ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΑΝΟΡΓΑΝΕΣ ΜΗΤΡΕΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δ. ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

ΣΑΡΟΥΚΙΑΔΗΣ ΜΙΧΑΛΗΣ ΗΡΆΚΛΕΙΟ 2018

UNIVERSITY OF CRETE DEPARTMENT OF CHEMISTRY



BACHELOR THESIS

DRUG DELIVERY SYSTEMS BASED ON INORGANIC MATRICES

SUPERVISOR: D. GHANOTAKIS

SAROUKIADIS MICHALIS HERAKLION 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να είχε πραγματοποιηθεί χωρίς την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση του καθηγητή Γανωτάκη Δημητρίου, ο οποίος με δέχθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και μου έδωσε την ευκαιρία να εφαρμόσω και να αναπτύξω τις ακαδημαϊκές μου δεξιότητες.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Σφενδουράκη Γεώργιο, ο οποίος είχε ενεργό ρόλο στην εκπόνηση αυτής της εργασίας και παρείχε αδιάκοπα καθοδήγηση και υποστήριξη. Βεβαίως δεν θα ήθελα να παραλείψω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου τα οποία συνέβαλαν στο να υπάρχει επαγγελματικό αλλά παράλληλα και ζεστό περιβάλλον.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα εργαστήριο πολυμερών και Laser για τις μετρήσεις περίθλασης ακτίνων Χ καθώς και το εργαστήριο αναλυτικής για τις μετρήσεις φάσματος υπερύθρου.

ΠΕΡΊΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και πιο συχνά χρήση βιοανόργανων νανοϋλίκών για την μεταφορά φαρμάκων σε όργανα και ιστούς στόχους, λόγω της ανάπτυξης νέων αναλυτικών τεχνικών αλλά και της αυξανόμενης κατανόησης τους. Παρόλα αυτά, δεν έχει βρεθεί ακόμα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων το οποίο να μπορεί να μεταφέρει βιομόρια όπως DNA ή πεπτίδια, να είναι αρκετά επιλεκτικό, οικονομικό και σταθερό. Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται πολλαπλές τεχνικές σύνθεσης διπλά στοιβαγμένων υδροξειδίων (LDH), καθώς και παράγωγων αυτών, τα οποία είναι κατάλληλοι φορείς φαρμάκων και πλεονεκτούν λόγω της ευκολίας και ποικιλίας τροποποιήσεων που μπορούν να δεχθούν ως προς τους συμβατικούς φορείς. Οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των LDH ήταν αυτές της συγκαταβύθισης και της ανιοντοανταλλαγής, με την πρώτη να δίνει ποιοτικά καλύτερο αποτέλεσμα και την δεύτερη να είναι οικονομικότερη. Η ταυτοποίηση των νανοϋβριδίων αυτών έγινε μέσω περίθλασης ακτίνων X (XRD) αλλά και φασματομετρίας απορρόφησης υπερύθρου. Επιπροσθέτως παρουσιάζεται μια νέα τεχνική σύνθεσης βιοσυμβατών αποστοιβαγμένων LDH (dLDH), η οποία βασίζεται στην χρήση προπυλενικής γλυκόλης. Μέσω αυτής της μεθόδου ήταν δυνατή η παγίδευση γλουταμίνης αλλά και DNA στην επιφάνεια αποστοιβαγμένου LDH.

Περιγράφεται επίσης η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νανοϋβριδικής μήτρας LDH-Αλγινικού, το οποίο αναμένεται να έχει ενισχυμένη σταθερότητα συγκριτικά με κρυσταλλικό ή αποστοιβαγμένο LDH. Πραγματοποιήθηκε μορφολογική μελέτη της μήτρας χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο με σκοπό την βελτιστοποίηση της συνθετικής διαδικασίας. Επιπλέον διεξήχθη μελέτη απελευθέρωσης σε διάλυμα κατάλληλο για προσομοίωση του ορού πλάσματος, η οποία επίσης πραγματοποιήθηκε και για το νανοϋβριδίου LDH-Νιτροφουραντοΐνη.

Αναμένεται πως αυτές οι νέες προσεγγίσεις θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βάση για την σύνθεση σταθερότερων, ασφαλέστερων και πιο επιλεκτικών φορέων φαρμάκων, μειώνοντας παράλληλα σημαντικά το κόστος σύνθεσης και αποθήκευσης

Λέξεις κλειδιά

Στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια (LDH), DNA, Μεταφορά φαρμάκων, Χολικό νάτριο, Νανοϋβρίδια, Νιτροφουραντοΐνη, Αμινοξέα, Αλγινικό νάτριο, Γονιδιακή Θεραπεία, Γλουταμίνη

Abstract

In recent years, bio-inorganic nanomaterials have been increasingly used to deliver drugs to target organs and tissues, due to the development of new analytical techniques and their growing understanding. However, we have yet to find a drug delivery system that can carry biomolecules such as DNA or peptides, while also being selective, economical and stable. This work presents the synthesis of Layered Double Hydroxides, and their derivatives, which are the potential basis for a new class of drug delivery systems. In comparison to most conventional drug delivery systems, LDHs feature the advantages of less complex synthetic routes, as well as a variety of possible structural modifications that can alter or enhance their activity. The main synthetic routes used for the synthesis of LDHs were that of co-precipitation and anion exchange. Co-precipitation typically yields a product of better quality, while anion exchange is more suitable for small scale experiments. The characterization of these nanohybrids was carried out using Xray diffractometers (XRD) and Infrared absorption spectrometry. In addition, this work presents a new technique for the synthesis of biocompatible delaminated LDH (dLDH), based on the use of propylene glycol. Through this method it was possible to trap glutamine and DNA on the surface of dLDH.

Additionally, we describe the synthesis and characterization of a LDH-alginate nanohydrid matrix, which is expected to have enhanced stability as compared to crystalline or dLDH. In order to optimize the synthetic process of the matrix we conducted morphological studies using optical microscopy. In addition, drug release assays were conducted simulated plasma serum. The process which was also performed for the LDH-Nitrofurantoin nanohybrid.

It is expected that these new approaches can be used as a basis for the synthesis of more stable, safer and more selective drug carriers, while greatly reducing the cost of synthesis and increasing shelf life.

Keywords

Layered double hydroxides (LDH), DNA, Drug Delivery, Sodium Cholate, Nanohybrids, Nitrofurantoin, Aminoacids, Sodium Alginate, Gene therapy, Glutamine

ΠΕΡΙΕΧΌΜΕΝΑ

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Δομή	1
1.3 Σύνθεση	2
1.4 Εφαρμογές	4
1.4.1 Κεραμικά υλικά	5
1.4.2 Περιβάλλον	5
1.4.3 Συστηματά μεταφοράς φαρμακών	6
1.4.4 Βιοαισθητήρες 1.4.5 Απο στοιθαιαμένει Η DLL	/
1.4.5 ΑΠΟΟΙΟΙΡαγμένα LDΠ 1.5 Μαχανισμός κυπασικό πρόσλαιμα χανοϋβοιδίων LDH	8
1.6 Χαρακτροισμός	9
1.0 Λαρακτηρισμος 1.7 Νανούθοι Σικές μέτρος Ι. D. Ι. Αλινινικού Ασθοστίου	10
1.7 Νανουρριοικές μητρές LDH-Αλγινικού Ασρεότιου	11
2. ΤΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 2.1 Σύνθεση στοιβανιμένων διπλών μδοοξειδίων	13
$2.2 \Sigma_{\rm inv}$ As an use of the particular to possible v	1/
	14
$2.2.1$ 2000E0EIG μ E aviovioavia/havi	14
	14
2.3 Συνθεσεις αποστοιβαγμενων υδροξειδιών και υβριδιών	15
2.3.1 Αποστοίβαξη LDH	15
2.4 Προσθήκη LDH υβριδίων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου	16
2.5 Χαρακτηρισμός	17
2.6 Έλεγχος ρυθμού απελευθέρωσης ουσίας από LDH	17
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	18
3.1 Χαρακτηρισμός των LDH	18
3.1.1 Περίθλαση ακτίνων Χ (XRD)	18
3.1.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου	26
3.2 Έλεγχος ρυθμού απελευθέρωσης ουσίας από LDH	32
3.3 Έλεγχος απελευθέρωσης LDH υβριδίων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου	33
3.4 Μορφολογική μελέτη LDH υβριδίων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου	34
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	36
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	37

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Η χορήγηση θεραπευτικών μορίων σε κύτταρα, με στόχο την μεταφορά τους δια μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, εντός του κυτταροπλάσματος, είναι αντικείμενο έντονης μελέτης. Η μη στοχευμένη χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών είναι συνήθως μη αποδοτική, λόγω χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας, καταστροφής των μορίων από ένζυμα ή κακής διάχυσης της ουσίας στον οργανισμό.

Πρόσφατες ανακαλύψεις στον τομέα της νανοτεχνολογίας με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα αποτελούν τα νανοσωματίδια χρυσού, οι μικροσωλήνες άνθρακα, τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια καθώς και τα νανοσωματίδια οξειδίων μετάλλων. Ωστόσο για την χρήση των περισσότερων ανόργανων νανοσωματιδίων απαιτείται τροποποίηση τους ώστε να έχουν τις επιθυμητές ιδιότητες ώστε να είναι δυνατή η ασφαλής και αποτελεσματική χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών.

Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να γίνεται όλο και πιο προφανές ότι τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια, αποτελούν εξαίρεση μεταξύ των ανόργανων νανοϋλικών. Η ιδιότητα τους να παγιδεύουν εύκολα ουσίες στο εσωτερικών των στοιβάδων τους, μέσω ανιοντοανταλλαγής, χωρίς να επηρεάζεται ιδιαιτέρως η ικανότητα τους να διασχίζουν τις κυτταρικές μεμβράνες, μαζί με την εξαιρετικά χαμηλή τοξικότητα τους, τα καθιστά ιδανικούς μήτρες μεταφοράς φαρμάκων σε σχέση με άλλα νανοσωματίδια.

1.2 **Δομ**ή

Τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια είναι μια οικογένεια ανόργανων ανιονικών υλικών. Στην φύση μπορούν να βρεθούν υπό την μορφή του υδροταλκίτη [Mg₆Al₂(OH)₁₆CO₃·4H₂O]. Τα υλικά αυτά μπορούν επίσης να περιγράφουν από τον τύπο [M^{II}_{1-x} M^{III}_x(OH)₂]^{x+}(A^{m-})_{x/m}·nH2O (x = 0.2 – 0.4; n = 0.5 – 1), όπου M^{II} δισθενές μεταλλικό κατιόν, M^{III} τρισθενές μεταλλικό κατιόν και A^{m-} αντιστοίχως συμβολίζει το εκάστοτε παγιδευμένο ανιόν. Δομικώς, τα LDH είναι συγγενή του μπρουσίτη, Mg(OH)₂. Κάθε στοιβάδα του μπρουσίτη αποτελείται από ιόντα Mg²⁺ τα οποία είναι οκταεδρικώς συναρμοσμένα ιόντα υδροξυλίων, με το κάθε οκτάεδρο να μοιράζεται κοινές πλευρές με τα γειτονικά του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό δισδιάστατων στοιβάδων. Η μερική αντικατάσταση ιόντων Mg²⁺ από ιόντα Al³⁺ προσδίδει θετικό φορτίο στις στοιβάδες, το οποίο εξισορροπείται από τα ανιόντα που βρίσκονται στον χώρο μεταξύ των στοιβάδων. Επομένως η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των στοιβάδων του LDH και των ανιόντων, δίνουν στα LDH την χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή τους, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.¹

Τα LDH είναι δυνατόν να έχουν εξαγωνική ή ρομβοεδρική μορφή, ωστόσο τα LDH συνθετικής προέλευσης είναι συνήθως ρομβοεδρικά. Υπάρχουν πολλαπλοί συνδυασμοί δισθενούς/τρισθενούς μετάλλου μέσω των οποίων μπορεί να σχηματιστεί LDH, με μοναδικό προαπαιτούμενο να είναι το εύρος στο οποίο περιορίζονται οι ατομικές ακτίνες των μετάλλων οι οποίες δεν πρέπει να διαφέρουν κατά πολύ αυτές του Mg²⁺ και του Al³⁺.²



