



Bioenkapsulacja związków aktywnych biologicznie w matrycach otrzymanych metodą zol-żel i jej zastosowanie

Katarzyna Polska¹, Jan Fiedurek², Stanisław Radzki¹

¹Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

²Zakład Mikrobiologii Przemysłowej,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Bioencapsulation of biologically active compounds in matrices obtained by sol-gel method and its application

Summary

The encapsulation of biomolecules, e.g. enzymes, whole living cells or microorganisms in sol-gel derived monolithic silica, has been widely studied in recent years. Upon encapsulation, biomolecules retain their spectroscopic properties and biological activity. Sol-gel matrices are thermally and chemically stable and can be obtained in a variety of forms, such as optically transparent monoliths, granulates, microparticles or thin films. Sol-gel immobilization is characterized by physical entrapment without chemical modification. Immobilizing substances by physically trapping in individual pore of a matrix permits their molecules to be isolated and stabilized. The advantages of sol-gel encapsulated biologicals might give them applications such as optical and electrochemical sensors, diagnostic devices, catalysts, and even bioartificial organs. While the relatively large biomolecules are immobilized within the silica network, small ions or molecules are transported into the interior of the matrix.

Adres do korespondencji

Stanisław Radzki,
Wydział Chemii,
Uniwersytet
Marii Curie-Skłodowskiej,
Pl. M. Curie-Skłodowskiej 5,
20-031 Lublin;
e-mail:
radzki@hermes.umcs.
lublin.pl

Key words:

sol-gel, catalysis, sensors, enzymes, bioencapsulation.

1. Wprowadzenie

W ostatnich dwóch dekadach rośnie zainteresowanie unieruchamianymi enzymami w wielu dziedzinach przemysłu chemicznego, farmaceutycznego i spożywczego. W przemyśle spożyw-

czym zastosowanie takich biokatalizatorów zależy od rodzaju procesów technologicznych stosowanych przy produkcji i przetwarzaniu żywności, które w większości przypadków z natury mają charakter enzymatyczny. Istotny wpływ na rozwój współczesnej biotechnologii ma immobilizacja biokatalizatorów. Pierwszą technologią przemysłową biotransformacji mikrobiologicznej, w której wykorzystano unieruchomiony biokatalizator, była produkcja octu. Polegała ona na konwersji etanolu do kwasu octowego przy udziale komórek bakterii z rodzaju *Acetobacter* immobilizowanych na wiórach bukowych. Złoża biologiczne z unieruchomioną biomasa od ponad stu lat wykorzystywane są również w technologii oczyszczania ścieków.

Unieruchomione enzymy wykorzystuje się w przemyśle farmaceutycznym do produkcji antybiotyków, hormonów, niektórych witamin oraz kwasów organicznych służących do produkcji leków (1-3). Poszukiwanie coraz to nowszych technologii mających na celu zmniejszenie zanieczyszczeń doprowadziło do wykorzystania immobilizowanej peroksydazy do degradacji odpadów fenolowych, powstających w fabrykach celulozy (4,5).

Chibata i Tosa w roku 1967 (6) opisali technologię produkcji L-aminokwasów z odpowiednich racematów przy zastosowaniu aminoacylazy z grzybów nitkowatych osadzonej na DEAE-Sephadex metodą adsorpcji. Za pomocą różnych technik immobilizacji, oprócz enzymów, z powodzeniem unieruchamiano komórki bakteryjne, grzybowe, roślinne i zwierzęce lub protoplasty roślinne czy też organelle komórkowe, wykorzystując do tego modyfikacje metod opracowanych pierwotnie do immobilizacji enzymów (7).

Techniczne wykorzystanie biokatalizatorów w natywnej formie jest ograniczone, zarówno poprzez koszty ich otrzymywania, jak też przez niemożliwość ich wielokrotnego zastosowania. Ponadto labilność struktury molekularnej enzymów utrudnia i znacznie podwyższa koszty zastosowania wielu enzymów w przemyśle. Biokatalizatory unieruchomione na hydrofobowych lub hydrofilowych matrycach uzyskują właściwości podobne do enzymów związanych z błonami lipidowo-białkowymi w komórkach. Przez łączenie grup funkcyjnych białek enzymatycznych z powierzchnią matrycy z grupami czynnymi, znajdującymi się wewnątrz nośnika, powstają układy przestrzenne zbliżone w swojej konformacji do układu przestrzennego białek w błonach białkowo-lipidowych.

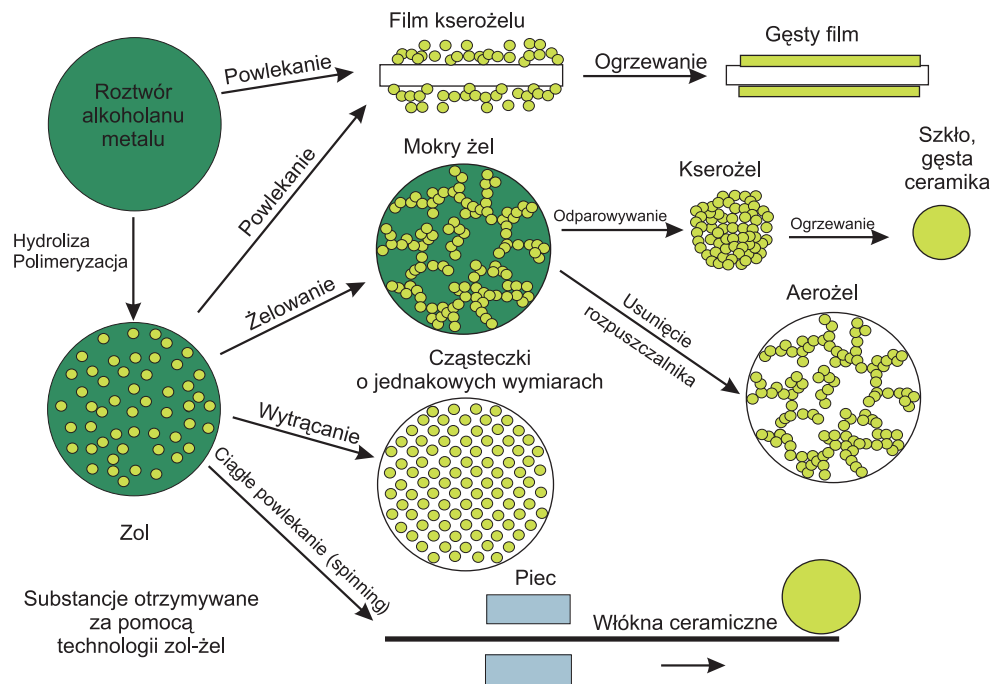
Enkapsulacja w matrycach otrzymywanych metodą zol-żel należy obecnie do najprężniej rozwijających się metod unieruchamiania cząsteczek aktywnych biologicznie. Pod pojęciem enkapsulacji należy rozumieć według terminologii zalecanej przez IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) zamykanie, stosuje się również termin „pułapkowanie” (ang. *entrapment*), dużych cząsteczek w półprzepuszczalnej błonie, zwykle okrągłego kształtu. Z kolei zamknięcie biomolekuł w labiryncie polimerycznej trójwymiarowej sieci (żelu) definiuje się jako immobilizację przez inkluzję, a przyłączenie za pomocą wyłącznie sił adsorpcji, jako immobilizację adsorpcyjną (8). Ponieważ w metodach opartych na różnych odmianach technik zol-żel, procesy te mogą występować równocześnie, a nawet konkurować ze sobą

na różnych etapach tworzenia się i późniejszego starzenia żelu, w obecnym artykule przyjęto termin enkapsulacja. Za pomocą metod zol-żel można immobilizować w żelu molekuly aktywne biologicznie, to znaczy mające wpływ na żywe organizmy (enzymatyczny, toksyczny, farmaceutyczny, etc.). Mogą to być cząsteczki zarówno nieorganiczne jak i organiczne. W przypadku immobilizacji dużych cząsteczek organicznych w literaturze przyjęł się termin bioenkapsulacja.

