

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:

Χαρακτηρισμός Μαγνητικών Νανοσωματιδίων γ-Fe₂O₃ για

εντοπισμένη Καρκινική Θεραπεία



ΜΑΛΑΜΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

Επιβλέπων Καθηγητής : Κ.Α. Χαριτίδης, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2013



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:

Χαρακτηρισμός Μαγνητικών Νανοσωματιδίων γ-Fe₂O₃ για

εντοπισμένη Καρκινική Θεραπεία

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΜΑΛΑΜΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κ.Α. Χαριτίδης, Καθηγητής Ε.Μ.Π. Χ.Σ. Καραγιάννη, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Λ. Ζουμπουλάκης, Επικ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, 2013

<u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u>

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Χαρακτηρισμός Μαγνητικών Νανοσωματιδίων γ-Fe₂O₃ για Εντοπισμένη Καρκινική Θεραπεία» εκπονήθηκε στη Σχολή Χημικών Μηχανικών, Τομέας ΙΙΙ: Επιστήμη και Τεχνική των Υλικών, υπό την επίβλεψη του Καθηγ. Κων/νου Χαριτίδη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή Κ. Α. Χαριτίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στο πρόσωπό μου κατά την εκπόνηση της μελέτης, την καθοδήγηση και επίβλεψη για την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ειδικά σε μία περίοδο δύσκολη για εμένα καθώς εκτελούσα παράλληλα τη στρατιωτική μου θητεία.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Υποψήφια Διδάκτορα Αμαλία Σκαρμούτσου για την επεξήγηση της πειραματικής διαδικασίας που εκπονήθηκε στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της και την καθοδήγηση για να μπορέσω να ερμηνεύσω το πλήθος των τεχνικών χαρακτηρισμών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των συντιθέμενων μαγνητικών νανοδομών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, την κοπέλα που έχω δίπλα μου και όσους με στήριξαν το διάστημα που πραγματοποιούσα τη μελέτη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται ως μία από τις ασθένειες με τα μεγαλύτερα ποσοστα θνησιμότητας παγκοσμίως, με τις δυνατότητες αντιμετώπισής του να βρίσκονται ακόμα σε πρώιμο στάδιο. Οι κύριες μορφές θεραπείας που χρησιμοποιούνται είναι η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και η χειρουργική επέμβαση. Η ανάπτυξη του τομέα της νανοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια, σε συνδυασμό με τις μοναδικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, έδωσε τη δυνατότητα έρευνας και ανάπτυξης εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης του καρκίνου. Το μικρό τους μέγεθος στην κλίμακα του νανομέτρου, το μεγάλο εμβαδόν της επιφανείας τους, η δυνατότητα διαχείρησης τους από απόσταση και οι σχεδόν μηδενικές παρενέργειες καθιστούν τα μαγνητικά νανοσωματίδια πολύ αποτελεσματικά για την εφαρμογή τους στην βιοϊατρική, στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου ειδικότερα. Με κατάλληλες τροποποιήσεις της επιφάνειας των νανοσωματιδίων, μπορούν να προσδεθούν σε αυτά είτε παράγοντες για τη διάγνωση καρκινικών όγκων, είτε φάρμακα, τα οποία εγχύονται κατευθείαν πάνω στον όγκο. Τα σωματίδια χορηγούνται με ένεση στον οργανισμό, κινούνται μέσω του κυκλοφοριακού συτήματος και κατευθύνονται με εξωτερικό μαγνητικό πεδίο στο όργανο-στόχο (στοχευμένη θεραπεία). Επίσης, μέσω εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, μπορεί να προκληθεί αύξηση της θερμοκρασίας των νανοσωματιδίων (στους 45°C περίπου), με αποτέλεσμα την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων χωρίς να επηρεάζονται τα υγιή. Οι πρόσφατες προσεγγίσεις χρησιμοποιούν νανοσωματίδια για τη μεταφορά των φαρμάκων με υψηλή ακρίβεια στο στόχο, στο χρόνο και στην ποσότητα που απαιτείται, μειώνοντας τις παρενέργειες και το κόστος των θεραπειών. Υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια, με κατάλληλη επιφανειακή χημεία, έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά σε πολυάριθμες και πολλά υποσχόμενες in vivo εφαρμογές, όπως αναγέννηση (αναδόμηση/ανάπλαση) ιστών, υπερθερμία, απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI), μεταφορά φαρμάκων και διάγνωση καρκίνου και άλλων ασθενειών (διαβήτη, καρδιακές παθήσεις, Alzheimer και Parkinson, νευρολογικές παθήσεις).

Στόχος της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη και ανάλυση των διαφορετικών τεχνικών χαρακτηρισμού που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της ανάπτυξης βιοσυμβατών μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου γ-Fe₂O₃, ικανά να περικλείουν και να μεταφέρουν φαρμακευτικές ουσίες, μη διαλυτές σε υδατικά μέσα (π.χ., βιολογικά υγρά), με εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Τα σωματίδια γ- Fe₂O₃ περιέχουν ένα μαγνητικό πυρήνα, επικαλυμμένο με οργανόφιλο στρώμα, το οποίο συγκρατεί τη φαρμακευτική ουσία, και εξωτερικά περιβάλλονται από ένα υδρόφιλο στρώμα που προσδίδει διαλυτότητα στο νερό, βιοσυμβατότητα, προστασία των σωματιδίων από τα φαγοκύτταρα του ενδοθηλιακού συστήματος και αυξάνει το χρόνο ημιζωής στο κυκλοφορικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, οργανόφιλα μαγνητικά σωματίδια παρέχουν τη δυνατότητα στα υλικά να εγκλωβίσουν φαρμακευτικές ουσίες που παρουσιάζουν προβλήματα διαλυτότητας στο Η2Ο. Υδρόφιλα μαγνητικά σωματίδια μπορούν να εγκλωβίσουν φαρμακευτικές ουσίες, παράγοντες υπερθερμίας (επικάλυψη με χρυσό Au ή άλλα στοιχεία) και να συζευχθούν με γονίδια ή πεπτίδια για τον εντοπισμό καρκινικών όγκων στα κύτταρα και στους ιστούς. Τέλος, αμφίφιλα μαγνητικά σωματίδια, παραμένουν διαλυτά και διασπειρόμενα σε οργανικό διαλύτη και ταυτόχρονα διαλυτά σε H₂O και δύνανται να εγκλωβίσουν φάρμακα στην οργανόφιλη φάση τους και να μεταφερθούν, μαζί με το περιεχόμενο φάρμακο, στην υδατική φάση.

Στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου, απαιτούνται νανοσωματίδια με υψηλές τιμές μαγνήτισης και μέγεθος <100 nm, με ομοιόμορφη κατανομή, και να παρουσιάζουν κατάλληλες φυσικές και χημικές ιδιότητες. Επιπλέον, η ειδική επιφανειακή επικάλυψη των μαγνητικών σωματιδίων, όχι μόνο πρέπει να είναι μη τοξική και βιοσυμβατή, αλλά επιπλέον να επιτρέπει τη στοχευόμενη μεταφορά των σωματιδίων.

πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δεδομένων Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χαρακτηρισμού που συλλέγονται από πλήθος τεχνικών χαρακτηρισμού, με στόχο να ελεγχθεί κατά πόσο η προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων διαφορετικής φύσης και σε διαφορετικές αναλογίες επηρεάζει τη δομή και τις ιδιότητες των μαγνητικών νανοσωματιδίων. Αναλύθηκαν τα δεδομένα της δομής, μορφολογίας, επιφανειακής χημείας και των μαγνητικών ιδιοτήτων οργανόφιλων, υδρόφιλων και αμφίφιλων νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν μέσω γημικής σύνθεσης σε οργανικό διαλύτη. Επίσης, ερμηνεύτηκαν τα αποτελέσματα μετρήσεων μαγνητικής υπερθερμίας, υδροδυναμικού μεγέθους και ζ-δυναμικού, ώστε να προσδιοριστεί ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας και η τάση συσσωμάτωσης που εμφανίζουν τα νανοσωματίδια στη μεταβολή των συνθηκών θερμοκρασίας και pH (αύξηση μεγέθους-φραγμός αρτηριών). Τέλος, χαρακτηρίστηκαν τα φάσματα που ελήφθησαν για τη μελέτη της επιφανειακής χημείας, μορφοποιημένων υδρόφιλων νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν για να εγκλωβίσουν και μεταφέρουν στον κατάλληλο στόχο φάρμακα, όπως η δοξορουβυκίνη (dxorubicin, DOX). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μορφοποίηση, περιελάμβανε αφενός τη σύνδεση τροποποιημένης λυσίνης στην επιφάνεια των σωματιδίων, και τροποποιημένης mPEG, συνδεδεμένης με μαλεαμίδιο, στις δραστικές ομάδες των μαγνητικών νανοσωματιδίων. Στη συνέχεια, συνδέεται φολικό οξύ στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, ώστε να επιτευχθεί η στοχευμένη θεραπεία.

Πραγματοποιήθηκε ερμηνεία και ανάλυση δεδομένων από πληθώρα τεχνικών χαρακτηρισμού, όπως **XRD**, **TEM**, **SEM**, **NMR**, **FT-IR**, **XPS**, **DLS** και VSM, έτσι ώστε να λάβουμε μια όσο το δυνατόν καλύτερη γνώση των ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών του κάθε υλικού.

<u>Περαιτέρω έρευνες</u> περιλαμβάνουν εναλλακτικές και με μεγαλύτερη ανάλυση τεχνικές χαρακτηρισμού των νανοσωματιδίων (κυρίως του μεγέθους τους), τον εγκλωβισμό αντικαρκινικών φαρμάκων σε αυτά και μελέτη της συμπεριφοράς τους και της αποδέσμευσης του περιεχομένου τους *in vivo*.

vi

ABSTRACT

Cancer is considered among the diseases with the highest mortality rates worldwide, while the potentials of its confrontation being still in a premature stage. The most common types of cure applied include chemotherapy, radiotherapy and surgery. However, developments in the field of nanotechnology in the last few years, combined with the unique properties of nanoparticles, have led to the research of alternative ways for defeating cancer. The small size of the particles in the scale of nanometers, the large surface area, the ability of controlling them by distance and their almost zero side effects render magnetic nanoparticles very efficient for their application in biomedicine and in the diagnosis and treatment of cancer in particular. With appropriate modifications of the surface of the nanoparticles, it is possible to attach onto them either contrast agents for the diagnosis of tumors, or drugs for therapy, which are injected and driven directly to the tumor. The nanoparticles are injected into the human body, move through the circulatory system and directed by an external magnetic field to the target organ (targeted therapy). Furthermore, the external magnetic field, may cause increase in the temperature of the nanoparticles (at about 45°C), resulting in the destruction of cancer cells without affecting the healthy ones. Recent approaches involve using nanoparticles to deliver the drug with high accuracy in order, in time and in the quantity required, reducing the side effects and the cost of treatment.

Superparamagnetic nanoparticles, with appropriate surface chemistry, are used in numerous experimental and promising *in vivo* applications, such as tissue regeneration, hyperthermia, magnetic resonance imaging (MRI), drug delivery and diagnosis, such as cancer and other diseases (diabetes, heart disease, Alzheimer and Parkinson disease, and in general, neurological disorders).

The aim of this thesis is the characterization and analysis of techniques used to monitor the synthesis and modification of **biocompatible magnetic nanoparticles of iron oxide** γ -Fe₂O₃, able to enclose and deliver drugs, insoluble in aqueous media (e.g., biological fluids) by applying an external magnetic field. The γ - Fe₂O₃ particles contain a magnetic core, coated with an organophilic layer, which retains the drug and externally it is surrounded by a hydrophilic layer, which imparts water solubility, biocompatibility, protection of the particles from the phagocytes of the endothelial system and increases the half-life time in the circulatory system. More specific, organophilic magnetic particles enable several materials to entrap drugs that present solubility problems in H_2O . Hydrophilic magnetic particles can enclose drugs, factors used in hyperthermia (Au coated with gold or other elements) and coupled with genes or peptides for detecting tumor cells and tissues. Amphiphilic magnetic nanoparticles remain soluble and dispersible in organic solvents and H₂O. The amphiphilic particles may entrap drugs in organophilic phase and later on transferred to the aqueous phase. The diagnosis and treatment of cancer require nanoparticles with high magnetization and size <100 nm, with a uniform distribution, so as to exhibit suitable physical and chemical properties. Furthermore, the specific surface coating of the magnetic particles not only should be non-toxic and biocompatible, but additionally has to allow the targeted transfer of particles.

In this diploma thesis, interpretation and analysis were conducted, of data obtained by characterization techniques, in order to check in which way the modification of nanoparticles by surfactants of different nature and proportions, affects their structure and properties. Data of the structure, morphology, surface chemistry and magnetic properties were analyzed, for organophilic, hydrophilic and amphiphilic nanoparticles, prepared by chemical synthesis in organic solvent. Furthermore, the results of magnetic hyperthermia, hydrodynamic size and zpotential measurements were defined, in order to determine the rate of temperature increase and the tendency to aggregate exhibiting nanoparticles on changing temperature and pH (increasing size may cause block of arteries). Finally, characterization of spectrums was held, extracted by modified hydrophilic nanoparticles, in a way to be suitable for particular drug entrapment and delivery (doxorubicin-DOX). The process of functionalization included the connection of a modified lysine to the particle surface and secondly, the bonding of modified mPEG, coupled with maleamide. Then, folic acid was ligated to the nanoparticles, in order to achieve targeted treatment. Data for interpretation in this study were provided by plenty of characterization techniques, such as XRD, TEM, SEM, NMR, FT-IR, XPS, DLS and VSM, in order to reassure the best possible knowledge of the properties and characteristics of each material.

<u>Further investigations</u> include alternative and with higher resolution characterization techniques for the nanoparticles (mainly about the size), **entrapping anticancer drugs on the nanoparticles and study the** *in vivo* behavior and release of their content.

<u>HEPIEXOMENA</u>

	Σελ
Θεωρητικό Μέρος	
Κεφάλαιο 1	
Υλικά και Ιδιότητες νανοσωματιδίων	
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Κατηγορίες υλικών για τη σύνθεση νανοσωματιδίων	3
1.3 Μαγνητικές ιδιότητες	4
1.4 Βιοδιασπασιμότητα	6
1.5 Τοξικότητα	6
Κεφάλαιο 2	
Επιφανειακή Τροποποίηση Υπερπαραμαγνητικών Νανοσωματιδίων	
2.1 Εισαγωγή	7
2.2 Συνθετικά πολυμερή	10
2.3 Πολυαιθυλενογλυκόλες(PEG)	10
2.4 Πολυμερικές δεξτράνες	11
2.5 Ανόργανα μόρια	11
2.6 Χιτοζάνη(Chitosan)	12
2.7 Επιφανειοδραστικές ενώσεις	
Α) Ελαϊκό οξύ	12
B) Μερκαπτο-ενδεκανοϊκό οξύ	13
Γ) Φολικό οξύ	13
Κεφάλαιο 3	
Μέθοδοι Σύνθεσης Μαγνητικών Νανοσωματιδίων	
3.1 Εισαγωγή	15
3.2 Χημική σύνθεση σε διαλύματα	15
3.2.1 Μέθοδος συγκαταβίθυσης	17
3.2.2 Μέθοδος μικρογαλακτωμάτων	18
3.2.3 Μέθοδος πολυόλης	20
3.2.4 Θερμόλυση	21
Κεφάλαιο 4	
Βιοϊατρικές Εφαρμογές	
4.1 Εισαγωγή	23
4.2 Στοχευμένη θεραπεία (Drug Delivery)	24
4.3 Απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI)	27
4.4 Μαγνητική υπερθερμία	28
4.5 Αποτοξίκωση βιολογικών υγρών	29
4.6 Αναδόμηση γενετικών ιστών	30
4.7 Γονιδιακή θεραπεία	30
Κεφάλαιο 5	
Τεχνικές Χαρακτηρισμού Μαγνητικών Νανοσωματιδίων	
5.1 Δομικός Χαρακτηρισμός	31
5.2 Μορφολογικός Χαρακτηρισμός	32

5.2.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmitance Electron Microscopy - TEM)	32
5.2.2 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης(Scanning Electron Microscopy - SEM)	33
5.3 Χαρακτηρισμός επιφανειακής τροποποίησης	33
5.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering - DLS)	34
5.5 Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός (Z-potential)	35
5.6 Χαρακτηρισμός Μαγνητικών Ιδιοτήτων	36
5.7 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance -	36
NMR)	
5.8 Μαγνητική υπερθερμία	38
5.9 Φασματοσκοπία Φωτοηλεκτρονίων Ακτίνων Χ (XPS)	40
Πειραματικό Μέρος	
Κεφάλαιο 6	
Περιληπτική Πειραματική Διαδικασία Σύνθεση Μαγνητικών Νανοσωματιδίων	
6.1 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων	42
6.1.1 Υλικά	42
6.1.2 Σύνθεση οργανόφιλων σωματιδίων	43
6.1.3 Σύνθεση υδρόφιλων σωματιδίων	43
6.1.4 Σύνθεση αμφίφιλων σωματιδίων	44
6.2 Επιφανειακή μορφοποίηση μαγνητικών νανοσωματιδίων	44
6.2.1 Αποπροστασία της Lysine-Boc-Fmoc από το Boc	45
6.2.1.1 Σύνδεση της Lys-NH2 στα νανοσωματίδια	46
6.2.2 Τροποποίηση mPEG-NH2 για προστασία των νανοσωματιδίων	48
6.2.3 Σύνδεση φολικού οξέος	52
Κεφάλαιο 7	
Πειραματικά Αποτελέσματα-Συζήτηση Αποτελεσμάτων	
7.1 Δομικός Χαρακτηρισμός	54
7.1.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)	56
7.1.2 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (ΤΕΜ)	56
7.2 Χαρακτηρισμός Επιφανειακής Χημείας των νανοσωματιδίων	58
7.3 Χαρακτηρισμός δεδομένων XPS	60
7.4 Χαρακτηρισμός Μαγνητικών Ιδιοτήτων	61
7.4.1 Μαγνητική Υπερθερμία	63
7.5 Χαρακτηρισμός Υδροδυναμικού Μεγέθους και Ζ-Δυναμικού	64
7.6 Χαρακτηρισμός Επιφανειακής Μορφοποίησης μαγνητικών νανοσωματιδίων	67
Συμπεράσματα	74
Βιβλιογραφία	79

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

1.1 Εισαγωγή

Η νανοτεχνολογία είναι ένα πεδίο που έχει αρχίσει να αναπτύσσεται τα τελευταία χρόνια ραγδαία, και περιγράφει τη δημιουργία και χρήση δομών μεγέθους μεταξύ 1 και 100 nm, της τάξεως δηλαδή 10⁻⁹ m. Οι δομές αυτής της τάξης μεγέθους διαφέρουν σημαντικά σε ιδιότητες και εφαρμογές από τα υλικά μεγαλύτερης κλίμακας. Τα υλικά γενικά αποτελούνται από κόκκους που προσδιορίζουν τη φύση, τη δομή, τις ιδιότητες, τις αντοχές και κατά συνέπεια τις εφαρμογές αυτών. Όσο το μέγεθος του κόκκου μειώνεται, υπάρχει μια σημαντική αύξηση στο κλάσμα όγκου των ορίων του κόκκου ή των διεπιφανειών. Αυτό το χαρακτηριστικό επηρεάζει σημαντικά τις χημικές και φυσικές ιδιότητες του υλικού. Όμως και άλλες ιδιότητες του υλικού επηρεάζονται από το μέγεθος των κόκκων όπως ηλεκτρικές, μαγνητικές, οπτικές.

Νανοσωματίδιο ονομάζεται κάθε σωματίδιο με μέγεθος περίπου 100 nm, με μέγιστο όριο τα 500 nm. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω σε αυτό το μέγεθος οι ιδιότητες αλλάζουν. Τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν νέες ή βελτιωμένες ιδιότητες που στηρίζονται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπως τη μορφολογία ή τη φάση ή ακόμα και το μέγεθος τους [1].

Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι για τη σύνθεση και τον έλεγχο των ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων, οι οποίες εξαρτώνται τόσο από το είδος του υλικού όσο και από τη χρήση για την οποία αυτό προορίζεται. Οι μέθοδοι σύνθεσης των νανοσωματιδίων χωρίζονται ως εξής [2-9]:

- Μέθοδος στερεάς κατάστασης ή μηχανικές διεργασίες (Solid state method or mechanical processes)
- Μέθοδοι ατμού (Vapour methods)
- Χημική σύνθεση ή υγρές χημικές διεργασίες (Chemical synthesis or wet chemical processes)
- Μέθοδοι σύνθεσης από αέρια φάση (Gas synthesis methods)

Κάθε μια από τις παραπάνω κατηγορίες περιλαμβάνει συγκεκριμένες μεθόδους οι οποίες ανάλογα με την επιλογή των υλικών και τη χρήση των νανοσωματιδίων παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα έναντι των άλλων μεθόδων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναλύθηκαν τα δεδομένα που ελήφθησαν από τις τεχνικές χαρακτηρισμού και εκτιμήθηκε η επίδραση των επιφανειοδραστικών ενώσεων στην τελική δομή , μορφολογία και στις ιδιότητες που εμφανίζουν τα μανγητικά νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν μέσω χημικής σύνθεσης σε διαλύτη πολύ-αιθυλενογλυκόλης (polyethylenglycol - PEG) μοριακού βάρους 600 Da, με τη μέθοδο της θερμόλυσης. Θερμόλυση είναι η θερμολυτική διάσπαση του ανόργανου άλατος του σιδήρου Fe(acac)₃ (Iron (III) acetylocetonate) σε ένα διαλύτη με υψηλό σημείο ζέσεως (PEG). Γενικά κατά τη σύνθεση νανοσωματιδίων από υγρές χημικές διεργασίες με επιθυμητές ιδιότητες, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι δομικές (κρυσταλλική ή άμορφη δομή, μέγεθος, σχήμα, μορφολογία) και οι χημικές ιδιότητες (σύνθεση του όγκου, της διεπιφάνειας και της επιφάνειας). Ο ρόλος της χημείας στην επιστήμη των υλικών αυξάνεται συνεχώς λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρουν οι χημικές μέθοδοι έναντι των φυσικών. Η χημική σύνθεση επιτρέπει τον χειρισμό της ύλης σε μοριακό επίπεδο και συνεπώς μπορεί να επιτευχθεί καλή χημική ομοιογένεια. Υπάρχουν όμως δυσκολίες που προκύπτουν κατά τις χημικές διεργασίες, όπως η δύσκολη και επικίνδυνη χημεία των ενώσεων σε ορισμένες περιπτώσεις. Υπάρχει επίσης πιθανότητα να παγιδεύονται κατά τη διαδικασία διάφορες ακαθαρσίες στο τελικό προϊόν, οι οποίες πρέπει να αποφεύγονται ή να ελαχιστοποιούνται προκειμένου να έχουμε τις επιθυμητές ιδιότητες. Τέλος, ένα πιθανό πρόβλημα που μπορεί να μεταβάλλει τις ιδιότητες (σε κάθε βήμα της σύνθεσης) του υλικού είναι η συσσωμάτωση. Η ανάπτυξη στερεών από διαλύματα είναι μια συνηθισμένη τεχνική για τη σύνθεση λεπτόκοκκων σωματιδίων. Η συνήθης διαδικασία περιλαμβάνει αντιδράσεις σε υδατικά και άνυδρα διαλύματα, που περιέχουν διαλυτά άλατα ή αιωρήματα. Μόλις το διάλυμα γίνει υπέρκορο, δημιουργείται ένα ίζημα είτε με ομογενή, είτε με ετερογενή πυρηνοποίηση. Εφόσον δημιουργηθεί ο σταθερός πυρήνας, η ανάπτυξη πραγματοποιείται συνήθως με διάχυση, κατά την οποία σημαντικό ρόλο παίζουν η θερμοκρασία και η συγκέντρωση των αντιδραστηριών [10].

Σημειώνεται ωστόσο, ότι τα λεπτόκοκκα σωματίδια, και ιδίως τα νανοσωματίδια, εξαιτίας των επιφανειακών περιοχών, συχνά συσσωματώνονται, σχηματίζοντας δευτερεύοντα σωματίδια, βάσει της τάσης τους να ελαχιστοποιήσουν την ολική επιφάνεια ή την επιφανειακή ενέργεια του συστήματος. Πολλά υλικά που περιέχουν νανοσωματίδια, παραμένουν χρήσιμα μόνο αν τα σωματίδια στο υγρό αιώρημα δεν δημιουργούν συσσωματώματα.

Γενικά, η χρήση των νανοϋλικών και των νανοσωματιδίων αυξάνεται τα τελευταία χρόνια, τόσο σε τεχνολογικές εφαρμογές, όσο και σε εφαρμογές στην ιατρική και στην οδοντιατρική. Η νανοτεχνολογία μπορεί να βρει εφαρμογές στους εξής κλάδους:

- Ηλεκτρονική και τηλεπικοινωνίες
- Υλικά και χημικές ενώσεις
- Φαρμακευτική και επιστήμες υγείας
- Αυτοκινητοβιομηχανία και αεροναυπηγική
- Βιομηχανία παραγωγής
- Ενέργεια
- Περιβάλλον
- Εξερεύνηση διαστήματος

Τα πεδία εφαρμογών δικαιολογούν την αυξημένη έρευνα και χρήση των νανοσωματιδίων με πολύ σημαντική την αύξηση στο τομέα της υγείας. Η δυνατότητα και η αυξημένη χρήση των νανο και μικροσωματιδίων συγκεκριμένα για την μεταφορά φαρμάκων στον οργανισμό πηγάζουν από συγκεκριμένα πλεονεκτήματα όπως:

1) Η δυνατότητα να στοχεύουν συγκεκριμένες περιοχές στο σώμα

2) Η μειωμένη ποσότητα του φαρμάκου που χρειάζεται να παρευρεθεί σε συγκεκριμένη συγκέντρωση στην περιοχή του στόχου

3) Η μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στις μη στοχευόμενες περιοχές [11], μειώνοντας επομένως τις σημαντικές επιπτώσεις.

Όλα αυτά δικαιολογούν τη γρήγορη αύξηση των δημοσιεύσεων που αφορούν τις εφαρμογές των νανοσωματιδίων για τη μεταφορά φαρμάκων. Στο Σχήμα 1.1 που ακολουθεί σχηματικά παρουσιάζεται η δομή και οι ενώσεις από τις οποίες αποτελούνται μαγνητικά νανοσωματίδια για τη στοχευμένη θεραπεία των ασθενειών.



Σχήμα 1.1: Μαγνητικό νανοσωματίδιο με προσδεδεμένους παράγοντες για διάγνωση και θεραπεία ασθενειών.

Γενικά είναι γνωστό, από την ανάπτυξη και άλλων τεχνολογιών, πως λανθασμένη χρήση της νανοτεχνολογίας στους τομείς εφαρμογής της, μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές επιπτώσεις τόσο στις βιομηχανίες όσο και στην κοινωνία. Οι επιπτώσεις όμως που ενδεχομένως μπορεί να προκύψουν, δεν πρέπει να μειώσουν το ενδιαφέρον των ερευνητών και της κοινωνίας για την νανοτεχνολογία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες ανατροπές και βελτίωση του βιοτικού επιπέδου των ανθρώπων. Μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες των νανοσωματιδίων είναι η δυνατότητα προσανατολισμού και κατεύθυνσή τους στο όργανο-στόχο με επιβολή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Οι μαγνητικοί νανοκρύσταλλοι προσελκύουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των μεταβαλλόμενων μαγνητικών ιδιοτήτων τους [12- 15] και των χρήσεων τους στην κατάλυση [16,17], στη μαγνητική καταγραφή [18], σε υψηλής ευκρίνειας ηλεκτρομαγνητικές [19] και spintronic συσκευές [20], για τον περιβαλλοντικό εξευγενισμό (environmental remediation) [21- 25] και σε βιοεφαρμογές, μέσω της απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού (MRI) [26-32], στον κυτταρικό και πρωτεϊνικό διαχωρισμό [33-36] και στη μεταφορά φαρμάκων [37]. Για τις περιβαλλοντολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές είναι απαραίτητη η χρήση μεγάλων ποσοτήτων μαγνητικών νανοσωματιδίων σταθερά διασπειρόμενων σε νερό.

Τα κύρια πλεονεκτήματα των μαγνητικών νανοσωματιδίων (οργανικών και ανόργανων) είναι ότι:

- Μπορούν να εντοπισθούν (υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια, χρησιμοποιούνται σε MRI)
- Μπορούν να καθοδηγηθούν και να παραμείνουν σε μία συγκεκριμένη θέση μέσω μαγνητικού πεδίου
- Μπορούν να θερμανθούν με εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, ώστε να απελευθερώσουν το φάρμακο ή να προκαλέσουν υπερθέρμανση των ιστών.

Βέβαια, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η τελευταία ιδιότητα δεν περιορίζεται μόνο στη χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων, αλλά και σε άλλα σωματίδια που μπορούν να απορροφήσουν υπέρυθρη ακτινοβολία, ακτινοβολία μικροκυμάτων και υπερηχητική ακτινοβολία [38].

1.2 Είδη/Κατηγορίες Υλικών που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση νανοσωματιδίων

Βάσει των στατιστικών του Αμερικανικού Ινστιτούτου Καρκίνου, περίπου 1.660.290 περιπτώσεις καρκίνου αναμένεται να διαγνωσθούν μέσα στο 2013. Μόνο στις ΗΠΑ, ο αριθμός των αναμενόμενων θανάτων από καρκίνο το 2013 ανέρχεται στις 580.350, περίπου 1.600 θάνατοι την ημέρα. Οι έρευνες αποδεικνύουν πως η ασθένεια του καρκίνου είναι εκείνη με τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας σε ανθρώπους παγκοσμίως, απαριθμώντας 7,6 εκατομμύρια θανάτων καρκίνου παρατηρήθηκαν το συγκεκριμένο έτος, με το 56% αυτών και το 63% των θανάτων να

περιορίζονται στις λιγότερο ανεπτυγμένες περιοχές του κόσμου. Οι πιο διαδεδομένες μορφές καρκίνου είναι αυτή του πνεύμονα (1,61 εκατομμύρια, 12,7% του συνόλου), του μαστού (1,38 εκατομμύρια, 10,9%) και του παχέος εντέρου (1,23 εκατομμύρια, 9,7%) [39].

Η διάγνωση καρκίνου με χρήση της νανοτεχνολογίας είναι ένα αναπτυσσόμενο πεδίο. Ανιχνεύοντας τον καρκίνο με μη βίαιους τρόπους έχει θετική επίδραση στον ασθενή με ποικίλους τρόπους. Για παράδειγμα, η «παθητική» διάγνωση μπορεί να αποτρέψει τη δειγματοληψία μέσω βιοψίας και να μειώσει το φυσικό βάρος που ασκείται στον ασθενή. Αυτού του είδους η θεραπεία αποτελεί το πιο εκτεταμένο πεδίο έρευνας στην περιοχή των εφαρμογών της τεχνολογίας μαγνητικών νανοσωματιδίων στη βιοϊατρική. Καθώς καινούριοι δείκτες της ασθένειας του καρκίνου ανακαλύπτονται, τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την επιθετικότητα και την αντοχή στα φάρμακα των καρκινικών κυττάρων ταυτοποιούνται. Η ανακάλυψη θεραπειών για τον καρκίνο αποτελεί κύριο μέλημα για τις εταιρείες παρασκευής φαρμάκων. Ο σχεδιασμός των φαρμάκων, ο έλεγχος της συμπεριφοράς τους *in vivo*, η λειτουργία και οι θεραπευτικές τους ιδιότητες σε πραγματικό χρόνο είναι κρίσιμα για την επίτευξη του καλύτερου δυνατού αποτελέσματος. Στην περίπτωση του καρκίνου λοιπόν, μια συνήθης διαδικασία είναι ο εντοπισμός συγκεκριμένων βιο-δεικτών στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και η χορήγηση αντίστοιχων ανιχνευτών στον οργανισμό, με στόχο την αναγνώριση του σημείου και του μεγέθους του όγκου [40].

Ως διαγνωστικοί-θεραπευτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται κυρίως:

- Νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (Iron Oxide Nanoparticles-IONPs)
- Νανοκρύσταλλοι εκπεμπόμενου φωτός (Quantum Dots-QDs)
- Νανοσωματίδια χρυσού (Gold Nanoparticles)
- Νανοσωλήνες άνθρακα (Carbon nanotubes)
- Νανοσωματίδια πυριτίου (Silica Nanoparticles)

Μέταλλα μεταπτώσεως (Fe, Co, Ni, Mn, Cr ή Gd), διμεταλλικά [όπως αυτά σιδήρου-κοβαλτίου (Fe_xCo_y), FeNi, NiCo, FePt] ή μαγνητικά κράματα συμπεριλαμβανομένων των Nd–Fe–B και Sm–Co, ή οξείδια των μετάλλων (όπως Fe₃O₄,γ-Fe₂O₃) μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης ως μαγνητικοί πυρήνες για την παρασκευη νανοσωματιδίων. Ωστόσο παράγοντες όπως η βιοσυμβατότητα και η τοξικότητα περιορίζουν την επιλογή των υλικών [41]. Για παράδειγμα, τα καθαρά μέταλλα παρόλο που παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο μαγνητικό κορεσμό, είναι ιδιαιτέρως τοξικά και οξειδώνονται εύκολα. Από την άλλη μεριά, τα βαριά μαγνητικά υλικά απαιτούν υψηλά εξωτερικά πεδία.

Μεταξύ των υλικών που αναφέρθηκαν, τα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου χρησιμοποιούνται ευρέως σε φαρμακευτικές εφαρμογές εξαιτίας των πολύ καλών μαγνητικών ιδιοτήτων τους, της μη-τοξικότητάς τους, της χημικής σταθερότητάς, της βιοδιασπασιμότητάς και μεγάλης βιοσυμβατότητας που παρουσιάζουν. Επίσης είναι μη καρκινογόνα, συνθέτονται και τροποποιούνται εύκολα και έχουν μεγάλη επιδραστική επιφάνεια (μπορούν να προσδεθούν με κατάλληλες τεχνικές παράγοντες διάγνωσης, απεικόνισης και θεραπευτικοί). Τέλος έχουν χαμηλή ευαισθησία στην οξείδωση [41].

1.3 Μαγνητικές Ιδιότητες

Στις βιοϊατρικές εφαρμογές, είτε αυτές αφορούν τη διάγνωση είτε τη θεραπεία, είναι απαραίτητη η καλή μαγνητική φύση και συμπεριφορά των νανοσωματιδίων. Ο λόγος είναι ότι με χρήση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (όσο υψηλότερη μαγνήτιση κορεσμού, τόσο χαμηλότερη ισχύς

πεδίου απαιτείται, επομένως μειώνονται οι παρενέργειες αποσυντονισμού του εγκεφάλου και των υπόλοιπων οργάνων) καθίσταται εφικτός ο προσανατολισμός και η μεταφορά τους ύστερα από τη χορήγηση στον οργανισμό (συνήθως ενέσιμα) στον προς εξέταση ή θεραπεία ιστό.

Οι μαγνητικές ιδιότητες των υλικών οφείλονται στην ιδιοπεριστροφή των ηλεκτρονίων (spin) και στην τροχιακή τους κίνηση γύρω από τον πυρήνα (τροχιακά). Η κίνηση του ηλεκτρικού φορτίου παράγει μαγνητικό πεδίο και έτσι τα ηλεκτρόνια δημιουργούν μαγνητικά δίπολα, τα οποία αντιδρούν κάτω από την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, ακριβώς όπως τα ηλεκτρικά δίπολα κάτω από την επίδραση εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Τα σωματίδια οξειδίων του σιδήρου συνήθως συμπεριφέρονται διαφορετικά στο εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο, εξαρτώμενα από το μέγεθός τους. Προηγούμενες μελέτες [42,43] αναφέρουν ότι απότομες αλλαγές στις μαγνητικές ιδιότητες συμβαίνουν όταν το μέγεθος των σωματιδίων μειώνεται από την κλίμακα των μικρόμετρων σε νανόμετρα.

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια για βιοϊατρικές εφαρμογές πρέπει να έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, με πιο βασικό τον υπερπαραμαγνητισμό. Η υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά συμβαίνει σε μαγνητικά υλικά τα οποία έχουν παρασκευασθεί από πολύ μικρούς κρυσταλλίτες (το όριο του μεγέθους εξαρτάται από τη φύση του υλικού π.χ. νανοσωματίδια που στηρίζονται στο Fe εμφανίζουν υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά σε μεγέθη << 25 nm [44]). Στα υπερπαραμαγνητικά υλικά, οι διακυμάνσεις της μαγνητικής κατεύθυνσης επηρεάζονται από όλο τον πληθυσμό των κρυσταλλιτών. Οι μαγνητικές ροπές ξεχωριστών κρυσταλλιτών αντισταθμίζονται με των υπολοίπων, με αποτέλεσμα η ολική μαγνητική ροπή να μηδενίζεται. Όταν εφαρμόζεται εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, η συμπεριφορά στι, αντί κάθε ξεχωριστό άτομο να επηρεάζεται ανεξάρτητα από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, η μαγνητική ροπή όλων των κρυσταλλιτών ευθυγραμμίζεται με το μαγνητικό πεδίο (Σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2: (a) Μαγνητικό νανσωματίδιο οξειδίου του σιδήρου τροποποιημένο με ενώσεις ώστε να καθίσταται κατάλληλο για βιοϊατρική χρήση και (b) συμπεριφορά υπερπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων σε εφαρμοζόμενο εξωτερικό πεδίο.

Σε μεγάλου μεγέθους νανοσωματιδία το ενεργειακό περιεχόμενο ευνοεί το σχηματισμό ομάδων (domain walls). Παρόλα αυτά, όταν το μέγεθος του σωματιδίου μειωθεί κάτω από μια ορισμένη τιμή, η δημιουργία ομάδων δεν ευνοείται, και κάθε σωματίδιο αντιπροσωπεύει μια ξεχωριστή ομάδα. Αυτό αποτελεί χρήσιμο χαρακτηριστικό των υπεραπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων. Η υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά των νανοσωματιδίων καθιστά ικανή τη σταθερότητα και τη διασπορά τους, μετά την απομάκρυνση του μαγνητικού πεδίου, καθώς δεν υπάρχει καθόλου εναπομένουσα μαγνητική δύναμη μεταξύ των σωματιδίων. Ως αποτέλεσμα του υπερπαραμαγνητισμού, τα σωματιδία παρουσιάζουν μηδενική υστέρηση, ισχυρότερες μαγνητικές ιδιότητες, μηδενικά υπολείμματα, μηδενική συνεκτικότητα, η περαιτέρω συσσωμάτωση αποφεύγεται και τα νανοσωματίδια παραμένουν σε κυκλοφορία χωρίς να αποβάλλονται από τα «φίλτρα» του οργανισμού όπως το συκώτι ή το ανοσοποιητικό σύστημα [41].

1.4 Βιοδιασπασιμότητα

Ένα απαραίτητο στοιχείο είναι η βιοαποδόμηση ή η ανέπαφη έκκριση του μαγνητικού πυρήνα. Συνεπώς, υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων τους σιδήρου θεωρούνται βιοδιασπώμενα, καθώς ο σίδηρος ανακυκλώνεται από τα κύτταρα, ακολουθώντας βιοχημικές μεθόδους για το μεταβολισμό του Fe [45,46] και ο περισσευούμενος μπορεί να αποθηκευτεί για περαιτέρω βιολογικές ανάγκες. Στην περίπτωση που ο πυρήνας δεν είναι βιοδιασπώμενος απαιτείται επικάλυψη για να αποφεύγεται η έκθεση (και η πιθανή διήθηση) του μαγνητικού πυρήνα, ώστε να επιτευχθεί έκκριση μέσω των νεφρών. Επομένως, ο χρόνος ημιζωής του μέσου στο αίμα καθορίζεται από το ρυθμό σφαιρόμορφης διήθησης (π.χ. παράγοντες αντίθεσης βασισμένοι στο γαδολίνιο) [46].

