

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ & ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

Μεταπτυχιακή Εργασία

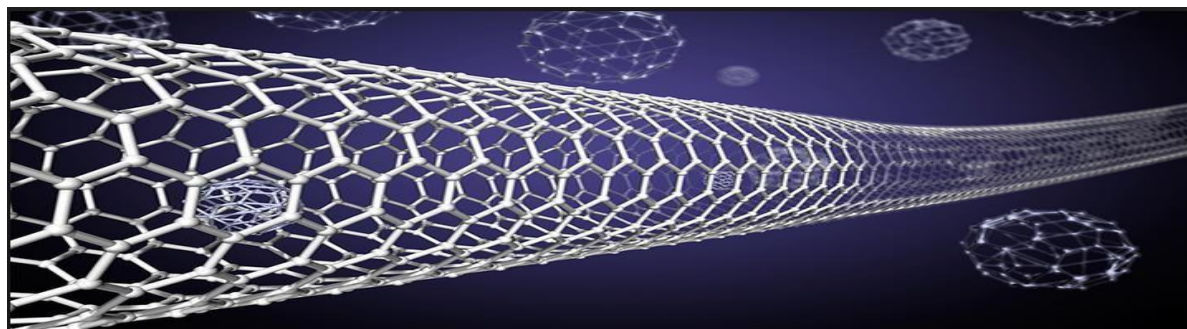
**Τροποποίηση νανοσωλήνων άνθρακα, η αλληλεπίδρασή τους με
λιποσώματα και η μελέτη της συμπεριφοράς του συστήματος**

Μητούδη-Βαγουρδή Ελένη

Ακαδημαϊκή επιβλέπουσα: Αναπλ. Καθ. Μ. Μακροπούλου

Ερευνητικός επιβλέπων: Καθ. Κ. Δεμέτζος

Ερευνητικός επιβλέπων: Δρ. Ν. Ταγματάρχης



NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS
INTERDISCIPLINARY MASTER PROGRAMME IN
“MICROSYSTEMS AND NANOSTRUCTURES”

Master Thesis

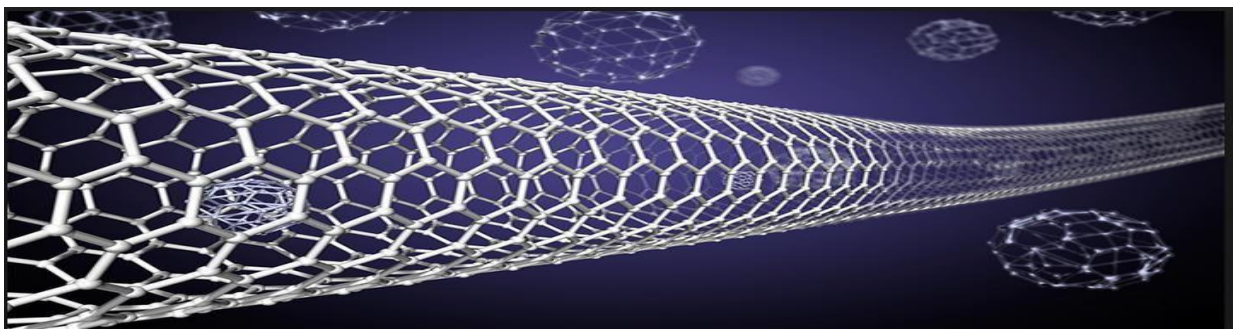
**Carbon nanotubes functionalization, encapsulation into liposomes and
investigation of the system's behavior**

Mitoudi – Vagourdi Eleni

Academic supervisor: As. Prof. M. Makropoulou

Research supervisor: Prof. C. Demetzos

Research supervisor: Dr. N. Tagmatarchis



Εισαγωγή

Στη σύγχρονη εποχή γίνεται όλο και περισσότερο επιτακτική η ανάγκη της βελτιστοποίησης σε κάθε τομέα της καθημερινότητας. Βελτιστοποίηση στον τομέα του περιβάλλοντος σημαίνει ελαχιστοποίηση ρύπων, στον τομέα της υγείας ελαχιστοποίηση παρενεργειών στις θεραπείες, στον τομέα της ενέργειας, μεγαλύτερη απόδοση με λιγότερη ποσότητα καύσιμων. Η νανοτεχνολογία και τα νανοϋλικά είναι βασικό κομμάτι της προσπάθειας αυτής αφού υπεισέρχεται στους τομείς της ενέργειας, του περιβάλλοντος, και της υγείας. Νανοϋλικά όπως οι νανოსωλήνες άνθρακα (CNTs) έχουν παίξει σημαντικό ρόλο τις τελευταίες δεκαετίες σε όλους αυτούς τους τομείς λόγω των πολλών εξαιρετικών ιδιοτήτων τους. Πολλές ερευνητικές ομάδες από όλο τον κόσμο μελετούν τα τελευταία χρόνια όλες τις πιθανές δομές και ιδιότητες του άνθρακα και κατά συνέπεια του γραφενίου με αποτέλεσμα την ανακάλυψη νανοδομών που παίζουν και θα παίζουν καίριο ρόλο σε εφαρμογές του παρόντος και του μέλλοντος.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Κωνσταντίνο Δεμέτσο, καθηγητή του τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών που μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου εργασίας πως οι τομείς της Νανοτεχνολογίας, της Επιστήμης Υλικών και της Φαρμακευτικής μπορούν να συνδυαστούν και να βρουν κοινό τόπο στην έρευνα για την επίτευξη ενός σκοπού. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Αναστασία Πίππα για την βοήθειά της στην κατανόηση εννοιών και πειραματικών μεθόδων κατά την διεξαγωγή πειραμάτων μου στο εργαστήριο του τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Δρ. Νικόλαο Ταγματάρχη, Διευθυντή Τομέα Φυσικής και Θεωρητικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών που δέχθηκε να πραγματοποιήσω το πρώτο μέρος των πειραμάτων μου στα εργαστήρια του τομέα, γεγονός που μου έδωσε την δυνατότητα να γνωρίσω πειραματικά ένα από τα πλέον διαδεδομένα νανοϋλικά όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα και να το χρησιμοποιήσω σε περαιτέρω εφαρμογές. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δημήτριο Χρονόπουλο για την βοήθειά και την παρουσία του καθ' όλη την διάρκειά της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Μυρσίνη Μακροπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στον τομέα Φυσικής του τμήματος Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών επιστημών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου για την στήριξή και την βοήθειά της σε όλη την διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας. Η παρουσία της ήταν πολύ σημαντική τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	3
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	3
1.1 Νανοτεχνολογία	3
1.2 Τα Νανοϋλικά.....	4
1.3 Είδη νανοϋλικών.....	5
1.3.1 Φυσικά νανοϋλικά	5
1.4 Νανοϋλικά και συστήματα μεταφοράς.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	8
Οι Νανοςωλήνες άνθρακα.....	8
2.1 Ανακάλυψη και δομικά χαρακτηριστικά.....	8
2.2 Ηλεκτρικές και μαγνητικές ιδιότητες των CNTs.....	9
2.3 Τοξικότητα των Νανοςωλήνων Άνθρακα (CNTs).....	10
2.4 Πλεονεκτήματα των CNTs και εφαρμογές.....	11
2.5 Κινητική των CNTs σε in vivo πειράματα	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	15
ΤΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ	15
3.1 Ταξινόμηση των λιποσωμάτων.....	15
3.1.1 Ταξινόμηση με βάση τη σύσταση και τις εφαρμογές.....	15
3.1.2 Ταξινόμηση με βάση το μέγεθος	16
3.2 Φυσικοχημική Σταθερότητα Λιποσωμάτων	16
3.3 Αλληλεπίδραση λιποσωμάτων-CNTs.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	19
ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ CNTS.....	19
4.1 Μέθοδος Φασματομετρίας υπερύθρου FTIR	19
4.2 Μέθοδος θερμοστατικής ανάλυσης (TGA)	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	23
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΚΑΙ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	23
5.1 Γενικό πειραματικό μέρος	23
5.1.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες	23
5.1.2 Όργανα και διατάξεις.....	23
5.2 Πειραματικές Πορείες και Δεδομένα.....	24

5.2.1 Οξείδωση νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών πλευρικών τοιχωμάτων με την χρήση μίγματος Piranha	24
5.2.3 Οξείδωση νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών πλευρικών τοιχωμάτων με την χρήση μίγματος Oleum	24
5.2.4 Κατεργασία οξειδωμένων νανοσωλήνων με καυστικό νάτριο	24
5.2.5 Γενική μέθοδος σύζευξης αμίνης με οξειδωμένους MWCNTs	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	26
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ	
ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ (MWCNTs) ΚΑΙ Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ	
ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ	26
6.1 Τροποποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα και δημιουργία βιοσυμβατού ανθρακικού υλικού θετικού και αρνητικού φορτίου.	26
6.2 Ανάλυση της οξείδωσης του αρχικού υλικού MWCNTs και της περαιτέρω τροποποίησής τους.....	27
6.2.1 Ανάλυση της οξείδωσης του αρχικού υλικού MWCNTs και χαρακτηρισμός του οξειδωμένου υλικού	27
6.2.2 Περιγραφή υδρόλυσης των καρβοξυλικών ομάδων και συνθετική πορεία νανοσωλήνων αρνητικού φορτίου	29
6.2.3 Αντίδραση εισαγωγής αμινο-ομάδας στους MWCNTs- συνθετική πορεία υλικού θετικού φορτίου	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	33
Σύνθεση νανοσωμάτων και η αλληλεπίδραση τους με νανοσωλήνες	
άνθρακα.	33
7.1 Εισαγωγή	33
7.1.1 Η μέθοδος χαρακτηρισμού DLS -Δυναμική σκέδαση φωτός	33
7.1.2 Το ζ-δυναμικό (Zeta)	36
7.1.3 PROBESONICATOR (Αισθητήρας υπερήχων).....	38
7.2 Πειραματική διαδικασία	39
7.2.1 Χαρακτηρισμός των υδατικών διαλυμάτων των MWCNTs με τη μέθοδο Δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).....	39
7.2.2 Παρασκευή λιποσωμάτων DPPC&HSPC.....	40
7.2.3 Ενυδάτωση λεπτού υμενίου με διαλύματα των MWCNTs. Δημιουργία των υπό μελέτη συστημάτων.	44
7.2.4. Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των συστημάτων LMVs-MWCNTs και SUVs-MWCNTs	45
7.3 Αποτελέσματα	46
7.3.1 Χαρακτηρισμός υδατικών διαλυμάτων CNTs	46
7.3.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και σταθερότητα των συστημάτων LMVs- MWCNTs	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	57
Συμπεράσματα – προτάσεις	57
Βιβλιογραφία	59

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία εξετάζονται οι Νανοσωλήνες Άνθρακα (CNTs) και η αλληλεπίδραση τους με μεταφορείς φαρμακευτικών ουσιών, όπως τα λιποσώματα. Αναφέρεται αρχικά η σημασία της Νανοτεχνολογίας και των Νανοϋλικών στην σύγχρονη έρευνα αλλά και στις ιατρικές επιστήμες. Παρατίθενται οι κύριες μέθοδοι σύνθεσης, τροποποίησης, καθώς και οι αρχές λειτουργίας χαρακτηρισμού των νανοδομών.

Ο κύριος σκοπός όμως αυτής της εργασίας είναι να εξεταστούν η τροποποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) και τα λιποσώματα, ως προς τη μορφολογία και τις ιδιότητες τους και επίσης να μελετηθεί η αλληλεπίδρασή μεταξύ τους, οπότε κρίσιμο ρόλο παίζει η καταλληλότητά των CNTs σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Είναι λοιπόν σημαντικό να εισαχθούν και να ληφθούν υπόψιν οι έννοιες της βιοσυμβατότητας, της τοξικότητας, της απομάκρυνσης από το ανθρώπινο σώμα και πως μπορούν αυτά να επηρεαστούν από την τροποποίηση.

Τέλος περιγράφονται οι τρέχουσες ερευνητικές δραστηριότητες και εφαρμογές των CNTs, η αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα, τα οφέλη των εφαρμογών τους στη θεραπεία καρκίνου, στη διάγνωση και στα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων (DDS).

Κατά το πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας που πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών γίνεται τροποποίηση των MWCNTs και δημιουργία τριών διαφορετικών υλικών. Στο δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας γίνεται η σύνθεση των λιποσωμάτων στον τομέα Φαρμακευτικής του Ε.Κ.Π.Α. και στη συνέχεια τα πειράματα αλληλεπίδρασης λιποσωμάτων με τους MWCNTs. Τα συστήματα λιπόσωμα-MWCNTs που δημιουργούνται, χαρακτηρίζονται ως προς το μέγεθος τους, το δείκτη πολυδιασποράς τους στο διάλυμα και την σταθερότητά τους. Η πορεία και οι μέθοδοι περιγράφονται αναλυτικά στην πειραματική διαδικασία και συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι δημιουργούνται συστήματα μεγέθους νανοκλίμακας που μπορούν να κατευθυνθούν επιλεκτικά και να χρησιμοποιηθούν σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων (DDSs)

Abstract

In this thesis Carbon Nanotubes (CNTs) were used as a starting material and after their functionalization process, were developed into Carbon Nanotubes - Liposome Systems. In the first part the importance of Nanotechnology and Nanomaterials in current scientific research is explained and emphasized. Also the main methods of synthesis, modification and characterization of nanostructures are described as well as the basic operating principles of the characterization techniques.

The main purpose of this project is to examine the MWCTs functionalization processes, the liposomes synthesis, their morphology, their properties and the interaction between them. Therefore it is critical to study the role of CNTs compatibility in biomedical applications. It is very important to introduce and take into account the concepts of CNTs biocompatibility, toxicity, removal time from the human body and what is the role of functionalization in all these issues. Finally in this thesis the current research activities are also described, as well as the applications of CNTs and their benefits to drug delivery systems and cancer treatment.

The first experimental process includes the functionalization of MWCNTs which results in three different materials. In the second experimental process the liposome synthesis and final liposome-MWCNTs interaction experiments are conducted. The results of the DLS characterization technique are the MWCNTs-liposomes systems size, their polydispersity and their stability in the solution. It was observed that the size of MWCNTs affects the systems size. The methods are thoroughly described in the two experimental parts. In conclusion, nano-sized systems (MWCNTs-liposomes) are created that can be selectively manipulated and used as potential DDS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Νανοτεχνολογία

Γενικά ο όρος νανοτεχνολογία μπορεί να γίνει κατανοητός ως η τεχνολογία, που επιτρέπει με ελεγχόμενο τρόπο όχι μόνο να παρασκευασθούν νανοϋλικά αλλά και να τροποποιηθούν ή να χρησιμοποιηθούν για συγκεκριμένο σκοπό. Αντίστοιχα ως νανοϋλικά ορίζονται τα υλικά των οποίων τουλάχιστον η μία από τις τρεις διαστάσεις τους βρίσκεται στη νανοκλίμακα. Ο όρος νανοτεχνολογία όπως ορίστηκε για πρώτη φορά είναι άμεσα συνδεδεμένος με την γνωστή ομιλία του φυσικού R. Feynman το 1959, με τίτλο “There is plenty of room at the bottom” [1].

Οι νανοεπιστήμες και η νανοτεχνολογία διαδραματίζουν σήμερα σημαντικό ρόλο στον τομέα της ιατρικής και της φαρμακευτικής τεχνολογίας, κυρίως μέσα από την ανίχνευση νόσων και την ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων. Όσον αφορά τα νανοϋλικά, οι δυνατότητες τους έχουν προσελκύσει τεράστιο ενδιαφέρον και ο συνδυασμός τους με βιολογικά μόρια φαίνεται να είναι ιδιαίτερα υποσχόμενος στον τομέα της σύγχρονης ιατρικής.

Ιδιότητες λιπιδικών φορέων και μακρομορίων όπως η διαπερατότητα και η συγκράτηση, φαινόμενο EPR (enhanced permeability and retention), έχουν βρεθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση στερεών όγκων [2]. Το ενδιαφέρον γύρω από τα νανοσωματίδια εστιάζεται στο μέγεθος τους και στη μεγάλη ελεύθερη επιφάνεια η οποία μπορεί να τροποποιηθεί.

Λόγω των φαινομένων νανοκλίμακας και της αυξημένης επιφάνειάς τους, τα νανοσωματίδια αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την ανάπτυξη των διαγνωστικών βιοαισθητήρων, τη μεταφορά φαρμάκων και γονιδιώματος αλλά και της βιοαπεικόνισης. Για παράδειγμα οι νανοσωλήνες άνθρακα (και ιδιαίτερα μονού τοιχώματος) με διάμετρο συγκρίσιμη με το εύρος των μορίων του DNA έχουν χαρακτηριστεί ως υψηλής αποδοτικότητας μεταφορείς βιομορίων μέσα στα κύτταρα [3].

Επιπλέον, τα νανοσωματίδια μπορούν να έχουν εύκολα πρόσβαση σε διάφορες περιοχές του σώματος και να αλληλοεπιδρούν με βιολογικά συστήματα σχεδόν σε μοριακό επίπεδο. Καθώς η γνώση για τις διάφορες πολυλειτουργικές και υβριδικές νανοδομές εμπλουτίζεται και εξελίσσεται, νέες προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν ανακύπτουν.

Έτσι, ενώ σχεδιάζονται τροποποιημένες νανοδομές, η προσοχή πρέπει να στραφεί σε ορισμένα χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική στόχευση. Αυτά περιλαμβάνουν:

- ✓ Αύξηση διαλυτότητας
- ✓ Ενίσχυση βιοσυμβατότητας
- ✓ Μεταφορά του συστήματος φάρμακο-νανοφορέας και την αποδέσμευση του φαρμάκου στη θέση-στόχο
- ✓ Αποτελεσματική αποβολή του νανοφορέα από το σώμα [4]

1.2 Τα Νανοϋλικά

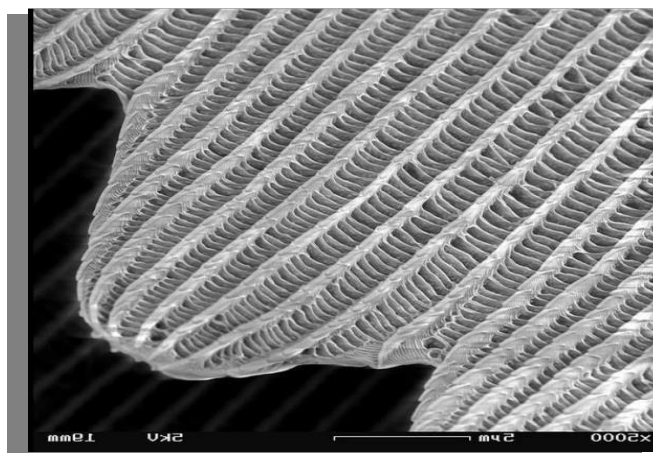
Τα νανοϋλικά είναι όπως προαναφέρθηκε χημικές ουσίες ή υλικά που παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται σε νανοκλίμακα. Το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 1 και 100 nm περίπου κατά τη μία τουλάχιστον διάσταση.

