

DOI: 10.1002/ange.200602382

Polymerbürsten als ionotrope Matrices für die gezielte Herstellung mikrostrukturierter dünner Calcit-Filme***Stefano Tugulu, Marc Harms, Marc Fricke, Dirk Volkmer* und Harm-Anton Klok**

Viele Biomineralien zeichnen sich durch komplexe, hierarchisch organisierte Strukturen aus.^[1] In der Natur wird die Bildung dieser Biomineralien durch spezielle Matrixmoleküle gesteuert. Beispielsweise spielen saure Biomakromoleküle eine bedeutende Rolle in der gezielten Mineralisation von CaCO_3 , einem der am häufigsten vorkommenden Biomineralien.^[2] Neben den drei kristallinen Polymorphen kommt biogenes CaCO_3 in zwei amorphen Modifikationen vor: einer stabilen hydratisierten Form und einer metastabilen, überwiegend wasserfreien Form, die als Vorstufe der thermodynamisch stabilen kristallinen Modifikationen auftreten kann.^[3,4] Diese zweite, metastabile amorphe CaCO_3 -Phase (ACC) wird insbesondere als Vorstufe bei der Bildung verschiedener biogener Strukturen aus CaCO_3 , z. B. dem Seeigelstachel, vermutet.^[5,6] Bei In-vitro-Experimenten wurde ACC ebenfalls als Vorstufe genutzt, z. B. zur Bildung von CaCO_3 -Kristallen in räumlich begrenzten Geometrien, und um mikrostrukturierte Calciteinkristalle sowie perlmutartige, laminierte Beschichtungen aus CaCO_3 herzustellen.^[7-9] Ein Vorteil einer Vorstufenphase aus ACC liegt darin, dass sie sich viel einfacher zu komplexen Strukturen formen lässt als kristallines CaCO_3 . Die Route über amorphe Vorstufen

[*] S. Tugulu, Prof. H.-A. Klok
École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL)
Institut des Matériaux
Laboratoire des Polymères
Bâtiment MXD, Station 12, 1015 Lausanne (Schweiz)
Fax: (+41) 216-935-650
E-Mail: harm-anton.klok@epfl.ch
Homepage: <http://lp.epfl.ch>

M. Harms, Dr. M. Fricke, Prof. D. Volkmer
Anorganische Chemie II
Universität Ulm
Albert-Einstein-Allee 11, 89081 Ulm (Deutschland)
Fax: (+49) 731-502-3039
E-Mail: dirk.volkmer@uni-ulm.de
Homepage: http://www.uni-ulm.de/ac2/Volkmer_Group/

[**] Diese Arbeiten wurden durch die VolkswagenStiftung (H.-A.K.) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-Schwerpunktprogramm 1117 „Prinzipien der Biomineralisation“, Vo 829/2-3, D.V.) unterstützt. Die Autoren danken Priv.-Doz. Dr. A. Ziegler (Zentrale Einrichtung Elektronenmikroskopie, Universität Ulm) für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Dr. S. Hild (Universität Ulm), Dr. G. Lamarque (Laboratoire des Polymères, EPFL) und WITec GmbH (Ulm) für die AFM-Studien.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

wurde außerdem zur Herstellung kristalliner carbonathaltiger Apatitfilme verfolgt.^[10]

Solche Konzepte zur Beeinflussung von Größe, Gestalt und Mikrostruktur synthetischer anorganischer Materialien sind von großer technischer Bedeutung und könnten zu neuen Materialien mit Anwendungen im Bereich der optischen Informationsverarbeitung, Katalyse und regenerativen Medizin führen.^[11–14] Eine geeignete Methode zur Herstellung mikrostrukturierter anorganischer Materialien beruht auf der Verwendung von selbstorganisierten Monoschichten (SAMs), die geeignete zweidimensionale, räumlich begrenzte Mikroumgebungen für die Kristallisation bilden können.^[12,14] In diesem Fall tritt die Kristallisation auf Bereichen des Substrats auf, die geeignete Oberflächengruppen exponieren. Anstelle von spezifischen Oberflächenmodifizierungen kann auch ein auf der Mikrometerskala zweidimensional strukturierter Keramikfilm durch Auferlegen äußerer physikalischer Zwänge erzeugt werden.^[13] Dies kann durch eine Reihe von „weichen“ lithographischen Techniken erfolgen, wie Mikrotransfer-Formung, Mikroformung in Kapillaren und Prägung.

