

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΦΥΛΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΣΤΟΙΒΑΞΗΣ
ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΜΗΤΡΩΝ LDH (ΣΤΟΙΒΑΓΜΕΝΩΝ ΔΙΠΛΩΝ
ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΩΝ) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΤΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

ΣΦΕΝΔΟΥΡΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
LABORATORY OF BIOCHEMISTRY



DOCTORAL THESIS

**A STUDY OF THE EXFOLIATION AND RESTACKING OF LDH
(LAYERED DOUBLE HYDROXIDE) INORGANIC MATRICES
WITH USE IN DRUG TARGETING**

SFENDOURAKIS GEORGIOS

THESIS SUPERVISOR: DEMETRIOS GHANOTAKIS

HERAKLION 2022

Εξεταστική Επιτροπή (αλφαβητικά)

Μαρία Βαμβακάκη

Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών Πανεπιστημίου Κρήτης

Δημήτριος Γανωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων)

Νικόλαος Ελευθεριάδης

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Παυλίδης

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Απόστολος Σπύρος

Αναπληρωτής καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Τσιώτης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Νικόλαος Χανιωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την υψηλού επιπέδου εκπαίδευση που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια, ξεκινώντας από το προπτυχιακό επίπεδο, μέχρι σήμερα. Ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας, επίσης, για τις υλικοτεχνικές υποδομές που μου διέθεσε για να μπορέσω να εκπληρώσω την παρούσα έρευνα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δημήτριο Γανωτάκη που με καθοδήγησε σε κάθε βήμα της ερευνητικής σταδιοδρομίας τα τελευταία 7 χρόνια, από την αρχή της διπλωματικής μου εργασίας μέχρι και την εκπόνηση της παρούσας έρευνας. Τον ευχαριστώ που με δίδαξε καλά το δρόμο της έρευνας, πάντοτε προσφέροντας βοήθεια και κατευθύνοντάς με στις σωστές ερωτήσεις. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω επίσης για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλον αυτόν τον καιρό, επιτρέποντάς μου να ακολουθήσω μια ερευνητική πορεία που μετέτρεψε απλές ιδέες σε πειραματικά αποτελέσματα. Είμαι βαθιά ευγνώμων που υπήρξε στο πλάι μου σαν άνθρωπος και με στήριξε σε κάθε βήμα που χρειάστηκα σαν ερευνητής.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, καθηγητές Γεώργιο Τσιώτη και Νικόλαο Χανιωτάκη, για τις συμβουλές που μου προσέφεραν αυτά τα χρόνια. Οι γνώσεις τους στη βιοχημεία και την ανάλυση ανόργανων ουσιών, ήταν καταλυτικές για την πραγματοποίηση των πειραμάτων που περιγράφονται σε αυτή την έρευνα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής, καθηγήτρια Μαρία Βαμβακάκη, επίκουρο καθηγητή Νικόλαο Ελευθεριάδη, επίκουρο καθηγητή Ιωάννη Παυλίδη και αναπληρωτή καθηγητή Απόστολο Σπύρο, που δέχτηκαν να αφιερώσουν το χρόνο τους για να κρίνουν την παρούσα διατριβή και να τη βελτιώσουν με τις παρατηρήσεις τους.

Πολύ θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη του εργαστηρίου που τόσα χρόνια συνεργαστήκαμε εποικοδομητικά, ανταλλάσσοντας τακτικά ιδέες και διαφορετικές απόψεις, που έσπρωξαν την έρευνα στο επίπεδο που είναι σήμερα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δημήτριο Στεφανάκη που υπήρξε μέντοράς μου και με εξαιρετική υπομονή με δίδαξε τις βάσεις πάνω στις οποίες

στηρίχθηκε η παρούσα έρευνα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια και τον δεύτερο μέντορα και φίλο μου μεταδιδακτορικό ερευνητή Θεοχάρη Νάζο, που με δίδαξε πώς πρέπει να είναι ένας σωστός ερευνητής και με βοήθησε να διαμορφώσω έναν επιστημονικό τρόπο σκέψης. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τα μέλη που συνεργαστήκαμε εκτενώς πάνω σε αυτό το επιστημονικό πεδίο, Μιχάλη Σαρουκιάδη και Δέσποινα Δεσποτοπούλου, καθένας από τους οποίους συνέβαλε στην προώθηση της έρευνας. Τέλος, ιδιαίτερη ευχαριστία θα ήθελα να δώσω στους υποψήφιους διδακτορικούς ερευνητές Μάνο Κοκαράκη και Ναπολέον Στρατηγάκη για τη συμπαράστασή τους στις δύσκολες στιγμές που υπήρξαν μέσα σε αυτά τα χρόνια.

Οφείλω να ευχαριστήσω βαθιά και τα εργαστήρια που συνεργαστήκαμε κατά τη διεκπεραίωση της έρευνας. Αρχικά, ευχαριστώ το εργαστήριο Χημείας Υλικών του καθηγητή Παντελή Τρικαλίτη, τα μέλη του οποίου με δίδαξαν το χειρισμό και τις βάσεις του XRD. Παρόμοια αναπόσπαστη βοήθεια προσέφερε η Μαρία Φουσκάκη του εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας του καθηγητή Νικόλαου Χανιωτάκη, την οποία ευχαριστώ για τις γνώσεις που μου μετέδωσε στη μελέτη και το χειρισμό του IR φασματοφωτομέτρου του εργαστηρίου τους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη το εργαστήριο Πολυμερών της καθηγήτριας Μαρίας Βαμβακάκη για τη βοήθειά τους με τις μετρήσεις DLS, καθώς και τον Λάμπρο Παπουτσάκη του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ, για τις πολλές ώρες που αφιέρωσε μαζί μου στις μετρήσεις υγρού XRD.

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθιά την οικογένειά μου και ιδιαιτέρως τη μητέρα μου, για τη συνεχή στήριξη που μου προσέφερε σε κάθε βήμα, μικρό ή μεγάλο, που με έφερε ως εδώ.

Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) στο πλαίσιο του έργου με τίτλο «Ανάπτυξη καινοτόμων Βιοκαταλυτικών διεργασιών για τη μετατροπή οينوποιητικών αποβλήτων σε προϊόντα λίπανσης και θρέψης» (Τ2ΕΔΚ-00523 με MIS 5063788)



ΕΠΑνΕΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΦΕΝΔΟΥΡΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ημερομηνία γέννησης: 3/9/1993
Διεύθυνση: Ηράκλειο Κρήτης (Ελλάδα) 71202
Τηλέφωνο: (+30) 698 169 5777
Διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου: geosfen1@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

11/2017–Σήμερα: **Υποψήφιος Διδάκτωρ Χημείας**

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα)
Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής: Μελέτη αποφυλλοποίησης και επαναστοίβαξης ανόργανων μητρών LDH (Στοιβαγμένων Διπλών Υδροξειδίων) με χρήση στη στόχευση φαρμάκων (Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

10/2015–11/2017: **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη Βιοχημεία**

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα)
Μέσος όρος μεταπτυχιακών μαθημάτων: Άριστα (8,67/10)
Τίτλος Διατριβής: Σύθεση και χαρακτηρισμός νανοβιοϋβριδίων LDH (Στοιβαγμένων Διπλών Υδροξειδίων). (Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

09/2011–07/2015: **Πτυχίο Χημείας**

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα)
Βαθμός: Λίαν Καλώς (7,52/10)
Διπλωματική Εργασία: Σύθεση νανοϋβριδίων πρωτοπορφυρίνης IX σε στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια και μήτρα αλγινικού ασβεστίου (Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

10/2020–10/2021: **Επιστημονικός Συνεργάτης** στο Ερευνητικό Πρόγραμμα «Ανάπτυξη καινοτόμων Βιοκαταλυτικών διεργασιών για τη μετατροπή οινοποιητικών αποβλήτων σε προϊόντα λίπανσης και θρέψης».
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Επιστημονικά υπεύθυνος: Καθ. Νικόλαος Χανιωτάκης

07/2014–10/2014: **Πρακτική** στο Γενικό Χημείο του Κράτους
Τμήμα ανάλυσης τροφίμων

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα: Ελληνικά

Αγγλικά: International English Language Testing System (IELTS) 8.0

Γερμανικά: Goethe-Zertifikat B2

Οργανωτικές δεξιότητες: Διαχείριση ομάδας (Τρεις φορές αρχηγός ομάδων σε συνέδρια Model of the United Nations).

Επίλυση προβλημάτων

Δημιουργία και τήρηση προθεσμιών (Καλλιεργήθηκε μέσω πολλαπλών προφορικών παρουσιάσεων καθώς και άλλων έργων με αυστηρές προθεσμίες.)

Τεχνικές δεξιότητες:

Κυτταρικές καλλιέργειες: Ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα, βακτήρια

Απομόνωση και χαρακτηρισμός πρωτεϊνών μέσω πολλαπλών τεχνικών ηλεκτροφόρησης gel

Βασικά στοιχεία PCR

Σύνθεση και χαρακτηρισμός υλικών: Περίθλαση ακτίνων Χ, φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας, θερμοσταθμική ανάλυση, Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, Ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης, φασματοσκοπία ακτίνων Χ διασποράς ενέργειας, δυναμική σκέδαση φωτός

Μεταφορά φαρμάκων

Υπολογιστική Βιολογία: κώδικας R, βασικές γνώσεις Fortran, Python και Bash

Ψηφιακές δεξιότητες:

Βεβαίωση επαρκούς γνώσης πληροφορικής και χειρισμού Η/Υ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Γνώσεις linux και προγραμματισμού σε R, Τμήμα Επιστήμης Υπολογιστών, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Δημοσιεύσεις: Nazos, T.T., Kokarakis, E.J., Valsami, E. Stratigakis, N.S., Poloniataki, E.G., Sfindourakis, G.P., Ghanotakis, D.F. Characterization of a novel herbicide and antibiotic-resistant *Chlorella sp.* with an extensive extracellular matrix. *Photosynth Res* **143**, 315–334 (2020)

Συνέδρια: **6^ο συνέδριο εις μνήμην της Dr Μαρίας Χατζημαρινάκη** «Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανούβριδίων με βιολογικές εφαρμογές» (προφορική παρουσίαση)

18^ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας. Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα, 26-28 Μαρτίου 2016. «*Σύνθεση και χαρακτηρισμός ναουόβριδίων πρωτοπορφυρίνης IX παγιδευμένης σε μήτρα LDH*».

Σεμινάρια: **Εργαστήρια MITOS για τη μεταφορά τεχνολογίας και τη δημιουργία πατεντών, οργανωμένα σε συνεργασία του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Bizrupt (2020-2021)**

- Ενημερωτικές ομιλίες από επαγγελματίες στον τομέα της εμπορικής αξιοποίησης της έρευνας, της επιχειρηματικότητας και της καινοτομίας
- Βιωματική εκπαίδευση μέσω πρακτικής άσκησης σε πραγματικές περιπτώσεις
- Συνεδρίες καθοδήγησης
- Δικτύωση με επαγγελματίες στον τομέα της εμπορικής αξιοποίησης της έρευνας

Συνέδρια στη Βιολογία και τη Χημεία Ωνάση 2019– Επεξεργασία Γονιδιώματος

Συνέδρια στη Βιολογία και τη Χημεία Ωνάση 2018– Η ευκαρυωτική μεταγραφή και η ρύθμισή της

Ημερίδα με θέμα «Λιποσωματικά αντικαρκινικά φάρμακα στην τρέχουσα αγορά. Caelyx, Myocet. Μια μελέτη περίπτωσης» 2019

Δενδρίτες 2018: Δενδρική ανατομία, μόρια και λειτουργία (Εργαστήριο EMBO)

CURRICULUM VITAE

SFENDOURAKIS GEORGIOS

PERSONAL INFORMATION

Date of birth: 3/9/1993
Address: Heraklion, Crete, Greece, 71202
Phone number: (+30) 698 169 5777
E-mail: geosfen1@gmail.com

EDUCATION AND TRAINING

- 11/2017–Today: **PhD candidate**
Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion (Greece)
Doctoral Thesis Title: A study of the exfoliation and restacking of LDH (Layered Double Hydroxide) inorganic matrices with use in drug targeting (Thesis Supervisor: Professor Demetrios Ghanotakis)
- 10/2015–11/2017: **Master of Sciences (MSc) in Biochemistry**
Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion (Greece)
Average Grade of Examined Subjects: Excellent (8.67/10)
Master Thesis Title: Synthesis and characterization of LDH (Layered Double Hydroxide) bionanohybrids.(Thesis Supervisor: Professor Demetrios Ghanotakis)
- 09/2011–07/2015: **Degree in Chemistry**
Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion (Greece)
Grade: 7.52/10
Bachelor Thesis: Synthesis of bionanohybrids of protoporphyrin IX in layered double hydroxides and calcium alginate matrix. (Thesis Supervisor: Professor Demetrios Ghanotakis)

WORK AND RESEARCH EXPERIENCE

- 10/2020–10/2021: **Research associate** in the research program “ Development of Innovative Biocatalytic Processes for the Conversion of Wine Waste into Fertilization and Nutrition Products”.
University of Crete, Department of Chemistry, P.I.: Professor Nikolaos Chaniotakis
- 07/2014–10/2014: **Internship** at the General Chemical State Laboratory in Heraklion, Department of Food Analysis

PERSONAL SKILLS

- Native Tongue: Greek
- English: International English Language Testing System (IELTS) 8.0
German: Goethe-Zertifikat B2
- Organisational / managerial skills: Team management (Three times leader of teams in Model of the United Nation conferences.)
Problem solving (due to sometimes lack of proper equipment, constant discovery of alternate experimental pathways was a necessity.)
Creating and keeping deadlines (Gained through multiple oral presentations as well as other projects with strict deadlines.)
- Job-related skills: Cell cultures: Human epithelial cancer cells, bacteria
Isolation and Characterization of Proteins through multiple gel electrophoresis techniques
PCR basics
Synthesis and characterization of materials: X-ray diffraction, infrared spectroscopy, thermostathmic analysis, Scanning Electron Microscopy, Transmission Electron Microscopy, Energy-dispersive X-ray spectroscopy, Dynamic Light Scattering
Drug Delivery
Computational Biology: coding in R, basic coding in Fortran, Python and Bash
- Digital competence: Certification of competency in computer use, Department of Chemistry, University of Crete
Knowledge of linux and coding in R, Department of Computer Science, University of Crete

ADDITIONAL INFORMATION

- Publications: Nazos, T.T., Kokarakis, E.J., Valsami, E. Stratigakis, N.S., Poloniataki, E.G., Sfindourakis, G.P., Ghanotakis, D.F. Characterization of a novel herbicide and antibiotic-resistant *Chlorella* sp. with an extensive extracellular matrix. *Photosynth Res* **143**, 315–334 (2020)
- Conferences: **6th Conference in memory of Dr. Maria Chatzimarini** «Synthesis and characterization of nanohybrids with biological applications»
- 18° Postgraduates' Conference on Chemistry**. Heraklion, Crete, Greece, March 26-28, 2016. “*Synthesis and characterization of protoporphyrin IX nanohybrids trapped in LDH matrix*” (Oral presentation)

Seminars: **MITOS technology transfer and patenting courses organized in collaboration by the University of Crete and Bizrupt (2020-2021)**

- Informative talks by professionals in the field of commercial utilization of research, entrepreneurship and innovation
- Experiential training through internships in real case studies
- Mentoring sessions
- Networking with professionals in the field of commercial utilization of research.

Onassis Lectures 2019 in Biology and Chemistry – Genome Editing

Onassis Lectures 2018 in Biology and Chemistry – Eukaryotic Transcription and its Regulation

Workshop on “Liposomic anticancer drugs in the current market. Caelyx, Myocet. A case study” 2019

Dendrites 2018: Dendritic anatomy, molecules and function (EMBO Workshop)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της σύνθεσης βιοανόργανων συμπλόκων, με παγίδευση οργανικών ουσιών στο εσωτερικό στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων. Στα πλαίσια της διατριβής εξετάστηκε πληθώρα μορίων με βιολογικές εφαρμογές, με ιδιαίτερη έμφαση σε αμινοξέα και σε μόρια δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος. Επιπλέον μελετήθηκαν τροποποιήσεις στην παραπάνω ανόργανη μήτρα για τη βελτιστοποίηση της χωρητικότητάς της.

Αρχικά περιγράφεται η επιτυχημένη σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων με τη χρήση μαγνησίου και αλουμινίου σε αναλογία 2 προς 1. Η ανόργανη μήτρα χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την παγίδευση ανιόντων ασκορβικού, γαλακτικού, οξικού και χολικού οξέος, καθώς και του φαρμάκου νιτροφουραντοΐνη. Τα νανοβιοϋβρίδια αυτά χαρακτηρίστηκαν με περίθλαση ακτίνων Χ (XRD) και φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).

Εν ακολούθως, μελετήθηκε η αποφυλλοποίηση των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων με τη χρήση δύο νέων μεθόδων, συγκεκριμένα την κατεργασία με υπερήχους μήτρας διαλυμένης σε γλυκερίνη και προπυλενογλυκόλη ξεχωριστά. Οι μέθοδοι αυτοί συγκρίθηκαν με τις πιο αποτελεσματικές ήδη υπάρχουσες μεθόδους αποφυλλοποίησης. Η αποφυλλοποίηση εξακριβώθηκε με τη χρήση δυναμικής σκέδασης φωτός και περίθλασης ακτίνων Χ υγρού (liquid XRD), ενώ ακολούθησαν πειράματα ελέγχου σταθερότητας, τα οποία έδειξαν πως οι νέοι διαλύτες εμφανίζουν προφίλ αποφυλλοποίησης καλύτερο από άλλες - εδραιωμένες στη βιβλιογραφία - μεθόδους.

Οι παραπάνω τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή ουσιών στο εσωτερικό στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων με επαναστοίβαξη. Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε σαν μια εναλλακτική στην ακριβότερη μέθοδο συγκαταβύθισης, που χρησιμοποιείται εκτενώς για την εισαγωγή δύσκολων προς παγίδευση μορίων, όπως των αμινοξέων. Με τη χρήση αυτής έγινε σύνθεση 16 νανοβιοϋβριδίων LDH με παγιδευμένα αμινοξέα, τα οποία συγκρίθηκαν με όμοια που συντέθηκαν με ανιονανταλλαγή. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη βιβλιογραφία, δείχνοντας πως η επαναστοίβαξη έχει πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μεθόδων σύνθεσης νανοβιοϋβριδίων LDH και μπορεί να οδηγήσει σε επιτυχημένες συνθέσεις σε σημεία που ανιονανταλλαγή δεν μπορούσε. Ταυτόχρονα

μέσα από τα πειράματα αυτά αναδεικνύονται ελαττώματα στις διαδικασίες καθαρισμού που ακολουθούνται ευρέως στις συνθέσεις LDH, εφόσον τονίζουν τη σημασία του μέσου καθαρισμού και πώς αυτό επηρεάζει το τελικό νανοβιοϋβρίδιο.

Τέλος, εξετάστηκε η ικανότητα της επαναστοίβαξης να εκμεταλλευτεί την αυξημένη δραστική επιφάνεια των αποφυλλοποιημένων στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων και να χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή ουσιών που δε μπορούν να εγκλωβιστούν εύκολα λόγω μεγέθους, όπως το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ.

Λέξεις κλειδιά: στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια (LDH), νανοβιοϋβρίδια, αποφυλλοποίηση, επαναστοίβαξη, μεταφορά φαρμάκων, νιτροφουραντοΐνη, αμινοξέα, χολικό οξύ, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, ασκορβικό οξύ, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA)

ABSTRACT

The aim of this thesis was the synthesis of bioinorganic complexes, developed through the entrapment of organic substances inside layered double hydroxides. A plethora of molecules with biologic applications was examined, with emphasis on amino acids and deoxyribonucleic acid, while at the same time alterations to the inorganic matrix with the purpose of improving its capacity were investigated.

The successful synthesis of layered double hydroxides, composed of magnesium and aluminum in a 2 to 1 ratio, is described. The inorganic matrix was then used to entrap anions of ascorbate, lactate, acetate and cholate, as well as the drug nitrofurantoin. These nanobiohybrids were characterized by x-ray diffraction (XRD) and infrared spectroscopy (IR).

The exfoliation of layered double hydroxides through two new methods was examined, more specifically through sonication of the matrix dissolved in glycerol or propyleneglycol. These methods were subsequently compared to the most efficient already established methods of exfoliation. The exfoliation was confirmed through dynamic light scattering and liquid x-ray diffraction (liquid XRD), and was followed by examination of its stability, which showed that the new solvents have a better exfoliation profile than those established in the literature.