Σχήμα 1: Τρισδιάστατη δομή των LDH

Όσο αφορά το ανιόν προς παγίδευση, ένας εκ των περιορισμών είναι η επαρκής πυκνότητα φορτίου. Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει μια σειρά προτίμησης στα ιόντα προς παγίδευση, όπως δείχνει και η βιβλιογραφία, η οποία είναι η παρακάτω: $CO_3^{2^-} > SO_4^{2^-} > OH^- > F^- > CI^- > Br^- > NO_3^- > I^- ³ Επιπλέον, είναι δυνατή η αντικατάσταση των παγιδευμένων ιόντων από άλλα τα οποία βρίσκονται πιο υψηλά στην σειρά προτίμησης. Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την κατάταξη ενός ανιόντος στην παραπάνω σειρά είναι η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνο και η πυκνότητα του φορτίου. Βάσει της παραπάνω ιδιότητας, είναι εξαιρετικά εύκολο να αντικατασταθεί το εσωτερικό ιόν από ένα άλλο το οποίο βρίσκεται πιο ψηλά στην κατάταξη. Επομένως, σε εργαστηριακό περιβάλλον τα πιο κοινά LDH που χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη είναι αυτά τα οποία έχουν παγιδευμένα νιτρικά ιόντα.$

1.3 Σύνθεση

Τα LDH μπορούν εύκολα να παραχθούν συνθετικά. Βασικά στοιχεία της κύριας μεθόδου σύνθεσης αποτελούν η πυρηνωποίηση και η αύξηση των στοιβάδων μεταλλικών υδροξειδίων μέσω αντίδρασης διαλυμάτων που περιέχουν τα άλατα των μεταλλικών

ιόντων, μαζί με διάλυμα ισχυρής βάσης, παρουσία του επιθυμητού ανιόντος προς παγίδευση. Αυτή η μέθοδος, ονομάζεται μέθοδος συγκαταβύθισης.⁴

Τα βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν είναι κατάλληλη σε περίπτωση που το ανιόν προς παγίδευση έχει χαμηλότερη συγγένεια σε σχέση με τα ανιόντα των μεταλλικών αλάτων. Όπως προαναφέρθηκε, για αυτό τον λόγο γίνεται χρήση κυρίως νιτρικών αλάτων. Για την βελτιστοποίηση της απόδοσης αυτής της μεθόδου έχουν χρησιμοποιηθεί παραλλαγές από τις οποίες ίσως η πιο αποδοτική είναι η ογκομετρική προσθήκη υπό σταθερό pH. ⁵ Το pH μπορεί να διατηρηθεί σχετικά εύκολα σταθερό, δεδομένου ότι το διάλυμα μεταλλικών αλάτων είναι στην ουσία ρυθμιστικό διάλυμα.

Ένα από τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι επειδή λαμβάνει χώρα σε χαμηλότερο pH, λόγω του ρυθμιστικού διαλύματος, μειώνονται η πιθανότητες παγίδευσης μην επιθυμητών ανιόντων. Για τις περισσότερες εφαρμογές, μη επιθυμητά ανιόντα είναι τα OH⁻, τα οποία προέρχονται από περίσσεια βάσης, και τα CO₃²⁻, τα οποία προέρχονται από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Η παγίδευση ανθρακικών ιόντων είναι ιδιαίτερα προβληματική, καθώς τα ανθρακικά ιόντα είναι πολύ δύσκολο να απομακρυνθούν από το κρυσταλλικό πλέγμα του LDH λόγω της υψηλής τους συγγένειας. Η απομάκρυνση τους, αποτελεί ενεργό αντικείμενο μελέτης. ⁶

Μια ακόμα κοινή μέθοδος σύνθεσης LDH, είναι αυτή της ανιοντοανταλλαγής. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται μια από τις πιο βασικές ιδιότητες των LDH, δηλαδή την αντικατάσταση των ήδη παγιδευμένων ανιόντων, με άλλα μεγαλύτερης συγγένειας. Ως προς την εκτέλεση της, χρειάζεται μονάχα ανάδευση πρώτης ύλης LDH μαζί με την ουσία η οποία πρόκειται να αντικαταστήσει το προηγουμένως παγιδευμένο ανιόν. Τροποποιήσεις αυτής της μεθόδου έκαναν δυνατή την παγίδευση ανιόντων τα οποία κανονικά παρεμποδίζονται στερεοχημικά λόγω του όγκου τους.⁷

Τέλος, γίνεται χρήση και άλλων μεθόδων όπως αυτή της σύνθεσης από μεταλλικά οξείδιά⁸, υδροθερμικά⁹, ή με χρήση μικροκυμάτων¹⁰. Παρότι οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν υψηλότερη δυσκολία, ή έχουν υψηλότερο κόστος, παράγουν προϊόντα τα οποία είναι πιο ομοιόμορφα και με υψηλότερη κρυσταλλικότητα.

1.4 Εφαρμογές

Δομικές διακυμάνσεις στις στοιβάδες των LDH καθώς και στα ανιόντα εντός των στομάτων οδηγούν σε ποικίλους τρόπους χρήσης και εφαρμογής των υλικών αυτών. Επιγραμματικά, μερικές αυτές τις εφαρμογές είναι ο καθαρισμός υδάτων¹¹, χρήση σαν επιβραδυντικά για πυρκαγιές τα οποία είναι φιλικά προς το περιβάλλον^{12,13}, σταθεροποίηση πολυμερών υλικών¹³, πρώτες ύλες στην φαρμακοβιομηχανία αλλά και σαν ενεργές ουσίες για μερικά αντιόξινα φάρμακα¹⁴ και στην αγροτική παραγωγή¹⁵. Τέλος έχουν δει χρήση και σε διάφορους τομείς της κατάλυσης¹⁶ με εξέχοντα ρόλο στην φωτο/ηλεκτρο-κατάλυση.



Σχήμα 2: Εφαρμογές των LDH

1.4.1 Κεραμικά Υλικά

Στην βιομηχανία κεραμικών υλικών υπάρχει μεγάλό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων LDH τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χρώματα σε προϊόντα εμπορικού χαρακτήρα όπως μελάνια για χρήση σε εκτυπωτές τύπου ink-jet. Τέτοια προϊόντα μπορούν να παρασκευαστούν με βασικό συστατικό LDH μετάλλων μετάπτωσης. Το τελικό χρώμα εξαρτάται κυρίως από το χρώμα των αλάτων των μετάλλων μετάπτωσης που χρησιμοποιούνται σαν πρώτη ύλη. Πιο συγκεκριμένα LDH τύπου Ni-Al μπορούν να δώσουν έντονα πράσινα χρώματα ενώ με ειδική κατεργασία είναι δυνατόν έχουν χρώματα από μπλε έως και κυανό.¹⁷ Επιπλέον LDH τύπου Co-Al είναι κατάλληλα για ροζ και μπλε χρώματα.¹⁸ Για τα λευκά μελάνια, γίνεται ήδη χρήση LDH Zn-Al. Τα πλεονεκτήματα των LDH στην βιομηχανία των κεραμικών χρωστικών είναι εμφανή καθώς έχουν χαμηλό κόστος και μεγάλη διάρκεια ζωής.

1.4.2 Περιβάλλον

Η αυξημένη χρήση μηχανών εσωτερικής καύσης έχει σαν αποτέλεσμα την μόλυνση της ατμόσφαιρας με τοξικούς για τον άνθρωπο ρύπους. Διάφοροι τύποι LDH έχουν χρησιμοποιηθεί στην προσρόφηση αέριων ρύπων όπως τα οξείδια του αζώτου και τα σωματίδια που σχηματίζονται από την ατελή καύση υδρογονανθράκων. Στο τομέα της απομάκρυνσης αέριων ρύπων έχει βρεθεί ότι τα LDH παράγουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.^{19,20}

Επιπροσθέτως, η χρήση των LDH ήταν επιτυχής και στην απομάκρυνση τοξικών ρύπων από απόβλητα ύδατα. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά για ρύπους όπως τα οξείδια του σεληνίου, του χρωμίου, του αρσενικού καθώς και του ουρανίου.^{21,22} Για τον καθαρισμό υδατικών αποβλήτων δεν περιορίζονται σε ανόργανους ρύπους, καθώς έχει βρεθεί ότι μπορούν δεσμεύσουν ικανοποιητικά και οργανικά μόρια όπως φαινόλες, αμίνες και οργανοφωσφορικές ενώσεις. Οι οργανοφωσφορικές αποτελούν ιδιαίτερο πρόβλημα λόγω της ευρείας τους χρήση σαν ζιζανιοκτόνα, τα οποία μπορούν να μολύνουν τον υδροφόρο ορίζοντα και είναι ιδιαίτερα τοξικά για τον άνθρωπο.¹⁵

Τέλος, επιτυχής ήταν και η χρήση νανοϋβριδίου LDH-λυσοζύμης στην απολύμανση νερού. Μέχρι τώρα η απολύμανση νερού γίνεται χρησιμοποιώντας αλογόνα ή όζον για την καταστροφή των μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά έχει βρεθεί ότι αυτοί οι απολυμαντικοί παράγοντες μπορούν να δημιουργήσουν καρκινογόνα παραπροϊόντα παρουσία οργανικών ουσιών.²³ Η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο το οποίο μπορεί να καταστρέψει το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηριδίων. Η αντιβακτηριδιακή δράση του νανοϋβριδίου LDH-λυσοζύμης βρέθηκε να είναι πολλές φορές υψηλότερη σε σχέση με

την λυσοζύμη ελεύθερης μορφής²⁴ και θεωρείται πράσινος αντιβακτηριδιακός παράγοντας καθώς δεν σχηματίζει βλαβερά παραπροϊόντα.

1.4.3 Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να κάνουν την εμφάνιση τους συνθετικά νανοϋβρίδια βασισμένα στα LDH, τα οποία είναι κατάλληλα για χρήση σαν συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Βασικά τους πλεονεκτήματα είναι η χαμηλή τους τοξικότητα και ο υψηλός βαθμός βιοσυμβατότητας με τον ανθρώπινο οργανισμό.²⁵ Επιπλέον, είναι σε θέση να μειώσουν την τοξικότητα των ουσιών που μεταφέρουν, κάνοντας τα ιδανικές μήτρες μεταφοράς για αντικαρκινικά φάρμακα.²⁶ Έως τώρα έχει μελετηθεί πληθώρα εφαρμογών τους ως συστήματα μεταφορά. Πιο συγκεκριμένα έχουν μελετηθεί ως μήτρες των παρακάτω κατηγοριών φαρμακευτικών ουσιών: αντικαρκινικά φάρμακα, αντιβιοτικά, αμινοξέα και πεπτίδια, αντιδιαβητικά αλλά και φάρμακα για την θεραπεία καρδιαγγειακών νοσημάτων.²⁷

Μια ακόμα ενδιαφέρουσα ιδιότητα είναι η βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας. Καταλλήλως σχεδιασμένα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων βασισμένα στα LDH είναι σε θέση να φτάσουν ακόμα και στον εγκέφαλο, ένα εγχείρημα το οποία θεωρείται ιδιαίτερα δύσκολο λόγω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι το νανοσωματίδιο να έχει μέγεθος μικρότερο των 250 nm. ²⁸ Μια πιθανή μελλοντική εφαρμογή είναι η παρασκευή του νανοϋβριδικού υλικού LDH-ποδοφυλλοτοξίνης. Η ποδοφυλλοτοξίνη είναι μια ουσία με αντικαρκινική δράση η οποία όπως έχει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και διαλυτότητα σε υδατικά συστήματα. Παρόλα αυτά, μετά από παγίδευση της σε νανοσωματίδια LDH, διαπιστώθηκε αύξηση της δραστικότητας της εναντίον καρκινικών κυττάρων.²⁹ Το θετικό αυτό αποτέλεσμα αποδόθηκε στην βελτιωμένη ικανότητα διείσδυσης στο κύτταρο καθώς και στην σταθεροποίηση της δραστικής ουσίας από την μήτρα.

Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων που βασίζονται στα LDH έχουν την ιδιότητα να απελευθερώνουν τις ενεργές ουσίες που είναι παγιδευμένες εντός τους με ελεγχόμενο τρόπο σε συγκεκριμένο εύρος τιμών pH. Η απελευθέρωση ακολουθεί δύο φάσεις. Αρχικά, απελευθερώνεται γρήγορα μεγάλο μέρος της παγιδευμένης ουσίας, ενώ στην συνέχεια ακολουθεί μια πιο αργή φάση η οποία μπορεί να κρατήσει ακόμα και μέρες.³⁰ Η ικανότητα αυτών των ανόργανων νανοϋλικών να απελευθερώνουν ουσίες σε συγκεκριμένους στόχους, με τον επιθυμητό τρόπο, εμποδίζοντας παράλληλα την αλλοίωση τους, μειώνοντας επιπλέον την όποια τοξικότητα και κάνοντας της δοσολόγηση πιο αποτελεσματική, τα καθιστούν ασημένιες σφαίρες για την καταπολέμηση πληθώρας παθήσεων.³¹ Το ελεγχόμενο μέγεθος των LDH καθώς και η ικανότητα τους να διασχίζουν με ευκολία τις κυτταρικές μεμβράνες παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην μείωση της τοξικότητας αλλά και στην βελτίωση της αντικαρκινικής δράσης. Σε pH μικρότερο του 7.4, τα LDH διαλύονται με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των μεταλλικών δομικών τους στοιχείων, καθώς και της παγιδευμένης ουσίας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ρύθμιση του pH εντός του κυττάρου. Επομένως, γίνεται αποφυγή της τοξικότητας λόγω όξινων συνθηκών. ³²

Η λεβοντόπα, ένα φάρμακο το οποίο χρησιμοποιείται για την θεραπεία της νόσου του Parkinson, σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνατόν να προκαλέσει σοβαρές παρενέργειες. Επιπλέον, ο μικρός χρόνος ημιζωής της κάνει την δοσολόγηση της ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς πρέπει να γίνεται πολλαπλές φορές ημερησίως. Νανοσωματίδια LDH (Zn-Al) τα οποία περιείχαν λεβοντόπα βρέθηκε ότι είχαν μειωμένη τοξικότητα σε σχέση με την καθαρή ουσία, αλλά επίσης κάνουν την δοσολόγηση ευκολότερη καθώς η απελευθέρωση λεβοντόπας από τα σωματίδια είχα διάρκεια αρκετών ημερών.³³

Τέλος, η κεφαζολίνη, ένα αντιβιοτικό το οποίο είναι δραστικό ενάντια σε grampositive αλλά και gram-negative βακτηρίδια, βρέθηκε να έχει αυξημένη αντιβακτηριδιακή δράση μετά από παγίδευση σε μήτρα LDH. Η βελτίωση αυτή αποδόθηκε στην αύξηση της χημικής σταθερότητας της δραστικής ουσίας αλλά και στον ελεγχόμενο τρόπο απελευθέρωσης της.³⁴

1.4.4 Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες είναι μια ανερχόμενη τεχνολογία με εφαρμογές σε κλάδους όπως η διαγνωστική, η επιστήμες τροφίμων καθώς στην περιβαλλοντολογία. Οι αισθητήρες είναι συσκευές που μπορούν να ανιχνεύσουν αλλαγές στον περιβάλλον τους και να μετατρέψουν αυτό το σήμα σε αναλυτικώς χρήσιμα δεδομένα. Γενικώς, αποτελούνται από δύο βασικά στοιχεία. Το πρώτο εξ αυτών είναι το αισθητήριο όργανο, το οποίο ουσιαστικά ανιχνεύει την αλλαγή. Το δεύτερο είναι ο μετατροπέας, του οποίου λειτουργία είναι να μετατρέπει τον εντοπισμό του συμβάντος σε σήμα.

Στους βιοαισθητήρες, ο μετατροπέας συναρμόζεται με το βιολογικό υλικό. Η φύση των βιολογικών υλικών που μπορούν να συναρμοστούν με τον μετατροπέα ποικίλει. Υπάρχει δυνατότητα σύνδεσης με ένζυμα, πεπτίδικα, αντισώματα, υποδοχείς ή και ολιγονουκλεοτίδια.³⁵ Η υψηλή σταθερότητα των LDH, καθώς και η ικανότητα τους να προστατεύουν μόρια που έχουν παγιδευτεί εσωτερικά αυτών, τα καθιστά ιδανικά δομικά για χρήση σε βιοαισθητήρες. Ένα παράδειγμα βιοαισθητήρα που κάνει χρήση LDH είναι αυτός που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση της συγκέντρωσης ουρίας. Πιο συγκεκριμένα, μετά από παγίδευση ουρεάσης μεταξύ των στοιβάδων LDH τύπου Zn-Al, ήταν δυνατή η λήψη σήματος μέσω μικροηλεκτρονικής συσκευής, το οποίο μπορεί να δώσει πληροφορίες για την συγκέντρωση της ουρίας γύρω από τον βιοαισθητήρα.³⁶

1.4.5 Αποστοιβαγμένα LDH

Ως αποστοιβαγμένα LDH ορίζονται τα δισδιάστατά συστήματα που λαμβάνονται μετά απο αποστοίβαξη των μεταλλικών στρωμάτων των LDH. Η σύνθεση του παρουσιάζει δυσκολίες σε σχέση με άλλα δισδιάστατα νανοΰλικά λόγω του υψηλού θετικού φορτίου των στρωμάτων των LDH. Παρόλα αυτά, έχει γίνει δημοσίευση αρκετών μεθόδων ικανών να παράξουν αποστοιβαγμένα LDH. Επιγραμματικά μερικές είναι η αποστοίβαξη LDH-Lactate σε νερό, σε βουτανόλη, η αποστοίβαξη με επιφανειοδραστικές ουσίες καθώς και η αποστοίβαξη σε Φορμαμίδιο η οποία θεωρείται το χρυσό στάνταρ λόγω της ταχύτητας και της απόδοσης της. Ωστόσο, καμία από τις παραπάνω μεθόδους σύνθεσης δεν είναι κατάλληλη για βιομηχανική χρήση, είτε επειδή έχει χαμηλή βιοσυμβατότητα λόγω χρήσης τοξικών για τον ανθρώπινο οργανισμό διαλυτών, είτε λόγω κόστους και χαμηλής απόδοσης. Παρόλα αυτά τα αποστοιβαγμένα LDH έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα κλασσικά LDH λόγω του μικρότερου τους μεγέθους που κατ' επέκταση κάνει ευκολότερη την διείσδυση τους σε κύτταρα καθώς και της μεγαλύτερης δραστικής τους επιφάνειας. Μερικές πιθανές μελλοντικές εφαρμογές τους είναι η σύνθεση νέων νανοσυνθετικών επιφανειών, η σύνθεση υλικών τύπου thin film, η ανακάλυψη νέων υβριδικών μαγνητικών υλικών αλλά και η σύνθεση νέων υβριδικών βιοανόργανων υλικών με εφαρμογές στην βιοτεχνολογία.³⁷



Σχήμα 3: Αποστοίβαξη των LDH

1.5 Μηχανισμός κυτταρική πρόσληψη νανοϋβριδίων LDH

Ο Γενικός μηχανισμός μέσω του οποίου τα νανοϋβρίδια LDH εισχωρούν μέσα στα ζωικά κύτταρα είναι ο παρακάτω. Αρχικά, λόγω του μερικού θετικού φορτίου που κατέχει το νανοϋβρίδιο, προσελκύεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Στην συνέχεια, το νανοϋβρίδιο διαπερνά την μεμβράνη, πιθανότατα με εγκόλπωση μέσω υποδοχέων κλαθρίνης.^{38–40} Λόγω του ότι τα ενδωσώματα γενικά, και κατ' επέκταση το ενδώσωμα μέσω του οποίο εισήλθε το νανοϋβρίδιο μέσα στο κύτταρο, έχουν χαμηλό pH, το LDH διαλύεται. Η διάλυση του LDH έχει ως αποτέλεσμα την προστασία του φαρμάκου καθώς έτσι ρυθμίζεται το ενδοσωμικό pH. Τέλος, μέρος των νανοϋβριδίων που δεν έχει διαλυθεί καθώς και ουσία που έχει ήδη απελευθερωθεί απελευθερώνεται στο σχήμα 4.



Σχήμα 4: Μηχανισμός πρόσληψης νανοϋβριδίων LDH στο κύτταρο.

Παρά την πρόοδο που έχει γίνει στην έρευνα του ακριβούς μηχανισμού κυτταρικής πρόσληψης, παρουσιάζονται δυσκολίες όσο αφορά την απόδοση της κυτταρικής χορήγησης νανοϋβριδίων LDH-DNA. Ένας από τους λόγους είναι ότι συγκεκριμένα το

DNA φαίνεται να τυλίγεται γύρω από το LDH, επομένως ποσοτικά κάθε μόριο LDH περιέχει λιγότερο DNA. Σε αντίθεση, η προσθήκη φαρμάκων στα LDH, τα οποία είναι μικρά μόρια, φαίνεται να γίνεται σχεδόν ποσοτικά. Επιπλέον, τα νανοϋβρίδια LDH-DNA φαίνονται να μαστίζονται και από ένα ακόμα πρόβλημα, το οποίο εξηγεί και την χαμηλή απόδοση πρόσληψης. Πολλές φορές, λόγω του μεγάλου μεγέθους των μορίων DNA, σχηματίζονται γέφυρες μεταξύ των LDH. Αυτό μπορεί να αδρανοποιήσει το νανοϋβρίδιο καθώς έτσι αυξάνεται κατά πολύ το μέγεθος των σωματιδίων, και έτσι δεν είναι δυνατή η εισχώρηση του σωματιδίου στο κύτταρο. Το μέγεθος των σωματιδίων αυτών πολλές φορές μπορεί να ξεπερνάει τα 500 nm. Παρότι η ιδιότητα αυτή κάνει απαγορευτική την είσοδο με εγκόλπωση μέσω υποδοχέων κλαθρίνης, παρατηρείται είσοδος νανοϋβριδίων στο κύτταρο. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει και κάποιος άγνωστος εναλλακτικός μηχανισμός.⁴¹

1.6 Χαρακτηρισμός

Για τον χαρακτηρισμό των νανοΰλικών με βάση τα LDH χρησιμοποιούνται αρκετές μέθοδοι, με τις πιο κύριες όμως να είναι αυτές της περίθλασης ακτίνων X (XRD) και της υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FT-IR). Από τις δύο, πιο συχνά χρησιμοποιείται η μέθοδος XRD, στην οποία συνήθως υποβάλλονται δείγματα των οποίων ο κρυσταλλικός προσανατολισμός είναι τυχαίος. Σε μερικές περιπτώσεις είναι δυνατή και η μελέτη δειγμάτων στην υγρή κατάσταση. Σε ένα τυπικό διάγραμμα XRD που λαμβάνεται από LDH, παρατηρούνται έντονες ανακλάσεις σε χαμηλές τιμές 2θ, οι οποίες αντιστοιχούν σε διαδοχικούς βαθμούς ανάκλασης του εσωτερικού στο ενδιάμεσο των κρυσταλλικών στρωμάτων. Ο ενδιάμεσος χώρος μεταξύ των στρωμάτων είναι ίσως με 1/n της παραμέτρου c. Εδώ όπου n είναι η τάξη της ανάκλασης. Αφαιρώντας το πάχος των υδροξειδίων είναι δυνατόν να υπολογιστεί το ύψος του εσωτερικού χώρου που καταλαμβάνεται από το εκάστοτέ παγιδευμένο ανιόν. Η τιμή αυτή εξαρτάται από το μέγεθος και τον προσανατολισμό του ανιόντος.