Hier stellen wir einen ganz neuen Ansatz für die Herstellung von mikrostrukturierten, kristallinen dünnen Calcit-Filmen vor. Unsere Strategie basiert auf der Verwendung photolithographisch strukturierter Polymethacrylsäure-(PMAA)-Bürsten, die über Oberflächen-initiierte Atomtransferradikalpolymerisation (SI-ATRP) auf ein Substrat aufwachsen. Sie fungieren als ionotrope^[15] Matrices für die Bildung kristalliner Calcitfilme, die exakte 3D-Replikat der PMAA-Bürsten sind. Einer der besonderen Vorteile von Polymerbürsten gegenüber SAMs besteht darin, dass Filmdicke und chemische Zusammensetzung präzise über Oberflächen-initiierte kontrollierte Radikalpolymerisationstechniken wie ATRP gesteuert werden können.^[16–18] Wir demonstrieren hier erstmalig die Verwendung solcher Bürsten als ionotrope Matrices zur gezielten Herstellung mikrostrukturierter dünner Calcit-Filme. Die vorgeschlagene Strategie umfasst drei Schlüsselschritte (Abbildung 1): 1) die Verwendung photolithographischer Techniken zur Herstel-

lung mikrostrukturierter PMAA-Bürsten; 2) die Fähigkeit der PMAA-Bürsten zur Stabilisierung von ACC; 3) die thermische Umwandlung der metastabilen ACC-Phase in einen polykristallinen Calcitfilm.

Eine erste Serie von Experimenten mit 100 nm dicken, unstrukturierten PMAA-Bürsten auf Glassubstraten wurde durchgeführt, indem die Bürsten 30 min dem kontinuierlichen Fluss einer übersättigten Calciumcarbonat-Lösung in einer Perfusionskammer ausgesetzt wurden. Anschließend wurden die Substrate aus der Perfusionskammer entnommen, gewaschen, getrocknet und mit mikroskopischen Methoden charakterisiert. Die differentielle Interferenzkontrastmikroskopie (DIC)-Aufnahme zeigt die Bildung eines gleichmäßig dünnen und unstrukturierten CaCO₃-Films (Abbildung 2 A).

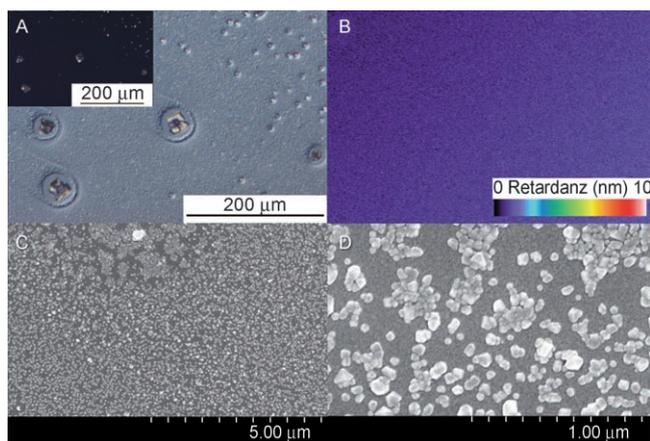


Abbildung 2. Mikroskopische Aufnahmen eines ACC-Films, der durch 100 nm dicke, unstrukturierte PMAA-Bürsten stabilisiert wird. A) DIC-Aufnahme und Polarisationsmikroskop-Aufnahme (Einschub); B) LC-PolScope-Abbildung in Pseudofarbdarstellung; C) niedrig und D) hoch aufgelöste Rasterelektronenmikroskop-Abbildung.



Abbildung 1. Herstellung mikrostrukturierter Calcitfilme. A) Synthese der PMAA-Bürsten durch SI-ATRP von Natriummethacrylat auf photolithographisch gemusterten ATRP-Initiator-funktionalisierten Substraten (bipy = 2,2'-Bipyridin). B) Gerichtete Abscheidung einer dünnen Schicht aus metastabilem amorphem Calciumcarbonat (ACC) mit anschließender thermischer Umwandlung der metastabilen ACC-Schicht in einen mikrostrukturierten polykristallinen Calcitfilm.