The above techniques were then used to insert molecules inside layered double hydroxides through restacking. This method was investigated as an alternative to the expensive coprecipitation, which is widely used to insert molecules, such as amino acids. By using restacking, 16 LDH nanobiohybrids containing amino acids were then synthesized and compared to similar ones prepared by anion exchange. The results were compared to those in the literature, and it was demonstrated that restacking has advantages over other methods of synthesizing LDH nanobiobrids and could lead to successful synthesis in experiments where anion exchange could not be used. In addition, through these experiments, problems in the purification processes that are usually developed during LDH synthesis are highlighted, emphasizing the importance of the medium used during the purification process and how this affects the final nanobiobrid.

Finally, the advantage of the increased active surface of the exfoliated LDH and subsequent restacking was examined in order to insert molecules that cannot easily be inserted because of their size, such as deoxyribonucleic acid.

Keywords: layered double hydroxides (LDH), nanobiohybrids, exfoliation, restacking, drug delivery, nitrofurantoin, amino acids, cholic acid, lactic acid, acetic acid, ascorbic acid, deoxyribonucleic acid (DNA)

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

LDH:	Στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια
dLDH:	Αποφυλλοποιημένα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια
XRD:	Περίθλαση ακτίνων Χ
IR:	Υπέρυθρο
DLS:	Δυναμική σκέδαση φωτός
EDS:	Φασματοσκοπία ακτίνων Χ με ενεργειακή διασπορά
PG:	Προπυλενογλυκόλη
VG:	Γλυκερίνη
DNA:	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	1
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	4
CURRICULUM VITAE.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10
ABSTRACT	12
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
1.1 Νανοϋλικά.....	17
1.2 Κατηγορίες νανοϋλικών.....	17
1.3 Νανοβιοϋβριδικά υλικά.....	19
1.4 Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.....	21
1.4.1 Εισαγωγή.....	21
1.4.2 Τρόποι στόχευσης.....	24
1.4.3 Κατηγορίες συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων.....	26
1.5 Στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια.....	27
1.5.1 Εισαγωγή.....	27
1.5.2 Δομή.....	28
1.5.3 Ιδιότητες.....	29
1.5.4 Τρόποι σύνθεσης.....	30
1.5.5 Αποφυλλοποιημένα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια.....	32
1.5.6 Χαρακτηρισμός.....	33
1.5.7 Εφαρμογές.....	39
1.6 Γονιδιακή θεραπεία.....	42
1.7 Σκοπός.....	46
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	47
2.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων.....	47
2.2 Συνθέσεις με ανιονανταλλαγή.....	48
2.3 Συνθέσεις με αποφυλλοποίηση.....	50
2.3.1 Μέθοδοι αποφυλλοποίησης.....	50
2.3.2 Συνθέσεις με αποφυλλοποιημένα διπλά υδροξείδια.....	51

2.4 Χαρακτηρισμός	52
2.5 Μελέτη σταθερότητας αποφυλλοποίησης LDH	53
2.6 Μελέτη LDH-DNA με γέλη αγαρόζης	53
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
3.1 Χαρακτηρισμός συνθέσεων LDH με ανιονανταλλαγή	54
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-NO ₃ :.....	54
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-χολικού οξέος:	56
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-nitrofurantoin:	58
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-οξικού:	60
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-γαλακτικού:	62
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-βιταμίνη C:.....	64
3.2 Ανάλυση αποφυλλοποιημένου LDH (dLDH).....	66
LDH (Mg-Al) με παγιδευμένα αμινοξέα:.....	71
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Asp:	73
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Glu:	76
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Gln:	79
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Cys:.....	81
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Trp:.....	84
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Phe:	86
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Tyr:.....	89
Συμπεράσματα συνθέσεων με αμινοξέα	92
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-DNA:.....	93
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	99
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	101
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	107

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νανοϋλικά

Τις τελευταίες δεκαετίες η νανοτεχνολογία έχει εξελιχθεί σε ένα πολύ ενεργό πεδίο έρευνας και έναν τεχνοοικονομικό τομέα με πλήρη επέκταση σε πολλές κατηγορίες εφαρμογών. Κεντρικό ρόλο σε αυτόν τον επιστημονικό τομέα έχουν τα νανοϋλικά, τα οποία όλο και περισσότερο εδραιώνονται σε κάθε πτυχή της ζωής μας. Με τον όρο νανοϋλικά αναφερόμαστε σε υλικά των οποίων το μήκος τουλάχιστον μίας διάστασης κυμαίνεται μεταξύ 1-100 nm. Το ενδιαφέρον για αυτά προκύπτει από τις νέες ιδιότητες που εμφανίζουν λόγω του μικρού μεγέθους τους. Πιο συγκεκριμένα, διαθέτουν πολλαπλάσια μεγαλύτερη ενεργή επιφάνεια, δίνοντάς τους ενισχυμένες φυσικοχημικές ιδιότητες¹ και κάνοντάς τα πολύ ελκυστικά σαν καταλύτες^{2, 3}. Ταυτόχρονα η υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο, μαζί με τα κβαντικά φαινόμενα⁴ που εμφανίζουν λόγω μεγέθους, δίνει στα νανοσωματίδια σαφώς διαφορετικές ιδιότητες (χημικές, ηλεκτρονικές, οπτικές, μαγνητικές και μηχανικές⁵) από αυτές των παραδοσιακών υλικών.

Λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους τα νανοϋλικά έχουν βρει ποικίλες εφαρμογές σε πάρα πολλούς διαφορετικούς τομείς συμπεριλαμβανομένων αγωγών⁶, ηλεκτρονικών συσκευών⁷, αισθητήρων^{8, 9}, φωτοβολταϊκών¹⁰, χορήγηση φαρμάκων^{11, 12}, κυψέλες καυσίμων^{13, 14}, διόδων εκπομπής φωτός¹⁵, κβαντικών συρμάτων¹⁶, κβαντικών συσκευών¹⁷, καλλυντικών¹⁸, βαφών¹⁹, τροφίμων²⁰, κατάλυσης²¹, αλλά και με στόχο την προστασία του περιβάλλοντος²². Ιδιαίτερα στην τελευταία περίπτωση τα νανοϋλικά έρχονται σαν μία μοναδική λύση για την αποκατάσταση υδάτων υπερφορτωμένων με τοξικές ουσίες²³⁻²⁵.

1.2 Κατηγορίες νανοϋλικών

Οι ιδιότητες των νανοσωματιδίων²⁶ εξαρτώνται έντονα από το ξεχωριστό σχήμα, το μέγεθός τους, τα περιβάλλοντα μέσα, τη μέθοδο κατασκευής τους και ιδιαίτερα από τα υλικά που τα αποτελούν. Έτσι, σήμερα τα νανοϋλικά χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες βασισμένες στα υλικά κατασκευής τους.

(α) Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα: Γενικά, αυτά τα νανοϋλικά περιέχουν άνθρακα και βρίσκονται σε μορφολογίες όπως κοίλοι σωλήνες, ελλειψοειδή ή σφαίρες. Τα φουλερένια, οι νανοσωλήνες άνθρακα, οι νανοϊνες άνθρακα, η αιθάλη, το γραφένιο και τα «κρεμμύδια» άνθρακα περιλαμβάνονται στην κατηγορία νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα. Η αφαίρεση με λέιζερ, η εκκένωση τόξου και η εναπόθεση χημικών ατμών είναι σημαντικές μέθοδοι για την κατασκευή αυτών των υλικών.

(β) Νανοϋλικά ανόργανης βάσης: Αυτά τα νανοϋλικά περιλαμβάνουν νανοσωματίδια μετάλλων και οξειδίων μετάλλων. Μπορούν να συντεθούν με μέταλλα όπως Au ή Ag, οξείδια μετάλλων όπως TiO_2 ή ZnO και ημιαγωγούς όπως πυρίτιο και κεραμικά. Σε αυτήν την κατηγορία εντάσσονται και οι νανοπυλοί, όπως ο υδροξυαπατίτης, καθώς και τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια, τα οποία είναι στη βάση της παρούσας έρευνας.

(γ) Νανοϋλικά οργανικής βάσης: Αυτά περιλαμβάνουν νανοϋλικά που παράγονται κυρίως από οργανική ύλη, εξαιρουμένων των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα ή τα ανόργανα. Η χρήση μη ομοιοπολικών (ασθενών) αλληλεπιδράσεων για την αυτοσυναρμολόγηση και το σχεδιασμό των μορίων βοηθά στο μετασχηματισμό των οργανικών νανοϋλικών σε επιθυμητές δομές όπως δενδριμερή, μικκύλια, λιποσώματα και πολυμερή νανοσωματίδια.

(δ) Νανοϋλικά βασισμένα σε σύνθετα υλικά: Τα σύνθετα νανοϋλικά είναι πολυφασικά νανοσωματίδια με μία φάση στις διαστάσεις της νανοκλίμακας, που μπορούν να συνδυάσουν διαφορετικά ήδη νανοσωματιδίων μεταξύ τους ή και με άλλα υλικά εκτός της νανοκλίμακας (π.χ. υβριδικές νανοϊνες) ή πιο περίπλοκες κατασκευές, όπως μεταλλικά-οργανικά πλαίσια. Τα σύνθετα υλικά μπορεί να είναι οποιοδήποτε συνδυασμοί νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, μέταλλο ή οργανική βάση με οποιαδήποτε μορφή μεταλλικών, κεραμικών ή πολυμερών υλικών.

Ένα δεύτερο σύγχρονο σύστημα ταξινόμησης για τα νανοϋλικά βασίζεται στην κίνηση των ηλεκτρονίων κατά μήκος των διαστάσεων των νανοϋλικών. Πιο συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια σε 0D νανοϋλικά (κβαντικές τελείες) είναι παγιδευμένα σε αδιάστατο χώρο, ενώ στα 1D νανοϋλικά (νανοσωλήνες) έχουν ηλεκτρόνια που μπορούν να κινηθούν κατά μήκος του άξονα x, ο οποίος είναι μικρότερος από 100 nm. Ομοίως, τα 2D (νανοφίλμ) και 3D (μεταλλικοί οργανικοί σκελετοί) νανοϋλικά έχουν κίνηση ηλεκτρονίων κατά μήκος του

επιπέδου $x-y$ και του χώρου x, y, z της νανοκλίμακας²⁷. Τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια, που μελετώνται στη συνέχεια, ανήκουν στην 2D κατηγορία, καθώς τα ηλεκτρόνια κινούνται κατά μήκος κάθε μοναδιαίου φύλλου, παρότι έχουν τρισδιάστατη δομή όταν στοιβάζονται.

Τέλος, τα νανοϋλικά μπορούν να ταξινομηθούν ως φυσικά ή συνθετικά, με βάση την προέλευσή τους. Τα φυσικά νανοϋλικά παράγονται στη φύση είτε από βιολογικά είδη είτε μέσω ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Είναι άφθονα σε κάθε σφαίρα της γης, ιδιαίτερα τη λιθόσφαιρα, ενώ πολλά που παράγονται στους οργανισμούς, τραβούν το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών προς μίμηση. Τα συνθετικά (μηχανικά) νανοϋλικά παράγονται με μηχανική λείανση και καπνό ή συντίθενται με φυσικές, χημικές, βιολογικές ή υβριδικές μεθόδους.

1.3 Νανοβιοϋβριδικά υλικά

Η ταυτόχρονη ανάπτυξη της επιστήμης υλικών και της βιολογίας οδήγησε στη συνάντηση των δύο επιστημονικών πεδίων στα νανοβιοϋβριδικά υλικά, ένα νέο διεπιστημονικό χώρο όπου συναντάται η χρήση νανοϋλικών με τη βιοτεχνολογία²⁸. Το πεδίο των νανοβιοϋβριδικών υλικών είναι ένα από τα πιο υποσχόμενα και γρήγορα αναπτυσσόμενα στη χημεία υλικών^{29, 30}. Τα υλικά αυτά ορίζονται ως συνθετικά υλικά με οργανικά και ανόργανα τμήματα τα οποία συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς (Τάξη 1) ή με ομοιοπολικούς δεσμούς (Τάξη 2), με μέγεθος στην κλίμακα των νανομέτρων. Οι ατελείωτοι δυνατοί συνδυασμοί των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων ανόργανων, οργανικών και βιοενεργών υλικών σε ένα μοναδικό νανοσωματίδιο, με κυτταρικές ή νάνο- διαστάσεις, έχουν τραβήξει μεγάλο ενδιαφέρον. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στη δημιουργία ενός τεράστιου αριθμού καινοτόμων υλικών με καλά ελεγχόμενες ιδιότητες και πολλαπλές δομές. Τυπικά ανόργανα συστατικά των νανοβιοϋβριδίων αποτελούν τα μεταβατικά μέταλλα και σωματίδια άνθρακα, οξείδια και υδροξείδια μετάλλων, πυρίτια, πυριτικά άλατα, ανθρακικά άλατα και φωσφορικά άλατα. Η συγγένεια μεταξύ των ανόργανων και των βιοοργανικών τμημάτων, η οποία καθορίζει τη σταθερότητα των βιοσύνθετων υλικών που προκύπτουν, εξαρτάται από τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης που διέπουν τις διαδικασίες συναρμολόγησης.

Παράλληλα με τη ραγδαία ανάπτυξη των νέων υβριδικών υλικών, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στις τεχνικές σύνθεσης των νανοβιοϋβριδίων. Πολλές από αυτές έχουν να κάνουν με την προετοιμασία υλικών εμπνευσμένων από παραδείγματα της φύσης όπως τα οστά³¹, δόντια, ή και διάφορα κελύφη. Τα υλικά αυτά διαθέτουν μοναδικές δομικές ιδιότητες χάρη στην ιδιαίτερη διευθέτηση των βιολογικών και ανόργανων τμημάτων τους. Τα κελύφη αποτελούν το καλύτερο παράδειγμα φυσικού βιοϋλικού, το οποίο σχηματίζεται στοιβάζοντας ανθρακικό ασβέστιο στερεωμένο με ινώδεις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια υπερδομή με πολύ καλύτερες δομικές ιδιότητες από το σκέτο ανθρακικό ασβέστιο³². Σήμερα, νανοβιοϋβρίδια μιμούμενα αυτά τα φυσικά υλικά παρασκευάζονται με στόχο την ανάπτυξη υλικών με βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες, που θα είναι βιοσυμβατά και θα διαθέτουν άλλα ενδιαφέροντα βιοανόργανα χαρακτηριστικά³³. Στο πλαίσιο αυτό φαίνεται να είναι εξαιρετικής σημασίας, η ανάπτυξη βιοϋβριδικών συστημάτων τα οποία μιμούνται βιολογικές συνθέσεις, όπως η μέθοδος βιοορυκτοποίησης, όπως αυτή λαμβάνει χώρα στο κυτταρικό τοίχωμα των διατόμων, όπου νανοσφαιρίδια πυριτίου στοιβάζονται από κατιονικά πολυπεπτίδια ονομαζόμενα σιλαφίνες. Βασισμένοι σε αυτά τα φυσικά συστήματα, οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ κολλοειδούς πυριτίου και πεπτιδίων έχουν μελετηθεί ιδιαίτερω με στόχο την κατανόηση των διεργασιών βιοορυκτοποίησης και κατά συνέπεια την ανάπτυξη, με ελεγχόμενο τρόπο, νέων βελτιωμένων συνθετικών νανοβιοϋβριδίων.

Όπως επισημάνθηκε παραπάνω, η ανάπτυξη νανοβιοϋβριδίων με τη μίμηση ανόργανων βιοκατασκευών, αντιπροσωπεύει μια εξαιρετικά χρήσιμη προσέγγιση. Αυτό ισχύει, για παράδειγμα, για τα νανοβιοϋβρίδια που βασίζονται σε προσεγγίσεις βιομιμητικής, τα οποία παρουσιάζουν εξαιρετικές δομικές ιδιότητες και βιοσυμβατότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα νανοϋβρίδια που παρασκευάζονται με συναρμολόγηση υδροξυαπατίτη, ο οποίος είναι το κύριο συστατικό κοκάλων και δοντιών, μαζί με βιοπολυμερή, όπως κολλαγόνο³⁴. Ένα άλλο εξελισσόμενο τομέα, αποτελεί η επικάλυψη των μικρο-ή νανο-σωματιδιακών στερεών με βιοπολυμερή μέσω μηχανισμών σύνδεσης με το υδρογόνο ή με συμπλοκοποίηση μετάλλων. Με αυτόν τον τρόπο, η συναρμολόγηση μαγνητικών νανოსωματιδίων οξειδίου του σιδήρου με βιοπολυμερή επιτρέπει την παρασκευή μαγνητικών νανοβιοϋβριδίων που εφαρμόζονται σε απεικόνιση NMR³⁵. Εξίσου σημαντική είναι επίσης η χρήση κβαντικών τελειών ως δεικτών φθορισμού

για την απεικόνιση βιομορίων και κυττάρων^{36, 37}. Οι μοναδικές οπτικές ιδιότητες καθώς και η δυνατότητα πρόσδεσης βιομορίων στην επιφάνειά τους καθιστούν τις κβαντικές τελείες καταλληλότερους δείκτες σε εφαρμογές απεικόνισης από τα οργανικά φθορίζοντα μόρια.

Η συναρμολόγηση βιοπολυμερών με ανόργανα στρώματα στερεών μπορεί να οδηγήσει σε νανοβιοϋβρίδια στα οποία το βιοπολυμερές παρεμβάλλεται μεταξύ των στρωμάτων των ανόργανων ξενιστών. Η παρεμβολή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που μπορεί ταυτόχρονα να περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς. Εκτός από τη σύνδεση υδρογόνου, έχει αναφερθεί ότι ορισμένα βιοπολυμερή αλληλεπιδρούν με τα ανόργανα στρώματα μέσω ιοντικών δεσμών. Αυτή είναι και η περίπτωση των πολυσακχαριτών, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων που μπορούν να ενεργούν ως παρεμβαλλόμενοι πολυηλεκτρολύτες, μέσω αντίδρασης ανταλλαγής ιόντων, σε στερεά που διαθέτουν θετικά ή αρνητικά φορτισμένα στρώματα, όπως τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια, ή οι πηλοί σμεκτίτη. Η ιατρική και η φαρμακευτική επωφελούνται σε μεγάλο βαθμό από την ανάπτυξη τέτοιων υλικών τα οποία όντας βιοσυμβατά και με ελεγχόμενη δομή, μπορούν να βρουν εφαρμογή σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.

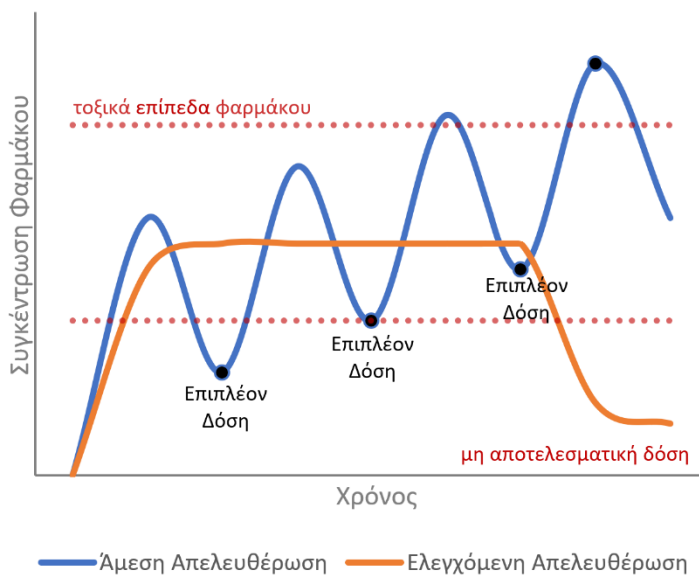
1.4 Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

1.4.1 Εισαγωγή

Συμβατικά, η χορήγηση φαρμάκων περιλαμβάνει την άμεση παροχή του φαρμάκου από το στόμα ή ενδοφλεβίως. Πρόσφατες προσεγγίσεις στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων έχουν οδηγήσει σε φάρμακα τα οποία είναι περισσότερο ισχυρά αλλά έχουν μικρότερη διαλυτότητα ή μεγαλύτερη τοξικότητα από ότι οι προηγούμενες γενιές φαρμάκων. Οι συμβατικές μεθοδολογίες επομένως, καθίστανται όλο και λιγότερο αποτελεσματικές στην επίτευξη του βέλτιστου φαρμακοκινητικού ρυθμού χορήγησης φαρμάκων νέας γενιάς. Έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα έχει στραφεί στην ανάπτυξη καινοτόμων προσεγγίσεων ώστε η μεταφορά φαρμάκων να γίνεται πιο αποδοτικά και πιο αποτελεσματικά. Οι νέες τεχνικές περιλαμβάνουν συνήθως πολύπλοκα

συστήματα μεταφοράς φαρμάκων με στόχο τη χορήγησή τους από το στόμα ή ενδοφλέβια, καθώς και για τη δημιουργία χειρουργικών εμφυτευμάτων.