Szerokie wykorzystanie bioenkapsulacji wiąże się głównie z tym, że duże biomolekuly w matrycy krzemionkowej są zatrzymane fizycznie, bądź też za pomocą na tyle słabych oddziaływań chemicznych, że nie ulegają zmianie ich zasadnicze właściwości (na przykład aktywność enzymu, albo obecność pasma Soreta w widmach porfiryn i pasma tryptofanu w widmach białek). Jednocześnie w materiałach otrzymanych metodą zol-żel, do dużej cząsteczki zatrzymanej w „pułapce”, dochodzą otwarte pory pełniące funkcję kanałów, przez które małe cząsteczki mogą się dostać do biomolekuł. Tym samym duże cząsteczki organiczne wchodzą w reakcje z małymi i działają jako, na przykład, odwracalny katalizator lub odczynnik analityczny. Jednocześnie wzrasta ich odporność na degradację chemiczną, biologiczną, i termiczną. Ponadto można kontrolować, co prawda w ograniczony sposób, selektywność takiego układu poprzez kontrolę porowatości matryc otrzymanych metodą zol-żel. Uzyskuje się to poprzez dobór odpowiedniego prekursora lub domieszek. Różnorodność form i kształtów otrzymanego materiału jest praktycznie nieograniczona. Mogą to być zarówno transparentne monolity, jak i cienkie filmy, czy też granulaty. Wszystko to stanowi o szeregu możliwych zastosowań tego rodzaju układów. Można je wykorzystać do konstrukcji czujników optycznych i elektrochemicznych, w katalizie, a także w medycynie do kontrolowanego uwalniania leków, a nawet do budowy sztucznych organów.

2. Metoda zol-żel

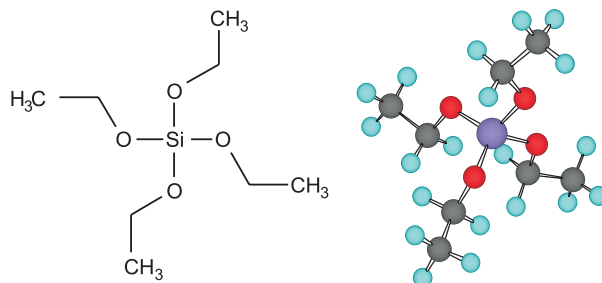
Technologia zol-żel polega na otrzymywaniu substancji szklistych z roztworów i opiera się na procesie przechodzenia roztworu koloidalnego (zolu) w żel. Po utworzeniu żelu poddaje się go najpierw dojrzewaniu (ang. *ageing*), podczas którego dochodzi do wyrzucania cieczy z wnętrza żelu (synerezy). W ten sposób można otrzymać alkożele, w których powstające pory są początkowo napełnione głównie alkoholami z dodatkiem wody, w następnym etapie mamy do czynienia z hydrożelami (pory napełnione są wodą z dodatkiem alkoholu). Dalszym etapem jest suszenie w celu otrzymania kserożelu i całkowite usunięcie z porów rozpuszczalników, w wyniku czego otrzymuje się materiał o niespotykanej małej gęstości zwany aerożelem, czy też wypalanie kserożelu w wysokich temperaturach w wyniku którego powstaje normalne szkło (9). Należy podkreślić, że o ile łatwo jest określić skrajne etapy procesu zol-żel, to rozstrzygnięcie czy mamy do czynienia z czystym alko- albo hydrożelem, lub ksero- albo aerożelem nie jest proste. Ogólny schemat otrzy-



Rys. 1. Schemat otrzymywania różnych materiałów za pomocą metody zol-żel (10).

mywania różnego typu materiałów za pomocą technologii zol-żel przedstawiono na rysunku 1.

Substancjami wyjściowymi (tak zwanymi prekursorami), stosowanymi w procesie zol-żel są alkohole o ogólnym wzorze $M(OR)_n$, gdzie: M oznacza pierwiastek przejściowy lub metal, (przy czym otrzymano żele dla następujących pierwiastków: Si, Ti, Al, B, Ge, Zr, Y i Ca); R w grupie alkoholowej -OR, to rodnik alkilowy; n = wartościowość metalu. Do najczęściej stosowanych prekursorów należą alkohole krzemu: tetrametoksy- i tertraetoksylan o wzorach $Si(OCH_3)_4$ i $Si(OC_2H_5OH)_4$, w skrócie TMOS i TEOS. Tertraetoksylan, którego wzór i strukturę przestrzenną przedstawiono na rysunku 2, ma tę przewagę, że w procesach hydrolizy i kondensacji uwalnia etanol, który jest mniej toksyczny aniżeli inne alkohole. Mniejsze znaczenie praktyczne mają alkohole krzemu będące pochodnymi wyższych alkoholi, jak również alkohole innych pierwiastków. Wynika to po pierwsze z ceny tych związków, a po drugie z faktu, że właściwości ich żeli są analogiczne do żeli krzemionkowych. TMOS i TEOS występują w warunkach normalnych w postaci cieczy, wyższe alkohole mogą być ciałami stałymi, jednak zarówno ciekłe jak i stałe alkohole używa się w postaci roztworów, w których rozpuszczalnikami są zazwyczaj etanol lub metanol, rzadziej wyższe alkohole: propanol czy butanol. Po-



Rys. 2. Wzór oraz struktura przestrzenna cząsteczki tetraetoksylanu (TEOS).

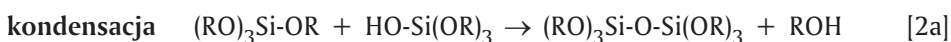
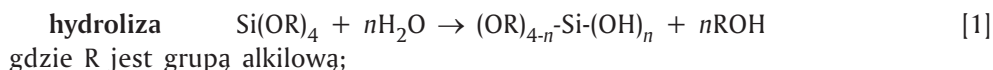
przez dobór odpowiedniego rozpuszczalnika i zmianę stężenia alkoholu można, do pewnego stopnia, kontrolować szybkość tworzenia się żelu (11).

We wszystkich odmianach metody zol-żel (12) można wyróżnić następujące etapy:

- przygotowanie homogenicznego roztworu prekursora w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą;
- przekształcenie roztworu w zol za pomocą odpowiedniego reagenta, na przykład wody z HCl;
- przejście zolu w żel w reakcjach hydrolizy i polikondensacji;
- kształtowanie żelu (lub lepkiego zolu) w odpowiednie formy na przykład w postaci monolitu, cienkiej warstwy (na nośniku z metalu, szkła czy tworzywa sztucznego), włókna lub ziaren;
- dojrzewanie (zwane też starzeniem) i suszenie żelu.

Jeśli wysuszony żel ma być przeprowadzony w szkło lub materiał ceramiczny, to spiekanie ukształtowanego żelu przebiega w temperaturach zazwyczaj znacznie niższych ($\sim 500^{\circ}\text{C}$) niż zazwyczaj stosowane w konwencjonalnych metodach ceramicznych.

Z chemicznego punktu widzenia proces zol-żel rozpoczyna się już po rozpuszczeniu alkoholu w odpowiednim rozpuszczalniku i dodaniu wody. W omawianym procesie mają miejsce reakcje hydrolizy i kondensacji alkoholanów. W przypadku alkoholanów krzemu reakcje te można przedstawić następująco:

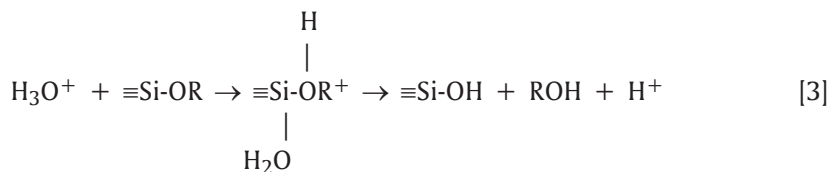


lub



Hydrolizę i kondensację alkoholanów krzemu przyspiesza się za pomocą katalizatorów kwasowych lub zasadowych. Kwasy nieorganiczne protonują (odwracalnie)

obdarzone ładunkiem grupy alkoholowej -OR w stanie przejściowym i powodują wzrost szybkości reakcji, w wyniku której odłączają się te grupy zgodnie z równaniem:

