénových nanostúh, a) „armchair”, b) „zigzag” [5].	16
Obrázok 6: a) Energetické hladiny blízko Fermiho hladiny v graféne. Vodivostný a valenčný pás sa prekrývajú v bodoch K a K'; b) Kónické energetické pásma v blízkosti bodov K a K'; c) hustota stavov blízko Fermiho hladiny s Fermiho energiou $E_F$ [6].	17
Obrázok 7: Znáznornenie vplyvu polohy Fermiho hladiny na typ vodivosti. a) p – dopovanie; b) Fermiho hladina leží presne v Diracovom bode; c) n – dopovanie [7].	18
Obrázok 8: Štruktúra grafénoxidu s naviazanými funkčnými skupinami [3].	22
Obrázok 9: a) štruktúra redukovaného grafénoxidu, b) štruktúra grafénoxidu [10].	24
Obrázok 10: Znáznornenie možných orientácií pre dvojicu benzénových jadier u $\pi$ - $\pi$ interakcií. a) sendvičová orientácia, b) „parallel - displaced” orientácia, c) tri typy orientácií „T-shaped” [12].	25
Obrázok 11: Schématické znázornenie porfyrínovej štruktúry modifikovanej adamantánom nekovalentnou $\pi$ - $\pi$ interakciou s grafénom, $\beta$ -cyklodextrínou modifikovaného kyselinou listovou a liečiva doxorubicín na liečbu rakoviny [11].	26
Obrázok 12: Syntéza modifikácie grafénoxidu chitosanom pomocou činidiel EDC a NHS [15].	27
Obrázok 13: Príprava grafénoxidu modifikovaného chitosanom použitím chloriu lítneho a dimetylformamidu [16].	28
Obrázok 14: a) FTIR, b) Raman, c) XPS, d) XRD analýzy grafénoxidu (GO), chitosanu (CH) a grafénoxidu modifikovaného chitosanom (GOCH) [17].	29
Obrázok 15: TGA krivky grafénoxidu, GOCH a chitosanu [15].	30
Obrázok 16: Štruktúra liečiva a) ibuprofen, b) 5-fluorouracil [19] [20].	31
Obrázok 17: Štruktúra protinádorového liečiva kamptotecin [21].	32
Obrázok 18: Štruktúra polyetylénglykolu [22].	33
Obrázok 19: Schéma prípravy grafénoxidu modifikovaného polyetylénglykolom; a) prevod OH skupín na $NH_2$ skupiny, b) naviazanie polyetylénglykolu a liečiva paklitaxel (ružová guľička) [23].	34
Obrázok 20: Schéma naviazania PEG reťazcov na GO-COOH štruktúru [25].	35



Obrázok 21: Schéma naviazania PEG reťazcov na redukovaný grafénoxid [10].	35
Obrázok 22: FTIR spektrá a) grafénoxidu, rGO a GO-COOH; b) modifikácie GO-COOH a rGO s PEG [24].	35
Obrázok 23: XPS spektrá a) grafénoxidu, b) grafénoxidu s COOH skupinami a c) redukovaného grafénoxidu [24].	36
Obrázok 24: Schéma prípravy grafénoxidovej štruktúry obsahujúcej magnetické nanočastice a PEG [10].	37
Obrázok 25: Štruktúra kyseliny listovej [26].	37
Obrázok 26: Schéma prípravy grafénoxidu modifikovaného kyselinou listovou [10].	38
Obrázok 27: Schéma modifikácie GO na rGO-FA-DOX a ciele dodanie k rakovinovým bunkám [28].	39
Obrázok 28: XPS spektrum štruktúry rGO-FA a FTIR spektrum štruktúry GOFA [29] [30].	39
Obrázok 29: Príprava grafénoxidu (vzorka č. 4); a) zmes po odstránení ľadového kúpeľa, b) zmes po zriedení demineralizovanou vodou a peroxidom vodíka.	43
Obrázok 30: a) roztok kyseliny listovej, b) roztok kyseliny listovej po nakvapkaní hydrazínu monohydrát, c) zmiešanie roztoku GO a roztoku kyseliny listovej s hydrazínom.	45
Obrázok 31: Ramanov konfokálny mikroskop XploRA™ (Horiba Jobin Yvon, France) [32].	46
Obrázok 32: Infračervený spektrometer s Fourierovou transformáciou Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Nicolet, USA) [32].	47
Obrázok 33: Rentgenový práškový difraktometer Rigaku Ultima IV [32].	47
Obrázok 34: XPS Thermo Scientific K-Alpha [33].	48
Obrázok 35: Ramanovo spektrum grafitových vločiek použitých na prípravu grafénoxidu.	50
Obrázok 36: Ramanovo spektrum komerčne dostupného grafénoxidu od firmy Abalonyx a grafénoxidov (Vzorka 1 - 5).	51
Obrázok 37: IR spektrum grafitových vločiek použitých na prípravu grafénoxidu.	53
Obrázok 38: IR spektrum komerčne dostupného grafénoxidu od firmy Abalonyx a grafénoxidov (Vzorka 1 - 5).	53
Obrázok 39: IR spektrum čistého grafénoxidu (vzorka č. 1 a 4) a modifikovaného chitosanom.	54
Obrázok 40: IR spektrum čistého grafénoxidu (vzorka č. 1 a 4) a modifikovaného polyetylén glykolom.	54
Obrázok 41: IR spektrum čistého grafénoxidu (vzorka č. 1 a 4) a modifikovaného kyselinou listovou.	55
Obrázok 42: XRD difraktogram grafitových vločiek použitých na prípravu grafénoxidu.	56
Obrázok 43: XRD difraktogram komerčne dostupného grafénoxidu od firmy Abalonyx a grafénoxidov (Vzorka 1 - 5).	57
Obrázok 44: XRD difraktogramy grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných chitosanom.	58
Obrázok 45: XRD difraktogramy grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných polyetylén glykolom.	58
Obrázok 46: XRD difraktogramy grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných kyselinou listovou.	58
Obrázok 47: XPS spektrá vzoriek grafénoxidu; a) komerčne dostupný grafénoxid od firmy Abalonyx, b) vzorka č. 1, c) vzorka č. 2, d) vzorka č. 3, e) vzorka č. 4, f) vzorka č. 5.	60
Obrázok 48: XPS spektrá vzoriek grafénoxidu (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných chitosanom.	60
Obrázok 49: XPS spektrá vzoriek grafénoxidov (vzorka 1 a 4) modifikovaných kyselinou listovou.	61
Obrázok 50: XPS spektrá vzoriek grafénoxidov (vzorka č. 1 a 4) modifikovaných polyetylén glykolom.	61