Στόχος ενός συστήματος μεταφοράς φαρμάκου με ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου είναι να διατηρεί τη συγκέντρωση σταθερή μεταξύ των δύο χαρακτηριστικών συγκεντρώσεων, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Με τη χορήγηση ενός φαρμάκου από το στόμα (χάπια ή υγρό) ή ενδοφλέβια, τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα κυμαίνονται σύμφωνα με το διάγραμμα που δίνεται στην Εικόνα 1.1 (μπλε γραμμή). Το επίπεδο της συγκέντρωσης του φαρμάκου αυξάνεται μετά από κάθε χορήγηση και στη συνέχεια μειώνεται, καθώς μεταβολίζεται και απομακρύνεται από τον οργανισμό, μέχρι τη χορήγηση της επόμενης δόσης. Η επιτυχία μιας φαρμακολογικής θεραπείας βασίζεται στη διατήρηση της συγκέντρωσης του ενεργού παράγοντα στο αίμα μεταξύ μιας μέγιστης τιμής (η οποία μπορεί να αναπαριστά ένα τοξικό επίπεδο), και μιας ελάχιστης τιμής (κάτω από την οποία το φάρμακο παύει να είναι αποτελεσματικό). Για να είναι επιτυχές σύστημα μεταφοράς φαρμάκων πρέπει να απελευθερώνει ορισμένη ποσότητα φαρμάκου σε μία επιθυμητή χρονική περίοδο με σταθερή ταχύτητα. Με τον τρόπο αυτό, στην ιδανική περίπτωση, χορηγούνται μικρότερες δόσεις και προκαλούνται λιγότερες παράπλευρες δράσεις. Στα συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης η ταχύτητα με την οποία το φάρμακο διατίθεται στο πλάσμα εξαρτάται από την ταχύτητα με την οποία απελευθερώνεται από τη μήτρα φαρμάκου και όχι από την ταχύτητα απορρόφησης από τον περιβάλλοντα ιστό, όπως συμβαίνει στα συμβατικά φάρμακα.



Εικόνα 1.1. Σύγκριση συμβατικής χορήγησης (μπλε) και ελεγχόμενης απελευθέρωσης (πορτοκαλί).

Με τις συμβατικές μορφές μόνο η δόση και η συχνότητα χορήγησης μπορούν να ελεγχθούν, ενώ το ποσό του φαρμάκου που διατίθεται στο στόχο και ο χρόνος διάθεσής του δε μπορούν να καθοριστούν ανεξάρτητα. Αντίθετα, με την ελεγχόμενη χορήγηση είναι δυνατόν να καθοριστούν τόσο το ποσό του φαρμάκου που διατίθεται στον πάσχον ιστό, όσο και ο χρόνος διάθεσής του στην επιθυμητή περιοχή. Πάνω σε αυτή την ιδέα αναπτύχθηκε το μοντέλο «magic bullet»³⁸. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, θα μπορούσε να παρασκευαστεί ένας συνδυασμός μήτρας και φαρμάκου (σφαίρα) ο οποίος θα μπορεί να στοχεύσει ένα και μόνο συγκεκριμένο κύτταρο στόχο, εξαλείφοντας τον κίνδυνο να επηρεαστούν οι γειτονικοί ιστοί, άρα και χωρίς να υπάρξουν παρενέργειες. Η κατασκευή των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων προϋποθέτει την ενσωμάτωση της φαρμακευτικής ουσίας σε ένα μη τοξικό, βιοσυμβατό ή βιοαπτοικοδομήσιμο νανοφορέα, ο οποίος θα χαρακτηρίζεται από παρατεταμένη παραμονή στη γενική κυκλοφορία και την ικανότητα να δεσμεύεται εκλεκτικά από το όργανο-στόχο με σκοπό την αποκλειστική αποδέσμευση του φαρμάκου στην πάσχουσα περιοχή. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πως τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νανοφορέα καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό το φαρμακοκινητικό προφίλ.

Ένα άλλο πρόβλημα που μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, είναι η χορήγηση αλληπάλληλων δόσεων σε σύντομα χρονικά διαστήματα, φαινόμενο που εμφανίζεται σε φάρμακα με μικρό χρόνο ημιζωής. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μορφοποίηση σε συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών με μεγάλο χρόνο ημιζωής είναι ανούσια καθώς οι ουσίες αυτές εμφανίζουν εκ φύσεως παρατεταμένη αποδέσμευση.

Συνοψίζοντας, τα κυριότερα πλεονεκτήματα των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, είναι τα ακόλουθα:

- Αύξηση της διάρκειας δράσης του φαρμάκου και καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς διότι αποφεύγονται οι συχνές λήψεις.
- Χορήγηση μικρότερης ποσότητας φαρμάκου που έχει σαν αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών.
- Βελτίωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας αφού αποφεύγεται η αυξομείωση των επιπέδων φαρμάκου στο αίμα.
- Αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας αρκετών φαρμακευτικών ουσιών.

- Αύξηση της σταθερότητας διαφόρων ουσιών.

Ωστόσο πρέπει να σημειωθούν και τα μειονεκτήματα των συστημάτων ελεγχόμενης μεταφοράς φαρμάκων:

- Η καθυστερημένη αποδέσμευση μπορεί να επιβραδύνει το θεραπευτικό αποτέλεσμα και να επιμηκύνει τη διάρκεια τυχόν ανεπιθύμητων ενεργειών.
- Ύπαρξη παραπροϊόντων από τη χημική αποικοδόμηση κάποιων συστημάτων.
- Πιθανή απόρριψη της φαρμακευτικής ουσίας από το νανοφορέα.
- Υψηλό κόστος σε σχέση με τα παραδοσιακά σκευάσματα.

1.4.2 Τρόποι στόχευσης

Η εκλεκτική στόχευση του φαρμάκου στο κύτταρο-στόχο συμβαίνει είτε παθητικά, είτε ενεργητικά. Η παθητική στόχευση βασίζεται στη διαφορετική μορφολογία μεταξύ του υγιούς ιστού και του ιστού-στόχου. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα παθητικής στόχευσης είναι η περίπτωση των καρκινικών όγκων. Πιο συγκεκριμένα, οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι, εμφανίζουν ιδιαίτερα παθολογικά χαρακτηριστικά που δεν παρατηρούνται στους φυσιολογικούς ιστούς, όπως εκτεταμένη αγγειογένεση προκειμένου να καλυφθούν οι συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες του όγκου σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Αυτή όμως η υπεραγγείωση που δημιουργείται, έχει δομικές ατέλειες, με διεσταλμένα, ακανόνιστα ή διαπερατά αιμοφόρα αγγεία καθώς και κακή λεμφική παροχέτευση. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κυτταρικών τοιχωμάτων συχνά παρουσιάζουν μεγάλα κενά. Έτσι, αυτή η ελαττωματική αρχιτεκτονική των αιμοφόρων αγγείων του όγκου, σε συνδυασμό με τον ευρύ αυλό τους, έχει σαν αποτέλεσμα την εκτεταμένη διαρροή συστατικών του πλάσματος του αίματος μέσα στον όγκο. Ταυτόχρονα, η κακή λεμφική παροχέτευση του όγκου, οδηγεί στην κατακράτηση αυτών των συστατικών (μακρομόρια, νανοσωματίδια, λιπιδικά νανοσωματίδια) εντός του όγκου. Αυτή η ιδιαιτερότητα των καρκινικών όγκων ονομάζεται φαινόμενο ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης^{39, 40}. Μέσω αυτού του μηχανισμού λοιπόν, οι νανοφορείς μπορούν, όπως τα συστατικά του πλάσματος, να συγκεντρωθούν στον καρκινικό ιστό. Σημαντική προϋπόθεση για την ικανοποιητική συγκέντρωση των νανοφορέων στο στόχο μέσω του φαινομένου ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης είναι η παρατεταμένη

κυκλοφορία τους στο αίμα, ώστε σταδιακά να επιτευχθεί αυξημένη εντόπισή τους μέσω της διάχυσης από τα υψηλής διαπερατότητας αιμοφόρα αγγεία του όγκου.

Με βάση αυτό το φαινόμενο έχουν γίνει πολλές προσπάθειες στοχευμένης μεταφοράς και αποδέσμευσης φαρμάκων στην περιοχή του όγκου^{41, 42}. Έτσι είναι δυνατό να επιτευχθούν τοπικές συγκεντρώσεις φαρμάκων έως και 10-50 φορές μεγαλύτερες στην περιοχή του όγκου συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς, σε διάστημα 1-2 ημερών. Μελέτες έχουν δείξει ότι το φαινόμενο κατακράτησης, όμως, δεν είναι εφαρμόσιμο σε χαμηλού μοριακού βάρους φάρμακα εξαιτίας της γρήγορης διάχυσής τους στην κυκλοφορία του αίματος, ακολουθούμενη από νεφρική κάθαρση. Για να παρακαμφτεί ο περιορισμός έχουν σχεδιαστεί συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, τα οποία στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα βασιζόμενα σε άλλες ιδιαιτερότητες που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα, όπως χαμηλότερο pH^{43, 44}. Αυτή η διαφορά στην οξύτητα του κυττάρου οφείλεται στην αυξημένη γλυκολυτική δραστηριότητα που συμβαίνει στο κύτταρο, λόγω των αυξημένων αναγκών του σε ενέργεια. Ένα είδος νανοσωματιδίου που εκμεταλλεύεται εκτενώς αυτή τη διαφορά στο pH είναι τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια, τα οποία όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια, όταν βρίσκονται σε όξινο pH μπορούν να απελευθερώσουν το φάρμακο που είναι παγιδευμένο μέσα τους.

Η ενεργητική στόχευση βασίζεται στη μοριακή τροποποίηση της επιφάνειας των νανοφορέων, συνήθως μέσω χημικών μεθόδων. Έτσι επιτυγχάνεται η σύνδεσή τους με ποικίλους παράγοντες στόχευσης, οι οποίοι αναγνωρίζονται και συνδέονται εκλεκτικά με συγκεκριμένους υποδοχείς ή αντιγόνα της επιφάνειας των κυττάρων-στόχων. Αυτοί οι παράγοντες στόχευσης συνήθως είναι πρωτεΐνες (κυρίως αντισώματα και τα κλάσματα τους), κλάσματα νουκλεϊκών οξέων (aptamers), ή άλλοι συνδέτες υποδοχέων (πεπτιδία, βιταμίνες, υδατάνθρακες). Γενικά, όταν χρησιμοποιείται ένας παράγοντας στόχευσης για την πρόσδεση του νανοφορέα σε καρκινικά κύτταρα, είναι αναγκαίο ο συνδέτης να προσδένεται με υψηλή εκλεκτικότητα στα μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Επίσης, για τη βελτιστοποίηση της εκλεκτικότητας, κρίνεται σκόπιμο το μόριο στο οποίο θα προσδεθεί ο συνδέτης να είναι υπερ-εκφρασμένο στην επιφάνεια του κυττάρου στόχου, συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα^{45, 46}.

Μόλις οι νανοφορείς αναγνωριστούν και προσδεθούν στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων, τότε ανάλογα με τον συνδέτη τον οποίο φέρουν, είτε θα

πραγματοποιηθεί ενδοκυττάρωση του νανοφορέα, είτε θα παραμείνει προσκολλημένος στην επιφάνεια του κυττάρου. Στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιείται ιδιαίτερα το φολικό οξύ, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι σε πολλούς τύπους καρκίνου υπερεκφράζονται υποδοχείς φολικού οξέος στην επιφάνεια των κυττάρων⁴⁷. Επίσης, έχουν παρασκευαστεί πολλά αντισώματα που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα καρκινικά κύτταρα^{48, 49}, καθώς και ολιγοπεπτίδια που αναγνωρίζονται από καρκινικά κύτταρα⁵⁰.

1.4.3 Κατηγορίες συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων

Ανάλογα με την πολυπλοκότητα που παρουσιάζουν στην τεχνολογία τους, τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- Συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης
- Συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης
- Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης
- Συστήματα στόχευσης

Στα συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας έχει προκαθοριστεί ώστε να γίνεται με συγκεκριμένο ρυθμό. Αυτό επιτυγχάνεται με τον κατάλληλο σχεδιασμό του συστήματος, κατά τον οποίο ο ρυθμός αποδέσμευσης της εγκλωβισμένης ουσίας ελέγχεται από τη διάχυση της ουσίας ή τη διείσδυση του διαλύτη. Τα ελεγχόμενα μέσω διάχυσης συστήματα διακρίνονται σε συστήματα δεξαμενής, στα οποία ο φραγμός είναι μια πολυμερική μεμβράνη που περιβάλλει το σύστημα και τα συστήματα τύπου μήτρας, όπου το φάρμακο βρίσκεται διαλυμένο ή διεσπαρμένο εντός μιας πολυμερικής μήτρας.

Στα συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης η αποδέσμευση του ενεργού συστατικού ξεκινά με την παρέμβαση φυσικών, χημικών και βιοχημικών διαδικασιών ή με την επίδραση εξωτερικώς παρεχόμενης ενέργειας.

Στα συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης η αποδέσμευση του φαρμάκου ρυθμίζεται από ένα βιοχημικά ανταποκρινόμενο αισθητήρα, ο οποίος ενσωματώνεται στο νανοφορέα. Ο αισθητήρας αυτός συνήθως ανιχνεύει μια βιολογική ουσία μέσα στο σώμα, η οποία δρα ως ενεργοποιητής του συστήματος. Ανάλογα με τη συγκέντρωση αυτής της ουσίας, ο μηχανισμός ανάδρασης του συστήματος

ρυθμίζει κατάλληλα και το ρυθμό αποδέσμευσης του εγκλωβισμένου συστατικού. Τα συστήματα αυτής της κατηγορίας διακρίνονται στα:

- Ρυθμιζόμενα συστήματα μέσω βιοδιάσπασης.
- Βιο-αποκρινόμενα συστήματα.
- Αυτο-ρυθμιζόμενα συστήματα.

Το αυτορρυθμιζόμενο σύστημα χορήγησης ινσουλίνης αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της τελευταίας κατηγορίας.

Τέλος, τα συστήματα στόχευσης αποσκοπούν στη μεταφορά και αποδέσμευση της δραστικής ουσίας στον επιθυμητό στόχο. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της θεραπευτικής ικανότητας των δραστικών ουσιών. Παράλληλα συντελεί στη μείωση της εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών αφού ο στόχος αυτών των συστημάτων είναι η καταστροφή των κυττάρων που βρίσκονται στον ιστό-στόχο χωρίς να προκαλούν βλάβες στα υγιή κύτταρα.

1.5 Στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια

1.5.1 Εισαγωγή

Τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια αποτελούν ένα αρκετά υποσχόμενο υλικό για ελεγχόμενη μεταφορά φαρμάκων. Με τον όρο στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια (LDH) αναφερόμαστε σε ανόργανα πολυμερή που συναποτελούνται από υδροξείδια δύο διαφορετικών μετάλλων. Στο εσωτερικό των φορτισμένων στρωμάτων των μετάλλων, συνυπάρχουν μόρια νερού και διάφορα ανιόντα, όπως CO_3^{2-} , NO_3^- , Cl^- κ.ά., τα οποία εξισορροπούν το θετικό φορτίο των στρωμάτων. Δύο από τις σημαντικότερες ιδιότητες των μορίων αυτών είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν κρυστάλλους μικρότερους του 1 μm , καθώς και η ικανότητα προσρόφησης σημαντικών ποσοτήτων νερού από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

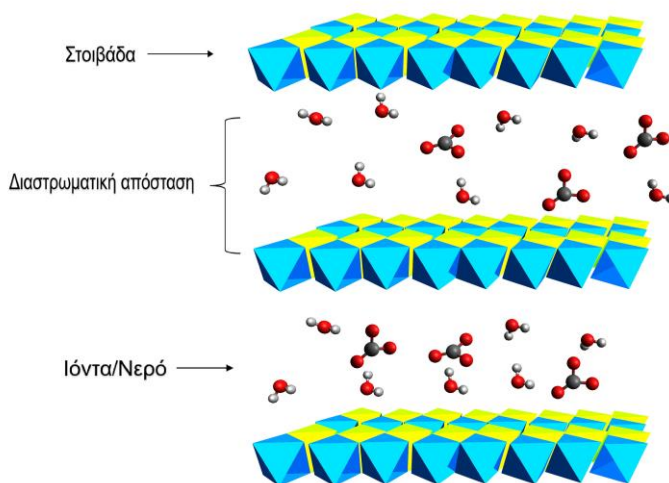
Η χημική σύσταση του LDH περιγράφεται από τον τύπο: $[\text{M}^{\text{II}}_x\text{M}^{\text{III}}_y(\text{OH})_{2x+2y}][\text{A}^{n-}]_{y/n} \cdot z\text{H}_2\text{O}$, όπου M^{II} και M^{III} είναι ένα δισθενές και ένα τρισθενές μέταλλο αντίστοιχα και A^{n-} είναι το ανιόν. Σαν αντισταθμιστικά ιόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν πληθώρα ανιόντων, όπως CO_3^{2-} , NO_3^- , Cl^- , ClO_4^- , OH^- κ.ά. Ταυτόχρονα

η αναλογία των μετάλλων μπορεί εύκολα να καθοριστεί κατά την παρασκευή, με συνήθης αναλογίες M^{II}/M^{III} να είναι 4:1, 3:1 ή 2:1. Ο λόγος αυτός καθορίζει την ικανότητα ανιονανταλλαγής, καθώς και τη χωρητικότητα της μήτρας⁵¹. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η παρασκευή του LDH είναι εύκολη και έχει γενικά χαμηλό κόστος. Μετά το τέλος της παρασκευής, πληθώρα νέων ανιόντων μπορεί να εισαχθεί με τη μέθοδο της ανιονανταλλαγής, η οποία θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια.

1.5.2 Δομή

Η δομή των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων είναι φυλλόμορφη. Οι ανόργανες στοιβάδες LDH αποτελούνται από δύο διαφορετικά μέταλλα γεφυρωμένα με υδροξείδια σε οκταεδρική διαμόρφωση με αναλογία δύο υδροξειδίων προς ένα μέταλλο. Τα οκτάεδρα αυτά ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα δισδιάστατο φύλλο με δομή παρόμοια με αυτή του Βρουσίτη ($Mg(OH)_2$). Το πάχος του φύλλου αυτού είναι περίπου 4,78Å. Η μόνη διαφορά ενός φύλλου βρουσίτη με αυτού του LDH είναι, ότι με την εισαγωγή ενός τρισθενούς μετάλλου το φύλλο αποκτά θετικό φορτίο. Το φορτίο αυτό εξουδετερώνεται από αντισταθμιστικά ιόντα, τα οποία μαζί με μόρια νερού, σχηματίζουν ένα στρώμα μεταξύ διαδοχικών ανόργανων φύλλων. Η συνολική δομή του LDH απεικονίζεται στην εικόνα 1.2.

Ανάλυση του LDH με ηλεκτρονική μικροσκοπία δείχνει ότι σχηματίζει κρυστάλλους σε σχήμα εξαγωνικής πλάκας^{52, 53}. Το μέγεθος των κρυστάλλων αυτών έχει εύρος από 100 nm έως μερικά μικρόμετρα και εξαρτάται από τη μέθοδο σύνθεσης.



Εικόνα 1.2. Αναπαράσταση της δομής στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων.

1.5.3 Ιδιότητες

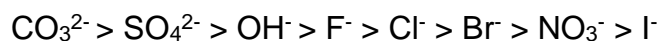
Οι βασικότερες ιδιότητες των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων είναι η αποσύνθεσή τους σε όξινες συνθήκες, η ιοντανταλλαγή και η παραγωγή των αντίστοιχων μεταλλικών οξειδίων μετά από ισχυρή θέρμανση.