Der Einschub von Abbildung 2 A zeigt eine Lichtmikroskop-Aufnahme unter gekreuzten Polarisatoren. Das Fehlen jeglicher Doppelbrechung in großen Bereichen der Probe deutet darauf hin, dass der CaCO₃-Film hauptsächlich amorph ist. In Abbildung 2 A sind zusätzlich einige isolierte Calcitkristalle zu erkennen, deren Bildung mit der Entstehung einer kreisförmigen CaCO₃-Verarmungszone um die wachsenden Kristalle verbunden ist. Einen weiteren Beweis für die amorphe Natur des CaCO₃-Films liefert die Bestimmung des Gangunterschieds im Film durch LC-PolScope.^[19,20] Der Gangunterschied ist eine Funktion der Orientierung der kristallographischen *c*-Achse und der Dicke des kristallinen Films. Aus der Pseudofarbdarstellung in Abbildung 2 B geht hervor, dass der Gangunterschied des amorphen Films weniger als 1 nm über die gesamte Fläche des Bildes variiert, was auf das Fehlen jeglicher Kristallinität zurückgeführt werden kann. Bei kleinen Schwankungen handelt es sich vermutlich um eine spannungsinduzierte Doppelbrechung im Film. Die amorphe Natur der Calciumcarbonat-Schichten konnte ebenfalls mit ATR-FTIR-Spektroskopie über das Fehlen der charakteristischen ν_4 -Absorptionsbande von Calcit bei 714 cm⁻¹ bestätigt

werden (siehe Hintergrundinformationen).^[21] Diese Experimente weisen eindeutig darauf hin, dass dünne, metastabile ACC-Filme mithilfe von PMAA-Bürsten abgeschieden und stabilisiert werden können. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 2 C und D belegen, dass der ACC-Film aus sphärischen Partikeln besteht, mit typischen Partikel-Durchmessern von 20 bis 100 nm.

Die ACC-Schicht wurde anschließend durch zweistündiges Erhitzen auf 250 °C kristallisiert. Die Polarisationsmikroskop-Aufnahme des so gebildeten Films in Abbildung 3

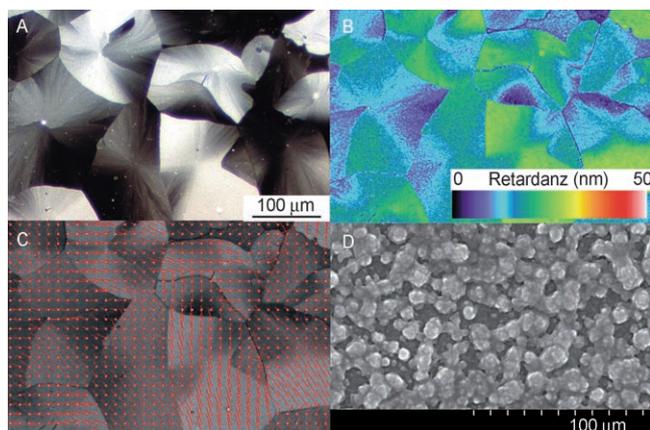


Abbildung 3. Mikroskopische Aufnahmen eines dünnen Calcit-Films, der durch zweistündiges Erhitzen auf 250 °C aus einem durch PMAA-Bürsten stabilisierten amorphen Vorstufenfilm hergestellt wurde. A) Polarisationsmikroskop-Aufnahme; B) LC-PolScope-Abbildung (Gangunterschied in Pseudofarbdarstellung); C) Grauwertabbildung des Gangunterschiedes mit einer Überlagerung von Vektorlinien, die die Richtung der langsamen optischen Achse kennzeichnen; D) hochauflösende Rasterelektronenmikroskop-Abbildung.

zeigt eine Mosaikstruktur aus diskreten Domänen, die jeweils aus flachen Calciteinkristallen bestehen. ATR-FTIR-Spektren weisen eine charakteristische ν_4 -Absorptionsbande bei 714 cm^{-1} auf, die eine Identifizierung von Calcit als Kristallmodifikation im dünnen Film unterstreicht (Hintergrundinformationen).^[21] Um genaueren Einblick in die kristallographische Orientierung der kristallinen Domänen im Calcitfilm zu erhalten, wurden LC-PolScope-Experimente durchgeführt. Die LC-PolScope-Aufnahme in Abbildung 3 B zeigt, dass jede einzelne Domäne des polykristallinen Films eine enge Verteilung der Gangunterschiede aufweist. Die geringe Variation innerhalb individueller Domänen kann auf spannungsinduzierte Doppelbrechung zurückgeführt werden, die beim Trocknen und Schrumpfen der Probe infolge des Erhitzens auftreten kann. Abbildung 3 C zeigt denselben Ausschnitt des dünnen Films wie in Abbildung 3 B, wobei die Richtung der langsamen Achse der Doppelbrechung an mehreren Punkten durch kleine Vektorsymbole gekennzeichnet ist. Da innerhalb jeder einzelnen Domäne in Abbildung 3 C die Vektoren in die gleiche Richtung zeigen, ist davon auszugehen, dass die polykristallinen Filme aus flachen Calciteinkristallen bestehen. Abbildung 3 D zeigt, dass der Calcitfilm aus miteinander verschmolzenen CaCO_3 -Partikeln besteht.