Σχήμα 5: Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ για LDH(Mg-Al)-NO3

Η φασματομετρία IR είναι μια χρήσιμη τεχνική για την επιβεβαίωση της φύσης του αντισταθμιστικού ανιόντος που έχει παγιδευτεί στο εσωτερικό του LDH. Παραδείγματος χάριν, η παγίδευση ανιόντος το οποίο περιέχει καρβοξυλικές ομάδες είναι δυνατόν να ταυτοποιηθεί μέσω των ισχυρών απορροφήσεων που παρατηρούνται στους 1560 και 1400 cm⁻¹. Αντιστοίχως αν το καρβοξυλικό οξύ του παραδείγματος δεν είχε παγιδευτεί, θα έκανε την εμφάνιση της κορυφή στους 1700 cm⁻¹. Επιπρόσθετα, οι μετρήσεις IR μπορούν να βοηθήσουν στην ταυτοποίηση μη επιθυμητών ανιόντων που πιθανώς έχουν παγιδευτεί κατά την σύνθεση.

1.7 Νανοϋβριδικές μήτρες LDH-Αλγινικού Ασβεστίου

Τα παράγωγα του αλγινικού οξέος είναι από τα πιο χρήσιμα βιοπολυμερή. Συνήθως χρησιμοποιούνται ως έκδοχα σε φαρμακευτικά προϊόντα λόγω της σταθεροποίησης που παρέχουν. Επιπλέον έχει αρχίσει να γίνεται χρήση τους σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, λόγω του ότι σαν πολυμερή μπορούν να τροποιηθούν ποικιλοτρόπως. Η ιδιότητα των αλγινικών να σχηματίζουν ιονοτροπικές γέλες έχει σημαντικές επιπτώσης στα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου μπορούν να λειτουργήσουν σαν μήτρες φαρμακευτικών ουσιών κάνοντας δυνατή την προστασία τους από το εξωτερικό περιβάλλον ή την ελεγχόμενη αποδέσμευση τους.



Σχήμα 6: Νανοϋβριδική μήτρα LDH-Αλγινικού Ασβεστίου

Μήτρες φαρμάκων με βάση του LDH είναι δυνατόν να σχηματίσουν υβριδικά σφαιρίδια μαζί με αλγινικό ασβέστιο. Η αλληλεπίδραση της μήτρας LDH με το αλγινικό ασβέστιο έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Αρχικά τα LDH μπορούν να δράσουν σαν παράγοντες διασύνδεσης σταθεροποιώντας περαιτέρω την μήτρα αλγινικού ασβεστίου. Αυτό συμβαίνει διότι μειώνεται η κινητικότητα των αλυσίδων του βιοπολυμερούς. Επιπλέον μπορούν να επιβραδύνουν τον ρυθμό με τον οποίο φουσκώνει το σφαιρίδιο και κατ επέκταση να επηρεάσουν τον ρυθμό απελευθέρωσης της ενεργής ουσίας μέσα από την μήτρα. Όπως φαίνεται σχηματικά η ενεργή ουσία που είναι παγιδευμένη σε νανοϋβριδικές μήτρες LDH-Αλγινικού ασβεστίου, πρέπει αρχικά να απομακρυνθεί από την μήτρα LDH μέσω ανιοντοανταλλαγής και στην συνέχεια εξέλθει από τους πόρους του σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια των εταιριών Sigma Aldrich και Fluka analytical grade. Επιπλέον, έγινε χρήση νερού nanopure από το οποίο πρώτα είχε αφαιρεθεί το διοξείδιο του άνθρακα με ροή αερίου αζώτου για 20 λεπτά.

2.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων

Η σύνθεση των LDH βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Panda⁴², μέσω του οποίου παρασκευάστηκαν LDH Mg-Al 3:1 και Mg-Al 2:1, τα οποία από εδώ και πέρα θα αναφέρονται ως LDH3 και LDH2 αντιστόχως. Η διαδικασία είναι παρόμοια, με μόνη διαφορά την αναλογία μεταλλικών αλάτων. Παρακάτω ακολουθεί η διαδικασία για το LDH Mg-Al 3:1.

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250mL προσαρμόζονται δύο προσθετικές φιάλες που επιτρέπουν τη στάγδην προσθήκη του περιεχομένου τους. Στη συνέχεια τοποθετείται πεχάμετρο, μαγνητικός αναδευτήρας και 50mL νερό. Από τις δύο προσθετικές φιάλες στη μία προστίθεται διάλυμα 50ml 0,675M Mg(NO₃) και 0,225M Al(NO₃), ενώ στη δεύτερη διάλυμα 50ml 2M NaOH. Να σημειωθεί εδώ ότι για την σύνθεση του LDH2, χρησιμοποιούνται 0.400M Mg(NO₃) και 0.200M Al(NO₃).

Στη συνέχεια ξεκινά η στάγδην ταυτόχρονη προσθήκη των δύο διαλυμάτων με τέτοιο ρυθμό, έτσι ώστε το διάλυμα στο εσωτερικό της τρίλαιμης να έχει pH σταθερό στο 10 ± 5. Καθώς τα δύο διαλύματα αναμειγνύονται σχηματίζεται λευκό ίζημα. Πρέπει να σημειωθεί, ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος το σύστημα παραμένει σφραγισμένο, ενώ στην τρίλαιμη φιάλη γίνεται συνεχής διοχέτευση N₂. Μετά το τέλος της προσθήκης το διάλυμα θερμαίνεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία 120°C σε ελαιόλουτρο, ώστε να προκύψει κρυσταλλική δομή με μικρό μέγεθος⁴³. Αφού περάσουν οι 24 ώρες, το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε πεδίο 10000 x g για 10min, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με απαερωμένο, nanopure H₂O και τελικά το νιτρικό LDH επαναιωρείται και φυλάσσεται, σφραγισμένο με parafilm, σε θερμοκρασία δωματίου.

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του αιωρήματος νιτρικού LDH, λαμβάνονται σε eppendorf 5 δείγματα του 1ml, φυγοκεντρούνται και αφήνονται να στεγνώσουν. Στη συνέχεια ζυγίζεται η ποσότητα νιτρικού LDH και υπολογίζεται η συγκέντρωση, η οποία για τις συνθέσεις που διεκπεραιώθηκαν κυμαίνεται μεταξύ 45-55mg/mL.

2.2 Σύνθεση υβριδίων LDH

Για τη σύνθεση των υβριδίων LDH, όπου η επιθυμητή ουσία βρίσκεται παγιδευμένη ανάμεσα στις στιβάδες, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ανταλλαγής ιόντων, συνκαταβυθίσεως. Οι διαδικασίες παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια:

2.2.1 Συνθέσεις με ανιοντοανταλλαγή:

LDH (Mg-Al)-Νιτροφουραντοΐνη

Για την παρασκευή αυτού του υβριδίου αρχικά 50mg (0,2mmol) *Νιτροφουραντοΐνη* διαλύονται σε 10mL DMSO δημιουργώντας ένα διάλυμα 0.02M. Στη συνέχεια το διάλυμα προστίθεται σε σφαιρική φιάλη που περιέχει νερό σε pH = 9 με Tris (0,30g, 2,4mmol). Στο διάλυμα προστίθεται κατάλληλος όγκος LDH-NO₃ που αντιστοιχεί σε 0,05g LDH-NO₃ και ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 50mL. Το διάλυμα αφήνεται να αναδεύεται για 24h σε σφραγισμένη σφαιρική φιάλη. Το ίζημα απομονώνεται στη συνέχεια με φυγοκέντρηση 10000 x g για 10 λεπτά, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

LDH (Mg-Al)-Χολικό

Ξεκινώντας, 0,12g Tris (1.0mmol) διαλύονται σε 48.5mL απαερωμένου nanopure. Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη 200mg Χολικού Νατρίου (0.49mmol). Όταν πλέον διαλυθουν, προστίθεται 1.5mL LDH-NO₃ συγκέντρωσης 50mg/mL, που αντιστοιχεί σε 75mg LDH-NO₃. Το διάλυμα με τελικό όγκο 50mL αφήνεται για ανάδευση 24h. Το υβρίδιο απομονώνεται στη συνέχεια με φυγοκέντρηση 10000 x g για 10 λεπτά, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.2 Συνθέσεις με συγκαταβύθιση

LDH (Mg-Al)- Νιτροφουραντοΐνη

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με τη διαδικασία σύνθεσης του LDH-NO₃. Η μόνη διαφορά ήταν η τοποθέτηση διαλύματος 200mg *Νιτροφουραντσΐνη* (0.8mmol) σε 10mL DMSO, στο νερό στη βάση της τρίλαιμης. Επιπλέον η θέρμανση έγινε στους 80 °C αντί για 120 °C, λόγω της θερμοευαισθησίας που παρουσιάζει η *Νιτροφουραντσΐνη*.

2.3 Σύνθέσεις αποστοιβαγμένων υδροξειδίων και υβριδίων

Για τη σύνθεση των αποστοιβαγμένων LDH, αλλά και το υβριδίων αυτών, χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές μέθοδοι. Αρχικά η αποστοίβαξη πραγματοποιήθηκε σε φορμαμίδιο³⁷ και στην συνέχεια σε υδατικό διάλυμα ιόντων γαλακτικού⁴⁴. Τέλος επιτεύχθηκε αποστοίβαξη σε προπυλενική γλυκόλη και γλυκερόλη.

2.3.1 Αποστοίβαξη LDH

LDH (Mg-Al) αποστοίβαξη σε φορμαμίδιο

Η διαδικασία αποστοίβαξης σε φορμαμίδιο βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Wu⁴⁵ μέσω του οποίο αποστοιβάχθηκαν επιτυχώς LDH2 και LDH3.

Σε σφαιρική φιάλη των 100mL γίνεται προσθήκη 20mL φορμαμίδιο και 4mL διαλύματος LDH συγκέντρωσης 50mg/mL, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10g/L. Μετά από επαρκή ανάδευση, η σφαιρική φιάλη μεταφέρεται σε λουτρό υπερήχων μέτριας έντασης όπου και παραμένει για 30 λεπτά. Τέλος, μετά το πέρας των 30 λεπτών, η σφαιρική φιάλη μεταφέρεται σε σκιερό μέρος όπου και παραμένει για 24 ώρες. Η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώνεται μέσω του φαινομένου Tyndall.

LDH (Mg-Al) αποστοίβαξη σε νερό

Η διαδικασία αποστοίβαξης σε υδατικό διάλυμα ιόντων γαλακτικού βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Hibino⁴⁴ μέσω του οποίο αποστοιβάχθηκαν επιτυχώς LDH2 και LDH3.

Σε σφαιρική φιάλη των 100mL γίνεται προσθήκη 50mL απαερωμένου nanopure H₂O, μαζί με 0.195mL 85% D-L-Lactic Acid (syrup), έτσι ώστε το τελικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 4g/L. Στην συνέχεια γίνεται ρύθμιση του pH στο 10, κάνοντας χρήση διαλύματος 1M NaOH σε nanopure το οποίο πρώτα έχει υποστεί απαέρωση. Αφού γίνει ρύθμιση του pH, προστίθεται Tris (0,30g, 2,4mmol). Έπειτα γίνεται προσθήκη 1mL LDH (50mg/mL), και το διάλυμα αναδεύεται για 24 ώρες. Τέλος το ακατέργαστο τελικό προϊόν καθαρίζεται και επαναδιαλύεται σε νερό nanopure. Η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώνεται μέσω του φαινομένου Tyndall.

LDΗ αποστοίβαξη σε προπυλενική γλυκόλη/γλυκερόλη

Η διαδικασία αποστοίβαξης σε πολυόλες ακολουθεί παρόμοιο πρωτόκολλο με την αποστοίβαξη σε φορμαμίδιο.

Σε σφαιρική φιάλη των 100mL γίνεται προσθήκη 20mL προπυλενική γλυκόλη και 4mL διαλύματος LDH συγκέντρωσης 50mg/mL, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι

10g/L. Μετά από επαρκή ανάδευση, η σφαιρική φιάλη μεταφέρεται σε λουτρό υπερήχων μέτριας έντασης όπου και παραμένει για 30 λεπτά. Τέλος, μετά το πέρας των 30 λεπτών, η σφαιρική φιάλη μεταφέρεται σε σκιερό μέρος όπου και παραμένει για 24 ώρες. Η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώνεται μέσω του φαινομένου Tyndall.

Η παραπάνω διαδικασία έχει επαναληφθεί με glycerol.