Τα νανοϋλικά εμφανίζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και ιδιότητες σε σύγκριση με τα κλασσικά μακροσκοπικά υλικά μεγαλύτερων διαστάσεων. Πληθώρα προϊόντων που περιέχουν νανοϋλικά κυκλοφορεί ήδη στην ευρωπαϊκή αγορά (π.χ. μπαταρίες, επιχρίσματα, αντιβακτηριδιακά ενδύματα, καλλυντικά, τρόφιμα) [5].

1.3 Είδη νανοϋλικών

1.3.1 Φυσικά νανοϋλικά

Τα βιολογικά συστήματα περιέχουν συχνά φυσικά, λειτουργικά νανοϋλικά. Η δομή των καψιδίων ιών, κάποια φτερά πεταλούδας, τα κοράλλια κι ακόμα οι δικοί μας οστεόνες είναι μερικά παραδείγματα φυσικών οργανικών νανοϋλικών.



Εικόνα 1. Σάρωση SEM φτερού πεταλούδας με κλίμακα ($\times 5000$).

Φυσικά ανόργανα νανοϋλικά αναπτύσσονται υπό διάφορες φυσικοχημικές συνθήκες στον φλοιό της γης. Παραδείγματος χάρη, υπάρχουν πετρώματα που εμφανίζουν σύνθετες νανοδομές λόγω της ασυμμετρίας της κρυσταλλικής τους δομής [6].

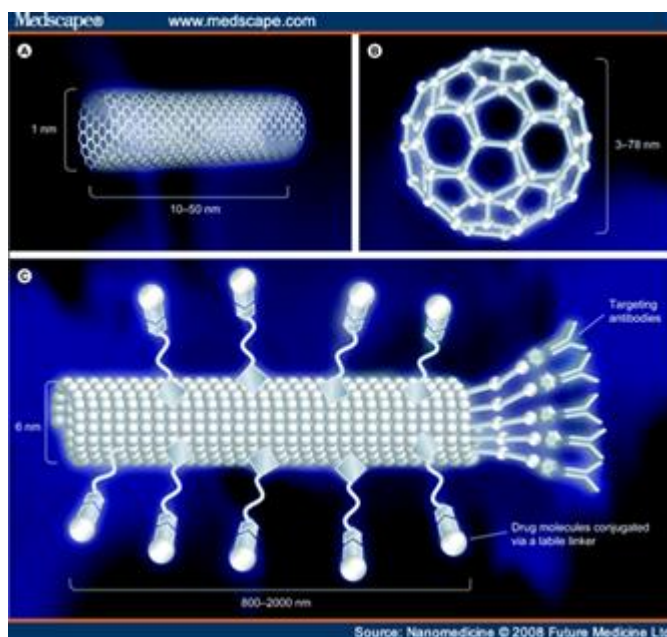


Εικόνα 2. Απεικόνιση φυσικού υλικού (οπάλιου) με οπτικές ιδιότητες

Οργανικά νανοϋλικά (π.χ. κβαντικές τελείες, νανοςύρματα και νανοράβδοι), λόγω των ενδιαφερουσών οπτικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην οπτοηλεκτρονική. Τα οργανικά νανουλικά χρησιμοποιούνται σε κατασκευές αεροσκαφών, αυτοκινήτων αλλά μπορούν και να βρεθούν διεσπαρμένα σε πολυμερή νανοςύνθετα υλικά ως νανοίνες ή σε φυλλόμορφη δομή για να ενισχύσουν τις μηχανικές τους ιδιότητες [7].

1.4 Νανοϋλικά και συστήματα μεταφοράς

Τα νανოსωματίδια μπορούν να θεωρηθούν πολύ αποτελεσματικά μέσα μεταφοράς φαρμάκου, καθώς μπορούν να οδηγήσουν τη δραστική ουσία στο σημείο όπου πρέπει να επιδράσει χωρίς να προκαλέσει ανεπιθύμητες παρενέργειες στους ανθρώπινους ιστούς και τα όργανα.



Εικόνα 3. Προσομοίωση νανოსωλήνα άνθρακα τροποποιημένου με λειτουργικές ομάδες μορίων.

Η αύξηση της βιοσυμβατότητας και η εύκολη απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας είναι από τους βασικούς στόχους στα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Ένα παράδειγμα σωματιδίων με ρόλο μεταφοράς είναι τα λιποσώματα, που αποτελούνται από υδρόφιλες κεφαλές και υδρόφοβες ουρές. Τα λιποσώματα όπως θα περιγραφεί και παρακάτω, λόγω της διττής φύσης τους δημιουργούν στοιβάδες. Στο εσωτερικό τους μπορούν να εγκλωβιστούν θεραπευτικές ουσίες. Ο πυρήνας είναι υδρόφοβος και περιέχει πολλές λειτουργικές ομάδες, οι οποίες μπορούν να προσδεθούν ομοιοπολικά με υδρόφοβες φαρμακευτικές ουσίες, όπως η cisplatin (πλέον διαδεδομένη αντικαρκινική ουσία).

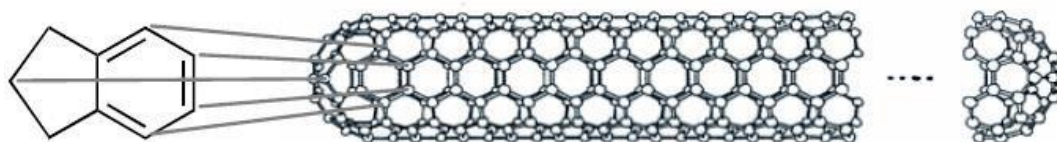
Ο αποτελεσματικός εγκλεισμός των εν δυνάμει φαρμακευτικών ουσιών στον πυρήνα των λιποσωμάτων μπορεί να τις προστατέψει από την πρόωρη απελευθέρωση στο ανθρώπινο σώμα. Επιπρόσθετα οι υδρόφιλες ουρές μπορούν να παρέχουν αυξημένη διαλυτότητα και να προλάβουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του πλάσματος και της εγκλεισμένης ουσίας μέσα στον πυρήνα των μεγάλων λιποσωματικών στοιβάδων. Ο συνδυασμός τους με νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) μπορεί να λειτουργήσει ως ένα αποδοτικό σύστημα μεταφοράς της φαρμακευτικής ουσίας συνδυάζοντας όπως θα αναλυθεί παρακάτω τα πλεονεκτήματα των νανοσωλήνων και των λιποσωμάτων, για ένα κοινό θεραπευτικό στόχο [8].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Οι Νανοσωλήνες άνθρακα

2.1 Ανακάλυψη και δομικά χαρακτηριστικά

Οι CNTs αποτελούν μία αλλοτροπική μορφή του άνθρακα και έγιναν ευρέως γνωστοί στην επιστημονική κοινότητα από τον Sumio Iijima. Δομικά περιγράφονται ως φύλλα γραφενίου, τα οποία τυλίγονται σχηματίζοντας κυλίνδρους με το μήκος τους να κυμαίνεται στα 50-100 μm και τη διάμετρο από μερικά nm μέχρι και 100 nm. Όταν οι CNTs αποτελούνται από ένα μόνο φύλλο γραφενίου χαρακτηρίζονται ως single wall CNTs (SWCNTs) και έχουν διάμετρο 0.3-1.4 nm. Στην περίπτωση που οι CNTs αποτελούνται από δύο ή περισσότερα φύλλα που σχηματίζουν ομόκεντρους σωλήνες, είναι γνωστοί ως multiwall CNTs (MWCNTs) και η διάμετρός τους κυμαίνεται από 1.4-100 nm.



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση ενός νανοσωλήνα άνθρακα (CNT).

Οι διαστάσεις της τάξεως νανομέτρου των CNTs μαζί με τη μοναδική ηλεκτρονική δομή των γραφιτικών φύλλων, κάνουν τις ηλεκτρικές ιδιότητες αυτής της μονοδιάστατης δομής εξαιρετικά ασυνήθιστες. Ένας νανοσωλήνας μονού τοιχώματος (SWCNT) είναι γεωμετρικά ένα απλά τυλιγμένο φύλλο γραφενίου. Η δομή του μπορεί να καθοριστεί από τη κυκλική του περιοδικότητα. Σύμφωνα με αυτό η γεωμετρία ενός SWCNT είναι πλήρως καθορισμένη από ένα ζεύγος μεταβλητών (παραμέτρων) που επισημαίνουν (denote) τη σχετική θέση $c = na1 + ma2$ των ζευγών των ατόμων του γραφενικού φύλλου όπου όταν τυλίγονται το ένα μέσα στο άλλο σχηματίζουν ένα σωλήνα.

2.2 Ηλεκτρικές και μαγνητικές ιδιότητες των CNTs

Θεωρητικοί υπολογισμοί και μετρήσεις αγωγιμότητας απέδειξαν ότι οι απομονωμένοι SWCNTs παρουσιάζουν μοναδικά ηλεκτρονικά φαινόμενα μεταφοράς, που μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλική και ημιαγώγιμη συμπεριφορά, η οποία βασίζεται σε μικρές διαφοροποιήσεις στη χειραλική (chiral) γωνία των εξαγώνων ή στη διάμετρο.

Αν όλες οι παράμετροι που επηρεάζουν την κυλινδρική δομή εμφανίζουν ίδια πιθανότητα επίδρασης, τότε το 1/3 των SWCNTs θα είχε μεταλλικό χαρακτήρα και τα 2/3 θα είχε ημιαγώγιμο. Τα φυσικά φαινόμενα που οδηγούν στις ηλεκτρικές ιδιότητες των CNTs μπορούν να κατανοηθούν με τη θεωρία band-folding. Οι γενικοί κανόνες για τη μεταλλική συμπεριφορά των SWCNTs είναι οι εξής:

- ✓ Οι (n,n) νανοσωλήνες είναι μέταλλα
- ✓ Οι (n,m) νανοσωλήνες με $n - m = 3j$, όπου j είναι μη μηδενική παράμετρος, είναι ημιαγωγοί με πολύ μικρό ενεργειακό χάσμα
- ✓ Όλοι οι υπόλοιποι είναι ημιαγωγοί μεγάλου ενεργειακού χάσματος

Άρα υπάρχουν τρεις κατηγορίες νανοσωλήνων, μεγάλου κενού, μικρού κενού και μηδενικού κενού. Όσο η ακτίνα των νανοσωλήνων αυξάνεται τα ενεργειακά χάσματα των ζωνών μεγάλου κενού και μικρού κενού μειώνονται αναλογικά με το $1/R$ και $1/R^2$. Αυτή η συμπεριφορά επαληθεύεται με τους υπολογισμούς Tight Binding, και αναμένεται να ισχύει για νανοσωλήνες με ακτίνα μεγαλύτερη των 4Å. Πειραματικές τεχνικές που χρησιμοποιούσαν scan tunneling και άλλες τεχνικές επιβεβαίωσαν αυτήν τη θεωρητική πρόβλεψη.

Βιολογικά μακρομόρια προσδένονται στην επιφάνεια των νανοσωλήνων και υπό την επίδραση του φαινομένου tight binding, με αλλαγή της κατάστασης του φορτίου μπορεί να διαταραχθεί η ροή του φορτίου στο νανοσωλήνα. Έχει ερευνηθεί η εφαρμογή συσκευών από νανοσωλήνες άνθρακα ως βιολογικούς αισθητήρες για τη μεταφορά βιομορίων όπως ένζυμα, πρωτεΐνες και ολιγοπεπτίδια.

Λόγω της μαγνητικής τους ευαισθησίας, οι CNTs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως κατευθυνόμενα εργαλεία. Η μαγνητική ευαισθησία μπορεί να

εισαχθεί ή και να ρυθμιστεί μέσω κατάλληλων προσδεμένων σωματιδίων. Ένα εξωτερικό πεδίο μπορεί να αλλάξει την ημιαγώγιμη ή αγώγιμη φύση των CNTs. Αυτό το φαινόμενο ανταποκρίνεται στο φαινόμενο Aharonov-Bohm των CNTs και σχετίζεται με την ταλάντωση των ηλεκτρονίων αγωγιμότητας των CNTs σε χαμηλή θερμοκρασία ή σχετίζεται με τις προσμίξεις και την φωνονική σκέδαση.

Μαγνητικές ιδιότητες που προκύπτουν από τους CNTs μπορούν να επαχθούν από μεταλλικές προσμίξεις που έχουν εγκλωβιστεί κατά τη διαδικασία παρασκευής, δίνοντάς τους τη δυνατότητα να επιδράσουν με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Οι νανοσωλήνες άνθρακα συνήθως αναπτύσσονται μέσω ή από την επιφάνεια τέτοιου είδους μεταλλικών καταλυτικών σωματιδίων.

Τα τριών διαστάσεων μέταλλα και οι συνδυασμοί τους με άλλα μέταλλα είναι πολύ αποτελεσματικοί καταλύτες. Ένας συνδυασμός νανοσωλήνων άνθρακα και μαγνητικών μεταλλικών σωματιδίων κατάλυσης, μπορούν να επιτρέψουν τη χρήση των νανοσωλήνων άνθρακα σε μαγνητικά κατευθυνόμενα συστήματα μεταφοράς φαρμάκου [9,10].

2.3 Τοξικότητα των Νανοσωλήνων Άνθρακα (CNTs)

Οι παρατηρούμενες αποκλίσεις στις αναφορές περί τοξικότητας βασίζονται στο γεγονός ότι οι CNTs μπορούν να είναι συνάρτηση πολλών παραμέτρων. Αυτές είναι οι φυσικοχημικές ιδιότητες, που συμπεριλαμβάνουν το μέγεθος, το μήκος, την παρουσία μεταλλικών προσμίξεων στην επιφάνεια, καθώς και την υδροφοβικότητα ή την υδροφιλικότητα της επιφάνειας, τη στιλπνότητα της επιφάνειας και το βαθμό οξείδωσής της.

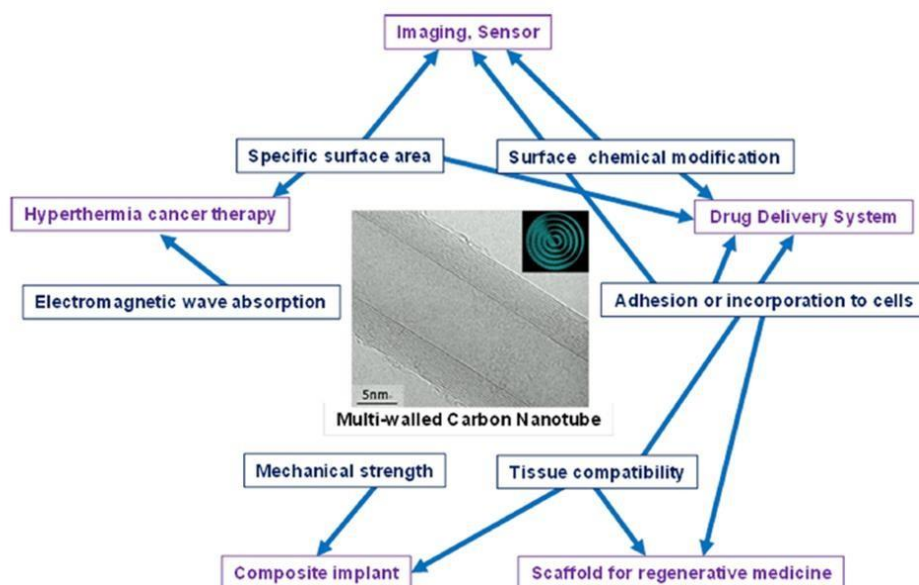
Άλλοι παράγοντες μαζί με την ικανότητα των CNTs να σχηματίζουν μακριά ινώδη σωματίδια αλλά και η αντιδραστικότητα της επιφάνειας που οδηγεί σε πιθανή δημιουργία οξυγόνου, μπορεί δυνητικά να επηρεάσει την τοξικότητα. Ο αργός καθαρισμός/απομάκρυνση των CNTs από την αναπνευστική οδό και η τάση τους να δημιουργούν συσσωματώματα λόγω των δυνάμεων Van der Waals τους καθιστούν πιθανώς επικίνδυνους για το ανθρώπινο σώμα.

Η παρουσία των επιφανειακών ατελειών στην επιφάνεια των CNTs μπορούν να αποτελέσουν σημαντική επιρροή στην παρατηρούμενη τοξικότητα *in vivo* και *in vitro* πειραμάτων. Υπάρχουν πολλά είδη επιφανειακών ατελειών, όπως τοπολογικές (π.χ. πεντάγωνα αντί για εξάγωνα, ζευγάρια πενταγώνων-επταγώνων σε εξαγωνική δομή των CNTs, επανυβριδισμός μεταξύ τροχιακών sp^2 και sp^3 ή ατέλειες που προκύπτουν από ατελής δεσμούς (vacancies). Οι ατέλειες μπορούν να επηρεάσουν τις ηλεκτρονικές ιδιότητες των CNTs. Έχει αναφερθεί ότι η παρουσία επιφανειακών ατελειών στους CNTs μπορούν να παίξουν πολύ σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα των MWCNTs.

Στοιχεία τοξικότητας έχουν αποδοθεί στις μεταλλικές προσμίξεις, στο μήκος του CNT και στην υδροφιλικότητα. Επίσης η τροποποίηση των CNTs με υδρόφιλους παράγοντες μπορεί να επηρεάσει την συμβατότητά τους σε *in vivo* και *in vitro* πειράματα. Η επίστρωση των CNTs μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδρασή τους με το αίμα, τις πρωτεΐνες και τα κύτταρα. Έχει αποδειχθεί ότι οι SWCNTs που επεξεργάστηκαν με φολικό οξύ εισήχθησαν μέσω κυττάρων υποδοχέων του φολικού οξέος. Οι ίδιοι SWCNTs δεν εισήχθησαν στο κύτταρο χωρίς τροποποίηση [11,12,13].