Η πρώτη ιδιότητα του LDH βασίζεται στο γεγονός ότι η παρασκευή του γίνεται με την προσθήκη βάσης στο μείγμα μετάλλων, ενώ παρουσία οξέος γίνεται η αντίστροφη διαδικασία. Οι αντιδράσεις, χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα το LDH (MgAl) με αναλογία 2:1, είναι οι εξής:

- Σύνθεση: $2\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 + \text{Al}(\text{NO}_3)_3 + 6\text{NaOH} \rightarrow [\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 + 6\text{NaNO}_3$
- Υδρόλυση: $[\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 + 7\text{HCl} \rightarrow 2\text{MgCl}_2 + \text{AlCl}_3 + \text{HNO}_3 + 6\text{H}_2\text{O}$

Η ιδιότητα του LDH να αποσυντίθεται σε pH μικρότερο του 5⁵⁵ είναι εξαιρετικά σημαντική, αφού επιτρέπει τη χρήση του σαν μήτρα για τη μεταφορά και ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων. Ακόμα, η αποσύνθεση του LDH δεν παράγει τοξικές ουσίες, κάτι που καθιστά το μόριο βιοσυμβατό.

Η δεύτερη ιδιότητα είναι αυτή που επιτρέπει την εύκολη και γρήγορη αλλαγή του ενδιάμεσου ιόντος⁵⁶. Η ιδιότητα αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε ανιόν έχει διαφορετική συγγένεια για το LDH. Η συγγένεια για ορισμένα από αυτά έχει μελετηθεί εκτενώς και αντιπροσωπεύεται από τη σειρά:



Τα δισθενή ιόντα δεσμεύονται πολύ ισχυρότερα από τα μονοσθενή. Η σειρά ισχύος έχει μεγάλη σημασία για το σχεδιασμό πειραμάτων. Για παράδειγμα σε ένα διάλυμα με LDH (Mg-Al) NO_3^- , τα νιτρικά ιόντα μπορούν εύκολα να αντικατασταθούν από ιόντα χλωρίου, με την προσθήκη NaCl . Στο ίδιο πείραμα, εάν το διάλυμα δεν προστατευτεί και έρθει σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα, θα γίνει ανταλλαγή ιόντων με ανθρακικά ιόντα (CO_3^{2-}). Με την ιοντανταλλαγή μπορεί να συντεθεί εύκολα και σε ήπιες συνθήκες πληθώρα διαφορετικών νανοβιοϋβριδίων.

Σύμφωνα με την τρίτη ιδιότητα του LDH, μετά από θερμική κατεργασία στους 500°C για 5 ώρες παράγονται μικτά μεταλλικά οξείδια με μικρό μέγεθος κρυστάλλων, αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες και αλκαλικές ιδιότητες. Αυτή η αλλαγή δομής και

ιδιοτήτων του LDH οφείλεται στην απομάκρυνση του νερού και των ανιόντων που βρίσκονται ανάμεσα στις στοιβάδες του. Η ιδιότητα αυτή παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, διότι το LDH μπορεί να επανακτήσει τη δομή του αν βρεθεί σε υδατικό διάλυμα κάποιου ανιόντος, δίνοντας έτσι μία ακόμα μέθοδο εισαγωγής ιόντων.

1.5.4 Τρόποι σύνθεσης

Η σύνθεση ενός LDH νανοβιοϋβριδίου με παγιδευμένο ένα επιθυμητό αρνητικά φορτισμένο φάρμακο είναι αρκετά φτηνή, σε σύγκριση με πολλούς άλλους νανοφορείς. Υπάρχουν 3 βασικοί τρόποι εγκλωβισμού μια ουσίας ανάμεσα στα φύλλα του^{57, 58}.

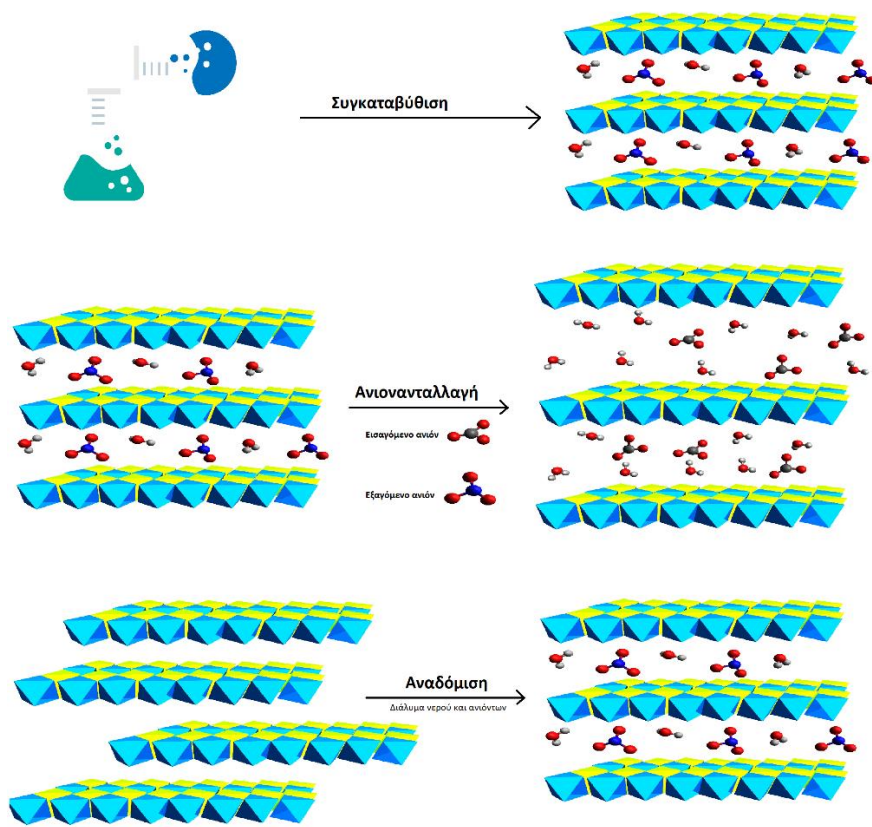
Η πιο βασική αυτών είναι η συγκαταβύθιση. Σε αυτή τη μέθοδο το LDH συντίθεται μέσα σε διάλυμα που περιέχει ήδη την επιθυμητή ουσία, με αποτέλεσμα τα φύλλα να στοιβάζονται άμεσα τριγύρω από το ανιόν. Με αυτόν τον τρόπο παγιδεύεται η μέγιστη ποσότητα φαρμάκου, αφού τα ανιόντα έχουν εύκολη πρόσβαση σε κάθε φύλλο. Η ευκολία της σαν μία one-pot σύνθεση την έχει κάνει μια πολύ ελκυστική μέθοδο για χρήση σε βιομηχανική κλίμακα⁵⁹. Παρά τα πλεονεκτήματά της, η συγκαταβύθιση είναι η πιο ακριβή μέθοδος σύνθεσης νανοβιοϋβριδίων LDH, ενώ ταυτόχρονα ανάλογα το φάρμακο που παγιδεύεται στο εσωτερικό των φύλλων, μπορεί να δημιουργήσει εύκολα χαμηλής κρυσταλλικότητας προϊόν με συσσωματώματα.

Τα προβλήματα αυτά λύνει η σύνθεση με ανιονανταλλαγή, η οποία βασίζεται στην ικανότητα του LDH να εναλλάσσει το εσωτερικό του ανιόν με άλλα μεγαλύτερης συγγένειας. Η ανιονανταλλαγή είναι μία σύνθεση δύο βημάτων. Αρχικά, παράγεται ένα νανοϋβρίδιο LDH με χαμηλής συγγένειας ανιόντα όπως τα νιτρικά. Στη συνέχεια αυτό το νανοϋβρίδιο έρχεται σε επαφή με το φάρμακο, το οποίο λόγω μεγαλύτερης συγγένειας με τα φύλλα αντικαθιστά το αρχικό ανιόν, παράγοντας το επιθυμητό νανοβιοϋβρίδιο. Αυτή η σύνθεση είναι πολύ πιο οικονομική αφού το αρχικό LDH που συντίθεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παγίδευση πολλών διαφορετικών φαρμάκων. Ταυτόχρονα το προϊόν που παράγεται είναι πολύ καλύτερης ποιότητας, με άριστα δομημένα φύλλα, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να τροποποιηθούν για καλύτερη στόχευση του φαρμάκου. Δυστυχώς, η χρήση της ανιονανταλλαγής είναι πιο περιορισμένη καθώς δεν επιτρέπει

στα ανιόντα προς εισαγωγή εύκολη πρόσβαση στα φύλλα, οδηγώντας σε μικρότερη απόδοση και αποτυχία σύνθεσης για φάρμακα μεγαλύτερου μεγέθους.

Η τρίτη μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά στη σύνθεση νανοβιοϋβριδίων LDH είναι η αναδόμηση. Αυτή η σύνθεση βασίζεται στην τρίτη ιδιότητα του LDH, όπως περιγράφηκε παραπάνω, όπου έπειτα από ανθρακοποίηση του LDH, τα μεμονωμένα φύλλα επαναστοιβάζονται έπειτα από την εισαγωγή τους σε διάλυμα νερού και ανιόντων. Αν και συνδυάζει όλα τα πλεονεκτήματα των παραπάνω συνθέσεων, η κατεργασία του LDH αλλοιώνει την κρυσταλλικότητά του σε μεγάλο βαθμό και μειώνει την απόδοσή του στην παγίδευση ανιόντων.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής μελετήθηκε μία νεότερη μέθοδος σύνθεσης που συνδυάζει τα θετικά στοιχεία και των τριών παραπάνω συνθέσεων. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται διαλύτες για να κάνουν την αποφυλλοποίηση του LDH, έναντι της θερμοκρασίας, διατηρώντας την ποιότητα των ανόργανων φύλλων, ενώ ταυτόχρονα προσφέρει εύκολη πρόσβαση σε αυτά, συγκρίσιμη με αυτή της συγκαταβύθισης.



Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση των συνηθέστερων μεθόδων σύνθεσης του LDH.

1.5.5 Αποφυλλοποιημένα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τα LDH στον τομέα της βιοχημείας έχει αυξηθεί πολύ περισσότερο, με την εξέλιξη των αποφυλλοποιημένων στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (dLDH). Αν και τα dLDH φτιάχτηκαν αρκετά χρόνια πριν^{60, 61}, μόνο πρόσφατα τράβηξαν το ενδιαφέρον των ερευνητών, με τις πρώτες εφαρμογές τους σαν φορείς γενετικού υλικού⁶²⁻⁶⁴.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα στη χρήση των LDH σαν συστήματα μεταφοράς για ογκώδεις ουσίες, είναι η σχετικά μικρή τους χωρητικότητα, σε σύγκριση με άλλους φορείς. Αυτή η αδυναμία μπορεί να ξεπεραστεί με την χρήση των dLDH, δηλαδή LDH των οποίων οι στοιβάδες έχουν διαχωριστεί. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί κανείς να εκμεταλλευτεί καλύτερα τις ενδιάμεσες στοιβάδες του LDH, ενώ το ίδιο δεν χάνει την ικανότητά του να προσροφά αρνητικά φορτισμένα σωματίδια. Έτσι έχουν εισαχθεί τμήματα DNA σε LDH⁶² και στη συνέχεια μεταφέρει το γενετικό υλικό μέσα σε κύτταρα με επιτυχία. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις dLDH η εισαγωγή του έχει αναφερθεί ότι δεν γίνεται με ενδοκύτωση, αλλά μπορούν να διαπεράσουν ελεύθερα την πλασματική μεμβράνη^{62, 65} επιτρέποντας τον σχεδιασμό νέων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων βασισμένων σε LDH.

Για να επιτευχθεί αποστοίβαξη των φύλλων LDH πρέπει οι δυνάμεις φύλλου-διαλύτη να είναι το ίδιο ή λιγότερο ισχυρές από τις δυνάμεις μεταξύ των διαδοχικών φύλλων. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται προκαλώντας διόγκωση της διαστρωματικής κοιλότητας και απομακρύνοντας τα φύλλα, ελαχιστοποιώντας τις δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ τους. Η αποφυλλοποίηση των LDH είναι μια φτηνή και πολύ γρήγορη διαδικασία, αφού μπορεί να γίνει μέσα σε 30 λεπτά. Μέχρι στιγμής η αποφυλλοποίηση LDH έχει γίνει με επιτυχία σε βουτανόλη, ακρυλικά, τετραχλωράνθρακα και τολουένιο, N,N-διμέθιλοφορμαμίδιο σε μίγμα με αιθανόλη, νερό, και φορμαμίδιο⁶⁶.

Από αυτές τις τεχνικές το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αποφυλλοποίηση σε νερό, αφού φτιάχνει ένα πιο βιοσυμβατό μίγμα dLDH. Από τις τεχνικές αποφυλλοποίησης LDH σε νερό, αυτές που έχουν τη μεγαλύτερη απόδοση αλλά και δίνουν ένα dLDH που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σε ανιοντανταλλαγή, είναι η αποφυλλοποίηση με γαλακτικό και οξικό⁶⁷ ανιόν. Και στις δύο περιπτώσεις, η

αποφυλλοποίηση συμβαίνει με την εισαγωγή ενός πολικού διαλύτη που θα κάνει το εσωτερικό περιβάλλον ανάμεσα στις στοιβάδες πιο «φιλικό» στην εισαγωγή περισσότερο διαλύτη, αυξάνοντας την απόσταση μεταξύ των στοιβάδων οι οποίες έπειτα χωρίζονται με μηχανικό τρόπο (ανάδευση). Το επιπλέον βήμα που απαιτείται στην αποφυλλοποίηση με νερό, μαζί με την παγίδευση ανιόντων που δεν είναι τόσο εύκολα να απομακρυνθούν στη συνέχεια, κάνουν τη χρήση dLDH σε νερό αρκετά περιορισμένη.

Τη βέλτιστη αποφυλλοποίηση LDH από τις παραπάνω τεχνικές εμφανίζει η αποφυλλοποίηση σε φορμαμίδιο. Όταν LDH διαλυθεί σε φορμαμίδιο, αυτό δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα υδροξείδια των μετάλλων, αντικαθιστώντας τα μόρια νερού και απομακρύνοντας τα φύλλα σε σημείο που μπορούν να αποφυλλοποιηθούν. Η αποφυλλοποίηση σε φορμαμίδιο είναι εξαιρετικά γρήγορη και αποδοτική σαν διαδικασία, αλλά είναι τοξικό και δεν παράγει βιοσυμβατά dLDH.

Είναι εμφανές λοιπόν πως υπάρχει μεγάλη ανάγκη εύρεσης τρόπων αποφυλλοποίησης του LDH οι οποίες συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των παραπάνω μεθόδων. Στα πλαίσια της έρευνας δοκιμάζονται δύο νέοι διαλύτες αποφυλλοποίησης, που επιτυγχάνουν την απομάκρυνση των φύλλων με παρόμοιο τρόπο με το φορμαμίδιο, χωρίς όμως να διαθέτουν την τοξικότητά του. Οι μέθοδοι αυτοί συγκρίνονται στη συνέχεια με τους τρόπους που περιγράφονται παραπάνω.

1.5.6 Χαρακτηρισμός

Ο χαρακτηρισμός των LDH γίνεται κυρίως με περίθλαση ακτίνων X και φασματοσκοπία υπερύθρου. Για μια πιο λεπτομερή εικόνα όμως χρησιμοποιούνται πολλές ακόμα μέθοδοι, όπως ηλεκτρονική μικροσκοπία και δυναμική σκέδαση φωτός. Στη συνέχεια θα αναλυθούν οι πιο συχνές μέθοδοι ανάλυσης πηλού LDH.

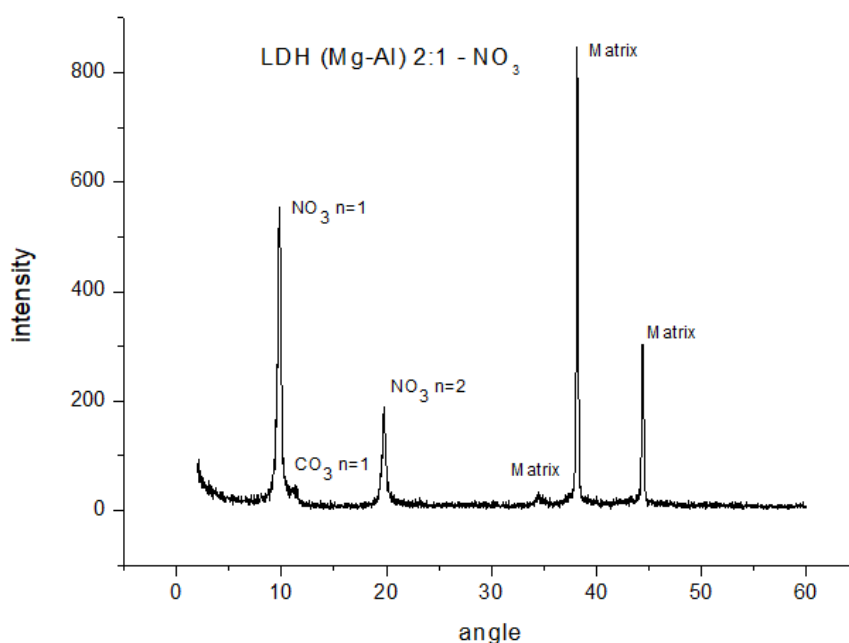
Περίθλαση ακτίνων X σε σκόνη

Εφόσον το LDH παρουσιάζει κρυσταλλική δομή, η κύρια μέθοδος ανάλυσης είναι η περίθλαση ακτίνων X σε σκόνη (Powder X-Ray Diffraction). Η μελέτη αυτή βασίζεται στο φαινόμενο περίθλασης μιας ακτίνας X όταν αυτή προσπίπτει πάνω σε κρύσταλλο. Η

περίθλαση αυτή εξαρτάται από το μήκος κύματος των ακτίνων X, τον προσανατολισμό και τη δομή των κρυστάλλων. Η δέσμη των ακτίνων X αλληλεπιδρά με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα των ατόμων ή των ιόντων του κρυσταλλικού πλέγματος και έτσι δημιουργείται ένας ηλεκτρονιακός «χάρτης» του εξεταζόμενου κρυστάλλου. Ο χάρτης αυτός είναι χαρακτηριστικός για κάθε κρύσταλλο. Τα αποτελέσματα που συλλέγονται από μια τέτοια μέτρηση αναλύονται με βάση το νόμο του Bragg. Με τη μελέτη των κορυφών ενός διαγράμματος περίθλασης ακτίνων X (εικόνα 1.4) και τη χρήση του νόμου του Bragg μπορεί να υπολογιστεί η απόσταση d μεταξύ δύο διαδοχικών στρωμάτων. Ο νόμος του Bragg παρουσιάζεται στη συνέχεια:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

όπου n είναι η τάξη της κορυφής ($n=1$ για την (003), $n=2$ για τη (006) κ.ο.κ.), λ είναι το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, d είναι η απόσταση μεταξύ των διαδοχικών ανόργανων στρωμάτων σε Å και θ είναι η γωνία περίθλασης της ακτίνας.



Εικόνα 1.4. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH(Mg-Al)-NO₃.

Με τη χρήση του νόμου του Bragg υπολογίζεται η διαστρωματική απόσταση d η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε παγιδευμένο ανιόν. Οποιαδήποτε μεταβολή του d

μπορεί να επιβεβαιώσει πως υπάρχει αλλαγή στο παγιδευμένο ανιόν. Ταυτόχρονα η καθαρότητα των κορυφών μπορεί να δώσει πληροφορίες για την οργάνωση και την κρυσταλλικότητα του προϊόντος.

Περίθλαση ακτίνων X σε υγρό

Η περίθλαση ακτίνων X σε υγρό (Liquid X-Ray Diffraction) ακολουθεί τις ίδιες θεμελιώδεις αρχές που περιγράφονται παραπάνω. Τα αποτελέσματά της δεν είναι το ίδιο καθαρά με αυτά της περίθλασης ακτίνων X σε σκόνη και χρειάζονται πολύ περισσότερο χρόνο για να ληφθούν, λόγω της απορρόφησης των ακτίνων από το διαλύτη. Είναι όμως ένα αναπόσπαστο εργαλείο μελέτης των LDH, καθώς είναι η μόνη μέθοδος που μπορεί να εξετάσει την ποιότητα αποφυλλοποιημένων LDH.