Die bisher diskutierten Experimente deuten darauf hin, dass die PMAA-Bürsten als ionotrope Matrices für die Stabilisierung von metastabilem ACC und dessen nachfolgende Umwandlung (durch Erhitzen) in einen dünnen, polykristallinen Calcitfilm fungieren können. In nachfolgenden Experimenten wurde diese Strategie weiterentwickelt, um strukturierte PMAA-Bürsten auf Glassubstraten zur Herstellung mikrostrukturierter Calcitfilme einzusetzen. Die Herstellung strukturierter PMAA-Bürsten erfolgte über die photolithographische Strukturierung ATRP-Initiator-funktionalisierter Substrate. Die Bestrahlung mit UV-Licht und einem TEM-Netz als Photomaske führte zur Zersetzung des ATRP-Initiators in den exponierten Regionen. Die anschließende SI-ATRP von Natriummethacrylat erfolgte ausschließlich in den Regionen des Substrats, die nicht bestrahlt wurden.^[22] Dies lässt sich in Abbildung 4 erkennen, in der lichtmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische (AFM-)Aufnahmen von 90 nm dicken PMMA-Bürsten gezeigt werden, die mit Photomasken unterschiedlicher Maschengröße hergestellt wurden.

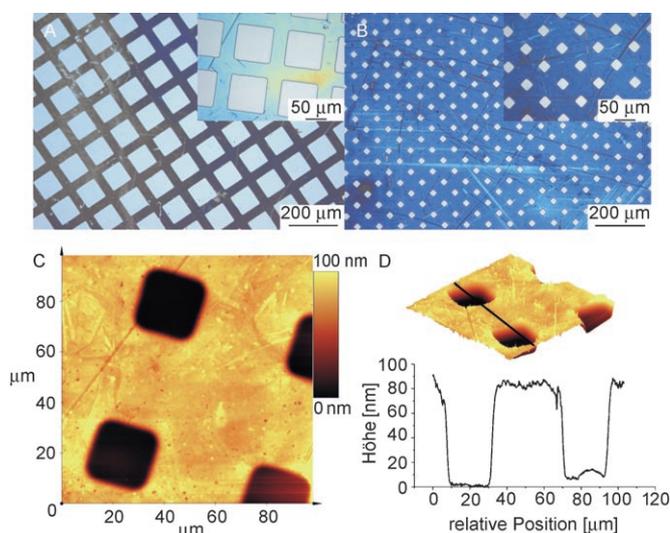


Abbildung 4. A, B) Reflexionslichtmikroskop-Aufnahmen von gemusterten PMAA-Bürsten, die auf Silicium-Wafern als Substrat immobilisiert und durch unterschiedliche Photomasken bestrahlt wurden; C) topographische Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme und D) 3D-Projektion des AFM-Bildes mit Höhenprofil einer photolithographisch strukturierten PMAA-Bürste.

Die Mineralisierungsversuche mit mikrostrukturierten PMAA-Bürsten wurden wie oben beschrieben durchgeführt und die amorphen dünnen Filme anschließend thermisch (2 h, 250 °C) in einen dünnen polykristallinen Calcitfilm umgewandelt. Abbildung 5 zeigt zum Vergleich eine DIC-Aufnahme von einer ACC-Schicht, die sich in einer 90 nm dicken, mikrostrukturierten PMAA-Bürste gebildet hat, sowie DIC-, Polarisationsmikroskop- und LC-PolScope-Aufnahmen dieser Probe nach zweistündigem Erhitzen auf 250 °C. Ein Vergleich der Abbildungen 5 A und 5 C zeigt eindeutig, dass sich ACC ausschließlich in den Regionen des Substrats abscheidet, die aus PMAA-Bürsten bestehen. Dies geht in