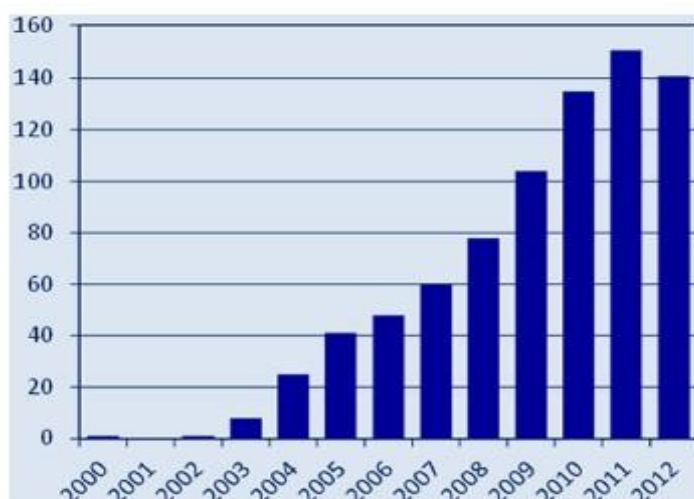
2.4 Πλεονεκτήματα των CNTs και εφαρμογές

Μια ευρεία ποικιλία πλεονεκτημάτων προκύπτουν από τη χρήση των CNTs σε εξαρτήματα ακριβείας, αλλά και σε τρανζίστορ, ή σε συσκευές μνήμης, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητά τους. Η χρήση των CNTs σε διάφορες οθόνες ή και οθόνες τηλεόρασης συνεχίζει να αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς. Οι CNTs χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως σε προϊόντα που έχουν σχεδιαστεί για να αποτρέπουν τον στατικό ηλεκτρισμό, για προστασία από ηλεκτρομαγνητικά κύματα, για την αποθήκευση της ηλεκτρικής ενέργειας, καθώς και για άλλες εφαρμογές.



Εικόνα 5. Ιδιότητες και εφαρμογές των MWCNTS

Στον ιατρικό τομέα, εκτεταμένες ερευνητικές δραστηριότητες βρίσκονται σε εξέλιξη για την ανάπτυξη νέων βιοϋλικών από CNTs και τη χρήση τους στη θεραπεία και τη διάγνωση διαφόρων νόσων. Παραδείγματα είναι η εφαρμογή των CNTs στη θεραπεία του καρκίνου και τη διάγνωση, στα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων (Drug Delivery Systems, DDSs) όπως επίσης και σε απεικονιστικές μεθόδους in vivo. Ο αριθμός των αναφορών στους CNTs έχει ραγδαία αύξηση από το 2005, γεγονός που υποδηλώνει ότι η έρευνα των CNTs έχει γίνει ένα άκρως ανταγωνιστικό πεδίο σε όλο τον κόσμο τα τελευταία χρόνια [14].



Εικόνα 6. Γραφική παράσταση της τάσης της αύξησης της έρευνας του πεδίου αυτού κατά την πάροδο του χρόνου.

2.5 Κινητική των CNTs σε in vivo πειράματα

Κατά την χρήση των CNTs ως ή σε βιοϋλικά, είναι σημαντικό να μελετήσουμε την in vivo κινητική τους. Συγκεκριμένα, είναι αναγκαίο να καθοριστεί αν οι CNTs κυκλοφορούν μέσα στο σώμα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή συσσωρεύονται σε συγκεκριμένα όργανα. Επίσης πρέπει να μελετηθεί τι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στο όργανο καθώς και πώς αποβάλλονται από το σώμα.

Φυσικά, η in vivo κινητική είναι άμεσης σημασίας για τα DDSs και τα συστήματα απεικόνισης όπου η εντοπισμένη συσσώρευση των CNTs και η διανομή συστηματικά μέσω της κυκλοφορίας του αίματος είναι αναμενόμενη. Ωστόσο, τα CNT σύνθετα υλικά που χρησιμοποιούνται ως εμφυτεύματα δεν εισέρχονται στην κυκλοφορία, και ακόμη και τα σωματίδια CNTs που χρησιμοποιούνται τοπικά, σχεδόν ποτέ δεν εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Μπορεί επίσης να υποτεθεί ότι οι μικροί CNTs, αλλά όχι οι μεγάλοι CNTs μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος σε κάποιο βαθμό. Η εστίαση των μελετών της in vivo κινητικής έγινε κυρίως για την τοξικότητα της εισπνοής και όχι για την εφαρμογή των CNTs σε βιοϋλικά.

Οι CNTs προσροφώνται στους πνεύμονες και θεωρείται ότι μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος σε κάποιο βαθμό, επειδή ο πνεύμονας είναι το όργανο που είναι υπεύθυνο για την ανταλλαγή αερίων ουσιών στο αίμα. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να εξεταστεί η διακίνηση των CNTs αφού εισπνευστούν και εισέλθουν στην πνευμονική κυκλοφορία [15,16]. Ορισμένες αναφορές είναι διαθέσιμες για την διάθεση τους με ενδοφλέβια ένεση. Οι μελέτες αυτές παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις εφαρμογές των CNTs ως βιοϋλικά και σχετικές εφαρμογές των CNTs που αφορούν την είσοδο τους στην κυκλοφορία του αίματος.

Σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες διαπιστώθηκε ότι ως επί το πλείστον οι CNTs που εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος είναι μη τοξικοί στους οργανισμούς και σε διάφορα όργανα. Για παράδειγμα, δεν υπάρχουν

καταγεγραμμένες ενδείξεις τοξικότητας τουλάχιστον για 90 ημέρες μετά την ενδοφλέβια ένεση pristine SWCNTs υλικού σε ποντίκια.

Επίσης κανένα σημάδι της οξείας τοξικότητας δεν καταγράφηκε μετά από ενδοφλέβια έγχυση SWCNTs ή MWCNTs συζευγμένη με διαιθυλενοτριαμινοπενταοξικό οξύ (DTPA) σε ποντίκια. Μια άλλη μελέτη επαλήθευσε την ασφάλεια των SWCNTs 24 ώρες μετά από ενδοφλέβια ένεση. Ενώ δεν βρέθηκε τοξικότητα σε ποντικούς 4 εβδομάδες μετά τη λήψη ένεσης. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι περισσότεροι CNTs απομακρύνονται από τα ούρα, με μόνο ένα μικρό ποσό να συσσωρεύεται στο ήπαρ και ιδίως τα μικρότερα μεγέθη. Επίσης τόσο οι MWCNTs όσο και οι SWCNTs είχαν αυξημένες πιθανότητες να συσσωρευθούν στο ήπαρ και στη σπλήνα.

Επειδή οι CNTs εισάγονται μέσω των τριχοειδών αγγείων και παραμένουν σε διάφορα όργανα, μπορεί να θεωρηθεί ότι το ήπαρ και η σπλήνα, τα οποία είναι πλούσια σε αιμοφόρα αγγεία, είναι τα πιο πιθανά όργανα συσσώρευσης των CNTs. Παρόλα αυτά η τοξικότητα των CNTs που συσσωρεύεται στο ήπαρ και την σπλήνα πιστεύεται ότι είναι χαμηλή [17]. Άλλα όργανα όπου συσσωρεύονται οι CNTs είναι ο πνεύμονας, η ουροδόχος κύστη τα νεφρά και το έντερο.

Αν και η δόση που χρησιμοποιείται σε αυτά τα πειράματα είναι μεταβαλλόμενη, στα περισσότερα είναι 20 $\mu\text{g} / \text{kg}$ σωματικού βάρους. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται για την διάλυσή τους είναι το αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) [18].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΤΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ

Ένα λιπόσωμα είναι ένα σφαιρικό κυστίδιο που έχει τουλάχιστον μία λιπιδική διπλοστοιβάδα. Το λιπόσωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως όχημα για τη χορήγηση θρεπτικών καθώς και φαρμακευτικών ουσιών. Τα λιποσώματα μπορούν να παρασκευαστούν με διάσπαση βιολογικών μεμβρανών όπως σε επεξεργασία με υπερήχους.

Επίσης τα λιποσώματα συνήθως αποτελούνται από φωσφολιπίδια, ειδικά φωσφατιδοχολίνη, αλλά μπορεί επίσης να περιλαμβάνει και άλλα λιπίδια, όπως φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, εφ 'όσον αυτά είναι συμβατά με τη δομή διπλοστοιβάδας λιπιδίων. Ένα λιπόσωμα μπορεί να χρησιμοποιεί συνδέτες στην επιφάνεια του για την προσάρτηση του σε μη υγιείς ιστούς [19].

3.1 Ταξινόμηση των λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος, τη σύσταση και τις εφαρμογές τους, τη μέθοδο παρασκευής κ.ά.

3.1.1 Ταξινόμηση με βάση τη σύσταση και τις εφαρμογές

- ✓ Συμβατικά λιποσώματα
- ✓ Λιποσώματα μακράς κυκλοφορίας
- ✓ Ανοσολιποσώματα
- ✓ Κατιονικά λιποσώματα

3.1.2 Ταξινόμηση με βάση το μέγεθος

Τα λιποσώματα ταξινομούνται σε μονοστοιβαδικά ή πολυστοιβαδικά και ανάλογα με το μέγεθός τους. Έτσι, διακρίνονται σε:

✓ **Μεγάλα Πολυστοιβαδικά Λιποσώματα (MLV multi-lamellar vesicles)**, των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται στα 0.1μm. Χαρακτηριστικό των λιποσωμάτων αυτών είναι ότι περιέχουν περισσότερες από μία διπλοστοιβάδες. Γι' αυτό εγκλωβίζουν αποτελεσματικότερα υδρόφοβα μόρια, είναι σχετικά σταθερά, ωστόσο απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος σχετικά γρήγορα.

✓ **Μεγάλα Μονοστοιβαδικά Λιποσώματα (LUV large unilamellar vesicles)** με μέγεθος 100-1000nm. Περιέχουν στη δομή τους μία και μοναδική διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και αυτό τα καθιστά αποτελεσματικότερα στον εγκλωβισμό υδρόφιλων μορίων καθώς περιέχουν μεγαλύτερο εσωτερικό υδρόφιλο τμήμα σε σχέση με τη υδρόφοβη επιφάνεια της διπλοστοιβάδας τους.

✓ **Μικρά Μονοστοιβαδικά Λιποσώματα (SUV small unilamellar vesicles)** με μέγεθος 20-100nm. Αποτελούνται από μία διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων. Τα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα εμφανίζουν μεγάλη ομοιογένεια στο μέγεθος, ωστόσο χαρακτηρίζονται από θερμοδυναμική αστάθεια και οδηγούνται γρήγορα σε συγχώνευση προς σχηματισμό μεγαλύτερων λιποσωμάτων και/ή συσσωμάτωση και καθίζηση.

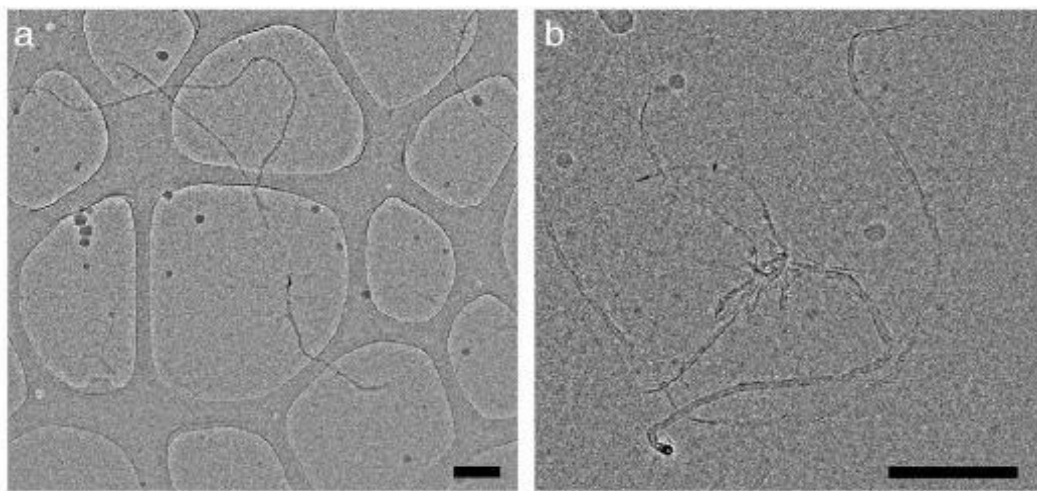
3.2 Φυσικοχημική Σταθερότητα Λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα αποτελούν ένα ασταθές θερμοδυναμικά σύστημα το οποίο οδηγείται σ' αυτή τη μορφή μέσα από διάφορες μετασταθείς καταστάσεις που εξαρτώνται από τον τρόπο παρασκευής τους. Η θερμοδυναμική τους αστάθεια στη μονάδα του χρόνου, προκύπτει μέσα από ενεργειακές μεταβολές που ακολουθούν τη συνεχόμενη αναδιοργάνωση των δομών των σωματιδίων, καθώς και τις μεταβολές στη σύστασή τους. Έτσι η σταθερότητα των λιποσωμάτων αναλύεται με όρους φυσικής και χημικής σταθερότητας. Η φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων αφορά τόσο τις φυσικές ιδιότητες των μορίων των φωσφολιπιδίων όσο και τη μεταξύ των λιποσωμάτων αλληλεπίδραση. Η χημική σταθερότητα από την άλλη, αφορά κυρίως διαδικασίες οι οποίες τροποποιούν τη χημική σύσταση των λιποσωμάτων. Τόσο η φυσική όσο και η

χημική σταθερότητα των λιποσωμάτων καθορίζουν τον εγκλωβισμό, την αποδέσμευση, το χρόνο διατήρησης και την *in vivo* συμπεριφορά και φαρμακοκινητική των μορίων που φέρουν είτε στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα είτε στο εσωτερικό υδατικό τους περιβάλλον. Επομένως, οι μηχανισμοί που καθορίζουν τη σταθερότητα των λιποσωμάτων αποτελούν σημαντική παράμετρο κατά τη διαδικασία παρασκευής τους. Ωστόσο, τα μόρια που εγκλωβίζονται στα λιποσώματα συχνά συμμετέχουν σε διαδικασίες αποσταθεροποίησης υποβοηθώντας μεταβολές σε σημαντικές ιδιότητές τους (φυσικές ή χημικές) και για το λόγο αυτό θα πρέπει η παρουσία τους να λαμβάνεται υπόψη (C. Demetzos, 2008)[20]

3.3 Αλληλεπίδραση λιποσωμάτων-CNTs

Στις επόμενες εικόνες φαίνεται η αλληλεπίδραση CNTs με λιποσώματα. Για να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση του φαρμάκου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στο pristine υλικό, στους MWCNT, γίνεται τροποποίηση με ένα μίγμα ισχυρών οξέων συνήθως νιτρικού και θειϊκού οξέος, το οποίο καταλήγει σε εισαγωγή των καρβοξυλομάδων στην επιφάνεια και στα άκρα των MWCNTs.



Εικόνα 7. Διασπορά σε νερό των MWCNTs κατεργασμένων με οξύ, οι οποίοι ονομάζονται τροποποιημένοι-MWCNT, ή f-MWCNTs, από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κρυογονικής διέλευσης (cryo-TEM)[21].

Όπως αναφέρεται η βέλτιστη αναλογία λιποσώματα: f-MWCNT είναι 1:1 η οποία και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Επίσης σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές

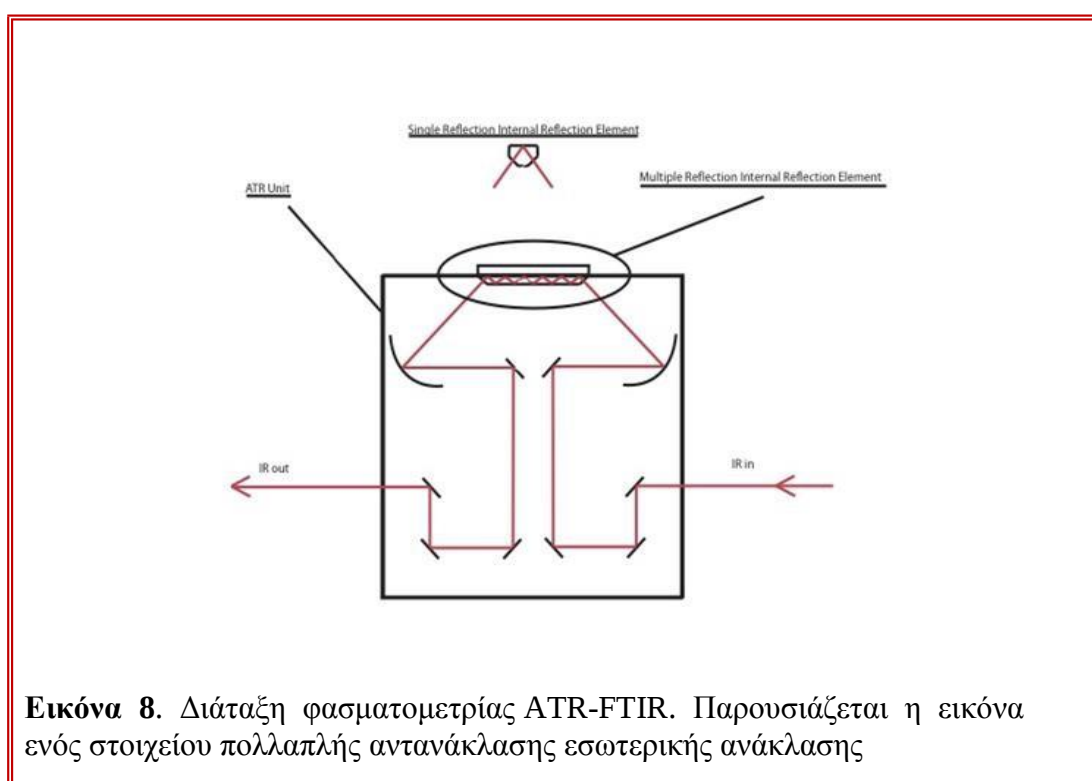
η μέση απόσταση λιποσωμάτων (δεσμευμένων στους τροποποιημένους MWCNTs) είναι 100-300 nm. Η παρατήρηση αυτή, μαζί με το μέσο μήκος των f- MWCNT 400-600 nm, δείχνει κατά μέσο όρο 2-6 λιποσώματα ανά μεμονωμένο f- MWCNT, δηλαδή, περίπου 50000 μόρια φαρμάκου ανά CLC, σε σύγκριση σε ~ 80 μόρια του φαρμάκου όταν συνδέεται άμεσα με τους CNTs [21].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ CNTS

4.1 Μέθοδος Φασματομετρίας υπέρυθρου FTIR

Η μέθοδος ATR-FTIR χρησιμοποιείται για την εξέταση διαφόρων χημικών ειδών, δίνοντας πληροφορίες για τα στοιχεία που περιέχουν.