Φασματοσκοπία υπέρυθρου

Όταν υπέρυθρη ακτινοβολία αλληλεπιδράσει με μία ουσία, υπάρχει πιθανότητα να απορροφηθεί από αυτήν. Γενικά, η υπέρυθρη ακτινοβολία είναι χαμηλότερης ενέργειας από αυτή της ορατής και της υπεριώδους περιοχής και αντιστοιχεί στην ενέργεια που χαρακτηρίζει τα δονητικά και περιστροφικά ενεργειακά επίπεδα ενός μορίου, τα οποία ως γνωστό είναι κβαντισμένα. Επομένως για να απορροφήσει ένα μόριο υπέρυθρη ακτινοβολία πρέπει η ενέργειά της να είναι ακριβώς τόση, ώστε να προκληθεί μια δονητική ή περιστροφική μετάπτωση.

Ένας άλλος παράγοντας που καθορίζει το αν θα απορροφηθεί η ακτινοβολία είναι η μεταβολή ή όχι της διπολικής ροπής στους δεσμούς μιας ένωσης. Οι δεσμοί των οποίων η διπολική ροπή μεταβάλλεται, έχουν τη δυνατότητα να απορροφήσουν υπέρυθρη ακτινοβολία. Ο λόγος για τον οποίο παρατηρείται αυτό το φαινόμενο είναι το γεγονός ότι εξαιτίας της μεταβολής της διπολικής ροπής στο μόριο, δημιουργείται εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο με συχνότητα ίδια με αυτή της δόνησης του δεσμού. Αν η συχνότητα της υπέρυθρης ακτινοβολίας είναι ίδια με αυτή του προκύπτοντος ηλεκτρικού πεδίου, τότε πραγματοποιείται σύζευξη των δύο πεδίων με αποτέλεσμα την απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Όταν λοιπόν υπέρυθρη ακτινοβολία πέσει στην προς εξέταση ουσία, ένα ποσοστό αυτής απορροφάται. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας συμβαίνει σε συχνότητες ν οι οποίες είναι συχνότητες δόνησης των δεσμών και οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε ουσία. Στην υπέρυθρη φασματοσκοπία μετρούνται οι ενεργειακές διαφορές των επιπέδων δόνησης, βρίσκοντας έτσι τη διέγερση των δονήσεων του μορίου της ουσίας. Έτσι, κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μια κανονική μορφή δόνησης του συγκεκριμένου χημικού είδους.

Η τεχνική αυτή είναι πολύ χρήσιμη για το χαρακτηρισμό των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων καθώς κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε έναν κανονικό τρόπο δόνησης της αναλυόμενης ουσίας και έτσι μπορεί να ταυτοποιηθεί η επιθυμητή ουσία που ενσωματώθηκε μεταξύ των ανόργανων στρωμάτων.

Φασματοσκοπία ακτίνων X με ενεργειακή διασπορά

Στην τεχνική φασματοσκοπίας ακτίνων X με ενεργειακή διασπορά (Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDS) μετράται το φάσμα ακτίνων X που εκπέμπεται από ένα στερεό δείγμα, όταν αυτό βομβαρδίζεται με μία εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων, από τη μελέτη του οποίου μπορεί να γίνει χημική ανάλυση. Όλα τα στοιχεία με ατομικό αριθμό 4 (Be) έως 92 (U) μπορούν να ανιχνευθούν με αυτήν την τεχνική, αν και δεν είναι εξοπλισμένα όλα τα όργανα για την ανίχνευση 'ελαφρών' στοιχείων ($Z < 10$). Η ποιοτική ανάλυση γίνεται με την αναγνώριση των γραμμών στο φάσμα και είναι αρκετά απλή λόγω της απλότητας ενός φάσματος ακτίνων X. Η ποσοτική ανάλυση (προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των παρόντων στοιχείων) γίνεται με τη σύγκριση της έντασης της κορυφής για κάθε στοιχείο του δείγματος με αντίστοιχες κορυφές πρότυπων δειγμάτων, γνωστών συγκεντρώσεων⁶⁸.

Για να ξεκινήσει η εκπομπή ακτίνων X από ένα δείγμα, μια δέσμη ακτίνων X εστιάζεται πάνω στο δείγμα. Σε κατάσταση ηρεμίας, ένα άτομο μέσα στο δείγμα περιέχει ηλεκτρόνια σε διακεκριμένα επίπεδα ενέργειας (στοιβάδες). Η προσπίπτουσα δέσμη μπορεί να διεγείρει ένα ηλεκτρόνιο από μία εσωτερική στιβάδα, εκτοξεύοντάς το από το κέλυφος δημιουργώντας μια ενεργειακή «οππή» ηλεκτρονίων εκεί όπου ήταν το ηλεκτρόνιο. Στη συνέχεια, ένα ηλεκτρόνιο από μία εξωτερική στιβάδα υψηλότερης

ενέργειας γεμίζει την οπή και η διαφορά ενέργειας εκπέμπεται με τη μορφή ακτινοβολίας. Ο αριθμός και η ενέργεια των ακτίνων X που εκπέμπονται από ένα δείγμα μπορούν να μετρηθούν με ένα φασματομέτρο ενεργειακής διασποράς. Καθώς οι ενέργειες των ακτίνων X είναι χαρακτηριστικές της διαφοράς ενέργειας μεταξύ των δύο στοιβάδων και της ατομικής δομής του στοιχείου εκπομπής, το EDS επιτρέπει τη μέτρηση της στοιχειακής σύστασης του δείγματος.

Θερμοσταθμική ανάλυση

Η θερμοσταθμική ανάλυση είναι μία τεχνική χαρακτηρισμού υλικών αλλά και ποσοτικής ανάλυσης. Βασίζεται στην απώλεια μάζας μίας ουσίας, καθώς αυτή υποβάλλεται σε σταθερή μεταβολή της θερμοκρασίας. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να προσδιοριστούν η περιεκτικότητα σε διαλύτη καθώς και η παρουσία πτητικών ειδών. Η μέτρηση πραγματοποιείται συνήθως υπό ροή ατμοσφαιρικού αέρα, αζώτου ή ηλίου, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί μηδαμινή χημική αλληλεπίδραση με το δείγμα. Μέσω αυτής της μεθόδου είναι επιπλέον δυνατή η ταυτοποίηση πολυμερών και ο προσδιορισμός προσμίξεων σε αυτά, ενώ μπορεί να μελετηθεί και η θερμική αποικοδόμηση των πολυμερών καθώς και ο μηχανισμός γήρανσής τους.

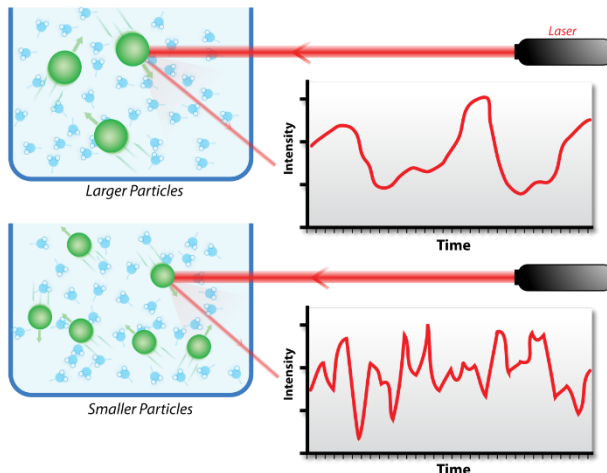
Δυναμική σκέδαση φωτός

Η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) είναι μια μέθοδος, που μπορεί μετρήσει το μέγεθος σωματιδίων σε διασπορά ταχύτητα, απαιτώντας ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος. Η τεχνική αυτή ανιχνεύει τη συχνότητα «τρεμοπαίγματος» ενός μοτίβου, που καταγράφεται στον ανιχνευτή, το οποίο δημιουργείται από τη σκέδαση του φωτός από τα σωματίδια. Η ενισχυτική και καταστρεπτική συμβολή του φωτός από τη σκέδαση είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση κορυφών σε αυτό το μοτίβο (Εικόνα 1.5). Η συχνότητα αυτή είναι ανάλογη της κίνησης Brown των σωματιδίων, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων (όσο μικρότερα τα σωματίδια τόσο μεγαλύτερη είναι η κίνηση Brown) και από το ιξώδες του διαλύτη. Το ιξώδες ενός υγρού σχετίζεται άμεσα με τη θερμοκρασία του,

άρα για να 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 του μοτίβου μπορεί να αποδώσει το συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων (D), μέσω του οποίου χρησιμοποιώντας την εξίσωση Stokes-Einstein ($D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$)⁶⁹, και γνωρίζοντας το ιξώδες του μέσου (η), μπορεί να υπολογιστεί

η υδροδυναμική διάμετρος (D_h) των σωματιδίων [όπου k : η σταθερά Boltzmann, T : η απόλυτη θερμοκρασία, και r : η υδροδυναμική ακτίνα του σωματιδίου ($R_h = 0.5D_h$)]. Η διάμετρος που υπολογίζεται μέσω της τεχνικής DLS ονομάζεται υδροδυναμική διάμετρος και είναι η διάμετρος μιας ιδεατής σφαίρας που έχει τον ίδιο συντελεστή διάχυσης με το σωματίδιο το οποίο δεν είναι απαραίτητα σφαιρικό. Η μέτρηση DLS αποτελεί μια γρήγορη και φτηνή εναλλακτική στη μελέτη με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης για τη μελέτη του μεγέθους νανοσωματιδίων LDH. Επίσης, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη μελέτη των αποφυλλοποιημένων LDH, τα οποία θα αναλυθούν εκτενώς στη συνέχεια.

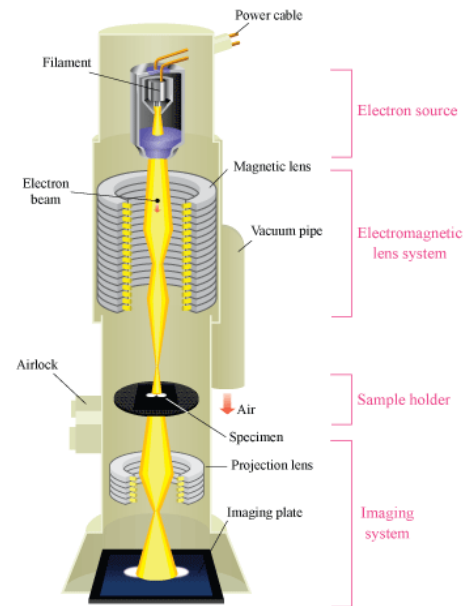


Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου δυναμικής σκέδασης φωτός.

Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy) είναι μια σημαντική τεχνική χαρακτηρισμού μιας και μπορεί να φτάσει σε διακριτική ικανότητα περίπου στα 0.15-0.35 nm, εκμεταλλευόμενη την κυματική φύση των ηλεκτρονίων⁷⁰. Κατά την τεχνική αυτή, μια δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από το δείγμα και η προβολή της δέσμης αυτής αντιστοιχεί στο είδωλο του δείγματος. Η πηγή ηλεκτρονίων αποτελείται από νήμα βολφραμίου, το οποίο καθώς διατρέχεται από ηλεκτρικό ρεύμα εκπέμπει ηλεκτρόνια. Μεταξύ του νήματος, που αποτελεί την κάθοδο, και της ανόδου, εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού, της τάξης των 60-200 kV, η οποία επιταχύνει τα ηλεκτρόνια. Η πορεία

και η κλίση των τροχιών των ηλεκτρονίων ρυθμίζεται από ηλεκτρομαγνητικούς φακούς. Όταν η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος που τους διαπερνά μεταβάλλεται, αλλάζει και η ένταση του μαγνητικού πεδίου, και επομένως η δέσμη των ηλεκτρονίων μπορεί να εσπιαστεί στο δείγμα. Αφού η δέσμη ηλεκτρονίων διέλθει του δείγματος, στη συνέχεια διέρχεται από μία σειρά φακών με στόχο τη συγκέντρωση της δέσμης στην οθόνη παρατήρησης. Η εικόνα που λαμβάνεται σχηματίζεται πάνω σε οθόνη επικαλυμμένη με φθορίζουσα ουσία. Η οθόνη αυτή διεγείρεται από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν επάνω της, αφού πρώτα έχουν διαπεράσει το δείγμα. Στα σημεία εκείνα όπου το δείγμα δεν είναι διαπερατό από τα ηλεκτρόνια δημιουργούνται σκοτεινές περιοχές, ενώ αντίθετα τα διαπερατά σημεία εμφανίζονται ως φωτεινές περιοχές. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα λήψης εικόνας μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή σε ψηφιακή μορφή με τη χρήση μικροκάμερας. Όπως στην περίθλαση ακτίνων Χ, έτσι και στην ηλεκτρονική μικροσκοπία τα ηλεκτρόνια περιθλώνται από τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα του κρυστάλλου έτσι ώστε να ισχύει ο νόμος του Bragg ($2d \sin\theta = n\lambda$)⁷¹. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης χρησιμοποιείται στα LDH κυρίως για την μελέτη της μορφολογίας τους.



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση ενός συστήματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης.

1.5.7 Εφαρμογές

Κατάλυση

Τα LDH μετά τη διαδικασία της θέρμανσης στους 500°C εμφανίζουν μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας με αλκαλικές ιδιότητες με αποτέλεσμα να βρίσκουν εφαρμογή σαν ετερογενείς καταλύτες. Γενικά έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορων ειδών αντιδράσεις,

όπως αλδολικές συμπυκνώσεις⁷², υδρογονώσεις⁷³, οξειδώσεις⁷⁴ και αντιδράσεις πολυμερισμού⁷⁵, ενώ έχουν φωτοκαταλυτική δράση για τη φωτοδιάσπαση χρωστικών²⁶. Επίσης, LDH χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την ακινητοποίηση καταλυτών με σκοπό τη μετατροπή τους από ομογενείς σε ετερογενείς⁷⁶.

Επεξεργασία νερού

Τα λύματα περιέχουν συχνά ανιόντα και οξοανιόντα όπως F^- , Cl^- , Br^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , τα οποία είναι επιβλαβή για τον άνθρωπο. Η δυνατότητα να αφαιρεθούν τα οξοανιόντα αυτά είναι εξαιρετικής σημασίας για την προστασία του περιβάλλοντος⁷⁷. Το LDH είναι ένα νέο πολλά υποσχόμενο υλικό, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην επεξεργασία του νερού, λόγω της ικανότητάς του να συλλάβει επιβλαβή οργανικά και ανόργανα ανιόντα, όπως ανιόντα μολύβδου⁷⁸. Τα πυρωμένα LDH αποτελούν επίσης ένα σημαντικό νέο υλικό, που χρησιμοποιείται στην επεξεργασία του νερού, δεδομένου ότι μπορούν να αντέξουν μικτά μεταλλικά οξείδια και έχουν μία ιδιότητα που ονομάζεται φαινόμενο μνήμης. Τα κύρια πλεονεκτήματα των LDH πάνω από τις ανταλλακτικές ρητίνες, βρίσκονται στην υψηλότερη ικανότητα ανταλλαγής ανιόντων και την καλή θερμική σταθερότητά τους. Επιπλέον, τα LDH μπορούν να αναγεννηθούν πλήρως σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα για επαναχρησιμοποίηση.

Συμπληρώματα μπετού και επιβραδυντικά φλόγας

Οι σκόνες LDH αποτελούν ένα νέο τύπο προσθέτων στο σκυρόδεμα. Πιο συγκεκριμένα, το CaAl-LDH έχει ένα γενικό τύπο παρόμοιο με τη φάση AFm, που συμβαίνει σε ενυδατωμένο τσιμέντο. Αποτελείται από θετικά φορτισμένα στρώματα $[Ca_2Al(OH)]^+$, και αρνητικά φορτισμένα παρεμβαλλόμενα φύλλα $[X \cdot nH_2O]^-$. Η φάση AFm γενικά πιστεύεται ότι δρα ως κρυσταλλικός «σπόρος» επιταχύνοντας τη στερεοποίηση του τσιμέντου. Τα CaAl-LDH έχουν, ως εκ τούτου, προταθεί ως επιταχυντές σκλήρυνσης στο σκυρόδεμα⁷⁹. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι δείγματα που περιέχουν καθαρό CaAl-LDH, χωρίς μόλυνση από $CaCO_3$, παρουσίασαν μια πολύ βελτιωμένη απόδοση σε σχέση με

την αρχική αντοχή σε θλίψη και κάμψη. Οι τιμές αυξήθηκαν κατά 61% και 71%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα απλά δείγματα σκυροδέματος⁸⁰.

Τα LDH σε μορφή σκόνης είναι επίσης υποσχόμενα ως πρόσθετα σε επιβραδυντικά φλόγας⁸¹. Πολλά επιβραδυντικά θεωρούνται επιβλαβή και έχουν συνδεθεί με τοξικότητα στο ήπαρ, το θυρεοειδή, προβλήματα στην αναπαραγωγή και νευρολογικές επιπτώσεις. Έτσι μελετούνται επιβραδυντικά φλόγας, χωρίς αλογόνο σαν εναλλακτικές λύσεις. Σε σύγκριση με άλλα επιβραδυντικά φλόγας, τα LDH είναι μία υποσχόμενη εναλλακτική λόγω της υψηλής καταστολής του καπνού και τη χαμηλή τοξικότητα. Τα LDH αυτή τη στιγμή διερευνώνται ως δεύτερης γενιάς επιβραδυντικά φλόγας με βελτιωμένες ιδιότητες, είτε με τροποποίηση των στρωμάτων ή με παρεμβολή διαφορετικών ανιόντων⁸².

Βιοϊατρική

Τα τελευταία χρόνια εκτός από την ανάπτυξη καταλυτών τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια άρχισαν να βρίσκουν εφαρμογή στη βιολογία και τη βιοϊατρική. Σημαντικό βήμα προς αυτήν την κατεύθυνση ήταν η εισαγωγή DNA σε LDH⁸³. Τα νουκλεϊκά οξέα και το DNA διαθέτουν αρνητικό φορτίο και έτσι μπορούν να εισαχθούν σε LDH με ιοντανταλλαγή ή συνκαταβύθιση⁸⁴. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός πως τα υβρίδια LDH-DNA μπορούν να εισχωρήσουν σε ευκαρυωτικά κύτταρα και να απελευθερώσουν το DNA, δρώντας έτσι ως γονιδιακοί φορείς.

Η απελευθέρωση γίνεται είτε στα λυσοσώματα όπου το όξινο περιβάλλον διασπά τη δομή του πηλού, είτε λόγω ιοντανταλλαγής από ανιόντα του κυτταροπλάσματος. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ένα υβρίδιο LDH με το κατάλληλο ολιγονουκλεοτίδιο μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, ενώ το σκέτο LDH δεν προκαλεί αναστολή⁸⁵. Επίσης, το ολιγονουκλεοτίδιο μόνο του δεν έχει επαρκή δράση, καθώς δεν εισέρχεται μέσα στα κύτταρα. Η αυξημένη δράση του υβριδίου οφείλεται στην εξουδετέρωση του θετικού φορτίου των στρωμάτων του LDH με το αρνητικό φορτίο των ολιγονουκλεοτιδίων, γεγονός που διευκολύνει την διείσδυσή του στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης. Αυτό συμβαίνει καθώς μειώνονται οι ηλεκτροστατικές απωστικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες του κυττάρου και τα

αρνητικά φορτισμένα ολιγονουκλεοτίδια. Το γεγονός ότι τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια μπορούν να απελευθερώσουν το ανιόν που φέρουν στο εσωτερικό τους μέσα σε κύτταρα τα καθιστά ελκυστικά υλικά για εφαρμογές μεταφοράς και ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων. Μελέτες τέτοιων εφαρμογών έχουν γίνει και για πληθώρα φαρμάκων, όπως το αντιφλεγμονώδες φάρμακο *ibuprofen*⁸⁶ καθώς και αντικαρκινικά φάρμακα όπως η *methotrexate*⁸⁷. Τέλος, υπάρχει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον για τις πορφυρίνες^{74, 88-90} αφού πολλές από αυτές συμμετέχουν σε αρκετές βιολογικές διεργασίες, και έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν στην καταπολέμηση του καρκίνου μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας (πρωτοπορφυρίνη IX), ενώ παράλληλα πολλές μεταλλοπορφυρίνες αποτελούν προσθετικές ομάδες πρωτεϊνών με εξέχουσα βιολογική σημασία (αιμίνη).