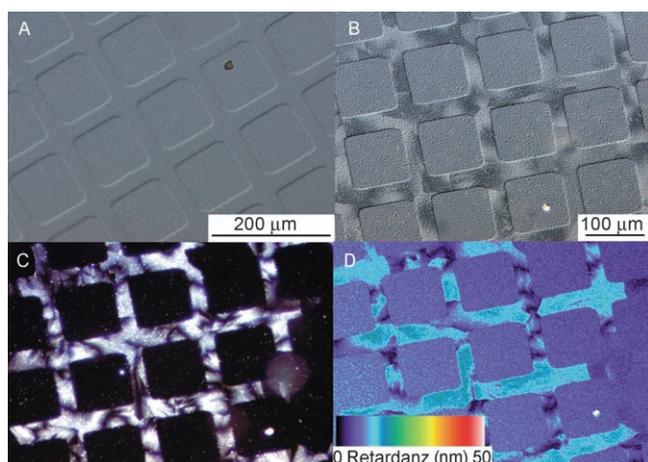


Abbildung 5. A) DIC-Aufnahme eines ACC-Films, der auf 90 nm dicken, gemusterten PMAA-Bürsten auf Glassubstraten aufgewachsen ist; B) DIC-, C) Polarisationsmikroskop- und D) Pseudofarb-LC-PolScope-Darstellung desselben Calciumcarbonatfilms nach zweistündigem Erhitzen auf 250 °C.

Abbildung 5 C insbesondere aus der fehlenden Doppelbrechung in den Bereichen hervor, die nicht mit PMAA-Bürsten bedeckt sind. Des Weiteren zeigt Abbildung 5 C, dass diejenigen Bereiche des Substrats, die mit PMAA-Bürsten bedeckt sind, eine mosaikartige Textur aufweisen. In Analogie zu Abbildung 3 A folgt daraus, dass sich ein polykristalliner Calcitfilm gebildet hat. Mithilfe von AFM-Untersuchungen konnte die Dicke des mikrostrukturierten Calcitfilms auf 80–90 nm abgeschätzt werden (Hintergrundinformationen). Wir gehen daher davon aus, dass die Mineralisation von CaCO_3 innerhalb der PMAA-Bürsten auftritt und der polykristalline Calcitfilm ein exaktes 3D-Replikat der ionotropen PMAA-Matrix ist. Um genaueren Einblick in die kristallographischen Orientierungen der Calcitkristalle in dem mikrostrukturierten Film zu erhalten, wurden erneut LC-PolScope-Messungen durchgeführt. Ein Vergleich der Abbildungen 3 B und 5 D lässt eine engere Verteilung des Gangunterschiedes für die mikrostrukturierten Calcitfilme als für die unstrukturierten Filme erkennen. Dies geht vermutlich auf einen Spannungsausgleich während der Kristallisation der mikrostrukturierten Probe zurück.^[8]

Wir haben hier eine neuartige Strategie zur Herstellung mikrostrukturierter dünner Calcit-Filme vorgestellt. Unser Prozess weist einige Gemeinsamkeiten mit biologischen Mineralisierungsprozessen auf, bei denen saure Makromoleküle ein ionotropes Gel bilden, das eine Übergangsphase aus ACC aufnehmen und stabilisieren kann und das Kristallwachstum in eine räumlich begrenzte Geometrie zwingt, die durch die makromolekulare Matrix vorgegeben wird. Wir haben photolithographisch strukturierte PMAA-Bürsten als biomimetische, saure makromolekulare Matrix zur Herstellung mikrostrukturierter Calcitfilme eingesetzt, die exakte 3D-Replikate der PMAA-Bürsten sind. Der Erfolg der vorgestellten Strategie beruht auf drei Schritten: 1) der Verwendung photolithographischer Techniken zur Herstellung mikrostrukturierter PMAA-Bürsten, 2) der Fähigkeit der PMAA-Bürsten zur Stabilisierung von ACC und 3) der

thermischen Umwandlung der metastabilen ACC-Phase in einen polykristallinen Calcitfilm. Anders als bei Verwendung von SAMs erfolgt die Kristallisation von CaCO_3 nicht auf einem 2D-Templat, sondern *innerhalb* der ionotropen Matrix aus PMAA-Bürsten. Daraus folgt, dass die PMAA-Bürsten als 3D-Matrix fungieren, die mit hoher Genauigkeit in ein Calcit-Replikat kopiert wird. Während die lateralen Abmessungen der Mikrostrukturen durch die lithographischen Techniken festgelegt sind, die zur Herstellung der strukturierten PMAA-Bürsten genutzt werden, kann die Dicke des Calcitfilms durch die Dicke der PMAA-Bürsten eingestellt werden. Diese lässt sich einfach über das „lebende“ Verhalten des SI-ATRP-Prozesses steuern. Das Potenzial dieser Strategie haben wir hier mit der Herstellung relativ einfacher mikrostrukturierter Calcitfilme aufgezeigt. Es ist naheliegend, dass sich diese Technik auch auf andere anorganische Materialien und komplexere Strukturen erweitern lässt. Dies kann erreicht werden, indem man die Flexibilität von SI-ATRP in Bezug auf die chemische Zusammensetzung und die Architektur der Polymerbürsten mit den zahlreichen lithographischen und nichtlithographischen Techniken kombiniert, die zur Herstellung gemusterter Oberflächen zur Verfügung stehen. Damit stehen zukünftig Verfahren zur Verfügung, die zur Herstellung mikrostrukturierter anorganischer Materialien mit interessanten optischen, katalytischen und biologischen Eigenschaften genutzt werden können.