2.4 Προσθήκη LDH υβριδίων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου

Για την παρασκευή των σφαιριδίων χρησιμοποιήθηκε νιτρικό ασβέστιο, αντί του χλωριούχου ανάλογού του. Ο λόγος είναι ότι τα ανιόντα χλωρίου επηρεάζουν την ταχύτητα απελευθέρωσης της ενεργής ουσίας στο υβρίδιο LDH, λόγω της μεγαλύτερης συγγένειας που παρουσιάζουν, σε σχέση με τα νιτρικά.

Stock Αλγινικού Νατρίου

Σε δοχείο falcon των 50mL γίνεται προσθήκη, 50mL απαερωμένο nanopure H₂O. Στην συνέχεια προστίθενται 1.5g αλγινικού νατρίου, έτσι ώστε το τελικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 3% w/v. Το μείγμα αναδεύεται παλμικά σε vortex, για 10 λεπτά, μέχρι το περισσότερο αλγινικό νάτριο να διαλυθεί. Το μείγμα μεταφέρεται σε water bath θερμοκρασίας 50°C όπου και μένει για άλλα 10 λεπτά. Τέλος, ακολουθεί σύντομη ανάδευση σε vortex.

LDH (Mg-Al)- Νιτροφουραντοΐνη σε σφαιρίδια Αλγινικού

Σε δοχείο falcon των 15mL γίνεται προσθήκη 4mL διαλύματος LDH-Νιτροφουραντοΐνη και 1mL διαλύματος Αλγινικού Νατρίου (3% w/v), έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του αλγινικού νατρίου να είναι 0.6% w/v. Ακολουθεί ανάδευση για 2 λεπτά σε vortex. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ειδικό νεφελοποιητή και φυλάσσεται σε σκοτεινό σημείο μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Σε ποτήρι ζέσεως των 100mL παρασκευάζεται διάλυμα 5% w/v Calcium Nitrate Tetrahydrate (2.5g) σε 45mL nanopure H₂O. Στην συνέχεια ακολουθεί μέτρια ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα με παράλληλη εφαρμογή ισχυρών υπερήχων. Ταυτόχρονα, το διάλυμα LDH- *Νιτροφουραντοΐνη*/Αλγινικού Νατρίου, νεφελοποιήται στην επιφάνεια του διαλύματος ιόντων ασβεστίου με ταχύ ρυθμό. Όταν τελειώσει η διαδικασία της νεφελεοποίησης, το διάλυμα μεταφέρεται σε γυάλινη σφαιρική φιάλη των 100mL.

2.5 Χαρακτηρισμός

Τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ ελήφθησαν στα περιθλασίμετρα Rigaku RINT 2000 με πηγή ακτίνων X Cu Kα (λ=1,54Å) με τάση 40kV και ένταση 178mA, και Rigaku D/MAX 2400 X-Ray. Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-2700. Τέλος τα φάσματα υπέρυθρου ελήφθησαν μέσω του οργάνου Thermo-Electron Nicolet 6700 FT-IR με μέθοδο εξασθενημένης ολικής ανάκλασης.

2.6 Έλεγχος ρυθμού απελευθέρωσης ουσίας από LDH

Πέρα από το χαρακτηρισμό των υβριδίων LDH, μελετήθηκε και η ικανότητα απελευθέρωσης της συναρμοσμένης ουσίας. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη μελέτη του υβριδίου LDH(Mg-AI)- *Νιτροφουραντοΐνη* παρουσιάζεται στη συνέχεια:

Αρχικά, κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις με μέγιστη απορρόφηση το 0,5. Στη συνέχεια, σε διάλυμα 50ml 0,9% NaCl προστίθενται 100μg LDH- *Νιτροφουραντοΐνη* και το διάλυμα αφήνεται σε ανάδευση. Πριν την προσθήκη του υβριδίου λαμβάνεται δείγμα το οποίο ορίζεται ως χρόνος μηδέν. Μετά την προσθήκη και την έναρξη της ανάδευσης, δείγματα του 1ml λαμβάνονται στις χρονικές στιγμές 1min, 5min, 15min, 30min, 45min, 1h και έπειτα ανά μία ώρα. Μετά την κάθε λήψη δείγματος, ακολουθεί φυγοκέντρηση και το αιώρημα αποθηκεύεται σε ψυγείο μέχρι τη μέτρησή του. Μετά την πρώτη μέρα επιλέχθηκε να ληφθούν 3 με 4 δείγματα τη μέρα, αρκετά για την κατασκευή ομαλούς καμπύλης απελευθέρωσης. Το διάλυμα αφέθηκε για 170h συνολικά. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Shimadzu UV-2700 και κατάλληλες αραιώσεις έγιναν στο κάθε δείγμα, έτσι ώστε η απορρόφησή του να βρίσκεται μέσα στα πλαίσια της καμπύλης. Για το κάθε δείγμα λήφθηκαν απορροφήσεις στα 265nm και 367nm όπου η νιτροφουραντοΐνη παρουσιάζει κορυφές απορρόφησης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Χαρακτηρισμός των LDH

3.1.1 Περίθλαση ακτίνων Χ (XRD)

Τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια χαρακτηρίστηκαν κυρίως μέσω της μεθόδου περίθλασης ακτίνων Χ. Μέσω της μεθόδου μπορεί να προσδιοριστεί η ατομική και η μοριακή δομή κρυσταλλικών πλεγμάτων. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την μελέτη των LDH καθώς μέσω αυτής μπορεί να υπολογιστεί η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων του κρυσταλλικού πλέγματος, η οποία είναι χαρακτηριστική του ανιόντος που έχει συναρμοστεί μεταξύ των στρωμάτων, καθώς της φύσης των ίδιων των στρωμάτων. Επιπλέον μπορεί να δώσει στοιχεία για την κρυσταλλικότητα του δείγματος και επομένως για την ποιότητα του.

Ξεκινώντας, παρουσιάζονται τα διαγράμματα περίθλασης του LDH(Mg-Al)-NO₃ για αναλογίες 2:1 καθώς και 3:1, τα οποία αποτέλεσαν την βάση για τη σύνθεση των υπολοίπων υβριδίων LDH. Στην συνέχεια ακολουθούν διαγράμματα για LDH(Mg-Al)-Χολικό, LDH(Mg-Al)-*Νιτροφουραντοΐνη* καθώς επίσης και τα αποτελέσματα προσπάθειας συναρμογής γλουταμίνης και DNA από σπέρμα ρέγγας σε delaminated LDH3.

Με την εφαρμογή του νόμου του Bragg προκύπτει ότι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών στρωμάτων είναι 8.92Å για τα LDH(Mg-Al)-NO₃, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά⁴⁶. Επομένως όταν η απόσταση των στρωμάτων βρεθεί να είναι 8.92Å, συμπεραίνεται ότι υπάρχει σταθεροποίηση νιτρικών ιόντων μεταξύ των στρωμάτων του κρυσταλλικού πλέγματος και άρα η σύνθεση είναι επιτυχής. Όπως προαναφέρθηκε, ένα από τα προβλήματα στην σύνθεση του αρχικού LDH είναι η συγγένεια του με τα ανθρακικά ιόντα, τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στην ατμόσφαιρα. Κορυφή που αντιστοιχεί σε απόσταση 7.67Å⁴⁷, είναι αποτέλεσμα σταθεροποίησης ανθρακικών ιόντων μεταξύ των στοιβάδων των LDH. Τέλος, οι κορυφές για τα υβρίδια που περιείχαν Νιτροφουραντοΐνη, Χολικό οξύ και Γλουταμίνη είναι 18.9 Å, 38.4 Å⁴⁸ και 12.5 Å⁴⁹ αντιστοίχως.



Σχήμα 7: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ για LDH2(Mg-Al)-NO3 και LDH3(Mg-Al)-NO3.



Σχήμα 8: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ για LDH2(Mg-Al)-Χολικό

Κάνοντας ανάλυση του διαγράμματος υπολογίστηκε ότι η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων του δείγματος είναι 35.75Å, επομένως έχει γίνει συναρμογή του χολικού. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή για 2θ=2.47° αντιστοιχεί στην πρώτη ανάκλαση, η 2θ=5.11° αντιστοιχεί στην δεύτερη, η 2θ=7.69° στην τρίτη, ενώ η 2θ=10.17° αντιστοιχεί στην τέταρτη ανάκλαση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κορυφή 2θ=11.79°, της οποία το προφίλ ταιριάζει με πέμπτης τάξης ανάκλαση του χολικού αλλά και με πρώτης τάξης ανάκλαση ανθρακικών. Η ένταση της υποδεικνύει ότι πιθανότατα στο δείγμα υπάρχει μικρή ποσότητα ανθρακικών.

Ανάλυση LDH2(Mg-Al)- Νιτροφουραντοΐνη:

- LDH2(Mg-AI)-Nitrofurantoin



Σχήμα 9: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ για LDH2(Mg-Al)- Νιτροφουραντοΐνη

Κάνοντας ανάλυση του διαγράμματος υπολογίστηκε ότι η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων του δείγματος είναι 18.28Å, επομένως έχει γίνει συναρμογή της νιτροφουρανοΐνης. Πιο συγκεκριμένα η πρώτη ανάκλαση παρατηρείται για 2θ=4.83° ενώ η δεύτερη για 2θ=9.67°. Ωστόσο για μέρος της κορυφής της δεύτερης ανάκλασης πιθανότατα ευθύνεται και η ύπαρξη νιτρικών, των οποίων η πρώτη ανάκλαση βρίσκεται στην ίδια περιοχή, σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Επιπλέον οι κορυφές για 2θ=7.23 και 2θ=11.77 είναι αποτέλεσμα συναρμογής νιτροφουρανοΐνης υπό γωνία.

Ανάλυση LDH3(Mg-Al)-Χολικό:



Σχήμα 10: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ για LDH3(Mg-Al)-Χολικό

Υπολογίζοντας βρέθηκε ότι η μονή κορυφή που εμφανίζεται σε αυτό το διάγραμμα αντιστοιχεί σε απόσταση 7.86Å. Η απόσταση αυτή συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές τιμές και επιβεβαιώνει την συναρμογή ανθρακικών ιόντων. Η απουσία κορυφή που να αντιστοιχεί σε απόσταση 34.57Å, δείχνει ότι το χολικό δεν συναρμόστηκε καθόλου, παρότι παρατηρήθηκε συναρμογή στο χολικού στο υβρίδιο LDH2. Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού είναι η διαφορά χωρητικότητας μεταξύ LDH2 και LDH3.⁵⁰ Τα LDH2(Mg-AI) έχουν μεγαλύτερη χωρητικότητα, επομένης η εισαγωγή ανιόντων γίνεται ευκολότερα.



Σχήμα 11: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ για LDH3(Mg-Al)-Νιτροφουραντοΐνη

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε αυτό το υβρίδιο. Απουσιάζει κορυφή που να αντιστοιχεί στην νιτροφουραντοΐνη, και παρατηρείται μονάχα κορυφή ανθρακικών, απόστασης 7.83Å. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι το LDH3(Mg-Al)-NO₃, που είχε χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση των δύο αυτών υβριδίων, είχε επιμολυνθεί με ανθρακικά ιόντα κατά την αποθήκευση του. Επιπλέον, η προσθήκη ανιόντων στα LDH3 είναι πιο δύσκολη, λόγω της μειωμένης χωρητικότητας τους, σε σχέση με τα LDH2.