1.6 Γονιδιακή θεραπεία

Γονιδιακή θεραπεία ονομάζεται ένας τύπος θεραπείας ασθενειών, ο οποίος βασίζεται στην καταπολέμηση όχι των συμπτωμάτων, αλλά των υποκείμενων αιτιών αυτών. Η θεραπεία βασίζεται σε τεχνολογίες, οι οποίες επιτρέπουν στον άνθρωπο να επέμβει στο γονιδίωμα διαφόρων οργανισμών και να διορθώσει ασθένειες οι οποίες μπορεί να προέρχονται από μεταλλάξεις ή ελαττωματικά γονίδια. Η πιο συχνή τεχνική που χρησιμοποιείται στη γονιδιακή θεραπεία, περιλαμβάνει την εισαγωγή γονιδίου σε μία μη συγκεκριμένη θέση. Με τη γονιδιακή θεραπεία μπορεί να γίνει και αντικατάσταση ελαττωματικών γονιδίων με υγιή βασιζόμενοι στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Τέλος, υπάρχουν αρκετές τεχνικές, οι οποίες επιτρέπουν αντίστροφες μεταλλάξεις, κατά τις οποίες ένα αλλαγμένο γονίδιο μπορεί να μετατραπεί στην κανονική, λειτουργική μορφή του⁹¹.

Η πρώτη εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας έγινε 27 χρόνια πριν, κάτω από την καθοδήγηση του William Anderson. Στην προσπάθεια αυτή κύτταρα του μυελού των οστών διορθώθηκαν γενετικά χρησιμοποιώντας ένα ρετροϊικό φορέα σε ένα παιδί που έπασχε από ανεπάρκεια δεαμινάσης αδενοσίνης, μία σπάνια μορφή ανοσοεπάρκειας⁹². Αυτή ήταν η πρώτη προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν γενετικά τροποποιημένα βλαστοκύτταρα για τη θεραπεία ανθρώπινης ασθένειας. Η δημοσίευση αυτής της μελέτης,

καθώς και μίας παράλληλης, όπου χρησιμοποιήθηκαν T λεμφοκύτταρα του αίματος για να θεραπευθεί η ίδια ασθένεια⁹³, σηματοδότησε την έναρξη της γονιδιακής θεραπείας.

Μετά από 30 χρόνια έρευνας, τεχνολογικών βελτιώσεων και κλινικών δοκιμών για τη απόδειξη της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας αυτής της θεραπείας, η γονιδιακή θεραπεία αποκτά σιγά σιγά πρόσβαση στην αγορά^{94, 95}. Κατά την ίδια περίοδο, *ex vivo* καθώς και *in vivo* μορφές γονιδιακής θεραπείας για γενετικές ασθένειες έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί βρίσκοντας μεγάλο εύρος επιτυχιών και αποτυχιών, καθώς και ανεπιθύμητων ενεργειών, που αποκάλυψαν τους κινδύνους της ενσωμάτωσης ιικών στοιχείων στο ανθρώπινο γονιδίωμα⁹⁶. Πιο πρόσφατα, μια σειρά κλινικών μελετών έδειξε ότι η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να αλλάξει την πορεία πολλών γενετικών ασθενειών, όπως ανοσοανεπάρκειες, προβλήματα αμφιβληστροειδούς, διαταραχές αποθήκευσης λυσοσωμάτων, αιμοσφαιρινοπάθειες ή αιμοφιλία⁹⁷. Με την ανακοίνωση άδειας κυκλοφορίας της πρώτης γονιδιακής θεραπείας (Strimvelis), πολλές από αυτές τις θεραπείες θα έχουν πρόσβαση αγορά στα επόμενα 2-5 χρόνια, συμβάλλοντας στην οριστικοποίηση της γονιδιακής θεραπείας στην κλινική ιατρική.

Η διαδικασία της γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνει τη χρήση ενός μορίου μήτρας που δρα ως μεταφορέας για το "κανονικό" γονίδιο που πρόκειται να αντικαταστήσει τα γονίδια στα κύτταρα-στόχους. Οι ιοί συνήθως χρησιμοποιούνται ως φορείς, καθώς από φύσης τους μεταφέρουν παθογόνα γονίδια στο εσωτερικό κυττάρων. Στη γονιδιακή θεραπεία, ιοί-φορείς τροποποιούνται γενετικά για να μεταφέρουν ανθρώπινο DNA⁹⁸. Κοινοί ιοί που χρησιμοποιούνται ως φορείς γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνουν ρετροϊούς, αδενοϊούς, αδενο-συσχετιζόμενους ιούς και ιούς απλού έρπητα.

Σαν φορείς μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μη-ϊικά συστήματα, αν και αυτές οι τεχνικές βρίσκονται σε νεότερο στάδιο εξέλιξης. Μία μέθοδος είναι η έγχυση του υγιούς γονιδίου απευθείας στα επιθυμητά κύτταρα. Ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε ορισμένους ιστούς, ενώ η ποσότητα του απαιτούμενου DNA είναι πολύ μεγάλη. Μια άλλη προσέγγιση απαιτεί τη δημιουργία ενός λιποσώματος το οποίο μεταφέρει το θεραπευτικό DNA στον υδάτινο πυρήνα του⁹⁹. Το πλεονέκτημά αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να περάσει τα υγιή γονίδια διαμέσω των μεμβρανών των κυττάρων στόχων. Μια ακόμα εναλλακτική λύση, αν και λιγότερο αποτελεσματική, είναι η χημική σύνδεση του DNA με ένα μόριο που δεσμεύεται στους

υποδοχείς των κυττάρων και από εκεί το DNA μεταφέρεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου-στόχου¹⁰⁰. Μια πολύ συναρπαστική τεχνική περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός 47ου χρωμοσώματος στα κύτταρα¹⁰¹. Αυτό το αυτόνομο χρωμόσωμα μπορεί να λειτουργήσει ως φορέας μιας μεγάλης ποσότητας γενετικών δεδομένων, ωστόσο είναι δύσκολο να παραδοθεί το μεγάλο χρωμόσωμα στον πυρήνα των κυττάρων άθικτο.

Πέρα από το σύστημα φορέα-γονιδίου, για την επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας έχει μεγάλη σημασία ο τρόπος μεταφοράς του συστήματος. Οι τεχνικές μεταφοράς χωρίζονται σε *in vivo* και *ex vivo*. Στις *in vivo* τεχνικές, χρησιμοποιείται κυρίως η ικανότητα του κυττάρου να απορροφά το DNA. Στις μεθόδους *ex vivo*, το υγιές γονίδιο προστίθεται στο κύτταρο έξω από το σώμα. Περιλαμβάνει την αφαίρεση των κυττάρων, την ανάπτυξη των διαγονιδιακών κυττάρων, την ανάλυση των κυττάρων και τέλος την προσθήκη τους στο σώμα. Η εξωσωματική θεραπεία χρειάζεται περισσότερη εργαστηριακή εργασία και έτσι παραμένει χρήσιμη μόνο σε εξατομικευμένες περιπτώσεις.

Παρ' όλα τα θετικά που μπορεί να προσφέρει μια θεραπεία που επεμβαίνει στο γονιδίωμα, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που έχουν επιβραδύνει την πρόοδο της γονιδιακής θεραπείας¹⁰². Αρχικά, υπάρχει ανάγκη για συνεχείς θεραπείες εξαιτίας της μικρής διάρκειας ζωής των θεραπευτικών αποτελεσμάτων μίας μόνο θεραπευτικής χορήγησης. Επίσης, τα μακροπρόθεσμα οφέλη είναι δύσκολο να επιτευχθούν, καθώς δεν είναι εύκολο να ενσωματωθεί το υγιές DNA σε όλα τα κύτταρα, ενώ δεν μπορεί να εξασφαλιστεί η μακροζωία και η σταθερότητα των κυττάρων που θα εισαχθεί. Ακόμα, η θεραπεία διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα και η ανταπόκρισή του καθιστά τη θεραπεία λιγότερο αποτελεσματική. Ταυτόχρονα, η χρήση αντιβιοτικών για την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να αφήσει τον ασθενή ευάλωτο σε ασθένειες. Τέλος, αν και οι ιοί χρησιμεύουν ως οι συνηθέστεροι φορείς, μπορούν να γίνουν τοξικοί κάποιες φορές μέσα στο σώμα και η φλεγμονώδης αντίδραση του σώματος να επηρεάσει τη διαδικασία.

Βέβαια θα ήταν λάθος να λεχθεί ότι δεν έχουν γίνει πολύ μεγάλα επιτεύγματα στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας. Οι πρόοδοι στη γονιδιακή θεραπεία, τα τελευταία χρόνια περιλαμβάνουν τη δυνατότητα να διορθώνονται ανωμαλίες στο αγγελιοφόρο RNA που λαμβάνεται από μεταλλαγμένα γονίδια¹⁰³. Αυτό έχει εφαρμογή στην θεραπεία της

κυστικής ίνωσης και της θαλασσαιμίας. Ταυτόχρονα, πλέον είναι δυνατόν να δημιουργηθούν πολύ μικρά λιποσώματα, διαμέτρου μόνο 25 nm, που μπορούν να λειτουργήσουν ως φορείς θεραπευτικού DNA. Τα λιποσώματα επικαλυμμένα με πολυαιθυλενογλυκόλη έχουν χρησιμοποιηθεί για να μεταφέρουν γονίδια στον εγκέφαλο¹⁰⁴, κάτι που αποτελεί μεγάλο επίτευγμα, αφού ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός δεν επιτρέπει τη διέλευση των ιικών φορέων. Σε άλλες ερευνητικές προσπάθειες, η γονιδιακή θεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή αντιμετώπιση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας σε ποντίκια¹⁰⁵ και ανθρώπους¹⁰⁶. Ακόμα, μια συναρπαστική νέα δυνατότητα έχει αναπτυχθεί με την επιτυχή εκτέλεση των τεχνικών γονιδιακής σίγασης που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων τρόπων αντιμετώπισης του Huntington's¹⁰⁷. Τέλος, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες, με αρκετές να βρίσκουν επιτυχία, αντιμετώπισης του μεταστατικού καρκίνου χρησιμοποιώντας γονιδιακή θεραπεία¹⁰⁸, όπου το microRNA χρησιμοποιήθηκε για να βοηθήσει στην απόκρυψη της ταυτότητας του υγιούς DNA για να αποτρέψει την ανίχνευση και καταστροφή του από το ανοσοποιητικό σύστημα.

1.7 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η παρασκευή και μελέτη νανοβιοϋβριδίων LDH με παγιδευμένες ουσίες που έχουν βιολογική σημασία. Στο πλαίσιο αυτό αρχικά έγιναν μερικές δοκιμές παγίδευσης αλάτων οξέων, καθώς και του αντιβιοτικού φαρμάκου νιτροφουραντοΐνη. Επιπλέον, σκοπός ήταν η εύρεση μιας νέας μεθόδου αποφυλλοποίησης LDH η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ένα βιοσυμβατό dLDH γρήγορα και αποτελεσματικά.

Ταυτόχρονα, σκοπός της έρευνας ήταν να γίνει ένας έλεγχος των μεθόδων παγίδευσης αμινοξέων μέσα σε LDH, με στόχο την διαλεύκανση των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων που εμφανίζονται στη βιβλιογραφία. Στα πλαίσια αυτού εξετάστηκε εάν η αποφυλλοποίηση (αρχικά) και μετέπειτα επαναστοίβαξη του LDH μπορεί να δώσει μία φτηνή εναλλακτική μέθοδο σύνθεσης νανοβιοϋβριδίων LDH με παγιδευμένα μόρια, τα οποία δύσκολα εισάγονται με ανιονανταλλαγή.

Τέλος, σκοπός της μελέτης ήταν να εξεταστεί η ικανότητα της επαναστοίβαξης να εκμεταλλευτεί την αυξημένη δραστική επιφάνεια των αποφυλλοποιημένων στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων, για να εισαχθούν μόρια μεγαλύτερου μεγέθους και να επεκταθεί η χρήση των LDH στη γονιδιακή θεραπεία.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Aldrich, Sigma και Fluka, και ήταν ποιότητας analytical grade. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε στις συνθέσεις ήταν nanopure grade και είχε απαερωθεί για τουλάχιστον 30 min υπό συνεχή ροή αερίου N_2 .

2.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων

Η παρασκευή LDH- NO_3 , έχει ως εξής: σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL προσαρμόζονται δύο προσθετικές φιάλες που επιτρέπουν τη στάγδην προσθήκη του περιεχομένου τους. Στη συνέχεια τοποθετείται πεχάμετρο, ροή αζώτου, μαγνητικός αναδευτήρας και 50 mL νερό. Από τις δύο προσθετικές φιάλες στη μία προστίθεται διάλυμα 50 mL 0,6 M $Mg(NO_3)_2$ και 0,3 M $Al(NO_3)_3$, ενώ στη δεύτερη διάλυμα 50 mL 2 M NaOH. Στη συνέχεια ξεκινά η στάγδην ταυτόχρονη προσθήκη των δύο διαλυμάτων με τέτοιο ρυθμό, έτσι ώστε το διάλυμα στο εσωτερικό της τρίλαιμης φιάλης να έχει pH σταθερό στο $10 \pm 0,5$, υπό συνεχής διοχέτευση N_2 . Καθώς τα δύο διαλύματα αναμειγνύονται σχηματίζεται λευκό ίζημα. Μετά το τέλος της προσθήκης το διάλυμα θερμαίνεται υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία $120^\circ C$, ώστε να προκύψει κρυσταλλική δομή με μικρό μέγεθος¹⁰⁹. Αφού περάσουν οι 24 ώρες, το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε 10.000 g για 10 min. Ακολουθούν εκπλύσεις με απαερωμένο, υπερκάθαρο H_2O , έως ότου το pH του αιωρήματος να είναι ουδέτερο, και χωρισμός σε δύο τμήματα, όπου το ένα επαναιωρείται και φυλάσσεται (σφραγισμένο με parafilm) σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ το δεύτερο στεγνώνει στον αέρα για περαιτέρω χαρακτηρισμό.

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του αιωρήματος LDH- νιτρικού, λαμβάνονται σε erpendorf 5 δείγματα του 1 mL, φυγοκεντρούνται και αφήνονται να στεγνώσουν. Στη συνέχεια ζυγίζεται η ποσότητα νιτρικού LDH και υπολογίζεται η συγκέντρωση, η οποία για τις συνθέσεις που διεκπεραιώθηκαν κυμάνθηκε μεταξύ 60-75 mg/mL.

2.2 Συνθέσεις με ανιονανταλλαγή

Κάθε σύνθεση με ανιονανταλλαγή υπακούει στους εξής κανόνες για να είναι επιτυχής:

- Η σύνθεση γίνεται υπό ροή αζώτου για να αποφευχθεί μόλυνση από ανθρακικά ανιόντα.
- Η αντίδραση γίνεται σε pH κατάλληλο για να εξασφαλιστεί το αρνητικό φορτίο της προς παγίδευση ουσίας. Αυτό μερικές φορές απαιτεί τη χρήση ρυθμιστικού στην αντίδραση.
- Η ποσότητα της ουσίας που χρησιμοποιείται είναι σε περίσσεια σε σχέση με την ποσότητα της μήτρας LDH, για να σπρώξει την αντίδραση προς το επιθυμητό προϊόν.

Στη συνέχεια ακολουθεί η ανάλυση των συνθέσεων που έγιναν με ανιονανταλλαγή.

LDH (Mg-Al) 2:1 - cholate

Σε 50 mL απαερωμένο νερό με 20 mM Tris (0,12 g, 1 mmol) προστίθενται 0,2 g sodium cholate (0.46 mmol) και το pH ρυθμίζεται στο 9. Η χρήση του συγκεκριμένου ρυθμιστικού εξασφαλίζει πως το pH δε θα πέσει κάτω από ένα κρίσιμο σημείο για την αντίδραση, ενώ έχει εξεταστεί πως το ίδιο δεν επηρεάζει τη μήτρα. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα αιωρήματος LDH-NO₃ που αντιστοιχεί σε 0,075 g LDH-NO₃ και το διάλυμα αφήνεται σε ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση σε 10.000 g για 10 min, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και η ουσία αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

LDH (Mg-Al) 2:1 - nitrofurantoin

Για την παρασκευή αυτού του υβριδίου αρχικά 0,05 g (0,2 mmol) nitrofurantoin διαλύονται σε 10 mL DMSO δημιουργώντας ένα διάλυμα 0.02 M. Στη συνέχεια το διάλυμα προστίθεται σε σφαιρική φιάλη που περιέχει νερό με Tris (0,30 g, 2,4 mmol) ρυθμισμένο σε pH = 9. Στο διάλυμα προστίθεται κατάλληλος όγκος LDH-NO₃ που αντιστοιχεί σε 0,05 g

LDH-NO₃ φέροντας τον τελικό όγκο του διαλύματος στα 50 mL. Το διάλυμα αναδεύεται για 24 h σε σφραγισμένη σφαιρική φιάλη. Το ίζημα απομονώνεται στη συνέχεια με φυγοκέντριση 10.000 g για 10 min, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

LDH (Mg-Al) 2:1 - acetate

Ξεκινώντας την αντίδραση, σε υπερκάθαρο νερό προστίθενται 0,73 g οξικό νάτριο. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα αιωρήματος LDH-NO₃ που αντιστοιχεί σε 0,1 g LDH-NO₃. Το διάλυμα με τελικό όγκο 50 mL αφήνεται σε ανάδευση για 24 h. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση σε 10000 g για 10 min, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και ένα τμήμα του ιζήματος αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για μελέτη, ενώ του υπόλοιπου επαναιωρείται σε απαερωμένο νερό για αποφυλλοποίηση.

LDH (Mg-Al) 2:1 - lactate

Για την παρασκευή αυτή, 0,02 g (0,22 mmol) λακτικού οξέος προστίθενται σε σφαιρική φιάλη που περιέχει νερό με 48 mM Tris (0,30 g, 2,4 mmol) και το pH ρυθμίζεται στο 10. Στη συνέχεια προστίθενται 0,3 g LDH-NO₃. Το διάλυμα με τελικό όγκο 50 mL αφήνεται σε ανάδευση για 24 h. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση σε 10000 g για 10 min, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και ένα τμήμα του ιζήματος αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για μελέτη, ενώ του υπόλοιπου επαναιωρείται σε απαερωμένο νερό για αποφυλλοποίηση.

LDH (Mg-Al) 2:1 – Vitamin C

Σε 10 mL απαερωμένου υπερκάθαρου νερού τοποθετούνται 0,04 g (0,23 mmol) Βιταμίνης C και 0,15 g LDH-NO₃. Το pH ρυθμίζεται στο 10 και το διάλυμα αφήνεται σε ανάδευση για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται η απομόνωση με φυγοκέντριση σε 10.000 g για 10 min, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

LDH (Mg-Al) 2:1 – amino acid

Αρχικά 0,1 g αμινοξέος τοποθετούνται σε 50 mL απαερωμένο νερό και το pH ρυθμίζεται μισή μονάδα πάνω από το ψηλότερο pK_a για την εξασφάλιση της αρνητικά φορτισμένης μορφής του στο διάλυμα (σε όποια είναι εφικτό). Στη συνέχεια προστίθενται 0,1 g LDH-NO₃ και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση σε 10.000 g για 10 min, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και η ουσία αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για περαιτέρω μελέτη.

Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για την μελέτη προσθήκης των L – αμινοξέων: αργινίνη, λυσίνη, ιστιδίνη, ασπαραγινικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, γλουταμίνη, γλυκίνη, βαλίνη, λευκίνη, ίσολευκίνη, κυστεΐνη, μεθειονίνη, σερίνη, θρεονίνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και τρυπτοφάνη.

2.3 Συνθέσεις με αποφυλλοποίηση

2.3.1 Μέθοδοι αποφυλλοποίησης

LDH (Mg-Al) 2:1 – γαλακτικό οξύ σε νερό

Για την αποφυλλοποίηση αυτή 0,2 g LDH (Mg-Al) 2:1 – γαλακτικό οξύ, το οποίο παρασκευάστηκε όπως αναγράφεται παραπάνω, αραιώνεται σε 10 mL νερό και αφήνεται σε ισχυρή ανάδευση για 72 h. Στο σημείο αυτό το διάλυμα θα πρέπει να έχει γίνει διαυγές.

Το πείραμα επαναλήφθηκε με θέρμανση στους 60°C κατά την ανάδευση και η διάρκεια μειώθηκε στη 1 μέρα.

LDH (Mg-Al) 2:1 – οξικό οξύ σε νερό

Για την αποφυλλοποίηση αυτή 0,2 g LDH (Mg-Al) 2:1 – οξικό οξύ, το οποίο παρασκευάστηκε όπως αναγράφεται παραπάνω, διαλύεται σε 10 mL νερό και αφήνεται σε ισχυρή ανάδευση για 48 h όπου παύει να παρατηρείται κolloειδές.