1.5 Τοξικότητα

Η τοξικότητα είναι το λιγότερο κατανοητό χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων όσον αφορά την εφαρμογή τους για την *in vivo* απεικόνιση ιστών ή κυττάρων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως από τη στιγμή που θα εισέλθουν στον οργανισμό, η τοξικότητα μπορεί να προκύψει τόσο από τα σωματίδια καθεαυτά, όσο και από τα συνδεδεμένα σε αυτά υλικά κατά την αποδόμησή τους [47]. Επίσης έχει παρατηρηθεί πως η τοξικότητα των νανοσωματιδίων μπορεί να οφείλεται και σε παράγοντες όπως η συγκέντρωση, το υδροδυναμικό μέγεθος, η φόρτιση της επιφάνειας και το είδος των υλικών που χρησιμοποιούνται για επικάλυψη. Η δημιουργία συσσωματωμάτων μεταξύ των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (iron oxide nanoparticles - IONPs) μπορεί επίσης να προκαλέσει προβλήματα όπως το φράξιμο αρτηριών. Άλλος περιορισμός των ΙΟNPs είναι η πρόσληψή τους από τα φαγοκύτταρα (καθαρίζοντας γρήγορα το αίμα) και μεγάλες ποσότητες είναι δυνατό να προκαλέσουν ανισορροπία στην ομοιο-σύσταση και να οδηγήσουν σε τοξικότητα [48].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΕΡΠΑΡΑΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Η συμπεριφορά των μαγνητικών νανοσωματιδίων (magnetic nanoparticles - MNPs) *in vivo* εξαρτάται από διάφορους φυσικούς και χημικούς παράγοντες:

Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια έχουν υδροφοβικές επιφάνειες και μεγάλη αναλογία επιφάνειαςόγκου. Εξαιτίας των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σωματιδίων, των δυνάμεων van der Waals που αναπτύσσονται και των μαγνητικών διπολικών αλληλεπιδράσεων αυτά παρουσιάζουν μικρή διασπορά σε υδατικούς και οργανικούς διαλύτες και συσσωματώνονται σχηματίζοντας μεγαλύτερα συμπλέγματα ώστε να μειώσουν την επιφανειακή τους ενέργεια. Αυτό οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων, απώλεια των υπερ-παραμαγνητικών ιδιοτήτων και σε δυσκολία εισόδου στα καρκινικά κύτταρα καθώς και στην πιθανότητα σχηματισμού θρομβώσεων στο κυκλοφοριακό σύστημα και στα τριχοειδή αγγεία [1,2,3]. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να υπερκαλυφθεί με χρήση κατάλληλων παραγόντων επικάλυψης της επιφάνειας των σωματιδίων.

Οξείδωση

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια, λόγω της μεγάλης αναλογίας επιφάνειας-όγκου είναι ευάλωτα σε οξειδωτικά και διαβρωτικά περιβάλλοντα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να καθίστανται τα νανοσωματίδια ακατάλληλα για βιοϊατρικές εφαρμογές, το οποίο επιλύεται με την επιφανειακή τροποποίηση τους, ώστε να προστατεύονται από την οξείδωση [4,5,6]. Αντίθετα, σωματίδια οξειδίου του σιδήρου παρουσιάζουν αντοχή στην οξείδωση, αλλά λόγω της ύπαρξης του Fe²⁺ στο Fe₃O₄ είναι πιθανή η οξείδωση και μετατροπή τους σε α-Fe₂O₃, που τα καθιστά μη μαγνητικά.

- Τοξικότητα

Σχεδόν όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή νανοσωματιδίων είναι τοξικά με αποτέλεσμα να μην μπορουν να χορηγηθούν απευθείας στον οργανισμό [2,7]. Η επικάλυψη της επιφάνειας των νανοσωματιδίων με πολύ-βινυλοαλκοόλη [poly(vinyl alcohol)-PVA] έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση της τοξικότητας όπως απέδειξαν η ομάδα του Mahmoudi (πειράματα σε κύτταρα ποντικών και ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα) [8,9] και η ομάδα του Karlsson (πειράματα σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου πνεύμονα) [10].

Χαρακτηριστικά επιφάνειας (καθορίζουν τη βιοσυμβατότητα)

Η επιφάνεια των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου περιλαμβάνει πολλές υδροξυλικές ομάδες, καθιστώντας δύσκολη την πρόσδεση οργανικών υλικών. Το πρόβλημα αυτό παρακάμπτεται με τη χρήση πολυμερών που δεσμεύουν τα ελεύθερα υδροξύλια και λειτουργούν ως μήτρα για την πρόσδεση φαρμάκου, νουκλεϊδίων ή γενετικού υλικού [11-13].

- Χρόνος ημιζωής

Τα νανοσωματίδια πρέπει να μπορούν να μείνουν για αρκετό διάστημα στον οργανισμό προτού γίνουν αντιληπτά από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού, προκειμένου να φτάσουν στα προς στόχευση όργανα. Η επικάλυψη με PEG ή Dextran οδηγεί σε άυξηση του χρόνου ημιζωής των σωματιδίων εντός του οργανισμού. Άλλοι παράγοντες που καθορίζουν τη χρήση των νανοσωματιδίων και αποτελούν λόγους για την επιφανειακή τροποποίησή τους είναι η φυσικοχημική σταθερότητα, η φόρτιση της επιφάνειας και το πάχος.

Είναι λοιπόν εμφανές πως τα γυμνά υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου δεν μπορούν απευθείας να χρησιμοποιηθούν στις *in vivo* εφαρμογές. Η τροποποίηση της

επιφάνειας τους με οργανικές ή ανόργανες ουσίες είναι πολύ σημαντική, η οποία θα σταθεροποιεί τα υπεραπαραμαγνητικά νανοσωματιδία οξειδίων του σιδήρου i) με ηλεκτροστατική απώθηση (δημιουργώντας διπλή ηλεκτρική στοιβάδα γύρω από τον πυρήνα των σωματιδίων), ii) με στερική απώθηση, iii) με συνδυασμό και των δυο τρόπων ώστε να δημιουργηθούν σταθερά κολλοειδή [14]. Επίσης, η κατάλληλη επικάλυψη είναι απαραίτητη όπως αναφέρθηκε, για τη βιοσυμβατότητα των υπερπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων του σιδήρου.

Τελευταίες έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα κύτταρα αναρροφούν μαζικά τα γυμνά υπερπαραμαγνητικά νανοσωματιδία του σιδήρου με ενδοκύττωση, το οποίο μπορεί να προκαλέσει θάνατο των κυττάρων [15,16]. Όταν τα υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου χορηγούνται στον ανθρώπινο οργανισμό, τα σωματίδια θα απορροφήσουν πρωτεΐνες του πλάσματος in opsonisation λόγω της υδροφοβικής επιφάνειάς τους. Επομένως τα σωματίδια θα αναγνωριστούν από τα μακροφάγα και θα απομακρυνθούν από τον οργανισμό. Η επιφανειακή χημεία των νανοσωματιδίων είναι ιδιαίτερα σημαντική για να αποφεύγεται η δράση (εγκλωβίζουν τα σωματίδια) του δικτυοενδοθυλιακού συστήματος (Reticulo-endothelial system -RES), που είναι μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος, και να αυξάνει ο χρόνος ημιζωής στο κυκλοφοριακό σύστημα του οργανισμού. Επικάλυψη των νανοσωματιδίων με ουδέτερα και υδρόφιλα στοιχεία αυξάνει το χρόνο ημιζωής από μερικά λεπτά σε μερικές ώρες. Παρόλα αυτά δεν είναι δυνατόν όλη η ποσότητα των νανοσωματιδίων να φτάσει στον στόχο της, διότι δεν είναι δυνατή η πλήρης αποφυγή από τα φαγοκύτταρα και το ανοσοποιητικό σύστημα. Έγει παρατηρηθεί ότι κάποια ποσότητα νανοσωματιδίων μεταναστεύει σε άλλες περιοχές με πιθανή δημιουργία τοξικολογικών προβλημάτων στον ανθρώπινο οργανισμό. Εκτός από την προστασία από το ανοσοποιητικό σύστημα, η επικάλυψη των νανοσωματιδίων είναι ιδιαιτέρως σημαντική και για την πρόσδεση στην επιφάνεια βιοενεργών μορίων με συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες του επικαλυπτόμενου στρώματος. Βιομόρια όπως μονοκλονικά αντισώματα, πρωτεΐνες σύνδεσμοι/ υποδοχείς ligands, λιπαρά οξέα, πολυπεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια ή ένζυμα μπορούν να συζευχθούν στα σωματίδια οξειδίων του σιδήρου ως σύνδεσμοι με συγκεκριμένο στόχο, ώστε να διευκολύνεται η αναγνώριση συγκεκριμένων κυττάρων/ ιστών. Κύτταρα τα οποία έχουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς που δέχονται μόνο συγκεκριμένους φορείς – στόχους, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων/ γονιδίων ή στην θεραπεία μέσω τοπικής υπερθερμίας.

Για την επιφανειακή επικάλυψη των νανοσωματιδίων ακολουθούνται δύο κυρίως τεχνικές,η επικάλυψη *in situ* (πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης) και η επικάλυψη μετά τη σύνθεση. Η τεχνική *in situ* παρουσιάζει πλεονεκτήματα έναντι της τροποποίησης μετά τη σύνθεση, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης εμφάνισης συσσωματωμάτων (λόγω της πραγματοποίησης λιγότερων αντιδράσεων και της άμεσης επικάλυψης των σωματιδίων). Ωστόσο, η παρουσία πολυμερών κατά το σχηματισμό και ανάπτυξη των νανοκρυστάλλων, έχει σοβαρή επίδραση στην κρυσταλλική δομή και μορφολογία των MNPs που παραλαμβάνονται με τις διαδικασίες αυτές [50].

Η τροποποίηση υδρόφοβων επιφανειών, με την οποία αποδίδεται στα νανοσωματίδια λειτουγικότητα, υδροφιλικότητα ή/και βιοσυμβατότητα πραγματοποιείται τις περισσότερες φορές με δύο βασικές διεργασίες που είναι γνωστές ως μέθοδος της ανταλλαγής και της προσθήκης.



Σχήμα 2.1: Σχηματική απεικόνηση τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων με επιφανειοδραστικά μόρια με τη μέθοδο της ανταλλαγής (A) και της προσθήκης (B) [17].

Οı επικεντρώνονται έρευνες κυρίως στον προσδιορισμό των πιο κατάλληλων επιφανειοδραστικών ενώσεων. Αυτές είναι οργανικές ενώσεις στις οποίες στην άκρη της αλυσίδας τους υπάρχει μια ενεργή ή ιονική ομάδα και μπορούν να ελέγχουν την ανάπτυξη των σωματιδίων, να προσδίδουν στα σωματίδια διαλυτότητα και να καθορίζουν το σχήμα τους. Πιο σημαντική επικάλυψη, από τις ήδη χρησιμοποιούμενες ενώσεις, φαίνεται πως είναι οι πολυαιθυλενογλυκόλες (PEG), ένας γραμμικός ουδέτερος πολυαιθέρας. Οι PEG μεγάλου μοριακού βάρους όταν συνδέονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων παρουσιάζουν το φαινόμενο αόρατης ασπίδας [διαμορφώνουν την επιφάνεια των νανοσωματιδίων με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι αόρατα ως προς το ανοσοποιητικό σύστημα (stealth shielding effect)], δικτυοενδοθυλιακού καθυστερώντας τη δράση του συστήματος [18]. Λόγω της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν στις πρωτεΐνες και στο συνδυασμό της χαμηλής διεπιφανειακής ενέργειας στο νερό και στο φαινόμενο στερικής σταθερότητας [19], οι PEG παρουσιάζουν μικρή τοξικότητα, ενώ τα νανοσωματίδια τελικά δύναται να εκκριθούν ανέπαφα από τα νεφρά ή μέσω των περιττωμάτων. Δυστυχώς, η λειτουργία των σωματιδίων που τροποποιούνται με τις PEG για να είναι αόρατα για το ανοσοποιητικό σύστημα, χάνεται σχεδόν ταυτόχρονα με την απώλεια της στοχευμένης βιομοριακής δυνατότητας τους.

Η τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων, εκτός από τις ενώσεις PEG μπορεί να πραγματοποιηθεί και με άλλους σταθεροποιητές. Στην κατηγορία των πολυμερικών σταθεροποιητών ανήκουν επίσης βιοσυμβατά συμπολυμερή της οικογένειας των pluronics, τα οποία αποτελούνται από PEO (Poly Ethylene Oxide, υδρόφιλες αλυσίδες) και PPO (Poly Propylene Oxide, υδρόφοβες αλυσίδες) πολυμερικές αλυσίδες. Πριν από αυτής της φύσης επικάλυψη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη πολυμερικού οργανικοί σταθεροποιητές, όπως ελαϊκό οξύ και η παρόμοια επιφανειοδραστική ένωση στειρικού (stearic) οξέος, που οδηγούν σε προοδευτική σταθερότητα των νανοσωματιδίων. Παράγωγα σιλανίου (SiH₄) μπορούν επίσης να χρησιμοποιήθούν για την τροποποίηση της επιφανείας των οξειδίων του σιδήρου απευθείας λόγω των πλεονεκτημάτων της βιοσυμβατότητας και των πολλών λειτουργικών ομάδων που φέρουν στα άκρα της επιφανείας τους, παρέχοντας τη δυνατότητα περαιτέρω πρόσδεσης και άλλων μορίων όπως μέταλλα, πολυμερή ή βιομόρια [20,21]. Η τελευταία τροποποίηση που γίνεται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων είναι με χρήση εξωτερικού μεταλλικού περιβλήματος από ανόργανα υλικά.

2.2 Συνθετικά Πολυμερή

συχνά χρησιμοποιούμενα πολυμερή για επιφανειακή επικάλυψη, Τα πιο είναι οι πολυαιθυλενογλυκόλες (PEG), τα πολυαιθυλενοξείδια (PEO) και οι πολυβινυλοαλκοόλες (PVA). Για τις PEG γίνεται αναφορά παρακάτω. Τα πολυαιθυλενοξείδια (PEO) είναι γνωστά βιοσυμβατά, υδρόφιλα και μη-βιοδιασπώμενα πολυμερή. Συμπολυμερή που περιέχουν ΡΕΟ αλυσίδες (pluronics), χρησιμοποιούνται ως υλικά επικάλυψης στα υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου με στόχο τη σταθεροποίησή τους, εκμεταλλευόμενα την υδροφιλικότητα τους και την αντοχή τους στην απορρόφηση πρωτεϊνών, ώστε να αυξάνεται ο χρόνος κυκλοφορίας του σωματιδίου στο αίμα. Οι Harris et al., παρασκεύασαν ένα triblock συμπολυμερές, το οποίο περιέχει δυο ΡΕΟ υδρόφιλες αλυσίδες [27]. Αυτού του είδους τα όταν χρησιμοποιούνται ως επικαλύψεις επιτυγχάνουν συμπολυμερή τη δημιουργία απομονωμένων σωματιδίων που αποτελούνται από μικρά συσσωματώματα [27]. Η πολυβινοαλκοόλη (PVA) είναι επίσης χρήσιμο συνθετικό πολυμερές, το οποίο αποτρέπει την θρόμβωση των σωματιδίων και καταλήγει σε μονοδιασπειρόμενα σωματίδια. Το πλεονέκτημα της PVA είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για επί τόπου (in situ) σύνθεση ${\rm Fe}^{3+}$ και Fe^{2+} σωματιδίων μεγέθους 20 nm ή μπορεί να προστεθεί σε λεπτόκοκκη μορφή στο υδατικό διάλυμα που παρασκευάζεται ο πυρήνας των οξειδίων του σιδήρου [28]. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε ότι η αυξημένη προσθήκη PVA οδηγεί σε μειωμένη κρυσταλλικότητα του πυρήνα, ενώ το μέγεθος των σωματιδίων παραμένει αμετάβλητο.

2.3 Πολυαιθυλενογλυκόλες (Polyethylene glycol - PEG)

Πιο σημαντική επικάλυψη, από τις ήδη χρησιμοποιούμενες ενώσεις, φαίνεται πως είναι οι πολυαιθυλενογλυκόλες (PEG), ένας γραμμικός ουδέτερος πολυαιθέρας. Οι PEG είναι εύκαμπτα και υδατοδιαλυτά ολιγομερή με μοριακό τύπο HO-CH₂-(CH₂-O-CH₂-),-CH₂-OH (δομή όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2) και εμπορικά διαθέσιμες από μοριακά βάρη 300 g/mol μέχρι 10.000.000 g/mol. Η PEG παρουσιάζει αμφιφιλικό χαρακτήρα (υδρόφιλο και οργανόφιλο μόριο) και έχει χρησιμοποιηθεί ως μέσο επικάλυψης στα σωματίδια για να τα σταθεροποιήσει . Η επιφανειακή επικάλυψη με PEG των υπερπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου μειώνει ή εξαλείφει την απορρόφηση πρωτεϊνών πάνω στην επιφάνεια των σωματιδίων, αποφεύγοντας το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και αυξάνει το χρόνο κυκλοφορίας στο αίμα [διαμορφώνουν την επιφάνεια των νανοσωματιδίων με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι αόρατα ως προς το ανοσοποιητικό σύστημα (stealth shielding effect)]. Επίσης, αυξάνεται η κυτταρική αναρρόφηση μέσω μη ειδικής ενδοκύττωσης, λόγω της διαλυτότητας της PEG σε πολικούς και μη πολικούς διαλύτες, καθιστώντας τα επικαλυμμένα σωματίδια ικανά να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Εκτός από τον υδρόφιλο χαρακτήρα της πολυμερικής επικάλυψης, έχει προταθεί ότι η αύξηση του γρόνου κυκλοφορίας των σωματιδίων οφείλεται στην ευκαμψία των αλυσίδων του πολυμερούς [29,31]. Λόγω της βραχύβιας, ευέλικτης και γρήγορα εναλλασσόμενης δομής της PEG, το ανοσοποιητικό σύστημα αδυνατεί να προσαρμόσει ένα αντίσωμα γύρω της [32], και η προστατευτική στοιβάδα της PEG θεωρείται ότι δημιουργεί ένα «σύννεφο» αποτελούμενο από προσαρμοζόμενες αλυσίδες, με αρκετά μεγάλη πυκνόητα, ώστε να αποφεύγονται οι αλληλοεπιδράσεις των πρωτεϊνικών ουσιών που προσδένονται στην επιφάνεια των σωματιδίων. Αυτές οι πρωτεϊνικές ουσίες ενισχύουν την αναρρόφηση των σωματιδίων από τα φαγοκύτταρα (opsonins). Μόνο όταν μια πολυμερική αλυσίδα κατέχει τον υδροφιλικό χαρακτήρα και την ευελιξία, μπορεί να θεωρηθεί ως αποτελεσματική επικάλυψη, που προστατεύει τα σωματίδια από τη διεργασία πρόσδεσης στην επιφάνεια του υλικού από opsonins [30]. Άλλα υποψήφια πολυμερή πέρα από τις PEG είναι τα πολύ- ακρυλαμίδια και η πολύ- βινυλοπυρρολιδόνη. Προτιμάται όμως τα πολυμερή επικάλυψης να μην περιέχουν υδροξυλικές ομάδες (όπως πολυσακχαρίδια), γιατί είναι στόχοι για το συμπλήρωμα C3 ή άμινο ομάδες (όπως πολυλυσίνη), οι οποίες είναι στόχοι για το C4 [30]. Οι PEG παρουσιάζουν μικρή τοξικότητα και είναι εγκεκριμένες από τον οργανισμό φαρμάκων και τροφίμων (FDA) για χρήση στους ανθρώπους.



2.4 Πολυμερικές δεζτράνες

Οι δεξτράνες είναι πολυσακχαρίτες, αποτελούμενοι από υπομονάδες γλυκόζης, με μοριακά βάρη από 1 έως 2000 kDa και επικαλύπτουν τα περισσότερα σωματίδια με φυσική απορρόφηση, όμως εύκολα διαγωρίζονται από τον πυρήνα του οξειδίου του σιδήρου, ο οποίος παρουσιάζει προβληματική σταθερότητα. Με φυσική προσρόφηση της δεξτράνης πάνω στους μαγνητικούς πυρήνες οξειδίων του σιδήρου παρουσιάζεται μεγαλύτερη συνάφεια. Όμως πρέπει να υπάρχει ισοσθενής σύνδεση του πυρήνα του οξειδίου του σιδήρου και του κελύφους της δεξτράνης, ώστε να επιτυγχάνεται εξαιρετική σταθερότητα του κολλοειδούς διαλύματος βιοσυμβατότητα. Με αυτή τη μέθοδο δεν επηρεάζεται το μέγεθος και οι μαγνητικές ιδιότητες των κολλοειδών [22]. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι διασταυρώνονται μετά την πρόσδεση με επιχλωρυδρίνη και αμμωνία, σχηματίζοντας άλλες ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν μία ευέλικτη πλατφόρμα που προσδίδει αυξημένο χρόνο ημιζωής στο αίμα [23]. Από την άλλη όμως, παρουσιάζεται αδυναμία απόρριψης από τον οργανισμό, με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η χρήση τους σε κλινικές εφαρμογές. Με αυτή τη μέθοδο δεν επηρεάζεται το μέγεθος και οι μαγνητικές ιδιότητες των κολλοειδών. Οι δεξτράνες παρασκευάζονται συνήθως in situ όπως περιέγραψαν πρώτοι οι Molday and Mackenzie, με διαφορετική διάταξη του πολυμερούς (όπως carboxydextran and carboxymethyl dextran) και σε ποικίλα υδροδυναμικά μεγέθη [24]. Ιδιαίτερα θετικά είναι τα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται μειωμένη ποσότητα δεξτράνης με άλλα είδη πολυσακχαριτών ως ακροδέκτη, διότι βελτιώνεται σημαντικά η αποδοτικότητα της επικάλυψης και η σταθερότητα του μαγνητικού διαλύματος [25]. Σωματίδια επικαλυμμένα με δεξτράνη ωστόσο, έχουν μικρότερο χρόνο κυκλοφορίας από τα επικαλυμμένα με PEG [26], παρόλο που η δεξτράνη θεωρείται πιο υδρόφιλη από την PEG.

2.5 Ανόργανα Μόρια

Κύριο ανόργανο προϊόν επικάλυψης των οξειδίων του σιδήρου είναι η πυριτία (silica), εξαιτίας της μοναδικής του μαγνητικής απόκρισης, της ορατής φωτοβολίας που εκπέμπει και των ιδιοτήτων μεσο-πορώδους του και χρησιμοποιείται ευρέως ως ανόργανη παθητική επίστρωση για MNPs [34,35]. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου που επικαλύπτονται με πυριτία, μπορούν να φορτιστούν αρνητικά πάνω από το ηλεκτρικό σημείο της πυριτίας (pH=2) και να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό βιομορίων μέσω ηλεκτροστατικών αντιδράσεων. Τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται επίσης στην ακινητοποίηση ενζύμων για βιο-κατάλυση [36]. Το

κύριο πλεονέκτημα που εμφανίζει η επικάλυψη με πυριτία είναι η παρουσία ομάδων σιλανόλης στην επιφάνεια των σωματιδίων. Αυτές οι ομάδες αντιδρούν με αλκοόλη ή με δεσμικούς παράγοντες σιλάνης, επομένως επιτυγχάνεται περεταίρω πρόσδεση βιοενεργών μορίων [37,38] και σταθεροποίηση του κολλοειδούς ασχέτως με την αλλαγή του pH και της ηλεκτρολυτικής συγκέντρωσης. Τέλος, λόγω της ανιονικής φύσης, δεν προάγουν την αποκλειστική ενδοκύττωση των σωματιδίων σε συγκεκριμένα κύτταρα. Οι Dormer et al. απέδειξαν ότι σωματίδια επικαλυμμένα με πυριτία ενσωματώθηκαν με ενδοκύττωση σε επιθηλιακούς ιστούς, χωρίς να παρουσιάζουν τα κύτταρα αυτά παθογένεια [39].

2.6 Χιτοζάνη (Chitosan)

Είναι ένα συμπολυμερές b-[1→4]-συνδεδεμένων των 2-acetamido- 2-deoxy- D-glucopyranose και 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose. Το βιο-πολυμερές αυτό, είναι ένας πολυσακχαρίτης και μεταβολίζεται από συγκεκριμένα ένζυμα του ανθρώπινου οργανισμού, κυρίως από τη λυσοζύμη. Επίσης συμμετέχει στην επούλωση πληγών και έχει βακτηριοστατική δράση. Λόγω της θετικής φόρτισής της σε ουδέτερα pH η χιτοζάνη είναι βιοσυμβατή και χρησιμοποιείται ευρέως στη μηχανική ιστών και στον τομέα της υπερθερμίας [50].



Σχήμα 2.3: Δομή και τρόποι σύνδεσης πολυμερών για επικάλυψη μαγνητικών νανοσωματιδίων.

2.7 Επιφανειοδραστικές Ενώσεις

Α) Ελαϊκό Οξύ (Oleic Acid)

Το ελαϊκό οξύ είναι ένα μονοακόρεστο λιπαρό οξύ με χημικό τύπο $C_{18}H_{34}O_2$ (ή $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$) [40] και συναντάται φυσικά σε πολλά φυτά και σε ζωικά προϊόντα. Η κορεσμένη μορφή του είναι το στεαρικό οξύ. Μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή του ελαϊκού οξέος είναι ως συστατικό στο λάδι Lorentzo, ένα φάρμακο που αναπτύχθηκε για την αποτροπή των παρενεργειών της αδρενολευκοδυστροπίας (ALD) [41], μια πάθηση που προσλαμβάνει μόνο νεαρά αγόρια και η οποία επιτίθεται στα κύτταρα του μυελού, δημιουργώντας συμπτώματα όμοια με αυτά της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Ως μονοακόρεστο λίπος όμως έχει συνδεθεί με την αυξημένη επικινδυνότητα του καρκίνου του μαστού [42].

Το ελαϊκό οξύ χρησιμοποιείται ως επιφανειοδραστική ένωση, επηρεάζοντας το μέγεθος των νανοσωματιδίων, παρατηρείται δηλαδή μικρότερο μέγεθος σωματιδίων, το οποίο οφείλεται στην προσρόφηση του ελαϊκού οξέος στην επιφάνεια των οξειδίων του σιδήρου, μειώνοντας την περαιτέρω κρυσταλλική ανάπτυξη.

Τα μαγνητικά σωματίδια με επικάλυψη ελαϊκού οξέος παρουσιάζουν αυξημένη λιποφιλικότητα και σταθερότητα [43] σε μη πολικούς διαλύτες (χρησιμοποιείται για στερική σταθερότητα σε αυτούς [44]). Πρέπει να σημειωθεί ότι το ελαϊκό οξύ έχει βαθμό υδροφιλικής-λιποφιλικής ισορροπίας 1, για αυτό και είναι δύσκολη η σταθερότητα του στο νερό. Λόγω τούτου, με τη προσθήκη του block-συμπολυμερούς Pluronic, το οποίο έχει βαθμό υδροφιλικής-λιποφιλικής ισορροπίας 22, ως δεύτερης στοιβάδας αυξάνεται η διασπορά και η σταθερότητα των σωματιδίων στο νερό. Μία ακόμα χρησιμότητα του ελαϊκού οξέος ως επιφανειοδραστική ένωση είναι η ικανότητα των ομάδων που υπάρχουν στην επιφάνειά να προσροφήσουν ποσότητα φαρμάκου καθιστώντας τα σωματίδια κατάλληλους παράγοντες για μεταφορά φαρμάκων [45]. Καθώς οι περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες είναι διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες ή σε διαλύματα με pH διάφορο του 7, απαιτείται από τα σωματίδια να είναι σταθερά και διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες και αυτό επιτυγχάνεται με επιφανειακή επικάλυψη ελαϊκού οξέος.

B) Μερκαπτο- ενδεκανοϊκό οζύ (Mercapto-undecanoic acid, MUA)

Η παρασκευή των νανοσωματιδίων μέσα σε οργανικούς διαλύτες βοηθάει σημαντικά στον έλεγχο της ανάπτυξης τους, λόγω των χαμηλών διεπιφανειακών ενεργειών. Μεταλλικά νανοσωματίδια σταθεροποιούνται και διασπείρονται καλύτερα στους οργανικούς διαλύτες όταν στην επιφάνεια τους υπάρχουν ελεύθερες ρίζες θειόλης [46]. Μια τέτοια επιφανειοδραστική ένωση είναι το MUA, το οποίο μορφοποιεί τα σωματίδια να είναι απευθείας διαλυτά σε υδατικά διαλύματα (προσφέρει την ιδιότητα της υδροφιλικότητας), φορτίζει, σταθεροποιεί και προστατεύει τα σωματίδια με τις ακραίες ενεργές ομάδες του καρβοξυλίου και της θειόλης [47]. Η δομή του MUA είναι η παράκατω:



Σχήμα 2.4: Χημικός τύπος μερκαπτο- ενδεκανοϊκού οξέος.

Γ) Φολικό Οξύ (Folic Acid-FA)

Ο υποδοχέας φυλλικού οξέος (Folate receptor-FR) είναι μια δεσμευτική πρωτεΐνη, συγγενούς μεμβράνης με αυτή του φυλλικού οξέος και με μοριακό βάρος περίπου 38–40 kDa. Η έκφρασή της είναι αμελητέα στα υγιή κύτταρα, σε αντίθεση με τα καρκινικά, στα οποία εμφανίζεται σε μεγάλες ποσότητες (ειδικά στις περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών και της μήτρας, του ρινοφάρυγγα, του νεφρού, των πνευμόνων και του καρκίνου στο συκώτι). Αυτό καθιστά τον υποδοχέα FR πιθανό στόχο για σύνδεση κατάλληλων ενώσεων. Οι μεμβράνες των κυττάρων των όγκων και των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου είναι και οι δύο αρνητικά φορτισμένες, με αποτέλεσμα την δυσκολία πρόσληψης των τελευταίων. Το φολικό οξύ (Folic acid-FA) χρησιμοποιείται ευρέως ως διαγνωστικός παράγοντας για την επιφανειακή τροποποίηση νανοσωματιδίων, καθώς μπορεί να δεσμευθεί με τον υποδοχέα φυλλικού οξέος [33].

Το Φολικό οξύ είναι μια χαμηλού μοριακού βάρους, υδροφιλική βιταμίνη, απαραίτητη για το ανθρώπινο σώμα, κυρίως στο μεταβολισμό του άνθρακα στα ευκαρυωτικά κύτταρα και στη σύνθεση νουκλεοτιδίων, DNA και ενζυμικών συστημάτων. Η δομή του παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.5 [48]. Επίσης, το FA είναι βιο-συμβατό, σταθερό σε διαλύματα, μη ανιχνεύσιμο από το ανοσοποιητικό και χαμηλού κόστους συγκριτικά με άλλα υποκατάστατα και συνδέεται επιτυχώς με τους υποδοχείς FR των καρκινικών κυττάρων, διαχωρίζοντας τα από τα υγιή. Το φολικό οξύ συνδέεται στο απώτατο άκρο της PEG, ωστόσο παρουσιάζει αδυναμία σύζευξης, λόγω της ασθενούς χημικής αντιδραστικότητας της υδροξυλικής ομάδας που βρίσκεται στην PEG [49].



Σχήμα 2.5: Δομή Φολικού οξέος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Την τελευταία δεκαετία η σύνθεση υπερπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων έχει μελετηθεί εντατικά λόγω του αυξανόμενου ενδιαφέροντος τόσο σε θεμελιώδες επιστημονικό επίπεδο όσο και στο διευρυμένο πεδίο εφαρμογών τους. Μέχρι και σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι φυσικές και γημικές για τη σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων με ελεγγόμενη σύσταση, μέγεθος και σχήμα. Στις φυσικές μεθόδους περιλαμβάνονται η φυσική εναπόθεση ατμών, η λιθογραφία ηλεκτρονικής δέσμης και η εναπόθεση με ιοντοβολή/sputtering, ενώ στις χημικές η τεχνική sol-gel, η συγκαταβύθιση, τα μικρο- νανο-γαλακτώματα, η μέθοδος της πολυόλης και η μέθοδος της θερμόλυσης. Από αυτές οι περισσότερο διαδεδομένες τεχνικές είναι εκείνες των χημικών μεθόδων σε διαλύματα, της φυσικής εναπόθεσης ατμών και της μηχανικής κατεργασίας. Η μηγανική κατεργασία βασίζεται στο κατακερματισμό των μακροσκοπικών υλικών τη σμίνκρυνση και το σχηματισμό νανοσωματιδίων, γνωστή με πορεία προς διαδικασία ως top-down προσέγγιση. Αντίθετα, η μέθοδος της φυσικής εναπόθεσης ατμών και της χημικής σύνθεσης σε διαλύματα βασίζονται στη σύνθεση νανοσωματιδίων ξεκινώντας από τις δομικές μονάδες των ατόμων ή μορίων με ελεγχόμενο τρόπο. Η προσέγγιση αυτή είναι γνωστή ως **bottom-up** προσέγγιση.

Στα βασικά πλεονεκτήματα των χημικών μεθόδων σε διαλύματα περιλαμβάνονται η απλότητα, η ικανότητα ελέγχου του μεγέθους, του σχήματος και η μεγάλη ποικιλία επιφανειακής τροποποίησης, που πραγματοποιείται ρυθμίζοντας κάποιες κινητικές παραμέτρους, όπως είναι για παράδειγμα το pH, η θερμοκρασία αντίδρασης, ο ρυθμός ανάδευσης και η συγκέντρωση των πρόδρομων ενώσεων. Καθοριστικό ρόλο στη χημική σύνθεση των σωματιδίων παίζει και η παρουσία ή όχι επιφανειοδραστικών ενώσεων. Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις επηρεάζουν ισχυρά την επιφάνεια των σωματιδίων και την ισχύ του μέσου στο οποίο διαλυτοποιούνται και επιδρούν σημαντικά στο σχήμα, στην κατανομή μεγέθους και στη μορφολογία των σωματιδίων. Τα μόρια αυτά, ανάλογα με τη φύση τους προσδίδουν διαλυτότητα σε πολικούς ή μη-πολικούς διαλύτες που είναι σημαντικό για διάφορες εφαρμογές όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της βιοϊατρικής διάγνωσης και θεραπείας που προϋποθέτει τα μαγνητικά σωματίδια να είναι σταθερά σε υδατικά μέσα, ουδέτερο pH και φυσιολογικό ορό.

3.2 Χημική σύνθεση σε διαλύματα

Ομοιόμορφα νανοσωματίδια με στενή κατανομή μεγέθους (monodispersed) μπορούν εύκολα να παρασκευαστούν με μεθόδους υγρής χημείας. Η ανάπτυξη ομοιόμορφων νανοσωματιδίων που επιδιώκεται σε πολλές εφαρμογές, εξαρτάται από το στάδιο της πυρήνωσης και της ανάπτυξης σύμφωνα με τη θεωρία La Mer [1], που περιγράφει τη σύνθεση νανοκρυστάλλων σε διαλύματα. Τα δύο αυτά στάδια επηρρεάζουν ισχυρά το μέγεθος και τη κατανομή μεγέθους των σχηματιζόμενων σωματιδίων. Μονοδιασπορά σωματιδίων με σχετική απόκλιση (~5%) επιτυγχάνεται σύμφωνα με τη θεωρία La Mer πάνω από ένα κρίσιμο σημείο ($C > C_{min}$) με ραγδαία πυρήνωση όταν η συγκέντρωση του μονομερούς αυξηθεί απότομα πάνω από μια κρίσιμη συγκέντρωση ($C > C_s$) ξεπερνώντας την κρίσιμη συγκέντρωση υπερκορεσμού ($C = C_{max}$) και χωρίς τον περαιτέρω σχηματισμό νέων πυρήνων. Οι πυρήνες που σχηματίζονται, αρχίζουν να αναπτύσσονται στην συνέχεια με τον ίδιο ρυθμό, συνήθως μέσω συνδυασμού διάχυσης των ατόμων πάνω στον πυρήνα και με αμετάκλητη συσσώρευση του πυρήνα, προσδίδοντας στα σωματίδια μονοδιασπορά. Τα νανοσωματίδια μόλις παρασκευαστούν χαρακτηρίζονται από

πολύ υψηλή επιφανειακή ενέργεια με αποτέλεσμα να συσσωματώνονται εύκολα ώστε να μειωθεί η ενέργειά τους. Προκειμένου να παρεμποδιστεί η συσσωμάτωση όπως έχει αναφερθεί, τα νανοσωματίδια θα πρέπει να σταθεροποιηθούν με κατάλληλους επιφανειοδραστικούς παράγοντες.

Ελέγχοντας τον ρυθμό πυρήνωσης και ανάπτυξης των σωματιδίων είναι δυνατόν να ελεγχθεί και το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Οι Gupta et al., έδειξαν πως για τη χρήση σε φαρμακευτικές εφαρμογές, το επιθυμητό μέγεθος των νανοσωματιδίων κυμαίνεται ανάμεσα στα 10 και 100 nm. Στα μεγέθη αυτά είναι μεγαλύτερη η αποτελεσματικότητα των περιοχών της επιφάνειας στις οποίες μπορεί να προσδεθεί κάποια ένωση, μεγαλύτερη η χημική σταθερότητα και ευκολότερη η εισχώρηση στο ενδοθηλιακό σύστημα (RES) [2]. Πιο συγκεκριμένα λοιπόν, όταν η πυρήνωση γίνεται πολύ γρήγορα, η συγκέντρωση των πυρήνων που δημιουργούνται είναι υψηλή με αποτέλεσμα να σχηματίζονται νανοσωματίδια με μικρότερα μεγέθη. Αντίθετα, όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 3.1, η αργή πυρήνωση παρέχει χαμηλή συγκέντρωση κόκκων που «καταναλώνοντας» την ίδια ποσότητα πρόδρομης ένωσης οδηγεί στο σχηματισμό μεγαλύτερων σε μέγεθος σωματιδίων [3]. Στην πραγματικότητα η ισορροπία μεταξύ της πυρήνωσης και της ανάπτυξης των σωματιδίων μπορεί να ελεγχθεί μεταβάλλοντας την θερμοκρασία της αντίδρασης καθώς η ενέργεια που απαιτείται για ομογενή πυρήνωση είναι αισθητά μεγαλύτερη από εκείνη που απαιτείται για την ανάπτυξη του σωματιδίου. Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι ο ρυθμός πυρήνωσης είναι περισσότερο ευαίσθητος στην θερμοκρασία από τον ρυθμό ανάπτυξης. Έτσι σε υψηλότερες θερμοκρασίες ευνοούνται τα μικρότερα μεγέθη.



Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση ανάπτυξης νανοσωματιδίων διαφόρων μεγεθών [3].

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων επηρεάζεται επίσης από τη συγκέντρωση των επιφανειοδραστικών μορίων που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης για τη σταθεροποίηση των σωματιδίων. Συγκεκριμένα, η αύξηση της συγκέντρωσης των επιφανειοδραστικών ενώσεων οδηγεί σε μικρότερα μεγέθη σωματιδίων. Παρόλο που με την αύξηση της συγκέντρωσης των επιφανειοδραστικών μορίων, μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των σωματιδίων και για αυτό το λόγο σχηματίζονται μικρότερα σε μέγεθος σωματίδια, ο ρυθμός πυρήνωσης των σωματιδίων δεν επηρρεάζεται ή επηρρεάζεται σε πολύ μικρό βαθμό.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναπτυχθεί πληθώρα μεθόδων για την παρασκευή νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου (γ-Fe₂O₃ και Fe₃O₄). Αυτές οι μέθοδοι σύνθεσης μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο γενικότερες κατηγορίες, στις υδρολυτικές και μη- υδρολυτικές τεχνικές. Στις υδρολυτικές τεχνικές συμπεριλαμβάνονται η μέθοδος της συγκαταβύθισης [4,5] και των μικρογαλακτωμάτων [6,7], η σύνθεση sol-gel [8,9], η ηλεκτροχημική μέθοδος [10,11] και η σύνθεση με υπέρηχους [12,14] που κατά κύριο λόγο βασίζονται στην υδρόλυση δισθενών και τρισθενών ιόντων σιδήρου, ενώ η μέθοδος της θερμόλυσης [15-17] που αποτελεί το βασικό

κορμό των μη-υδρολυτικών τεχνικών βασίζεται στην πυρόλυση/θερμική διάσπαση πρόδρομων οργανικών μορίων του σιδήρου. Στις μη- υδρολυτικές τεχνικές περιλαμβάνεται και η μέθοδος της πολυόλης [18-24] η οποία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των υδρολυτικών και θερμολυτικών μεθόδων. Παρακάτω, περιγράφονται διαφορετικές μέθοδοι σύνθεσης σε διαλύματα, που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για τη παρασκευή μαγνητικών νανοσωματιδίων, με τις οποίες είναι δυνατόν να ελεγχθεί το μέγεθος, το σχήμα, η επιφάνεια και σε ορισμένες περιπτώσεις και η δομή των υλικών. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση των επιμέρους μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου και οι οποίες είναι η μέθοδος της συγκαταβύθισης, τα μικρογαλακτώματα και η θερμόλυση.