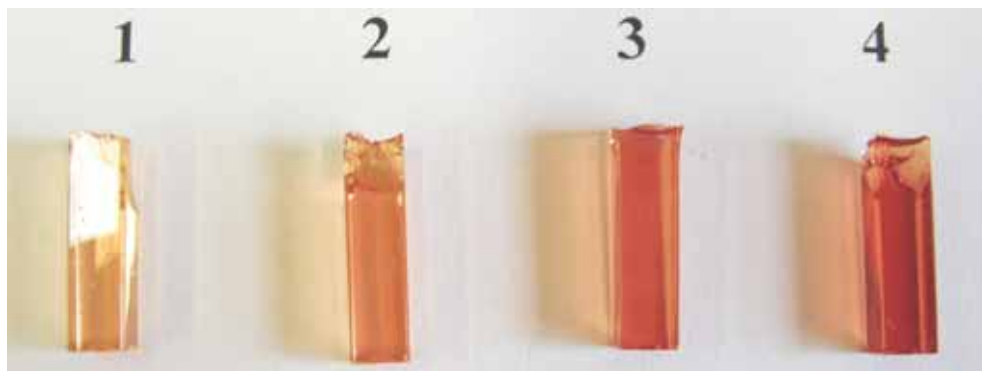


Proton przyciągany przez atom tlenu grupy -OR powoduje przesunięcie chmury elektronowej w wiązaniu $\equiv\text{Si}-\text{O}$ w kierunku atomu tlenu. W ten sposób wzrasta ładunek dodatni na atomie krzemu, do którego przyłącza się cząsteczka wody, tworząc kompleks aktywowany krzemu w jego pięciokoordynacyjnym stanie przejściowym. W rezultacie wzrasta szybkość reakcji w wyniku której grupy -OR ulegają odłączeniu (reakcja [1]). Katalizatory zasadowe dostarczają silnych nukleofilowych grup OH^- , które w trakcie reakcji hydrolizy deprotonują grupy silanolowe, tworząc $\equiv\text{Si}-\text{O}^-$ w obecności nadmiaru wody, co zwiększa szybkość kondensacji (reakcja [2]) (11).

Tak zatem, katalizator kwasowy sprzyja hydrolizie, prowadząc do utworzenia $\text{Si}(\text{OH})_4$. Z kolei kondensacja zachodzi szybciej w obecności katalizatorów zasadowych. Należy podkreślić, że reakcje hydrolizy i polikondensacji przebiegają równocześnie, a szybkość poszczególnych reakcji zależy od pH środowiska. W wyniku postępującej polikondensacji następuje wzrost cząsteczek polimeru w roztworze, aż do utworzenia trójwymiarowej sieci krzemionki. Stopniowo zatem ma miejsce przejście do stanu koloidalnego, zwanego zolem, w którym zgodnie z ogólnie akceptowaną definicją rozmiary cząstek fazy rozproszonej zawierają się w przedziale od 1 do 1000 nm (11). Zol następnie przechodzi w żel, a próbka powoli zwiększa mechaniczną spójność i zachowuje kształt nadany przez naczynie, w którym się znajduje.

W praktyce procesy hydrolizy i polimeryzacji przebiegają równocześnie, dlatego też żel trzeba poddać procesowi dojrzewania, które zwiększa odporność próbki na pękanie w późniejszych etapach. Podczas tego procesu następuje synereza, czyli uwalnianie wody i alkoholu z porów, a w konsekwencji zmniejszenie się objętości żelu, co wiąże się bezpośrednio ze zmniejszeniem wielkości porów. Kolejnym etapem obróbki materiału zol-żelowego jest suszenie, którego rezultatem są kserożele, o często nawet kilkukrotnie mniejszej objętości niż wyjściowa próbka. Można je poddać wypalaniu w wysokiej temperaturze (nawet do 1250°C), a uzyskany wówczas materiał niczym nie różni się od klasycznego, topionego szkła.

Bardzo ważną zaletą metody zol-żel jest możliwość otrzymania monolitycznych i transparentnych optycznie żeli, zwanych alko-, hydro-, aero- i kserożelami, przy czym te ostatnie mają już właściwości szkła, a różnią się od szkła znacznie mniejszą gęstością. Właśnie z powodu nowej jakości takiego materiału IUPAC wprowadził nową definicję szkła, w myśl której, kserożel nie jest szkłem, chociaż posiada



Rys. 3. Próbkki monolitycznych żeli krzemionkowych domieszkowanych mieszaninami tetrametylopirydyloporfiryny Cu(II) z konkanawaliną A, o różnych stężeniach (od $2,5 \times 10^{-6}$ do $1,5 \times 10^{-5}$ M) i o różnym stosunku molowym: 1:2 (1), 1:1 (2), 2:1 (3) i 3:1 (4), po sześciu miesiącach suszenia w temp. 25°C (12).

wszystkie jego właściwości, ponieważ jest materiałem, który nie uległ transformacji termicznej. Jednakże właśnie ten brak transformacji termicznej powoduje, że w żelach można zamykać biomolekuły nie niszcząc ich struktury. Przykłady monolitycznych żeli krzemionkowych z porami wypełnionymi kompleksem porfiryne-białko pokazano na rysunku 3. Ponieważ pory te są otwarte dla mniejszych cząsteczek, kompleks ten może wchodzić w szereg reakcji z małymi cząsteczkami, a przezroczystość materiału pozwala na śledzenie przebiegu tych reakcji zarówno za pomocą widm absorpcyjnych jak i emisyjnych.

3. Żele domieszkowane związkami organicznymi

Związki organiczne i bioorganiczne można wprowadzić do materiałów otrzymanych metodą zol-żel trzema sposobami:

1) poprzez adsorpcję na powierzchni żelu, niezależnie od tego czy występuje on w postaci cienkiej warstwy czy też granulatu;

2) poprzez związanie wprowadzanych do żelu cząsteczek z podłożem za pomocą wiązań kowalencyjnych, w wyniku czego powstaje trwały związek biocząsteczki z podłożem;

3) na drodze enkapsulacji, zwanej czasami „pułapkowaniem” (ang. *entrapment*).

Stosunkowo najłatwiejsza w realizacji jest adsorpcja, ale posiada też wiele wad. Najważniejsza z nich to stosunkowo słabe związanie immobilizowanej cząsteczki z powierzchnią adsorbenta, ponadto liczba zaadsorbowanych biomolekuł o dużych wymiarach jest stosunkowo mała. Z kolei trwałe związanie biocząsteczki z podłożem, za pomocą wiązania chemicznego wymaga dołączenia do niej odpowiednich grup funkcyjnych umożliwiających wytworzenie takiego wiązania. Jest to trudne do

wykonania i prowadzi zwykle do zmian struktury immobilizowanej cząsteczki, a w konsekwencji do zaniku aktywności katalitycznej, czy też zdolności do pełnienia funkcji analitycznego reagenta w czujniku.