Ανάλυση dLDH3(Mg-Al)- NO3 σε Φορμαμίδιο:



Σχήμα 12: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ για dLDH3(Mg-Al)- NO₃ σε Φορμαμίδιο

Παραπάνω φαίνεται το διάγραμμα XRD για LDH3(Mg-Al)-NO₃ το οποίο έχει αποστοιβαχθεί σε φορμαμίδιο, μια διαδικασία γνωστή από την βιβλιογραφία. Χαρακτηριστικές κορυφές είναι το όρος με ευρύ πλάτος μεταξύ 2θ=20°-30°, που είναι αποτέλεσμα ανάκλασης στο ίδιο το φορμαμίδιο, και η διπλή κορυφή στα 2θ=62°, η οποία υποδηλώνει την 2D συμμετρίας του LDH. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κορυφή στις 2θ=10°, καθώς και η διπλή κορυφή στις 35°, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για παρουσία νιτρικών, αλλά δεν συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς εμφανίζονται μονάχα σε υψηλές συγκεντρώσεις άνω των 120g/L, σε αντίθεση με το δείγμα του διαγράμματος το οποίο είναι συγκέντρωσης 40g/L.⁵¹





Σχήμα 13: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ για dLDH3(Mg-Al)- NO₃ σε Προπυλενική Γλυκόλη

Στο σχήμα παρουσιάζεται το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X για dLDH3(Mg-Al)-NO₃ το οποίο αποστοιβάχθηκε με διαλύτη προπυλενική γλυκόλη. Παρατηρήθηκαν παρόμοιες κορυφές, διαφορετικές εντάσης, με αυτές του σχήματος 12. Όπως και στο φορμαμίδιο, η ευρεία κορυφή στο 2θ=20° είναι αποτέλεσμα της φύσης του δείγματος το οποίο περιέχει διαλύτη αποστοίβαξης.⁵¹ Οι σχετικά εντονότερες κορυφές υποδηλώνουν αυξημένη κρυσταλλικότητα, άρα λιγότερους βαθμούς αποστοίβαξης σε σχέση με την αποστοίβαξη σε φορμαμίδιο. Παρόλα αυτά θα χρειαστούν περισσότερες πειραματικές δοκιμές ώστε να αποσαφηνιστεί ο βαθμός αποστοίβαξης του LDH3(Mg-Al)- NO₃ στην προπυλενική γλυκόλη.





Σχήμα 14: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ για dLDH3(Mg-AI)-Γλουταμίνη σε Προπυλενική Γλυκόλη

Στο σχήμα 14 συγκρίνονται συνθέσεις νανοϋβριδίων dLDH3(Mg-Al)-Γλουταμίνη, η διαφορά των οποίων είναι ο χρόνος στον οποίο έγινε προσθήκη της γλουταμίνης. Το before αναφέρεται στην προσθήκη του αμινοξέος πριν την αποστοίβαξη, κάνοντας το προδιάλυση στην προπυλενική γλυκόλη, ενώ το after αναφέρεται σε εισαγωγή μετά την διαδικασία της αποστοίβαξης. Και στις δύο περιπτώσεις η συναργομή του αμινοξέος ήταν επιτυχής, καθώς παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικές κορυφές στις 7.13° (after) και 6.99° (before), οι οποίες επιβεβαιώνονται και από την βιβλιογραφία⁴⁹.





Σχήμα 15: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ για dLDH3(Mg-Al)- DNA σε Προπυλενική Γλυκόλη

Υπολογίζοντας βρέθηκε ότι η μονή κορυφή που εμφανίζεται σε αυτό το διάγραμμα αντιστοιχεί σε απόσταση 8.67Å. Η απόσταση αυτή συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές τιμές και επιβεβαιώνει την συναρμογή νιτρικών ιόντων. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα που λήφθηκαν από την φασματομετρία υπέρυθρου καταδεικνύουν την ύπαρξη DNA στο νανοϋβρίδιο. Ένας πιθανός λόγος για τον οποίο δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του μέσω της τεχνικής XRD, είναι ότι το μόριο του DNA μπορεί να σχημάτισε σπείρα εξωτερικά του υβριδίου. Κάτι τέτοιο έχει σαν αποτέλεσμα να μην παρατηρείται κάποια χαρακτηριστική κορυφή καθώς δεν υπάρχουν διαδοχικές στοιβάδες ώστε να γίνει περίθλαση των ακτίνων X. Με λίγα λόγια, σε αυτό το διάγραμμα παρατηρείται μονάχα μέρος του dLDH το οποίο δεν αποστοιβάχθηκε.

3.1.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου

Μία δεύτερη μέθοδος χαρακτηρισμού η οποία δουλεύει συμπληρωματικά με την περίθλαση ακτίνων X, είναι η φασματοσκοπία υπερύθρου. Μέσω αυτής της μεθόδου μπορεί να επιβεβαιωθεί η παρουσία ουσιών στο δείγμα χωρίς όμως να επιβεβαιώνεται η συναρμογή τους μεταξύ των στρωμάτων. Για να επιβεβαιωθεί λοιπόν η συναρμογή μιας ένωσης μεταξύ των στρωμάτων του νανοϋβριδίου, είναι απαραίτητο τα συμφωνούν τα δεδομένα που λήφθηκαν καθώς σε διαφορετική περίπτωση, υποδεικνύουν επιμόλυνση ή εναπόθεση στο εξωτερικό των στρωμάτων



Στο παραπάνω σχήμα παρουσιάζεται φάσμα απορρόφησης υπερύθρου για δείγμα LDH3(Mg-Al)-CO3. Γενικά, οι χαρακτηριστικές κορυφές είναι αυτές των περιοχών 1643 cm⁻¹ καθώς και οι κορυφές της περιοχής 1000 cm⁻¹ έως και 400 cm⁻¹. Αυτές είναι κοινές για κάθε LDH. Προσδιορισμός των ιόντων που έχουν συναρμοστεί γίνει χρησιμοποιώντας την περιοχή μεταξύ 1000 cm⁻¹ και 2000 cm⁻¹. Πιο συγκεκριμένα, οι ευρεία μπάντα στα 3500 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική των υδροξυλίων των μεταλλικών στρωμάτων, ενώ η δόνηση στα 1643 cm⁻¹ είναι αποτέλεσμα της δόνησης κάμψεως που παρουσιάζει το νερό. Επιπλέον, οι κορυφές της περιοχής 400 cm⁻¹ έως και 1000 cm⁻¹

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα ουσιών που αναλύθηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Η ανάλυση των φασμάτων υπερύθρου γίνεται κατά κανόνα μέσω

σύγκρισης μεταξύ των φασμάτων LDH, Ουσίας, LDH-Ουσία. Μερικά από διαγράμματα περιέχουν το φάσμα της προπυλενογλυκόλης η οποία είναι απαραίτητη για την σύνθεση αποστοιβαγμένου LDH.



Ανάλυση LDH3(Mg-Al)-Χολικό.

Το φάσμα της προπυλενογλυκόλης διαθέτει τρεις χαρακτηριστικές κορυφές. Η ευρεία ταινία στα 3290,0 cm⁻¹ είναι αποτέλεσμα της τάσης του δεσμού μεταξύ των υδρογόνων και των οξυγόνων των υδροξυλίων. Επιπλέον χαρακτηριστική κορυφή για τον υδροξυλικό δεσμό εμφανίζεται στα 1040,0 cm⁻¹. Ωστόσο, η κορυφή αυτή είναι χαρακτηριστική του δεσμού άνθρακα – υδροξυλοομάδας. Τέλος, παρατηρείται μια ακόμα κορυφή στα 2920,0 cm⁻¹, χαρακτηριστική ανθρακικών σκελετών.⁵²

Συνεχίζοντας με το ελεύθερο χολικό, βρέθηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 2929 και 2863cm⁻¹ οι οποίες είναι αποτέλεσμα των δονήσεων μεταξύ των δεσμών άνθρακα υδρογόνου. Επίσης, εμφανίζεται δόνηση χαρακτηριστκή κοαρβοξυλομάδας στα 1574,8 και 1398,5 cm⁻¹. Όσο αφορά την περιοχή ταυτοποίησης (1000-2000cm⁻¹) παρατηρούνται κορυφές οι οποίες είναι αποτέλεσμα των δονήσεων του ανθρακικού σκελετού.⁴⁸

Το πρόβλημα που παρατηρήθηκε στο φάσμα XRD για του LDH3(Mg-Al)-NO₃, κάνει την εμφάνιση του και στο φάσμα του υπερύθρου. Χαρακτηριστικές κορυφές για τα νιτρικά ιόντα θα εμφανίζονταν στα 1380 cm⁻¹, 1760 cm⁻¹ και 825 cm⁻¹, οι οποίες όμως απουσιάζουν. Παρόλα αυτά, όπως έδειξαν και τα δεδομένα του XRD για το ίδιο δείγμα, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ανθρακικών στο δείγμα μέσω της χαρακτηριστικής κορυφής στα 1355 cm⁻¹.

Τέλος, στο φάσμα του αποστοιβαγμένου υβριδίου εμφανίζονται κορυφές του LDH, όπως ήταν αναμενόμενο. Επιπλέον διαπιστώθηκε μετατόπιση της κορυφής των cm⁻¹) ανθρακικών (1355 στα 1339,8 cm⁻¹ πιθανότατα λόγω ύπαρξης προπυλενογλυκόλης στο δείγμα, η οποία φαίνεται να έχει ευρεία κορυφή στην ίδια περιοχή. Δεν απαντώνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του χολικού πέρα αυτής των 1041,5 cm⁻¹. Η κορυφή αυτή ωστόσο, εμφανίζεται και στο φάσμα тпс προπυλενογλυκόλης. Βάσει των παραπάνω δεδομένων καθώς και αυτών που εξήχθησαν από το διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ για το LDH3(Mg-Al)-Χολικό (σχήμα 17), διαπιστώθηκε ότι το νανοϋβρίδιο dLDH3 περιέχει μεγάλη ποσότητα ανθρακικών ιόντων στο εσωτερικό του, ενώ εμφανής είναι και η ύπαρξη προπυλενογλυκόλης, η οποία όμως δεν έχει συναρμοστεί.



Ανάλυση LDH3(Mg-Al)- Νιτροφουραντοΐνη.

Σχήμα 18: Φάσμα υπερύθρου για LDH3(Mg-Al)- Νιτροφουραντοΐνη.

Ελεύθερη η νιτροφουραντοΐνη παρουσιάζει χαρακτηριστική κορυφή στα 1727,0cm⁻¹ η οποία αποδίδεται στην δόνηση δεσμού των καρβονυλικών ανθράκων με τα οξυγόνα, που ανοίκουν στο δακτύλίο υδατοΐνης. Επιπλέον η ομάδα κορυφών στην περιοχή 1518,8-1337,1 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική του α-νιτροφουραντο δακτυλίου.

Όπως και με το προηγούμενο δείγμα, μετά από εξέταση των δεδομένων του λήφθηκαν μέσω της διάθλασης ακτίνων Χ, βρέθηκε ότι και αυτό περιείχε ποσότητα ανθρακικών ιόντων. Επιβεβαίωση των δεδομένων που λήφθηκαν μέσω της μέτρησης XRD, έγινε από το φάσμα απορρόφησης στο υπέρυθρο. Όπως φαίνεται στο σχήμα 18, παρατηρήθηκε έντονη κορυφή στα 1347,6 cm⁻¹ η οποία και αντιστοιχεί σε ανθρακικά ιόντα. Συμπερασματικά άρα, μεταξύ των στοιβάδων του LDH υπάρχουν ανθρακικά ιόντα. Ωστόσο το δείγμα dLDH-*Νιτροφουραντοΐνη* σε προπυλενική γλυκόλη, το οποίο συντέθηκε χρησιμοποιώντας ως βάση το LDH3 που βρέθηκε να περιέχει ανθρακικά ιόντα, διαθέτει τις χαρακτηριστικές κορυφές της νιτροφουραντοΐνης. Μια πιθανή εξήγηση, η οποία δυνητικά δικαιολογεί και την αναπάντεχη κορυφή που εμφανίστηκε στο φάσμα διάθλασης ακτίνων Χ, είναι ότι πιθανώς υπήρξε αλληλεπίδραση μεταξύ του νανοϋβριδίου και της νιτροφουραντοΐνης, αλλά όχι στον οριζόντιο άξονα.



Ανάλυση LDH3(Mg-Al)-Γλουταμίνη.

Σχήμα 19: Φάσμα υπερύθρου για dLDH3(Mg-Al)-Γλουταμίνη.

Η γλουταμίνη, στην ελεύθερη της μορφή, εμφανίζει έντονες κορυφές στα 1687,0 cm⁻¹ και 1629 cm⁻¹, σύμφωνα με την βιβλιογραφία.⁵³ Οι κορυφές αυτές είναι αποτέλεσμα των δονήσεων των δεσμών άνθρακα-οξυγόνου της αμιδικής ομάδα και άνθρακα-οξυγόνου της καρβοξυλομάδας. Η βιβλιογραφία επιβεβαιώνει λοιπόν τα πειραματικά δεδομένα, μιας το δείγμα γλουταμίνης έδωσε τις αντίστοιχες κορυφές στα 1682,9 cm⁻¹ και 1620,3 cm⁻¹ αντιστοίχως.