Καλείται πολλαπλής αντανάκλασης επειδή η ακτινοβολία κάνει περισσότερες από μία αντανάκλασεις εντός του στοιχείου πριν από την έξοδο προς τον ανιχνευτή. Κατά τη λειτουργία της διάταξης ATR-FTIR η υπέρυθρη ακτινοβολία εισέρχεται από το κάτω μέρος της βάσης ATR και ανακλάται από πέντε διαφορετικά κάτοπτρα πριν εισέλθει και εξέλθει από το στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (IRE) και οδηγηθεί προς το τον ανιχνευτή. Αυτή η λειτουργία επιτρέπει στην υπέρυθρη ακτινοβολία να ανιχνεύσει τα μόρια της διεπιφάνειας του στοιχείου εσωτερικής ανάκλασης (IRE). Η χρήση ενός στοιχείου πολλαπλής ανάκλασης εμφανίζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Ένα από τα πλεονεκτήματα είναι ότι ο χρήστης

είναι σε θέση να παρατηρήσει ισχυρότερη απορρόφηση από το δείγμα λόγω των πολλαπλών σημείων αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας, ωστόσο το μειονέκτημα της χρήσης ενός στοιχείου πολλαπλής ανάκλασης είναι ότι η απορρόφηση του φωτός είναι δύσκολο να ποσοτικοποιηθεί, λόγω της σκέδασης. Ένας τρόπος για έναν χρήστη να ξεπεράσει το μειονέκτημα ότι πολλαπλές ανακλάσεις είναι η χρήση στοιχείου IRE μονής ανάκλασης και όχι ενός στοιχείου IRE πολλαπλής αντανάκλασης.

Η υπέρυθρη ακτινοβολία που αλληλοεπιδρά με τα δείγματα απορρόφησης περιορίζεται σε ένα δεδομένο βάθος, και εξαρτάται:

- ✓ Από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας
- ✓ Τη γωνία της εισερχόμενης ακτινοβολίας
- ✓ Το δείκτης διαθλάσεως του στοιχείου IRE
- ✓ Τους δείκτες διάθλασης των στρωμάτων στη διεπιφάνεια του στοιχείου IRE

Αυτό το βάθος είναι γνωστό ως το βάθος της διείσδυσης και η βασική εξίσωση παρατίθεται παρακάτω[22].

$$dp = \frac{\lambda^2}{2\pi \sqrt{n_1}} \sin[\theta]^2 - n_2^2$$

Τα μόρια ακτινοβολούνται με κατάλληλο ποσό ενέργειας το οποίο δημιουργεί στην συνέχεια ηλεκτρονικές μεταπτώσεις από μία ενεργειακή κατάσταση (περιστροφική ή δονητική) σε μία άλλη.

Για να λάβει χώρα απορρόφηση ενέργειας από τα μόρια, θα πρέπει η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να είναι συγκρίσιμη με την ιδιοσυχνότητα δόνησης των ατόμων του δεσμού. Οι συχνότητες με τις οποίες δονούνται τα άτομα στα μόρια εξαρτώνται μόνο από τις μάζες των ατόμων, τον τύπο του δεσμού και του μορίου.

Ένα μόριο θα απορροφήσει στο IR αν μεταβληθεί η διπολική ροπή του κατά την διάρκεια της δόνησης. Διαφορετικά, η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο IR. Ωστόσο όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη σημαίνει ότι

είναι και η απορρόφηση. Οι δονήσεις που λαμβάνουν χώρα διακρίνονται σε 2 κατηγορίες:

✓ Δονήσεις τάσης: Τα άτομα του δεσμού διαδοχικά πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους κινούμενα κατά μήκος του δεσμού.

✓ Δονήσεις κάμψης: Τα άτομα των γειτονικών δεσμών κινούνται έτσι ώστε να αλλάζει η γωνία μεταξύ δύο δεσμών. Εκτός από τις παραπάνω λαμβάνουν χώρα και συνδυασμένες δονήσεις. Υπάρχουν δηλαδή και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής του μορίου, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting), ή έχει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), κ.λπ.

Λόγω του ότι οι μοριακές ταλαντώσεις των ομάδων είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικές, η φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι κατάλληλη για τον χαρακτηρισμό συγκεκριμένων ομάδων σε ένα μόριο (π.χ. υδροξύλια, καρβοξύλια, αμινομάδες, διπλοί και τριπλοί δεσμοί κ.α)[23].

4.2 Μέθοδος θερμοστατικής ανάλυσης (TGA)

Τέλος για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα των εν λόγω τροποποιήσεων και κατά συνέπεια η δημιουργία των τριών υλικών χρησιμοποιήθηκε μέθοδος χαρακτηρισμού θερμοστατικής ανάλυσης, TGA.

Η μέθοδος θερμοστατικής ανάλυσης, TGA είναι μια τεχνική η οποία μετρά την αλλαγή στην μάζα του δείγματος σε ένα εύρος θερμοκρασιών. Μια διάταξη TGA αποτελείται από ένα δοχείο δείγματος το οποίο κρέμεται από ένα άγκιστρο και συνδέεται με ένα βραχίονα ισοστάθμισης μικρογραμμαρίων σε ένα αντίστοιχο δοχείο απόβαρο. Μπορεί να περιγραφεί ως η μέτρηση της μάζας ενός δείγματος καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία του σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Οι μετρήσεις των υλικών χρησιμοποιήθηκαν πρωταρχικά για να καθορίσουν την σύνθεση των υλικών και να προβλέψουν την θερμική σταθερότητα σε θερμοκρασίες έως και 1000 °C. Αυτή η τεχνική όπως και στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό υλικών τα οποία παρουσιάζουν απώλεια βάρους λόγω της διάσπασης, οξείδωσης ή της αφυδάτωσης.

Η βασική αρχή της TGA είναι ότι καθώς ένα δείγμα θερμαίνεται, η μάζα του αλλάζει. Αυτή η αλλαγή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθοριστεί η σύνθεση του

υλικού ή η θερμική σταθερότητα του, έως 1000 °C. Συνήθως, ένα δείγμα χάνει βάρος, καθώς θερμαίνεται λόγω της αποσύνθεσης, της μείωσης ή της εξάτμισης μέρους της μάζας του. Ένα δείγμα θα μπορούσε επίσης να κερδίσει βάρος, λόγω της οξείδωσης ή απορρόφησης [24].

Κατά τη διάρκεια της μέτρησης, το μηχάνημα TGA παρακολουθεί την αλλαγή στο βάρος του δείγματος μέσω ενός ισοζυγίου μικρογραμμαρίων. Η θερμοκρασία παρακολουθείται μέσω κατάλληλου θερμοστοιχείου. Η TGA μπορεί επίσης να παρακολουθήσει αλλαγή σε βάρος ως συνάρτηση του χρόνου. Τα δεδομένα μπορούν να ληφθούν ως γράφημα του ποσοστού επί τοις εκατό κατά βάρος της μάζας συναρτήσει της θερμοκρασίας (°C). Τα δεδομένα που λαμβάνονται σε αυτό το πείραμα όπως θα παρουσιαστούν στην συνέχεια στα αποτελέσματα ήταν ένα γράφημα του ποσοστού βάρους συναρτήσει της θερμοκρασίας. Οι καμπύλες εξόδου TGA μπορούν να αναλυθούν με διάφορους τρόπους. Στην περίπτωση, ενός μη στοιχειομετρικού υλικού, η θερμοκρασία αποσύνθεσης του κάθε συστατικού πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την ερμηνεία των καμπυλών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΚΑΙ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

5.1 Γενικό πειραματικό μέρος

Το πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο τομέα Φυσικής και Θεωρητικής Χημείας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

5.1.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες

Τους νανοσωλήνες άνθρακα (MWCNTs) προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Nanostructured and Amorphous Materials, Inc., (www.nanoamor.com; outer diameter 8-15 nm, length 500 nm; purity 95%). Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν από την Sigma-Aldrich®.

5.1.2 Όργανα και διατάξεις

Τα φάσματα δόνησης υπερύθρου στην περιοχή $500\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ λήφθηκαν σε φασματόμετρο FT IR (Equinox 55 από την Bruker Optics) με την τεχνική της αποσβεννύμενης ολικής ανάκλασης (ATR), με την προσάρτηση σε αυτό πρίσμα απλής ανάκλασης από διαμάντι (Dura Samp 1IR II από την Sens IR Technologies).

Οι μετρήσεις θερμοσταθμικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν με όργανο TGAQ500 V20.2 Build 27 της εταιρίας TA σε αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Κατά την διαδικασία αυτή, 2 mg του υλικού τοποθετήθηκαν σε ειδικό δοχείο από λευκόχρυσο και μεταφέρθηκαν στο φούρνο του οργάνου, όπου η θερμοκρασία σταθεροποιήθηκε στους 40 °C. Στη συνέχεια εφαρμόζεται σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 900 °C, με ρυθμό 10 °C/min ενώ συγχρόνως καταγράφεται η απώλεια βάρους του δείγματος.

5.2 Πειραματικές Πορείες και Δεδομένα

5.2.1 Οξείδωση νανοςωλήνων άνθρακα πολλαπλών πλευρικών τοιχωμάτων με την χρήση μίγματος Piranha

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται 50 mg MWCNTs και σε αυτά προστίθενται 50 ml διαλύματος piranha (4:1 v/v, 96% H_2SO_4 /30% H_2O_2), προσφάτως παρασκευασθέντος. Το αιώρημα που προκύπτει θερμαίνεται στους 65°C και αφήνεται να αναδεύεται για 7 ώρες. Το ισχυρά όξινο μίγμα αραιώνεται με την προσθήκη 1 L απεσταγμένου νερού. Το οξειδωμένο υλικό παραλαμβάνεται με διήθηση σε φίλτρο Nylon ($0.22\ \mu\text{m}$) και ακολούθως πλένεται διαδοχικά πάνω στο φίλτρο με απεσταγμένο νερό μέχρι το pH του διηθήματος να γίνει ουδέτερο και τέλος με αιθανόλη.

5.2.3 Οξείδωση νανοςωλήνων άνθρακα πολλαπλών πλευρικών τοιχωμάτων με την χρήση μίγματος Oleum

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται 50 mg MWCNTs και σε αυτά προστίθενται 50 ml διαλύματος Oleum. Το μίγμα αφήνεται να αναδεύεται για 72 ώρες, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια, σε φιάλη που περιέχει 25 ml HNO_3 προστίθενται προσεκτικά 17 ml διαλύματος Oleum. Το όξινο διάλυμα που παρασκευάστηκε προστίθεται αργά στο παραπάνω αιώρημα των νανοςωλήνων, λαμβάνοντας μέριμνα ώστε η θερμοκρασία να μην υπερβεί τους 65°C και ακολουθεί ανάδευση του μίγματος για 2 ώρες. Το παραχθέν ισχυρά όξινο μίγμα αραιώνεται με την προσθήκη πάγου. Το οξειδωμένο υλικό παραλαμβάνεται με διήθηση σε φίλτρο Nylon ($0.22\ \mu\text{m}$) και ακολούθως πλένεται διαδοχικά πάνω στο φίλτρο με απεσταγμένο νερό, μεθανόλη και διαιθυλαιθέρα μέχρι το pH του διηθήματος να γίνει ουδέτερο.

5.2.4 Κατεργασία οξειδωμένων νανοςωλήνων με καυστικό νάτριο

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται 15 mg οξειδωμένων MWCNTs και προστίθενται 0,024 g καυστικού νατρίου (NaOH) διαλυμένα σε 25 ml απεσταγμένου νερού. Το μίγμα αφήνεται να αναδεύεται για 48 ώρες. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται έπειτα από διήθηση σε φίλτρο Nylon ($0.22\ \mu\text{m}$) και έκπλυση.

5.2.5 Γενική μέθοδος σύζευξης αμίνης με οξειδωμένους MWCNTs

15 mg οξειδωμένων MWCNTs διασπείρονται σε 6 ml οξαλυλοχλωρίδιο $[(\text{COCl})_2]$ με την χρήση λουτρού υπερήχων για 5 λεπτά και το αιώρημα θερμαίνεται μέχρι βρασμού για 24 ώρες, προκειμένου να παραχθεί το υλικό MWCNTs-COCl. Στη συνέχεια, απομακρύνεται η περίσσεια του οξαλυλοχλωριδίου με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα και πλύσεων με άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (THF). Ακολούθως, στο υλικό προστίθενται 10 ml άνυδρου THF και 200 mg της αμίνης tert-βουτυλο 2-(2-(2-αμινοαιθοξυ) αιθοξυ) αιθυλοκαρβαμίδιο. Το μίγμα που προκύπτει διασπείρεται με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων για 15 λεπτά και ακολούθως θερμαίνεται υπό αναρροή στους 70 °C για 48 ώρες. Έπειτα, για την παραλαβή του υλικού πραγματοποιείται διήθηση σε φίλτρο Nylon (0.22 μm), το υλικό πλένεται πάνω στο φίλτρο κατά σειρά με μεθανόλη και διχλωρομεθάνιο και τέλος συλλέγεται.

5.2.5.1 Απομάκρυνση της Boc-ομάδας

12 mg του υβριδικού υλικού X διασπείρονται σε 15 ml CH_2Cl_2 με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων για 30 λεπτά. Ακολούθως, στο μίγμα προστίθενται 10 ml TFA και αφήνεται να αναδεύεται για 18 ώρες. Στη συνέχεια, ο διαλύτης και η περίσσεια του TFA απομακρύνονται με συμπύκνωση, ενώ πραγματοποιούνται επαναδιαλυτοποιήσεις και εκπλύσεις με CH_2Cl_2 . Το τελικό προϊόν λαμβάνεται με διήθηση σε φίλτρο Nylon (0.22 μm) και πλένεται διαδοχικά με MeOH και CH_2Cl_2 .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ (MWCNTs) ΚΑΙ Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ

6.1 Τροποποίηση των νανοςωλήνων άνθρακα και δημιουργία βιοσυμβατού ανθρακικού υλικού θετικού και αρνητικού φορτίου.

Τα τελευταία χρόνια, οι νανοςωλήνες άνθρακα έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων τους, που τους επιτρέπουν να βρίσκουν εφαρμογές σε πληθώρα πεδίων. Σχετικά με την αλληλεπίδραση νανοςωλήνων άνθρακα με λιποσώματα και στη δημιουργία σύνθετων βιολογικών συστημάτων, υπάρχουν περιορισμένες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία.

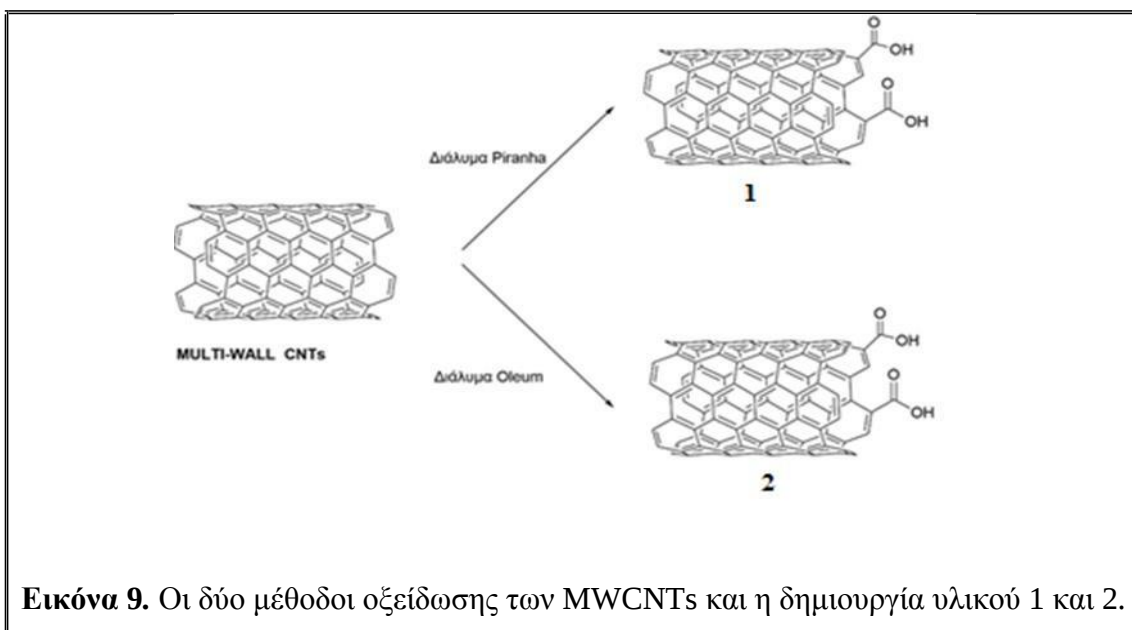
Οι νανοςωλήνες άνθρακα έχουν διάμετρο από 0.3 -100 nm και μήκος αρκετά νανόμετρα, έως και μικρόμετρα. Όμως, με κατάλληλη επεξεργασία-τροποποίηση μπορούν να αποκτήσουν μήκος μικρότερο των 100 nm. Αφού είναι εφικτή η παρασκευή ενός υλικού με τόσο περιορισμένες διαστάσεις, αποφασίστηκε η τροποποίηση τέτοιων υλικών, ώστε να χρησιμοποιηθούν για να εξετασθεί η συμπεριφορά των ανθρακικών νανοϋλικών σε βιολογικά συστήματα και συγκεκριμένα ως προς την επίδρασή του με λιποσώματα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν νανοςωλήνες άνθρακα πολλαπλών γραφιτικών τοιχωμάτων (MWCNTs) για λόγους χρηστικότητας και υψηλότερης καθαρότητας, συγκριτικά με τους νανοςωλήνες μονού γραφιτικού τοιχώματος (SWCNTs). Το αρχικό υλικό αρχικά οξειδώθηκε ώστε να μειωθεί το μήκος του, να καταστεί υδατοδιαλυτό και να αποκτήσει λειτουργικές ομάδες (καρβοξυλικές ομάδες) που στη συνέχεια μέσω αυτών θα αποκτηθεί το επιθυμητό φορτίο (θετικό ή αρνητικό) για κάθε περίπτωση.