Obrázok 51: SEM snímky grafénoxidu - vzorka č. 1; zväčšenie a) 3000x, b) 6000x, c) 12000x, d) 24000x, e) 800x.....	63
Obrázok 52: SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 2; zväčšenie a) 800x, b) 3000x, c) 6000x, 12000x. ....	64
Obrázok 53: SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 3; zväčšenie a) 800x, b) 3000x, c) 6000x, d) 12000x. .	64
Obrázok 54: SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 4; zväčšenie a) 1600x, b) 3000x, c) 6000x, d) 12000x. ....	65
Obrázok 55: SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 5; zväčšenie a) 800x, b) 1600x, c) 6000x, d) 12000x. .	65
Obrázok 56: SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 1 modifikovaná chitosanom; zväčšenie a) 200x, b) 800x, c) 1600x, d) 3000x, e) 6000x, f) 12000x.....	66
Obrázok 57: SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 4 modifikovaná chitosanom; zväčšenie a) 1600x, b) 6000x, c) 12000x, d) 24000x. ....	67
Obrázok 58: SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 1 modifikovaná polyetylén glykolom; zväčšenie a) 800x, b) 1600x, c) 6000x, d) 12000x, e) 24000x. ....	68
Obrázok 59: SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 4 modifikovaná polyetylén glykolom; zväčšenie a) 800x, b) 1600x, c) 6000x, d) 12000x, e) 24000x. ....	69
Obrázok 60: SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 1 modifikovaná kyselinou listovou; zväčšenie a) 800x, b) 1600x, c) 6000x, d) 12000x, e) 24000x. ....	70
Obrázok 61: SEM snímky grafénoxidu – vzorka č. 4 modifikovaná kyselinou listovou; zväčšenie a) 800x, b) 1600x, c) 6000x, d) 12000x, e) 24000x. ....	71
Obrázok 62: IR spektrá grafénoxidov (vzorka č. 4) modifikovaných polyetylén glykolom, kyselinou listovou a chitosanom v porovnaní so spektrami týchto modifikácií s naviazaným liečivom kamptotecín. .	72

## 10 Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 – Súhrn typických kovalentných a nekovalentných modifikácií grafénových štruktúr používaných na systém prenosu liečiva [8].....	23
Tabuľka 2 – Podmienky prípravy vzoriek grafénoxidov.....	49
Tabuľka 3 – Hodnoty intenzít D, G a 2D pásov a príslušné pomery intenzít.....	51
Tabuľka 4 – Hodnoty intenzít (002) píkov a odpovedajúce medzirovinné vzdialenosti.....	57
Tabuľka 5 – Percentuálne zastúpenie funkčných skupín vzoriek z XPS analýzy.....	61
Tabuľka 6 – Percentuálne zastúpenie prvkov vzoriek z XPS analýzy.....	62