Το νανοϋβρίδιο προς μελέτη έδωσε μια έντονη κορυφή στα 1543,3 cm⁻¹, η οποία είναι αποτέλεσμα μετατώπισης των κορυφών της αμιδο-ομάδας και της καρβόξυλομάδας της γλουταμίνης. Συνδυάζοντας τα δεδομένα της φασματομετρίας υπερύθρου καθώς και της μέτρησης που λήφθηκε μέσω της διάθλασης ακτίνων Χ, μπορεί κανείς να πει με σχετική ασφάλεια πως η σύνθεση του νανοϋβριδίου dLDH3-Γλουταμίνη ήταν επιτυχής.



Ανάλυση LDH3(Mg-Al)-DNA.

%Reflectance



Το δείγμα Herring2 αντιστοιχεί σε DNA από σπέρμα ρέγγας, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή νανοϋβριδίου dLDH3-DNA. Η συγκεκριμένη ακολουθία DNA είναι πλούσια σε βάσεις αδενίνης και θυμίνης. Χαρακτηριστικές κορυφές για την αδενίνη και την θυμίνη βρίσκονται στα 1690 cm⁻¹ και 1700 cm⁻¹ αντιστοίχως. Οι κορυφές αυτές είναι αποτέλεσμα δονήσεων δεσμών άνθρακα-οξυγόνου και άνθρακααζώτου. ²³ Επιπλέον οι κορυφές που παρατηρούνται στην περιοχή 1200-1225 cm⁻¹, οφείλονται στις αντισυμμετρικές δονήσεις των φωσφορικών ομάδων που περιέχει το DNA. Τέλος, κορυφή στα 1057,5 είναι αποτέλεσμα δόνησης δεσμών άνθρακα-οξυγόνου της δεοξυριβόζης.

Οι παραπάνω κορυφές απαντώνται και στο δείγμα dLDH3-DNA, με μερικές μετατοπίσεις. Συμπερασματικά, τα δεδομένα που εξήχθησαν από το διάγραμμα απορρόφησης στο υπέρυθρο καθώς και τα δεδομένα από την μέτρηση διάθλασης ακτίνων X, δείχνουν ότι η σύνθεση υβριδίου dLDH3-DNA ήταν επιτυχής.

3.2 Έλεγχος ρυθμού απελευθέρωσης ουσίας από LDH

Απαραίτητη προϋπόθεση για την μέτρηση συγκέντρωσης μέσω της μεθόδου της φασματοφωτομετρίας υπεριώδους είναι η κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Η λήψη των μετρήσεων έγινε στα 265nm και 367nm, τα οποία ήταν μήκη κύματος στα οποία παρατηρήθηκαν μέγιστα απορρόφησης. Η προσθήκη ενός επιπλέον μήκους κύματος για μέτρηση στο πειραματικό πρωτόκολλο, είχε σκοπό την βελτίωση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 21: Πρότυπες καμπύλες απορρόφησης της νιτροφουραντοΐνης.

Ακολούθησε λήψη δειγμάτων για τις επόμενες έξι ημέρες ανα κατά χρονικά διαστήματα. Τα δεδομένα απορρόφησης, σε συνδυασμό με τις πρότυπες καμπύλες του σχήματος 21, έδωσαν τα παρακάτω διαγράμματα συγκέντρωσης ως προς τον χρόνο.



Σχήμα 22: Καμπύλες απελευθέρωσης της νιτροφουραντοΐνης ως προς το χρόνο.

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω σχήμα, υπήρξε ταχύτατη απελευθέρωση νιτροφουραντοΐνης τις πρώτες ώρες, με το 64% έχει ήδη απελευθερωθεί τα πρώτα 30 λεπτά, ενώ πλέον στις 6 ώρες αυτό το ποσοστό είχε φτάσει το 73%. Από εκείνο το σημείο παρατηρήθηκε πιο αργή απελευθέρωση, της τάξεως του 10% ανά ημέρα, κάτι που οφείλεται στο γεγονός ότι για κάθε δείγμα, το δοχείο άνοιγε και ανανεωνόταν η παροχή διοξειδίου, δίνοντας επιπλέον σπρώξιμο της αντίδρασης στην απελευθέρωση του φαρμάκου. Υπό βέλτιστες πειραματικές συνθήκες αυτό δεν θα συνέβαινε και η αντίδραση θα έφτανε στην πλήρη εφικτή απελευθέρωση την δεύτερη περίπου ημέρα. Εκτός από το υβρίδιο, το διάλυμα περιείχε χλωριούχο νάτριο παρόμοιας συγκέντρωσης με αυτής στον ορό του αίματος. Παρόμοια μέτρηση in vivo πιθανότατά να έδινε πιο αργή απελευθέρωση, αν δεν υπήρχε εισαγωγή στο κύτταρο. Παρότι ανθρακικά ιόντα απαντώνται και στον ορό του αίματος, η συγκέντρωση τους είναι χαμηλότερη σε σχέση με αυτή του διαλύματος, παρόλο που πάρθηκαν όλα τα κατάλληλα μέτρα.

3.3 Έλεγχος απελευθέρωσης LDH υβριδίων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου

Σε αντίθεση με τον έλεγχο απελευθέρωσης της νιτροφουραντοΐνης από το υβρίδιο LDH, η αντίστοιχη πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο απελευθέρωσης του ίδιου υβριδίου το οποίο είχε προηγουμένως παγιδευτεί σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου, ήταν ανεπιτυχής. Πιο συγκεκριμένα, έγινε λήψη δειγμάτων για ένα διάστημα 6 ημερών, στα οποία δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στην συγκέντρωση της νιτροφουραντοΐνης.

Το πείραμα επαναλήφθηκε ώστε να αποκλειστεί ως πιθανή εξήγηση το ανθρώπινο σφάλμα, ωστόσο τα αποτελέσματα ήταν πανομοιότυπα με αυτά της πρώτης δοκιμής. Κύρια πιθανή αιτία για τα αποτελέσματα αυτά είναι το μέγεθος των πόρων της μήτρας του αλγινικού ασβεστίου. Πιθανότατα το μέγεθος των πόρων της μήτρας αλγινικού ασβεστίου δεν ήταν επαρκές για την απελευθέρωση του νανοϋβριδίου, ή την επαρκή εισαγωγή ιόντων χλωρίου ώστε να γίνεται η ανιοντοανταλλαγή με ικανοποιητικό ρυθμό. Λύση για αυτό το πρόβλημα είναι ανασχεδιασμός του πρωτοκόλλου, λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν.

3.4 Μορφολογική μελέτη LDH υβριδίων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου

Για την βελτιστοποίηση των χαρακτηριστικών των σφαιριδίων ήταν απαραίτητη μελέτη τους μέσω οπτικού μικροσκοπίου. Τα χαρακτηριστικά προς βελτιστοποίηση ήταν το σχήμα, το μέγεθος καθώς και η ανθεκτικότητα των σφαιριδίων στο περιβάλλον.



Σχήμα 23: Σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου όπως φαίνονται σε οπτικό μικροσκόπιο

Στο σχήμα 23, παρουσιάζεται το τελικό αποτέλεσμα της μελέτης αυτής. Για την λήψη των σφαιριδίων αυτών έγιναν τροποποιήσεις στην σύσταση των διαλύματος ιόντων ασβεστίου, καθώς επίσης και στον εξοπλισμό μέσω του οποίου γινόταν ο ψεκασμός του διαλύματος αλγινικού νατρίου/LDH. Η αλλαγή του αρχικού νεφελοποιητή με νεφελοποιητή υψηλότερης πίεσης είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του μεγέθους των σφαιριδίων, και την βελτιστοποίηση της μορφολογίας καθώς τα σφαιρίδια από άμορφα έγιναν πιο σφαιρικά. Βελτίωση επίσης παρατηρήθηκε με την εφαρμογή ισχυρών υπερήχων στο διάλυμα ιόντων ασβεστίου κατά την σύνθεση. Η μεγαλύτερη βελτίωση παρατηρήθηκε με αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος προς νεφελοποίηση. Αρχικά, ο ψεκασμός γινόταν με διάλυμα το οποίο βρισκόταν σε θερμοκρασία δωματίου, λόγω όμως του υψηλού του ιξώδους παρουσιαζόντουσαν συχνά μηχανικές βλάβες κατά την νεφελοποίηση. Η αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος αλγινικού στους 60°C αμέσως πριν την νεφελοποίηση μείωσε σημαντικά το ιξώδες και κατ' επέκταση την εμφάνιση μηχανικών βλαβών καθώς και το μέγεθος των σωματιδίων. Τέλος, αλλαγή της σύστασης του διαλύματος ιόντων ασβεστίου είχε σαν αποτέλεσμα την επιβράδυνση της διάσπασης του LDH που βρισκόταν εσωτερικά των σφαιριδίων. Για αν επιτευχθεί αυτό έγινε αντικατάσταση του χλωριούχου ασβεστίου με νιτρικό ασβέστιου, καθώς τα νιτρικά ιόντα έχουν χαμηλότερη συγγένεια με το LDH, σε σχέση με τα χλωριούχα.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός υβριδίων στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων με φαρμακευτικές ουσίες καθώς και η απόδειξη εφικτότητας σύνθεσης υβριδίων των αποστοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων με DNA ή αμινοξέα. Επιπλέον μελετήθηκαν οι ιδιότητες απελευθέρωσης παγιδευμένης ουσίας, σε προσομοίωση ορού αίματος. Για την σύνθεση αποστοιβαγμένων υβριδίων LDH χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι της βιβλιογραφίας αλλά επιπρόσθετα αναπτύχθηκε μιας νέα βιοσυμβατή μέθοδος σύνθεσης για την οποία χρησιμοποιούνται διαλύτες μη επιβλαβείς για τον άνθρωπο.

Από τις συνθέσεις που αποπειράθηκαν, υπήρξαν δύο οι οποίες απέτυχαν. Πιο συγκεκριμένα, οι σύνθεσεις των υβριδίων LDH3(Mg-Al)-Νιτροφουραντοΐνη και LDH3(Mg-Al)-Χολικό οξύ μαστιζόντουσαν από την ύπαρξη ανθρακικών ανιόντων τα οποία εικάζεται ότι επιμόλυναν το υβρίδιο κατά την σύνθεση ή την αποθήκευση. Λιγότερο πιθανή αιτία θεωρείται η επιμόλυνση ή η αποτυχημένη σύνθεση της πρώτης ύλης LDH3(Mg-Al)-NO₃, το οποίο αποδείχθηκε μετά από ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν σε πλήθος δειγμάτων. Προβληματική ήταν όμως και η απελευθέρωση της Νιτροφουραντοΐνης από το υβριδίο LDH3(Mg-Al)-Νιτροφουραντοΐνη στο εσωτερικό μήτρας αλγινικού ασβεστίου. Ενδεχομένως η αποτυχία αυτή να οφείλεται στο μικρό μέγεθος των πόρων της μήτρας του αλγινικού ασβεστίου. Ωστόσο, αυτό δεν ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί πειραματικά.