3.2.1 Μέθοδος συγκαταβύθισης

Η μέθοδος της συγκαταβύθισης ανήκει στην κατηγορία των υδρολυτικών μεθόδων και αποτελεί πιθανά την πιο απλή και αποδοτική μέθοδο για τη παρασκευή μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου σε μεγάλη κλίμακα (μέγεθος σωματιδίων ~ 2-17 nm) [25,26]. Από τα διάφορα οξείδια του σιδήρου, ο μαγνητίτης (Fe₃O₄) και ο μαγκεμίτης (γ-Fe₂O₃) παρασκευάζονται συνήθως με συγκαταβύθιση δισθενών και τρισθενών αλάτων σε υδατική φάση. Μεταξύ των δύο, στις βιοϊατρικές εφαρμογές προτιμάται ο μαγνητίτης (Fe₃O₄) λόγω της υψηλότερης μαγνήτισης κορεσμού που εμφανίζει, αλλά ο μαγκεμίτης (γ-Fe₂O₃) είναι χημικά σταθερότερος σε συνθήκες περιβάλλοντος. Η σύνθεση του μαγνητίτη περιγράφεται από την παρακάτω χημική αντίδραση [27]:

$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^- => Fe_3O_4 + 4H_2O$

Σύμφωνα με τη θερμοδυναμική της αντίδρασης, όταν αυτή πραγματοποιείται σε μηοξειδωμένο περιβάλλον ολοκληρώνεται σε pH που κυμαίνονται μεταξύ 8-14 για στοιχειομετρική αναλογία αλάτων (Fe³⁺/Fe²⁺) ίση προς 2:1 [28]. Παρουσία οξυγόνου ο μαγνητίτης που είναι ευαίσθητος στην οξείδωση, μετατρέπεται σε μαγκεμίτη σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση. Fe₃O₄ + 2H⁺ => γ-Fe₂O₃ + Fe²⁺ + H₂O

Ο Massart [29] ήταν ο πρώτος που παρασκεύασε υπερπαραμαγνητικά νανοσωματιδία μαγνητίτη με συγκαταβύθιση αλάτων FeCl₃, FeCl₃ σε αλκαλικές συνθήκες. Κατά αυτήν την προσέγγιση τα πρώτα σωματίδια που παρασκευάστηκαν ήταν σχεδόν σφαιρικά με μέση διάμετρο σωματιδίων 8 nm. Από μελέτες που έγιναν αργότερα διαπιστώθηκε ότι οι ιδιότητες των παρασκευασμένων νανοσωματιδίων όπως και η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται από πολλές παράμετρους, όπως είναι για παραδειγμα η αναλογία $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (*ιδανικά μεταξύ* 0.5-0.6), η συγκέντρωση των πρόδρομων ενώσεων του σιδήρου (τυπικά 39-78 mM) [30], το pH και η ιοντική ισχύς του διαλύματος. Ρυθμίζοντας το pH και την ιοντική ισχύ του διαλύματος, είναι δυνατό να ελεγχθεί το μέγεθος των σωματιδίων. Συγκεκριμένα, η αύξηση αυτών (pH και ιοντικής ισχύος) οδηγεί σε σωματίδια με μικρότερο μέγεθος αλλά και μικρότερη κατανομή μεγέθους [31-33]. Αυτό οφείλεται στο ότι το pH και η ιοντική ισχύς του διαλύματος επηρεάζουν τη χημική σύσταση στην επιφάνεια του σωματιδίου και συνεπώς το ηλεκτροστατικό επιφανειακό φορτίο. Εκτός από τις παραπάνω παραμέτρους, η απόδοση της αντίδρασης, το μέγεθος και η κατανομή μεγέθους επηρεάζονται ισχυρά από το είδος της βάσης (NH₃, CH₃NH₂ ή NaOH) που χρησιμοποιείται για την συγκαταβύθιση των πρόδρομων ενώσεων του σιδήρου (χλωρικά, νιτρικά) και από την παρουσία διαφορετικών κατιόντων (N(CH₃)₄⁺, CH₃NH₃⁺, NH₄⁺, Na⁺, Li⁺, K⁺) [34]. Με τη μέθοδο της συγκαταβίθυσης αλάτων είναι δυνατόν να παρασκευαστούν μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου με μέσο μέγεθος 4-16 nm. Άλλοι παράμετροι που επιδρούν στο μέγεθος των σωματιδίων είναι ο ρυθμός ανάδευσης της αντίδρασης, η μεταβολή της θερμοκρασία [30,35]

και η παρουσία αδρανούς ατμόσφαιρας, απαερώνοντας το διάλυμα καθόλη την διάρκεια της αντίδρασης με άζωτο (bubbling N_2) η οποία εκτός του ότι προστατεύει το σχηματισμό μαγνητίτη από την οξείδωση οδηγεί και σε μικρότερο μέγεθος σωματιδίων [36].

Πρόδρομη Ένωση	Επιφανειοδραστική Ένωση	Είδος νανοσωματιδίου
Co ₂ (CO) ₈	trioctylphosphine oxide (TOPO)	κοβαλτίου
Πεντακαρβονύλιο του σιδήρου(Fe(CO)₅)	trioctylphosphine oxide (TOPO)	μαγκεμίτη (γ-Fe ₂ O ₃)
Co ₂ (CO) ₈	ΤΟΡΟ και ελαϊκό οξύ 1,2-δωδεκανόλη, διφαινυλο-	κοβαλτίου
Οξικό άλας κοβαλτίου	αιθέρας, ελαϊκό οξύ και τριοκτυλφωσφίνη	κοβαλτίου
Ακετυλακετόνιο του σιδήρου(III) – Fe(acac) ₃	φαινυλικός αιθέρας και αλκοόλη	σιδήρου
$Fe(CO)_5 \kappa \alpha Pt(acac)_2$	-	FePt
Καρβονύλιο του κοβαλτίου και Pt(acac) ₂	-	CoPt ₃
Διάλυμα Fe(CO) ₅	οξείδιο διμεθυλοφαινόλης	σιδήρου

Πίνακας 3.1: Μέθοδοι οργανομεταλλικής σύνθεσης νανοσωματιδίων [37].

Σε γενικές γραμμές, η μέθοδος της συγκαταβύθισης αποτελεί μια περισσότερο πολυσύνθετη τεχνική όχι μόνο λόγω της πολυπλοκότητας που παρουσιάζεται κατά την υδρόλυση στη χημική ισσορροπία των εμπλεκόμενων δισθενών και τρισθενών ιόντων, αλλά επειδή το σχήμα, το μέγεθος και η κατανομή μεγέθους επηρρεάζονται ισχυρά από πάρα πολλές παράμετρους. Εκτός της ευρείας κατανομής μεγέθους, η μέθοδος της συγκαταβύθισης θα πρέπει να πραγματοποιείται σε ελεγχόμενες συνθήκες έτσι ώστε να αποφεύγεται η ανεπιθύμητη οξείδωση. Παρόλα αυτά, η μέθοδος της συγκαταβύθισης προτιμάται για την απλότητά της. Σε αυτή τη μέθοδο η θερμοκρασία και ο χρόνος αντίδρασης είναι αρκετά μικρότερος συγκριτικά με άλλες όπως στην θερμόλυση και σε άλλες υδροθερμικές μεθόδους. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου της συγκαταβύθισης είναι η χρήση φιλικού προς το περιβάλλον διαλύτη (νερό) και η μεγάλη απόδοση της αντίδρασης που μπορεί να ελεγχθεί. Η μέθοδος της συγκαταβύθισης είναι επαναλήψιμη, ενώ στα βασικά πλεονεκτήματα της τεχνικής αναφέρεται η δυνατότητα σύνθεσης νανοσωματιδίων σε ένα στάδιο που είναι διαλυτά σε υδατικά μέσα, βασική προϋπόθεση για την εφαρμογή τους βιοϊατρική. Από τα βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου στην συγκαταβύθισης είναι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, η σχετικά ευρεία κατανομή μεγέθους και η δυσκολία ελέγχου του σχήματος των σωματιδίων, που οφείλεται στο ότι ο ρυθμός ανάπτυξης κατά την διάρκεια της αντίδρασης είναι πολύ γρήγορος.

3.2.2 Μέθοδος μικρογαλακτωμάτων

Η μέθοδος των μικρογαλακτωμάτων ανήκει στις υδρολυτικές μεθόδους και αποτελεί μια καλή επιλογή για τη παρασκευή ομοιόμορφων μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου με ελεγχόμενο μέγεθος. Το γαλάκτωμα αποτελεί ένα ισότροπο και θερμοδυναμικά σταθερό σύστημα μιας φάσης αποτελούμενο από 3 συστατικά: νερό, έλαιο και ένα αμφίφιλο μόριο, την

επιφανειοδραστική ένωση. Όταν η υδατική φάση στο σύστημα είναι μεγαλύτερη τότε σχηματίζεται γαλάκτωμα τύπου «ελαίου σε νερό» (oil in water, o/w). Ο σχηματισμός ενός o/w γαλακτώματος πραγματοποιείται όταν η υδατική φάση στο σύστημα είναι μεγαλύτερη από το 45% του συνολικού βάρους του και χρησιμοποιείται ως υδρόφιλο γαλάκτωμα. Αντίστροφα, όταν νερό ή υδατική φάση είναι διεσπαρμένη εντός ελαιώδους φάσης, τότε σχηματίζεται γαλάκτωμα/μικύλλια τύπου «νερό σε έλαιο» (water in oil, w/o) στο οποίο η υδατική φάση είναι σε ποσοστό μικρότερο από 45% του συνολικού βάρους του γαλακτώματος. Ο αμφίφιλος χαρακτήρας των επιφανειοδραστικών ενώσεων επιτρέπει τον εντοπισμό τους στις μεσοεπιφάνειες διφασικών συστημάτων. Απορροφούνται στη διεπειφάνεια ελαίου-ύδατος, ελαττώνοντας τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων των υγρών και οδηγούν στη δημιουργία διαυγών διαλυμάτων [37]. Η μέθοδος των μικρογαλακτωμάτων έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για την σύνθεση πολλών φερριτών MFe₂O₄ (M: Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mg) με μέση διάμετρο 4-15 nm χρησιμοποιώντας και το NaDBS (=dodecylbenzenesulfonate) ως επιφανειοδραστικά ένωση. Τέτοια νανοσωματίδια χαρακτηρίζονται από μικρότερα μεγέθη συγκριτικά με εκείνα που λαμβάνονται με καταβύθιση και από υψηλότερες τιμές μαγνήτισης.

Πολύ πρόσφατα, μόλις το 2011, ο Okoli και οι συνεργάτες του, σε ελαιώδη φάση χρησιμοποιώντας ως επιφανειοδραστική ένωση το CTAB αλλά ως δεύτερο επιφανειοδραστικό παράγοντα αλκοόλη με μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα και συγκεκριμένα την 1-οκτανόλη, παρασκεύασαν μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου με μέγεθος κοντά στα 9 nm και τιμή μαγνήτισης 30 emu/g [38]. Απευθείας υδρόφιλα νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου παρασκευάζονται με χρήση μη-ιοντικού επιφανειοδραστικού μορίου πρωτοταγής αιθόξυαλκοόλης με το εμπορικό όνομα Synperonic 10/6. Η μέθοδος των μικρογαλακτωμάτων σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιείται σε εξάνιο στους 30°C και οδηγεί σε εξαιρετικά μικρά υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια μέσου μεγέθους περίπου 2 nm και τιμή μαγνήτισης 10 emu/g. Υδρόφιλα νανοσωματίδια παρασκευάζονται και με παρουσία επιφανειοδραστικού μορίου με αρνητικά φορτισμένα ιόντα όπως το δις(-12αιθυλεξ) σουλφοηλεκτρικό νάτριο [39].



Σχήμα 3.2: (A) Ενδεικτικό διάγραμμα φάσεις συστήματος νερού-ελαίου- επιφανειοδραστικής ένωσης. Μικρογαλάκτωμα ελαίου σε νερό (o/w)-υδρόφυλλο γαλάκτωμα (Σημείο A) και νερό σε έλαιο (w/o)υδρόφοβο γαλάκτωμα (Σημείο B).

Συμπερασματικά, η μέθοδος των μικρογαλακτωμάτων οδηγεί σε σωματίδια οξειδίων του σιδήρου με μέγεθος μικρότερο από 10 nm και με καλή κατανομή μεγέθους (Sd < 10%). Τα νανοσωματίδια αυτά είναι ομοιόμορφα με σφαιρικό σχήμα και δεν σχηματίζουν συσσωματώματα. Το μέγεθος τους μπορεί να ελεγχθεί ρυθμίζοντας κάθε φορά το μέγεθος του υδατικού πυρήνα του μικκυλίου. Τέτοια νανοσωματίδια παρουσιάζουν υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά με μαγνήτιση κορεσμού που φθάνει τα 40 emu/g. Στα βασικά μειονεκτήματα της τεχνικής των μικρογαλακτωμάτων αναφέρεται η δυσκολία απομάκρυνσης των επιφανειοδραστικών ενώσεων, με αποτέλεσμα την παρασκευή νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μικρή κλίμακα. Παρόλα αυτά, η μέθοδος των μικρογαλακτωμάτων αποτελεί ίσως την καλύτερη μέθοδο για τη τροποποίηση της επιφανείας οργανόφιλων νανοσωματιδίων και τη μετατροπή τους σε υδρόφιλα που κρίνεται απαραίτητη για την εφαρμογή μαγνητικών νανοσωματιδίων στην βιοϊατρική [40].

3.2.3. Μέθοδος Πολυόλης

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια ευέλικτη χημική προσέγγιση που αναφέρεται στη χρήση πολυολών (αλκοόλες με πολλαπλά υδροξύλια, π.χ. αιθυλενο γλυκόλη) για την αναγωγή μεταλλικών αλάτων προς την παρασκευή μεταλλικών σωματιδίων. Οι πολυόλες έχουν πολλαπλές λειτουργείες και χρησιμοποιούνται ως διαλύτες με υψηλά σημεία ζέσεως (αιθυλενογλυκόλη: ~197°C), αναγωγικοί παράγοντες αλλά και ως σταθεροποιητές ελέγχοντας το μέγεθος των σωματιδίων και παρεμποδίζοντας τη συσσωμάτωση μεταξύ τους [41,42]. Μαγνητικά νανοσωματίδια Fe₃O₄, σε διάφορα μεγέθη (6~18nm), παρασκευάζονται σε μη-υδατικά ομογενή διαλύματα πολυολών στους 220°C παρουσία ελαϊκού οξέος. Τα μικρότερα σε μέγεθος σωματίδια (~6.6 nm) παρασκευάζονται σε δι-αιθυλενογλυκόλη χρησιμοποιώντας ως πρόδρομες ενώσεις

μείγμα ένυδρων δισθενών και τρισθενών αλάτων (FeCl₂'4H₂O/FeCl₃'H₂O) σε αναλογία ¹/₂ και αλκαλικό περιβάλλον. Αυτά τα σωματίδια παρουσιάζουν υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά και εμφανίζουν πολύ υψηλή μαγνήτιση κορεσμού που φθάνει τα 70.7 emu/g [43].

Πολύ πρόσφατα, ο Ηu και οι συνεργάτες του παρασκεύασαν υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου μέσω θερμολυτικής διάσπασης πρόδρομης ένωσης συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου με ακετυλακετόνη, Fe(acac)₃ σε τριαιθυλενογλυκόλη (TREG) που δρα ως διαλύτης και αναγωγικός παράγοντας [44]. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 260°C παρουσία επιφανειοδραστικού παράγοντα δικαρβόξυ-πολυαιθυλενογλυκόλης (HOOC-PEG-COOH) και έλαβε χώρα για 2h. Με την παραπάνω διαδικασία προέκυψαν μαγνητικά νανοσωματίδια Fe₃O₄, με πολύ μικρό μέγεθος (~5.4 nm) και υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά, με πολύ υψηλή τιμή μαγνήτισης κορεσμού που φθάνει στους 250 K τα 94 emu/g [44]. Τα νανοσωματίδια αυτά είναι βιοσυμβατά λόγω της τροποποίησής της επιφανείας τους με τη δι-καρβόξυ πολυαιθυλενογλυκόλη, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή τους ως T₁. και T₂- παράγοντες αντίθεσης στην τεχνική MRI [44].

Υδρόφιλα νανοσωματίδια μαγνητίτη, τροποποιημένα επιφανειακά με διαφορετικά μόρια μπορούν να παρασκευαστούν σε ένα στάδιο σε διαιθυλενογλυκόλη. Μικρά μόρια που φέρουν διαφορετικές οργανικές ομάδες όπως αμίνες, καρβοξύλια και θειόλες επιλέγονται ως επιφανειοδραστικοί παράγοντες και εισάγονται στο μέσο ή στο τέλος της αντίδρασης με αποτέλεσμα να προσδένονται στην εξωτερική επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Επιφανειακά τροποποιημένα νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου που συντίθονται με την παραπάνω μέθοδο όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 3.3., σχηματίζουν σιδηρορευστά (ferrofluids) που είναι πολύ σταθερά στο νερό και σε βιολογικά υγρά. Τα υλικά αυτά φέρουν στην επιφάνειά τους λειτουργικές ομάδες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περεταίρω πρόσδεση άλλων βιολογικών μορίων κάνοντας τα κατάλληλα για βιοΐατρικές εφαρμογές [45].

Κατά τη μέθοδο της πολυόλης, διάφορες πρόδρομες ενώσεις θερμολύονται σε υψηλές θερμοκρασίες που μπορούν, ορισμένες φορές, να φθάσουν έως και τους 290°C. Οι υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν το σχηματισμό νανοσωματιδίων με καλύτερη κρυσταλλικότητα. Συμπερασματικά, με τη μέθοδο της πολυόλης μπορούν να παραχθούν καλά καθορισμένα σε μέγεθος και σχήμα μαγνητικά νανοσωματίδια, ελέγχοντας την κινητική της αντίδρασης (συσσωμάτωση και συγκαταβύθιση των σχηματιζόμενων σωματιδίων). Συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των υδρολυτικών και θερμολυτικών μεθόδων παρέχοντας τη δυνατότητα ανάπτυξης υδρόφιλων νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου σε ένα στάδιο (όπως και στην περίπτωση της συγκαταβύθισης) αλλά με καλύτερη μορφολογία σχήματος και μικρότερη κατανομή μεγέθους (όπως συναντάται στις θερμολυτικές μεθόδους), καθιστώντας τα κατάλληλα για την εφαρμογή τους στην βιοϊατρική. Στα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι επίσης η ικανότητα επέκτασής της και σε μεγάλη κλίμακα.

3.2.4 Θερμόλυση

Η μέθοδος της θερμόλυσης βασίζεται στην χημική διάσπαση πρόδρομων ενώσεων με τη θερμοκρασία. Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι συνήθως ενδόθερμη, κατά την οποία ενέργεια με την μορφή θερμότητας απαιτείται έτσι ώστε να σπάσουν οι χημικοί δεσμοί της πρόδρομης ένωσης. Με τις θερμολυτικές μεθόδους παρασκευάζονται συνήθως, ελεγχόμενα, νανοσωματίδια με ομοιόμορφο μέγεθος και σχήμα. Υπάρχουν δύο μέθοδοι θερμόλυσης για παρασκευή νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου, η θερμολυτική διάσπαση σε μη-πολικούς διαλύτες και η διάσπαση σε ισχυρά πολικούς διαλύτες. Στην πρώτη περίπτωση, μονοδιασπειρόμενα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου (monodispersed NPs) παρασκευάζονται συνήθως με θερμολυτική διάσπαση διαφορετικών πρόδρομων ενώσεων του σιδήρου όπως πεντεκαρβονυλιών (Fe(CO)₅), οξικού εστέρα [Fe(CH₃COO)₃, Fe(CH₃COO)₂] ή/και σύμπλοκα Fe με ακετυλακετόνης [Fe(acac)₂ ή Fe(acac)₃]. Νανοσωματίδια που παρασκευάζονται με τη μέθοδο της θερμόλυσης ποικίλουν σε μέγεθος από 3-50 nm. Αυτή η προσέγγιση της θερμολυτικής διάσπασης έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ανάπτυξη ομοιόμορφων και με στενή κατανομή μεγέθους, μαγνητικών νανοσωματιδίων γ-Fe₂O₃ σε οκτυλεθαίρα και υπό την παρουσία ελαϊκού και λαουρικού οξέος. Η παραπάνω σύνθεση πλεονεκτεί έναντι άλλων, καθώς οδηγεί στο σχηματισμό σωματιδίων με πολύ καλή κρυσταλλικότητα, στενή κατανομή του μεγέθους (Sd < 5%), ελεγχόμενο μέγεθος, σχήμα και με πολύ καλή διασπορά σε οργανικούς διαλύτες [46,50].

Στην περίπτωση θερμόλυσης σε ισχυρά πολικούς διαλύτες, πραγματοποιείται θερμική διάσπαση πρόδρομων ενώσεων του σιδήρου σε ισχυρά πολικούς διαλύτες (όπως είναι η 2-πυρολιδόνη), σε μια προσπάθεια να παρασκευαστούν απευθείας υδρόφιλα νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου, καθώς τα νανοσωματίδια που παρασκευάζονται με την 1^η μέθοδο είναι μη βιο-συμβατά. Η θερμική διάσπαση πρόδρομων ενώσεων του σιδήρου σε ισχυρά πολικούς διαλύτες οδηγεί στην παρασκευή νανοσωματιδίων με μικρή διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα και κυρίως σε ουδέτερα pH. Σε μια προσπάθεια τέτοια υλικά να χρησιμοποιηθούν σε βιοϊατρικές εφαρμογές η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία μονο-καρβοξυλικής πολυαιθυλενογλυκόλης (MPEG-COOH) που είναι βιοσυμβατή [51,52]. Συμπερασματικά, η μέθοδος της θερμόλυσης αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο για την παρασκευή νανοσωματιδίων υψηλής ποιότητας. Νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου που παρασκευάζονται μέσω θερμολυτικής διάσπασης πρόδρομων ενώσεων σε υψηλή θερμοκρασία είναι πολύ κρυσταλλικά και χαρακτηρίζονται από πολύ στενή κατανομή μεγέθους (Sd < 5%). Βασικό πλεονεκτήμα της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα ελέγχου του μεγέθους (3-50 nm) αλλά και του σχήματος (σφαίρες, κύβοι, σύρματα κ.λπ.) των νανοσωματιδίων. Επιπλέον η παρασκευή νανοσωματιδίων με τη μέθοδο της θερμόλυσης μπορεί εύκολα να αυξηθεί κλιμακωτά για μαζική παραγωγή. Ανάλογα με την εφαρμογή για την οποία προορίζονται, μειονέκτημα θα μπορούσε να θεωρηθεί το γεγονός ότι η μέθοδος οδηγεί στη σύνθεση οργανόφιλων νανοσωματιδίων. Προκειμένου αυτά να εφαρμοστούν σε βιοϊατρικές εφαρμογές κρίνεται απαραίτητη σε δεύτερο στάδιο η τροποποίηση της επιφανείας τους και η μετατροπή τους σε υδρόφιλα νανοσωματίδια.

			• ••	•		
ΜΕΘΟΔΟΣ	Θερμοκρασία αντίδρασης	Χρόνος	Διαλύτης	Κατανομή μεγέθους	Σχήμα	Απόδοσ
Συγκαταβύθιση	20-90 °C	Λεπτά	H ₂ O	Ευρεία	Ακανόνιστο	Υψηλή (μεγ κλίμακα)
Μικρο- γαλακτώματα	20-50°C	Ωρες	${ m H_2O} + { m O}$ ργανικός δ/της	Σχετικά στενή	Ομοιόμορφα σφαιρικό	Χαμηλή
Πολυόλη	170-260°C	Λεπτά-ώρες	Οργανικός δ/της	Στενή	Σχεδόν σφαιρικό	Υψηλή (μεγ κλίμακα)
Θερμόλυση	100-320°C	Ώρες-ημέρες	Οργανικοί δ/τες	Πολύ στενή	Ομοιόμρφο (σφαίρες,κυβοι, εξάγωνα)	Υψηλή

Πίνακας 3.2. Συγκεντρωτικά χαρακτηριστικά μεθόδων σύνθεσης σε διαλύματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

4.1 Εισαγωγή

Σύμφωνα με το Αμερικανικό Ινστιτούτο Καρκίνου, ο καρκίνος είναι υπεύθυνος για τον 1 στους 4 θανάτους. Λαμβάνοντας υπόψιν το θανατηφόρο της ασθένειας και στις περισσότερες περιπτώσεις την έλλειψη συμπτωμάτων μέχρι τα τελευταία στάδια, η μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης βασίζεται στην έγκαιρη διάγνωση. Ωστόσο, οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι διάγνωσης και θεραπείας είναι στις περισσότερες των περιπτώσεων αδύνατο να προσφέρουν έγκαιρη αναγνώριση και αποτελεσματική θεραπεία. Η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία αποτελούν τις κύριες μεθόδους θεραπείας του καρκίνου στα προχωρημένα στάδια. Παρόλα αυτά, καμία από αυτές δεν είναι αποκλειστικά ειδικευμένη για όγκους κυττάρων, προκαλώντας ουσιώδεις ζημιές σε υγιή ιστούς και όργανα και περιορίζοντας τη φαρμακευτική δόση θεραπείας [58].

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα μαγνητικά νανοσωματίδια έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας, εξαιτίας των μοναδικών ιδιοτήτων τους, που εμφανίζονται στην κλίμακα του νανομέτρου και της δυνατότητας εφαρμογής τους στην βιοϊατρική. Οι βιοϊατρικές εφαρμογές, ταξινομούνται ανάλογα με το εάν αυτές εφαρμόζονται σε ζωντανό οργανισμό (*in vivo applications*) ή σε τεχνητό περιβάλλον (*in vitro applications*). Μεταξύ αυτών, στις *in vitro* εφαρμογές, οι οποίες καλύπτουν κυρίως την περιοχή των διαγνωστικών, συμπεριλαμβάνονται ο μαγνητικός διαχωρισμός και η σήμανση κυττάρων. Αφετέρου, στις βασικότερες *in vivo* εφαρμογές συμπεριλαμβάνονται, η υπερθερμία και η στοχευμένη απελευθέρωση φαρμάκου που χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικές τεχνικές και η μαγνητική τομογραφία (MRI) που αποτελεί μια καθαρά διαγνωστική εφαρμογή.

Η καταλληλότητα των μαγνητικών νανοσωματιδίων για τη εφαρμογή τους στην βιοϊατρική, οφείλεται αρχικά στα διάφορα μεγέθη των νανοσωματιδίων, που μπορούν να παρασκευασθούν ελεγχόμενα και τα οποία χαρακτηρίζονται από διαστάσεις που ποικίλουν από μερικά νανόμετρα έως και δεκάδες νανόμετρα. Τα μεγέθη αυτά είναι πολύ μικρότερα ή ακόμη και συγκρίσιμα με το μέγεθος ενός κυττάρου (10-100 μm), ενός ιού (20-450 nm), μιας πρωτεΐνης (5-50 nm) ή/και ενός γονιδίου (2 nm πλάτος και μήκους 10-100 nm). Το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι πολύ σημαντικό και οφείλεται στο γεγονός ότι τα σωματίδια αυτά μπορούν να πλησιάζουν όλο και πιο κοντά στις παραπάνω βιολογικές οντότητες [1-3]. Επιπλέον, λόγω της μεγάλης επιφανείας τους, υπάρχει η δυνατότητα προσκόλλησης των βιολογικών μορίων πάνω στα νανοσωματίδια. Εκτός από το μέγεθος, τα μαγνητικά νανοσωματίδια πλεονεκτούν έναντι άλλων νανοσωματιδίων, καθώς:

- Είναι μαγνητικά, που συνεπάγεται τη δυνατότητα χειρισμού τους από απόσταση με εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, και τη συγκέντρωσή τους γύρω από έναν στόχο (στοχευμένη μεταφορά φαρμάκου).
- Είναι δυνατή η εκμετάλλευση της μαγνητικής ροπής των σωματιδίων προκαλώντας μεγαλύτερες μεταβολές στους ρυθμούς χαλάρωσης T₁ και T₂ (σκιαγραφικά/παράγοντες αντίθεσης στην τεχνική MRI).
- Υπό την επίδραση ενός εναλλασσόμενου, AC μαγνητικού πεδίου μετατρέπουν την απορροφούμενη ενέργεια σε θερμότητα (μαγνητική υπερθερμία).

Τα πιο διαδεδομένα μαγνητικά υλικά που βρίσκουν εφαρμογή στην βιοϊατρική είναι τα οξείδια του σιδήρου (γ-Fe₂O₃ και Fe₃O₄), ο φερρίτης του μαγγανίου (MnFe₂O₄), ο μεταλλικός σίδηρος (Fe) και ορισμένα κράματά του, όπως σίδηρος-κοβάλτιο (FeCo) και σίδηρος-λευκόχρυσος

(FePt). Μεταξύ αυτών, τα οξείδια του σιδήρου είναι βιοσυμβατά και εγκεκριμένα σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών ενώ τα μεταλλικά νανοσωματίδια (Fe, FeCo, FePt) που χαρακτηρίζονται από βελτιωμένες μαγνητικές ιδιότητες, είναι υπό μελέτη και αποτελούν υπό συνθήκες (περιορισμός τοξικότητας, δημιουργία σταθερών ferrofluids), ιδανικά υποψήφια υλικά για την εφαρμογή τους ως παράγοντες αντίθεσης στην τεχνική MRI ή/και ως παράγοντες θερμότητας στην μαγνητική υπερθερμία [4-10].

4.2 Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκου (Drug Delivery)

Ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα που αφορούν στις χημειοθεραπείες, είναι ότι αποτελούν τεχνικές μη-περιορισμένες. Ως γνωστόν, τα θεραπευτικά φάρμακα χορηγούνται ενδοφλεβίως, κάτι που οδηγεί σε μια γενική κατανομή, με αποτέλεσμα τη φθοροποιό επίδραση του φαρμάκου στα φυσιολογικά, υγιή κύτταρα πέραν των καρκικών στόχων, που τις περισσότερες φορές έχει επιπτώσεις στον ασθενή (εκτεταμένη τριχόπτωση, κόπωση, μικροβιακή μόλυνση, κτλ.). Η λογική πίσω από τη χρήση της νανοτεχνολογίας στο συγκεκριμένο πεδίο, είναι η στόχευση αντικαρκινικών φαρμάκων να γίνεται εντοπισμένα, σε συγκεκριμένο σημείο (π.χ. καρκινικός όγκος) του ανθρώπινου σώματος [1]. Ο αντικειμενικός στόχος αυτής της ιδέας, αποβλέπει στο (α) να περιοριστεί η ποσότητας της γενικής κατανομής του κυτταροτοξικού φαρμάκου, μειώνοντας έτσι και τις συνδεόμενες παρενέργειες, (β) να ελαττωθεί η δοσολογία που απαιτείται για αποτελεσματική, τοπική στόχευση του φαρμάκου και (γ) να ελαττωθεί το κόστος.

Κατά την στοχευμένη θεραπεία παρουσία εζωτερικού μαγνητικού πεδίου, ένα κυτταροτοξικό φάρμακο έρχεται σε επαφή με ένα βιοσυμβατό μαγνητικό φορέα νανοσωματιδίων, όπως είναι για παράδειγμα τα οξείδια του σιδήρου και χορηγούνται στον ασθενή, μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Κατά την εισαγωγή των νανοσωματιδίων στο αίμα, χρησιμοποιείται ένα εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο που περιορίζει το σύνθετο υλικό, σε συγκεκριμένο σημείο του σώματος, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.1 [11]. Αφού το φάρμακο συγκεντρωθεί σε αυτό το σημείο, απελευθερώνεται μέσω είτε ενζυματικής διαδικασίας, είτε με μεταβολή μερικών από τις φυσιολογικές συνθήκες όπως είναι για παράδειγμα το pH, η ώσμωση ή/και η θερμοκρασία, με σκοπό να απορροφηθεί από τον αντίστοιχο όγκο. Το παραπάνω σύστημα, γνωστό ως μαγνητικός φορέας φαρμάκων παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συνηθισμένων, μή- εντοπισμένων μεθόδων που χρησιμοποιούν κυτταροτοξικές ουσίες.



Σχήμα 4.1: Απεικόνιση υποθετικού μαγνητικού συστήματος παροχής φαρμάκου.Τα σωματίδια (1) περνούν από το αγγειακό σύστημα,(2) κατευθύνονται μέσω εξωτερικού μαγνητικού πεδίου που εφαρμόζεται στο σώμα, στο καρκινικό όγκο και (3) αποικοδομούνται εκεί αποδεσμεύοντας το φάρμακο [53].

Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς/στόχευσης φαρμάκων με εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου σχετίζεται με διάφορες φυσικές παραμέτρους (όπως η ένταση του μαγνητικού πεδίου και οι μαγνητικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων), υδροδυναμικές (όπως είναι ο ρυθμός ροής του αίματος, η συγκέντρωση των μαγνητικών σωματιδίων, η πορεία και το χρονικό διάστημα χορήγησης της φαρμακευτικής ουσίας) και φυσιολογικές παραμέτρους, όπως το βάθος του ιστού σε σχέση με την στοχευόμενη περιοχή (δηλαδή η απόσταση από την πηγή του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου), η αντιστρεπτότητα και η ανθεκτικότητα του φορέα με το φάρμακο, καθώς και η έκταση του όγκου.

Ο χρόνος παραμονής του μαγνητικού φορέα στο αίμα, επηρρεάζεται σημαντικά από το μέγεθος, το φορτίο, την επιφανειακή χημεία και την βιοσυμβατότητα των νανοσωματιδίων. Σε ότι αφορά το μέγεθος, εάν χορηγηθούν σωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερο από 200 nm, τότε αυτά διαχωρίζονται από τη σπλήνα και τελικά απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο χρόνος παραμονής των σωματιδίων αυτών στο αίμα. Αφετέρου, όταν τα σωματίδια είναι πολύ μικρά σε μέγεθος και συγκεκριμένα, μικρότερα των 10 nm, τότε αυτά απομακρύνονται από τα αγγεία πάρα πολύ γρήγορα και στην συνέχεια ακολουθεί ο καθαρισμός τους από τα νεφρά. Για ενδοφλεβική χορήγηση φαρμάκου προτιμώνται μεγέθη που κυμαίνονται μεταξύ των 10-100 nm, στα οποία έχει αποδειχθεί ότι ο χρόνος παραμονής τους στο αίμα είναι σημαντικά μεγαλύτερος. Τα σωματίδια αυτά έχουν αρκετά μικρό μέγεθος ώστε να αποφεύγουν το δικτυωτό ενδοθηλιακό σύστημα (*RES:Reticuloendothelial system*) του οργανισμού και να μπορούν, επιπλέον, να διαπερνούν τα πολύ μικρά τριχοειδή αγγεία των ιστών, παρέχοντας χωρίς αμφιβολία περισσότερο αποτελεσματική κατανομή των σωματιδίων αυτών στους ιστούς [5,12].

Επιπλέον, έχει ήδη αναφερθεί η ανάγκη τα μαγνητικά νανοσωματίδια να τροποποιούνται επιφανειακά με ένα βιοσυμβατό πολυμερές, ώστε να παρέχεται σε αυτά, προστασία από το γειτονικό τους περιβάλλον. Υπάρχουν δύο πιθανές διευθετήσεις τροποποίησης των σωματιδίων. Στην πρώτη περίπτωση, ο μαγνητικός πυρήνας των νανοσωματιδίων επικαλύπτεται από ένα βιοσυμβατό πολυμερές, το οποίο εμπεριέχει καρβοξυλομάδες (ή και αμινομάδες) πάνω στις οποίες μπορούν να προσδεθούν αντικαρκινικά φάρμακα ή άλλα βιολογικά μόρια (π.χ. πρωτείνες, αντισώματα), ενώ στην δεύτερη περίπτωση, ο μεταφορέας είναι ένα πορώδες βιοσυμβατό πολυμερές, στους πόρους του οποίου βρίσκονται διεσπαρμένα τα μαγνητικά νανοσωματίδια και η φαρμακευτική ουσία [13,14].



Σχήμα 4.2: Σχηματική απεικόνιση, διευθέτησης μαγνητικών μεταφορέων τροποποιημένα με πολυμερικά μόρια, όπου τα νανοσωματίδια είτε (Α) τροποποιούνται επιφανειακά με αμφίφιλα συμπολυμερή, είτε (Β) εγκλωβίζονται στο εσωτερικό των πόρων τους.

Συνοψίζοντας, τα μαγνητικά νανοσωματίδια που παρασκευάζονται για μεταφορά φαρμάκων, αποτελούνται από ένα μαγνητικό πυρήνα, στον οποίο μπορούν να προσδεθούν οι φαρμακευτικές

ουσίες (υδρόφοβη επιφάνεια) και μετά τροποποιούνται επιφανειακά για να μπορέσουν να εισαχθούν στον οργανισμό (υδρόφιλη επιφάνεια). Οι φαρμακευτικές ουσίες μπορούν να τοποθετηθούν στα νανοσωματίδια είτε με χημικό τρόπο, πριν την δημιουργία της υδρόφιλης επιφάνειας, είτε με φυσική απορρόφηση. Κυρίες φαρμακευτικές ουσίες που βρίσκουν εφαρμογή για μεταφορά τους μέσω μαγνητικών νανοσωματίδίων είναι: μιτοξατρόνη (mitoxatrone) [15,16], ταμοξιφένη (tamoxifen) [17], σεφραντίνη (cefradine) [18], δοξορουβικίνη (doxorubicin) [19–24], φλουνταραμπίνη (fludarabine) [25], σισπλατίνη (cisplatin) [26], μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα [27], αμεθοπτερίνη (amethopterin) [28,29], πακλιταξέλη (paclitaxel) [30,31], δικλοφενάκη νατριούχος (diclofenac sodium) [32,33], και άλλες.



Σχήμα 4.3: Σχηματική παρουσίαση του τρόπου διείσδυσης νανοφορέων στους ιστούς με όγκους μέσω του φολικού υποδοχέα και απελευθέρωση του φαρμάκου με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης [59].



Σχήμα 4.4: In vivo εφαρμογή τροποποιημένων υπερπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων, τα οποία με τη βοήθεια των μακροφάγων κυττάρων διεισδύουν στους λεμφαδένες για θεραπεύσουν τα παθογόνα κύτταρα. Στο σχήμα παρουσιάζεται επίσης και η εξέλιξη των μεταστατικών κυττάρων μετά από 24 ώρες της χορήγησης των νανοσωματιδίων [35].
4.3 Μαγνητική τομογραφία - Απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό (MRI)

Με την μαγνητική τομογραφία (MRI), η οποία εκμεταλλεύεται τον μαγνητικό πυρηνικό συντονισμό, εξάγονται σημαντικές πληροφορίες απεικόνισης ιστών και ζωτικών οργάνων. Επίσης, με την MRI τεχνική μπορεί να γίνει και εντοπισμός των βλαστοκυττάρων που μεταμοσχεύονται, ιδιαίτερα για την αναδόμηση/ θεραπεία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Εκτός όμως από τις ανατομικές πληροφορίες, η μαγνητική τομογραφία έχει την δυνατότητα να απεικονίσει διάφορες λειτουργικές διαδικασίες του σώματος καλύτερα από οποιαδήποτε άλλη απεικονιστική μέθοδο, διότι εκμεταλλεύεται την ανίχνευση παραμαγνητικών και υπερπαραμαγνητικών υλικών με διαφορετικές μαγνητικές ιδιότητες και τα προβάλει επιλεκτικά έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη φωτοαντίθεση, άρα και καλύτερη ποιότητα ισχυρό μαγνητικό πεδίο και σε συνδυασμό με ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα, με μορφή ραδιοσυχνοτήτων παράγονται λεπτομερείς εικόνες υψηλής ανάλυσης από το εσωτερικό του σώματος χωρίς τη χρήση των δυνητικά επιβλαβών ακτινοβολιών που χρησιμοποιούνται στις συμβατικές ακτινογραφίες ή/και αξονικές τομογραφίες.



Σχήμα 4.5: Σχηματική απεικόνιση μαγνητικού τομογράφου (MRI).

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί ως παράγοντες αντίθεσης στην τεχνική MRI για την ενίσχυση του σήματος, λόγω της ικανότητά τους να ενισχύουν το σήμα της φωτοαντίθεσης, που οφείλεται στις μοναδικές ιδιότητές τους όπως το μεγάλο εμβαδόν της επιφανείας τους και η υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά τους. Στους παράγοντες αντίθεσης, που χρησιμοποιούνται στην τεχνική MRI, προσδένονται κατάλληλα μόρια/υποκαταστάτες ώστε να εξασφαλιστεί η εκλεκτική δέσμευση των κακοηθών ιστών. Μεταξύ διαφόρων εμπορικά διαθέσιμων παραγόντων αντίθεσης, χρησιμοποιούνται κυρίως το γαδολίνιο (Gd) και υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου. Από αυτά, το γαδολίνιο χαρακτηρίζεται από χαμηλούς σχετικά χρόνους χαλάρωσης, δεν είναι βιοσυμβατό, έχει μικρό χρόνο ημι-ζωής και είναι πιθανόν να παρέχει κάποια τοξικότητα με το πέρας του χρόνου κατά την κυτταρική αποικοδόμηση (λόγω του κινδύνου διαρροής του τοξικού ιόντος Gd³⁺). Αντίθετα, υπερπαραμαγνητικά οξείδια του σιδήρου παρέγουν ισχυρή φωτοαντίθεση (contrast), η υψηλή μαγνητική ροπή που παρουσιάζουν και κατ' επέκταση η υψηλή τιμή μαγνήτισής τους ενισχύουν το σήμα στην απεικόνιση με MRI, περιέχουν σίδηρο (Fe) που είναι

βιοδιασπώμενος, έχουν κατάλληλα τροποποιημένη επιφάνεια επιτρέποντας την απευθείας πρόσδεση διαφόρων λειτουργικών ομάδων και υποκαταστατών, ανιχνεύονται εύκολα με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία και μπορούν εύκολα να διαχειριστούν μαγνητικά και να αλλάζουν τις μαγνητικές τους ιδιότητες, ανάλογα με το μέγεθός τους. Ωστόσο, υπάρχουν λίγοι εμπορικά διαθέσιμοι παράγοντες αντίθεσης οξειδίων του σιδήρου, όπως Endorem®, Feridex® και Sinerem®, οι οποίοι παράγονται από μαγνητικούς πυρήνες, σε μερική συσσωμάτωση, και είναι εμφυτευμένοι/ενσωματωμένοι σε υδρόφιλα πολυμερή όπως η δεξτράνη, το άμυλο ή η λευκωματίνη [36].

Σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων, υπάρχουν δυο κύριες κατηγορίες οξειδίων του σιδήρου ως παράγοντες αντίθεσης:

α) Υπερπαραμαγνητικά οζείδια του σιδήρου με υδροδυναμική διάμετρο ≥ 50 nm

Λόγω του σχετικά μεγάλου μεγέθους τους εγκλωβίζονται από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα μόλις χορηγηθούν στον οργανισμό. Μέσα σε λίγα λεπτά εντοπίζονται από τα μακροφάγα και το 80% της χορηγηθείσας ποσότητας καταλήγει στο συκώτι και το 5–10 % στη σπλήνα, καθιστώντας τα συγκεκριμένα σωματίδια κατάλληλα για απεικόνιση των οργάνων αυτών [37].

β) Υπερπαραμαγνητικά οξείδια του σιδήρου με υδροδυναμική διάμετρο ≤ 50 nm

Λόγω του μικρού μεγέθους και των επιφανειακών υδροφιλικών ιδιοτήτων, έχουν 2 h ημιζωής στο πλάσμα του αίματος, και παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος για αρκετό χρόνο, ώστε να χρησιμοποιούνται για την μαγνητική αγγειογραφική απεικόνιση (Magnetic Resonance Angiography, MRA) [38].

4.4 Μαγνητική υπερθερμία (MH: Magnetic Hyperthermia)

Η αντιμετώπιση του καρκίνου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα θέματα που καλείται να αντιμετωπίσει η σύγχρονη επιστήμη, δεδομένου ότι η ασθένεια αυξάνεται με ανησυχητικούς ρυθμούς και αποτελεί εξέχον πρόβλημα διεθνώς, ιδιαίτερα στις προηγμένες χώρες. Ο ευεργετικός ρόλος της υπερθερμίας στηρίζεται στην υψηλή ευαισθησία που παρουσιάζουν τα κύτταρα που περιέχουν όγκους στη θερμοκρασία, σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, βασίζεται στη μέση κυτταρική αδρανοποίηση, που προκαλείται με θέρμανση των ιστών ή/και οργάνων σε θερμοκρασία υψηλότερη από τους 42°C. Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την υπερθερμία των καρκινικών ιστών είναι οι υπέρηχοι, τα μικροκύματα και οι ακτίνες laser, οι οποίες προκαλούν προβλήματα, λόγω ανομοιογενούς θερμότητας. Το 1957, προτάθηκε για πρώτη φορά η εφαρμογή με ενέσιμη χορήγηση, μαγνητικών σωματιδίων σε καρκινικό ιστό, τα οποία υπό την επίδραση ενός εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου ήταν ικανά να προκαλέσουν την αύξηση της θερμοκρασίας στην περιοχή του όγκου [39]. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια συσσωρεύονται εκλεκτικά στους καρκινικούς όγκους και καθώς εκτίθενται σε ένα εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο, απορροφούν ενέργεια αυξάνοντας την ευθυγράμμισή τους με το εφαρμοζόμενο πεδίο (κατάσταση υψηλότερης ενέργειας). Με την παύση του πεδίου, τα σωματίδια υφίστανται γαλάρωση και η αποθηκευμένη ενέργεια μετατρέπεται στη συνέχεια σε θερμότητα που οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας τοπικά γύρω από τον όγκο [40]. Η μαγνητική υπερθερμία των υγρών επιτυγχάνει τοπική θέρμανση σε βάθος περιοχών του οργανισμού, με ομοιογενή έλεγχο της θερμοκρασίας, άρα και της θερμότητας και τα νανοσωματίδια μπορούν να επιτύχουν την κυτταρική εκλεκτικότητα μέσω επιφανειακής τροποποίησης [37].

Η αποτελεσματικότητα της μαγνητικής υπερθερμίας ως θεραπεία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά, τόσο των μαγνητικών ρευστών, όσο και

των πειραματικών διατάξεων (ένταση πεδίου, συχνότητα) και μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω, εάν συνδυαστεί και με άλλες θεραπευτικές ή/και διαγνωστικές τεχνικές, όπως είναι για παράδειγμα η στοχευμένη μεταφορά φαρμάκου και η μαγνητική τομογραφία [41,42]. Παρά το γεγονός ότι σε μελέτη παρατηρήθηκε εννέα φορές μεγαλύτερη συγκράτηση των μαγνητικών νανοσωματιδίων από παθογόνα κύτταρα σε σχέση με υγιή, μέχρι στιγμής έχουν εντοπισθεί οι εξής παρενέργειες της υπερθερμίας σε πειραματόζωα: εγκεφαλική νέκρωση, οιδήματα, τοπικές αιμορραγίες και κατάγματα [43].



Σχήμα 4.6: Σχηματική απεικόνιση τροποποίησης μαγνητικού νανοσωματιδίου και απελευθέρωση του φαρμάκου DOX μέσω υπερθερμίας.



Σχήμα 4.7: In vivo θεραπευτικές εφαρμογές των μαγνητικών νανοσωματιδίων. (a) Μαγνητικά νανοσωματίδια (γκρι σφαίρες) έχουν συνδεθεί με δραστικές ουσίες λειτουργώντας ως συστήματα στοχευμένης χορήγησης και αποδέσμευσης φαρμάκου με τη χρήση ενός εξωτερικού μαγνήτη που τοποθετείται πάνω από τον ιστό – στόχο. (b) Στη μαγνητικά επαγόμενη υπερθερμία, τα μαγνητικά νανοσωματίδια συσσωρεύονται στον καρκινικό ιστό και θερμαίνονται με την επίδραση εξωτερικού εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου, με αποτέλεσμα τη νέκρωση των καρκινικών κυττάρων (κόκκινες σφαίρες) [54].

4.5 Αποτοξίκωση Βιολογικών Υγρών (Detoxification of Biological Fluids)

Σε μια προσπάθεια να απομονωθούν ζωντανά κύτταρα από βιολογικά υγρά που περιέχουν τοξικές ουσίες, αναπτύχθηκαν νανοσωματίδια τα οποία φέρουν στην επιφάνεια τους αντισώματα για την πρόσδεση τους στα κύτταρα. Μαγνητικά σφαιρίδια επικαλύπτονται με αντισώματα, τα

οποία δρουν με τα αντιγόνα της επιθηλιακής επιφάνειας (epithelial surface antigens, ESA, clone VU- 1D9) [44]. Το μέγεθος των σωματιδίων κυμαίνεται από τα 50 nm μέχρι μερικά μm. Το υλικό της μήτρας είναι κυρίως πυριτία και σε ορισμένες περιπτώσεις πολυστυρένιο. Κατά τον εγκλωβισμό ποσότητας αίματος από το δείγμα, τα επικαλυμμένα σφαιρίδια με επιθηλιακά αντισώματα, προσδένονται στα επιθηλιακά κύτταρα. Τα αναγνωριστικά κύτταρα μπορούν να εξευγενιστούν μέσω βημάτων καθαρισμού πάνω σε μαγνητική βάση. Σε όλες τις περιπτώσεις, η καθαρότητα, ο ρυθμός ανάρρωσης και η κατάσταση των απομονωμένων κυτταρικών όγκων οφείλονται στον αριθμό των πλύσεων, τη σύσταση και τα χαρακτηριστικά των αναγνωριστικών σφαιριδίων [45].

4.6 Αναδόμηση Ιστών και Γενετική Μηχανική (tissue repair and tissue engineering)

Η αναδόμηση ιστών χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου επιτυγχάνεται είτε μέσω συγκόλλησης (welding), θέτοντας σε επαφή δυο επιφάνειες ιστών οι οποίες θερμαίνονται ομοιόμορφα για να ενωθούν, είτε μέσω μηχανικής συγκόλλησης (soldering), κατά την οποία οι πρωτεΐνες ή τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια με συνθετικά πολυμερή τοποθετούνται ανάμεσα σε δυο επιφάνειες ιστών για να ενισχύσουν τη σύνδεση των ιστών. Θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50°C είναι γνωστό ότι προκαλούν την ένωση των ιστών [46]. Χρήσιμα είναι επίσης τα νανοσωματίδια που επικαλύπτονται με χρυσό ή πυριτία, διότι έχουν την ικανότητα να απορροφούν το φως ή την προσπίπτουσα ακτινοβολία και εμφανίζουν εφαρμογές στην αναδόμηση των ιστών [47,48]. Έρευνες βρίσκονται σε εξέλιξη από το 2000, κατά τις οποίες γίνεται εφαρμογή μαγνητικού πεδίου και ενσωμάτωση των νανοσωματίδίων για τη γενετική μηχανική των ιστών (tissue engineering) [49]. Οι έρευνες επικεντρώνονται σε δυο εφαρμογές: έλεγχο της κυτταρικής συμπεριφοράς μέσω στόχευσης με μαγνητική δύναμη [50,51] και προσανατολισμό και κινητοποίηση των κυττάρων για in vitro αναγέννηση (γέννηση κατ' εναλλαγή) των ιστών [52].

4.7 Γονιδιακή Θεραπεία

Η γονιδιακή θεραπεία είναι μια πολλά υποσχόμενη ιατρική θεραπεία για γενετικές ανωμαλίες, καρδιαγγειακές παθήσεις και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Ο μηχανισμός λειτουργίας της γονιδιακής θεραπείας είναι η διόρθωση των γενετικών ανωμαλιών ή η παραγωγή εξωγενών πρωτεϊνών/ πεπτιδίων, τα οποία θα ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, με παρεμβολή εξωγενούς κομματιού DNA. Για να εκτιμηθεί όμως η γονιδιακή θεραπεία πρέπει να εξελιχθεί ένας κατάλληλος ξενιστής/ φορέας μεταφοράς γονιδίου. Μια μέθοδος που μπορεί να αποδειχθεί πολύ καλή είναι η εκμετάλλευση της κλίσης πεδίου (field gradient) που συγκεντρώνει στη χωρική γειτονία του τα μαγνητικά σωματίδια με χρήση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (magnetofection). Με αυτή τη μέθοδο DNA προσκολλάται σε ένα μικρο- ή νανοσωματιδιακό μαγνητικό φορέα όπως αρχικά ανέπτυξαν και οι Mah et al. [53,54]. Τα σημαντικά πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι: η μικρότερη ποσότητα φορέων που χρειάζεται για να επιτευχθεί ένα επίπεδο κορεσμού με εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, ο μικρός χρόνος εγκλωβισμού για την καλύτερη κλίση πεδίου και η δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων σε μη- ανεκτικά κύτταρα [55,56].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Οι ιδιότητες των μαγνητικών νανοσωματιδίων, μπορούν να καθοριστούν με πλήθως τεχνικών χαρακτηρισμού. Ο <u>δομικός χαρακτηρισμός</u> τους πραγματοποιείται κυρίως με την τεχνική περίθλασης ακτίνων-X (XRD), ενώ ο μορφολογικός έλεγχος</u> γίνεται με την ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) και την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Ο χαρακτηρισμός της επιφανείας των νανοσωματιδίων επιβεβαιώνεται κυρίως με τη φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR) και τη διαφορική θερμική/θερμοβαρυτική ανάλυση (DTA/TGA), ενώ το <u>επιφανειοδραστικό φορτίο</u> καθορίζεται με τη τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Οι μαγνητικές ιδιότητες</u> των νανοσωματιδίων προσδιορίζονται, με μετρήσεις της μαγνήτισης που μπορούν να λάβουν χώρα σε ένα μαγνητόμετρο παλλόμενου δείγματος (VSM)

5.1 Δομικός Χαρακτηρισμός (Περίθλαση Ακτίνων-Χ)

Η περίθλαση των ακτίνων X (XRD) είναι μια τεχνική η οποία δίνει λεπτομερείς πληροφορίες για τη κρυσταλλογραφική δομή των φυσικών και συνθετικών υλικών χωρίς να τα καταστρέφει. Το μήκος κύματος των ακτίνων X είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με το μήκος των ενδοατομικών αποστάσεων (απόσταση κρυσταλλικών επιπέδων) ενός κρυστάλλου. Η εικόνα περίθλασης που προκύπτει χαρακτηρίζει μονοσήμαντα το υλικό και χρησιμοποιείται για τη δομική ταυτοποίηση των δειγμάτων. Με την περίθλαση ακτινών-X είναι δυνατή η επακριβής μέτρηση των αποστάσεων των ατόμων στο κρυσταλλικό πλέγμα, καθώς και ο προσδιορισμός της πλεγματικής δομής σύνθετων κρυστάλλων αυξημένης δομικής πολυπλοκότητας.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε περιθλασίμετρο ακτίνων XD 500 της Siemens στο οποίο η ακτινοβολία προέρχονταν από χαλκό (K_a, 40 eV, 35 mA), ενώ η σάρωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε περιοχή 2θ =20-80°, με βήμα 0.03°/5s (Σχήμα 3.1). Οι ακτίνες-X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με τυπική ενέργεια φωτονίων 100 eV – 100 keV. Για εφαρμογές περίθλασης χρησιμοποιούνται μόνο μικρού μήκους κύματος ακτίνες-X σε μήκος λίγων Å. Εξαιτίας του μήκους κύματος των ακτινών-X που είναι συγκρίσιμο με το μέγεθος του ατόμου, είναι ιδανικές για την μελέτη της κρυσταλλικής δομής των υλικών. [12]



Σχήμα 5.1: Η διάταξη ακτίνων Χ που χρησιμοποιήθηκε για το δομικό χαρακτηρισμό.

Από το φάσμα ακτίνων-Χ μπορεί επίσης να υπολογιστεί το μέσο μέγεθος κόκκων των δομών που μελετώνται. Το πλάτος της καμπύλης του Σχήματος 3.2 αυξάνει καθώς το πάχος του κρυστάλλου

μειώνεται, επειδή το γωνιακό εύρος $(2\theta_1 - 2\theta_2)$ αυξάνει καθώς ο αριθμός των επιπέδων μειώνεται. Το πάχος B συνήθως υπολογίζεται σε ακτίνια, σε πυκνότητα ίση με το μισό της μέγιστης πυκνότητας. Μια προσέγγιση του πάχους B είναι το μισό της διαφοράς μεταξύ των δύο οριακών γωνιών, στις οποίες η πυκνότητα είναι μηδενική, το οποίο προϋποθέτει ότι η γραμμή απόκλισης είναι τριγωνικής μορφής. O Scherrer [1] ανέπτυξε μια εξίσωση μέσω της οποίας υπολογίζεται το μέγεθος μικρών κρυστάλλων από το πάχος της καμπύλης ανάκλασης:

$$t = \frac{\lambda}{B\cos\theta_{\rm B}}$$

ή με καλύτερη προσέγγιση:

$$t = \frac{0.9\lambda}{B\cos\theta_{\rm B}}$$
 E\xi. 5.1

Πρέπει να τονιστεί ότι ο υπολογισμός του μεγέθους με βάση την εξίσωση του Scherrer (Εξ. 5.1) περιέχει σφάλμα, διότι η τιμή που λαμβάνεται δεν ανταποκρίνεται στο μέσο μέγεθος κόκκων, αλλά στο μέγιστο μέγεθος κόκκων και γι' αυτό εμφανίζεται απόκλιση τιμών.



Σχήμα 5.2: Επίδραση του τέλειου κρυσταλλικού μεγέθους στην καμπύλη ανάκλασης.

5.2 Μορφολογικός Χαρακτηρισμός

5.2.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (ΤΕΜ)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (ΤΕΜ) είναι μια τεχνική μικροσκοπίας στην οποία αντί για φως χρησιμοποιείται δέσμη ηλεκτρονίων προκειμένου να δημιουργήσει μεγενθυμένα είδωλα των αντικειμένων που εξετάζονται. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης είναι από τις σημαντικότερες τεχνικές εξαιτίας του γεγονότος ότι μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων δίνει τη δυνατότητα πολύ μεγάλης διακριτικής ικανότητας που μπορεί να φθάσει περίπου 2.5 Å. Η τεχνική βασίζεται στο διαφορετικό ποσοστό σκέδασης της δέσμης των ηλεκτρονίων ανάλογα με την διαφορετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα ή το διαφορετικό πάχος που έχουν τα υλικά, δημιουργώντας ένα είδωλο με φωτεινές και σκοτεινές περιοχές. Όσο μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα έχει ένα υλικό ή όσο πιο παχύ είναι, τόσο πιο σκοτεινό είναι το είδωλό του στην επιφάνεια καταγραφής Η καταγραφή των εικόνων της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έγινε με μικροσκόπιο TEM Philips CM20 που λειτουργεί με τάση 200kV. Με αυτή την τεχνική, τα σωματίδια που είναι σε μορφή διαλύματος ή αιωρήματος σε χλωροφόρμιο (μερικά μL) γ-Fe₂O₃, τοποθετούνται σε ειδικό δειγματοφορέα, ο οποίος αποτελείται από πλέγμα Cu καλυμμένο με C (carbon-coated copper grid), με στόχο να ελεγχθεί το πραγματικό μέσο μέγεθος των σωματιδίων, η τυπική απόκλιση και η διασπορά τους στα δ/τα. Οι πληροφορίες που δύναται να εξαχθούν με το ΤΕΜ αφορούν στη μορφολογία του δείγματος (μέγεθος, σχήμα, διάταξη σωματιδίων), στην κρυσταλλογραφική κατάσταση αυτού σε μεσοσκοπική και μικροσκοπική κλίμακα (διάταξη ατόμων στο υλικό, το βαθμό της δομικής τους τάξης, ακριβής υπολογισμός των πλεγματικών αποστάσεων, ανίχνευση ατελειών) καθώς επίσης και στη σύσταση του [2].



Σχήμα 5.3: α) Βασικά οπτικά στοιχεία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διερχόμενης δέσμης. Το δείγμα τοποθετείται στη θέση Α και μέσω διαδοχικών ενδιάμεσων ειδώλων σχηματίζεται η τελική εικόνα στη θέση Ε, β) εικόνα σύγχρονου ΤΕΜ (JEOL 2010F)

5.2.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σαρωτικής δέσμης (SEM) δίνει τη δυνατότητα για παρατήρηση και χαρακτηρισμό επιφανειών. Το δείγμα βομβαρδίζεται με δέσμη ηλεκτρονίων ορισμένης ενέργειας από 5 ως 40 keV. Κατά τον βομβαρδισμό αυτό παράγονται δευτερογενή ηλεκτρόνια, σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, ηλεκτρόνια Auger και ακτίνες-Χ. Στη μελέτη με σαρωτικό μικροσκόπιο ιδιαίτερη σημασία έχουν τα δευτερογενή ηλεκτρόνια και τα σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια γιατί μ' αυτά παράγεται το είδωλο της εικόνας που παρατηρούμε με μεγάλη διακριτική ικανότητα. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια παράγονται από ανελαστικές κρούσεις ανάμεσα στα ηλεκτρόνια της δέσμης και τα άτομα του στόχου. Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια και οι ακτίνες Χ, δίνουν πληροφορίες για την χημική σύσταση του δείγματος. Έτσι αφού το προς εξέταση δείγμα επικαλυφθεί με ένα λεπτό μεταλλικό στρώμα προκειμένου να καταστεί αγώγιμη η επιφάνειά του και τοποθετηθεί στο θάλαμο όπου υπάρχει υψηλό κενό, βομβαρδίζεται με μια δέσμη ηλεκτρονίων και λαμβάνεται η εικόνα με την βοήθεια της οποίας γίνονται οι οπτικές παρατηρήσεις του δείγματος [3].

5.3 Χαρακτηρισμός Επιφανειακής Τροποποίησης

Η επιφανειακή τροποποίηση των σωματιδίων επιβεβαιώθηκε με φασματόμετρο μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) Excalibur - FTS 3000MX, με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (micro FT- IR). Το φάσμα του οργανικού περιεχομένου των δειγμάτων πάρθηκε με την τεχνική φασματομετρίας ανάκλασης μέσου υπερύθρου. Με τη βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου προσδιορίστηκε η πιο πυκνή στρώση του δείγματος. Η υπέρυθρη φασματομετρία είναι οπτική μέθοδος ανάλυσης και στηρίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης που είναι κβαντισμένες. Η υπέρυθρη φασματομετρία διερευνά τις μοριακές δονήσεις (τάσης και κάμψης) και όχι τις ηλεκτρονιακές διεγέρσεις και μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη δομή της ουσίας. Απαραίτητη είναι η ύπαρξη μεταβολής στο μέγεθος και στην διεύθυνση της διπολικής ροπής του δεσμού.

Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από την περιοχή του ορατού μέχρι την περιοχή των μικροκυμάτων και υποδιαιρείται στις περιοχές του:

- 1. Eyyúc IR (near IR) $0.8 2.5 \,\mu\text{m} (12.500 4.000 \,\text{cm}^{-1})$
- 2. Mérou IR (middle IR) $2.5 25 \ \mu m (4.000 400 \ cm^{-1})$
- 3. $A\pi\omega$ IR (far IR) 25 1000 µm (400 10 cm⁻¹).

Η κύρια περιοχή που παρουσιάζει ενδιαφέρον για αναλυτικούς σκοπούς είναι το μέσο IR, από 4.000 έως 400 κυματάριθμους (cm⁻¹) (κυματάριθμος = $1/\lambda$, λ : μήκος κύματος σε cm).

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματομετρίας διακρίνουμε δύο περιοχές, αυτή των χαρακτηριστικών ομάδων 4.000 – 1.400 cm⁻¹ που οι ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση ομάδων και στην περιοχή 1.400 – 600 cm⁻¹ όπου οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολοκλήρου του μορίου και η περιοχή αυτή αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα κάθε ένωσης. Τέλος, είναι δυνατή η μελέτη μοριακών αλλαγών και αλληλεπιδράσεων. Για παράδειγμα, δεσμοί υδρογόνου και ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις προκαλούν συνήθως είτε μετατοπίσεις στην συχνότητα απορρόφησης, είτε αλλαγή στο συντελεστή μοριακής απορρόφησης. Και οι δύο αυτές φασματικές διαφορές μπορούν να μελετηθούν λεπτομερώς με την τεχνική των φασμάτων διαφοράς. [12]

5.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μια χρήσιμη τεχνική για τη μελέτη του μεγέθους σωματιδίων σε δ/τα, η οποία εκμεταλλεύεται την κίνηση Brown των διασπειρόμενων σωματιδίων. Η δυναμική σκέδαση φωτός στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ένα διάλυμα τα σωματίδια βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση, λόγω της θερμικής ενέργειας που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω των συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (*κίνηση Brown*) έτσι ώστε η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα να συνδέεται ποσοτικά με την κίνηση των μορίων.Υπό τη θεώρηση των ομόδυνων συνθηκών σκέδασης, οι οποίες εύκολα πληρούνται σε αιωρήματα που δεν περιέχουν σκόνη, η εξίσωση αυτοσυσχέτισης του κανονικοποιημένου ηλεκτρικού πεδίου με το χρόνο $g^{(1)}(q,t) = \langle E(q,t) \rangle E(q,0) \rangle / \langle E(q,0)^2 \rangle$ σχετίζεται με την εξίσωση αυτοσυσχέτισης του Siegert [4]:

$$g^{(2)}(q,t) = B[1 + f^* | g^{(1)}(q,t) |^2]$$
 Eξ. 5.2

όπου το *B* περιγράφει τη συμπεριφορά μεγάλου καθυστέρησης του $g^{(2)}(q,t)$ και το f^* αντιπροσωπεύει έναν παράγοντα του οργάνου που αποκτάται πειραματικά από μετρήσεις ενός αραιωμένου δ/τος πολυστυρενίου/ τολουολίου. Για τη δική μας περίπτωση η συσχέτιση της οπτική ίνας καταλήγει σε $f^* \cong 1$.

Η εξίσωση συσχέτισης του ηλεκτρικού πεδίου με το χρόνο $g^{(1)}(t)$ (χάριν συντόμευσης απαλείφεται η εξάρτηση από το q στη συνέχεια) αναλύεται ως σταθμισμένο άθροισμα των εκθετικών εισφορών, δηλαδή:

όπου η δεύτερη ισότητα είναι η λογαριθμική αναπαράσταση του χρόνου χαλάρωσης. Η διασπορά των χρόνων χαλάρωσης $\angle (\ln \tau)$ αποκτάται από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace (ILT) του $g^{(1)}(q,t)$ χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο CONTIN [5]. Η φαινομενική ακτίνα των αιωρούμενων σωματιδίων προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τη σχέση των Stokes-Einstein [4]:

$$R_{h} = \frac{k_{B}T}{6\pi\eta D}$$
 Eξ. 5.4

3 όπου $k_{\rm B}$ είναι η σταθερά του Boltzman, η είναι το ιξώδες του δ/τος και D ο συντελεστής αυτοδιάχυσης των σωματιδίων. Το τελευταίο υπολογίζεται από $D = \frac{1}{\tau q^2}$, όπου τ είναι ο χρόνος

χαλάρωσης του $g^{(1)}(q,t)$.

5.5 Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (ζ-δυναμικό)

Η ανάπτυξη φορτίου στην επιφάνεια των σωματιδίων επιδρά στην ανακατανομή των ιόντων στην ενδιάμεση περιοχή μεταξύ τους με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης αντίθετα φορτισμένων ιόντων κοντά στην επιφάνεια των σωματιδίων. Έτσι γύρω από κάθε σωματίδιο δημιουργείται ένα διπλό στρώμα φορτίων (Σχήμα 5.4) [6]. Η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται μεταξύ του πυκνού στρώματος και της κυρίως μάζας του διαλύματος(διάχυτο νέφος) ορίζεται ως Ζήτα δυναμικό (zeta potential) ή ηλεκτροφορητικό δυναμικό.



Σχήμα 5.4: Αναπαράσταση επιφάνειας επαφής σωματιδίου-υγρού περιβάλλοντος, και απόκριση Ζήτα δυναμικού (βαίνει μειούμενη) με την απόσταση από την επιφάνεια επαφής.

Το **Ζ-δυναμικό** ορίζεται ουσιαστικά ως η φόρτιση που αναπτύσσεται στη διεπιφάνεια μεταξύ μιας στερεής επιφάνειας και του υγρού μέσου της. Η καθαρή φόρτιση στην επιφάνεια των σωματιδίων επηρεάζει την κατανομή ιόντων στην κοντινή περιοχή, αυξάνοντας την συγκέντρωση των αντίθετων ιόντων κοντά στην επιφάνεια και η οποία βαίνει μειούμενη με την απόσταση. Το δυναμικό αυτό δρα παρεμποδίζοντας την συνένωση των κολλοειδών και συνεπώς για γίνει συνένωση των κολλοειδών το διάλυμα πρέπει να αποσταθεροποιηθεί είτε με ελάττωση του ζ-δυναμικού είτε με παρεμπόδιση της δράσης του.

Αν όλα τα σωματίδια τα οποία βρίσκονται διεσπαρμένα μέσα σε μία φάση έχουν ένα μεγάλο αρνητικό ή θετικό ζ-δυναμικό, οι δυνάμεις άπωσης μεταξύ τους θα είναι ισχυρές με αποτέλεσμα τη σταθερότητα του διαλύματος. Στην περίπτωση όμως χαμηλού ζ-δυναμικού όπου δεν υπάρχουν οι δυνάμεις παρεμπόδισης της συνένωσης των σωματιδίων, λαμβάνει χώρα η κροκίδωση. Η διαχωριστική γραμμή ανάμεσα σε σταθερά και ασταθή διαλύματα είναι συνήθως τα ± 30mV. Τα κολλοειδή τα οποία παρουσιάζουν τιμές ζ-δυναμικού άνω των προαναφερθέντων συνήθως χαρακτηρίζονται ως σταθερά.

5.6 Χαρακτηρισμός Μαγνητικών Ιδιοτήτων

Οι μαγνητικές ιδιότητες προσδιορίστηκαν με τη χρήση μαγνητόμετρου δονούμενου δείγματος (VSM) Model 155 που φαίνεται στο Σχήμα 5.5, συνδεδεμένο με συσκευή μέτρησης του μαγνητικού πεδίου Bell 640 Gaussmeter και η πηγή του μαγνητικού πεδίου της Danfysik, System 8000. Το μαγνητικό πεδίο που χρησιμοποιήθηκε είναι 2T (20 kOe), ενώ οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.4, ένα μαγνητικό δοκίμιο τοποθετείται σε ένα ομογενές μαγνητικό πεδίο, το οποίο παράγεται από έναν ηλεκτρομαγνήτη, με στόχο τη μαγνήτιση του δοκιμίου. Στο VSM, ένα δείγμα το οποίο έχει μαγνητιστεί από ένα ομογενές μαγνητικό πεδίο ταλαντώνεται με ημιτονοειδή μορφή με ένα συγκεκριμένο πλάτος σύμφωνα με τα σταθερά πηνία ανίχνευσης (Σχήμα 5.5 Δεξιά) [7] και παρατηρείται η μεταβολή του πεδίου εξαιτίας της κίνησης. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των μαγνητικών ιδιοτήτων λεπτών υμενίων ή κρυσταλλικών συστημάτων όπως μαγνητικά οξείδια. Αυτό γίνεται εφαρμόζοντας μαγνητικό πεδίο ορισμένης έντασης σε συγκεκριμένη θερμοκρασία [8]. Με την εφαρμογή ενός μαγνητομέτρου VSM, λαμβάνεται ένα διάγραμμα μαγνήτισης συνάρτησει του πεδίου και στην περίπτωση ενός ισχυρά μαγνητικού υλικού δίνεται ο χαρακτηριστικός βρόχος υστέρησης, από τον οποίο εξάγονται χρήσιμες πληροφορίες για τις μαγνητικές ιδιότητες του υλικού [9].



Σχήμα 5.5: <u>Αριστερά</u> Μαγνητόμετρο Δονούμενου Δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για τον μαγνητικό χαρακτηρισμό των δοκιμίων. <u>Δεξιά</u> Μεγέθυνση τοποθετημένου δοκιμίου σε ομογενές μαγνητικό πεδίο.

5.7 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) δίνει πληροφορίες για το χημικό περιβάλλον συγκεκριμένων πυρήνων. Στην περίπτωση μελέτης οργανικών και οργανομεταλλικών ενώσεων, η φασματοσκοπία NMR πρωτονίου (¹H) και άνθρακα (¹³C) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη. Οι πυρήνες αυτοί ερευνήθηκαν πρώτοι, κυρίως για δυο λόγους: 1) ανιχνεύονται πιο εύκολα σε σχέση με άλλους πυρήνες και 2) τα άτομα του υδρογόνου και του άνθρακα είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στην οργανική χημεία. Μια άλλη ενδιαφέρουσα εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR είναι η μελέτη της κίνησης και ο μηχανισμός των χημικών αντιδράσεων. Παρακολουθώντας τις αλλαγές

του φάσματος NMR στο μείγμα μιας αντίδρασης μπορούμε απευθείας να υπολογίσουμε τη σχετική ταχύτητα της.

Οι πυρήνες που αφορούν τη φασματοσκοπία NMR έχουν γωνιακή στροφορμή spin $(I \neq 0)$. Τα πειράματα NMR στηρίζονται στην περιστροφή των θετικά φορτισμένων σωματιδίων, που δημιουργεί μικρά μαγνητικά πεδία τα οποία ευθυγραμμίζονται παράλληλα ή αντιπαράλληλα με ένα εξωτερικά εφαρμοζόμενο πεδίο. Το spin ενός δεδομένου πυρήνα είναι ο συνδυασμός των spin των πρωτονίων και των νετρονίων. Τα σωματίδια αυτά έχουν κβαντικό αριθμό spin ίσο με 1/2. Σε μερικούς πυρήνες, τα πυρηνικά spin των πρωτονίων και των νετρονίων είναι όλα ανά ζεύγη, για παράδειγμα στον ¹²C και ¹⁶O, με αποτέλεσμα I = 0. Όταν $I > \frac{1}{2}$, ο πυρήνας έχει πυρηνική τετραπολική στροφορμή. Πειράματα NMR με τετραπολικούς πυρήνες είναι δυνατά, είναι όμως πιο δύσκολα από αυτά με $I = \frac{1}{2}$ διότι τα σήματα NMR που παίρνουμε είναι ιδιαίτερα ευρεία εξ αιτίας της τυχαίας αλληλεπίδρασης των πυρηνικών τετραπόλων τους. Όταν δεν εφαρμόζει ισχυρό εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (B_0), όλοι οι προσανατολισμοί των πυρήνων με $I = \frac{1}{2}$ είναι ισοδύναμοι. Στην αντίθετη περίπτωση, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες όπως και τα μαγνητικά τους πεδία που ευθυγραμμίζονται είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα (μια λιγότερη σταθερή διευθέτηση) ως προς την διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου. Τα φαινόμενο αυτό συμβαίνει εξαιτίας του ότι η ενέργεια των πυρηνικών spin είναι κβαντισμένη. Για $I = \frac{1}{2}$, υπάρχουν δυο επιτρεπτές τιμές του κβαντικού αριθμού της γωνιακής στροφορμής πυρηνικού spin, $m_1 = \frac{1}{2}$ ή - $\frac{1}{2}$. Η διαφορά ενέργειας (ΔE) μεταξύ των δυο αυτών πυρηνικών καταστάσεων είναι πολύ μικρή, και σε κανονικές θερμοκρασίες, η χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση $(m_1 = -\frac{1}{2})$ είναι ελάχιστα περισσότερο κατειλημμένη από ότι η υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση ($m_1 = \frac{1}{2}$). Το πλάτος της ΔΕ αυξάνει γραμμικά με την ένταση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου (B_{o}) και οι μεταβολές της ενέργειας βρίσκονται στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η ΔΕ δίνεται από την εξίσωση:

$$\Delta E = h v_o = \frac{\gamma}{2\pi} B_o$$
 Eξ. 5.5

όπου το γ είναι γνωστό ως ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα. Η δράση του μαγνητικού πεδίου B_0 πάνω στον περιστρεφόμενο πυρήνα έχει ως αποτέλεσμα την προώθησή του σε κυκλική κίνηση γύρω από τον άξονα του εφαρμοσμένου μαγνητικού πεδίου υπό γωνία θ ως προς τη διεύθυνση του πεδίου. Η συχνότητα Larmor (ή γωνιακή συχνότητα) ω_0 της κίνησης δίνεται από την Εξ. 5.6 [10]:

$$\omega_o = 2\pi v_o = \gamma B_o$$
 Eξ. 5.6

Όταν οι συνθήκες που εισάγει η Εξ. 5.5 ικανοποιούνται, οι πυρήνες της χαμηλότερης ενεργειακής κατάστασης απορροφούν ενέργεια και διεγείρονται προς την υψηλότερη. Με τη διέγερση αυτή, μεταβάλλεται ο προσανατολισμός του spin. Πειραματικά αυτή η συνθήκη συντονισμού επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας ένα δευτερεύον μαγνητικό πεδίο B₁ σε διεύθυνση 90° ως προς το κύριο πεδίο B₀. Υπάρχουν δυο τρόποι για να επιτευχθεί ο συντονισμός: α) με μεταβολή της συχνότητας Larmor σε ένα σταθερά εφαρμοσμένο μαγνητικό πεδίο B₀, και β) με μεταβολή του πεδίου B₀ κρατώντας σταθερή τη συχνότητα Larmor. Κάθε ομάδα χημικά ισοδύναμων πυρήνων κινείται με μια χαρακτηριστική συχνότητα Larmor, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί ως ανηγμένο δυναμικό εξαρτώμενο από το χρόνο σε ένα δέκτη. Συνάθροιση των δεδομένων από αρκετούς κύκλους παλμών οδηγεί σε ένα χρονικά εξαρτώμενο φάσμα, το οποίο αφού μετασχηματισθεί κατά Fourier δίνει τελικά το συμβατικό φάσμα NMR συναρτήσει των συχνοτήτων [11].

Αν το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (B_0) είναι σταθερό, οι συχνότητες συντονισμού των διαφόρων πυρήνων αναμένεται να είναι ευθέως ανάλογες του κάθε επιμέρους γυρομαγνητικού λόγου. Στην πράξη όμως το εφαρμοσμένο πεδίο μεταβάλλεται κατά κάποιο τρόπο από το τοπικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον του κάθε πυρήνα. Αυτό οδηγεί στην αρχή της χημικής προστασίας, σ , και των χημικών μετατοπίσεων (Εξ. 5.7):

$$\omega_o = B_o (1 - \sigma)$$
 Eξ. 5.7

Οι χημικές μετατοπίσεις που πραγματοποιούνται κατά την εκτέλεση ενός πειράματος NMR προσδίδουν αρκετά δεδομένα για το υπό μελέτη δείγμα. Για τους εξεταζόμενους πυρήνες οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm). Οι τιμές αυτές χαρακτηρίζουν τη διαφορά της χημικής προστασίας για κάθε πυρήνα, η οποία οφείλεται στο διαφορετικό χημικό περιβάλλον του μορίου που εξετάζεται. Ο ορισμός της χημικής μετατόπισης δίνεται από την Εξ. 5.8:

$$\delta(\sigma \epsilon \ ppm) = \frac{(\delta_s - \delta_R)\sigma \epsilon \ H_Z}{v_o \sigma \epsilon \ MH_Z}$$
 Eξ. 5.8

όπου ($\delta_{s} - \delta_{R}$) είναι η διαφορά των συχνοτήτων συντονισμού μεταξύ του δείγματος S και της ένωσης αναφοράς R, και v_{o} είναι η σταθερή ραδιοσυχνότητα του καθετήρα (θήκη εισαγωγής δείγματος). Η ποσότητα ($\delta_{s} - \delta_{R}$) λαμβάνεται μεταβάλλοντας την ισχύ του εφαρμοσμένου μαγνητικού πεδίου. Το φαινόμενο της χημικής προστασίας διαφοροποιείται κυρίως από το είδος του δεσμού και την ηλεκτροαρνητικότητα των συνδεδεμένων ατόμων, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η διάκριση μεταξύ ισοδύναμων ομάδων πυρήνων. Τα πυρηνικά spin που σχετίζονται με ένα σύνολο πυρήνων, αλληλεπιδρούν με εκείνα ενός γειτονικού πυρήνα διαμέσου ενός χημικού δεσμού (ή δεσμών). Συζεύξεις δυο ή τριών δεσμών είναι αρκετά συχνές. Γενικά οι συζεύξεις οφείλονται στη γειτνίαση των πυρηνικών μαγνητικών ροπών, η οποία προκαλεί μεταβολή του πραγματικού μαγνητικού πεδίου που ασκείται από τον πυρήνα (ή πυρήνες) υπό εξέταση. Η ένταση αυτής της μεταβολής του μαγνητικών πεδίου εξαρτάται από τον προσανατολισμό των γειτονικών πυρήνων. Οι διαφορετικές διευθετήσεις spin οδηγούν σε σχάση της κορυφής, ο οποίος αριθμός των κορυφών (ή η πολλαπλότητα) ενός σήματος που είναι αποτέλεσμα της σύζευξης με έναν πυρήνα (ή ομάδα ισοδύναμων πυρήνων) δίνεται από τη σχέση 2*nI* + 1, όπου *n* είναι ο αριθμός των πυρήνων που έχουν spin *I*. [12]

5.8 Μαγνητική Υπερθερμία

Τον τελευταίο καιρό, τα μαγνητικά υγρά έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της συνεισφοράς τους σε αρκετές *in vivo* εφαρμογές όπως στο διαχωρισμό των κυττάρων [13], ως παράγοντες αντίθεσης στη μαγνητική τομογραφία [14], μαγνητική στόχευση και μεταφορά φαρμάκων [15] και ειδικότερα μπορούν να παράγουν θερμότητα σε ένα εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο και να είναι ιδανικά υλικά για την υπερθερμία όγκων. Η μαγνητική υπερθερμία είναι μια μέθοδος για τη θεραπεία του καρκίνου που χρησιμοποιεί μαγνητικά NPs. Με αυτή τη διαδικασία, μαγνητικά σωματίδια εισάγονται τοπικά σε καρκινικούς ιστούς, οι οποίοι μπορεί να θερμανθούν στην επιθυμητή θερμοκρασία ~45°C με τη βοήθεια ενός εξωτερικού εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου. Η μέθοδος αρχικά παρουσιάστηκε από τους Gilchrist et al. πριν από 50 χρόνια. [25] Μέχρι σήμερα, μερικές δουλειές έχουν αφοσιωθεί σε αυτό το αντικείμενο. [16-18] Έχει βρεθεί ότι τα μαγνητικά υγρά που βασίζονται σε υπερπαραμαγνητικά NPs οξειδίων του σιδήρου τα οποία επικαλύπτονται με βιοσυμβατές μεμβράνες είναι κατάλληλα για την υπερθερμία, καθώς τα

σωματίδια έχουν υψηλή μαγνητική ροπή, ισχυρή ειδική απώλεια ισχύος (specific loss power, SLP) και είναι και μη τοξικά. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων έχει εγκρίνει τη χρήση των υπερπαραμαγνητικών, βιοσυμβατών Fe₃O₄ NPs στον ανθρώπινο οργανισμό. [19] Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι οι απώλειες Néel και Brownian για τα υπερπαραμαγνητικά NPs είναι κυρίαρχες, καθώς δεν υπάρχει μαγνητική υστέρηση, επομένως η ειδική απώλεια ισχύος στα μαγνητικά υγρά επηρεάζεται ισχυρά από το εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο, τη φύση και τη δομή των σωματιδίων, όπως το μέγεθος τους και τη διασπορά τους, τη σταθερά ανισοτροπίας, τη μαγνήτιση κορεσμού και την επιφανειακή μορφοποίηση. [20-21] Παρόλα αυτά, η μέθοδος απαιτεί τη βελτίωση των μαγνητικών σωματιδίων, ώστε να παρουσιάζουν υψηλή ειδική απώλεια ισχύος, η οποία επιτρέπει τη μείωση της in vivo δόσης των μαγνητικών υγρών. Στην προσπάθεια να βελτιωθεί η SLP των NPs Fe₃O₄ έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι. [22-23] Η υψηλότερη τιμή SLP που έχει υπολογιστεί βρέθηκε για μαγνητικά βακτηρία ίση με 960 W/g σε πεδίο 410 kHz και 10 kA/m. [24] Εκτός από υψηλή τιμή SLP σε μικρής έντασης πεδίο, είναι σημαντικό τα μαγνητικά υγρά κατά την υπερθερμία να ελέγχουν τη θερμοκρασία κορεσμού στο εύρος 42-47°C, στο οποίο καταστρέφονται τα καρκινικά κύτταρα, με τη μικρότερη βλάβη σε υγιείς ιστούς και περιορισμένες παρενέργειες. Γενικά επιθυμείται οι θεραπείες να είναι μικρού χρόνου και να επιφέρουν αξιόπιστη βλάβη στους όγκους, καθώς υπάρχουν ενδείξεις που αφορούν τις κρίσιμες παρενέργειες του συστήματος λόγω ξαφνικής απελευθέρωσης μεγάλων ποσοτήτων νεκρωτικού υλικού από τον όγκο και μείζονος φλεγμονώδη απόκριση. [25]

Η μέτρηση της υπερθερμίας μαγνητικών υγρών πραγματοποιείται με μια μονάδα Easy Heat 0224 2.4 kW (Ambrell, USA) η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.4. Το Easy Heat είναι ένας εξοπλισμός επαγωγής θέρμανσης στερεάς κατάστασης που μετατρέπει τη μονοφασική γραμμική τάση σε ένα τερματικό εξόδου 2.4 kW σε ένα εύρος ραδιοσυχνοτήτων (RF) και τάσεων. Η μέγιστη ισχύς του μαγνητικού πεδίου κυμαίνεται ανάμεσα στο εύρος 2.2 με 93.6 kA/m, και το αντίστοιχο εύρος των συχνοτήτων λειτουργίας είναι από 148 μέχρι 356 kHz. Αυτές οι τιμές είναι μεταξύ των ορίων που αναμένονται για τις κλινικές εφαρμογές της μαγνητικής υπερθερμίας ($H \ge f < 5 \ge 10^8$ A/m*s). [26] Αυτή η ενέργεια παραδίδεται σε ένα σειριακό σύστημα συντονισμού που περιλαμβάνει ένα πηνίο. Επομένως, ένα συγκεκριμένο ελεγχόμενο μαγνητικό πεδίο παράγεται γύρω από το δείγμα κατά την πειραματική διαδικασία. Το χάλκινο πηνίο έχει διάμετρο 25 mm και αποτελείται από 8 βρόχους, και είναι υπεύθυνο για το επιβαλλόμενο εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο στο δείγμα. Η διάταξη ελέγχεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή όπου και δύναται η ρύθμιση των συνθηκών λειτουργίας. Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει την τοποθέτηση μικρής μάζας των μαγνητικών NPs σε ένα σωλήνα Teflon με 3 mL απιονισμένου νερού ή δ/τος που προσομοιάζει τα ανθρώπινα υγρά. Στη συνέγεια οι γυάλινοι σωλήγες επικαλύπτονται με ένα μονωτικό υλικό και τοποθετούνται στο κέντρο του πηνίου. Η μεταβολή της θερμοκρασίας καταγράφεται με οπτική ίνα που δεν αλληλεπιδρά με το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, έχει ακρίβεια ±0.2°C στο εύρος από 20°C μέχρι 60°C. Η θερμοκρασία καταγράφεται ανά 1 s. Στην αρχή της μέτρησης καταγράφεται η θερμοκρασία υποβάθρου για 60 s, η οποία αφαιρείται ως θερμοκρασία αναφοράς.