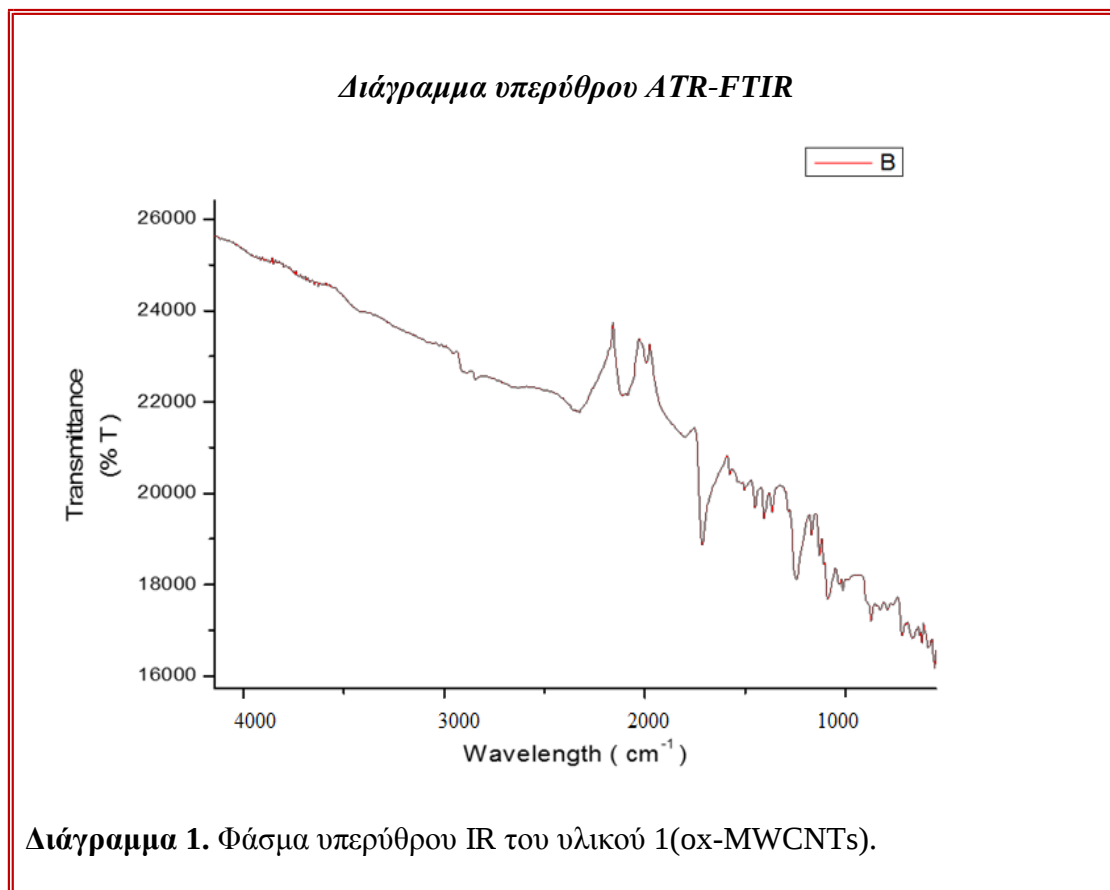
6.2 Ανάλυση της οξείδωσης του αρχικού υλικού MWCNTs και της περαιτέρω τροποποίησής τους

6.2.1 Ανάλυση της οξείδωσης του αρχικού υλικού MWCNTs και χαρακτηρισμός του οξειδωμένου υλικού

Η οξείδωση του υλικού που περιγράφεται στην παρούσα παράγραφο πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους, με χρήση είτε του οξειδωτικού διαλύματος piranha είτε του οξειδωτικού διαλύματος Oleum. Με την κατεργασία των νανοσωλήνων με όξινα διαλύματα, ο ανθρακικός σκελετός τους τεμαχίστηκε και προέκυψαν οξειδωμένοι νανοσωλήνες μικρότερου μήκους, στους οποίους εισήχθησαν κυρίως καρβοξυλικές ομάδες στα άκρα τους. Όπως είναι γνωστό, οι οξειδωμένοι νανοσωλήνες άνθρακα παρουσιάζουν αυξημένη διαλυτότητα σε πολικούς διαλύτες και στο νερό.

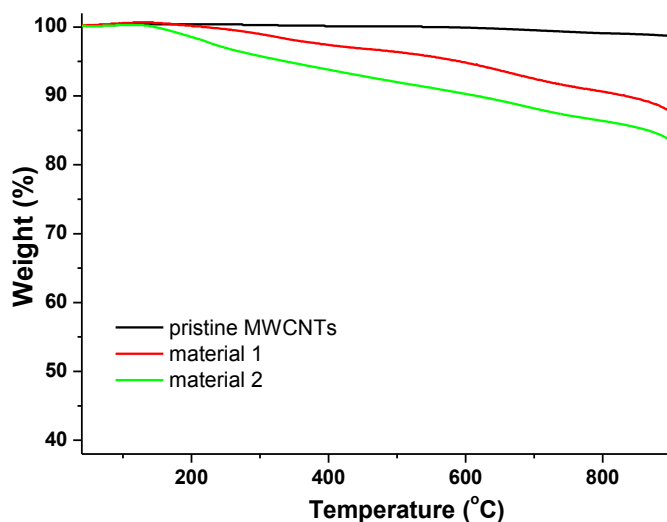


Τέλος οι οξειδωμένοι νανοσωλήνες χαρακτηρίστηκαν πλήρως με χρήση φασματοσκοπικής τεχνικής υπερύθρου ATR-IR, (infrared resonance spectroscopy) και θερμικής τεχνικής (θερμοσταθμική ανάλυση, TGA). Η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), απέδειξε την επιτυχή εισαγωγή καρβοξυλικών ομάδων στα άκρα των MWCNTs λόγω της εμφάνισης της χαρακτηριστικής δόνησης του καρβονυλικού οξέος στα 1710 cm^{-1} , στο φάσμα υπερύθρου του υλικού 1.



Στη συνέχεια, τα θερμογράφημα του οξειδωμένου υλικού 1 και 2 και στις δύο περιπτώσεις οξείδωσης απεικονίζεται στο **Διαγραμμα 2**, σε σύγκριση με το αρχικό υλικό (pristine). Από τη θερμοκρασιακή περιοχή μεταξύ 200-550 °C, παρατηρείται απώλεια της τάξεως του 5 % για το υλικό 1 σε σύγκριση με το αρχικό υλικό μη οξειδωμένων MWCNTs και 8% για το υλικό 2 . Από το διάγραμμα θερμικής ανάλυσης των οξειδωμένων MWCNTs (υλικού 1 και 2) με τις δύο μεθόδους οξείδωσης παρατηρείται ότι με την ισχυρότερη μέθοδο οξείδωσης Oleum ο βαθμός απώλειας/καύσης του υλικού είναι μεγαλύτερος.

Διάγραμμα Θερμοστατικής Ανάλυσης (TGA)



Διάγραμμα 2. Θερμοστατικής ανάλυσης για τους οξειδωμένους MWCNTs με τις δύο μεθόδους, piranha και Oleum.

6.2.2 Περιγραφή υδρόλυσης των καρβοξυλικών ομάδων και συνθετική πορεία νανοςωλήνων αρνητικού φορτίου

Σε αυτή την παράγραφο θα περιγραφεί η διαδικασία υδρόλυσης των καρβοξυλικών ομάδων του οξειδωμένου υλικού. Για την συγκεκριμένη τροποποίηση το οξειδωμένο υλικό 2 (ox- MWCNTs) αναμιγνύεται με 0,024 gr NaOH σε υδατικό διάλυμα τα μόρια της καρβοξυλικής ομάδας που φέρουν οι MWCNTs να υδρολυθούν και να μείνουν ως εστέρες έχοντας αρνητικά φορτίο και προσδίδοντας κατά συνέπεια αρνητική φόρτιση στο υλικό με κωδικό υλικό 3 όπως φαίνεται στην αντίδραση της Εικόνας 10.

Τροποποίηση II- Δημιουργία αρνητικά φορτισμένων MWCNTs



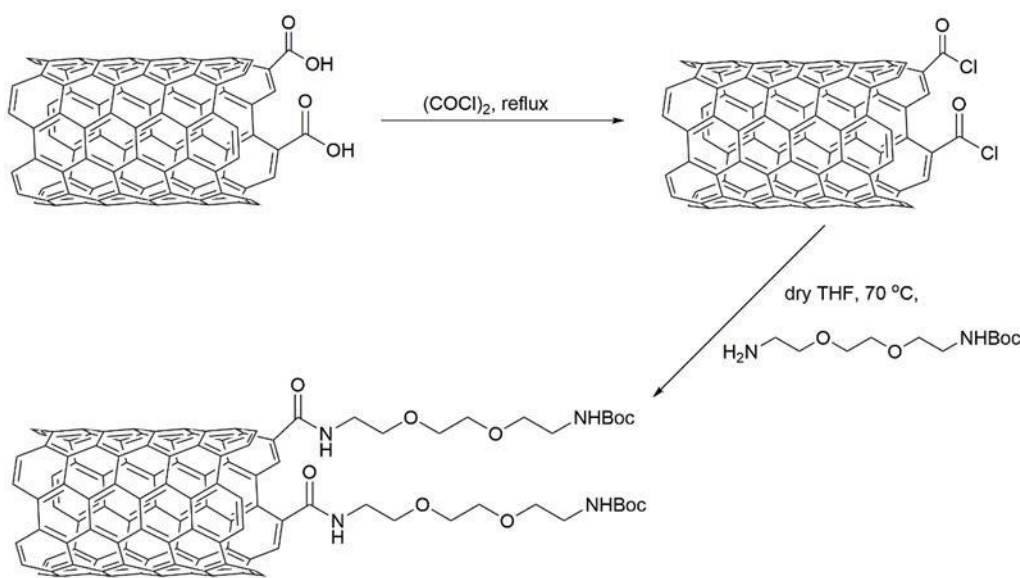
Εικόνα 10. Τροποποίηση των ox-MWCNTs μέσω αλκαλικής υδρόλυσης, δημιουργία υλικού 3.

6.2.3 Αντίδραση εισαγωγής αμίνο-ομάδας στους MWCNTs- συνθετική πορεία υλικού θετικού φορτίου.

Στην εν λόγω τροποποίηση χρησιμοποιήθηκε πάλι το υλικό 2 που όπως προαναφέρθηκε προέκυψε μετά από την κατεργασία του αρχικού MWCNTs με ισχυρά οξέα. Στο οξειδωμένο υλικό που έφερε πλέον λειτουργικές καρβοξυλικές ομάδες στα άκρα του, προστέθηκε οξαλυλοχλωρίδιο $[(\text{COCl})_2]$, η διασπορά του υλικού επιτεύχθηκε με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων και θερμάνθηκε στους 70°C για 18 ώρες σε αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου (N_2). Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων και μετατροπή τους σε ακυλοχλωρίδια.

Η απομάκρυνση της περίσσειας οξαλυλοχλωριδίου έγινε με συμπύκνωση και πλύσεις με άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (THF), στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη του tert-βουτυλο 2-(2-(2-αμινοαιθοξυ)αιθοξυ)αιθυλοκαρβαμιδίου και το μίγμα θερμάνθηκε στους 70°C για 18 ώρες σε αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου (N_2). Τέλος, το υλικό διασπάρθηκε σε διχλωρομεθάνιο και στο αιώρημα προστέθηκε τριφθοροξικό οξύ (TFA), ώστε να απομακρυνθεί η Boc-ομάδα της αμίνης και το τελικό υλικό 4 να είναι θετικά φορτισμένο.

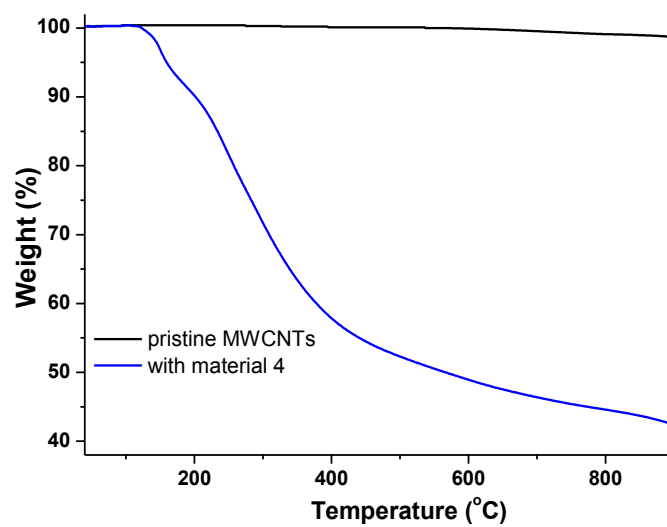
Τροποποίηση ΙΙΙ – δημιουργία θετικού φορτίου MWCNTs



Εικόνα 11. Πορεία σύνθεσης του αμινο-τελικού υβριδικού υλικού 4.

Το θερμογράφημα του τροποποιημένου αμινο-τελικού υβριδικού υλικού, συγκρινόμενο με αυτά των μη τροποποιημένων MWCNTs απεικονίζεται στο **Διάγραμμα 3**. Η απώλεια βάρους που παρατηρήθηκε, στην περιοχή μεταξύ $200-550^\circ\text{C}$, είναι της τάξης του 40%, σε σχέση με τους μη τροποποιημένους MWCNTs. Με βάση αυτή την τιμή υπολογίστηκε ότι αντιστοιχεί 1 οργανική ομάδα σε κάθε 60 άτομα άνθρακα.

Διάγραμμα TGA υλικού MWCNTs-NH⁺



Διάγραμμα 3. : Θερμομετρική ανάλυση υλικού 4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Σύνθεση νανοσωμάτων και η αλληλεπίδραση τους με νανοσωλήνες άνθρακα.

7.1 Εισαγωγή

7.1.1 Η μέθοδος χαρακτηρισμού DLS -Δυναμική σκέδαση φωτός

Το δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Ε.Κ.Π.Α. Στην αρχή του δεύτερου μέρους της πειραματικής διαδικασίας κρίνεται απαραίτητο να γίνει χαρακτηρισμός των δειγμάτων-υλικών MWCNTs που δημιουργήθηκαν στο Ε.Ι.Ε. με τη βοήθεια της μεθόδου δυναμικής σκέδασης ώστε να ληφθούν πληροφορίες τόσο για το φορτίο όσο και για το μέγεθός τους.

Μια από τις πιο δημοφιλείς τεχνικές σήμερα για την μέτρηση του μεγέθους κολλοειδών νανοσωματιδίων είναι η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS), με την οποία μπορεί να μετρηθεί το μέγεθος σωματιδίων ενός διαλύματος διασποράς, πολύ γρήγορα και απαιτώντας μικρή προετοιμασία του δείγματος.

Η μέθοδος DLS ανιχνεύει τη συχνότητα του τρεμοπαίγματος του αντικειμένου που καταγράφεται στον ανιχνευτή από τη σκέδαση του φωτός στα σωματίδια [26]. Εμφανίζονται δε σκοτεινές και φωτεινές περιοχές λόγω της ενισχυτικής και ακυρωτικής συμβολής του κύματος του φωτός στο σωματίδιο.

Η συγκεκριμένη συχνότητα είναι ανάλογη της θερμικής κίνησης Brown των σωματιδίων και εξαρτάται από το μέγεθός τους (όσο μικρότερα τα σωματίδια τόσο γρηγορότερη είναι η κίνηση Brown) και από το ιξώδες του διαλύτη. Το ιξώδες ενός υγρού συσχετίζεται άμεσα με την θερμοκρασία του, άρα για μετρηθεί η κινητικότητα των σωματιδίων μέσα σε ένα διάλυμα είναι απαραίτητο οι μετρήσεις να διεξάγονται κάτω από μια γνωστή και σταθερή θερμοκρασία.

Η ανάλυση της χρονικής εξάρτησης της διακύμανσης/συσχέτισης του μοτίβου τρεμοπαίγματος μπορεί επομένως να αποδώσει το συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων μέσω του οποίου, χρησιμοποιώντας την εξίσωση Stokes-Einstein, και γνωρίζοντας το ιξώδες του μέσου, μπορεί να υπολογιστεί η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων.

Η διάμετρος που μετριέται μέσω της τεχνικής DLS ονομάζεται υδροδυναμική διάμετρος και είναι η διάμετρος μιας ιδεατής σφαίρας που έχει τον ίδιο συντελεστή διάχυσης με το σωματίδιο και δίνεται από τον ακόλουθο τύπο:

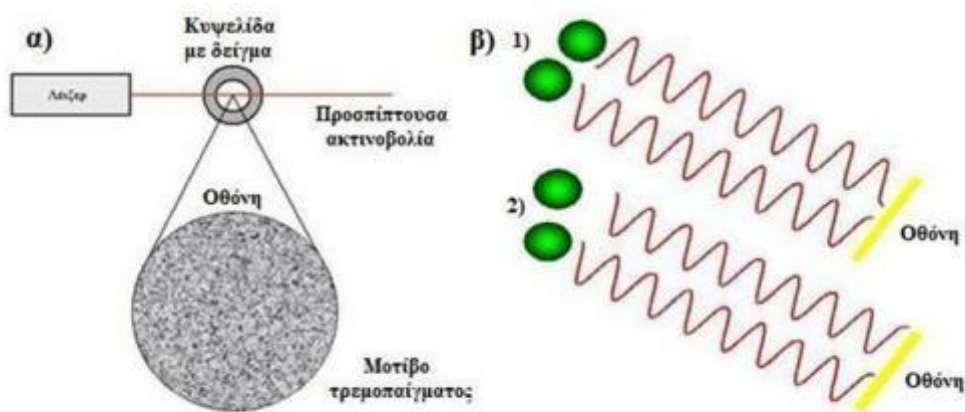
$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta(T)D_m}$$

$D = kT/6\pi\eta r$, όπου

k: η σταθερά Boltzmann,

T: η απόλυτη θερμοκρασία,

η : το ιξώδες του διαλύτη και



Εικόνα 12 α). Η σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του μηχανήματος DLS. **β).** Το παρατηρηθέν σήμα που λαμβάνεται από τα σωματίδια που μελετώνται.

Το σήμα που λαμβάνεται εξαρτάται από την συμβολή των φάσεων του σκεδαζόμενου φωτός που προσπίπτει στον ανιχνευτή. Εάν οι δύο ακτίνες συμβάλουν ακυρωτικά με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται μειωμένη ένταση (σκοτεινή περιοχή). Ενώ

εάν οι δύο ακτίνες συμβάλουν ενισχυτικά ανιχνεύεται αυξημένη ένταση (φωτεινή περιοχή).