LDH (Mg-Al) 2:1 σε φορμαμίδιο, γλυκερίνη και προπυλενογλυκόλη

Για την αποφυλλοποίηση φτιάχτηκαν διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων απλού LDH (Mg-Al) 2:1 – NO₃ διαλυμένου σε φορμαμίδιο, γλυκερίνη (VG) ή προπυλενογλυκόλη (PG) αντίστοιχα. Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν ήταν συγκεντρώσεων 1, 2, 3, 4, 5, 20 και 40 mg/mL. Κάθε διάλυμα αναδεύτηκε σε υπερήχους για 30 min για να γίνει η αποφυλλοποίηση.

2.3.2 Συνθέσεις με αποφυλλοποιημένα διπλά υδροξείδια

Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε αποφυλλοποιημένο LDH-NO₃ που είχε κατασκευαστεί με κατεργασία σε υπερήχους μέσα σε προπυλενογλυκόλη. Το αποφυλλοποιημένο σε νερό LDH απορρίφθηκε, καθώς τα περισσότερα αμινοξέα αδυνατούν να διώξουν το γαλακτικό ή οξικό ανιόν που έχει ήδη συναρμοστεί. Ταυτόχρονα το αποφυλλοποιημένο σε φορμαμίδιο LDH απορρίφθηκε λόγω της τοξικότητας του διαλύτη. Τέλος, το αποφυλλοποιημένο σε γλυκερίνη LDH έδειξε πανομοιότυπη συμπεριφορά με αυτό της προπυλενογλυκόλης σε κάθε δοκιμή.

dLDH (Mg-Al) 2:1 – αμινοξέα

Για τη σύνθεση αυτή, 0,1 g αμινοξέος διαλύονται σε 5 mL απαερωμένο νερό. Το pH ρυθμίζεται μισό βαθμό πάνω από το ανώτερο pK_a για να εξασφαλιστεί η αρνητικά φορτισμένη μορφή της ουσίας στο διάλυμα. Στη συνέχεια το μείγμα προστίθεται σε διάλυμα προπυλενογλυκόλης που περιέχει 0,1 g αποφυλλοποιημένου LDH (τελικός όγκος 50 mL) και αφήνεται σε έντονη ανάδευση για 48 h. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση σε 15.000 g για 15 min και ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό στις ίδιες συνθήκες, πριν αφεθεί για ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αλλαγές στις συνθήκες φυγοκέντρισης κρίθηκαν απαραίτητες για την καθίζηση του αποφυλλοποιημένου LDH.

dLDH (Mg-AI) 2:1 – DNA

Σε 10 mL απαερωμένου νερού διαλύονται 0,1 g αποικοδομημένου DNA από σπέρμα πέστροφας (20-40 bp) με τη χρήση ομογενοποιητή. Το διάλυμα προστίθεται σε 40 mL μείγματος 0,3 g dLDH διαλυμένα στο υγρό που έγινε η αποφυλλοποίηση. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 48 h, φυγοκέντριση σε 15.000 g για 15 min, δύο εκπλύσεις με νερό και το στερεό αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

2.4 Χαρακτηρισμός

Τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X ελήφθησαν σε περιθλασίμετρο Rigaku RINT 2000 με πηγή ακτίνων X Cu K α ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$), τάση 40 kV και ένταση 178 mA. Χρησιμοποιήθηκαν βήματα των $0,02^\circ$ με χρόνο μέτρησης στο κάθε βήμα ίσο με 1 δευτερόλεπτα. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν 0,05 g στερεού κονιορτοποιημένου δείγματος, τα οποία απλώθηκαν σε δειγματολήπτη τιτανίου.

Οι μετρήσεις υγρής περίθλασης ακτίνων X έγιναν σε περιθλασίμετρο BEDE D1 Triple Axis High Resolution XRD σε ίδιες συνθήκες. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν 0,05 g LDH διαλυμένων στον εκάστοτε διαλύτη αποφυλλοποίησης. Το υγρό δείγμα τοποθετήθηκε σε κλειστό γυάλινο τριχοειδή σωλήνα, μέσα από τον οποίο περνά η δέσμη ακτίνων X. Ο χρόνος μέτρησης αυξήθηκε στα 20 δευτερόλεπτα ανά βήμα, για να υπερκεραστεί το χαμηλό σήμα, λόγω της απορρόφησης των ακτίνων από το διαλύτη.

Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-2700. Οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση στερεού κονιορτοποιημένου δείγματος αρκετής ποσότητας για να καλυφθεί ο κρύσταλλος του φασματοφωτομέτρου.

Τα φάσματα υπερύθρου λήφθηκαν σε φασματόμετρο Thermo-Electron Nicolet 6700 FT-IR με μέθοδο εξασθενημένης ολικής ανάκλασης. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία. Οι μετρήσεις συγκεντρώσεων των διαλυμάτων DNA λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο nanodrop Multiskan Sky Microplate της εταιρείας Thermo Fischer Scientific.

Για τις μελέτες δυναμικής σκέδασης φωτός χρησιμοποιήθηκε ένα όργανο τυπικής διάταξης, κατασκευασμένο από την ALV GmbH στο Langen της Γερμανίας, με συσχετιστή

ALV-5000. Το μήκος κύματος λέιζερ που χρησιμοποιήθηκε ήταν 532 nm στα 100 mW (χωρίς εξασθενητή), ενώ η θερμοκρασία ήταν 20°C. Μετρήθηκαν υγρά δείγματα LDH ίδιας συγκέντρωσης με παραπάνω, τα οποία τοποθετήθηκαν σε γυάλινους δειγματολήπτες. Οι δειγματολήπτες πρώτα πλύθηκαν με αιθανόλη και ξηράθηκαν στους 100°C για να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή απομάκρυνση υγρασίας.

2.5 Μελέτη σταθερότητας αποφυλλοποίησης LDH

Για τον έλεγχο σταθερότητας αποφυλλοποιημένου LDH που παρήχθησε, όπως περιγράφεται παραπάνω, ελέγχθηκε ο χρόνος που μπορεί να παραμείνει αποφυλλοποιημένο. Για κάθε μία από τις 5 μεθόδους αποφυλλοποίησης δημιουργήθηκε μία σειρά διαλυμάτων του 1 mL, με συγκεντρώσεις dLDH 1, 2, 5, 10, 20 και 40 g/L. Ύστερα από απαέρωση με άζωτο, τα διαλύματα φυλάχθηκαν στον εκάστοτε διαλύτη αποφυλλοποίησης και αφέθηκαν σε ηρεμία για ένα χρόνο, ελέγχοντας σε καθημερινή βάση αν συνεχίζουν να εμφανίζουν το φαινόμενο Tyndall.

2.6 Μελέτη LDH-DNA με γέλη αγαρόζης

Προκειμένου να προσδιοριστεί αν το DNA έχει εγκλωβιστεί επιτυχώς στο εσωτερικό του LDH, τα βιοϋβρίδια που παρήχθησαν μελετήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης. Έγιναν δύο σειρές πειραμάτων, όπου μελετήθηκε η κινητικότητα των: LDH-DNA, dLDH-DNA σε φορμαμίδιο, dLDH-DNA σε PG και dLDH-DNA σε VG, χωρίς ή με την προσθήκη οξέος.

Σε κάθε πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκε διάλυμα αγαρόζης 0,8% σε ρυθμιστικό TE 1x (10x TE buffer περιέχει 100 mM Trisma base και 10 mM EDTA σε pH 8,0) στο οποίο προστέθηκαν 2 σταγόνες βρωμιούχο αιθίδιο. Σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν 200 μ L ουσίας και εφαρμόστηκε ρεύμα 120 V για 20 min. Στη δεύτερη πειραματική σειρά, η μόνη διαφορά ήταν στην προσθήκη 10 μ L HCl περιεκτικότητας 1 M σε κάθε δείγμα πριν γίνει η εισαγωγή στο πηγάδι. Οι τελικές μπάντες που σχηματίστηκαν, εμφανίστηκαν με λάμπα UV.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

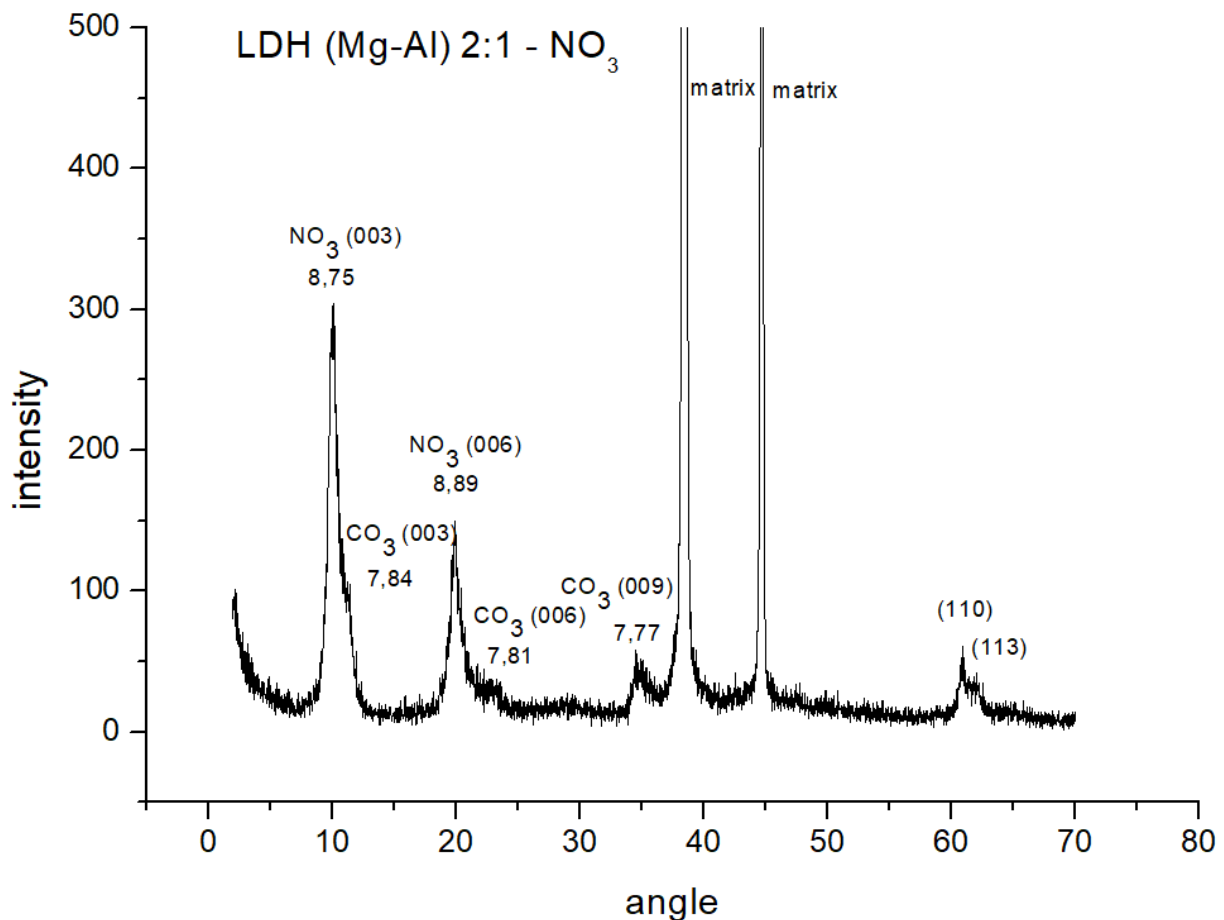
3.1 Χαρακτηρισμός συνθέσεων LDH με ανιονανταλλαγή

Ο χαρακτηρισμός των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων βασίστηκε στην ανάλυση με περίθλαση ακτίνων X και φασματοσκοπία υπεριώθρου. Με τη χρήση της περίθλασης ακτίνων X μελετήθηκε η απόσταση μεταξύ των ανόργανων στρωμάτων των LDH (d-spacing). Η απόσταση αυτή εξαρτάται από το είδος των ανιόντων που βρίσκονται ανάμεσα στα στρώματα, το μέγεθος και το φορτίο τους. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διαπιστωθεί οποιαδήποτε αντικατάσταση ανιόντων στο εσωτερικό των LDH.

Στη συνέχεια με τη χρήση φασματοσκοπίας υπεριώθρου μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση της παγιδευμένης στο εσωτερικό ουσίας. Αυτή η μέθοδος όμως δεν μπορεί να ανιχνεύσει εάν η ουσία έχει μπει στο εσωτερικό των στρωμάτων του LDH ή απλά έχει συναρμοστεί επιφανειακά και για αυτό πρέπει τα αποτελέσματά της πάντα να διασταυρώνονται με αυτά της ανάλυσης με περίθλαση ακτίνων X.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-NO₃:

Ξεκινώντας, παρουσιάζεται το διάγραμμα περίθλασης του LDH (Mg-Al) 2:1 - NO₃ (εικόνα 3.1), το οποίο χρησιμοποιήθηκε μετέπειτα για τη σύνθεση των υπολοίπων υβριδίων LDH με ανιονανταλλαγή. Εφαρμόζοντας τον νόμο του Bragg προκύπτουν δύο διαστρωματικές αποστάσεις, στα 8.75 Å και 7.84 Å αντίστοιχα. Η διαστρωματική απόσταση 8.75 Å δηλώνει τη σταθεροποίηση νιτρικών ανιόντων μεταξύ των στρωμάτων, ενώ ο ώμος δίπλα της, που δίνει απόσταση 7.84 Å, δηλώνει την ύπαρξη ανθρακικών ανιόντων¹¹⁰. Η ύπαρξη ανθρακικών δεν είναι επιθυμητή, καθώς τα ιόντα αυτά δεσμεύονται πολύ ισχυρά και είναι δύσκολο να απομακρυνθούν, αλλά είναι αναπόφευκτη. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι κορυφές στις μεγαλύτερες γωνίες (38,19° και 44,41° αντίστοιχα) ανήκουν στη μήτρα τιτανίου, πάνω στην οποία μετρήθηκαν τα δείγματα και όχι στο ίδιο το δείγμα. Οι μικρής έντασης κορυφές στις 60,95° και 62,03° (d = 1,52 και 1,49 Å αντίστοιχα) υποδεικνύουν την ύπαρξη δυσδιάστατων κρυστάλλων¹¹¹ και είναι καθοριστικής σημασίας στη μελέτη των αποφυλλοποιημένων LDH.

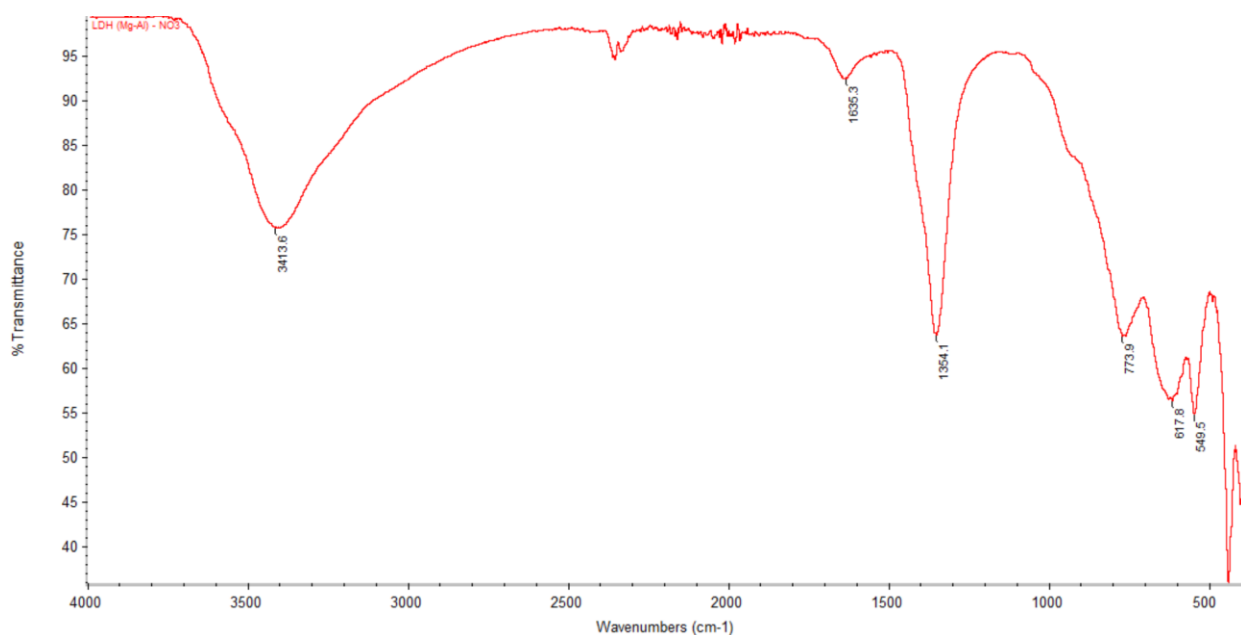


Εικόνα 3.1. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X LDH(Mg-Al) 2:1 -NO₃.

Οι διαστρωματικές αποστάσεις, παρότι συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, δεν είναι αρκετές για να υποστηριχθεί με σιγουριά η επιτυχημένη σύνθεση του LDH-NO₃. Όπως θα εμφανιστεί και στη συνέχεια, υπάρχουν και άλλες ουσίες που εμφανίζουν κοντινό d-spacing. Για το λόγο αυτό η εξακρίβωση της ουσίας γίνεται μελετώντας τις κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα φασματοσκοπίας υπερώθρου.

Χαρακτηριστικό κάθε φάσματος υπερώθρου LDH είναι η ευρεία ταινία που εμφανίζεται κοντά στους 3.400 cm⁻¹, η οποία οφείλεται στη δόνηση τάσης των υδροξυλίων των μεταλλικών στρωμάτων, καθώς και οι κορυφές στην περιοχή 400-1.000 cm⁻¹, οι οποίες δηλώνουν τις δονήσεις των δεσμών μετάλλου-οξυγόνου (M-O) και μετάλλου-υδροξυλίου (M-OH). Η δόνηση που εμφανίζεται στους 1633 cm⁻¹ ανήκει στη δόνηση κάμψης του νερού. Συνήθως οι κορυφές που οφείλονται αποκλειστικά στα ανιόντα

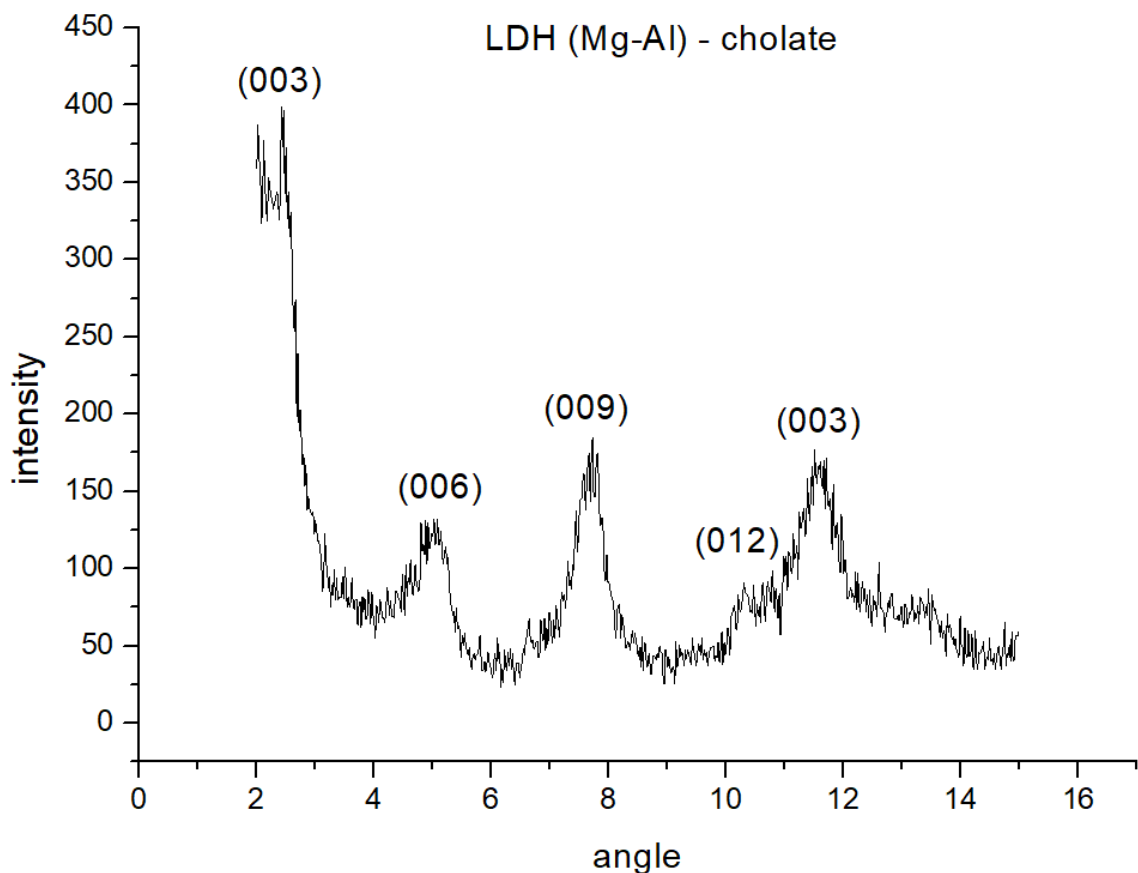
εμφανίζονται στην περιοχή 1.000 cm^{-1} έως 2.000 cm^{-1} . Στην περίπτωση του φάσματος LDH(Mg-Al)-NO₃ (εικόνα 3.2) δεν εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του νιτρικού ανιόντος στους 1380 cm^{-1} , 1.760 cm^{-1} και 825 cm^{-1} . Αντίθετα, η κορυφή στους 1355 cm^{-1} δηλώνει την ύπαρξη ανθρακικών ανιόντων. Αυτό μπορεί να σημαίνει δύο πράγματα: είτε ότι νιτρικά ανιόντα υπάρχουν, αλλά η εντάσεις των κορυφών τους είναι μικρές και υπερκαλύπτονται από τις διπλανές, είτε ότι δεν υπάρχουν καθόλου και το δείγμα είναι μόνο LDH-CO₃. Συγκρίνοντας το IR με το XRD της ουσίας μπορούμε με ευκολία να συμπεράνουμε το πρώτο αφού υπάρχουν οι χαρακτηριστικές αποστάσεις των νιτρικών ανιόντων.