Κατά την πειραματική διαδικασία καταγράφεται η μεταβολή της θερμοκρασίας με το χρόνο και υπολογίζεται η SLP. Η SLP ορίζεται ως η θερμική κατανάλωση ισχύος διαιρούμενη από τη μάζα του μαγνητικού στοιχείου και εκφράζεται ως [27]:

$$SLP = \sum \left[\frac{(C_i m_i + A)}{m}\right] dT/dt$$
 Eξ. 5.9

όπου C_i είναι η ειδική θερμοχωρητικότητα του μαγνητικού υγρού, m_i είναι η μάζα του εξαρτήματος, A είναι το ισοδύναμο του νερού στο σωλήνα (A=11.28 J/K) και m είναι μάζα των οξειδίων του σιδήρου στο μαγνητικό υγρό. Η ειδική θερμοχωρητικότητα του απιονισμένου νερού και του μαγνητίτη είναι 4180 και 650J/kgK, αντίστοιχα. [28] Για να είναι πιο άμεση η σύγκριση των SLP μετρήσεων μεταξύ διαφορετικών εργαστηριακών δοκιμών που πραγματοποιούνται κάτω από διαφορετικές συνθήκες ισχύος πεδίου και συχνοτήτων, υπολογίζεται η εγγενής απώλεια ισχύος (intrinsic loss power, ILP) η οποία ορίζεται ως [29]:

$$ILP = \frac{SLP}{H^2 f}$$
 E\xi. 5.10



Σχήμα 5.6.: Η διάταξη Easy Heat 0224 2.4 kW που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της μαγνητικής υπερθερμίας των μαγνητικών υγρών.

5.9 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X(XPS)

0 χαρακτηρισμός και ο καθορισμός της χημικής σύστασης της επιφάνειας των νανοσωματιδίων, εκτός από τη φασματοσκοπία IR, μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ. Η XPS είναι μη καταστρεπτική τεχνική και χρησιμοποιείται για τη χημική ανάλυση και την ταυτοποίηση της χημικής κατάστασης των στοιχείων στην επιφάνεια ενός νανοδομημένου υλικού. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η διάταξη K-Alpha, με υψηλής απόδοσης μονοχρωματικό φασματόμετρο XPS της Thermal Fisher Scientific. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενεργειακή ανάλυση των ηλεκτρονίων που εξάγονται από το στερεό, όταν αυτό εκτίθεται σε ακτίνες-Χ συγκεκριμένης ενέργειας. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία στα άτομα του δείγματος προκαλεί την εκπομπή φωτοηλεκτρονίων, που προέργονται από τις εσωτερικές ηλεκτρονιακές στοιβάδες των ατόμων του φωτοκαταλύτη [30]. Για αυτόν το λόγο, η τεχνική της φασματοσκοπίας XPS είναι μια πολύ καλή μέθοδος επιφανειακής ανάλυσης. Τα ηλεκτρόνια αυτά έχουν χαρακτηριστική ενέργεια σύνδεσης, $E_{\rm B}$. Η εξάρτηση μεταξύ της κινητικής ενέργειας των ηλεκτρονίων που εγκαταλείπουν τα άτομα του δείγματος, της ενέργειας ακτινοβολίας της δέσμης ακτίνων Χ και της ενέργειας σύνδεσης περιγράφεται από τη σχέση:

όπου $h = 6.62 \times 10^{-23}$ Js η σταθερά του Planck, $\Delta \Phi$ η διαφορά του έργου εξόδου ανάμεσα στο στερεό και τον ανιχνευτή και $E_{\rm B}$ η ενέργεια δέσμευσης του φωτοηλεκτρονίου που προέρχεται από εσωτερική στοιβάδα.

Τα ηλεκτρόνια που συλλέγονται, μεταφέρονται σε έναν αναλυτή, όπου διαχωρίζονται ανάλογα με την κινητική τους ενέργεια και στη συνέχεια συγκεντρώνονται στον ανιχνευτή, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 5.7. Από την ανάλυση των ηλεκτρονίων προκύπτει ένα φάσμα, το οποίο περιλαμβάνει ένα σύνολο κορυφών σε χαρακτηριστικές κινητικές ενέργειες. Η χημική σύσταση

της επιφάνειας προσδιορίζεται από τις σχετικές εντάσεις των κορυφών στο φάσμα XPS. Οι θέσεις και το σχήμα των γραμμών δίνει πληροφορίες για τη χημική κατάσταση των στοιχείων που ανιχνέυονται. Μέσω της τεχνικής XPS, μπορεί να γίνει και ποσοτική ανάλυση. Οι υπολογισμοί αυτοί όμως απαιτούν τη σύγκριση των δεδομένων που προκύπτουν με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα για όλα τα ηλεκτρονιακά επίπεδα των στοιχείων [12]. Γενικά, η φασματοσκοπία XPS αποτελεί μία καινοτόμα τεχνική χαρακτηρισμού στο πεδίο της νανοτεχνολογίας με περιορισμένες ακόμα εφαρμογές. Συμπληρωματικά της τεχνικής FT-IR ωστόσο, μπορεί να δώσει λεπτομερή αποτελέσματα για την επιφανειακή τροποποίηση των νανοσωματιδίων.

.



Σχήμα 5.7: Πειραματική Διάταξη Φασματοσκοπίας ακτίνων Χ.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΠΕΡΙΛΗΠΤΙΚΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

6.1 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων(NPs)

Για τη σύνθεση των NPs χρησιμοποιήθηκε χημική μέθοδος, δηλαδή πραγματοποιείται θερμολυτική διάσπαση οργανομεταλλικής ένωσης (πρόδρομη ένωση) σε διαλύτη (οργανικός διαλύτης) και στο διάλυμα προστέθηκαν χημικές ουσίες (επιφανειοδραστικές ενώσεις) για να ελεγχθεί το μέγεθος, το σχήμα, οι ιδιότητες και η επιφανειακή χημεία των σωματιδίων. Για τη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε διαλύτης PEG με μοριακό βάρος 600 Da (PEG 600), πρόδρομη ένωση τριακετυλακετονίου του σιδήρου (Fe(acac)₃) και επιφανειοδραστικές ενώσεις ελαϊκού οξέος (oleic acid, OA) και μερκαπτο-ενδεκανοϊκού οξέος (11-mercaptoundecanoic acid, MUA) (Πίνακας 6.1). Το σχήμα και το μέγεθος των NPs που συνθέτονται ελέγχεται τόσο από τον οργανικό διαλύτη που χρησιμοποιείται αλλά και από την ποσότητα και το είδος των επιφανειοδραστικών ενώσεων που προστίθενται κατά την πειραματική διαδικασία. Λόγω των δυο επιφανειοδραστικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται τα σωματίδια παρουσιάζουν διαλυτότητα τόσο σε οργανικούς διαλύτες όσο και σε υδατικούς (νερό), λόγω της θειόλης του MUA. Τα σωματίδια παραμένουν διαλυτά και σταθερά για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χλωροφόρμιο (CHCl₃), αντίθετα στο νερό παρατηρείται κροκίδωση τους μετά από κάποιες μέρες λόγω των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται.

Δείγμα		Επιφανειο	οδραστική	
	PEG 000 +	Ένα	Φύση NPs	
	$Fe(acac)_3$	OA	MUA	-
Organophilic 1			-	Οργανόφιλα
Hydrophilic 1		-	\checkmark	Υδρόφιλα
Amphiphilic1			\checkmark	Αμφίφιλα

Πίνακας 6.1: Περιεχόμενες ενώσεις για τη σύνθεση των NPs και αναμενόμενη συμπεριφορά σε διαλύτες.

6.1.1 Υλικά

Ο οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη PEG 600 ($C_{26}H_{54}O_{14}$) (Merc) με μοριακό βάρος 570 – 630 g/mol. Ως επιφανειοδραστικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν:

- εμπορικό ελαϊκό οζύ (oleic acid, OA, C₁₈H₃₄O₂) μοριακού βάρους 282.47 g/mol, πυκνότητας
 0.89 mL/ mg και καθαρότητας 60% (Sigma–Aldrich), και
- μερκαπτο- ενδεκανοϊκό οξύ (mercaptoundecanoic acid, MUA) καθαρότητας 99%, με μοριακό βάρος 218.36 g/mol (Sigma–Aldrich) για την απευθείας σύνθεση υδρόφιλων σωματιδίων.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται σχηματικά η διαμόρφωση των επιφανειακών ενώσεων στην επιφάνεια των σωματιδίων, οι οποίες τελικά καθορίζουν τη διαλυτότητα τους και τη δραστικότητα τους.



Σχήμα 6.1: Παρουσίαση της σύνδεσης των επιφανειακών ενώσεων ελαϊκού οξέος (OA) και 11-μερκαπτο ενδεκανοϊκού οξέος (MUA), προς τη σύνθεση οργανόφιλων, υδρόφιλων και αμφίφιλων σωματιδίων.

6.1.2 Σύνθεση Οργανόφιλων Σωματιδίων (Organophilic)

Για την παρασκευή οργανόφιλων σωματιδίων τοποθετούνται 15 mL PEG 600 σε σφαιρική φιάλη, τα οποία θερμαίνονται σε θερμοκρασία 300°C, μέχρι να αποκτήσουν ένα κίτρινο ανοιχτό χρώμα (αρχικά οι PEG είναι διάφανες). Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα OA και 2 mmol Fe(acac)₃ για χρόνο περίπου μιας ώρας μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία της διάσπασης της πρόδρομης ένωσης και της πυρηνοποίησης. Η ποσότητα OA που προστίθεται για κάθε παρασκευαζόμενο δείγμα επηρεάζει το τελικό μέγεθος και τη διασπορά των NPs, καθώς επίσης και τις μαγνητικές ιδιότητες τους. Με την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας το διάλυμα αποκτά μαύρο χρώμα, το οποίο υποδηλώνει τη δημιουργία σωματιδίων οξειδίων του σιδήρου. Ο αφρισμός στο διάλυμα υποδηλώνει τη διαφυγή O₂ από το $\delta/$ τη PEG. Το στερεό δείγμα λαμβάνεται ύστερα από τουλάχιστον 3 φυγοκεντρήσεις με αιθανόλη και ακετόνη στις 19500 rpm για 5 min, για να απομακρυνθούν όλα τα προϊόντα της αναγωγικής διεργασίας [1]. Το στερεό δείγμα που λαμβάνεται ελέγχεται ως προς τις μαγνητικές ιδιότητες (με χρήση απλού μαγνήτη) και τη διαλυτότητα του σε οργανικούς διαλύτες (αιθανόλη, ακετόνη και χλωροφόρμιο - CHCl₃).

6.1.3 Σύνθεση Υδρόφιλων Σωματιδίων (Hydrophilic)

Για την παρασκευή των υδρόφιλων σωματιδίων ποσότητα MUA διαλύεται αρχικά με χρήση υπερήχων σε 15 mL PEG 600. Στη συνέχεια το παραπάνω δ/μα τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη και θερμαίνεται για 10 min σε θερμοκρασία 200°C (μέχρι να κιτρινίσει η PEG). Ακολούθως, προστίθεται στο δ/μα ποσότητα 2 mmol Fe(acac)₃ και δίδεται χρόνος 1 h για την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας. Το στερεό δείγμα λαμβάνεται τουλάχιστον μετά από 3 φυγοκεντρήσεις του δ/τος αρχικά με αιθανόλη και τέλος με ακετόνη. Το στερεό δείγμα που λαμβάνεται ελέγχεται

ως προς τις μαγνητικές ιδιότητες και τη διαλυτότητα του σε νερό. Τα σωματίδια είναι διαλυτά στο νερό αλλά μετά από παραμονή μιας τουλάχιστον ημέρας το διάλυμα διαχωρίζεται σε δυο φάσεις.

6.1.4 Σύνθεση Αμφίφιλων Σωματιδίων (Amfiphilic)

Για την παρασκευή των υδρόφιλων σωματιδίων ποσότητα MUA διαλύεται όπως περιγράφηκε παραπάνω στην PEG 600. Στη συνέχεια προστίθεται σε συγκεκριμένη αναλογία ποσότητα OA και τέλος η πρόδρομη ένωση, 2 mmol Fe(acac)₃. Το δ/μα θερμαίνεται στους 300°C για μια ώρα περίπου. Στερεό δείγμα λαμβάνεται μετά από τουλάχιστον 3 φυγοκεντρήσεις με αιθανόλη και ακετόνη. Στη συνέχεια, ελέγχονται οι μαγνητικές ιδιότητες και η διαλυτότητα των σωματιδίων σε νερό και CHCl₃, με στόχο να διαπιστωθεί η υδρόφιλη και οργανόφιλη (αμφίφιλα σωματίδια) συμπεριφορά τους. Στη συνέχεια παρουσιάζεται ο Πίνακας 6.2 στον οποίο αναγράφονται οι κωδικοί των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν και οι αναλογίες επιφανειοδραστικών ενώσεων που προστέθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Δείγμα	Oleic Acid (mmol)	11-Mercaptoendecanoic Acid (mmol)		
Bare-NPs	-	-		
Organophilic 1	4 (~1,26 mL)	-		
Organophilic 2	2 (~0,63 mL)	-		
Organophilic 3	1 (~315 µL)	-		
Hydrophilic 1	-	1 (218 mg)		
Hydrophilic 2	-	0.5 (104 mg)		
Hydrophilic 3	-	0.25 (54.59 mg)		
Amphiphilic1	4	1		
Amphiphilic2	2	0.5		
Amphiphilic3	1	0.25		

Πίνακας 6.2: Περιεκτικότητα σε επιφανειοδραστικές ενώσεις και ονομασία δειγμάτων που παρασκευάστηκαν.

6.2 Επιφανειακή μορφοποίηση μαγνητικών νανοσωματιδίων

Στην παρούσα παράγραφο περιγράφεται η πειραματική πορεία για την μορφοποίηση της επιφάνειας των NPs, με στόχο να εγκλωβιστεί τελικά φάρμακο, όπως DOX, στη δομή τους και τελικά να πραγματοποιείται ελεγχόμενη αποδέσμευση του φαρμάκου. Η ελεγχόμενη αποδέσμευση πρέπει να γίνει σε συγκεκριμένα σημεία-στόχους, με τα νανοσωματίδια να παρουσιάζουν *in vivo* σταθερότητα και σχετικά υψηλό χρόνο παραμονής στο αγγειακό σύστημα χωρίς να αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζονται συνοπτικά τα στάδια της επιφανειακής μορφοποίησης που είναι:

(1) σύνδεση τροποποιημένης λυσίνης στις ελεύθερες καρβοξυλικές (–COOH) ομάδες της επιφάνειας των NPs, (2) σύνδεση μορφοποιημένης πολυαιθυλενογλυκόλης, μεγάλου μοριακού βάρους (PEG5000), με μαλεαμίδιο, στις ελεύθερες θειόλες (-SH) των NPs, για να αποκτήσουν οι νανοφορείς *in vivo* σταθερότητα και προστασία από το ανοσοποιητικό σύστημα, (3) σύνδεση του φολικού οξεός και (4) ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση της DOX με αρνητικά φορτισμένη –COOH ελεύθερη ομάδα.

Τα παραπάνω στάδια παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.4 και περιγράφονται περιληπτικά στη συνέχεια του Κεφαλαίου.



Σχήμα 6.4: Σχηματική περιγραφή των σταδίων μορφοποίησης των μαγνητικών NPs. (1) Σύνδεση τροποποιημένης λυσίνης στην επιφάνεια των NPs, (2) σύνδεση της μορφοποιημένης mPEG για την *in vivo* σταθερότητα των NPs, (3) σύνδεση του φολικού οξέος και (4) ηλεκτροστατική αλληλεπίδρασης της DOX με τις COO⁻ ελεύθερες ομάδες.

6.2.1 Αποπροστασία της Lysine-Boc-Fmoc από το Boc

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιείται μορφοποίηση της επιφάνειας με δραστικές ενώσεις, που θα προσδώσουν ενεργές ελεύθερες αλυσίδες για σύνδεση φαρμάκου στην επιφάνεια των NPs. Η μορφοποίηση πραγματοποιείται με την προστατευμένη με Boc και Fmoc λυσίνη που φαίνεται παρακάτω:



Σχήμα 6.5: (a) Χημική δομή και (b) μόριο της Boc και Fmoc λυσίνης.

Για τη σύνδεση της προστατευμένης λυσίνης στην επιφάνεια των NPs πρέπει να πραγματοποιηθεί αποπροστασία της λυσίνης από την Boc, η οποία ολοκληρώνεται σε όξινο περιβάλλον, με έκλυση CO₂ και CH₄. Επομένως, παρασκευάζεται ένα διάλυμα με 5 mL CH₂Cl₂ στο οποίο διαλύεται 5% (250 μL) Trifluoroacetic Acid (TFA, CF₃COOH, Sigma-Aldrich), και στη συνέχεια προστίθενται 191 mg της Fmoc-Lysine-Boc (M_w = 468.54 g/mol). Η αντίδραση πραγματοποιείται υπό μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για χρόνο 60 min, ώστε να ολοκληρωθεί η αποπροστασία από την ένωση Boc και λαμβάνεται τελικά η Fmoc-Lysine-NH₂ (M_w = 368.43 g/mol).

6.2.1.1 Σύνδεση της Lys-NH2 στα NPs

Μετά την αποπροστασία της λυσίνης από τη Boc, πρέπει να γίνει αποπρωτονίωση του αζώτου της αμινομάδας για να συνδεθεί με τη μορφοποιημένη λυσίνη στην επιφάνεια των NPs, μέσω αντίδρασης με την καρβοξυλομάδα. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποίηθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.4:

Πίνακας	<i>6.4</i> :	Δεδομένα	μοριακού	βάρους	και	πυκνότητας	για	τα	αντιδραστήρια	που
χρησιμοποιούνται κατά τη σύνδεσης της Fmoc-Lysine-NH $_2$ στα μαγνητικά NPs.										

Υλικά	Μοριακό Βάρ (g/mol)	^{ος} Πυκνότητα (g/L)
Fmoc-Lysine-NH ₂	368.43	
Εt ₃ N (Τριαιθυλαμίνη)	101.3	0.725
DIC (καρβοδιιμίδιο, Carbodiimide) N=c=N	126.2	0.81
DMF (διμεθυλοαμίδιο, dimethylformamide)	73.09	0.948

Διάλυμα A: 1 mL DMF + 100 μL Et₃N + 1 eq Fmoc-Lysine-NH₂.

Ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να πραγματοποιηθεί η αποπρωτονίωση του αζώτου.

Διάλυμα B: 1 mL DMF + x eq (y μL) DIC + 1/2 eq NPs-COOH¹.

Ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε περιβάλλον N₂. Κατά την αντίδραση, το DIC αποκτά θετικά φορτισμένο άνθρακα και το υδροξύλιο της καρβοξυλομάδας είναι αρνητικά φορτισμένο. Οπότε δημιουργείται ένα ασταθές σύμπλοκο που εικονίζεται παρακάτω (Σχήμα 6.7).

).

Αντίστοιχο μηχανισμό ακολουθούν οι ενώσεις N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, $\bigvee_{N=C=N}$

και ethyl-dimethylaminopropyl carbodiimide (EDC, $__{N=C=N}^{N=C=N}$



Σχήμα 6.6: Μηχανισμός σύνδεσης του καρβοδιιμιδίου (DIC) στα μαγνητικά NPs.

Στη συνέχεια αναμειγνύονται τα δ/τα A και B. Κατά την ανάμειξη εξελίσσεται ο μηχανισμός σχηματισμού ενεργού εστέρα. Σχηματικά συμβαίνει η παρακάτω αντίδραση με το προϊόν και το παραπροϊόν της DIU ουρίας όπως φαίνονται:



Σχήμα 6.7: Μηχανισμός σύνδεσης της αποπρωτονιωμένης Lys-Fmoc στα μαγνητικά NPs που έχουν συνδεθεί με DIC.

Δηλαδή παρατηρείται ότι η συνδεδεμένη DIC στο υδροξύλιο της καρβοξυλομάδας, όταν αναμειγνύεται με την αποπρωτονιωμένη λυσίνη, απομακρύνεται από το NP σχηματίζοντας έναν εστέρα, επομένως, η λυσίνη συνδέεται πάνω στο NP. Η παραπάνω αντίδραση με DCC παράγει το παραπροϊόν DCU ουρία, που είναι πρακτικά αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες, το οποίο κάποιες φορές είναι θετικό και κάποιες άλλες όχι. Το παραπροϊόν της ουρίας εύκολα

¹ Η ποσότητα NPs που χρησιμοποιείται εξαρτάται από τον αριθμό mol -COOH που προσδιορίζονται με τιτλοδότηση με NaOH 0.1 M και HCl 0.1 M όπως περιγράφηκε στην § 4.1.2.1.

απομακρύνεται καθώς το ιόν του αμμωνίου εισάγει μια πλύση του οξέος κατά την πειραματική διαδικασία.

6.2.2 Τροποποίηση πολυαιθυλενογλυκόλης (mPEG-NH₂) για την προστασία των νανοσωματιδίων

Στη συνέχεια συνθέθηκε μια μορφοποιημένη PEG μεγάλου μοριακού βάρους, που συνδέεται στις ελεύθερες –SH ομάδες που βρίσκονται στην επιφάνεια των μαγνητικών NPs, για να προσδοθεί σε αυτά *in vivo* διαλυτότητα και ικανοποιητικός χρόνος παραμονής στο κυκλοφορικό σύστημα. Τροποποιημένη πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) με μαλεαμίδιο (Mal-PEG) είναι ένα ενεργό παράγωγο της PEG με σουλφυδρυλική ομάδα (-SH), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να τροποποιηθούν επιλεκτικά πρωτεΐνες, πεπτίδια ή οποιαδήποτε άλλη επιφάνεια με διαθέσιμες –SH ομάδες, π.χ. NPs. Η αντίδραση μεταξύ του μαλεαμιδίου και της θειόλης πραγματοποιείται σε pH 6.5~7.5 προς σχηματισμό σταθερών θειοαιθερικών δεσμών. Η σύνδεση του μαλεαμιδίου στην ομάδα της θειόλης είναι μια από τις πιο σημαντικές βιοσυζυγείς αντιδράσεις, η οποία ειδικεύεται στις θειόλες. Αυτά τα γνωρίσματα είναι μεγάλης σημασίας για τη διατήρηση της δραστικότητας άλλων δραστικών ομάδων [2].

Πρώτο Στάδιο: Τροποποίηση του μηλεϊνικού ανυδρίτη με προσθήκη αμινοξέος

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεση του ενδιάμεσου μηλεϊνικού οξέος παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.IV. Ο μηλεϊνικός ανυδρίτης πριν τη χρήση του έχει υποστεί ανακρυστάλλωση² της εμπορικής ένωσης μηλεϊνικού ανυδρίτη (98% καθαρότητα, Sigma Aldrich). Το 4-αμινοβουτυρικό οξύ έχει καθαρότητα 97% και είναι εμπορικά διαθέσιμο από την Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany).

Πίνακας 6.5: Δεδομένα μοριακού τύπου και βάρους για τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση του μαλεαμικού ανυδρίτη με προσθήκη αμινοξέος.

Αντιδραστήριο	Μοριακό	Βάρος
	(g/mol)	
Μηλεϊνικός Ανυδρίτης (Maleic anhydride)		
	98.06	
4- αμινοβουτυρικό οξύ (4-aminobutyric acid)		
H ₂ N OH	103.12	
Οξικό Οξύ (AcOH)	60.05	

Συνθετική Πορεία

Διάλυμα <u>A</u>: το 4-αμινοβουτυρικού οξύ προστίθεται σε AcOH, με σκοπό την πρωτονίωση της αμίνης για να συνδεθεί στη συνέχεια με το μηλεϊνικό ανυδρίτη. Το δ/μα A αναδεύεται για 5 min.

² Κατά την ανακρυστάλλωση του μηλεϊνικού ανυδρίτη, ποσότητα της ένυδρης μορφής του προστίθεται σε κωνική φιάλη στην οποία συμπληρώνεται ποσότητα C_6H_6 έως την πλήρη διάλυση του, ενώ παράλληλα θερμαίνεται. Στη συνέχεια πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και περιμένουμε μέχρι την ανακρυστάλλωση. Τέλος, πραγματοποιείται πάλι διήθηση και ξήρανση υπό κενό για να παραλάβουμε τον ανακρυσταλλωμένο μηλεϊνικό ανυδρίτη.

Διάλυμα Β: το μηλεϊνικό οξύ προστίθεται σε AcOH, με σκοπό την πρωτονίωση της ένωσης. Το δ/μα αναδεύεται για 5 min. Στη συνέχεια το δ/μα Α προστίθεται στο δ/μα Β και αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 h. Όταν προστίθεται το δ/μα Α στο δ/μα Β, τα υπολείμματα που παραμένουν στο ποτήρι ζέσεως ξεπλένονται με H₂O. Στο Σχήμα 6.8 αποτυπώνεται η αντίδραση μεταξύ των δ/των Α και Β και το τελικό προϊόν της αντίδρασης.



Σχήμα 6.8: Η αντίδραση παραγωγής του ενδιάμεσου μηλεϊνικού οξέος.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το δ/μα φιλτράρεται υπό κενό και το λευκό ίζημα συλλέγεται και εκπλένεται 3 φορές με H₂O για να απομακρυνθούν υπολείμματα από τα αντιδρώντα και το AcOH. Το H₂O που χρησιμοποιείται για τις πλύσεις του προϊόντος βρίσκεται σε θερμοκρασία 5°C, ώστε να μειωθεί η διαλυτότητα του προϊόντος με το H₂O και να αποφευχθεί η δημιουργία δεσμών Η. Στη συνέχεια, το προϊόν τοποθετείται στο κενό για να απομακρυνθεί η υγρασία.

Δεύτερο Στάδιο: Σύνθεση μαλεαμιδίου

Το μαλεαμίδιο συντίθεται από συμπύκνωση του μηλεϊνικού οξέος που παρασκευάστηκε στο προηγούμενο στάδιο [3]. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται καταγράφονται στον Πίνακα 6.6 που ακολουθεί. Το μαλεαμίδιο είναι μια χημική ένωση με τύπο $H_2C_2(CO_2)NH$ (Σχήμα 6.9). Τα μηλεϊνικά οξέα περιγράφουν επίσης τα παράγωγα του αρχικού μαλεαμιδίου, όπου η –NH ομάδα αντικαθιστάται με αλκάνια ή αρωματικές ομάδες, όπως μεθύλιο ή φαινόλη, αντίστοιχα. Οι υποκαταστάτες μπορούν να είναι επίσης πολυμερή, όπως η PEG.



Σχήμα 6.9: Μοριακός τύπος του μαλεαμιδίου.

Συνθετική Πορεία

Προστίθεται 1 eq του ενδιάμεσου μηλεϊνικού οξέος που παράχθηκε στο πρώτο στάδιο σε 96.42 mL τολουολίου (Merck), με προσθήκη 2 eq DIPEA (Merck) σε μια σφαιρική φιάλη, η οποία συνδέεται με τη διάταξη Dean Stark. Το δ/μα αφήνεται υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία 100°C για 3 h. Κατά την αντίδραση όπως φαίνεται και από την Σχήμα 6.9, πραγματοποιείται συμπύκνωση. Το H_2O που παράγεται απομακρύνεται μέσω της διάταξης Dean Stark, για να παραλάβουμε το τελικό προϊόν. Κατά την απομάκρυνση του H_2O παρασέρνονται και μόρια τολουολίου, οπότε το δ/μα που αποστάζεται πρέπει να υποστεί συμπύκνωση και τελικά να υπολογιστεί ο όγκος του H_2O που παράχθηκε (υπολογισμός mol) και σε αναλογία 1:1 υπολογίζεται η ποσότητα του μαλεαμιδίου που παράχθηκε (Σχήμα 6.10).

Αντιδραστήριο	Μοριακό Βάρος (g/mol)	Πυκνότητα (g/mL)
	201.06	-
Διισοπροπυλαιθυλαμίνη (N,N-Diisopropylethylamine, DIPEA)	N 129.24	0.742
_ОН		

Πίνακας 6.6: Δεδομένα μοριακού τύπου και βάρους για τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τη μορφοποίηση του μηλεϊνικού οξέος.



4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butanoic acid Σχήμα 6.10: Η αντίδραση παραγωγής του μαλεαμικού οξέος.

Στη συνέχεια το δ/μα τολουολίου που περιέχει το προϊόν μηλεϊνικού οξέος και ποσότητα του ενδιάμεσου μηλεϊνικού οξέος που δεν έχει αντιδράσει συμπυκνώνεται. Το τελικό προϊόν διαλύεται με οξεϊκό αιθύλιο (ethyl acetate, EtOAc) και προσθήκη HCl 37% μέχρι pH 2. Το δ/μα οξυνίζεται με στόχο την πρωτονίωση του μηλεϊνικού οξέος για να είναι περισσότερο διαλυτό στο EtOAc.

Τρίτο Στάδιο: Τροποποίηση της mPEG-NH2

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για το τελικό στάδιο της τροποποίησης της mPEG-NH₂ καταγράφονται στον Πίνακα 6.7. Η διμεθυλοαμινοπυριδίνη (DMAP) που αναγράφεται στον Πίνακα 6.7 είναι ένα παράγωγο της πυριδίνης με χημικό τύπο (CH₃)₂NC₅H₄N. Είναι ένα άχρωμο στερεό το οποίο χρησιμοποιείται ως πυρηνόφιλος καταλύτης για ποικιλία αντιδράσεων όπως τις εστεροποιήσεις με ανυδρίτες, την αντίδραση Baylis-Hillman, τις υδροσιλυώσεις, τριτυλιώσεις και άλλες.

Πίνακας 6.7: Δεδομένα μοριακού τύπου και βάρους για τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση της mPEG-NH₂.





Συνθετική Πορεία

Κατά την πειραματική διαδικασία παρασκευάζονται δυο δ/τα (Solution A και Solution B, όπως φαίνονται στο Σχήμα 6.14). Το δ/μα A αποτελείται από DMF, 1 eq μηλεϊνικού οξέος που παρασκευάστηκε στο προηγούμενο στάδιο και 2 eq DIC, αφήνεται υπό ανάδευση σε ατμόσφαιρα N₂ (αντίδραση καρβοδιμιδίου). Επομένως, ενεργοποιείται η καρβοξυλομάδα του μαλεαμιδίου για να συνδεθεί εν συνεχεία με μια πρωτονιωμένη αμίνη (Solution B). Το δ/μα B αποτελείται από δ/τη DMF, μικρή ποσότητα του καταλύτη DMAP, μερικές σταγόνες της βάσης Et₃N και 1 eq mPEG-NH₂, το οποίο αφήνεται για 10 min μέχρι την πλήρη διάλυση της mPEG-NH₂ λόγω της αποπρωτονίωσης του αζώτου εξαιτίας της βάσης. Το δ/μα B προστίθεται με πολύ αργό ρυθμό στο δ/μα A με συνεχή ανάδευση, σε ατμόσφαιρα N₂ και σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 70°C οπού και παραμένει για 24 h. Η αργή προσθήκη είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η σύνδεση της mPEG-NH₂ στο μηλεϊνικό οξύ, λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους, το οποίο δυσκολεύει την κινητικότητα της ένωσης μέσα στο δ/μα. Σχηματικά οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.11.



Σχήμα 6.11: Η αντίδραση παραγωγής της τροποποιημένης PEG5000.

Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το προϊόν καταβυθίζεται με περίσσεια CH₂Cl₂ και διαιθυλαιθέρα (DEE) και ψύξη. Το υπερκείμενο μαζί με το παραπροϊόν της ουρίας αποχύνεται και στον πυθμένα του δοχείου παραμένει το προϊόν. Το προϊόν διαχωρίζεται από του διαλύτες σε μια διαχωριστική χοάνη και επαναδιαλύεται με CH₂Cl₂ για να υποστεί την παραπάνω διαδικασία καθαρισμού τουλάχιστον τρεις φορές, για να απομακρυνθεί οποιαδήποτε ποσότητα δ/των, καταλύτη και ουρίας που μπορεί να έχουν εγκλωβιστεί στη δομή της mPEG. Κατά την τελευταία πλύση του προϊόντος τοποθετείται το δ/μα στην κατάψυξη για 12 h όπου γίνεται πλήρης

διαχωρισμός του προϊόντος στον πυθμένα του δοχείου από τα δ/τα. Το προϊόν διαλύεται από τον πυθμένα με ελάχιστη ποσότητα CH_2Cl_2 και μικρή ποσότητα βενζολίου οπότε και πραγματοποιείται ξήρανση με πάγο. Το βενζόλιο τοποθετείται για να απομακρυνθεί ποσότητα υγρασίας και νερού που μπορεί να έχει εγκλωβιστεί στη δομή του προϊόντος. Τέλος, το προϊόν τοποθετείται στο κενό για την απομάκρυνση όλων των διαλυτών και ελέγχεται με ¹Η και ¹³C NMR φασματοσκοπία.

Τέταρτο Στάδιο: Σύνδεση της τροποποιημένης PEG στην επιφάνεια των NPs

Στη συνέχεια η μορφοποιημένη PEG συνδέθηκε στις ελεύθερες –SH ομάδες που βρίσκονται στην επιφάνεια των NPs που ήδη έχουν τροποποιηθεί επιφανειακά με τη λυσίνη, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Επομένως, συντίθεται ένα δ/μα που παρουσιάζει αναλογία μαζών μεταξύ των μορφοποιημένων με λυσίνη NPs και της τροποποιημένης PEG. Οι ποσότητες των ενώσεων διαλύονται σε ένα ρυθμισμένο δ/μα φωσφορικού άλατος (~5 mL) με pH 5.5 και αφήνονται για 24 h υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το pH επιλέγεται 5.5 για να γίνει πιο ηλεκτραρνητική (αποπρωτονίωση) η ελεύθερη –SH ομάδα. Η παραπάνω αντίδραση παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.12. Στη συνέχεια συλλέγεται με φυγοκέντρηση (12000 rpm για 5 min) η ποσότητα των μορφοποιημένων NPs.



Σχήμα 6.12: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης σύνδεσης της μορφοποιημένης PEG στην επιφάνεια των NPs σε όξινο περιβάλλον.

6.2.3 Σύνδεση φολικού οξέος (folic acid)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποπροστασία της Fmoc από τη λυσίνη. Τα NPs λοιπόν διαλύθηκαν σε δ/μα 20% πυριδίνης σε DMF, όπου και αφέθηκαν για να ολοκληρωθεί η αντίδραση (Σχήμα 6.13). Στη συνέχεια τα NPs με το φολικό οξύ διαλύθηκαν σε DMSO, καταλύτη τριαθυλαμίνη και EDC, το οποίο συμμετέχει στην αντίδραση καρβοδιιμιδίου και το παραπροϊόν της ουρίας που σχηματίζεται απομακρύνεται με H₂O. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και για 12 h αφήνεραι να ολοκληρωθεί η αντίδραση σύνδεσης του φολικού οξέος στην αποπροστατευμένη λυσίνη (Σχήμα 6.14).

Πίνακας 6.8: Δεδομένα μοριακού βάρους και πυκνότητας για τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνδεσης του φολικού οξέος στα μαγνητικά τροποποιημένα NPs.

Φολικό οξύ (Folic acid)		
HN H H CO ₂ H	441.4	-
Εt ₃ N (Τριαιθυλαμίνη)	101.3	0.725
EDC (1-Ethyl-3-(3-		
dimethylaminopropyl)carbodiimide)		
N	155.24	0.877
N=C=N		
DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο,		
H ₃ C S CH ₃	78.13	1.1004
Dimethylsulfoxide)		



Σχήμα 6.13: Σχηματική αναπαράσταση των μορφοποιημένων μαγνητικών NPs μετά την αποπροστασία της Fmoc.



Σχήμα 6.14: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης σύνδεσης του φολικού οξέος στην επιφάνεια των μορφοποιημένων NPs.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Στο παρόν κεφάλαιο θα παρουσιαστούν και θα αναλυθούν τα δεδομένα που ελήφθησαν από τις διαφορετικές τεχνικές χαρακτηρισμού που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των μαγνητικών NPs, ώστε να συγκριθούν οι διαφορετικές μέθοδοι χαρακτηρισμού και να μελετηθεί η επίδραση της προσθήκης διαφορετικών επιφανειοδραστικών ενώσεων και διαφορετικών αναλογιών στην τελική απόδοση των μαγνητικών NPs. Τέλος, αναλύθηκαν τα φάσματα NMR και IR που ελήφθησαν κατά την επιφανειακή μορφοποίηση των NPs, με στόχο να διαπιστωθεί αν η *in situ* χημική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, ύστερα από τους κατάλληλους χαρακτηρισμούς που ακολούθησαν, ενδύναται για επιφανειακή μορφοποίηση των μαγνητικών NPs, για χρήση τους ως φορείς φαρμάκων ή/και παράγοντες υπερθερμίας.