Εικόνα 13. Η σχηματική απεικόνιση της διάταξης δυναμικής σκέδασης φωτός.

Ένα τυπικό σύστημα δυναμικής σκέδασης φωτός αποτελείται από έξι κύρια τμήματα:

- ✓ Την πηγή φωτός (laser), η ακτίνα της οποίας θα περάσει μέσα από την κυψελίδα με το δείγμα
- ✓ Την κυψελίδα με το δείγμα
- ✓ Τον ανιχνευτή για να μετρηθεί η σκεδαζόμενη ακτινοβολία

Μέσω ψηφιακού συστήματος επεξεργάζεται το σήμα της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Τέλος η πληροφορία αυτή περνά σε ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου με το κατάλληλο λογισμικό, αναλύονται τα δεδομένα και δίνονται πληροφορίες για το μέγεθος των σωματιδίων.

Ένα ακόμα μέγεθος που υπολογίζεται με το μηχάνημα DLS είναι η πολυδιασπορά του αιωρήματος η οποία δίνεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Polydispersity} = \mu_2/\Gamma^2, \Gamma = D_m q^2$$

- ✓ Γ : decay constant,
- ✓ D_m : diffusion coefficient,
- ✓ q : scattering vector,

✓ η:viscosity

Στο όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τα συγκεκριμένα πειράματα η παραγωγή της δέσμης του εκπεμπόμενου φωτός γίνεται από λυχνία He-Ne και το μήκος κύματος του φωτός είναι 633nm. Η ακτινοβολία προσπίπτει στα σωματίδια (π.χ. λιποσώματα), σκεδάζεται, και στη συνέχεια, τα σκεδαζόμενα φωτόνια ανιχνεύονται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή.

Στο λογισμικό του οργάνου υπάρχει πρόγραμμα αλγορίθμων που επεξεργάζεται τις μεταβολές της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός και καταλήγει στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων που περιέχονται στο δείγμα. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη μαθηματική ανάλυση, η οποία συνίσταται από την ISO 13321 διεθνή μέθοδο, προκύπτει και ο μέσος όρος των μεγεθών. Κατά τις μετρήσεις αυτές το μέγεθος ορίζεται ως η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων – λιποσωμάτων, ενώ ως δείκτης διασποράς το εύρος κατανομής [25].

7.1.2 Το ζ-δυναμικό (Zeta)

Το ζήτα δυναμικό είναι το φορτίο της ενδιάμεσης επιφάνειας κάλυψης (shear) μεταξύ των σωματιδίων με τα ιόντα που τους περιβάλλουν (ion atmosphere) και του υδατικού μέσου και χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων [100,35]. Εκφράζει το ηλεκτρικό δυναμικό των σωματιδίων και επηρεάζεται από τη σύνθεση του σωματιδίου και το μέσο στο οποίο είναι διεσπαρμένο.

Νανοσωματίδια με ζήτα δυναμικό πάνω από (+ / -) 30 mV έχουν δείξει ότι είναι σταθερά σε εναιώρημα, καθώς το επιφανειακό φορτίο εμποδίζει την συσσωμάτωση των σωματιδίων. Το ζήτα δυναμικό μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να διαπιστωθεί αν ένα φορτισμένο υλικό είναι εγκλεισμένο (encapsulated) στο κέντρο της του λιποσώματος ή έχει προσδεθεί (adhered) στην επιφάνεια.

Το δυναμικό ζήτα εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών του διαλυτού. Εάν το δυναμικό ζήτα είναι χαμηλότερο από μια δεδομένη κρίσιμη τιμή του συστήματος σωματιδίων, συμβαίνει συσσωμάτωση ή και καθίζηση των σωματιδίων[26].

Το δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας εκτελέστηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.).

Αρχικά έγινε ο χαρακτηρισμός των τριών δειγμάτων μέσω του DLS (Dynamic Light Scattering), μετρήθηκαν λοιπόν τα διαλύματα διασποράς των MWCTNs-COOH σε μορφή άλατος (αρνητικού τόνου), των MWCNTs-COOH και των MWCNTs-NH₃⁺ (θετικού τόνου) και κατεγράφησαν τα εξής:

- ✓ Η μέτρηση του μέσου μεγέθους σωματιδίων διασποράς των τριών δειγμάτων
- ✓ Το ζ-δυναμικό (Zeta) μέσω του οποίου επαληθεύτηκε η φόρτιση των σωματιδίων
- ✓ Η πολυδιασπορά των διαλυμάτων



Εικόνα 14. Όργανο Φασματοσκοπίας Συσχετισμού Φωτονίων. Μοντέλο: Zetasizer Particle Size and Zeta Potential Analyser 3000. Εταιρεία: Malvern Instruments Ltd.

7.1.3 PROBESONICATOR (Αισθητήρας υπερήχων)

Μοντέλο: UP 200 S (Ultrasonic processor for stationary operation)

Εταιρεία: Dr Hielscher GmbH

Αρχή λειτουργίας :

Από τον αισθητήρα του οργάνου (την ακίδα τιτανίου Ti) γίνεται μεταφορά ενέργειας μέσω των υπερήχων στο δείγμα (π.χ. λιποσωμιακό εναιώρημα). Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου – δηλαδή η συχνότητα και η ένταση των υπερήχων – ρυθμίζονται ανάλογα με το είδος του δείγματος, μέσω δύο ποτενσιομέτρων από τον χειριστή του οργάνου.

Συνθήκες λειτουργίας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων:

Εκπεμπόμενη ενέργεια: 200W (150W σε υγρό μέσο)

Ένταση ισχύος εκπεμπόμενης ενέργειας (amplitude): 20% - 100%

Συχνότητα εκπεμπόμενου παλμού: 0.1 -1 κύκλοι/sec (cycle)

Συχνότητα λειτουργίας: 24kHz

Μεταβαλλόμενο εύρος συχνότητας: ± 1 kHz

Συνθήκες λειτουργίας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων:

Εκπεμπόμενη ενέργεια: 200W (150W σε υγρό μέσο)

Ένταση ισχύος εκπεμπόμενης ενέργειας(amplitude):100%

Συχνότητα εκπεμπόμενου παλμού: 0.7 κύκλοι/sec (cycle)

Συχνότητα λειτουργίας: 24kHz

Μεταβαλλόμενο εύρος συχνότητας: ± 1 kHz

7.2 Πειραματική διαδικασία

7.2.1 Χαρακτηρισμός των υδατικών διαλυμάτων των MWCNTs με τη μέθοδο Δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)

Υλικά

- ✓ Υδατικό διάλυμα οξειδωμένων MWCNTs που φέρουν καρβοξυλομάδες
- ✓ Υδατικό διάλυμα τροποποιημένων MWCNTs που φέρουν αμινομάδες
- ✓ Υδατικό διάλυμα οξειδωμένων MWCNTs σε μορφή άλατος
- ✓ Κυψελίδες 10x10 x48 mm (Sarstedt, Germany)
- ✓ Μικροσύριγγα 1μl Hamilton microliter™ syringes (Bonaduz AG, Switzerland)

Όργανα

- ✓ Φασματοφωτόμετρο συσχέτισης φωτονίων (Zetasizer 3000 HAS, MalvernUK)

Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός οξειδωμένων και τροποποιημένων MWCNTs

Τα αρχικά υδατικά διαλύματα MWCNTs που παρασκευάστηκαν στο Ε.Ι.Ε. όπως προαναφέρθηκε με συγκέντρωση $C_1 = 1\text{mg/ml}$ αραιώθηκαν 60 φορές σε H_2O HPLC καθαρότητας (pH 5.6-5.7) σε κυψελίδα όγκου 3 ml μέχρι τελικής συγκεντρώσεως $C_2 = 0,0169\text{ mg/ml}$ και αυτό γιατί η ευαισθησία του μηχανήματος DLS απαιτεί δείγματα που έχουν υποστεί αραιώση για αποφυγή βλάβης κατά την πρόσπτωση της δέσμης laser.

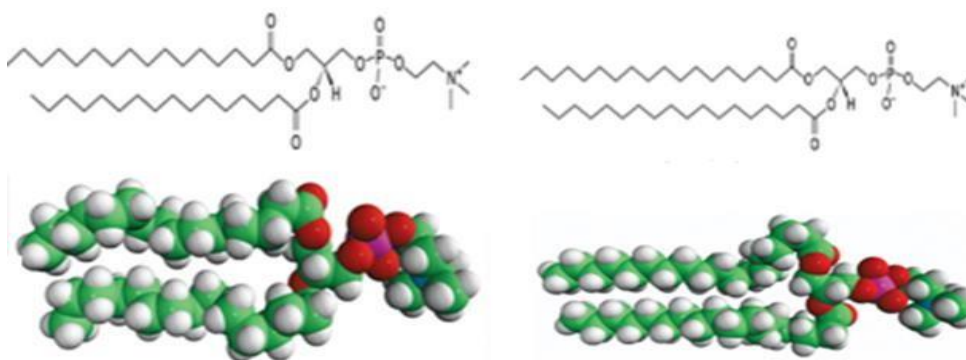
Στη συνέχεια μετρώνται η υδροδυναμική διάμετρος (Z_{Ave}), το ζ-δυναμικό (Zeta) των νανοσωλήνων και ο δείκτης πολυδιασποράς (PI). Η σκέδαση εκτελείται υπό γωνία 90° και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25°C. Η ανάλυση των δεδομένων γίνεται με τη μέθοδο CONTIN του πακέτου λογισμικού MALVERN.

7.2.2 Παρασκευή λιποσωμάτων DPPC&HSPC

Στο σημείο αυτό θα περιγραφεί η πειραματική διαδικασία της παρασκευής των λιποσωμάτων. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ενυδάτωσης λεπτού υμενίου. Χρησιμοποιούνται επίσης δύο τύποι λιπιδίων, το DPPC και το HSPC οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά τους παρατίθενται στον **Πίνακα 1**.

Τύπος λιπιδίου	I	II
Όνομα	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Hydro Soy PC, L- α -phosphatidylcholine, (hydrogenated soy)
Κωδικόνομα	DPPC	HSPC
Μοριακή φόρμουλα	$C_{40}H_{80}NO_8P$	$C_{44}H_{88}NO_8P$
Μοριακό βάρος	734.039	783.774
Ποσότητα	30 mg	30mg

Πίνακας 1. Ιδιότητες και χαρακτηριστικά των λιπιδίων DPPC και HSPC που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 15. Μοριακός τύπος και η σχηματική αναπαράσταση των δύο τύπων λιπιδίων, DPPC και HSPC αντίστοιχα.

7.2.2.1 Παρασκευή Λιποσωμάτων DPPC και HSPC ως συστήματα αναφοράς

Υλικά

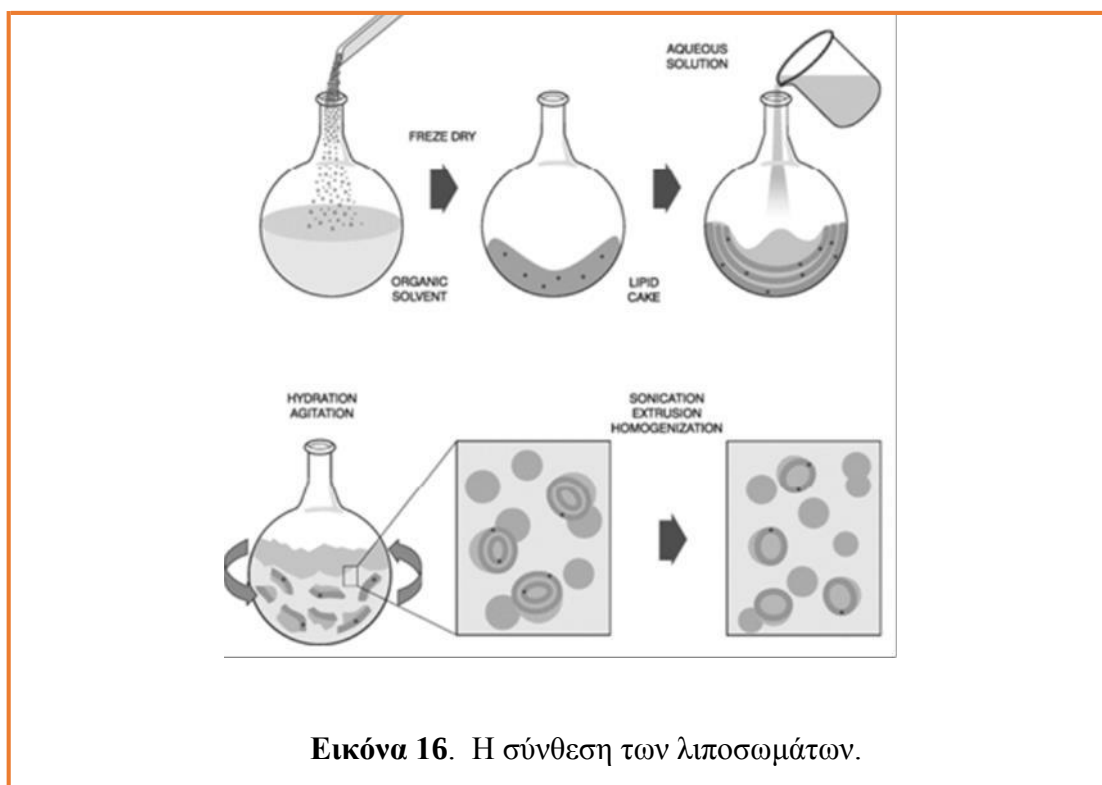
- ✓ Χλωροφόρμιο (Lab-Scan analytical sciences Ltd, Dublin, Ireland)
- ✓ Μεθανόλη
- ✓ H₂O HPLC (PROTMPS Labconco System)
- ✓ Κυψελίδες 10x10 x48 mm (Sarstedt, Germany)
- ✓ Μικροσύριγγα 1μl Hamilton microliterTM syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- ✓ 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)
- ✓ Hydro Soy PC, L-α-phosphatidylcholine, (hydrogenated soy) (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)

Όργανα

- ✓ Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- ✓ Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό (Laborota 40 A00, Heidolph Instruments)
- ✓ Ξηραντήρας κενού
- ✓ Συσκευή Υπερήχησης με αισθητήρα (UP200s Ultraschallprozessor dr. Hielscher GmbH, Berlin, Germany)
- ✓ Φασματοφωτόμετρο συσχέτισης φωτονίων (Zetasizer 3000 HAS, Malvern UK)

7.2.2.2 Παρασκευή Λιποσωμάτων DPPC&HSPC

Το πρώτο μέρος της παρασκευής των λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού υμενίου, όπου ζυγίζονται και εισάγονται σε σφαιρική φιάλη των 100ml, 30 mg λιπιδικής σκόνης 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) τα οποία διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες, συγκεκριμένα σε χλωροφόρμιο και μεθανόλη. Στην συνέχεια τοποθετούνται μία-μία σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό, όπου οι οργανικοί διαλύτες εξατμίζονται και σχηματίζεται το λεγόμενο λιπιδικό φιλμ. Η φιάλη με το λιπιδικό φιλμ (lipid cake) στην συνέχεια τοποθετήθηκε στην ψύξη στους 4-6 °C για 24 ώρες. Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τη σύνδεση λιποσωμάτων με την μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού υμενίου όπως περιγράφεται παραπάνω χρησιμοποιώντας λιπιδική σκόνη Hydro Soy PC, L- α -phosphatidylcholine, (hydrogenated soy) (HSPC).



Το λιπιδικό υμένιο που σχηματίστηκε σε κάθε ένα από τα δύο συστήματα αναφοράς ενυδατώνεται σε H₂O/HPLC καθαρότητας με αναλογία 10mg:1ml. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδρόλουτρο πάνω από τη θερμοκρασία ναλώδους μετάβασης των λιπιδίων με αργή περιστροφή της φιάλης για μία ώρα με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μεγάλων πολυστοιβαδικών κυστιδίων (MLVs).

Ένα μέρος του εναιωρήματος υφίσταται αραίωση (50 μl:2950 ml) και οδηγείται στη συσκευή φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων για χαρακτηρισμό το υπόλοιπο υποβάλλεται σε υπερήχηση (sonication) 5 λεπτών μέσω του αισθητήρα υπερήχων (probesonicator). Τα σχηματιζόμενα μονοστοιβαδικά λιποσώματα (SUVs) υπόκεινται ομοίως σε αραίωση στην συνέχεια με την ίδια αναλογία σε νερό καθαρότητας HPLC ώστε το εναιώρημα να χαρακτηριστεί ομοίως μέσω της συσκευής φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων (DLS).

7.2.3 Ενυδάτωση λεπτού υμενίου με διαλύματα των MWCNTs. Δημιουργία των υπό μελέτη συστημάτων.

7.2.3.1 Συστήματα λιποσωμάτων-νανοσωλήνων, DPPC – MWCNTs & HSPC MWCNTs

Υλικά

- ✓ Υδατικό διάλυμα οξειδωμένων MWCNTs που φέρουν καρβοξυλομάδες
- ✓ Υδατικό διάλυμα τροποποιημένων MWCNTs που φέρουν αμινομάδες
- ✓ Υδατικό διάλυμα οξειδωμένων MWCNTs σε μορφή άλατος
- ✓ Χλωροφόρμιο (Lab-Scan analytical sciences Ltd, Dublin, Ireland)
- ✓ Μεθανόλη
- ✓ H₂O HPLC (PROTMPS Labconco System)
- ✓ Κυψελίδες 10x10 x48 mm (Sarstedt, Germany)
- ✓ Μικροσύριγγα 1μl Hamilton microliterTM syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- ✓ 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)
- ✓ Hydro Soy PC, L- α -phosphatidylcholine, (hydrogenated soy) (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)

7.2.3.2 Παρασκευή Συστημάτων Μεγάλων Πολυστοιβαδικών Κυστιδίων-Νανοσωλήνων (LMVs-MWCNTs)

Το δεύτερο μέρος της σύνθεσης των λιποσωμάτων, είχε στόχο την σύνθεση συστημάτων LMVs-MWCNTs. Ομοίως με τη σύνθεση λιποσωμάτων του πρώτου μέρους ζυγίζονται και εισάγονται σε τρεις σφαιρικές φιάλες των 100ml, 30 mg λιπιδικής σκόνης 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), και διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες (χλωροφόρμιο και μεθανόλη). Στην συνέχεια

τοποθετούνται μία-μία σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό, όπου οι οργανικοί διαλύτες εξατμίζονται και σχηματίζεται το λεγόμενο λιπιδικό φιλμ. Οι σφαιρικές φιάλες με το λιπιδικό φιλμ (lipid cake) στην συνέχεια τοποθετήθηκε στην ψύξη στους 4-6 °C για 24 ώρες. Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τη σύνδεση λιποσωμάτων με την μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού υμενίου σε τρεις ακόμα σφαιρικές φιάλες όπως περιγράφεται παραπάνω χρησιμοποιώντας λιπιδική σκόνη Hydro Soy PC, L- α -phosphatidylcholine, (hydrogenated soy) (HSPC).