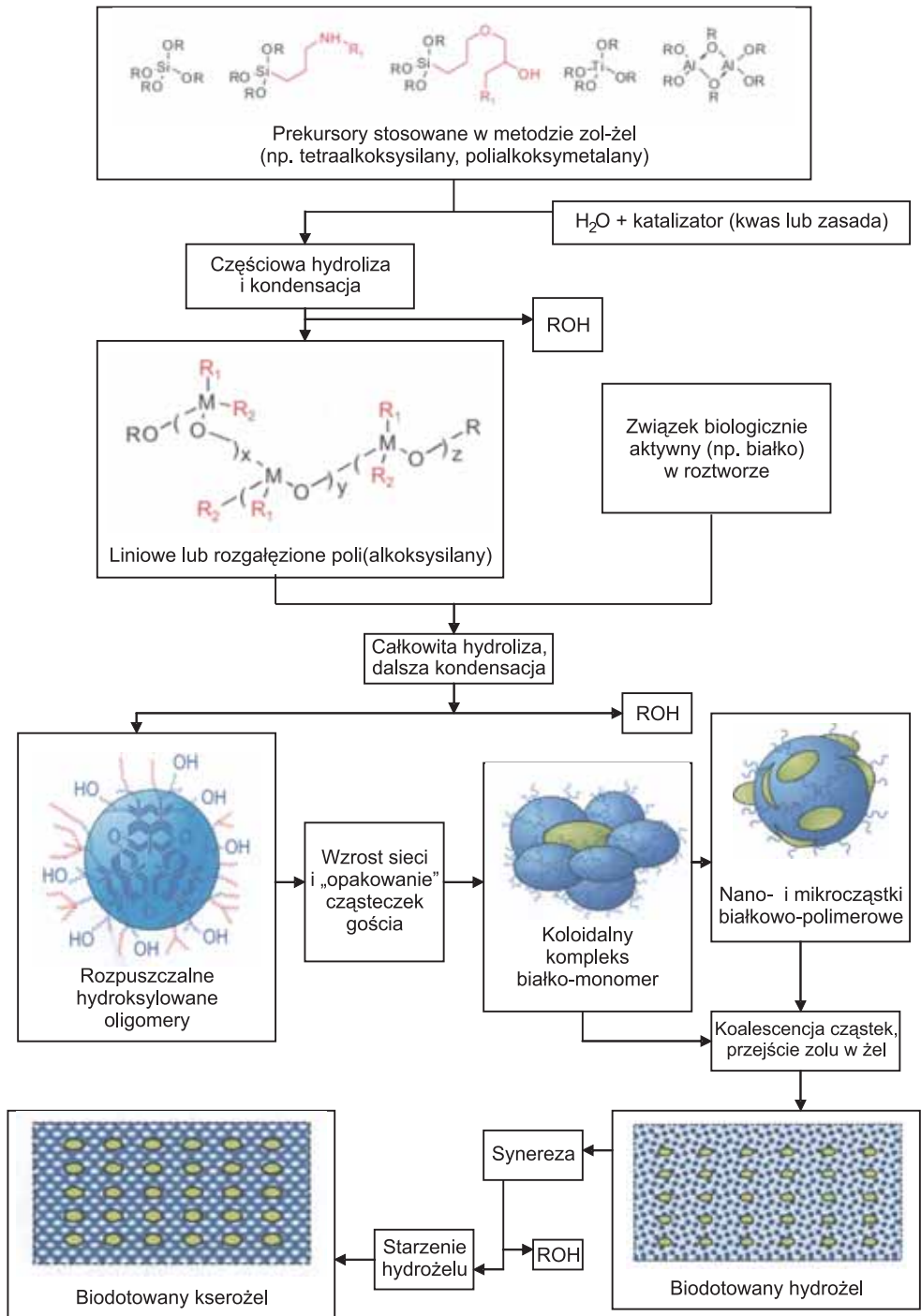
Ostatnia metoda jest szczególnie interesująca, gdyż dzięki niej można zamykać w materiałach żelowych molekuly o rozmaitych kształtach, wielkościach i ładunkach elektrycznych. Wprowadzenie dużej biocząsteczki już na etapie formowania zolu i dalsze przeprowadzenie układu w żel powoduje bowiem okłudowanie molekuly w tworzącej się sieci trójwymiarowych wiązań $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$. Bardzo istotną cechą materiałów żelowych jest niska temperatura procesu ich suszenia. Zazwyczaj proces ten przeprowadza się w temperaturze pokojowej, zapewnia trwałość immobilizowanych substancji. Stosując temperaturę suszenia nawet poniżej 100°C można uzyskać suche i transparentne optycznie kserożele (9).

Istotą metody zol-żel jest przeprowadzenie w temperaturze pokojowej równoczesnych reakcji hydrolizy i polikondensacji związków organometalicznych. Otrzymany na tej drodze materiał jest porowatą matrycą, zawierającą połączone ze sobą pory o kształcie „butelek z cienką szyjką”, zwanych też czasami porami „wnęgowymi i klatkowymi” (ang. *cavity and cages*). Pory te są utworzone przez trójwymiarową sieć krzemionkową, a rozmiar tych porów zależy przede wszystkim od wielkości zamkniętej w nich cząsteczki. Mówiąc obrazowo, sieć krzemionkowa „opakowuje” duże molekuly. Bioenkapsulacja jest zatem metodą, która łączy zalety dwóch pierwszych metod immobilizacji cząstek o biologicznej aktywności, a równocześnie, jak się wydaje, jest pozbawiona ich wad. Do bioenkapsulacji wykorzystywano głównie polimery organiczne (takie jak polichlorek winylu, polistyren i poliakrylany), a nieorganiczne polimery nie wzbudzały zainteresowania do czasu klasycznej już pracy Avnira z roku 1990 (15). Od tego czasu rozpoczęło się zainteresowanie bioenkapsulacją przy wykorzystaniu metody zol-żel (16-18), co wynika z szeregu korzystnych cech, jakie posiadają polimery krzemionkowe w porównaniu z polimerami organicznymi. Do najważniejszych należą:

- znaczna odporność mechaniczna;
- wytrzymałość na chemiczną i biologiczną degradację;
- możliwość pracy w środowisku gazowym, ciekłym (układy wodne, organiczne i mieszane) oraz w warunkach pod- i nadkrytycznych;
- pełna immobilizacja w porach dużych biocząsteczek, przy jednoczesnym zachowaniu ich struktury i właściwości;
- zwiększenie odporności biomolekuł na denaturację termiczną i chemiczną, a także wydłużenie czasu ich aktywności;

Rys. 4. Schemat bioenkapsulacji cząsteczek aktywnych biologicznie (np. białek) w żelach otrzymanych metodą zol-żel (R = grupa alkilowa). Autorzy wyrażają podziękowanie wydawnictwu Elsevier za pozwolenie wykorzystania rysunku z artykułu (10).

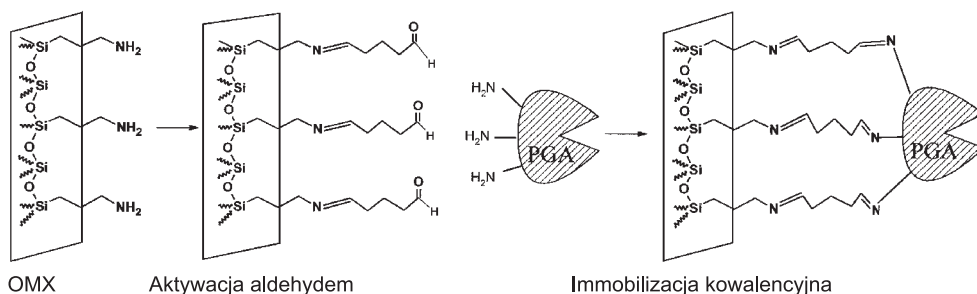




– możliwość kontrolowania właściwości fizycznych i chemicznych porowatego materiału poprzez ogromną ilość różnego rodzaju prekursorów, modyfikatorów, domieszek, a także zmianę warunków polimeryzacji.

Dość często jako substratów w procesie zol-żel używa się organicznie modyfikowane alkoholan krzemu o ogólnym wzorze $R'_x\text{Si}(\text{OR})_{4-x}$, gdzie R i R', to w praktyce prawie wszystkie znane rodniki organiczne. Związki te zawierają niepolarne wiązania $\equiv\text{Si}-\text{C}\equiv$ nieulegające zerwaniu w trakcie hydrolizy i kondensacji. Dzięki nim można utworzyć połączenia hybrydowe organiczno-nieorganiczne znane jako krzemiany modyfikowane organicznie (ang. *ormosil* = *organically modified silicate*) lub kserożele modyfikowane organicznie (ang. *OMX* = *organically modified xerogel*). Chemia tych związków była centrum zainteresowania wielu autorów (19-21), znane są też prace, w których do takich nieorganiczno-organicznych materiałów wprowadzano między innymi, porfiryny (22-24). W wielu przypadkach za stosowaniem prekursorów modyfikowanych organicznie przemawia mniejsza porowatość i zwiększona odporność mechaniczna, która pozwala na ich cięcie, rozdrabnianie i polerowanie (25). Wiele barwników organicznych, które znalazły zastosowanie w technice laserowej, z dobrym skutkiem było pułapkowanych w tego typu materiałach, nie tylko ze względu na większą elastyczność hybrydowych żeli zawierających duży procent substancji organicznych, ale także z uwagi na podobieństwo chemiczne organicznej części matrycy i zastosowanego barwnika (26). Schemat postępowania w procesie enkapsulacji biologicznie aktywnych materiałów w matrycach zol-żelowych pokazano na rysunku 4.