7.1 Δομικός Χαρακτηρισμός

Από την ανάλυση των ακτίνων Χ προσδιορίστηκε ότι τα NPs παρουσιάζουν την τυπική δομή του γ-Fe₂O₃, με χημικά διαταραγμένη την κυβική εδροκεντρωμένη (fcc) δομή [1]. Στο Σχήμα 7.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα φάσματα των NPs που συντέθηκαν σε δ/τη PEG600 με προσθήκη των OA και MUA επιφανειοδραστικών ενώσεων. Η ταυτοποίηση των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τα δεδομένα της βάσης δεδομένων JCPDS και συγκεκριμένα την καρτέλα JCPDS, card 79-0419. Για κάθε δείγμα σημειώνεται και το μέσο κρυσταλλικό μέγεθος των NPs όπως υπολογίζεται από την εξίσωση του Scherrer.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 7.1 η προσθήκη του ΟΑ, μειώνει το μέσο μέγεθος του πυρήνα. Το ΟΑ συνδέεται μέσω ισχυρών ομοιοπολικών δεσμών στην επιφάνεια, μειώνοντας τις διαθέσιμες περιοχές για περαιτέρω κρυστάλλωση, κάτι που οδηγεί τελικά σε μικρότερα μεγέθη [2]. Η προσθήκη ΟΑ δεν επηρεάζει τη δομή των σωματιδίων αλλά μόνο το μέγεθος τους. Με χρήση μεγαλύτερης ποσότητας ελαϊκού οξέος παρατηρείται η παρασκευή σωματιδίων μικρότερου μεγέθους. Επίσης από τα φάσματα XRD βάσει των δεδομένων, συμπεραίνουμε πως τα νανοσωματίδια αποτελούνται από συνδυασμό των δομών γ-Fe₂O₃ και Fe₃O₄, σε περίπου ίσο ποσοστό. Μετά από καιρό, παρατηρείται σταδιακά μείωση του ποσοστού της μορφής Fe₃O₄ του σιδήρου, λόγω οξείδωσης. Αυτό οδηγεί σταδιακά σε μείωση των μαγνητικών ιδιοτήτων. Τέλος, η μικρή κορυφή που παρατηρείται λίγο πριν από τις 30° πιθανώς να οφείλεται στην κρυσταλλική δομή του θείου. Η προσθήκη MUA παρατηρείται ότι αυξάνει το μέσο μέγεθος των NPs που παρασκευάστηκαν με προσθήκη των ΟΑ ή μόνο MUA.

Στο Σχήμα 7.2 που ακολουθεί παρουσιάζεται η μεταβολή μέσου μεγέθους των NPs συναρτήσει της διαφορετικής συγκέντρωσης των επιφανειαδραστικών ενώσεων κατά τη σύνθεση τους για τα τρία διαφορετικά είδη NPs που παράγονται. Από τα διαγράμματα παρατηρείται για τα οργανόφιλα NPs, ότι η προσθήκη του OA, αυξάνει το μέσο μέγεθος των σωματιδίων που υπολογίζεται από την εξίζωση του Scherrer (Σχήμα 7.2a). Μεγάλη όμως άυξηση οδηγεί στο σχηματισμό NPs με πολύ μικρό μέγεθος, μικρότερο από αυτό που προσδιορίζεται για τα NPs, που είναι επικαλυμμένα μόνο με PEG. Συμπεραίνουμε δηλαδή, ότι το OA σε μεγάλη ποσότητα, ενώνεται με το Fe της πρόδρομης ένωσης, σχηματίζοντας μικρούς κρυσταλλίτες, που δε δύναται να μεγαλώσουν σε μέγεθος κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Η προσθήκη του MUA αντίστοιχα οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους των υδρόφιλων NPs, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.2b, όπου φαίνεται

ότι το μέγεθος δεν επηρεάζεται με την αύξηση της περιεκτικότητας σε MUA, αλλά παρατηρείται μείωση της διασποράς μεγέθους, όσο αυξάνεται η ποσότητα σε MUA. Η αύξηση του μεγέθους των NPs με την αύξηση των επιφανειοδραστικών ενώσεων στο δ/μα PEG κατά την πειραματική διαδικασία, οφείλεται στην πρόσδεση των επιφανειοδραστικών ενώσεων στο δ/μα PEG κατά την πειραματική διαδικασία οφείλεται στην πρόσδεση των επιφανειοδραστικών ενώσεων στο δ/μα PEG κατά την πειραματική διαδικασία οφείλεται στην πρόσδεση των επιφανειοδραστικών ενώσεων στο δ/μα PEG κατά την πειραματική διαδικασία, οφείλεται στην πρόσδεση των επιφανειοδραστικών ενώσεων στο δ/μα PEG κατά την πειραματική διαδικασία, οφείλεται στην πρόσδεση των επιφανειοδραστικών ενώσεων στην επιφάνεια των NPs, στα οποία επιτρέπεται η περαιτέρω κρυστάλλωση και ανάπτυξη, κάτι το οποίο δεν επιτυγχάνεται, όσο μεγαλύτερη είναι επιφανειακή στοιβάδα PEG που επικαλύπτει τα NPs. Τέλος, για τα αμφίφιλα NPs (Σχήμα 7.2c) παρατηρείται αντίστοιχη συμπεριφορά με τα οργανόφιλα νανοσωματίδια, δηλαδή, το μέγεθος των NPs αυξάνει με την προσθήκη των επιφανειοδραστικών ενώσεων (OA και MUA), ενώ με περισσότερη προσθήκη σε ΟΑ παρατηρείται μείωση στο μέγεθος, γεγονός που υποδηλώνει την μεγαλύτερη επιρροή του ΟΑ στο μέγεθος των αμφίφιλων NPs.



Σχήμα 7.1: Φάσματα ακτίνων Χ για (a) NPs οξειδίων του σιδήρου παρασκευασμένα σε δ/τη PEG600, παρουσία (b) OA, (c) MUA και (d) OA και MUA.



Σχήμα 7.2: Μεταβολή μεγέθους (a) οργανόφιλων, (b) υδρόφιλων και (c) αμφίφιλων NPs με την προσθήκη διαφορετικών αναλογιών επιφανειοδραστικών ενώσεων.

7.1.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM), κατά το οποίο έγινε προσπάθεια να εκτιμηθεί η μορφολογία των NPs και να υπολογιστεί το μέσο μέγεθος τους. Τα NPs τοποθετήθηκαν σε στερεή μορφή για τη μελέτη της μορφολογίας τους οπότε δεν υπάρχουν δεδομένα ακόμα για τη διασπορά τους στους διαλύτες. Στο Σχήμα 7.3 παρατίθενται εικόνες από αντιπροσωπευτικά δείγματα οργανόφιλων, υδρόφιλων και αμφίφιλων σωματιδίων. Το μέσο μέγεθος των σωματιδίων προσδιορίστηκε ~ 20 nm για τα οργανόφιλα και τα αμφίφιλα NPs και ~ 16 nm για τα υδρόφιλα NPs. Από την ανάλυση του SEM βέβαια δεν είναι δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός του μέσου μεγέθους των σωματιδίων διότι η διακριτική ικανότητα του SEM δεν είναι ικανή να προσδιορίσει το μέγεθος των NPs. Επίσης, όπως φαίνεται από τις φωτογραφίες SEM, τα NPs παρουσιάζονται συσσωματωμένα, καθώς μελετώνται σε στερεή κατάσταση και όχι διαλυτά σε κάποιον καλό δ/τη για να προσδιοριστεί ταυτόχρονα και η διασπορά τους. Από την ανάλυση της δομής των σωματιδίων (SEM-EDX) προσδιορίστηκε ότι έχουν τη δομή του γ-Fe₂O₃, όπως φαίνεται στο φάσμα στο Σχήμα 7.3.



Σχήμα 7.3: Εικόνες SEM από οργανόφιλα, υδρόφιλα και αμφίφιλα NPs με μέσο μέγεθος 20, 16 και 20 nm, αντίστοιχα και φάσμα EDX των Fe₂O₃ NPs.

7.1.2 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (ΤΕΜ)

Η μορφολογία και η δομή των παραπάνω σωματιδίων επιβεβαιώθηκε επίσης μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης. Όπως διαπιστώνεται από τις εικόνες που λαμβάνονται από το ΤΕΜ (Σχήματα 7.5 και 7.6), τα σωματίδια έχουν σχήμα σφαιρικό. Δυστυχώς λόγω της διακριτκής ικανότητας του οργάνου δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός του ακριβούς μέσου μεγέθους, διότι τα σωματίδια φαίνεται να έχουν μέσο μέγεθος μικρότερο από τα 10 nm. Παρατηρούμε επίσης, πως τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν είναι κρυσταλλικά. Στις εικόνες σκοτεινού πεδίου που ελήφθησαν, διαπιστώθηκε εκτός από την κρυσταλλική δομή (φωτεινές κουκίδες), ότι τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν σχετικά ομοιογενή κατανομή μεγέθους (που βέβαια δεν μπορεί να αναλυθεί πλήρως όπως αναφέρθηκε), κάτι που υποδηλώνει ότι δε σχηματίζουν συσσωματωμάτα. Αντίθετα λοιπόν με ό,τι παρατηρείται στη μελέτη μέσω SEM και στη βιβλιογραφία [3], όπου η συσσωμάτωση αναφέρεται ως συχνό φαινόμενο, παρατηρούμε πως τα σωματίδια εγκλωβίζονται σε δομή μεμβράνης, η οποία οφείλεται στην PEG. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στον τρόπο που στεγνώνει το δείγμα κατά την εναπόθεσή του στο υμένιο άνθρακα για τη μελέτη στο ΤΕΜ. Για το λόγο αυτό το μέγεθος που παρατηρείται μέσω TEM δεν είναι αντιπροσωπευτικό του πραγματικού μεγέθους των σωματιδίων που παρασκευάστηκαν. Τόσο από την ανάλυση με TEM όσο και με XRD, διαπιστώνουμε πως τα νανοσωματίδια που παρασκευάζονται έχουν μέσο μέγεθος κάτω από 10 nm και σφαιρικό σχήμα. Η ανομοιογένεια του δείγματος που παρατηρείται είναι χαρακτηριστικό μειονέκτημα των υγρών μεθόδων σύνθεσης νανοσωματιδίων. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά συμφωνούν με τη βιβλιογραφία και αποδίδονται στη μέθοδο της πολυόλης η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία. Η δομή των σωματιδίων που παρασκευάστηκαν μπορεί να επιβεβαιωθεί και με την ανάλυση SAED (*Selected Area Electron Diffraction*) στο Σχήμα 7.6 (b). Σε αυτή, κάθε ομόκεντρος κύκλος αντιστοιχεί σε συγκεκριμένες ανακλάσεις των κρυσταλλικών επιπέδων (hkl). Η αντιστοιχία τον ομόκεντρων κύκλων με τις ανακλάσεις των κρυσταλλικών επιπέδων γίνεται με τη βοήθεια βάσεων δεδομένων (JCPDS).



Σχήμα 7.4: Εικόνες ΤΕΜ για νανοσωματίδια επικαλυμμένα με MUA(υδρόφιλα).



Σχήμα 7.5: Εικόνες ΤΕΜ για νανοσωματίδια επικαλυμμένα με MUA και ΟΑ(αμφίφιλα).



Σχήμα 7.6: Εικόνες ΤΕΜ από δείγμα NP-MUA (a) πριν (δ/μα EtOH) και (b) μετά την επιφανειακή μορφοποίηση (υδατικό δ/μα).

7.2 Χαρακτηρισμός της Επιφανειακής Χημείας των NPs

Το οργανικό περιεχόμενο των σωματιδίων μελετήθηκε μέσω της απορρόφησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Μέσω των φασμάτων IR διακρίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του OA και του MUA κατά τη σύνδεση τους πάνω στα NPs. Στο Σχήμα 7.7 παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης των OA και MUA στα οποία σημειώνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές και το είδος της δόνησης ή της παραμόρφωσης λόγω της υπέρυθρης ακτινοβολίας.



Σχήμα 7.7: Φάσματα IR των επιφανειοδραστικών ενώσεων ΟΑ και MUA.

Στη συνέχεια, στο Σχήμα 7.8, παρουσιάζεται το συγκριτικό διάγραμμα από τα φάσματα IR των NPs που συντέθηκαν σε δ/τη PEG600 χωρίς ή με προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων. Στο διάγραμμα παρατηρείται ότι για τα επικαλυμμένα NPs μόνο με PEG600 εμφανίζονται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές της PEG (-OH, -CH₂ και C-OH) [4].

Τα NPs που περιέχουν ποσότητα OA εμφανίζουν αντίστοιχα μαζί με τις χαρακτηριστικές κορυφές που οφείλονται στη PEG και χαρακτηριστικές κορυφές στους 1500 και 1411 cm⁻¹ που οφείλονται του στην αντισυμμετρική και συμμετρική δόνηση COO⁻ (καρβοξυλομάδα). Όμοια εμφανίζονται οι κορυφές συμμετρικής και αντισυμμετρικής δόνησης της κορυφής -CH2- στους 2855 και 2926 cm⁻¹ και στους 1700 cm⁻¹ παρατηρείται μια περιοχή η οποία αντιστοιχεί στο τέντωμα του δεσμού C=O, και είναι χαρακτηριστική της διμερούς μορφής του ελαϊκού οξέος [5]. Για τα NPs που επικαλύπτονται με MUA παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές της PEG και η χαρακτηριστική κορυφή της καρβοζυλομάδας, καθώς επίσης και η δόνηση που οφείλεται στο δεσμό CH₂-S- (θειόλη) στους 2900 cm⁻¹ περίπου, όπως σημειώνεται στο διάγραμμα [6]. Επίσης, εμφανίζεται μια πολύ μικρή κορυφή στους 2558 cm⁻¹ που αντιστοιχεί στη δόνηση του δεσμού -SH. Αυτό μας δείχνει ότι στη επιφάνεια των σωματιδίων υπάρχουν ελεύθερες θειόλες που δύνανται να ενωθούν με άλλα στοιχεία, γονίδια ή πρωτεΐνες. Παρατηρείται όμως και η επίδραση στην επιφάνεια των σωματιδίων. Η συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση του COOγια το MUA παρατηρείται στους 1470 και 1750 cm⁻¹ αντίστοιχα, ενώ στους 2918 και 2850 cm⁻¹, οι κορυφές αντιστοιχούν στη συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση του δεσμού C-H των αλκανίων. Οι κορυφές αυτές πιστοποιούν την τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων με τη σύνδεση του MUA σε αυτά [7].

Και στα τέσσερα φάσματα που παρουσιάζονται, εμφανίζονται δύο χαρακτηριστικές κορυφές. Η μία κορυφή στους 580 cm⁻¹ αποδίδεται στον δεσμό Fe-O στη δομή του μαγνητίτη και επιβεββαιώνει την παρουσία του Fe₃O₄ [8] και η άλλη, στους 691 cm⁻¹ περίπου, η οποία είναι μικρής έντασης και οφείλεται στο τέντωμα του δεσμού C-S [9].

Τέλος, το IR φάσμα των NPs που περιέχουν στην επιφάνεια τους OA και MUA αποτελεί ένα συνδυασμό των φασμάτων που περιέχουν ξεχωριστά OA και MUA και οι κορυφές έχουν μικρότερη ένταση, συγκριτικά με τα άλλα δυο φάσματα. Η ένταση μίας κορυφής στα φάσματα IR είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ένωσης που περιλαμβάνει τη χαρακτηριστική ομάδα της κορυφής αυτής. Υποθέτουμε λοιπόν, ότι στα αμφίφιλα νανοσωματίδια, οι ποσότητες του OA και MUA που προσδένονται σε αυτά είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες στα σωματίδια που παρουσιάζουν μόνο οργανόφιλη ή μόνο υδρόφιλη συμπεριφορά. Επίσης, η ένταση είναι μικρότερη διότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη από την περιεκτικότητα σε επιφανειοδραστικές ενώσεις (OA και MUA) και από την προσροφημένη PEG600 στη δομή των NPs.



Σχήμα 7.8: Φάσματα IR (a) NPs οξειδίων του σιδήρου παρασκευασμένα σε δ/τη PEG600, (b) παρουσία OA, (c) παρουσία MUA και (d) παρουσία OA και MUA.

7.3 Χαρακτηρισμός δεδομένων XPS

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων με την XPS τεχνική, με στόχο να πιστοποιηθεί συμπληρωματίκα της IR τεχνικής, η επιφανειακή πρόσδεση των επιφανειοδραστικών ενώσεων και της PEG στην επιφάνεια των NPs. Στο Σχήμα 7.17 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα φάσματα XPS για τα διάφορα νανοσωματίδια που έχουν συντεθεί με διαφορετική προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων. Από τα φάσματα παρατηρείται ότι τα νανοσωματίδια έχουν τη δομή γ-Fe₂O₃ που έχει πιστοποιηθεί και από τα φάσματα XRD. Χαρακτηριστικά, στο πρώτο φάσμα, οι θέσεις των κορυφών για το σίδηρο παρατηρούνται στα 710 eV περίπου για το Fe₂P₃ και στα 723 eV για το Fe₂P₁. Οι τιμές αυτές των χαρακτηριστικών ενεργειών αποδεικνύουν τη δομή του μαγκεμίτη, καθώς είναι παραπλήσιες με τις τιμές του υλικού όγκου που υπάρχουν στη βιβλιογραφία (711 eV για το Fe₂P₃ και 725 eV για το Fe₂P₁) [18].

Στο δεύτερο φάσμα (περιοχή 525-545 eV), στα 530 eV εμφανίζεται μία κορυφη που εκφράζει τη χαρακτηριστική ενέργεια του ανιόντος O^2 του Fe_2O_3 . Οι κορυφές που παρατηρούνται στο διάστημα 531-534 eV, αποδίδονται στις ενέργειες των ομάδων καρβοξυλίου και υδροξυλίου που είναι συνδεδεμένες στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων και επιβεβαιώνουν τη σύνδεση των επιφανειοδραστικών ενώσεων σε αυτά [19].

Τέλος, στο τρίτο φάσμα που παρουσιάζεται, παρατηρούμε τις κορυφές που αποδίδονται στην επικάλυψη με PEG. Πιο συγκεκριμένα, η χαρακτηριστική ενέργεια στα 285 eV περίπου οφείλεται στο δεσμό C-C/C-H, στα 286 eV στο δεσμό C-O και εκείνη στα 288 eV στο δεσμό N-C=O [20].

Στον πίνακα 7.2 που ακολουθεί παρατίθενται τα δεδομένα ποσοστιαίας ατομικής περιεκτικότητας στις κυριότερες ενέργειες δεσμών που παρατηρήθηκαν σε επικαλυμμένα με PEG600, οργανόφιλα, υδρόφιλα και αμφίφιλα νανοσωματίδια. Από τις διαφορετικές αναλογίες-ποσοστά που αναγράφονται εξηγείται η σύνδεση των επιφανειοδραστικών ενώσεων στην επιφάνεια. Παρατηρούμε ότι για τα υδρόφιλα και τα αμφίφιλα σωματίδια, εμφανίζονται ποσοστα που αντιστοιχούν σε δεσμούς που σχηματίζει το θείο. Επαληθεύεται λοιπόν και η σύνδεση του MUA στα νανοσωματίδια, η οπόια δεν μπορούσε να παρατηρηθεί στα φάσματα XPS (πιθανώς λόγω διακριτικής ικανότητας του οργάνου ή λόγω επικάλυψης τους από άλλες κορυφές).



Σχήμα 7.9: (a) Φάσματα XPS μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με PEG600, OA ή/και MUA. (b) Μεγένθυνση φασμάτων σε συγκεκριμένες ενέργειες για να προσδιοριστεί η διαφορά στις καμπύλες.

PEG600	Atomic	Organophilic	Atomic	Hydrophilic	Atomic	Amphiphilic	Atomic
coated NPs	%	NPs	%	NPs	%	NPs	%
O1s Fe ₂ O ₃	10,6	O1s Fe ₂ O ₃	17	S2p3 Sulfur	0,2	S2p3 Sulfur	0,3
O1s C-O	20,4	Ols C-O	16,8	S2p1 Scan A	0	S2p1 Scan A	0
O1s C=O	5,5	O1s C=O	6,9	S2p3 SO ₃	2,9	S2p3 SO ₃	0,2
Na KL2	0	Na KL2	0	S2p1 Scan B	0	S2p1 Scan B	0
C1s C-C	20,3	C1s C-C	23,9	O1s Fe ₂ O ₃	5,4	O1s Fe ₂ O ₃	14,7
C1s C-O	30,9	C1s C-O	19,3	O1s C-O	12,9	O1s C-O	19,6
C1s O-C=O	4,8	C1s O-C=O	4,7	O1sC=O/SO ₃	14	O1s C=O/SO ₃	5,1
Fe2p	4,8	Fe2p	8,6	Na KL2	0	Na KL2	0
Na1s	2,7	Na1s	2,8	C1s C-C	33,4	C1s C-C	23,1
				C1s C-O	15,3	C1s C-O	23,5
				C1s O-C=O	5,5	C1s O-C=O	4,6
				Fe2p	2,9	Fe2p	6,3
				Na1s	7,7	Na1s	2,5

Πίνακας 7.2: Δεδομένα δεσμικών περιεκτικοτήτων από την ανάλυση XPS.

7.4 Χαρακτηρισμός των μαγνητικών ιδιοτήτων

Στο Σγήμα 7.10 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι βρόγγοι υστέρησης των NPs που συντέθηκαν σε δ/τη PEG600 με ή χωρίς προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων. Διαπιστώνουμε από τη μορφή των καμπυλών ότι τα σωματίδια παρουσιάζουν υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά, χωρίς μόνιμη μαγνήτιση κατά την απομάκρυνση του εξωτερικά εφαρμοζόμενου πεδίου ($M_s=0$). Οι τιμές μαγνήτισης κορεσμού υπολογίστηκαν ότι είναι 10 emu/g για τα επικαλυμμένα με PEG NPs, 22 emu/g για τα οργανόφιλα, 20 emu/g για τα υδρόφιλα και 36 emu/g για τα αμφίφιλα σωματίδια. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά χαμηλές εάν συγκριθούν με τη μαγνήτιση κορεσμού του υλικού όγκου γ-Fe₂O₃ που κυμαίνεται μεταξύ 60-80 emu/gr [10]. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο μικρότερο μέγεθος των νανοσωματιδίων που συντέθηκαν σε σχέση με το μέγεθος του υλικού όγκου, στη μειωμένη κρυσταλλικότητα του μαγνητικού πυρήνα (μη «ιδανική» κρυστάλλωση), καθώς και στο οργανικό περιεχόμενο της επιφάνειας, την παρουσία δηλαδή της PEG και των επιφανειοδραστικών ενώσεων του ΟΑ και MUA, που επηρεάζουν τη συνολική μάζα του δείγματος. Η υποεκτίμηση του πάχους της μη-μαγνητικής στοιβάδας πολυμερούς που καλύπτει το μαγνητικό πυρήνα, μειώνει την υπερπαραμαγνητική συνεισφορά του στη συνολική μαγνήτιση [11]. Παρατηρείται ακόμη, ότι η προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων αυξάνει την τιμή της μετρούμενης μαγνήτισης κορεσμού, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση που παρουσιάστηκε στη δομική ανάλυση των NPs, ότι οι επιφανειοδραστικές ενώσεις αυξάνουν το μέγεθος των σωματιδίων, βελτιώνοντας την κρυστάλλωση τους, καθώς επίσης διαπιστώνεται και το ότι μειώνονται οι ενεργές θέσεις πρόσδεσης της PEG600 στην επιφάνεια των NPs.



Σχήμα 7.10: Βρόγχοι υστέρησης NPs οξειδίων του σιδήρου παρασκευασμένα σε δ/τη PEG600, παρουσία ΟΑ, παρουσία MUA και παρουσία ΟΑ και MUA.

Στο Σχήμα 7.11 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι τιμές μαγνήτισης κορεσμού των οργανόφιλων, υδρόφιλων και αμφίφιλων NPs, συναρτήσει της προσθήκης επιφανειοδραστικών ενώσεων. Στο Σχήμα 7.2 είχε παρουσιαστεί η μεταβολή του μεγέθους συναρτήσει της προστιθέμενης ποσότητας επιφανειοδραστικών ενώσεων κατά την πειραματική διαδικασία. Επομένως, στόχος μας είναι να εξηγήσουμε την επίδραση του μεγέθους, αλλά και της πολυμερικής στοιβάδας που περιβάλλει τα NPs στις τιμές μαγνήτισης κορεσμού τους. Για τα οργανόφιλα NPs, παρατηρείται ότι υπάρχει αύξηση της μαγνήτισης κορεσμού με την προσθήκη ΟΑ στο δ/μα. Η περαιτέρω όμως προσθήκη του ΟΑ οδηγεί σε μείωση των υπολογιζόμενων τιμών μαγνήτισης κορεσμού, όχι λόγω μείωσης του μέσου μεγέθους των οργανόφιλων NPs, ίσως λόγω της αύξησης της οργανικής στοιβάδας, που επηρεάζει το συνολικό βάρος, άρα και τον τελικό υπολογισμό της μαγνήτισης κορεσμού του μαγνητικού πυρήνα. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρείται για τα υδρόφιλα NPs, τα οποία είχαν παρουσιάσει σταθερό μέσο μεγέθος με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας MUA. Αντίθετα, τα αμφίφιλα NPs, παρουσιάζουν αυξητική πορεία στις τιμές μαγνήτισης κορεσμού με την αύξηση της ποσότητας επιφανειοδραστικών ενώσεων που προστίθενται, γεγονός που υποδηλώνει ότι όσο λιγότερη PEG συνδέεται στη δομή του μαγνητικού πυρήνα, τόσο καλύτερη κρυστάλλωση παρουσιάζουν τα νανοσωματίδια, επιτρέποντας την ανάπτυξη των NPs σε μεγαλύτερο μέγεθος, προσδίδοντας κιόλας υψηλότερες τιμές μαγνήτισης κορεσμού.


Σχήμα 7.11: Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής της μαγνήτισης κορεσμού συναρτήσει της περιεκτικότητας σε επιφανειοδραστικές ενώσεις των (a) οργανόφιλων, (b) υδρόφιλων και (c) αμφίφιλων NPs.

7.4.1 Μαγνητική Υπερθερμία

Όπως έχει αναφερθεί είναι σημαντικό κατά τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό των NPs να ελεγχθεί η παραγόμενη θερμότητα των μαγνητικών υδατικών δ/των για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Επομένως, πριν ολοκληρωθεί η επιφανειακή μορφοποίηση των δειγμάτων, έγινε έλεγχος της υπερθερμίας του υδατικού δ/τος που παρατηρείται με επιβολή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Στο Σχήμα 7.12 παρατηρούνται οι καμπύλες υπερθερμίας που ελήφθησαν συναρτήσει του χρόνου, για υδρόφιλα και αμφίφιλα μαγνητικά δ/τα διαφορετικών συγκεντρώσεων. Από την κλίση των καμπυλών έχει υπολογιστεί ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας όπου και παρατηρείται ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης των δ/των, ο ρυθμός αυξάνει, καθώς οι μαγνητικοί πυρήνες μεταβάλλουν τα μαγνητικά spin με την επιβολή του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Οι ρυθμοί που υπολογίζονται αναγράφονται μέσα στα διαγράμματα, για κάθε συγκέντρωση των μαγνητικών δ/των, αντίστοιχα. Επίσης παρατηρείται ότι τα μαγνητικά διαλύματα των αμφίφιλων νανοσωματιδίων αυξάνουν πιο γρήγορα τη θερμοκρασία του διαλύματος με την επιβολή του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και παρατηρείται ένα πλατό από τα 1250 s και μετά. Αυτό ήταν αναμενόμενο, μιας και τα αμφίφιλα σωματίδια παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές μαγνήτισης. Η ταχύτητα αύξησης της θερμοκρασίας είναι άμεσα εξαρτώμενη από τις μαγνητικές ιδιότητες των σωματιδίων. Συμπεραίνεται επομένως, ότι η μεγαλύτερη μέση τιμή μαγνήτισης κορεσμού που παρουσιάζουν τα αμφίφιλα NPs, λόγω της πιο καλά οργανωμένης κρυσταλλικής δομής τους, δίνει μεγαλύτερη απόδοση θερμότητας στα υδατικά μαγνητικά δ/τα που υπόκεινται σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο [12]. Στόχος είναι γενικά τα μαγνητικά διαλύματα να προσεγγίζουν όσο πιο γρήγορα τη θερμοκρασία των 45°C (στην οποία καταστρέφονται τα καρκινικά κύτταρα) για να μην υπόκεινται για μεγάλο γρόνο οι ζωντανοί οργανισμοί σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.



Σχήμα 7.12: Καμπύλες αύξησης θερμοκρασίας των (a) υδρόφιλων και (b) αμφίφιλων μαγνητικών υδατικών δ/των για διαφορετικές συγκεντρώσεις μαγνητικών NPs.

7.5 Χαρακτηρισμός υδροδυναμικού μεγέθους και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη του υδροδυναμικού μεγέθους των σωματιδίων. Τα σωματίδια βρίσκουν εφαρμογή στην *in vivo* μεταφορά φαρμάκων, οπότε καθίσταται σημαντικός ο προσδιορισμός του ακριβούς μεγέθους τους όταν βρίσκονται σε διασπαρμένη φάση. Όταν τα σωματίδια είναι διαλυμένα σε κάποιον διαλύτη οι αλυσίδες που προσροφόνται στην επιφάνεια τους «ανοίγουν», αυξάνοντας το πραγματικό μέγεθος του μαγνητικού πυρήνα (υδροδυναμικό μέγεθος). Η διάνοιξη των αλυσίδων μπορεί να οδηγήσει σε φραγή του αγγειακού συστήματος όταν τα NPs εισαχθούν στον οργανισμό για τη μεταφορά φαρμάκων [13]. Από τη δυναμική σάρωση φωτός (DLS) προσδιορίστηκαν το υδροδυναμικό μέγεθος των σωματιδίων και το ζ-δυναμικό της επιφάνειάς τους.

Η μελέτη του ζ-δυναμικού παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την τάση που παρουσιάζουν τα NPs να συσσωματώνονται και να δημιουργούν σταθερά κολλοειδή διαλύματα. Ένα κολλοειδές σύστημα παραμένει σταθερό όταν οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις μεταξύ των σωματιδίων (οι οποίες προέρχονται από το καθαρό φορτίο στην επιφάνεια των σωματιδίων), είναι ισχυρότερες από τις ελκτικές δυνάμεις van der Walls μεταξύ των όμοιων σωματιδίων. Επομένως, αν όλα τα σωματίδια τα οποία βρίσκονται διεσπαρμένα μέσα σε μία φάση έχουν μεγάλο αρνητικό ή θετικό ζ-δυναμικό, οι δυνάμεις άπωσης μεταξύ τους θα είναι ισχυρές με αποτέλεσμα τη σταθερότητα του διαλύματος. Αντίθετα, όταν το ζ- δυναμικό είναι κοντά στο μηδέν η συσσωμάτωση είναι πολύ γρήγορη και προκαλείται καταβύθιση [14]. Επίσης, με τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού καθίσταται δυνατή η χρήση κατάλληλης επιφανειοδραστικής ένωσης αντίθετου φορτίου για να συντεθούν σωματίδια πολλαπλών στοιβάδων, ώστε να αποκτήσουν την αόρατη προστασία έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος. Στο Σχήμα 7.13 που ακολουθεί παρουσιάζονται τυπικές καμπύλες κατανομής του υδροδυναμικού μεγέθους και του ζ-δυναμικού των οργανόφιλων NPs γ-Fe₂O₃.

Παρατηρήθηκε ότι και τα τρία είδη σωματιδίων (οργανόφιλα, υδρόφιλα, αμφίφιλα) έχουν αρνητικές τιμές ζ-δυναμικού και δεν υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στις μέσες τιμές τους. Η αρνητική τιμή του ζ-δυναμικού ήταν αναμενόμενη, δεδομένου ότι οι επιφανειοδραστικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη μορφοποίηση των NPs θεωρούνται ανιονικές ενώσεις. Αυτές, οι σχετικά μεγάλες αρνητικές τιμές ζ-δυναμικού είναι υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση που παρουσιάζουν τα κολλοειδή υδατικά διαλύματα των νανοσωματιδίων γ-Fe₂O₃. Η σταθερότητα αυτή ήταν αναμενόμενη, καθώς όπως προτείνεται και στην βιβλιογραφία, σε διαλύματα που γαρακτηρίζονται από τιμές ζ-δυναμικού \geq [30] mV, οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις είναι επαρκείς, για την αποφυγή κροκιδωμάτων και την εξασφάλιση σταθερών

κολλοειδών συστημάτων [15].



Σχήμα 7.13: Καμπύλες κατανομής (a) του υδροδυναμικού μεγέθους και (b) του ζ-δυναμικού οργανόφιλων NPs γ-Fe₂O₃.

Όσον αφορά τα σωματίδια που επικαλύπτονται με MUA, το υδροδυναμικό τους μέγεθος και το ζδυναμικό επηρεάζονται κατά κύριο λόγο από το δεσμό υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ του οξέος και της επιφάνειας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους των NPs και επιπροσθέτως, μένει ελεύθερη η καρβοξυλομάδα για περαιτέρω χημικές αντιδράσεις ή/και τροποποιήσεις. Στον Πίνακα 7.1 παρατίθενται οι τιμές του υδροδυναμικού μεγέθους και ζδυναμικού που υπολογίστηκαν (σε συνθήκες δωματίου).

Δείγμα	Υδροδυναμικό μέγεθος (nm)	Ζ-δυναμικό (mV)
Μη τροποποιημένα NPs	156	-33.2
Επικαλυμμένα με ΟΑ (οργανόφιλα)	196	-34.5
Επικαλυμμένα με MUA (υδρόφιλα)	571	-30.5
Επικαλυμμένα με ΟΑ & MUA (αμφίφιλα)	521	-32

Πίνακας 7.1: Υδροδυναμικό μέγεθος και τιμές ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν.

Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δυναμικής μέτρησης φωτός με στόχο να προσδιοριστεί το υδροδυναμικό μέγεθος των σωματιδίων, λόγω της επικάλυψης που φέρουν στην επιφάνεια τους και το ζ-δυναμικό της. Η μελέτη πραγματοποιείται σε συνθήκες περιβάλλοντος για διαφορετικές συγκεντρώσεις (5, 50 και 100 mg/L), όπου και προσδιορίζεται η βέλτιστη συγκέντρωση (50 mg/L), στην οποία τα συσσωματώματα δεν επηρεάζουν τη μέτρηση. Κατά τη μελέτη του υδροδυναμικού μεγέθους τα δείγματα που παράγονται, διαλύονται σε διαλύτη που είναι πολύ καλά διασπειρόμενα, σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Για τον υπολογισμό όμως του ζουναμικού, οι μετρήσεις δεν πραγματοποιούνται σε οργανικούς διαλύτες αλλά πρέπει να είναι υδατικός διαλύτης, για να υπάρχουν ιόντα για τη μελέτη του δυναμικού της επιφάνειας των σωματιδίων. Γίνεται επομένως αντιληπτό πως δεν είναι δυνατόν να γίνουν ακριβείς μετρήσεις για τα νανοσωματίδια που έχουν επικαλυφθεί με ΟΑ, καθώς είναι υδρόφοβα.

Σύγκριση του υδροδυναμικού μεγέθους των NPs που συντέθηκαν, υπολογισμένο μέσω DLS, SEM και TEM, καταδεικνύει ότι το μέσο μέγεθος μέσω DLS υπολογίζεται πολύ μεγαλύτερο από το μέγεθος που υπολογίστηκε από τις μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι μέσω των τεχνικών ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και μέσω XRD υπολογίζεται το μέσο μέγεθος των μαγνητικών πυρήνων χωρίς να περιλαμβάνονται οι ενώσεις που προστίθενται για επιφανειακή τροποποίηση.

Λόγω του ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν τα αμφίφιλα και υδρόφιλα NPs, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δυναμικής μέτρησης φωτός, με στόχο να προσδιοριστεί το υδροδυναμικό μέγεθος και το ζ-δυναμικό των σωματιδίων σε διαφορετικές τιμές pH υδατικού διαλύματος (Σχήμα 7.14 a,b) και αυξανόμενης θερμοκρασίας (Σχήμα 7.14 c,d). Με τις αναφερθείσες μετρήσεις προσδιορίζεται ο βαθμός συσσωμάτωσης των σωματιδίων και οι ενώσεις που δύναται να επικαλύψουν τα σωματίδια, μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, λόγω διαφοράς φορτίου. Οι διαφορές που παρατηρούνται στο υδροδυναμικό μέγεθος με τη μεταβολή του pH οφείλονται σε πρωτονίωση και αποπρωτονίωση. Πιο συγκεκριμένα, σε όξινα pH πραγματοποιείται αποπρωτονίωση της θειόλης -SH, ενώ σε βασικά pH πραγματοποιείται αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας [16]. Παρατηρούμε λοιπόν, πως τα νανοσωματίδια που επικαλύπτονται με MUA παρουσιάζουν καλή διαλυτότητα σε βασικές συνθήκες και εμφανίζουν αρνητικό ζ-δυναμικό εξαιτίας του συντονισμού της θειόλης προς τα κατιόντα σιδήρου στην επιφάνεια του μαγκεμίτη, αφήνοντας ελεύθερες καρβοξυλομάδες στο άλλο άκρο [17]. Από τα διαγράμματα (a) και (b) βλέπουμε ότι το ισοηλεκτρικό σημείο για τα υδρόφιλα σωματίδια βρίσκεται σε pH ~3.1 και για τα αμφίφιλα ~4. Στα pH αυτά η τιμή του ζ-δυναμικού μηδενίζεται, με αποτέλεσμα να ευνοείται η δημιουργία συσσωματωμάτων. Στα διαγράμματα (c) και (d) συμπεραίνουμε ότι τα αμφίφιλα νανοσωματίδια δεν παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές στο υδροδυναμικό τους μέγεθος όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, σε αντίθεση με τα υδρόφιλα. Λόγω του ΟΑ που είναι υδρόφοβο, δεν είναι δυνατή η πλήρης διάνοιξη των αλυσίδων. Ακόμη, η ύπαρξη και των δυο επιφανειοδραστικών ενώσεων μειώνει τον αριθμό των μορίων της PEG που θα ενωθούν στο σωματίδιο, οπότε η διάνοιξη της αλυσίδας της PEG είναι σχετικά μικρή. Τέλος, η ύπαρξη των δύο επιφανειοδραστικών ενώσεων περιορίζει τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου ή σουλφιδικών δεσμών. Όλα τα παραπάνω, έχουν ως αποτέλεσμα να παρατηρείται μικρότερο υδροδυναμικό μέγεθος των αμφίφιλων σωματιδίων. Επίσης, και στα δύο είδη σωματιδίων βλέπουμε ότι με αύξηση της θερμοκρασίας, η τιμή του ζδυναμικού αυξάνεται.



Σχήμα 7.14: Μεταβολή υδροδυναμικού μέσου μεγέθους και ζ-δυναμικού με τη μεταβολή (a,b) του pH και (c,d) της θερμοκρασίας για τα υδρόφιλα και τα αμφίφιλα NPs αντίστοιχα.

7.6 Χαρακτηρισμός επιφανειακής μορφοποίησης μαγνητικών νανοσωματιδίων

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 6 της πειραματικής διαδικασίας, ακολουθήθηκε μια διαδικασία επιφανειακής τροποποίησης των νανοσωματιδίων που συντέθηκαν, με σκοπό να συντεθούν δομές έτοιμες να συνδεθούν με κάποιο αντικαρκινικό φάρμακο, όπως είναι η DOX. Σε κάθε στάδιο της μορφοποίησης, πραγματοποιήθηκαν στα εκάστοτε προϊόντα των αντιδράσεων μετρήσεις μέσω της ¹Η και ¹³C NMR φασματοσκοπίας, έτσι ώστε να πιστοποιείται το αναμενόμενο αποτελέσμα για τις ενώσεις που παράγονται και να ελέγχεται η ορθή πρόοδος της διαδικασίας. Παρακάτω παρατίθενται για κάθε στάδιο της επιφανειακής μορφοποίησης ταν καθιστά κατάλληλα για σύνδεση του φαρμάκου DOX.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε σύνδεση της λυσίνης στην επιφάνεια των υδρόφιλων NPs³. Αυτή επιβεβαιώνεται από το φάσμα IR, στο οποίο εμφανίζεται οι χαρακτηριστικές κορυφές του εστέρα που σχηματίζεται. Στο Σχήμα 7.15 που ακολουθεί σημειώνονται όλες οι χαρακτηριστικές δονήσεις των ενώσεων που εμφανίζονται στο μορφοποιημένο δείγμα των NPs. Η κορυφή στους 535 cm⁻¹ αντιστοιχεί στο δεσμό Fe-O των μαγνητικών νανοσωματιδίων. Οι κορυφές C-O και $-CH_2$ οφείλονται στην ύπαρξη της PEG και η κορυφή του δεσμού CH-S στο MUA. Στους 1515 και 1576 cm⁻¹ παρατηρούνται κορυφές που αντιστοιχούν στο τέντωμα των δεσμών C=O και C=C (αποδίδεται στον αρωματικό δακτύλιο), αντίστοιχα, ενώ στους 3300 cm⁻¹ περίπου η κορυφή που εμφανίζεται στο δεσμό N-H. Τέλος, στους 2100 cm⁻¹ παρατηρούμε την κορυφή που αποδίδεται στο τέντωμα του δεσμού C-N. Οι κορυφές είναι χαρακτηριστικές της λυσίνης και επιβεβαιώνουν τη σύνδεσή της στα NPs.

³ Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν μόνο υδρόφιλα νανοσωματίδια, για να δείξουμε ότι ακόμα και ο δισουλφιδικός δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ των αλυσίδων MUA, μπορεί να καταστήσει ικανή την περαιτέρω επιφανειακή μορφοποίηση των NPs, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκου ή για τη χρήση τους ως μαγνητικά δ/τα.



Σχήμα 7.15: Φάσμα IR της συνδεδεμένης λυσίνης στα μαγνητικά NPs.

Στη συνέχεια, έγινε τροποποίηση της πολυαιθυλενογλυκόλης (mPEG-NH₂) για την προστασία των NPs. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του μηλεϊνικού ανυδρίτη με προσθήκη αμινοξέος με στόχο τη δημιουργία μηλεϊνικού οξέος. Η σύσταση του ενδιάμεσου προϊόντος μελετάται με ¹H και ¹³C NMR φασματοσκοπία σε δευτεριομένη μεθανόλη (CH₃OD) και ζυγίζεται για να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω τροποποίηση.





Σχήμα 7.16: Φάσματα (a) ¹H, (b,c) ¹³C NMR οξέος σε CH₃OD και (d) FT-IR του ενδιάμεσου μηλεϊνικού οξέος.

Από το φάσμα ¹Η NMR (Σχήμα 7.16a) παρατηρείται στα 1.8 ppm μια κορυφή άγνωστης πολλαπλότητας που αντιστοιχεί στα Η του κορεσμένου 2 C όπως σημειώνεται και στη χημική ένωση, ενώ στα 2.35 ppm αντιστοιχεί στα Η του 1 C. Οι πολλαπλές κορυφές που παρατηρούνται στα 3.3 και 3.6 ppm αντιστοιχούν στα H του 3 C σε συνδυασμό με την επίδραση του $\delta/\tau\eta$, καθώς η CH_3OD εμφανίζει κορυφή στο ίδιο σημείο. Η μονή κορυφή που παρατηρείται στα 4.8 ppm ανήκει στο H₂O που έχει η CH₃OD. Τέλος, οι διπλέτες που εμφανίζονται στα 6.2 και 6.4 ppm αντιστοιχούν στα Η των 4 και 5 C, αντίστοιχα. Στο Σχήμα 7.16b και c παρουσιάζεται το φάσμα ¹³C NMR και μεγέθυνση αυτού στις κορυφές που αφορούν το μηλεϊνικό οξύ, αντίστοιχα. Η μεγέθυνση πραγματοποιείται για να αποφεύγεται η κοιλότητα που παρατηρείται στο φάσμα λόγω δυσλειτουργίας του ανιχνευτή του NMR. Στο φάσμα του ¹³C NMR του μηλεϊνικού οξέος σε CH₃OD εμφανίζεται αρχικά μια κορυφή στα 230 ppm που οφείλεται στο διαλύτη (Σχήμα 7.16b,c). Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 20, 30 και 40 ppm οφείλονται στους 2, 1 και 3 C, αντίστοιχα. Η έντονη κορυφή που παρατηρείται στα 50 ppm οφείλεται στο διπλό δεσμό των 4 και 5 C. Στο Σχήμα 7.16d παρουσιάζεται το φάσμα IR του ενδιάμεσου μηλεϊνικού οξέος και σημειώνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του. Στους 1500 cm⁻¹ περίπου η κορυφή αντιστοιχεί στο τέντωμα του δεσμού C=C του δακτυλίου και στους 2160 και 2220 cm⁻¹ η κορυφή που αντιστοιχεί στο δεσμό C-N. Téloc, η κορυφή στους 3300 cm⁻¹ οφείλεται στο τέντωμα του δεσμού H-N.

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του μηλεϊνικού οξέος για το σχηματισμό του μαλεαμιδίου. Κάθε ενδιάμεσο προϊόν που συλλέγεται συμπυκνώνεται και ελέγχεται μέσω ¹H NMR φασματοσκοπίας. Στο Σχήμα 7.17a παρουσιάζεται το φάσμα ¹H NMR σε CDCl₃ του μαλεαμιδίου που παράχθηκε. Η κορυφή που παρατηρείται στα 1.2 ppm αντιστοιχεί στο CH₃COOH που προστέθηκε στο δ/μα κατά το διαχωρισμό με χρωματογραφία στήλης. Οι πολλαπλές κορυφές που εμφανίζονται στα 1.9 και 2.31 ppm αντιστοιχούν στους 2 και 1 C, αντίστοιχα, όπως σημειώνεται στην χημική δομή, ενώ η πολλαπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 3.55 ppm αντιστοιχεί στα H του 3 C. Τέλος, η διπλέτα που εμφανίζεται στα 6.7 ppm οφείλεται στα H των 4 και 5 C, λόγω συμμετρίας της χημικής ένωσης. Από το φάσμα του ¹³C NMR του μαλεαμιδίου σε CDCl₃ εμφανίζεται στα 23, 32 και 38 ppm οφείλεται στο διαλύτη (Σχήμα 7.17b). Οι κορυφή που ενου παρατηρεύται στα 1.71 ppm αντιστοιχεί στον μαλεαμιδίου σε τον κορυφή που παρατηρείται στα 1.75 ppm αντιστοιχεί στον 179 ppm αντιστοιχεί στον μαλεαμιδίου σε κορυφή που παρατηρεύται στα 1.75 και 2.31 και 38 ppm οφείλεται στο διαλύτη (Σχήμα 7.17b). Οι κορυφές που ενου παρατηρεύται στα 1.75 ppm αντιστοιχεί στον 1.75 και 1.75 και 2.75 και 3.75 ppm αντιστοιχα, ή διαλύτη του μαλεαμιδίου σε CDCl₃ εμφανίζεται στα 1.75 ppm αντιστοιχεί στον 1.75 και 2.75 και 3.75 ppm αντιστοιχα, δια 25 και 38 ppm οφείλεται στο διαλύτη (Σχήμα 7.17b). Οι κορυφές που κορυφή που παρατηρείται στα 1.75 ppm οφείλεται στο διπλό δεσμό των 6 και 7 C. Η κορυφή που εντοπίζεται στα 1.71 ppm αντιστοιχεί στον υποκατεστημένο 1 C και τέλος, η κορυφή στα 1.79 ppm αντιστοιχεί στον υποκατεστημένο 1 C και τέλος, η κορυφή στα 1.79 ppm



Σχήμα 7.17: Φάσματα (a) ¹Η ΚΑΙ (b) ¹³C NMR σε CDCl₃ τελικού προϊόντος που διαχωρίστηκε κατά το διαχωρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης.

Φασματοσκοπία ¹Η NMR πραγματοποιήθηκε και στο ενδιάμεσο προϊόν που παραλάβαμε κατά το διαχωρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης. Το φάσμα που εξήχθη δεν παρουσίαζε κάποια πληροφορία για τη δομή κάποιας ενδιάμεσης ένωσης για αυτό και δεν παρουσιάζεται. Περιγραφικά, στο φάσμα στα 0 ppm παρατηρείται μια κορυφή που οφείλεται σε υπολείμματα πυριτίας, μια έντονη κορυφή στα 1.2 ppm οφείλεται στην παρουσία του CH₃COOH που προστέθηκε κατά το διαχωρισμό με χρωματογραφία στήλης, για να αποφεύγεται το τράβηγμα των καρβοξυλίων όταν γίνεται έλεγχος με TLC και τέλος, μια μικρή κορυφή που εμφανίζεται στα 5.1 ppm πιθανόν να οφείλεται σε υπολείμματα DIPEA.

Στο τρίτο στάδιο έγινε η τελική τροποποίηση της mPEG-NH₂ με τη σύνδεση σε αυτή του μαλεαμιδίου. Από το φάσμα ¹H NMR (Σχήμα 7.18a) παρατηρήθηκε στα 7.25 ppm η κορυφή που αντιστοιχεί στο δ/τη CDCl₃, η οποία έχει κοπεί για να γίνει μεγέθυνση στις κύριες κορυφές της ένωσης. Οι πολλαπλές κορυφές που παρατηρούνται στα 3.632 ppm οφείλονται στην επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της PEG (-CH₂-CH₂-O-, M.W.= 44 g/mol), των οποίων η ένταση διαφοροποιείται λόγω των διαφορετικών μοριακών βαρών που εμφανίζονται. Η κορυφή που παρατηρείται στα 3.3 ppm οφείλεται στο CH₃-O-CH₂-CH₂- (M.W. = 59 g/mol) άκρο από τα μόρια PEG. Από την ολοκλήρωση υπολογίζεται ότι αυτή η κορυφή οφείλεται συνολικά σε 326 H, δηλαδή λόγω 82 επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων. Τέλος, πολύ μικρές κορυφές εμφανίζονται στα 6.736 ppm, η οποία ευθύνεται στα Η των διπλών δεσμών των 4 και 5 C, όπως

αναγράφονται και στο χημική δομή της προς μελέτης ένωσης. Επίσης, μελετήθηκε η ένωση μέσω ¹³C NMR φασματοσκοπίας κατά την οποία αυξήθηκε ο χρόνος T_2 , διότι λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους ο χρόνος χαλάρωσης της PEG αυξάνει. Δυστυχώς, λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους, ήταν δύσκολο να παραλάβουμε το ¹³C φάσμα, στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας, και θα πραγματοποιηθεί στη συνέχιση της μελέτης. Παρόλα αυτά πραγματοποιήθηκε μελέτη μέσω IR, όπου και παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες δείχνουν την τροποποίηση της mPEG-NH₂ (σύνθεση της PEG5000). Από το φάσμα IR που παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.18b, παρατηρούμε τις κορυφές –CH₂ (2850 cm⁻¹) και –OH (3500 cm⁻¹), καθώς και την κορυφή του δεσμού H-N στους 1500 cm⁻¹, χαρακτηριστικών της τροποποιημένης mPEG. Στο μαλεαμίδιο αποδίδονται οι κορυφές στους 1333 cm⁻¹ του διπλού δεσμού C=C και στους 1600 και 1700 cm⁻¹ των διπλών δεσμών C=O. Το τέντωμα του δεσμού C-N στους 2160-2230 cm⁻¹ υποδηλώνει τη σύνδεση του μαλεαμιδίου στην τροποποιημένη mPEG.

Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιήθηκε σύνδεση της τροποποιημένης PEG στην επιφάνεια των NPs. Το φάσμα IR της ένωσης (Σχήμα 7.19) αποτελεί συνδυασμό των φασμάτων που παρουσιάστηκαν παραπάνω (NPs-Lys και mPEG-Maleimide). Παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές των NPs (Fe-O) και του MUA (CH-S), της λυσίνης (C=C, N-H stretching, C=O stretching, C-N) και της τροποποιημένης PEG5000 (-CH₂, -OH, N-H bonding) με συνδεδεμένο το μαλεαμίδιο (C=O, C-N stretching). Συμπεραίνουμε επομένως, πως έχει συνδεθεί η μορφοποιημένη PEG5000 στα σωματίδια.





Σχήμα 7.18: Φάσματα (a) ¹Η της μορφοποιημένης PEG5000 και (b) IR από τη μορφοποιημένη PEG5000.



Σχήμα 7.19: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης σύνδεσης της μορφοποιημένης PEG στην επιφάνεια των NPs σε όξινο περιβάλλον.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύνδεση στα τροποποιημένα NPs του φολικού οξέος. Στο Σχήμα 7.20 παρουσιάζεται το φάσμα και όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που παρατηρούνται από τα τροποποιημένα νανοσωματίδια στα οποία έχει συνδεθεί το φολικό οξύ. Για το φολικό οξύ, με βάση τη βιβλιογραφία, παρατηρούμε τη δόνηση της καρβοξυλικής ομάδας στους 1626 cm⁻¹ και το τέντωμα του δεσμού C-H (της ομάδας $-CH_2$) στους 2900 cm⁻¹. Επίσης περιμένουμε στους 1731 cm⁻¹ μία κορυφή που αντιστοιχεί στο δεσμό $-CO-NH_2$ και αυτή του φαινυλικού δακτυλίου στους 431 cm⁻¹ [2]. Στο Σχήμα 7.20, παρατηρείται ότι οι χαρακτηριστικές κορυφές του φολικού οξέος συμπίπτουν με κορυφές άλλων ενώσεων, με εξαίρεση την κορυφή του $-CO-NH_2$.



Σχήμα 7.20: Φάσμα IR του συνδεδεμένου φολικού οξέος στην επιφάνεια των μορφοποιημένων σωματιδίων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων που λαμβάνονται από τις διαφορετικές τεχνικές χαρακτηρισμού που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της λειτουργικότητας των μαγνητικών NPs που παρασκευάζονται με χημική μέθοδο. Αναλύθηκε η επίδραση των επιφανειοδραστικών ενώσεων σε μέγεθος, σχήμα, μαγνητικές ιδιότητες και στην επιφανειακή χημεία των NPs. Τέλος, αναλύθηκαν τα φάσματα IR και NMR για να διαπιστωθούν οι δομές των μαγνητικών NPs που μορφοποιούνται επιφανειακά μετά από μια διαδικασία σύνδεσης δραστικών μοριών και ενώσεων που προσδίδουν μεγαλύτερο χρόνο παραμονής των NPs στους βιολογικούς οργανισμούς αλλά και προστασία έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος.

Δομικός Χαρακτηρισμός

- Από την ανάλυση με XRD, προσδιορίστηκε ότι τα νανοσωματίδια (NPs) παρουσιάζουν την τυπική δομή του γ-Fe₂O₃, με χημικά διαταραγμένη την κυβική εδροκεντρωμένη (fcc) δομή.
- Από τα φάσματα XRD και με τη βοήθεια της εξίσωσης Scherrer υπολογίστηκε το μέσο μέγεθος των σωματιδίων που παρασκευάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, τα επικαλυμμένα με PEG νανοσωματίδια, παρουσίασαν μέγεθος ίσο με 6,7 nm. Τα οργανόφιλα (επικάλυψη με ελαϊκό οξύ-OA) είχαν μέγεθος ίσο με 5,3 nm. Τα υδρόφιλα (επικάλυψη με μερκαπτοενδεκανοϊκό οξύ-MUA) είχαν μέγεθος ίσο με 10,6 nm και τα αμφίφιλα (επικάλυψη με OA και MUA) μέγεθος ίσο με 8,8 nm.
- Η προσθήκη του ελαϊκού οξέος παρατηρήθηκε ότι μειώνει το μέγεθος του πυρήνα των σωματιδίων, αλλά δεν επηρεάζει τη δομή τους. Για τα οργανόφιλα NPs, η προσθήκη του OA, αυξάνει το μέσο μέγεθος των σωματιδίων που υπολογίζεται από την εξίζωση του Scherrer. Μεγάλη όμως άυξηση οδηγεί στο σχηματισμό NPs με πολύ μικρό μέγεθος, μικρότερο από αυτό που προσδιορίζεται για τα NPs, που είναι επικαλυμμένα μόνο με PEG.
- Το μέγεθος των NPs δεν επηρεάζεται με την αύξηση της περιεκτικότητας σε MUA, αλλά παρατηρείται μείωση της διασποράς μεγέθους, όσο αυξάνεται η ποσότητα σε MUA. Για τα αμφίφιλα NPs παρατηρείται αντίστοιχη συμπεριφορά με τα οργανόφιλα νανοσωματίδια.
- Από τη μελέτη της μορφολογίας των NPs μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM), το μέσο μέγεθος των σωματιδίων προσδιορίστηκε ~ 20 nm για τα οργανόφιλα και τα αμφίφιλα NPs και ~ 16 nm για τα υδρόφιλα NPs.
- Από τις εικόνες που λαμβάνονται από το TEM, παρατηρούμε ότι τα σωματίδια έχουν σχήμα σφαιρικό, μεγάλη διασπορά μεγέθους και κρυσταλλική δομή. Ακόμη, συμπεραίνουμε ότι τα νανοσωματίδια δε σχηματίζουν συσσωματωμάτα, αλλά εγκλωβίζονται σε δομή μεμβράνης, η οποία δημιουργείται από την PEG και οφείλεται στον τρόπο που στεγνώνει το δείγμα κατά την εναπόθεσή του στο υμένιο άνθρακα. Επίσης, είναι εμφανές από τις διαφορές στα μεγέθη του πυρήνα που υπολογίζονται μέσω TEM και XRD το σφάλμα της μεθόδου υπολογισμού του μέσου μεγέθους που ανέπτυξε ο Scherrer.
- Τόσο από την ανάλυση με TEM όσο και με XRD, διαπιστώνουμε πως τα νανοσωματίδια που παρασκευάζονται έχουν ομοιόμορφο σχήμα και μεγάλη διασπορά μεγέθους, χαρακτηριστικά που αναμένονταν λόγω της μεθόδου της πολυόλης που χρησιμοποιήθηκε.

Χαρακτηρισμός της Επιφανειακής Χημείας των NPs

- Το οργανικό περιεχόμενο των νανοσωματιδίων μελετήθηκε με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR. Στα φάσματα IR των σωματιδίων που συντέθηκαν σε δ/τη PEG600 παρατηρήθηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές των εκάστοτε επικαλύψεων που χρησιμοποιήθηκαν (PEG, OA και MUA), επιβεβαιώνοντας την πρόσδεση των επιφανειοδραστικών ενώσεων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Παρασκευάστηκαν επομένως με επιτυχία, νανοσωματίδια που παρουσίαζαν οργανοφιλικότητα, υδροφιλικότητα και σωματίδια που ήταν διαλυτά τόσο σε οργανικό όσο και υδατικό διαλύτη (αμφίφιλα). Επίσης, παρασκευάστηκαν σωματίδια αόρατα προς το ανοσοποιητικό σύστημα (τροποποιημένα με PEG) και κατάλληλα για χρήση στη διάγνωση και θεραπεία καρκινικών όγκων.
- Το IR φάσμα των σωματιδίων που περιέχουν στην επιφάνεια τους OA και MUA αποτελούν ένα συνδυασμό των φασμάτων που περιέχουν ξεχωριστά PEG, OA και MUA και οι κορυφές έχουν μικρότερη ένταση συγκριτικά με τα μεμονωμένα φάσματα. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι στα αμφίφιλα νανοσωματίδια, οι ποσότητες του OA και του MUA που προσδένονται σε αυτά είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες στα σωματίδια που παρουσιάζουν μόνο οργανόφιλη ή μόνο υδρόφιλη συμπεριφορά.
- Συμπληρωματικά της IR τεχνικής, η επιφανειακή πρόσδεση των επιφανειοδραστικών ενώσεων και της PEG επιβεβαιώθηκε με την τεχνική XPS. Παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές ενέργειες της δομής γ-Fe₂O₃ του σιδήρου, καθώς και εκείνες των υδροξυλικών, καρβοξυλικών ομάδων και των θειολών. Από τα δεδομένα ποσοστιαίας ατομικής περιεκτικότητας στις κυριότερες ενέργειες δεσμών που παρατηρήθηκαν σε οργανόφιλα, υδρόφιλα και αμφίφιλα νανοσωματίδια, προκύπτει η ύπαρξη στην επιφάνεια των ΝPs του OA, του MUA και των δύο ενώσεων αντίστοιχα.

Χαρακτηρισμός των μαγνητικών ιδιοτήτων

- Με χρήση VSM, οι τιμές μαγνήτισης κορεσμού υπολογίστηκαν ότι είναι 10 emu/g για τα μηεπικαλυμμένα NPs, 22 emu/g για τα οργανόφιλα, 20 emu/g για τα υδρόφιλα και 36 emu/g για τα αμφίφιλα σωματίδια. Οι τιμές μαγνήτισης που προέκυψαν είναι σχετικά χαμηλές και οφείλονται στο μικρό μέγεθος και τη μη ιδανική κρυστάλλωση του πυρήνα, αλλά και στην επικάλυψη της επιφάνειας από την PEG και τις επιφανειοδραστικές ενώσεις. Από τους βρόγχους υστέρησης διαπιστώνουμε ότι τα σωματίδια παρουσιάζουν υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά, χωρίς μόνιμη μαγνήτιση, κατά την απομάκρυνση του εξωτερικά εφαρμοζόμενου πεδίου.
- Προσδιορίστηκε επίσης ότι οι τιμές μαγνήτισης κορεσμού επηρεάζονται από το μέσο μέγεθος του μαγνητικού πυρήνα, αλλά και από το μέγεθος της πολυμερικής στοιβάδας που επικαλύπτει τα νανοσωματίδια.
- Για τα οργανόφιλα και υδρόφιλα NPs, παρατηρείται αύξηση της μαγνήτισης κορεσμού με την προσθήκη OA και MUA αντίστοιχα στο δ/μα. Η περαιτέρω όμως προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων οδηγεί σε μείωση των υπολογιζόμενων τιμών μαγνήτισης κορεσμού. Αντίθετα, τα αμφίφιλα NPs, παρουσιάζουν αυξητική πορεία στις τιμές μαγνήτισης κορεσμού με την αύξηση της ποσότητας επιφανειοδραστικών ενώσεων που προστίθενται (εξαιτίας της μικρότερης ποσότητας PEG).
- Από μετρήσεις μαγνητικής υπερθερμίας που πραγματοποιήθηκαν, υπολογίστηκε ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας, όπου και παρατηρείται αύξηση αυτού με την αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων. Επίσης παρατηρείται ότι τα μαγνητικά διαλύματα των

αμφίφιλων νανοσωματιδίων αυξάνουν πιο γρήγορα τη θερμοκρασία του διαλύματος συγκριτικά με τα υδρόφιλα, με την επιβολή του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Χαρακτηρισμός υδροδυναμικού μεγέθους και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων

- Μέσω της τεχνικής DLS προσδιορίζεται το υδροδυναμικό μέγεθος των νανοσωματιδίων, πολύ μεγαλύτερο από το μέγεθος που υπολογίστηκε από τις μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, λόγω της διάνοιξης των αλυσίδων των επιφανειοδραστικών ενώσεων.
- Συμπεραίνουμε ότι τα αμφίφιλα νανοσωματίδια δεν παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές στο υδροδυναμικό τους μέγεθος, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, σε αντίθεση με τα υδρόφιλα. Επίσης, παρατηρείται μικρότερο υδροδυναμικό μέγεθος των αμφίφιλων σωματιδίων.
- Παρατηρήθηκε ότι και τα τρία είδη σωματιδίων (οργανόφιλα, υδρόφιλα, αμφίφιλα) έχουν αρνητικές τιμές ζ – δυναμικού και δεν υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στις μέσες τιμές τους. Οι σχετικά μεγάλες τιμές ζ-δυναμικού που υπολογίστηκαν, είναι υπεύθυνες για τη σταθερότητα που παρουσιάζουν τα κολλοειδή υδατικά διαλύματα των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν.
- Σε ουδέτερα pH παρατηρούμε σταθερότητα των διαλυμάτων, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται επιτυχώς τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων. Σε όξινα pH, όπως αυτά που επικρατούν στις περιοχές καρκινικών όγκων παρατηρούμε πρωτονίωση και αποπρωτονίωση, επομένως και αποδέσμευση του περιεχόμενου φαρμάκου.

Χαρακτηρισμός επιφανειακής μορφοποίησης μαγνητικών νανοσωματιδίων

Από τα φάσματα IR που προέκυψαν σε κάθε στάδιο της επιφανειακής μορφοποίησης (σύνδεση λυσίνης στα νανοσωματίδια, σύνθεση μαλεαμιδίου, τροποποίηση mPEG και σύνδεσή της στα νανοσωματίδια, σύνδεση φολικού οξέος), παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές κάθε ένωσης αντίστοιχα. Συμπεραίνουμε επομένως, ότι πραγματοποιήθηκε τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων, καθιστώντας τα κατάλληλα για σύνδεση του φαρμάκου DOX.

Συμπερασματικά:

Η ανάπτυξη του τομέα της νανοτεχνολογίας έχει οδηγήσει μέχρι σήμερα στην παρασκευή μαγνητικών νανοσωματιδίων, τα οποία λειτουργούν ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών για στοχευμένη θεραπεία ή/και για μαγνητική υπερθεμία, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα ανίχνευσης των ασθενειών. Στη διπλωματική εργασία αναλύθηκαν τα πειραματικά αποτελέσματα που λαμβάνονται από την πληθώρα των τεχνικών χαρακτηρισμού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξακρίβωση της δομής, του μεγέθους, της επιφανειακής χημείας και της μαγνήτισης που παρουσιάζουν τα βιοσυμβατά οξείδια του σιδήρου. Από τη φύση τους τα νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου είναι οργανοδιαλυτά, οπότε απαιτείται η επιφανειακή τροποποίηση τους με τέτοιο τρόπο που να καθίστανται υδατοδιαλύτα. Με την κατάλληλη τροποποίηση (επικάλυψη με πολυαιθυλενογλυκόλη-PEG) επιτυγχάνεται παράλληλα η δημιουργία αόρατων ως προς το ανοσοποιητικό σύστημα μαγνητικών σωματιδίων, με δυο βασικά μειονεκτήματα: τα σωματίδια αυξάνουν σε μέγεθος και μειώνεται η συνολική μαγνήτιση τους, λόγω της οργανικής επικάλυψης. Στην προσπάθεια να βρεθεί μια αποδοτική (και οικονομική) μέθοδος παρασκευής μεγάλης κλίμακας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της πολυόλης. Τα νανοσωματίδια που

παρασκευάζονται με τη μέθοδο αυτή είναι σφαιρικά, παρουσιάζουν κρυσταλλικότητα και δίνεται η δυνατότητα της *in situ* τροποποίησης της επιφάνειας των νανοσωματιδίων, ώστε να επιτυγχάνεται η μετέπειτα μορφοποίηση για την τελική εφαρμογή στον εντοπισμό και καταπολέμηση ασθενειών. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η μεγάλη διασπορά μεγέθους, η επιφανειακή πολυμερική στοιβάδα που δημιουργείται λόγω του πολυμερικού δ/τη και οι μικρές τιμές μαγνήτισης που μετρώνται, που παρόλα αυτά είναι ικανοποιητικές για τη χρήση μαγνητικών δ/των με στόχο την υπερθερμία των κυττάρων.

Με συνδυασμό διαφορετικών επιφανειοδραστικών ενώσεων (ελαϊκό οξύ και μερκαπτοενδεκανοϊκό οξύ) επιτεύχθηκε η παραλαβή σε ένα στάδιο οργανόφιλων, υδρόφιλων και αμφίφιλων σωματιδίων. Η σημαντικότητα των αμφίφιλων σωματιδίων βρίσκεται στη δυνατότητα τους να εγκλωβίσουν τα φάρμακα στην οργανοδιαλυτή φάση τους και να μεταφερθούν απευθείας στα υδατικά διαλύματα, ενώ παράλληλα δύνανται να φέρουν και άλλα στοιχεία όπως γονίδια, ένζυμα, πρωτεΐνες και παράγοντες υπερθερμίας. Τέλος, απαιτείται μικρότερη ποσότητα οργανικών επιφανειοδραστικών ενώσεων με στόχο τη δημιουργία αόρατων σωματιδίων για το ανοσοποιητικό σύστημα.

Σήμερα, αποτελεί πρόκληση η δημιουργία νανοσωματιδίων που θα μπορούν να θεραπεύουν μεταστατικά καρκινικά κύτταρα του νεοπλάσματος και μικρούς όγκους σε αρχικό στάδιο ανάπτυξής τους. Η θεραπεία των καρκινικών κυττάρων σε αρχικό στάδιο, είναι ένα πεδίο που θα απασχολήσει την ανάπτυξη νέων νανοσωματιδίων που θα μπορούν να εντοπίζουν και να καταστρέφουν παράλληλα καρκινικά κύτταρα. Αυτού του είδους τα νανοσωματίδια θα είναι δυνατό να αναγνωρίζουν μικρά σμήνη καρκινικών κυττάρων (παράγοντες διάγνωσης) και μεταφέροντας τα κατάλληλα στοιχεία (φάρμακο ή/και χρήση τους ως παράγοντες υπερθερμίας) θα τα καταστρέφουν. Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση των νανοσωματιδίων ως μέσω εισχώρησης σε όγκους που βρίσκονται σε περιοχές όπου η συμβατική χειρουργική είναι δύσκολο να αποδώσει (όπως ο εγκέφαλος).

Οι δυνατότητες που παρουσιαζεί η χρήση των μαγνητικών νανοσωματιδίων σε βιοϊατρικές εφαρμογές είναι πάρα πολλές, καθιστώντας την έρευνα και ανάπτυξη των νανοφορέων, ως μια ελπιδοφόρα λύση για την καταπολέμηση του καρκίνου. Η συνέχεια της παρούσας μελέτης μπορεί να περιλαμβάνει έλεγχο των συνθηκών των πειραμάτων (μπορεί να ελεγχθεί, η δομή και το μέγεθος των νανοσωματιδίων), επιβεβαίωση εγκλωβισμού φαρμακευτικής ουσίας στα αμφίφιλα ή/και υδρόφιλα σωματίδια (χαρακτηριστικά αναφέρεται η μελέτη ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης και ενκαψυλίωσης της DOX), εκτίμηση της σταθερότητας των σωματιδίων κατά τη μεταφορά τους στα υδατικά διαλύματα και εκτίμηση του χρόνου ζωής στο κυκλοφοριακό σύστημα. Επίσης, περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη στη χρήση των νανοσωματιδίων σε άλλες παθήσεις, όπως για παράδειγμα στις νευρολογικές παθήσεις (πολυπλοκότητα και η ευαισθησία του εγκεφάλου). Ο εγκέφαλος έχει αναπτύξει αποτελεσματικούς μηχανισμούς προστασίας από χημικά σκευάσματα, που μπορεί να αποτρέψουν θεραπευτικές επεμβάσεις. Πολλές υπάρχουσες φαρμακευτικές αγωγές καθίστανται αναποτελεσματικές, λόγω της ανικανότητας, των μέχρι τώρα μεθόδων, να εναποθέσουν αποτελεσματικά τις ουσίες και να διατηρηθούν στον εγκέφαλο. Για αυτούς τους λόγους μέθοδοι που θα ενισχύσουν τη μεταφορά φαρμάκων στον εγκέφαλο εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς που πάσχουν από ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως όγκοι στον εγκέφαλο, ΗΙV εγκεφαλοπάθειες, επιληψία και εκφυλισμό των νευρικών δυσλειτουργιών είναι περισσότεροι σε αριθμό αυτών που πεθαίνουν από όλες τις μορφές καρκίνου ή καρδιακών παθήσεων.

Κλείνοντας, αξίζει να αναφερθεί η αναγκαιότητα προσδιορισμού της τοξικότητας των νανοσωματιδίων, καθώς και η διεξαγωγή ερευνών, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, προκειμένου αυτά να καθίστανται ικανά για ακόμα πιο εκλεκτική θεραπεία καρκινικών όγκων και ουσιαστική εξάλειψη των παρενεργειών που παρατηρούνται στους καρκινοπαθείς που υποβάλλονται στις συμβατικές θεραπείες για την καταπολέμηση-εξάπλωση του καρκίνου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Κ. Α. Χαριτίδης, Νανοδομές & Νανοϋλικά, Σύνθεση, Ιδιότητες & Εφαρμογές, Εκδόσεις Ε.Μ.Π, Αθήνα 2007.
- P.M. Nagy, Characterization of layered materials by combined Nanoindentation and AFM, microscopy and analysis, vol.92, (2004), pp. 13.
- [3] Michael J. Pitkethly, Nanomaterials the driving force, Materials Today, vol. 7, 12, 1, December (2004), pp. 20-29.
- [4] The MicroJet Reactor for Producing Nanoparticles, Synthesechemie GmbH, home.tonline.de/home/penth/ebesch.htm
- [5] kava Technology (2004), <u>www.kavatechnology.com/index.html</u>
- [6] E.L. Mayes, J. Mag. Soc. Japan, vol. 26, (2002), pp. 932-935.
- [7] K.L. Choy, Process principles and applications of novel and cost- effective ESAVD based methods. In Innovative Processing of Films and Nanocrystalline Powders, World Scientific Publishing, Singapore, (2002).
- [8] M.S. Dresselhaus et.al., Carbon nanotubes- Synthesis, Structure, Properties and Applications, Springer- Verlag, Berlin/Heidelberg, (2001)
- [9] A. S. Edelstein, Nanomaterials, Encyclopedia of Materials: Science and Technology, (2008), pp. 5916- 5927.
- [10] http://en.wikipedia.org/wiki/Nucleation
- [11] D.A. Tomalia, Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry, Prog. Polym. Sci., vol. 30, 3-4, (2005),pp. 294-324.
- [12] Cornell R M and Schwertmann U, The Iron Oxides (New York: VCH),(1996)
- [13] P. Gambardella,S. Rusponi, M. Veronese,S. S. Dhesi,C. Grazioli, A. Dallmeyer,I. Cabria,R. Zeller,P. H. Dederichs, K. Kern, C. Carbone, H. Brune, Giant Magnetic Anisotropy of Single Cobalt Atoms and Nanoparticles, Science 300, (2003), 1130–3
- [14] Lalatonne Y, Richardi J and Pileni M P Van der Waals versus dipolar forces controlling mesoscopic organizations of magnetic nanocrystals Nat. Mater. 3,(2004), 121–5
- [15] Redl F X, Cho K S, Murray C B and O'Brien S Three-dimensional binary superlattices of magnetic nanocrystals and semiconductor quantum dots. Nature 423 (2003) 6943:968-71
- [16] D. S. Tang, S. S. Xie, Z. W. Pan, L. F. Sun, Z. Q. Liu, X. P. Zou, Y. B. Li, L. J. Ci, W. Liu, B. S. Zou, W. Y. ZhouPreparation of monodispersed multi-walled carbon nanotubes in chemical vapor deposition Chem. Phys. Lett. 356 ,(2002), 563–6
- [17] Bao S-J, Zhang X-G and Liu X-M Fenzi Cuihua 17, (2003) 96–100
- [18] Moser A, Takano K, Margulies D T, Albrecht M, Sonobe Y, Ikeda Y, Sun S and Fullerton E E Magnetic recording: advancing into the future J. Phys. D: Appl. Phys. 35 ,(2002), R157–67
- [19] Matsushita N, Chong C P, Mizutani T and Abe M, Ni–Zn ferrite films with high permeability ($\mu'=\sim30$, $\mu''=\sim30$) at 1 GHz prepared at 90°C J. Appl. Phys. 91, (2002), 7376
- [20] Sorenson T A, Morton S A, Waddill G D and Switzer J A, Epitaxial electrodeposition of Fe(3)O(4) thin films on the lowindex planes of gold J. Am. Chem. Soc. 124, (2002), 7604–9
- [21] Deliyanni E A, Bakoyannakis D N, Zouboulis A I and Matis Sorption of As(V) ions by akaganéite-type nanocrystals. K A Chemosphere 50,(2003), 155–63
- [22] Yamada M, Waki I, Sakairi M, Sakamoto M and Imai T Real-time-monitored decrease of trichlorophenol as a dioxin surrogate in flue gas using iron oxide catalyst Chemosphere 54, (2004),1475–80
- [23] Trivedi P and Axe L, Modeling Cd and Zn sorption to hydrous metal oxides Environ. Sci. Technol. 34, (2000), 2215–23
- [24] Benjamin M M and Leckie J O, Multiplesite adsorption of Cd, Cu, Zn, and Pb on amorphous iron oxyhydroxide J. Colloid Interface Sci. 79, (1981), 209–21
- [25] Yean S, Cong L, Yavuz C T, Mayo J T, Yu W W, Kan A T, Colvin V L and Tomson M B, Effect of magnetic particle size on adsorption and desorption of arsenite and arsenateJ. Mater. Res. 20, (2005), 3255–64
- [26] Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L, Glogarova K, Kroupova J, Andersson B, Bryja V, Burian M, Hajek M and Sykova E, Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord J. Neurosci. Res. 76, (2004), 232–43
- [27] Wiltshire M C K, Pendry J B, Young I R, Larkman D J, Gilderdale D J and Hajnal J V Magnetic Materials for RF Flux Guides in Magnetic Resonance Imaging Science 291,(2001) 849–51
- [28] Loubeyre P, Jaegere T D, Bosmans H, Miao Y, Ni Y, Landuyt W and Marchal G J. Comparison of iron oxide particles (AMI 227) with a gadolinium complex (Gd-DOTA) in dynamic susceptibility contrast MR imagings (FLASH and EPI) for both phantom and rat brain at 1.5 Tesla, Mag. Reson. Imaging 9, (1999),447-53
- [29] Cheng F-Y, Su C-H, Yang Y-S, Yeh C-S, Tsai C-Y, Wu C-L, Wu M-T and Shieh D-B Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications, Biomaterials 26 (2005) 729–38
- [30] Jun YW, Huh YM, Choi JS, Lee JH, Song HT, Kim S, Yoon S, Kim KS, Shin JS, Suh JS, et al. Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. J Am Chem Soc. 127: (2005) 5732–5733
- [31] Song H-T, Choi J-S, Huh Y-M, Kim S, Jun Y-W, Suh J-S and Cheon J, Surface modulation of magnetic nanocrystals in the development of highly efficient magnetic resonance probes for intracellular labeling. J.Am.Chem. Soc. 127 (2005) 9992-3
- [32] Huh YM, Jun Y, Song HT. In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. J Am Chem Soc. 127: (2005) 12387–12391.
- [33] Bucak S, Jones D A, Laibinis P E and Hatton T A Protein Separations using Colloidal Magnetic Nanoparticles

Biotechnol. Prog. 19 (2003) 477-84

- [34] Hatch G P and Steler R E Magnetic design considerations for devices and particles used for biological high-gradient magnetic separation (HGMS) systems, J. Magn. Magn. Mater. 225 (2001) 262–76
- [35] Xie X, Zhang X, Zhang H, Chend D and Fei W, Preparation and application of surface-coated superparamagnetic nanobeads in the isolation of genomic DNA J. Magn. Magn. Mater. 277 (2004) 16–23
- [36] Nam J-M, Thaxton C S and Mirkin C A Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins, Science 301 (2003) 1884–6
- [37] Shinkai M and Ito A,Functional magnetic particles for medical application, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 91 (2004) 191–220
- [38] M. Arruebo, R. Fernandez- Pacheco, M. R. Ibarra, J. Santamaria, J. Nano Today 2 (3), (2007) 22-32.
- [39] Juan-Juan Yin, Sonali Sharma, Stepan P. Shumyak, Zhi-Xin Wang, Zhi-Wei Zhou, Peixuan Guo, Chen-Zhong Li, Jagat, R. Kanwar, Tianxin Yang, Shyam S. Mohapatra, Wei Duan, Jian-Chen Wang, QiLi, Xueji Zhang, Jun Tan, Lee Jia, Ming, Q. Wei, Xiaotian L, Shu-Feng Zhou, Yangde Zhang, Wanqing Liu, Jun, Liang Synthesis and Biological Evaluation of Novel Folic Acid Receptor-Targeted, b-Cyclodextrin-Based Drug Complexes for Cancer Treatment Plos One Vol.8, Issue 5 (2013)
- [40] Jin Xie, Seulki Lee, Xiaoyuan Chen Nanoparticle-based theranostic agents, Advanced Drug Delivery Reviews 62 (2010) 1064–1079
- [41] Z. Karimi, L. Karimi, H. Shokrollahi Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials Materials Science and Engineering C 33 (2013) 2465–247
- [42] Lefebure S, Dubois V, Cabuil V, Neveu, Massart S. Monodisperse magnetic nanoparticles: preparation and dispersion in water and oils. J Mater Res 10 1998 2975.
- [43] Bean CP, Livingstone JD. Superparamagnetism. J Appl Phys 30 1959 120S–9S.
- [44] Lee, J, Isobe, T, Senna, M. Preparation of ultrafine Fe₃O₄ particles by precipitation in the presence of PVA at high pH. J Colloid Interface Sci 177: (1996) 490.
- [45] Harris, J. Laboratory synthesis of polyethylene glycol derivatives. J. Macromol. Sci.- Rev.Macromol Chem. Phys. C25, (1985) 325-373.
- [46] Yamaoka, T., Tabata, Y. and Ikada, Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. J. Pharm. Sci. 83, (1994) 601-606.
- [47] Ashwinkumar Bhirde, Jin Xie, Maggie Swierczewska and Xiaoyuan Chen Nanoparticles for cell labeling Nanoscale 3 (2011) 142–153
- [48] Mehmet V. Yigit & Anna Moore & Zdravka Medarova Magnetic Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy Pharm Res 29 (2012) 1180–1188

- A.K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, Biomaterials 26 (2005) 3995–4021.
- [2] Z. Ma, H. Liu, Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine J. China Particuology 5 (2007) 1–10.
- [3] N. Tran, T.J. Webster, Biomedical applications and challenges, J. Mater. Chem. 20 (2010) 8760–8767.
- [4] C. Sun, J. Lee, Zhang M, Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery Adv. Drug Deliv. Rev. 60 (2008) 1252–1265.
- [5] Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. J. Pharm. Biopharm. 57 (2004) 35–52.
- [6] Subhankar Bedanta, Supermagnetism in Magnetic Nanoparticle Systems, Phd thesis submitted to V.F. Physik, Duisburg-Essen Univ, (2006)
- [7] T. Neuberger, B. Schopf, H. Hofmann, M. Hofmann, B. Vonrechenberg, Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. J. Magn. Mater. 293 (2005) 483–496
- [8] M. Mahmoudi, M.A. Shokrgozar, A. Simchi, M.Imani, A.S.Milani, P.Stroeve et al., Multiphysics flow modeling and in vitro toxicity of iron oxide nanoparticles coated with polyvinyl alcohol. J. Phys. Chem. C 113 (2009) 2322–2331
- [9] Mahmoudi, A.S. Milani, A. Simchi, P. Stroeve, Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, J. Colloid Interface, Sci. 336 (2009) 510–518.
- [10] H.L. Karlsson, P. Cronholm, J. Gustafsson, L. Möller, Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. Chem. Res. Toxicol. 21 (2008) 1726–1732
- [11] O. Veiseh, J.W. Gunn, M. Zhang, Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging, Adv. Drug Deliv. Rev. 62 (2010) 284–304.
- [12] R. Ramanujan, Magnetic Particles for Biomedical Applications, Ntu.edu.sg. Springer Science (2009) 477-491
- [13] D.H. Kim, D.E. Nikles, C.S. Brazel, Synthesis and Characterization of Multifunctional Chitosan-MnFe2O4 Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia and Drug Delivery, Materials 3 (2010) 4051–4065
- [14] D. H. Everett, Basic principles of colloid science. Royal Society of Chemistry, Hertfordshire, UK (1989).
- [15] C. C. Berry, S. Wells, S. Charles, and A. S. G. Curtis, "Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro," Biomaterials, vol. 24, (2003) pp. 4551-4557.
- [16] C. C. Berry and A. S. G. Curtis, "Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicne," Journal of Physics D: Applied Physics, vol. 26 (2003) pp. R198- R206.
- [17] Xu, C. & Sun, S. Superparamagnetic nanoparticles as targeted probes for diagnostic and therapeutic applications.Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003), (2009) 5583-5591.
- [18] Ferrari, M., Curr. Opin. Chem. Biol. (2005) 9, 343.
- [19] Meng, F., et al., J. Biomed. Mater. Res. (2004) A70, 49.