Για να πραγματοποιηθεί η ενυδάτωση και κατά συνέπεια η παρασκευή των συστημάτων, στο σημείο αυτό, μετά το πέρας των 24 ωρών, προστίθενται στην κάθε σφαιρική φιάλη που περιέχει το λιπιδικό φιλμ κάθε ένα από τα τρία υδατικά διαλύματα των MWCNTs. Η αναλογία ανάμιξης είναι 10 mg λιπιδίων :1ml υδατικού διαλύματος. Δηλαδή έχουμε πλέον δημιουργήσει έξι συστήματα, εφόσον έχουμε δύο ήδη λιπιδικών φιλμ, ένα που δημιουργήθηκε με λιπιδική σκόνη DPPC και ένα είδος με τη λιπιδική σκόνη HSPC. **Κάθε μία από τις έξι συνολικά σφαιρικές φιάλες με τα σχηματιζόμενα λιπιδικά υμένια ενυδατώνεται με κάθε τύπο υδατικού διαλύματος MWCNTs.** Έτσι προκύπτουν τα έξι προς μελέτη συστήματα.

Οι σφαιρικές φιάλες με το λιπιδικό φιλμ και τα υδατικά διαλύματα MWCNTs τοποθετούνται ξανά σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό και σε θερμοκρασία να διατηρείται κατά την ενυδάτωση σταθερή λίγο υψηλότερα της θερμοκρασίας μετάβασης των λιπιδίων. Η θερμοκρασία αυτή είναι 41°C για το DPPC και 52°C για το HSPC. Πρέπει η θερμοκρασία να είναι λίγο πάνω από το σημείο μετάβασης για να επιτυγχάνεται καλύτερη ανάμιξη. Επειδή θα μελετηθούν και τα συστήματα μικρών μονοστοιβαδικών κυστιδίων – νανοσωλήνων (SUVs-MWCNTs) ένα μέρος του λιποσωματικού εναιωρήματος χωρίζεται και το υπόλοιπο οδηγείται στην υπερήχηση.

7.2.3.3 Παρασκευή Συστημάτων Μικρών Μονοστοιβαδικών κυστιδίων Νανοσωλήνων (SUVs-MWCNTs)

Τα συστήματα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα-νανοσωλήνες (SUVs-MWCNTs) σχηματίζονται με υπερήχηση (sonication) όπου με την βοήθεια των υπερήχων τα πολυστοιβαδικά λιποσώματα, LMVs διασπώνται σε μικρά μονοστοιβαδικά

λιποσώματα (small unilamellar vesicles, SUV) με διάμετρο από 15-50nm. Ακολουθεί αραιώση και ο χαρακτηρισμός με DLS κατά τον ίδιο τρόπο όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

7.2.4. Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των συστημάτων LMVs-MWCNTs και SUVs-MWCNTs

Το αποτέλεσμα της ενυδάτωσης είναι πολυστοιβαδικά λιποσώματα (Large Multi-lamellar Vesicles, LMV) τα οποία αλληλοεπιδρούν με τους MWCNTs δημιουργώντας συστήματα LMV-MWCNTs. Κάθε λιποσωματικό εναιώρημα συγκέντρωσης $C_1=10 \text{ mg/ml}$ αραιώθηκε με τρις-απιονισμένο νερό HPLC (με αναλογία 50 μl διαλύματος: 2950 μl νερού) για να επιτευχθεί ξανά μία τελική συγκέντρωση $C_2=0,0169\text{mg/ml}$ και να περάσουν στο χαρακτηρισμό με DLS.

Ομοίως υφίστανται αραιώση και τα διαλύματα συστημάτων SUVs-MWCNTs, κάθε διάλυμα συγκέντρωσης $C_1=10 \text{ mg/ml}$ αραιώθηκε με τρις-απιονισμένο νερό HPLC καθαρότητας (με αναλογία 50 μl διαλύματος: 2950 μl νερού) για να επιτευχθεί ξανά μία τελική συγκέντρωση $C_2=0,0169\text{mg/ml}$.

Με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω, δημιουργήθηκαν δεκαέξι συστήματα που οδηγήθηκαν για φυσικοχημικό χαρακτηρισμό μέσω της φασματοσκοπίας συσχέτισης φωτονίων. Τα φυσικοχημικά μεγέθη που μετρώνται αφορούν στο μέγεθος (μέση υδροδυναμική διάμετρος $Z\text{Ave}$), τον δείκτη πολυδιασποράς (PI) και το ζ-δυναμικό (Zeta) των συστημάτων liposomes – MWCNTs.

Τα δείγματα σκεδάζονται (633nm) υπό γωνία 90° και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25°C . Τα αποτελέσματα αναλύονται με τη μέθοδο CONTIN του πακέτου λογισμικού MALVERN.

7.3 Αποτελέσματα

7.3.1 Χαρακτηρισμός υδατικών διαλυμάτων CNTs

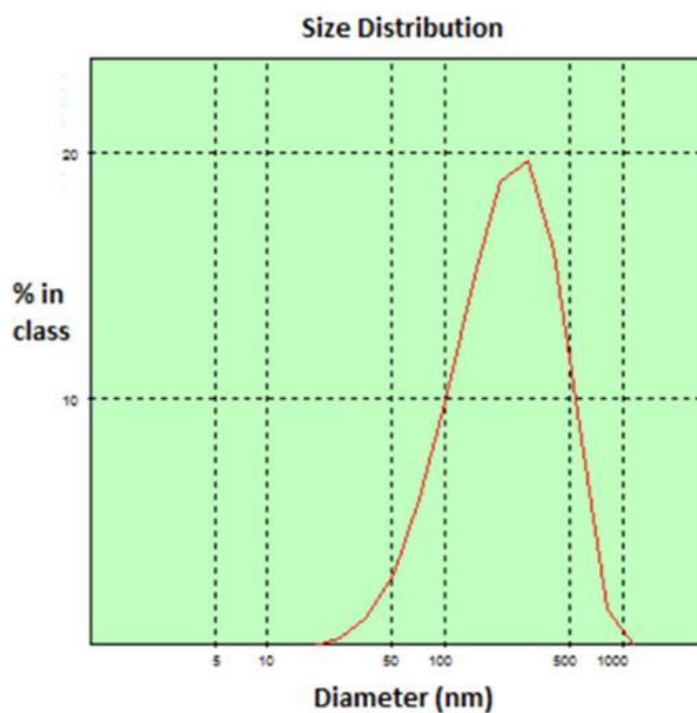
Από το θεωρητικό μέρος στο οποίο προαναφέρθηκε η έννοια του ζ δυναμικού, αξίζει να παρατηρηθεί ότι πράγματι εφόσον το ζ-δυναμικό (Zeta) εκφράζει το δυναμικό της ενδιάμεσης περιοχής (shear) μεταξύ του σωματιδίου με το φορτίο του και του περικλείοντος μέσου και εφόσον το σωματίδιο τείνει να συγκεντρώσει γύρω του το αντίθετο φορτίο (Zeta), τα αποτελέσματά μας όπως παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στη συνέχεια επαληθεύουν τα αναμενόμενα. Με του αρνητικού φορτίου σωματίδια να εμφανίζουν θετικό ζ-δυναμικό (Zeta), τα αρνητικού τόνου θετικό κ.ο.κ.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται ο πίνακας των μετρήσεων του υδατικού διαλύματος οξειδωμένων MWCNTs και τα αντίστοιχα δύο διαγράμματα μετρήσεων DLS δείγματος διασποράς MWCNTs-COOH. Το **Διάγραμμα 4** παρουσιάζει το διάγραμμα διασποράς της διαμέτρου των σωματιδίων του υλικού 2 στο διάλυμα διασποράς.

Τύπος υλικού MWCNTs	Υλικό 2 (ox-MWCNTs)
Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	172
ζ-δυναμικό (mV)	-35,1
Πολυδιασπορά εναιωρήματος	0,398

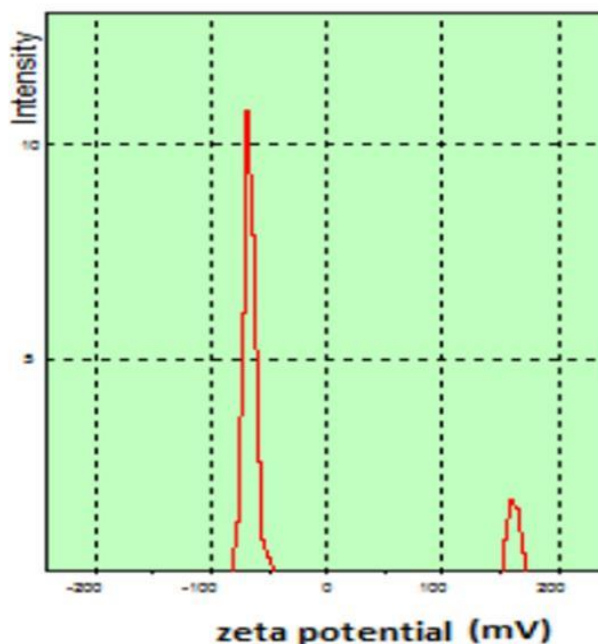
Πίνακας 2.Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού υλικού 2

Το αντίστοιχο διάγραμμα απεικονίζει τις τιμές πέντε κύκλων μετρήσεων για την διάμετρο των ox-MWCNTs. Το διάγραμμα απεικονίζει τη διασπορά του μεγέθους που μελετάται δηλαδή της υδροδυναμικής διαμέτρου των σωματιδίων γύρω από μία τιμή.



Διάγραμμα 4. Διάγραμμα από μέτρηση DLS της διασποράς μεγέθους των σωματιδίων του εναιωρήματος του **υλικού 2** (τροποποιημένων ox-MWCNTs).

Η μέτρηση του ζ-δυναμικού (Zeta) γίνεται με τη λήψη κορυφών αλλά και ενός πίνακα με όλα τα χαρακτηριστικά μεγέθη. Η τελική τιμή που λαμβάνεται είναι ο μέσος όρος που προκύπτει από πέντε κύκλους μετρήσεων.



Διάγραμμα 5. Μέτρηση μηχανήματος DLS του ζ-δυναμικού των σωματιδίων του εναιωρήματος σωματιδίων **υλικού 2** (ox-MWCNTs).

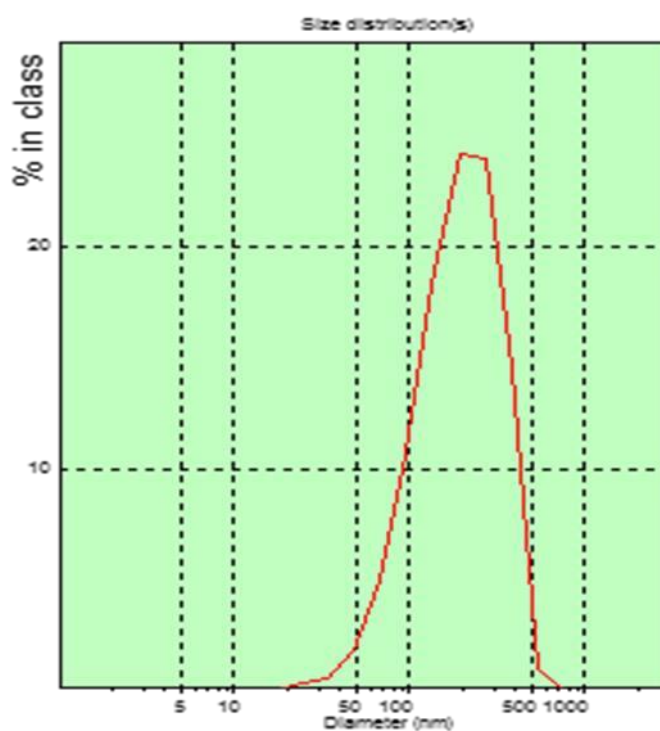
Επιλέχθηκε το υλικό 2 διότι ενώ ποιοτικά είναι το ίδιο με το υλικό 1 ο τρόπος παρασκευής του ήταν πιο αποτελεσματικός δηλαδή η οξείδωση Oleum με την οποία παρασκευάστηκε είναι πιο ισχυρή από τη μέθοδο Piranhaόπως αναλύεται και στο παράρτημα των αποτελεσμάτων.

Ομοίως στον **Πίνακα 3** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού DLS για το διάλυμα τροποποιημένων του **υλικού 3**.

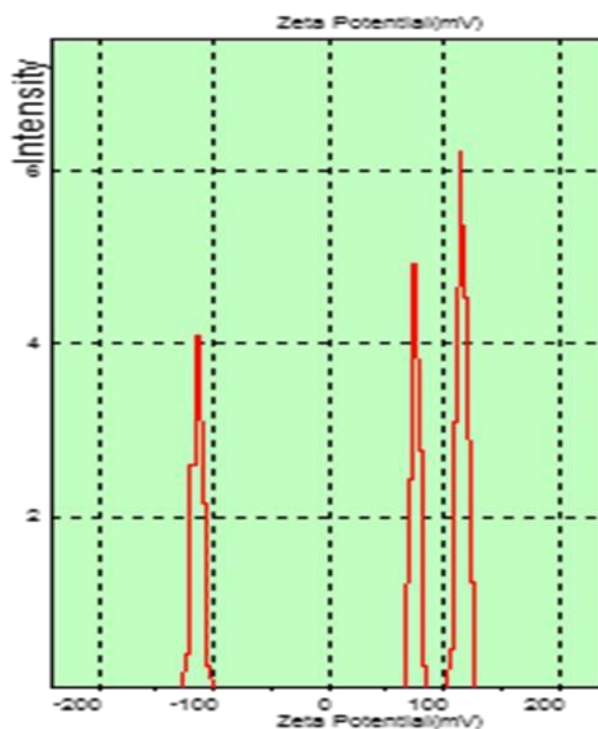
Τύπος υλικού MWCNTs	Υλικό 3
Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	160
ζ-δυναμικό (mV)	40,8
Πολυδιασπορά εναιωρήματος	0,383

Πίνακας 3. Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού υλικού 3

Ακολουθούν τα δύο διαγράμματα μέτρησης υδροδυναμικής διαμέτρου και ζ-δυναμικού για το **υλικό 3**.



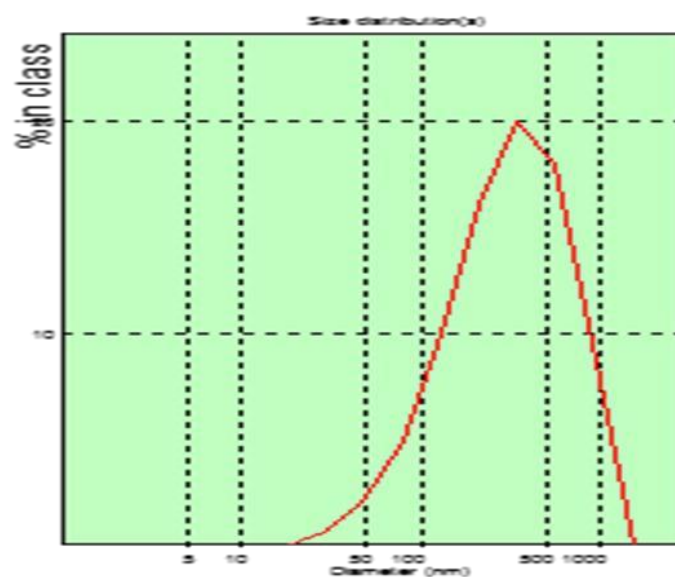
Διάγραμμα 6. Μέτρηση DLS διασποράς διαμέτρου σωματιδίων του **υλικού 3**.



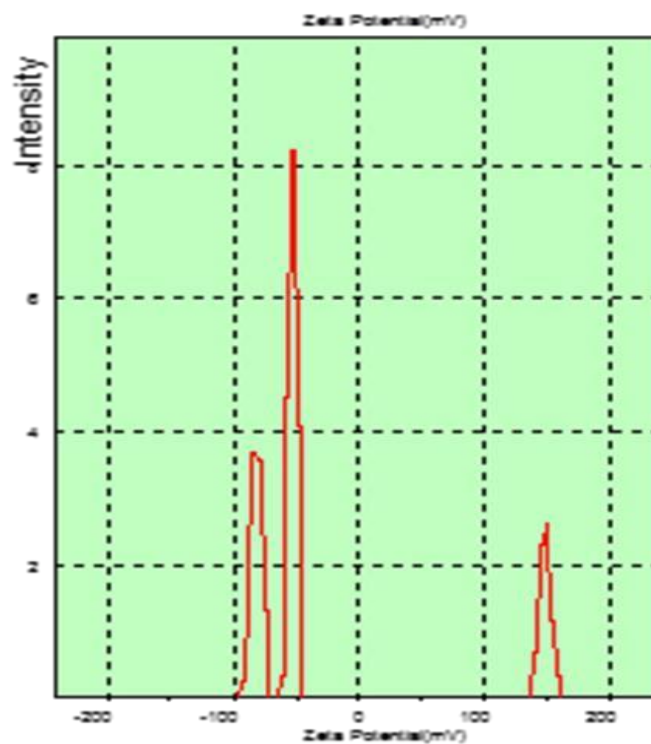
Διάγραμμα 7. Μέτρηση DLS ζ-δυναμικού (Zeta) του υλικού 3.

Από το υλικό 4 προκύπτουν οι εξής μετρήσεις για την κατανομή της διαμέτρου των σωματιδίων, του ζ-δυναμικού (zeta) και της πολυδιασποράς του εναιωρήματος.

Τύπος υλικού MWCNTs	Υλικό 4
Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	266,5
ζ-δυναμικό (mV)	-24,9
Πολυδιασπορά εναιωρήματος	0,855
Πίνακας 4. Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού υλικού 4	



Διάγραμμα 8. Μέτρηση DLS κατανομής της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου (ZAve) του υλικού 4..