Bardzo często tego typu materiały otrzymane na drodze zol-żel pozwalają na kowalencyjne wiązanie biocząsteczek na powierzchni nośnika. Przykładem może być immobilizacja enzymu – acylazy penicylinowej G w organicznie modyfikowanym kserożelu, utworzonym przez zmieszanie tetraetoksylanu i pochodnej aminowej w postaci (3-aminopropyl)trimetoksylanu, $(\text{MeO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ (27). Kowalencyjne przyłączenie enzymu do powierzchni tego nośnika było możliwe dzięki wcześniejszej aktywacji za pomocą aldehydu glutaralowego (rys. 5). Układ ten znalazł praktyczne zastosowanie w biokatalizie.



Rys. 5. Struktura organicznie modyfikowanego kserożelu (OMX) i proces wielopunktowej immobilizacji acylazy penicylinowej G (PGA) na jego powierzchni. Autorzy wyrażają podziękowanie wydawnictwu Elsevier za pozwolenie wykorzystania rysunku z artykułu (27).

3.1. Zastosowanie bioenkapsulacji do konstrukcji czujników analitycznych

Atrakcyjnym i najszybciej rozwijającym się aspektem wykorzystania technologii zol-żelowej jest możliwość konstruowania różnego rodzaju czujników do pomiaru rozmaitych parametrów fizycznych i chemicznych. Zasada działania takiego czujnika opiera się na zamknięciu substancji aktywnej (sensorycznej) w matrycy otrzymanej metodą zol-żel. Tym samym duża molekula biosensora jest opakowana, czy też uwięziona w strukturze krzemionkowej, podczas gdy małe, reagujące z nią cząsteczki mogą swobodnie do niej dotrzeć poprzez pory matrycy. Ze względu na sygnał zwrotny, konstruowane w ten sposób czujniki dzielimy na: optyczne (zwane optodami) i elektrochemiczne. Matryca zol-żelowa jest materiałem transparentnym optycznie, czyli może być zintegrowana z metodami spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej, stąd zastosowanie jej do budowy tak zwanych optod zasługuje na szczególną uwagę. Do innych zalet matryc krzemionkowych, które stanowią o ich użyteczności w konstrukcji biosensorów, zaliczyć można:

- niską temperaturę otrzymywania oraz odporność termiczną;
- porowatość, dużą zwilżalność, hydrofobowość i hydrofilowość;
- możliwość wprowadzania jako domieszek metali, tlenków metali lub grafitu, do konstruowania biosensorów amperometrycznych;
- możliwość formowania nośnika o różnych kształtach.

Szczególne interesujące są sensory wykorzystujące w reakcji analitycznej immobilizowane związki o znaczeniu biologicznym. Szeroki przegląd możliwości zamykania białek hemowych w zol-żelowych matrycach został przedstawiony w pracy Lana i wsp. (16). Takie układy mogą być wykorzystane do konstrukcji czujników optycznych (28,29), w których białka hemowe zachowują wszystkie swoje funkcje: biokatalityczne, chemiczne utleniająco-redukujące, oraz możliwości przyłączania takich ligandów jak O_2 , CO i NO . W tabeli 1 przedstawiono przykłady czujników opartych na matrycach krzemionkowych z unieruchamianymi białkami i enzymami.

Tabela 1

Optyczne i elektrochemiczne czujniki oparte na związkach biologicznie aktywnych immobilizowanych w matrycach otrzymanych metodą zol-żel

Enkapsulowany biosensor	Typ matrycy zol-żelowej	Substancja wykrywana	Typ czujnika	Literatura
1	2	3	4	5
dysmutaza i peroksydaza ponadtlenkowe	SiO_2	rodniki ponadtlenkowe	optyczny (fluorescencyjny)	(36)
oksydaza glukozowa	SiO_2 /poliuretan	NO	amperometryczny	(37)
lucyferaza	SiO_2 /glukoza	ATP	optyczny (fluorescencyjny)	(38)
oksydaza glukozowa	SiO_2 /polimer celulozowy	glukoza	optyczny (UV-Vis)	(39)
peroksydaza chrzanowa	APTMS/TEOS*	H_2O_2	amperometryczny	(40)
ureaza, peroksydaza	SiO_2	kwas moczowy	optyczny (fluorescencyjny)	(41)

1	2	3	4	5
dehydrogenaza mleczanowa	SiO ₂	L-mleczan	optyczny (fluorescencyjny)	(42)
lakaza**	SiO ₂	fenole, aryloaminy	optyczny (UV-Vis)	(43)
katalaza	SiO ₂	H ₂ O ₂	optyczny (UV-Vis)	(44)
cytochrom c	SiO ₂	NO	optyczny (UV-Vis)	(44)
ureaza	SiO ₂	mocznik	optyczny (UV-Vis)	(45)
oksydaza i dehydrogenaza mleczanowe	SiO ₂	mleczan, pirogronian	optyczny amperometryczny	(46)

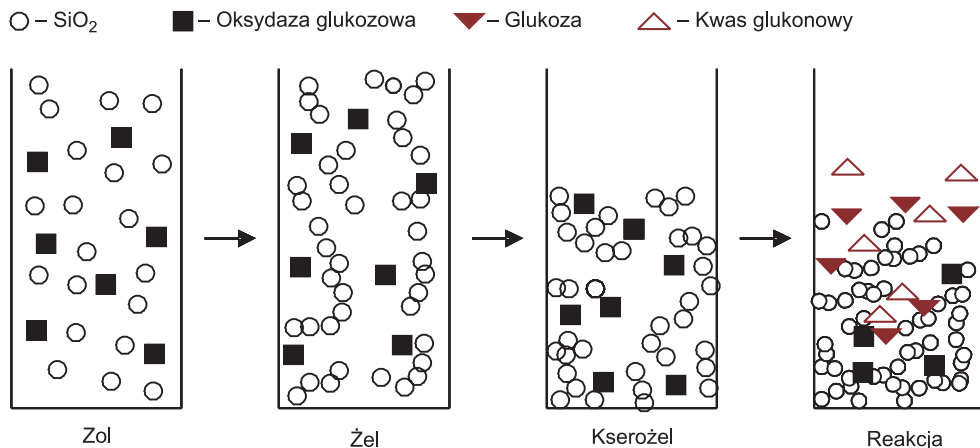
* 3-aminopropyltrimetoksylan/tetrametoksylan

** benzenodiol: O₂ oksydoreduktaza (EC 1.10.3.2)

Najbardziej znanym kierunkiem wykorzystania enzymów unieruchomionych w analityce są tzw. elektrody enzymowe (30). Stanowią one najważniejszą grupę czujników enzymatycznych o dużych perspektywach i możliwościach zastosowań, zwłaszcza w diagnostyce medycznej, biotechnologii i ochronie środowiska. Są to układy złożone z odpowiedniego (dla oznaczanego substratu) enzymu, unieruchomionego w bezpośredniej bliskości elektrody czulej na dany substrat, połączone z jonoselektywnymi lub czułymi na określone gazy elektrodami, mierzącymi bezpośrednio stężenie jonów H⁺, NH₄⁺ lub gazów takich jak NO₂, O₂, SO₂, CO₂ (31). Zalety elektrod enzymatycznych wynikają z połączenia dwóch zasadniczych cech: specyficzności substratowej enzymu oraz precyzji, prostoty i szybkości pomiaru sygnału elektrycznego elektrody. Zakres ich działania można poszerzyć przez wspólną immobilizację dwu lub więcej enzymów. Przykładami elektrod multienzymatycznych są: elektroda z unieruchomioną oksydazą glukozową i glukoamylazą, służąca do oznaczania glukozy, maltozy oraz wielocukrów ulegających hydrolizie pod wpływem glukoamylazy (31). Schemat działania czujnika do oznaczania glukozy pokazano na rysunku 6. W dalszych badaniach zmierza się w kierunku zwiększania czułości oznaczeń, zwiększania szybkości odpowiedzi elektrody oraz miniaturyzacji elektrod, pozwalających na oznaczenia *in vivo* w tkankach mięśniowych, żyłach i tkance mózgowej (31).