- [20] Shen, X.-C., Fang, X.-Z., Zhou, Y.-H. & Liang, H. Synthesis and Characterization of 3-Aminopropyltriethoxysilane-Modified Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles. Chemistry Letters 33, (2004) 1468-1469.
- [21] Ma, M.et al. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 212, (2003) 219-226.
- [22] S. Palmacci and L. Josephson, "Synthesis of polysaccharide covered superparamagnetic oxide colloids," U. S. Patents vol. 5262176, Ed., (1993).
- [23] P. Wunderbaldinger, L. Josephson, R. Weissleder, Crosslinked iron oxides (CLIO): A new platform for the development of targeted MR contrast agents, (2002) pp. S304–S306.
- [24] Omid Veiseh, Jonathan W. Gunn, Miqin Zhang Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging Advanced Drug Delivery Reviews 62 (2010) 284–304
- [25] K. G. Paul, T. B. Frigo, J. Y. Groman, and E. V. Groman, "Synthesis of ultrasmall superparamagnetic iron oxide using reduced polysaccharides," Bioconjugate Chemistry, vol. 15, (2004) pp. 394-401.
- [26] C. C. Berry, S. Wells, S. Charles, G. Aitchison, and A. S. G. Curtis, "Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation," Biomaterials, vol. 25, (2004) pp. 5405-5413.
- [27] L. A. Harris, J. D. Goff, A. Y. Carmihael, J. S. Riffe, J. J. Harburn, T. G. St Pierre, and M. Saunders, "Magnetite nanoparticle dispersions stablized with triblock copolymers," Chemistry of Materials, vol. 15, (2003) pp. 1367-1377.
- [28] A. Chastellain, A. Petri, and A. Hofmann, "Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles," Journal of Colloid and Interface Science, vol. 278, (2004) pp. 353-360.
- [29] Torchilin, V.P. and Papisov, MI. Hypothesis: why do polyethylene glycol-coated liposmes circulate so long. J. Liposome Res. 4, (1994) 725-739.
- [30] Blume, G. and Cevc, G. Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in viva. B&him. Biophys.Acta 1146, (1993) 157-168.
- [31] Woodle, M.C. and Lasic, D.D. Sterically stabilized liposomes. Biochim. Biophys. Acta 1113, (1992) 171-199.
- [32] Jeon, S.I. and Andrade. J.D. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxyde. II.Effect of protein size. J. Colloid Interf. Sci. 142, (1991) IS9- 166.
- [33] G. Devanand Venkatasubbu,S. Ramasamy, G.S. Avadhani, V. Ramakrishnan, J. Kumar Surface modification and paclitaxel drug delivery of folic acid modified polyethylene glycol functionalized hydroxyapatite nanoparticles Powder Technology 235 (2013) 437–442
- [34] T. Sen, I.J. Bruce, Microporous Mesoporous Mater. 120 (2009) 246–251
- [35] L. Qu, S. Tie, Microporous Mesoporous Mater. 117 (2009) 402–405.
- [36] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, Adv. Drug Deliv. Rev. 63 (2010) 24-46
- [37] Y. Lu, Y. D. Yin, B. T. Mayers, and Y. N. Xia, "Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach", Nano Letters, vol. 2, (2002) pp. 183-186.
- [38] C. Lu, Y. Hung, J. Hsiao, Y. Lin, S. Wu, S. Hsu, H. Liu, C. Mou, C. Yang, D. Huang, and Y. Chen, "Bifunctional magnetic silica nanoparticles for highly efficient huamn stem cell labeling" Nano Letters, (2006)
- [39] K. Dormer, C. Seeney, K. Lewelling, G. Lian, D. Gibson, and M. Johnson, "Epithelial internalization of superparamagnetic nanoparticles and response to external field," Biomaterials, vol. 26, (2005) pp. 2061-2072.
- [40] Bishop, Paul L. (Pollution Prevention: Chapter 2 Properties and Fates of Environmental Contaminants, instructional slides to accompany Pollution Prevention:Fundamentals and Practice, by Paul L. Bishop (ISBN 0-07-366147-3) (2005).
- [41] "Adrenoleukodystrophy: oleic acid lowers fibroblast saturated C22-26 fatty acids". National Center for Biotechnology Information. 3 March 1986. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3951702. Retrieved on 7 October 2008.
- [42] Valeria Pala, Vittorio Krogh, Paola Muti, Véronique Chajès, Elio Riboli, Andrea Micheli, Mitra Saadatian, Sabina Sieri, Franco Berrino "Erythrocyte Membrane Fatty Acids and Subsequent Breast Cancer: a Prospective Italian Study". *JNCL* 93. PMID 11459870. <u>http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/content/full/93/14/108</u>8. Retrieved on 30 November 2008.
- [43] L. Ngaboni Okassa, H. Marchais, L. Douziech-Eyrolles, S. Cohen-Jonathan, M. Souce, P. Dubois, I.Chourpa, Development and characterization of sub-micron poly(D,L-lactide-co-glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles, Int. J. Pharm. 302 (2005) 187–196.
- [44] M. A. Morales, Tapan Kumar Jain, V. Labhasetwar, D. L. Leslie-Pelecky, Magnetic studies of iron oxide nanoparticles coated with oleic acid and Pluronic® block copolymer, JOURNAL OF APPLIED PHYSICS 97, (2005) 10Q905.
- [45] U.O. Häfeli, Magnetically modulated therapeutic systems, Int. J. Pharm. 277 (2004) 19–24.
- [46] Xiaoli Zhou a, Jouliana M. El Khoury a, Liangti Qu b, Liming Dai b, Quan Li. A facile synthesis of aliphatic thiol surfactant with tunable length as a stabilizer of gold nanoparticles in organic solvents, Journal of Colloid and Interface Science 308 (2007) 381–384.
- [47] T. Laaksonen, P. Ahonen, C. Johans and K. Kontturi, Stability and Electrostatics of Mercaptoundecanoic Acid Capped Gold Nanoparticles with Varying Counter-Ion Sizes, ChemPhysChem, 7(10), (2006) 2143-2149.
- [48] Chun-jiao ZHOU, Shao-hua WANG, Yu ZHOU, Peng-fei RONG, Zi-zi CHEN, Jin-yan LIU, Jian-da ZHOU Folateconjugated Fe3O4 nanoparticles for in vivo tumor labeling, Trans. Nonferrous Met. Soc. China 23(2013) 2079–2084.
- [49] Saqlain A. Shah, A. Majeed, K. Rashid, Saif-Ullah Awan, PEG-coated folic acid-modified superparamagnetic MnFe2O4 nanoparticles for hyperthermia therapy and drug delivery, Materials Chemistry and Physics 138 (2013) 703-708.
- [50] Z. Karimi, L. Karimi, H. Shokrollahi Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials Materials Science and Engineering C 33 (2013) 2465–247

- [1] LaMer, V.K. & Dinegar, R.H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. J. Am. Chem. Soc. 72, (1950) 4847-4854.
- [2] Neena V. Jadhav, Amresh I. Prasad, Amit Kumar, R. Mishra, Sangita Dhara, K.R. Babu, C.L. Prajapat, N.L. Misra, R.S. Ningthoujam, B.N. Pandey, R.K. Vatsa Synthesis of oleic acid functionalized Fe3O4 magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 108 (2013) 158–168
- [3] Schmid, G. Nanoparticles: From Theory to Application (2005).
- [4] Zhao, P., Weng, J. & Hou, P. Preparation and characteristics of iron oxide nanoparticles modified by bovine serum albumin. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering* 26, (2009) 1005-1009.
- [5] Bumb, A. et al. Synthesis and characterization of ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles thinly coated with silica. *Nanotechnology* **19**, (2008) 335601-335601.
- [6] Maity, D. & Agrawal, D.C. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **308**, (2007) 46-55.
- [7] Darbandi Masih, Stromberg Frank, Landers Joachim, Reckers Nathalie, Sanyal Biplab, Keune Werner, Wende Heiko, Nanoscale size effect on surface spin canting in iron oxide nanoparticles synthesized by the microemulsion method. *Journal of Physics D: Applied Physics* **45**, (2012) 195001-195001.
- [8] Ganguli, A.K., Ganguly, A. & Vaidya, S. Microemulsion-based synthesis of nanocrystalline materials. *Chemical Society Reviews* **39**, (2010) 474-474.
- [9] Darmawan, A., Smart, S., Julbe, A. & Diniz da Costa, J.C. Iron Oxide Silica Derived from Sol-Gel Synthesis. *Materials* 4, (2011) 448-456.
- [10] Zhang, Y., Cao, J.X., Nie, D.P., Liu, F. & Dong, Y.G. Preparation and Characterization of Nanometer Iron Oxide by Sol-Gel Method and Supercritical Fluid Drying Technology. *Key Engineering Materials* 368-372, (2008) 617-619.
- [11] Maria Starowicz, Paweł Starowicz, Jan Żukrowski, Janusz Przewoźnik, Andrzej Lemański, Czesław Kapusta, Jacek Banaś , Electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles with controlled size. *Journal of Nanoparticle Research* 13, (2011) 7167-7176.
- [12] Therese, G.H.A. & Kamath, P.V. Electrochemical Synthesis of Metal Oxides and Hydroxides. *Chemistry of Materials* 12, (2000) 1195-1204.
- [13] Osborne Elizabeth A, Atkins Tonya M,Gilbert Dustin A, Kauzlarich Susan M, Liu Kai,Louie Angelique Y, Rapid microwave-assisted synthesis of dextran-coated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Nanotechnology* 23, (2012) 215602-215602.
- [14] Alina M. Balu, Doris Dallinger, David Obermayer, Juan M. Campelo, Antonio A. Romero, Daniel Carmona, Francisco Balas, Kenta Yohida, Pratibha L. Gai, Carolina Vargas, C. Oliver Kappe and Rafael Luque Insights into the microwave-assisted preparation of supported iron oxide nanoparticles on silica-type mesoporous materials. *Green Chemistry* 14, (2012) 393-393.
- [15] Acarbas, O. & Ozenbas, M. Preparation of iron oxide nanoparticles by microwave synthesis and their characterization. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **8**, (2008) 655-659.
- [16] Lin, M.M. & Kim, D.K. In situ thermolysis of magnetic nanoparticles using non-hydrated iron oleate complex *Journal* of Nanoparticle Research 14 (2012).
- [17] Bao, N., Shen, L., Wang, Y., Padhan, P. & Gupta, A. A Facile Thermolysis Route to Monodisperse Ferrite Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society* **129**, (2007) 12374-12375.
- [18] J. Cheon, N.-J. Kang, S.-M. Lee, J.-H. Lee, J.-H. Yoon, and S. J. Oh, Shape Evolution of Single-Crystalline Iron Oxide Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society* 126, (2004) 1950-1951.
- [19] Cai, W. & Wan, J. Facile synthesis of superparamagnet ic magnetite nanoparticles in liquid polyols. *Journal of Colloid* and Interface Science **305**, (2007) 366-370.
- [20] Hou, Y., Yu, J. & Gao, S. Solvothermal reduction synthesis and characterization of superparamagnetic magnetite nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **3**, (2003) 1983-1987.
- [21] Feldmann, C. & Jungk, H.-O. Polyol-Mediated Preparation of Nanoscale Oxide Particles. *Angewandte Chemie International Edition* **40**, (2001) 359-362.
- [22] Sun, X.-Y., Yu, S.-S., Wan, J.-Q. & Chen, K.-Z. Facile graft of poly(2- methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) onto Fe3O4 nanoparticles by ATRP: Synthesis, properties, and biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, (2012).
- [23] Helen Zhang and David Jin, One-Pot Synthesis of Water Soluble, Extremely Small-Sized Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles. *Advanced Materials Research* **531**, (2012) 219-222.
- [24] Viau, G., Fiévet-Vincent, F.o. & Fiévet, F. Monodisperse iron-based particles: precipitation in liquid polyols. *Journal of Materials Chemistry* 6, (1996) 1047-1047.
- [25] Xu, C. & Sun, S. Superparamagnetic nanoparticles as targeted probes for diagnostic and therapeutic applications. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, (2009) 5583-5591.
- [26] Laurent, S. et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064-2110 (2008) 2064-2110.
- [27] Kim, D.K., Mikhaylova, M., Zhang, Y. & Muhammed, M. Protective Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chemistry of Materials* 15, (2003) 1617-1627.
- [28] Jolivet J.-P, Chaneac C. & Tronc E. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chemical Communications*, (2004) 481.
- [29] Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *Magnetics, IEEE Transactions on* **17**, (1981) 1247-1248.

- [30] Lucia Babes, Benor't Denizot, Gisele Tanguy, Jean Jacques Le Jeune, and Pierre Jallet, Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study. *Journal of Colloid and Interface Science* 212, (1999) 474-482.
- [31] Vayssières, L., Chanéac, C., Tronc, E. & Jolivet, J.P. Size Tailoring of Magnetite Particles Formed by Aqueous Precipitation: An Example of Thermodynamic Stability of Nanometric Oxide Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **205**, (1998) 205-212.
- [32] Jiang, W. et al. Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **283**, (2004) 210-214.
- [33] Jolivet, J.P., Tronc, E. & Chanéac, C. Synthesis of iron oxide- and metal-based nanomaterials. *The European Physical Journal Applied Physics* **10**, (2000) 167-172.
- [34] Lu, J. et al. Solid-state synthesis of monocrystalline iron oxide nanoparticle based ferrofluid suitable for magnetic resonance imaging contrast application. *Nanotechnology* **17**, (2006) 5812-5820.
- [35] Gribanov, N.M., Bibik, E.E., Buzunov, O.V. & Naumov, V.N. Physico –chemical regularities of obtaining highlydispersed magnetite by the method of chemical condensation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **85**, (1990) 7-10.
- [36] Gupta, A.K. & Wells, S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *NanoBioscience, IEEE Transactions on* 3, (2004) 66-73.
 [37] Kim, D.K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K.V. & Muhammed, M. Synthesis and characterization of surfactant- coated
- [37] Kim, D.K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K.V. & Muhammed, M. Synthesis and characterization of surfactant- coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225, (2001) 30-36.
- [38] Xiao-Min Lina, Anna C.S. Samia Synthesis, assembly and physical properties of magnetic nanoparticles Journal of Magnetism and Magnetic Materials 305 (2006) 100–109
- [39] Okoli, C., Boutonnet, M., Mariey, L., Järås, S. & Raarao, G. Application of magnetic iron oxide nanoparticles prepared from microemulsions for protein purification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 86, (2011) 1386-1393.
- [40] C. Okoli, M. Sanchez-Dominguez, M. Boutonnet et al., Comparison and Functionalization Study of Microemulsion-Prepared Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* 28, (2012) 8479-8485.
- [41] Yu, W.W., Chang, E., Sayes, C.M., Drezek, R. & Colvin, V.L. Aqueous dispersion of monodisperse magnetic iron oxide nanocrystals through phase transfer. *Nanotechnology* 17, (2006) 4483-4487.
- [42] Hou, Y., Yu, J. & Gao, S. Solvothermal reduction synthesis and characterization of superparamagnetic magnetite nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **13**, (2003) 1983-1987.
- [43] Feldmann, C. & Jungk, H.-O. Polyol-Mediated Preparation of Nanoscale Oxide Particles. Angewandte Chemie International Edition 40, (2001) 359-362.
- [44] Caruntu, D., Caruntu, G. & O'Connor, C.J. Magnetic properties of variable-sized Fe₃O₄ nanoparticles synthesized from non-aqueous homogeneous solutions of polyols. *Journal of Physics D: Applied Physics* **40**, (2007) 5801-5809.
- [45] Hu, F., Jia, Q., Li, Y. & Gao, M. Facile synthesis of ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles for dual-contrast T 1 and T 2 -weighted magnetic resonance imaging. *Nanotechnology* **22**, (2011) 245604-245604.
- [46] Qu, H., Caruntu, D., Liu, H. & O'Connor, C.J. Water-Dispersible Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with Versatile Surface Functionalities. *Langmuir* 27, (2011) 2271-2278.
- [47] Casula MF, Jun YW, Zaziski DJ, Chan EM, Corrias A, *et al.*, The Concept of Delayed Nucleation in Nanocrystal Growth Demonstrated for the Case of Iron Oxide Nanodisks. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, (2006) 1675-1682.
- [48] Franz X. Redl, Charles T. Black, Georgia C. Papaefthymiou, Robert L. Sandstrom, Ming Yin, Hao Zeng, Christopher B. Murray and Stephen P. O'Brien. Magnetic, Electronic, and Structural Characterization of Nonstoichiometric Iron Oxides at the Nanoscale. J. Am. Chem. Soc. 126, (2004) 14583-14599.
- [49] Wang, X., Zhuang, J., Peng, Q. & Li, Y. A general strategy for nanocrystal synthesis. *Nature* 437, (2005) 121-124.
- [50] Qingliang He, Dr. Tingting Yuan, Prof. Dr. Suying Wei, Neel Haldolaarachchige, Dr. Zhiping Luo, Prof. Dr. David P. Young, Dr. Airat Khasanov and Prof. Dr. Zhanhu Guo. Morphology and Phase-Controlled Iron Oxide Nanoparticles Stabilized with Maleic Anhydride Grafted Polypropylene. *Angewandte Chemie International Edition* 51, (2012) 8842-8845.
- [51] Woo K, Hong J, Choi S, Lee HW, Ahn JP, Kim CS, Lee SW. Easy Synthesis and Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Mater.* **16**, (2004) 2814-2818.
- [52] Hu, F., Li, Z., Tu, C. & Gao, M. Preparation of magnetite nanocrystals with surface reactive moieties by one-pot reaction. *Journal of Colloid and Interface Science* **311**, (2007) 469-474.
- [53] Chen Qin, Chen Li, Yizhe Hu, Jianfeng Shen, Mingxin Ye Facile synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles using 1methyl-2-pyrrolidone as a functional solvent *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 336 (2009) 130–134

- Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K. & Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. Journal of Physics D: Applied Physics 36, (2003) R167- R181.
- [2] Gao, J., Gu, H. & Xu, B. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. Accounts of Chemical Research 42, (2009) 1097-1107.
- [3] Prasad, N.K., Bahadur, D., Vasseur, S.B. & Duguet, E. in Encyclopedia of Inorganic Chemistry (eds. King, R.B., Crabtree, R.H., Lukehart, C.M., Atwood, D.A. & Scott, R.A.) (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK) (2009).
- [4] Zeng, L., Ren, W., Zheng, J., Cui, P. & Wu, A. Ultrasmall water-soluble metal-iron oxide nanoparticles as T1- weighted contrast agents for magnetic resonance imaging. Physical Chemistry Chemical Physics 14, (2012) 2631-2636.
- [5] Wahajuddin & Arora, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers.International Journal of Nanomedicine 7, (2012) 3445-3471.

- [6] Hugounenq, P. et al. Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. The Journal of Physical Chemistry C 116, (2012) 15702-15712.
- [7] Hilger, I. & Kaiser, W.A. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. Nanomedicine 7, (2012) 1443-1459.
- [8] Kim, D.-H., Nikles, D.E. & Brazel, C.S. Synthesis and Characterization of Multifunctional Chitosan-MnFe2O4 Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia and Drug Delivery. Materials 3, (2010) 4051-4065.
- [9] Seehra, M.S. et al. Size-dependent magnetic parameters of fcc FePt nanoparticles: applications to magnetic hyperthermia. Journal of Physics D: Applied Physics 43 (2010).
- [10] Lai, S.-M. et al. Bifunctional Silica-Coated Superparamagnetic FePt Nanoparticles for Fluorescence/MR Dual Imaging. Journal of Nanomaterials (2012) 1-7.
- [11] Park, J.H., Saravanakumar, G., Kim, K. & Kwon, I.C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. Advanced Drug Delivery Reviews 62, (2010) 28-41.
- [12] Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M.R. & Santamaría, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. Nano Today 2, (2007) 22-32.
- [13] Hadjipanayis, C.G. et al. EGFRvIII Antibody Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for MRI Guided Convection Enhanced Delivery and Targeted Therapy of Glioblastoma. Cancer Research 70, (2010) 6303-6312.
- [14] Ding, G.-B. et al. Enhanced In Vitro Antitumor Efficacy and Strong Anti-Cell-Migration Activity of a Hydroxycamptothecin-Encapsulated Magnetic Nanovehicle. Chemistry – A European Journal 18, (2012) 14037-14046.
- [15] R Jurgons, C Seliger, A Hilpert, L Trahm, S Odenbach and C Alexiou. J. Phys.: Condens. Matter 18, (2006) S2893-S2902.
 [16] Alexiou C, Jurgons R, Schmid R, et al. In vitro and in vivo investigations of targeted chemotherapy with magnetic
- nanoparticles. J Magn Magn Mater. 293: (2005) 389–93.
 [17] Hu F.X., Neoh K.G., Kang E.T. Synthesis and *in vitro* anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA
- [17] Hu F.X., Neoh K.G., Kang E.T. Synthesis and *in vitro* anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. Biomaterials 27: (2006)5725–5733.
- [18] Zhang, YanQi; Li, LinLin; Tang, Fangqiong; Ren, Jun Controlled Drug Delivery System Based on Magnetic Hollow Spheres/Polyelectrolyte Multilayer Core–Shell Structure. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Volume 6,. (2006) 3210-3214(5)
- [19] Manuel Arruebo, Rodrigo Fernández-Pacheco, Silvia Irusta, Jordi Arbiol, M. Ricardo Ibarra, Jesús Santamaría Sustained release of doxorubicin from zeolite-magnetite nanocomposites prepared by mechanical activation. Nanotechnology, 17, (2006) 4057-4064.
- [20] Ma, Y., et al., J. Mater. Eng. Perform. (2006) 15, 376.
- [21] Ma Y, Manolache S, Denes FS, Thamm DH, Kurzman ID, Vail DM. Plasma synthesis of carbon magnetic nanoparticles and immobilization of doxorubicin for targeted drug delivery. J Biomater Sci Polym Ed. 15: (2004)1033–1049.
- [22] Nobuto H, Sugita T, Kubo T, Shimose S, Yasunaga Y, Murakami T, Ochi M: Evaluation of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin and a dipole external electromagnet. Int J Cancer 109 (2004) 627–635.
- [23] Leakakos T, Ji C, Lawson G, et al., Intravesical administration of doxorubicin to swine bladder using magnetically targeted carriers, Cancer Chemother Pharmacol 51(6): (2003) 445–50.
- [24] Rudge S, Peterson C, Vessely, et al. Adsorption and desorption of chemotherapeutic drugs from a magnetically targeted carrier (MTC) J Control Release. 74:1–3. (2001) 335–340.
- [25] Port RE, Schuster C, Port CR, Bachert P. Simultaneous sustained release of fludarabine monophosphate and Gd-DTPA from an interstitial liposome depot in rats: potential for indirect monitoring of drug release by magnetic resonance imaging. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 58(5): (2006) 607–617
- [26] Yang, J., et al., J. Microencapsulation (2006) 23, 203.
- [27] Taepaiboon P, Rungsardthong U and Supaphol P Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibers and their release characteristics of four model drugs Nanotechnology 17 (2006) 2317–29
- [28] Kohler N, Sun C, Fichtenholtz A, et al. Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery. Small. 2(6): (2006) 785–92.
- [29] Kohler N, Sun C, Wang J, Zhang M. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. Langmuir. 21(19): (2005) 8858–64
- [30] Widder KJ, Morris RM, Poore G, Howard DP Jr, Senyei AE. Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rts by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin. Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1981) 78, 579-81.
- [31] Zhang JQ, Zhang ZR, Yang H, Tan QY, Qin SR, Qiu XL. Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: in vitro and in vivo studies. Pharm. Res.4 (2005) 22, 573-583.
- [32] Saravanan M, Bhaskar K, Maharajan G, Pillai KS. Ultrasonically controlled release and targeted delivery of diclofenac sodium via gelatin magnetic microspheres., Int. J. Pharm. 283(1-2):71-82. (2004) 71-82
- [33] Jain S, Mishra V, Singh P, Dubey PK, Saraf DK, Vyas SP. RGD-anchored magnetic liposomes for monocytes/neutrophilsmediated brain targeting. Int. J. Pharm. 261(1-2): (2003) 43-55.
- [34] Φάραγκ Α. Μπιχίτ, Pharmalist II, Εκδόσεις Farag (Ιατροφαρμακευτικές Εκδόσεις Διαφημισείς), Αθήνα, (2006).
- [35] Harisinghani, M. G., Barentsz, J., et al. Noninvasive Detection of Clinically Occult Lymph-Node Metastases in Prostate Cancer. The New England Journal of Medicine 348(25): (2003) pp 2491-2499.
- [36] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, and E. Duguet, "Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy,"Journal of Materials Chemistry, vol. 14, (2004) pp. 2161-2175.
- [37] M. M. Lin, A. J. El Haj, J. Dobson, D K. Kim, development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation to clinical applications, IEEE, (2007).
- [38] T. Neuberger, B. Schopf, H. Hofmann, M. Hofmann, and B. von Rechenberg, "Superparamagnetic nanoparticle for biomedical applications: possibility and limitations of a new drug delivery system," Journal of Magnetism and

Magnetic Materials, vol. 293, (2005) pp. 483-496.

- [39] Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K. & Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* 36, (2003) R167- R181,
- [40] Cole, A.J., Yang, V.C. & David, A.E. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology* 29, (2011) 323-332.
- [41] Ito, A., Shinkai, M., Honda, H. & Kobayashi, T. Medical application oφ functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100, (2005) 1-11.
- [42] Ahmed, N., Fessi, H. & Elaissari, A. Theranostic applications of nanoparticles in cancer. Drug Discovery Today 17, (2012) 928-934.
- [43] A.K. Gupta, M. Gupta. Synthesis and surface modification of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials 26 (2005) 3995-4021.
- [44] Kemmner W, Moldenhauer G, Schlag P, Brossmer R. Separation of tumor cells from a suspension of dissociated human colorectal carcinoma tissue by means of monoclonal antibodycoated magnetic beads. J Immunol Methods (1992);147(2): 197–200.
- [45] Kronick P, Gilpin RW. Use of superparamagnetic for isolation of cells. J Biochem Biophys Methods 1986;12:73-80.
- [46] Lobel B, Eyal O, Kariv N, Katzir A. Temperature controlled CO₂ laser welding of soft tissues: Urinary bladder welding in different animal models (rats, rabbits, and cats). Lasers Surg Med (2000);26:4–12.
- [47] Xu HH, Smith DT, Simon CG. Strong and bioactive composites containing nano-silica-fused whiskers for bone repair. Biomaterials 25(19): (2004) 4615–26.
- [48] Sokolov K, Follen M, Aaron J, Pavlova I, Malpica A, Lotan R, Richards-Kortum R. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. Cancer Res (2003) 63(9).
- [49] S. H. Cartmell, J. Dobson, S. B. Verschueren, A. J. El Haj, "Development of Magnetic Particle Techniques for Long Term Culture of Bone Cells With Intermittent Mechanical Activation," Ieee Transactions on NanoBioscience, vol 1 (2002) pp. 92-97.
- [50] J. P. Dobson, S. H. Cartmell, A. Keramane, and A. J. El Haj, "Principles and design of a novel magnetic force mechanical conditioning bioreactor for tissue engineering, stem cell conditioning, and dynamic in vitro screening," Ieee Transactions on Nanobioscience, vol. 5, (2006) pp. 173-177.
- [51] S. Hughes, J.P. Dobson and A. J. El Haj, Magnetic targeting of mechanosensors in bone cells for tissue engineering applications J Biomechanics in press (2007)
- [52] C. Mah, I. Zolotukhin, T. J. Fraites, J. Dobson, C. Batich, B. J. Byrne "Microsphere-mediated delivery of recombinant AAV vectors in vitro and in vivo," *Molec. Therapy* vol. 1, (2000) pp. S239,.
- [53] C. Mah, T. J. Fraites, I. Zolotukhin, S. H. Song, T. R. Flotte, J. Dobson, C. Batich and B. J. Byrne "Improved method of recombinant AAV2 delivery for systemic targeted gene therapy," *Molecular Therapy* vol. 6, (2002) pp.106-112.
- [54] C. Plank, M. Anton, C. Rudolph, J. Rosenecker, and F. Krotz, "Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force," *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 3, (2003) pp. 745-758.
- [55] C. Plank, U. Schillinger, F. Scherrer, C. Bergemann, J. S. Remy, F. Krotz, M. Anton, J. Lausier, and J. Rosenecker, "The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery," Biological Chemistry, vol. 384, , (2003) pp. 737-747.
- [56] Dhruba J. Bharali, Shaker A. Mousa Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: Current perspective and future promise Pharmacology & Therapeutics 128 (2010) 324–335
- [57] Mehmet V. Yigit & Anna Moore & Zdravka Medarova Magnetic Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy Pharm Res 29 (2012) 1180–1188
- [58] Choi H, Choi SR, Zhou R, Kung HF, Chen IW. Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery. Acad. Rad., 9: (2004), 996-1004.
- [59] Sun, C.; Sze, R.; Zhang, M.Q. Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. J. Biomed. Mater. Res. A, 78A, (2006) 550.

- [1] B.D. Cullity, Elements of X-Ray Diffraction (Second Ed.), Vol. 1, Addison-Wesley (1996).
- [2] Williams, D.B. & Carter, C.B. in Transmission Electron Microscopy Springer US, (2009) 3-22.
- [3] Watt, I.M. The principles and practice of electron microscopy Cambridge University Press, Cambridge, (1997).
- [4] Berne B. J., and Pecora R., *Dynamic light scattering*, Wiley, New York (1976).
- [5] Provencher S. W., A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations, Comput. Phys. Commun. 27, (1982) 213
- [6] Pashley, R. & Karaman, M. Applied Colloid and Surface Chemistry John Wiley & Sons, (2005).
- [7] <u>http://www.iisc.ernet.in</u>
- [8] <u>http://www.dms-magnetics.com</u>
- [9] Cullity, B.D. & Graham, C.D. Introduction to Magnetic Materials Wiley-Blackwell, (2008).
- [10] Farrar T.C., Becker E.D. Pulse and Fourier Transform NMR: Introduction to Theory and Methods. Academic Press, New York, 1971
- [11] Shaw D. Fourier Transform NMR Spectroscopy. North-Holland, New York, 1976.
- [12] Όξενκιουν Πετροπούλου Μ., Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης, Φασματομετρικές Μέθοδοι, Έκδοση: 3η/2012
- [13] Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, Falk J, Reitz-Vick D, **Trevor KT**, Villalba M, Bendick PJ, Glover JL. *Isolation of* endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. Vasc. Surg. 31 (2000) 181.
- [14] Jun YW, Huh YM, Choi JS, Lee JH, Song HT, Kim S, Yoon S, Kim KS, Shin JS, Suh JS, Cheon J. Nanoscale size effect of

magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. J. Am. Chem. Soc 127 (16) (2005) 5732.

- [15] Schopf N T, Hofmann B, Hofmann H, Von Rechenberg M uperparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system J. Magn. Magn. Mater. 293: (2005) 483.
- [16] Gordon R T, Hines J R, Gordon D 1979 Intracellular hyperthermia a biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations Medical Hypothesis 5 (1979) 83.
- [17] Jordan A, Scholz R, Wust P, Fahling H, Krause J, Wlodarczyk W, Sander B, Vogl T, and Felix R Effects of magnetic fluid hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo Int. J. Hyperthermia 13(1997) 587.
- [18] Yanase M, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, and Kobayashi T Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: an *in vivo* study. Jpn. J. Cancer Res. 89 (1998) 463.
- [19] Marco Lattuada and Alan Hatton T Functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles Langmuir 23 (2007) 2158.
- [20] Ma M, Wu Y, Zhou J, Sun Y K, Yu Z, Gu N Size dependence of specific power absorption of Fe3O4particles in AC magnetic field, JMMM 268 (2004) 33.
- [21] Chan D C F, Kirpokin D C, Bunn P A, Ha Feli U, Schutt W, Teller J, Zborowsk M Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (New York: Plenum Press),(1997). /Brusentsov N A, Gogosov V V, Brusentsov T N (2001) 225 113.
- [22] Muller R, Hergt R, Zeisberger M, Gawalek W Investigations on magnetic particles prepared by cyclic growth JMMM 289 (2005) 13.
- [23] Zeng Q, Baker I, Loudis J A, Liao Y, Hoopes P J, and Weaver J B Fe/Fe oxide nanocomposite particles with large specific absorption rate for hyperthermia. Appl. Phys. Lett. 90 (2007) 233112.
- [24] Hergt R, Hiergeist R, Zeisberger M, Schuler D, Heyen U, Hilger I and Kaiser W A Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools J. Magn. Magn. Mater. 293 (2005) 80.
- [25] Moroz P, Jones S K and Gray B N Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions Int. J. Hyperthermia 18 (2002) 267–84.
- [26] R. Hergt, S. Dutz, R. Müller and M. Zeisberger, Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy, J. Phys.: Condens. Matter 18 (2006) S2919–S2934.
- [27] Frimpong RA, Dou J, Pechan M, Hilt JZEnhancing remote controlled heating characteristics in hydrophilic magnetite nanoparticles via facile co-precipitation. J. Magn. Mater 322 (3) (2010) 326–331.
- [28] S.Nigam, K.C.Barick, D.Bahadur, Development of citrate-stabilized Fe3O4 nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications J. Magn. Mater. 323 (2) (2011) 237–243.
- [29] Mathew Kallumadil, Masaru Tada, Takashi Nakagawa, Masanori Abe, Paul Southern, Quentin A. Pankhurst. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia, J. Magn. Magn. Mater. 321 (10) (2009) 1509–1513.
- [30] D. Briggs and M. P. Seah, Practical Surface Analysis 2nd edit., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England (1996).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

- G.N. Glavee, K.J. Klabunde, C.M. Sorensen, G.C. Handjipanayis, Chemistry of borohydride reduction of iron (II) and iron (III) ions in aqueous and non-aqueous media. Formation of nanoscale Fe, FeB and Fe₂B powders, Inorg. Chem. 34;1 (1995) 28-35.
- [2] X. Gao, W. Tao, W. Lu, Q. Zhang, Y. Zhang, X. Jiang, S. Fu, Lectin-conjugated PEG–PLA nanoparticles: Preparation and brain delivery after intranasal administration, Biomaterials 27 (2006) 3482–3490.
- [3] Cava, M. P.; Deana, A. A.; Muth, K.; Mitchell, M. J. "N-Phenylmaleimide", Org. Synth.; Coll. Vol. 5 (1973) 944.

- S.H. Sun, C.B. Murray, D. Weller, L. Folks, A. Moser. Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices. Science 287 (2000) 1989.
- [2] Chen Qin, Chen Li, Yizhe Hu, Jianfeng Shen, Mingxin Ye Facile synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles using 1methyl-2-pyrrolidone as a functional solvent C. Qin et al. / Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 336 (2009) 130–134.
- [3] Z. Karimi, L. Karimi, H. Shokrollahi Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials Materials Science and Engineering C 33 (2013) 2465–2475.
- [4] D. Caruntu, G. Caruntu, Y. Chen, C.J. O'Connor, G. Goloverda, V.L. Kolesnichenko, Chem. Mater. 16 (2004) 5527.
- [5] Jing Liu, Lu Wang, Jing Wang,Lantong Zhang Simple solvothermal synthesis of hydrophobic magnetic monodispersed Fe₃O₄ nanoparticles Materials Research Bulletin 48 (2013) 416–421.
- [6] G. Socrates, Infrared and Raman Characteristics Group Frequencies, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, England. Third Edition, (2011)
- [7] M. Timko, P. Kopčanský, M. Antalik, M. Simsikova, E Valusova, M. Molcan, J. Kováč, Physical Properties of Magnetite Nanoparticles Covered by 11-Mercaptoundecanoic Acid, Acta Phys Polonica A 121 (2012) 5-6.
- [8] Wang L, Bao J, Wang L, Zhang F, Li Y. One-pot synthesis and bioapplication of amine-functionalized magnetite nanoparticles and hollow nanospheres. Chem Eur J 12: (2006) 6341–7.
- [9] S.H. Xu, S.Y. Li, Y.X. Wei, L. Zhang, F. Xu, Reaction Kinetics and Mechanism Catalysis 101 (2010) 237–249.
- [10] M. R. Cornell and U. Schwertmann, The Iron Oxides sVCH, New York, (1996), p. 117.
- [11] J. Vidal-Vidal, J. Rivas, M.A. Lopez-Quintela, Colloids Surf. A 288 (2006) 44-51.
- [12] R. Hergt, S. Dutz, R. Müller and M. Zeisberger, Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy, J. Phys.: Condens. Matter 18 (2006) S2919–S2934.
- [13] M. Di Marco, C. Sadun, M. Port, I. Guilbert, P. Couvreur, C. Dubernet, Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents, International Journal of Nanomedicine:2(4) (2007) 609–622.

- [14] Greenwood, R. Review of the measurement of zeta potentials in concentrated aqueous suspensions using electroacoustics. *Advances in Colloid and Interface Science* **106**, (2003) 55-81.
- [15] Vandana M, Sahoo S. Optimization of physicochemical parameters influencing the fabrication of protein-loaded chitosan nanoparticles. Nanomed 4 (2009) 773–85.
- [16] M. Timko, P. Kopčanský, M. Antalik, M. Simsikova, E Valusova, M. Molcan, J. Kováč, Physical Properties of Magnetite Nanoparticles Covered by 11-Mercaptoundecanoic Acid, Acta Phys Polonica A 121 (2012) 5-6.
- [17] H. Qu, D. Caruntu, H. Liu, and C.J. O'Connor, Langmuir 27 (2011) 2271–2278.
- [18] Hosik Park, Perla Ayala, Marc A. Deshusses, Ashok Mulchandani, Heechul Choi, Nosang V. Myung Electrodeposition of maghemite γ-Fe₂O₃ nanoparticles, Chemical Engineering Journal 139 (2008) 208–212.
- [19] Basavaraja, H. Vijayanand, A. Venkataraman, U. P. Deshpande, T. Shripathi Characterization of γ-Fe2O3 Nanoparticles Synthesized Through Self-Propagating Combustion Route Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry 37: (2007) 409–412.
- [20] Zhijiang Tu, Baolin Zhang, Gao Yang, Ming Wang, Fangyuan Zhao, Dian Sheng, Jun Wang Synthesis of poly(ethylene glycol) and poly(vinyl pyrrolidone) co-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticle as a pH-sensitive release drug carrier Z.Tuetal. / Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 436 (2013) 854–861.