Παρά τις αρχικές δυσκολίες, επιβεβαιώθηκε πειραματικά για πρώτη φορά η σύνθεση των αποστοιβαγμένων νανοϋβρίδών LDH3(Mg-Al)-Γλουταμίνης και LDH3(Mg-Al)-DNA, χρησιμοποιώντας βιοσυμβατούς διαλύτες. Η μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε, ανοίγει τον δρόμο για την σύνθεση αποστοιβαγμένων νανοϋβριδίων τα οποία παρουσιάζουν έντονο θεραπευτικό ενδιαφέρον. Φυσικά επακόλουθα είναι η μελέτη αποστοιβαγμένων νανοϋβριδίων LDH3(Mg-Al) με ολιγοπεπτιδικά φάρμακα καθώς και η ενσωμάτωση του πολλά υποσχόμενου CRISPR, το οποίο αποτελεί "ασημένια σφαίρα" για της νόσου του καρκίνου και γενικώς για την επιλεκτική in-vivo γενετική τροποποίηση

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Cavani, F., Trifirò, F. & Vaccari, A. Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. *Catal. Today* **11**, 173–301 (1991).
- Reichle, W. T. Synthesis of anionic clay minerals (mixed metal hydroxides, hydrotalcite). *Solid State Ion.* 22, 135–141 (1986).
- Miyata, S. AnionExchange Properties of Hydrotalcite-Like Compounds. *Clays Clay Miner. CLAYS CLAY Min.* **31**, 305–311 (1983).
- Handbook of Layered Materials. *CRC Press* (2004). Available at: https://www.crcpress.com/Handbookof-Layered-Materials/Auerbach-Carrado-Dutta/p/book/9780824753498. (Accessed: 5th September 2018)
- Yamaoka, T., Abe, M. & Tsuji, M. Synthesis of Cu[®]Al hydrotalcite like compound and its ion exchange property. *Mater. Res. Bull.* 24, 1183–1199 (1989).
- Gordijo, C. R., Leopoldo Constantino, V. R. & de Oliveira Silva, D. Evidences for decarbonation and exfoliation of layered double hydroxide in N,N-dimethylformamide–ethanol solvent mixture. *J. Solid State Chem.* 180, 1967–1976 (2007).
- Crepaldi, E. L., Pavan, P. C. & Valim, J. B. A new method of intercalation by anion exchange in layered double hydroxides. *Chem. Commun.* 0, 155–156 (1999).
- Xu, Z. P. & Zeng, H. C. Control of Surface Area and Porosity of Co3O4 via Intercalation of Oxidative or Nonoxidative Anions in Hydrotalcite-like Precursors. *Chem. Mater.* **12**, 3459–3465 (2000).
- 9. Xu, Z. P., Stevenson, G., Lu, C.-Q. & Lu, G. Q. M. Dispersion and size control of layered double hydroxide nanoparticles in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. B* **110**, 16923–16929 (2006).
- 10. Rodriguez, P. G., Ruiter, M. de, Wijnands, T. & Elshof, J. E. ten. Porous Layered Double Hydroxides Synthesized using Oxygen Generated by Decomposition of Hydrogen Peroxide. *Sci. Rep.* **7**, 481 (2017).

- 11. He, X., Qiu, X., Hu, C. & Liu, Y. Treatment of heavy metal ions in wastewater using layered double hydroxides: A review. *J. Dispers. Sci. Technol.* **39**, 792–801 (2018).
- Guo, B. *et al.* Efficient Flame-Retardant and Smoke-Suppression Properties of Mg–Al-Layered Double-Hydroxide Nanostructures on Wood Substrate. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 23039–23047 (2017).
- Pereira, C. M. C., Herrero, M., Labajos, F. M., Marques, A. T. & Rives, V. Preparation and properties of new flame retardant unsaturated polyester nanocomposites based on layered double hydroxides. *Polym. Degrad. Stab.* **94**, 939–946 (2009).
- 14. Kumura, T., Imataki, N., Hasui, K., Inoue, T. & Yasutomi, K. Novel synthetic hydrotalcite and antacid comprising said synthetic hydrotalcite. (1972).
- Adsorption of Glyphosate and Glufosinate by Ni2AlNO3 layered double hydroxide ScienceDirect.
 Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131709003512. (Accessed: 5th September 2018)
- 16. Fan, G., Li, F., Evans, D. G. & Duan, X. Catalytic applications of layered double hydroxides: recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 7040–7066 (2014).
- Gabrovska, M. *et al.* Ni–Al Layered Double Hydroxides as Precursors of Ceramic Pigments. in *Proceedings of the III Advanced Ceramics and Applications Conference* (eds. Lee, W. E., Gadow, R., Mitic, V. & Obradovic, N.) 205–220 (Atlantis Press, 2016).
- Arai, Y. & Ogawa, M. Preparation of Co–Al layered double hydroxides by the hydrothermal urea method for controlled particle size. *Appl. Clay Sci.* 42, 601–604 (2009).
- 19. Liu, S., Wu, X., Lin, Y., Li, M. & Weng, D. Active oxygen-assisted NO-NO2 recycling and decomposition of surface oxygenated species on diesel soot with Pt/Ce0.6Zr0.4O2 catalyst. *Chin. J. Catal.* **35**, 407–415 (2014).

- 20. Wang, Z., Chen, M. & Shanguan, W. Simultaneous Catalytic Removal of NOx and Diesel Soot over Cu-Containing Hydrotalcite Derived Catalysts. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **25**, 79–85 (2009).
- 21. You, Y. W., Zhao, H. T. & Vance, G. F. Removal of Arsenite from Aqueous Solutions by Anionic Clays. *Environ. Technol.* **22**, 1447–1457 (2001).
- 22. Pshinko, G. N. Layered Double Hydroxides as Effective Adsorbents for U(VI) and Toxic Heavy Metals Removal from Aqueous Media. *Journal of Chemistry* (2013). doi:10.1155/2013/347178
- Watson, K., Farré, M. J. & Knight, N. Strategies for the removal of halides from drinking water sources, and their applicability in disinfection by-product minimisation: A critical review. *J. Environ. Manage.* **110**, 276–298 (2012).
- 24. Yang, Q.-Z., Chang, Y.-Y. & Zhao, H.-Z. Preparation and antibacterial activity of lysozyme and layered double hydroxide nanocomposites. *Water Res.* **47**, 6712–6718 (2013).
- 25. Kura, A. U., Hussein, M. Z., Fakurazi, S. & Arulselvan, P. Layered double hydroxide nanocomposite for drug delivery systems; bio-distribution, toxicity and drug activity enhancement. *Chem. Cent. J.* **8**, 47 (2014).
- 26. Ali, S. H. H. A. *et al.* Controlled release and angiotensin-converting enzyme inhibition properties of an antihypertensive drug based on a perindopril erbumine-layered double hydroxide nanocomposite. *International Journal of Nanomedicine* (2012). doi:10.2147/IJN.S30461
- 27. Rives, V., del Arco, M. & Martín, C. Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review. *Appl. Clay Sci.* **88–89**, 239–269 (2014).
- 28. Yu, J., Chung, H.-E. & Choi, S.-J. Acute Oral Toxicity and Kinetic Behaviors of Inorganic Layered Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials* (2013). doi:10.1155/2013/628381
- 29. Sugano, K. *et al.* Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 597–614 (2010).

- 30. Rojas, R., Palena, M. C., Jimenez-Kairuz, A. F., Manzo, R. H. & Giacomelli, C. E. Modeling drug release from a layered double hydroxide–ibuprofen complex. *Appl. Clay Sci.* **62–63**, 15–20 (2012).
- 31. Saifullah, B. & Hussein, M. Z. B. Inorganic nanolayers: structure, preparation, and biomedical applications. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 5609–5633 (2015).
- 32. Saifullah, B., Hussein, M. Z., Hussein-Al-Ali, S. H., Arulselvan, P. & Fakurazi, S. Antituberculosis nanodelivery system with controlled-release properties based on para-amino salicylate–zinc aluminum-layered double-hydroxide nanocomposites. *Drug Des. Devel. Ther.* **7**, 1365–1375 (2013).
- 33. Kura, A. U., Ali, S. H. H. A., Hussein, M. Z., Fakurazi, S. & Arulselvan, P. Development of a controlledrelease anti-parkinsonian nanodelivery system using levodopa as the active agent. *International Journal of Nanomedicine* (2013). doi:10.2147/IJN.S39740
- 34. Ryu, S.-J., Jung, H., Oh, J.-M., Lee, J.-K. & Choy, J.-H. Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system. *J. Phys. Chem. Solids* **71**, 685–688 (2010).
- 35. Yin, H. *et al.* Amperometric nitrite biosensor based on a gold electrode modified with cytochrome c on Nafion and Cu-Mg-Al layered double hydroxides. *Microchim. Acta* **171**, 385–392 (2010).
- 36. Vial, S. *et al.* Nanohybrid-layered double hydroxides/urease materials: Synthesis and application to urea biosensors. *Mater. Sci. Eng. C* **26**, 387–393 (2006).
- 37. Wang, Q. & O'Hare, D. Recent Advances in the Synthesis and Application of Layered Double Hydroxide (LDH) Nanosheets. *Chem. Rev.* **112**, 4124–4155 (2012).
- Ladewig, K., Niebert, M., Xu, Z. P., Gray, P. P. & Lu, G. Q. (Max). Controlled preparation of layered double hydroxide nanoparticles and their application as gene delivery vehicles. *Appl. Clay Sci.* 48, 280– 289 (2010).
- Choy, J.-H., Kwak, S.-Y., Jeong, Y.-J. & Park, J.-S. Inorganic Layered Double Hydroxides as Nonviral Vectors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 4041–4045 (2000).

- Oh, J.-M., Choi, S.-J., Kim, S.-T. & Choy, J.-H. Cellular Uptake Mechanism of an Inorganic Nanovehicle and Its Drug Conjugates: Enhanced Efficacy Due To Clathrin-Mediated Endocytosis. *Bioconjug. Chem.* 17, 1411–1417 (2006).
- 41. Xu, Z. P. *et al.* Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **130**, 86–94 (2008).
- 42. Panda, H. S., Srivastava, R. & Bahadur, D. Synthesis and in situ mechanism of nuclei growth of layered double hydroxides. *Bull. Mater. Sci.* **34**, 1599–1604 (2011).
- 43. Sun, X., Neuperger, E. & Dey, S. K. Insights into the Synthesis of Layered Double Hydroxide (LDH) Nanoparticles: Part 1. Optimization and Controlled Synthesis of Chloride-Intercalated LDH. *J. Colloid Interface Sci.* **459**, 264–272 (2015).
- 44. Hibino, T. & Kobayashi, M. Delamination of layered double hydroxides in water. *J. Mater. Chem.* **15**, 653–656 (2005).
- 45. Wu, Q., Olafsen, A., Vistad, Ø. B., Roots, J. & Norby, P. Delamination and restacking of a layered double hydroxide with nitrate as counter anion. *J. Mater. Chem.* **15**, 4695–4700 (2005).
- 46. Berber, M., Hafez, I., Minagawa, K., Mori, T. & Tanaka, M. Versatile Nanocomposite Formulation System of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs of the Arylalkanoic Acids. in (2011). doi:10.5772/21077
- 47. Extremera, R., Pavlovic, I., Pérez, M. R. & Barriga, C. Removal of acid orange 10 by calcined Mg/Al layered double hydroxides from water and recovery of the adsorbed dye. *Chem. Eng. J.* **213**, 392–400 (2012).
- Li, F., Jin, L., Han, J., Wei, M. & Li, C. Synthesis and Controlled Release Properties of Prednisone Intercalated Mg–Al Layered Double Hydroxide Composite. *Ind. Eng. Chem. Res. - IND ENG CHEM RES* 48, (2009).

- Delamination of Layered Double Hydroxides Containing Amino Acids Chemistry of Materials (ACS Publications). Available at: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm048842a. (Accessed: 11th May 2018)
- 50. Olfs, H.-W., Torres-Dorante, L. O., Eckelt, R. & Kosslick, H. Comparison of different synthesis routes for Mg–Al layered double hydroxides (LDH): Characterization of the structural phases and anion exchange properties. *Appl. Clay Sci.* **43**, 459–464 (2009).
- 51. Wang, J. *et al.* A simple and reliable method for determining the delamination degree of nitrate and glycine intercalated LDHs in formamide. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **50**, 10130–10132 (2014).
- 52. Suganthi, K. S., Anusha, N. & Rajan, K. S. Low viscous ZnO–propylene glycol nanofluid: a potential coolant candidate. *J. Nanoparticle Res.* **15**, 1986 (2013).
- 53. Dhamelincourt, P. & Ramirez, F. J. Polarized Micro-Raman and FT-IR Spectra of L-Glutamine. *Appl. Spectrosc.* **47**, 446–451 (1993).
- 54. Mello, M. L. S. & Vidal, B. C. Changes in the Infrared Microspectroscopic Characteristics of DNA Caused by Cationic Elements, Different Base Richness and Single-Stranded Form. *PLOS ONE* **7**, e43169 (2012).