Ze względu na łagodne warunki procesu bioenkapsulacji w matrycach zol-żelowych, zwłaszcza pokojowej temperatury żelowania, możliwe jest wprowadzenie do wyjściowego zolu także porfiryn i ich nawet nietrwałych, kompleksów z metalami. Dzięki swym receptorowym właściwościom, cząsteczki porfiryn zamknięte w porach powstającego żelu mogą być zastosowane w technice sensorowej i wykorzystane do konstrukcji czujników wykrywających tlen (32), jony rtęci (33), aminy (34), jak również do oznaczania pH (35). Matryce krzemionkowe są materiałem transparentnym optycznie w zakresie 300-800 nm, dlatego są dobrym materiałem do immobilizacji porfiryn i ftalocyjanin ponieważ pasma absorpcji i emisji tych związków są położone w tym zakresie.

Duża biokompatybilność matryc krzemionkowych umożliwia zamykanie w nich żywych komórek, tkanek i mikroorganizmów (47-49). Wykorzystanie bakterii, jako



Rys. 6. Immobilizacja oksydazy glukozowej w żelu SiO₂ i schemat działania czujnika wykrywającego glukozę. Autorzy wyrażają podziękowanie wydawnictwu Elsevier za pozwolenie wykorzystania rysunku z artykułu (28).

czynników sensorycznych zamkniętych w zol-żelu przedstawiono w wielu doniesieniach (50-52). Takie czujniki wykorzystujące właściwości fluorescencyjne niektórych białek mogą być wykorzystywane do różnych celów, na przykład do oznaczania tlenu singletowego, który powoduje wygaszanie fluorescencji. Wykazano, że zamknięte w matrycy krzemionkowej bakterie zachowują dość dużą żywotność, a jednocześnie tracą zdolność podziału. Jest to szczególnie istotne, gdy chcemy by sygnał przez nie przekazywany był miarodajny i odtwarzalny.

Niestety matryce zol-żelowe wykazują pewne niedogodności podczas stosowania ich do konstruowania czujników, w tym (53):

- długi czas odpowiedzi, ograniczony przez dyfuzję reagujących cząsteczek do wnętrza porów;

- mimo że elucja sensora z matrycy krzemionkowej jest ograniczona i niewielka w porównaniu z innymi rodzajami nośników, to jednak wciąż istnieje i może wpłynąć na intensywność sygnału;

- w kserożelu, otrzymanym metodą zol-żel z prekursorów czterofunkcyjnych, długo po zżelowaniu będzie przebiegać proces kondensacji, powodując kurczenie nośnika. Skutkiem tego nastąpi zmniejszanie się jego porów, a przez to ograniczenie ilości dyfundujących przez nie cząsteczek reagenta;

- zamknięcie w żelach może jednak wpływać na właściwości chemiczne i spektroskopowe zamkniętej w porach cząsteczki, ze względu na ograniczenie stopni swobody cząsteczek w porach (czasami mogą wystąpić trudności z określeniem liczby faz w regule Gibbsa), a ponadto istnieje możliwość oddziaływania uwięzionej cząstki z siecią krzemionki.

3.2. Przykłady zastosowania bioenkapsulacji w katalizie

Matryce krzemionkowe otrzymane metodą zol-żel nadają się doskonale na nośniki katalizatorów w katalizie heterogenicznej. Wynika to z faktu, że materiały te odznaczają się wysoką porowatością, dużą powierzchnią właściwą, dużą czystością, małą gęstością oraz niską temperaturą i łatwością otrzymania. Istotna jest również ich duża jednorodność, umożliwiająca równomierny rozkład składników aktywnych. Prowadzono badania nad wykorzystaniem aerożeli dotowanych katalizatorami nieorganicznymi w postaci tlenków metali, mieszanin tlenków metali, jak również katalizatorów typu metal-tlenek metalu. Układy takie były stosowane do katalizowania reakcji uwodornienia, hydrolizy, częściowego utlenienia, syntezy amoniaku, syntezy Fischera-Tropscha oraz wielu innych (54).

Wiele bioprocessów komercyjnych opiera się na wykorzystaniu katalizatorów zamkniętych w różnego rodzaju nośnikach, w tym również w matrycach zol-żelowych. Należą do nich między innymi: produkcja glicerydów, fosfolipidów, peptydów, białek, aminokwasów, antybiotyków, szeregu farmaceutyków oraz chiralnych półproduktów (14). Przemysłowe procesy biokonwersji często wymagają biokatalizatorów heterogenicznych, które dają się formować w pożądane kształty, wykazują wysoką aktywność i długotrwałą stabilność w specyficznych warunkach, również w rozpuszczalnikach organicznych. Warunki te, jak się wydaje, spełniają katalizatory immobilizowane w matrycach krzemionkowych otrzymanych metodą zol-żel. Układy oparte na tego typu kserożelach można formować w postaci monolitów, granulek, mikrocząstek, grubych i cienkich filmów. Zaletą tego typu nośników jest możliwość zwiększenia stabilności chemicznej i termicznej katalizatora, nie ograniczając w znacznym stopniu jego wydajności. Wykazano, że wydajność takich enzymów jak: oksydaza glukozowa, fosfataza, tripsyna, aspartaza i anhydraza węglanowa w formie „uwięzionej” w kserożelu krzemionkowym wynosiła od 30 do 100% ich wydajności w formie natywnej (55). Przykłady procesów katalizowanych przy użyciu enzymów unieruchomionych w matrycach zol-żelowych zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Przykłady enzymów enkapsulowanych w matrycach otrzymanych metodą zol-żel

Enkapsulowany biokatalizator	Typ matrycy zol-żelowej	Proces katalizowany	Literatura
1	2	3	4
acylaza penicylinowa G	SiO ₂ /pochodna aminowa	hydroliza benzylopenicyliny	(39)
chloroperoksydaza	SiO ₂	enantjoselektywne utlenianie siarczków za pomocą H ₂ O ₂	(57)
chloroperoksydaza	SiO ₂	nadtlenkowe fluorowcowanie i epoksydowanie alkenów bez pomocy jonów halogenkowych	(58)
peroksydaza chrzanowa	SiO ₂	tworzenie grup nadtlenkowych	(59)

1	2	3	4
peroksydaza chrzanowa	SiO ₂	asymetryczne utlenianie tioanizolu w acetonitrylu za pomocą H ₂ O ₂	(60)
β-glukuronidaza, arylosulfataza	SiO ₂	rozprężanie koniugatów zawartych w moczu	(61)
proteiny serynowe (trypsyna, subtylizyna Carlsberga, α-chymotrypsyna)	SiO ₂	transestryfikacja N-acetylo-L-feniloalaninianu etylu z 1-propanolem w cykloheksanie	(62)
mioglobina, peroksydaza, cytochrom c, hemoglobina,	SiO ₂	S-utlenianie dibenzotiofenu	(63)
dehydrogenazy: formaldehydowa, alkoholowa	SiO ₂	konwersja CO do metanolu	(64)
lipaza z <i>Burkboldelia cepacia</i>	MTMS/TMOS* TMOS	transestryfikacja laurynianu winylu z 1-octanolem	(65)
lipazy	MTMS/TMOS	reakcja estryfikacji kwasu laurynowego z 1-octanolem	(66)

* metylotrimetoksylan/tetrametoksylan

Z punktu widzenia sposobu prowadzenia procesu katalizy pożądane jest umieszczenie katalizatora na kolumnie (56), zapewniające ciągłość procesu oraz możliwość regeneracji kolumny, co najłatwiej uzyskać poprzez przeprowadzenie biodotowanego kserożelu w postaci drobnych ziaren.

Ważną grupą katalizatorów stosowanych w formie immobilizowanej w matrycach zol-żelowych są porfiryny i ich pochodne. Zazwyczaj katalizę w której uczestniczą porfiryny nazywamy biomimetyczną, ponieważ często imitują one enzymy w tego typu układach (67). W ten sposób porfiryny mogą katalizować na przykład utlenianie alkanów i alkenów łańcuchowych (68,69) oraz cykloalkenów (70).