Experimentelles

Details der Synthese der PMAA-Bürsten und der Mineralisierungsexperimente sind in den Hintergrundinformationen zu finden. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit DIC und Polarisationskontrast wurden mit einer Hitachi-RGB-Kamera (HV-C20A 3-CCD) mit einer Auflösung von $3 \times 768 \times 576$ Bildpunkten aufgenommen, die auf ein invertiertes Mikroskop (Olympus IX70) montiert war. Doppelbrechungen wurden mit einem kommerziellen LC-PolScope-Bildverarbeitungssystem (CRI) gemessen. Zur Rasterkraftmikroskopie wurde ein Nanoscope-II-Mikroskop eingesetzt. Proben für die Elektronenmikroskopie wurden in einer Gefrierschneidemaschine Balzer BAF300 rotierend mit Platin (3 nm) bedampft und mit einem Feldemissionsrasterelektronenmikroskop (Hitachi S-5200) untersucht. ATR-FTIR-Spektren wurden mit einem Nicolet Magna-IR 560 aufgenommen, das ein Einzelreflexionsdiamant-ATR-System (Specac Golden Gate) enthält.

Eingegangen am 13. Juni 2006

Online veröffentlicht am 13. Oktober 2006

Stichwörter: Biomimetische Synthese · Biom mineralisation · Calciumcarbonat · Dünne Filme · Polymerbürsten

- [1] S. I. Stupp, P. V. Braun, *Science* **1997**, 277, 1242.
- [2] B.-A. Gotliv, L. Addadi, S. Weiner, *ChemBioChem* **2003**, 4, 522.
- [3] L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 959.
- [4] T. Kato, A. Sugawara, N. Hosoda, *Adv. Mater.* **2002**, 14, 869.
- [5] Y. Politi, T. Arad, E. Klein, S. Weiner, L. Addadi, *Science* **2004**, 306, 1161.
- [6] N. Nassif, N. Pinna, N. Gehrke, M. Antonietti, C. Jäger, H. Cölfen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 12653.
- [7] E. Loste, F. C. Meldrum, *Chem. Commun.* **2001**, 901.

- [8] J. Aizenberg, D. A. Muller, J. L. Grazul, D. R. Hamann, *Science* **2003**, 299, 1205.
- [9] D. Volkmer, M. Harms, L. Gower, A. Ziegler, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 645; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 639.
- [10] G. Xu, I. A. Aksay, J. T. Groves, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2196.
- [11] D. Braga, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5702; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5544.
- [12] J. Aizenberg, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1295.
- [13] C. R. Martin, I. A. Aksay, *J. Electroceram.* **2004**, 12, 53.
- [14] Y. Gao, K. Koumoto, *Cryst. Growth Des.* **2005**, 5, 1983.
- [15] H. Thiele, *Histolyse und Histogenese: Gewebe und ionotrope Gele – Prinzip einer Strukturbildung*, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, **1967**.
- [16] S. Edmondson, V. L. Osborne, W. T. S. Huck, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 14.
- [17] B. Zhao, W. J. Brittain, *Prog. Polym. Sci.* **2000**, 25, 677.
- [18] J. Pyun, T. Kowalewski, K. Matyjaszewski, *Macromol. Rapid Commun.* **2003**, 24, 1043.
- [19] R. Oldenbourg, G. Mei, *J. Microsc.* **1995**, 180, 140.
- [20] R. Oldenbourg, *Nature* **1996**, 381, 811.
- [21] E. Beniash, J. Aizenberg, L. Addadi, S. Weiner, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1997**, 264, 461.
- [22] R. Iwata, P. Suk-In, V. P. Hoven, A. Takahara, K. Akiyoshi, Y. Iwasaki, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 2308.