Διάγραμμα 9. Μέτρηση ζ-δυναμικού (Zeta) του υλικού 4.

7.3.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και σταθερότητα των συστημάτων LMVs- MWCNTs

Με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω, δημιουργήθηκαν δεκαέξι συστήματα που οδηγήθηκαν για φυσικοχημικό χαρακτηρισμό μέσω του μηχανήματος DLS. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν αφορούσαν στο μέγεθος (μέση υδροδυναμική διάμετρος Z_{Ave}), τον δείκτης πολυδιασποράς (PI) (μετά το πέρας 5 ημερών) και το ζ-δυναμικό (Zeta) των συστημάτων liposomes – MWCNTs.

Σύστημα	LMVs-MWCNTs	SUVs-MWCNTs
T= 0 days	Dh (nm)	Dh (nm)
DPPC (reference)	67891	8366
DPPC: υλικό 2	17522	17938
DPPC:υλικό 3	11355	330
DPPC: υλικό 4	35672	666,5

Πίνακας 5. Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός συστημάτων λιποσωματα (DPPC) -υλικό

X (X=2, 3, 4).

Σύστημα	LMVs-MWCNTs	SUVs-MWCNTs
T= 0 days	Dh (nm)	Dh (nm)
HSPC (reference)	13805	4994
HSPC: υλικό 2	18012	5463
HSPC: υλικό 3	12798	7825
HSPC:υλικό 4	4210	4683.4

Πίνακας 6. Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός συστημάτων λιποσώματα (HSPC): υλικό X (X=2,3,4)

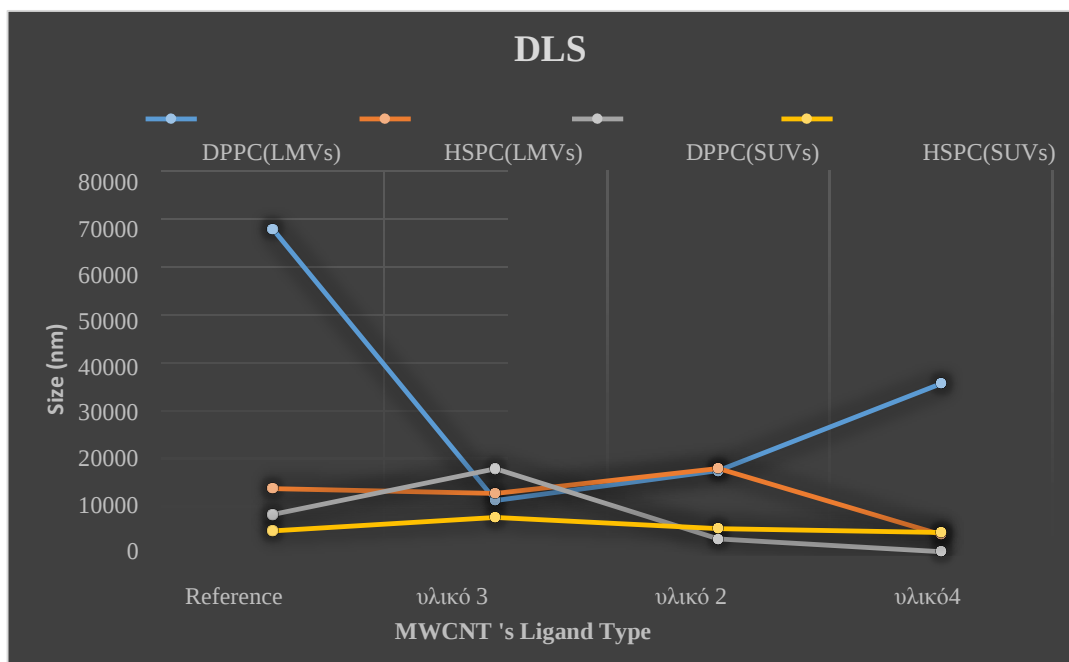
Στην συνέχεια παρατίθεται συγκεντρωτικός πίνακας των αντίστοιχων μεγεθών αλλά και συμπεριλαμβανομένων των μετρήσεων της σταθερότητας των λιποσωματικών εναιωρημάτων.

Σύστημα	Dh (nm)	SD	ζ-potential	SD
T= 5 days				
DPPC	21110.3	4737.3	-1.3	1.3
HSPC	7100.2	529.7	+2.2	0.3
DPPC:υλικό 2	51487.3	2798.2	-0.2	0.8
HSPC: υλικό 2	9590.6	625.6	+3.0	0.3
DPPC: υλικό 3	20800.1	7602.4	-4.6	1.0
HSPC: υλικό 3	18108.0	7707.7	+3.0	1.6
DPPC: υλικό 4	13224.9	292.1	+3.3	0.5
HSPC: υλικό 4	11112.9	3106.9	+3.0	0.8

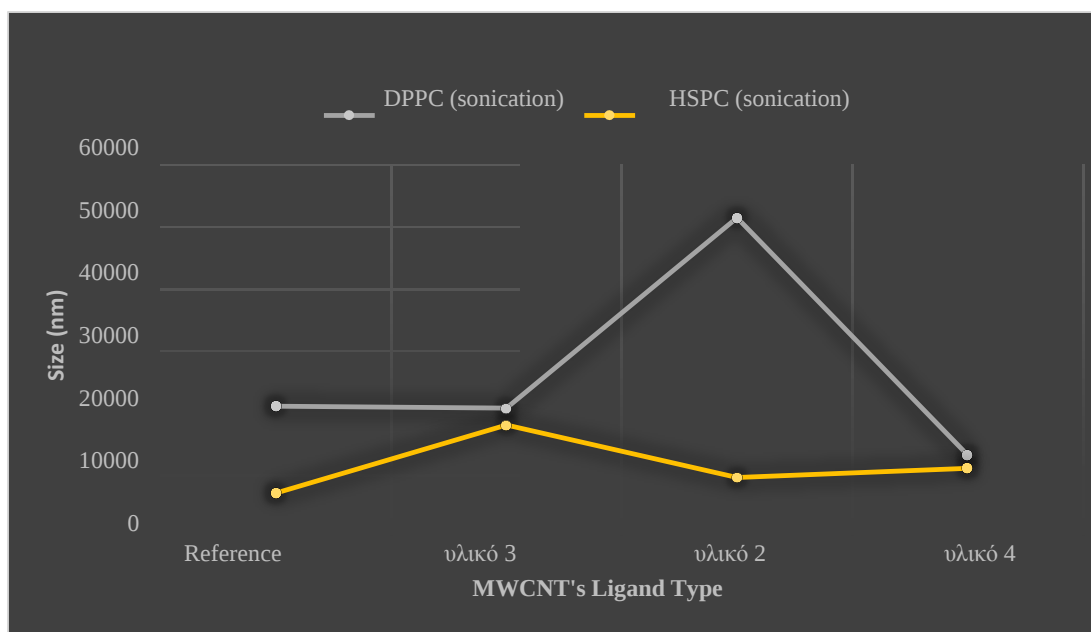
Πίνακας 7. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένης και της σταθερότητας των συστημάτων λιποσωμάτων DPPC-MWCNTs και HSPC MWCNTs για κάθε είδος υλικού (MWCNTs) σε διάστημα 5 ημερών, μετά από το πέρας των 5 ημερών.

Ο δείκτης πολυδιασποράς για τα δείγματα μετά το πέρας 5 ημερών βρέθηκε να έχει τιμή ίση με την μονάδα γεγονός που εκφράζει ευρύ φάσμα κατανομής και καταδεικνύει μη ομοιογενές δείγμα.

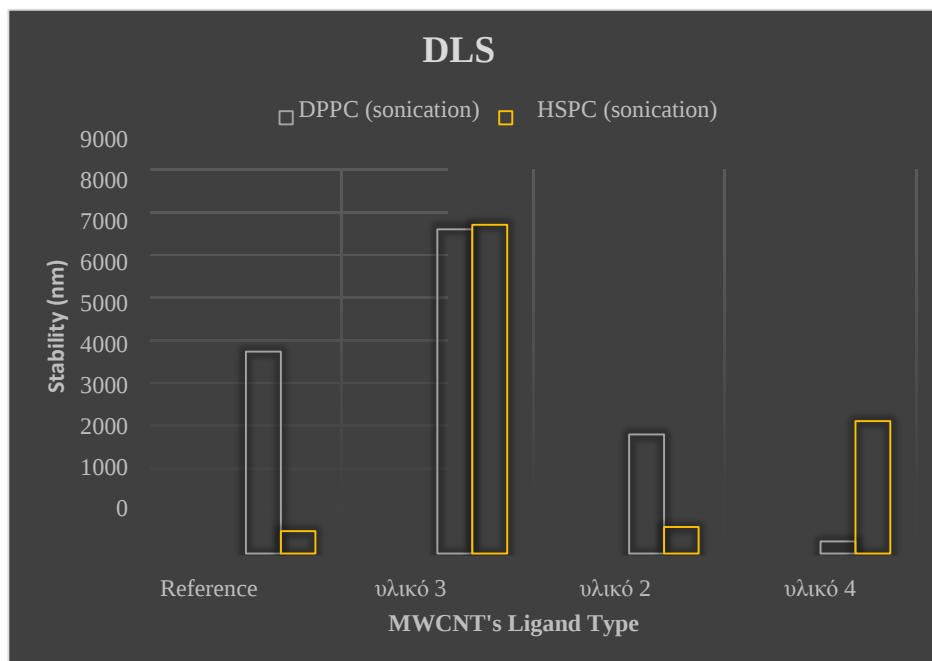
Τα συστήματα λιποσωμάτων – MWCNTs του που παρασκευάστηκαν και των οποίων τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**, ήταν όλα μικρά μονοστοιβαδικά (SUVs). Μετά το πέρας 5 ημερών παρατηρείται αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου των συστημάτων



Διάγραμμα 10. Μέση υδροδυναμική διάμετρος συστημάτων λιποσώματα - MWCNTs συγκεντρωτικά για κάθε κατηγορία υλικού σε χρόνο T=0 days.



Διάγραμμα. 11: Μέση υδροδυναμική διάμετρος συστημάτων λιποσώματα (SUVs)- MWCNTs συγκεντρωτικά για κάθε κατηγορία υλικού σε χρόνο T=5 days.



Διάγραμμα 12. Διάγραμμα σταθερότητας συστημάτων λιποσωμάτων DPPC-MWCNTs και HSPC-MWCNTs για κάθε είδος διαφορετικού υλικού (MWCNTs) σε διάστημα 5 ημερών.

Πρέπει να τονιστεί ότι τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα προέκυψαν από 16 σετ μετρήσεων και διαγραμμάτων DLS. Η εξάρτηση της αλληλεπίδρασης των λιποσωμάτων από τους προσδέτες των MWCNTs απεικονίζεται στο **Διάγραμμα 10**. Παρατηρείται ότι το μικρότερο σε ζ μέγεθος λιποσώματος-MWCNTs σωματιδίου εμφανίζεται με τύπο λιπιδίου DPPC, σε αλληλεπίδραση με MWCNTs-NH₃⁺ (θετικού τόνου MWCNTs).

Από τη μελέτη σταθερότητας προκύπτει ότι τα λιποσώματα DPPC-MWCNTs(-salt) και HSPC-MWCNTs(-salt) εμφανίζουν παρόμοια σταθερότητα ενώ όλα τα υπόλοιπα συστήματα να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Συμπεράσματα – προτάσεις

Στην παρούσα Διπλωματική εργασία παρασκευάσθηκαν επιτυχώς μεικτά συστήματα Λιποσωμάτων-Νανοσωλήνων Άνθρακα (MWCNTs). Χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών τύποι λιπιδίων (DPPC και HSPC) και τρία είδη τροποποιημένων Νανοσωλήνων Άνθρακα (MWCNTs). Μετρήθηκαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συστημάτων και μελετήθηκαν συγκριτικά ως προς τις διαφοροποιήσεις που παρουσιάστηκαν.

Από τα πρώτα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε αντιληπτή η σημασία της τροποποίησης των MWCNTs για τη χρήση τους σε βιολογικά πειράματα. Οι pristine MWCNTs (πριν την τροποποίηση) είναι ένα μη υδατοδιαλυτό υλικό που μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα δημιουργεί ίζημα σε οποιαδήποτε αναλογία διαλύματος. Αυτός είναι και ένας σημαντικός δείκτης τοξικότητας.

Μετά την οξείδωση των MWCNTs το αρχικό τους μήκος μειώθηκε, η διαλυτότητά τους αυξήθηκε σε μεγάλο βαθμό και η τοξικότητάς τους μειώθηκε. Με περαιτέρω τροποποίηση οι MWCNTs απέκτησαν θετικό και αρνητικό φορτίο.

Κατά τη δημιουργία των μεικτών αυτών συστημάτων τα λιποσώματα προσδένονται πάνω στους MWCNTs μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Η αναλογία λιποσωμάτων : MWCNTs επηρεάζει τον βαθμό πρόσδεσης. Η βέλτιστη αναλογία που έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά είναι 1:1 και αυτή χρησιμοποιήθηκε και στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία.

Όπως περιγράφεται εκτενώς στην πειραματική διαδικασία η σύνθεση λιποσωμάτων έγινε με υδατικά διαλύματα MWCNTs τριών διαφορετικών ειδών (θετικού, αρνητικού φορτίου). Μέσω της σύνθεσης αυτής εξασφαλίζεται και η αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Συγκρίνοντας την πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής με την αντίστοιχη βιβλιογραφική έρευνα αλληλεπίδρασης MWCNTs με λιποσώματα προκύπτει ως συμπέρασμα ότι τα λιποσώματα προσδένονται στους MWCNTs. Για να ληφθεί

ποσοτικό αποτέλεσμα της πρόσδεσης ή για να εξετασθεί ενδεχόμενο εναλλακτικής αλληλεπίδρασης π.χ. εγκλεισμός των MWCNTs στα λιποσώματα προτείνεται χαρακτηρισμός βιολογικών δειγμάτων με cryo-TEM ή AFM με ειδικές ακίδες για βιολογικά δείγματα.

Οι μεταβολές του μεγέθους των συστημάτων (MWCNTs-liposomes) διασποράς που δημιουργούνται κατά τη σύνθεση δείχνουν ότι:

- ✓ Η αλληλεπίδραση-πρόσδεση επιτεύχθηκε
- ✓ Το είδος της τροποποίησης και κατά συνέπεια το είδος του φορτίου των υλικών επηρεάζουν την αλληλεπίδραση αυτή
- ✓ Με περαιτέρω χαρακτηρισμό των βιολογικών συστημάτων αυτών μπορεί η αλληλεπίδραση να ποσοτικοποιηθεί
- ✓ Το φορτίο των MWCNTs δίνει την δυνατότητα τα συστήματα αυτά να κατευθυνθούν στοχευμένα.

Βιβλιογραφία

- [1] <http://www.eolss.net/sample-chapters/c05/e6-152-01.pdf> (προσπελάστηκε το Σεπτέμβριο 2015)
- [2] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Control. Rel.* 65 (2000) 271–284.
- [3] Lifeng Dong, Michael M. Craig, Dongwoo Khang, and Chunying Chen, *Applications of Nanomaterials in Biology and Medicine*
- [4] Σοφία Γ. Αντιμησιάρη “Μορφές χορήγησης φαρμάκων, εισαγωγή στη φαρμακευτική νανοτεχνολογία”, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πάτρα, σελ. 117, 122-127 (2010).
- [5] <http://www.echa.europa.eu> (προσπελάστηκε το Σεπτέμβριο 2015)
- [6] <https://en.wikipedia.org/wiki/Nanomaterials>
- [7] Σημειώσεις μαθήματος “Οργανικά Νανοϋλικά”, κ. Κυρίτσης, Ε.Μ.Π. 2015
- [8] *Carbon Nanotubes for Biomedical Applications* edited by Rüdiger Klingeler, Robert B. Sim
- [9] Prabhakar R. Bandaru* *Electrical Properties and Applications of Carbon Nanotube Structures*
- [10] Atsushi Nagata, Hideki Sato, Yusuke Matsui, Tetsuya Kaneko, Yuji Fujiwara. *Magnetic properties of carbon nanotubes filled with ferromagnetic metals*
- [11] Mahmoudi, M. Laurent, S. Shokrgozar, M. A. Hosseinkhani, M. ACS Nano 2011, 5, 7263
- [12] Saito, N. Usui, Y. Aoki, K. Narita, N. Shimizu, M. Ogiwara, N. Nakamura, K. Ishigaki, N. Kato, H. Taruta, S. Endo, M. *Curr. Med. Chem.* 2008, 15, 523
- [13] *Safe Clinical Use of Carbon Nanotubes as Innovative Biomaterials*, Naoto Saito, Hisao Haniu, Yuki Usui *et. Al*
- [14] Pagona, G.; Tagmatarchis, N. *Curr. Med. Chem.* 2006, 13, 1789
- [15] Yang, K. Liu, Z. *Curr. Drug Metab.* 2012, 13, 1057.
- [16] Liu, Z. Davis, Cai, W. He, L. Chen, X. Dai, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 105, 1410

- [17] Wei, Q. Zhan, L. Juanjuan, B. Jing, W. Jianjun, W. Taoli, S. Yi'an, G. Wangsuo, W. Nanoscale Res. Lett. 2012, 7, 473
- [18] Oberdorster, G. Sharp, Z. Atudorei, V. Elder, A. Gelein, R. Lunts, A. Kreyling, W. Cox, C. J. Toxicol. Environ. Health, Part A 2002, 65, 1531
- [19] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nat Rev Drug Discov 2005; 4 : 145 -59. 4.
- [20] Κωνσταντίνος Ν.Δεμέτζος, “ΦαρμακευτικήΝανοτεχνολογία”, Εκδόσεις Παρισίανου ΑΕ, Μάϊος 2014.
- [21] Faina Karchemski, Daniel Zucker, Yechezkel Barenholz, Oren Regev. Carbon nanotubes-liposomes conjugate as a platform for drug delivery into cells
- [22]]http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Spectrometer/ATR-FTIR
- [23] Wei, Q. Zhan, L. Juanjuan, B. Jing, W. Jianjun, W. Taoli, S. Yi'an, G. Wangsuo, W. Nanoscale Res. Lett. 2012, 7, 473
- [24]http://www.chem.uoa.gr/courses/Spectrochemical/KEF.9A_FASMATOFWTOMETRIA_IR.pdf
- [25] “DLS technical note”, Malvern Instruments Ltd
- [26] R.H. Muller, Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis, Bd. 37, WissenschaftlicheVerlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, 1996.