3.3. Zastosowanie bioenkapsulacji w medycznych materiałach żelowych do celów medycznych

Porowate kserożele krzemionkowe, jako całkowicie biokompatybilne, są bardzo atrakcyjnym materiałem do zastosowań medycznych. Wiele badań z tego zakresu dotyczy zastosowania tego typu matryc jako układów nośnikowych dla różnego rodzaju leków (71). Przykładem może być wykorzystanie sztucznie skonstruowanych wysepek Langerhansa do powolnego dozowania insuliny u diabetyków (72,73). Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów *in vitro* dowodzi się, że kserożele krzemionkowe mogą uwalniać leki o niskiej masie cząsteczkowej, takie, jak antybiotyki (np. wankomycyna o masie cząsteczkowej 2,8 kDa) (74,75). Również większe cząsteczki, takie, jak białka i czynniki wzrostu (masa cząsteczkowa około 20 kDa), mogą być uwalniane z odpowiednio przygotowanych matryc krzemionkowych, przy

czym podczas ich „wychodzenia” z porów nie następują uszkodzenia (76,77). Istotną zaletą tego typu układów jest możliwość kontroli szybkości uwalniania leku z porów. Z badań Radin i wsp. (78) wynika, że kserożele doskonale sprawdzają się jako nośniki w kontrolowanym uwalnianiu leków także *in vivo*, co zostało wykorzystane m.in. w leczeniu infekcji kostnych. Szeroki przegląd zastosowań materiałów otrzymanych metodą zol-żel w medycynie do takich celów jak kontrolowane uwalnianie leków czy też pokrywanie cienkimi warstwami metalicznych implantów został przedstawiony w pracy Salina i wsp. (79).

Zamknięte w matrycach zol-żelowych enzymy znalazły zastosowanie w analityce medycznej do oznaczania substancji będących substratami, aktywatorami lub inhibitorami enzymów. Użycie odpowiednich enzymów pozwala na selektywne i czułe oznaczanie we krwi, moczu, a także bezpośrednio w tkankach, ważnych fizjologicznych związków, takich jak: mocznik, kwas moczowy, glukoza i inne cukry, lipidy, fosfolipidy, cholesterol i antybiotyki (3-5). Wykorzystana tu została zdolność enzymu, na przykład peroksydazy, do barwnych reakcji z substratami. W wielu przypadkach zadziwia czułość stosowanych układów detekcji, np. lucyferazę immobilizowaną na zmodyfikowanych kuleczkach szklanych, którymi wypełniono szklaną rurkę wykorzystano do wykrywania ultraśladowych ilości NADH (koenzym wielu reakcji enzymatycznych), w tym przypadku dolna granica czułości wynosiła $1,3 \times 10^{-13}$ mola.

Maruszewski i wsp. (80) otrzymali żele krzemionkowe, zawierające immobilizowaną karbocyjaninę, będącą obiecującym fotouczulaczem dla terapii fotodynamicznej (PDT). Celem ich badań było podniesienie fotostabilności tego barwnika poprzez zamknięcie go w matrycy zol-żelowej. Okazuje się bowiem, że to co stanowi o antynowotworowej aktywności danego fotouczulacza, czyli produkcja cytotoksycznego tlenu singletowego, jednocześnie powoduje niszczenie uczulacza w reakcji fotolizy (81). W wyniku enkapsulacji w matrycy krzemionkowej proces rozkładu barwnika, zwany fotowyciełowaniem (ang. *photobleaching*), ulega znacznemu spowolnieniu. Tak zatem, unieruchomienie badanego przez fotouczulacza w zol-żelu prowadziło do znacznego zwiększenia jego fototrwałości.

Podbielska i wsp. (82) poszli o krok dalej w wykorzystaniu żeli krzemionkowych dotowanych fotosensybilizatorami w terapii fotodynamicznej. Opracowana przez nich metoda polega na immobilizacji barwników porfiryńowych (opartych na preparatach uzyskanych z chlorofilu) w matrycy krzemionkowej. Pokryli oni cienką warstwą końcówkę światłowodu, którym doprowadzane jest światło lasera w pobliże komórek nowotworowych. W ten sposób końcówka tego urządzenia staje się również dodatkowo źródłem cząsteczek fotosensybilizatora, a podczas naświetlania, także generatorem tlenu singletowego niszczącego komórki nowotworowe.

4. Podsumowanie

Uniwersalność enkapsulacji cząsteczek aktywnych biologicznie w matrycach uzyskanych metodą zol-żel w stosunku do rodzaju unieruchamianej substancji, a także różne możliwości zastosowania tak otrzymanych układów, dają ogromne nadzieje na przyszłość. Dodatkowym atutem metody jest prostota oraz brak modyfikacji chemicznej immobilizowanej substancji. Cząsteczki, żywe komórki, a nawet mikroorganizmy uwięzione fizycznie w sztywnej strukturze tego rodzaju matryc zachowują swoje właściwości spektroskopowe, a także aktywność biologiczną.

Literatura

1. Barker S. A., Kay I., (1975), *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Ed. Wiseman A., J Wiley and Sons Inc., New York.
2. Horitsu H., Takahashi Y., Adachi S., Xioa R., Hayashi T., Kawai K., Kautola H., (1988), *Fundamentals and Applications*, Ed. Murray Moo-Young, Elsevier Applied Science, 287-300.
3. Vandamme E. J., (1988), *Fundamentals and Applications*, Ed. Murray Moo-Young, Elsevier Applied Science, 287-300, London.
4. Chmiel A., (1994), *Biotechnologia, podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, Wyd. Naukowe PWN, 126-142; 314-319, Warszawa.
5. Łoborzewski J., Ginalska G., (1995), *Plant Peroxidase Newsletters*, 6, 3-7.
6. Tosa T., Mori T., Fuse N., Chibata I., (1967), *Enzymologia*, 32(3), 153-168.
7. Ginalska G., (2001), *Sposoby immobilizacji ligandów na matrycach stałych i ich zastosowanie w badaniach biochemicznych*, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.
8. IUPAC Compendium of Chemical Terminology <http://www.iupac.org/publications/compendium/index.html>.
9. Maruszewski K., (2000), *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, Wyd. UW., Wrocław.
10. Dargiewicz-Nowicka J., (2002), *Charakterystyka spektralna porfiryn i ich kompleksów z metalami w matrycach krzemionkowych uzyskanych metodą zol-żel*, praca doktorska, Wydział Chemii, UMCS, Lublin.
11. Klonkowski A. M., (1993), *Wiad. Chem.*, 47, 497-519.
12. Polska K., (2005), *Tworzenie się związków kompleksowych pomiędzy konkanawaliną A i porfirydami*, praca doktorska, Wydział Chemii, UMCS, Lublin.
13. Livage J., (1997), *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 2, 132-138.
14. Gill I., Ballesteros A., (2000), *TIBTECH*, 18, 282-296.
15. Zusman R., Rotman C., Avnir D., (1990), *J. Non-Cryst. Solids*, 122, 107-109.
16. Lan E. H., Dave B. C., Fukuto J. M., Dunn B., Zink J. I., Valentine J. S., (1999), *J. Mater. Chem.*, 9, 45-53.
17. Sacco H. C., Ciuffi K. J., Biazzotto J. C., Mello C., de Oliveira D. C., Vidoto E. A., Nascimento O. R., Serra O. A., Iamamoto Y., (2001), *J. Non-Cryst. Solids*, 284, 174-182.
18. Kawano S., Tamaru S., Fujita N., Shinkai S., (2004), *Chem. Eur. J.*, 10, 343-351.
19. Li X., King T. A., (1996), *J. Non-Crystalline Solids*, 204, 235-242.
20. Prabakar S., Assink R. A., (1997), *J. Non-Crystalline Solids*, 211, 39-48.
21. Zhang Y., Wang M., (2000), *J. Non-Crystalline Solids*, 271, 88-93.
22. Ciuffi K. J., Sacco H. C., Valim J. B., Manso C. M. C. P., Serra O. A., Nascimento O. R., Vidoto E. A., Iamamoto Y., (1999), *J. Non-Crystalline Solids*, 247, 146-152.
23. Kulikov S. G., Veret-Lemarinier A. V., Galaup J. P., Chaput F., Boilot J. P., (1997), *Chemical Physics*, 216, 147-161.

24. Arabei S. M., Kulikov S. G., Veret-Lemarinier A. V., Galaup J. P., (1997), *Chemical Physics*, 216, 163-177.
25. Reisfeld R., (2001), *Optical Materials*, 16, 1-7.
26. Lin H. T., Bescher E., Mackenzie J. D., Dai H., Stafsudd O. M., (1992), *J. Mater. Sci.*, 27, 5523-5529.
27. Basso A., de Martin L., Ebert C., Gardossi L., Linda P., Sibilla F., (2003), *Tetrahedron Lett.*, 44, 5889-5891.
28. Künzelmann U., Böttcher H., (1997), *Sensors and Actuators B*, 38-39, 222-228.
29. Yu J., Ju H., (2003), *Anal. Chim. Acta*, 486, 209-216.
30. Russel S., (1990), *Biotechnologia*, Wyd. Naukowe PWN, 168-200, Warszawa
31. Sugier H., (1994), *Biotechnologia*, 1 (24), 133-147.
32. Lee S. K., Okura I., (1997), *Anal. Chim. Acta*, 342, 181-188.
33. Plaschke M., Czolk R., Ache H. J., (1995), *Anal. Chim. Acta*, 304, 107-113.
34. Delmarre D., Bied-Charreton C., (2000), *Sensors and Actuators B*, 62, 136-142.
35. Delmarre D., Meallet-Renault R., Bied-Charreton C., Pasternack R. F., (1999), *Anal. Chim. Acta*, 401, 125-128.
36. Pastor I., Esquembre R., Micol V., Mallavia R., Mateo C. R., (2004), *Anal. Biochem.*, 334, 335-343.
37. Shin J. H., Marxer S. M., Schoenfish M. H., (2004), *Anal. Chem.*, 76, 4543-4549.
38. Cruz-Aguado J. A., Chen Y., Zhang Z., Elowe N. H., Brook M. A., Brennan J. D., (2004), *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 6878-6879.
39. Wu X. J., Choi M. M. F., (2004), *Anal. Chim. Acta*, 514, 219-226.
40. Prieto-Simon B., Armatas G. S., Pomonis P. J., Nanos C. G., Prodromidis M. I., (2004), *Chem. Mater.*, 16, 1026-1034.
41. Martinez-Perez D., Ferrer M. L., Mateo C. R., (2003), *Anal. Biochem.*, 322, 238-242.
42. Li C. I., Lin Y. H., Shih C. L., Tsaur J. P., Chau L. K., (2002), *Biosensors & Bioelectronics*, 17, 323-330.
43. Simkus R. A., Laurinavicius V., Boguslavsky L., Skotheim T., Tanenbaum S. W., Nakas J. P., Slomczynski D. J., (1996), *Anal. Lett.*, 29, 1907-1919.
44. Miller J. M., Dunn B., Valentine J. S., Zink J. I., (1996), *J. Non-Cryst. Solids*, 202, 279-289.
45. Narang U., Prasad P. N., Bright F. V., Kumar A., Kumar N. D., Malhotra B. D., Kamalasanan M. N., Chandra S., (1994), *Chem. Mater.*, 6, 1596-1598.
46. Park T. M., Iwuoha E. I., Smyth M. R., Freaney R., McShane A. J., (1997), *Talanta*, 44, 973-978.
47. Carturan G., Dal Monte R., Pressi G., Secondin S., Verza P., (1998), *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 13, 273-276.
48. Inama L., Dire S., Carturan G., Cavazza A., (1993), *J. Biotechnol.*, 30, 197-210.
49. Boninsegna S., Bosetti P., Carturan G., Dellagiacoma G., Dal Monte R., Rossi M., (2003), *J. Biotechnol.*, 100, 277-286.
50. Nassif N., Roux C., Coradin T., Bouvet O. M. M., Livage J., (2004), *J. Mater. Chem.*, 14, 2264-2268.
51. Ferrer M. L., Yuste L., Rojo F., del Monte F., (2003), *Chem. Mater.*, 15, 3614-3618.
52. Premkumar J. R., Sagi E., Rozen R., Belkin S., Modestov A. D., Lev O., (2002), *Chem. Mater.*, 14, 2676-2686.
53. Lin J., Brown C. W., (1997), *Trends Anal. Chem.*, 16, 200-211.
54. Pniak B., Walendziewski J., Stolarski M., Steiniger M., (1997), *Wiad. Chem.*, 51, 365-381.
55. Shtelzer S., Rappoport S., Avnir D., Ottolenghi M., Braun S., (1992), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15, 227-235.
56. Campestrini S., Meunier B., (1992), *Inorg. Chem.*, 31, 1999-2006.
57. Trevisan V., Signoretto M., Colonna S., Pironi V., Strukul G., (2004), *Angew. Chem.*, 43, 4097-4099.
58. Han Y. J., Watson J. T., Stucky G. D., Butler A., (2002), *J. Mol. Catal. B*, 17, 1-8.
59. Smith K., Silvernail N. J., Rodgers K. R., Elgren T. E., Castro M., Parker R. M., (2002), *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 4247-4252.
60. Ferrer M. L., Levy D., Gomez-Lor B., Iglesias M., (2004), *J. Mol. Catal. B*, 27, 107-111.
61. Cichna M., (2003), *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 26, 1159-1164.
62. van Unen D. J., Engbersen J. F. J., Reinhoudt D. N., (2001), *Biotech. Bioeng.*, 75, 154-158.
63. Wu S., Lin J., Chan S. I., (1994), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 47, 11-20.

64. Obert R., Dave B. C., (1999), *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 12192-12193.
65. El Rassy H., Perrard A., Pierre A. C., (2004), *J. Mol. Catal. B*, 30, 137-150.
66. Jaeger K. E., Reetz M. T., (1998), *TIBTECH*, 16, 396-403.
67. Damos F. S., Sotomayor M. D. T., Kubota L. T., Tanaka S. M. C. N., Tanaka A. A., (2003), *Analyst*, 128, 255-259.
68. de Faria A. L., Airoidi C., Doro F. G., Fonseca M. G., Assis M. D., (2004), *Appl. Catal. A*, 268, 217-226.
69. Cunningham I. D., Danks T. N., Hay J. N., Hamerton I., Gunathilagan S., Janczak C., (2002), *J. Mol. Catal. A*, 185, 25-31.
70. Vidoto E. A., Moreira M. S. M., Fabio D. V., Ciuffi K. J., Nascimento O. R., Iamamoto Y., (2002), *J. Non-Crystalline Solids*, 304, 151-159.
71. Barbe C., Bartlett J., Kong L. G., Finnie K., Lin H. Q., Larkin M., Calleja S., Bush A., Calleja G., (2004), *Adv. Mater.*, 16, 1959-1966.
72. Sakai S., Ono T., Ijima H., Kawakami K., (2001), *Ann. NY Acad. Sci.*, 944, 277-283.
73. Pope E. J. A., Braun K., Peterson C. M., (1997), *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 8, 635-639.
74. Radin S., Ducheyne P., Kamplain T., Tan B. H., (2001), *J. Biomed. Mater. Res.*, 57, 313-320.
75. Aughenbaugh W., Radin S., Ducheyne P., (2001), *J. Biomed. Mater. Res.*, 57, 321-326.
76. Nicoll S. B., Radin S., Santos E. M., Tuan R. S., Ducheyne P., (1997), *Biomaterials*, 18, 853-859.
77. Santos E. M., Radin S., Ducheyne P., (1999), *Biomaterials*, 20, 1695-1700.
78. Radin S., El-Bassyouni G., Vresilovic E. J., Schepers E., Ducheyne P., (2005), *Biomaterials*, 26, 1043-1052.
79. Vallet-Regí M., Ragel C.V., Salinas A.J., (2003), *Eur. J. Inorg. Chem.*, 6, 1029.
80. Maruszewski K., Sidorowicz A., Ulatowska A., Podbielska H., Stręk W., (1998), *J. Mol. Struct.*, 450, 193-200.
81. Ion R-M., (1996), *Romanian J. Biophys.*, 6, 205-212.
82. Podbielska H., Ulatowska-Jarża A., Binding U., Hołowacza I., Stręk W., Muller G., Eichler H. J., (2004), *Proceedings of the International Conference "Sol-Gel Materials '04"*, Wrocław, 49.