Εικόνα 3.2. Φάσμα υπερώθρου του LDH(Mg-Al)-NO₃.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-χολικού οξέος:

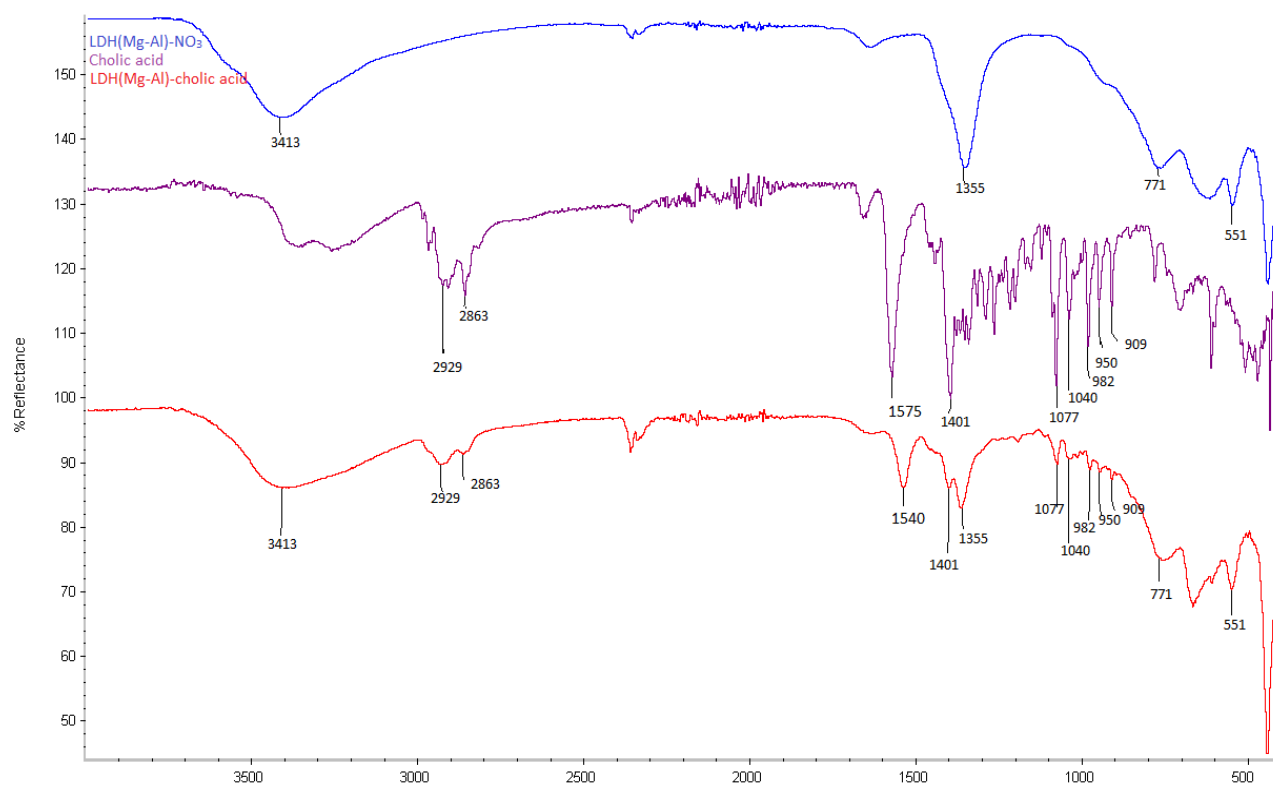
Χρησιμοποιώντας το νόμο του Bragg στο παραπάνω διάγραμμα (εικόνα 3.3), υπολογίστηκε απόσταση μεταξύ των στρωμάτων του LDH ίση με 35.72 \AA . Μπορούμε να συμπεράνουμε, πως η απόσταση μεταξύ των διαδοχικών στρωμάτων LDH έχει αυξηθεί, δηλώνοντας ότι πιθανότατα η εισαγωγή του χολικού ανιόντος ήταν επιτυχής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κορυφή στις $11,61^\circ$ δεν ανήκει στο χολικό ανιόν, αλλά σε ανθρακικά ανιόντα τα οποία ήταν παρόντα στο αρχικό LDH και δεν μπορούσαν να αντικατασταθούν λόγω της υψηλότερης συγγένειάς τους με τη μήτρα.



Εικόνα 3.3. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ του LDH (Mg-Al)-χολικού.

Η εξακρίβωση των παραπάνω υποθέσεων γίνεται με την ταυτοποίηση του ιόντος με φασματοσκοπία υπερύθρου. Αρχικά, αναλύεται το φάσμα του ελεύθερου χολικού (εικόνα 3.4). Οι κορυφές στους 2929 cm^{-1} και 2863 cm^{-1} οφείλονται στις δονήσεις C-H. Εξίσου εμφανής είναι η αντισυμμετρική δόνηση του καρβοξυλίου στους 1575 cm^{-1} και 1401 cm^{-1} . Οι κορυφές της περιοχής ταυτοποίησης $1000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ οφείλονται στις δονήσεις σκελετού του χολικού οξέος. Στο φάσμα του υβριδίου εμφανίζονται τόσο κορυφές του LDH όσο και του χολικού οξέος, αποκαλύπτοντας έτσι τη δέσμευση της ουσίας στο LDH. Η κορυφή στους 1355 cm^{-1} μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα ανθρακικά ανιόντα δεν έχουν απομακρυνθεί πλήρως από το LDH δικαιολογώντας την επιπλέον κορυφή στα $11,61^\circ$ του διαγράμματος περίθλασης ακτίνων Χ. Συνδυάζοντας τα στοιχεία που πήραμε από τη φασματοσκοπία IR με τη διόγκωση των στρωμάτων που

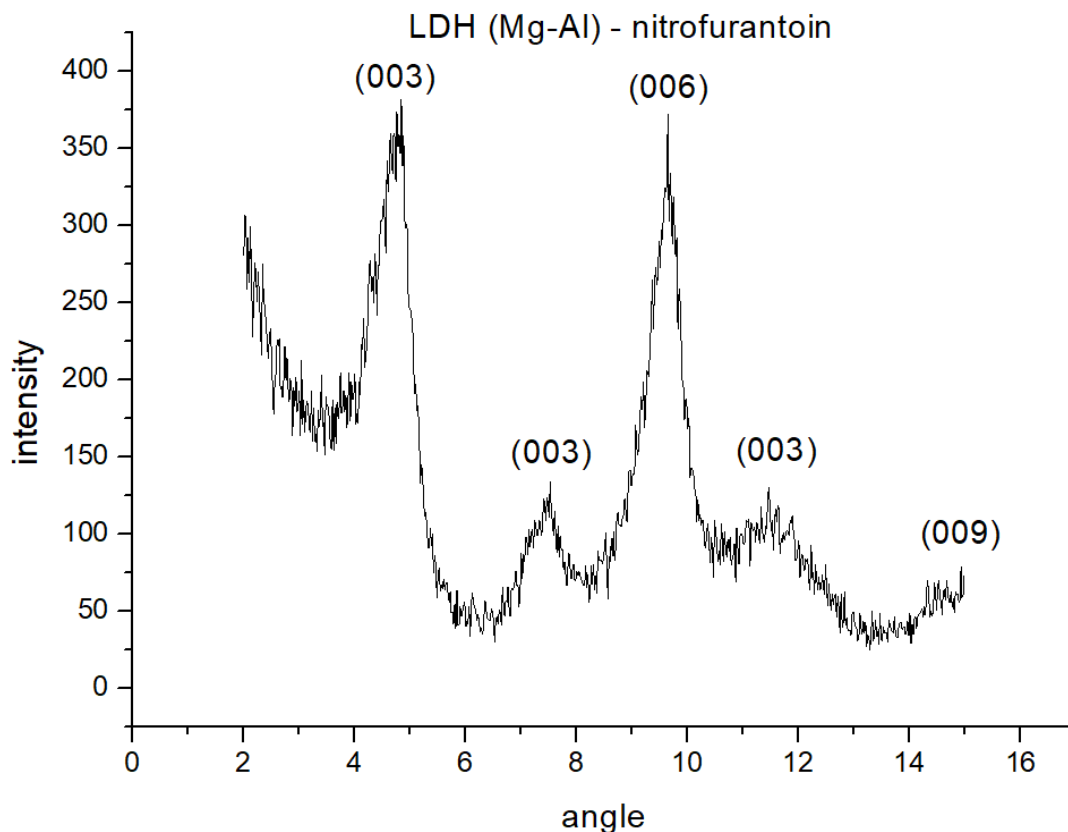
φαίνεται στην περίθλαση ακτίνων Χ, μπορούμε να συμπεράνουμε, ότι το χολικό οξύ έχει συναρμοστεί εσωτερικά του LDH.



Εικόνα 3.4. Φάσμα υπερύθρου του LDH (Mg-Al)-cholic acid.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-nitrofurantoin:

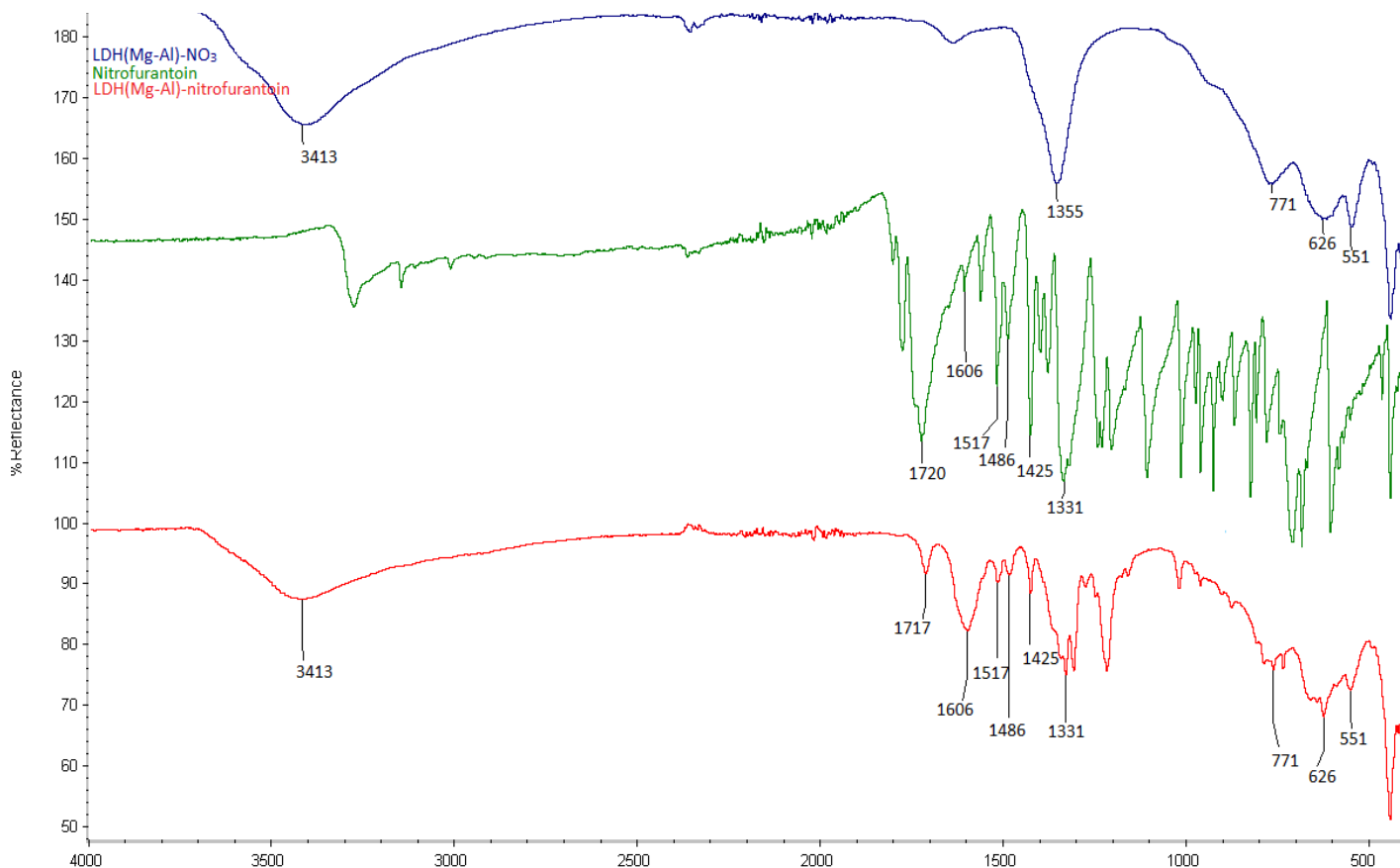
Στο διάγραμμα που εμφανίζεται στην εικόνα 3.5 η κύρια απόσταση μεταξύ των στρωμάτων του LDH υπολογίζεται στα 18,19 Å. Εμφανίζεται όμως και μία δεύτερη (003) κορυφή στις 7,53° ($d = 11,72 \text{ \AA}$) η οποία δηλώνει πως υπάρχει ανομοιομορφία στο δείγμα και μερικές αποστάσεις είναι διαφορετικές σε μέγεθος. Εφόσον δεν υπήρχε άλλο ανιόν να εισαχθεί μεταξύ των στρωμάτων, αυτή η ανομοιομορφία μπορεί να οφείλεται μονάχα στην συναρμογή της νιτροφουραντοΐνης υπό γωνία. Η επαλήθευση της υπόθεσης γίνεται με τη μελέτη του στερεού με φασματοσκοπία υπερύθρου.



Εικόνα 3.5. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ του LDH (Mg-Al)-nitrofurantoin.

Όπως και πριν, η αποφυγή της ύπαρξης ανθρακικών ανιόντων είναι αδύνατη, εφόσον υπάρχουν στο αρχικό LDH-NO₃ που χρησιμοποιείται.

Παρατηρώντας το φάσμα υπερύθρου της νιτροφουραντοΐνης (εικόνα 3.6) η κορυφή στους 1720 cm⁻¹ αποδίδεται στην ομάδα C=O που υπάρχει στον κύκλο υδαντοΐνης, ενώ οι κορυφές μεταξύ 1331-1517 cm⁻¹ δείχνουν την ύπαρξη του α-νιτροφουραντο-δακτυλίου¹¹². Η ύπαρξη των κορυφών αυτών, σε μαζί με τις κορυφές του LDH αποδεικνύουν τη συναρμογή του φαρμάκου στο LDH. Οι κορυφές αυτές σε συνδυασμό με την αλλαγή της απόστασης στρωμάτων στην ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ, δηλώνουν ότι η συναρμογή αυτή έγινε στο εσωτερικό των στοιβάδων.

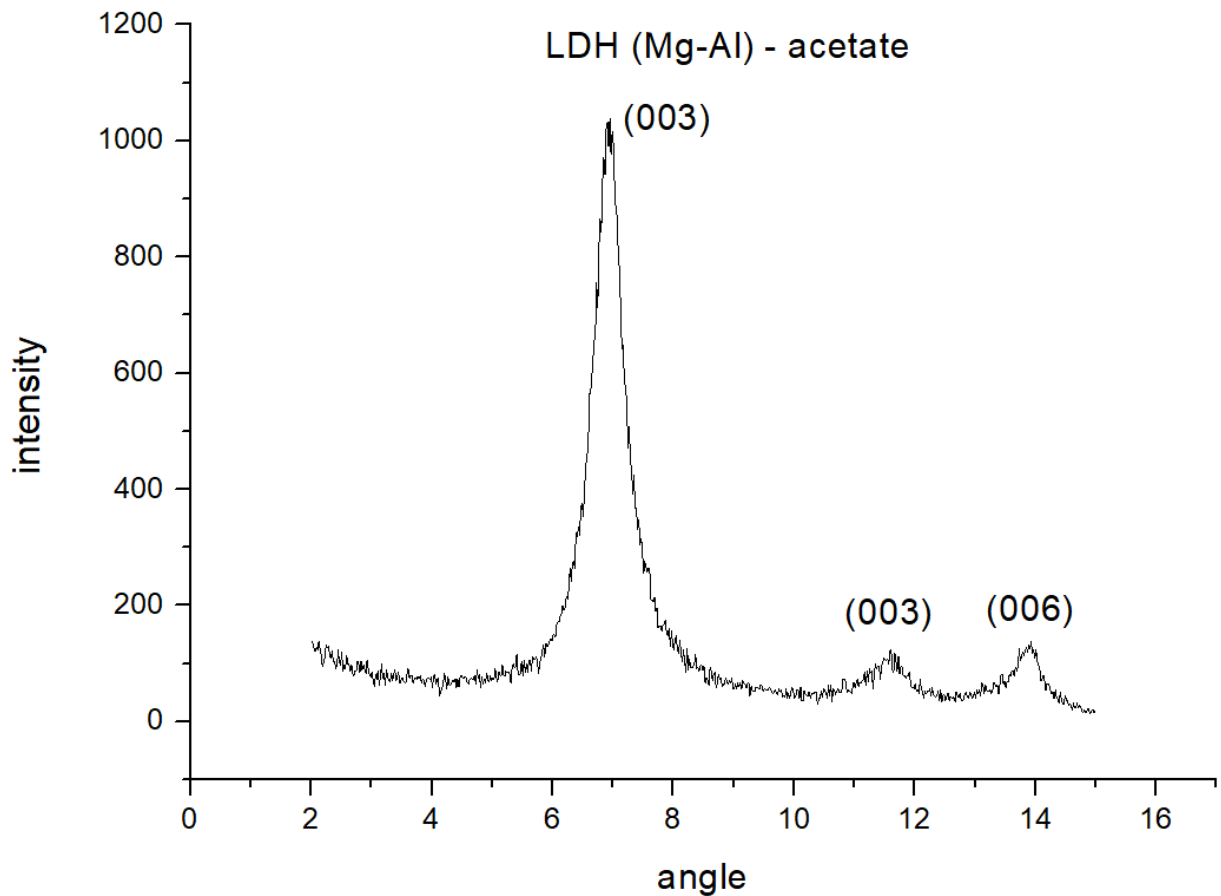


Εικόνα 3.6. Φάσμα υπέρυθρου του LDH (Mg-Al)-nitrofurantoin.

Αξίζει να σημειωθεί πως στους 1355 cm^{-1} υπάρχει ώμος στο φάσμα του LDH-nitrofurantoin, που δηλώνει την ύπαρξη LDH συναρμοσμένου με ανθρακικά ανιόντα. Όπως και στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X η κορυφή είναι χαμηλής έντασης και δείχνει ότι η ποσότητα LDH-CO₃ στο δείγμα είναι ελάχιστη.

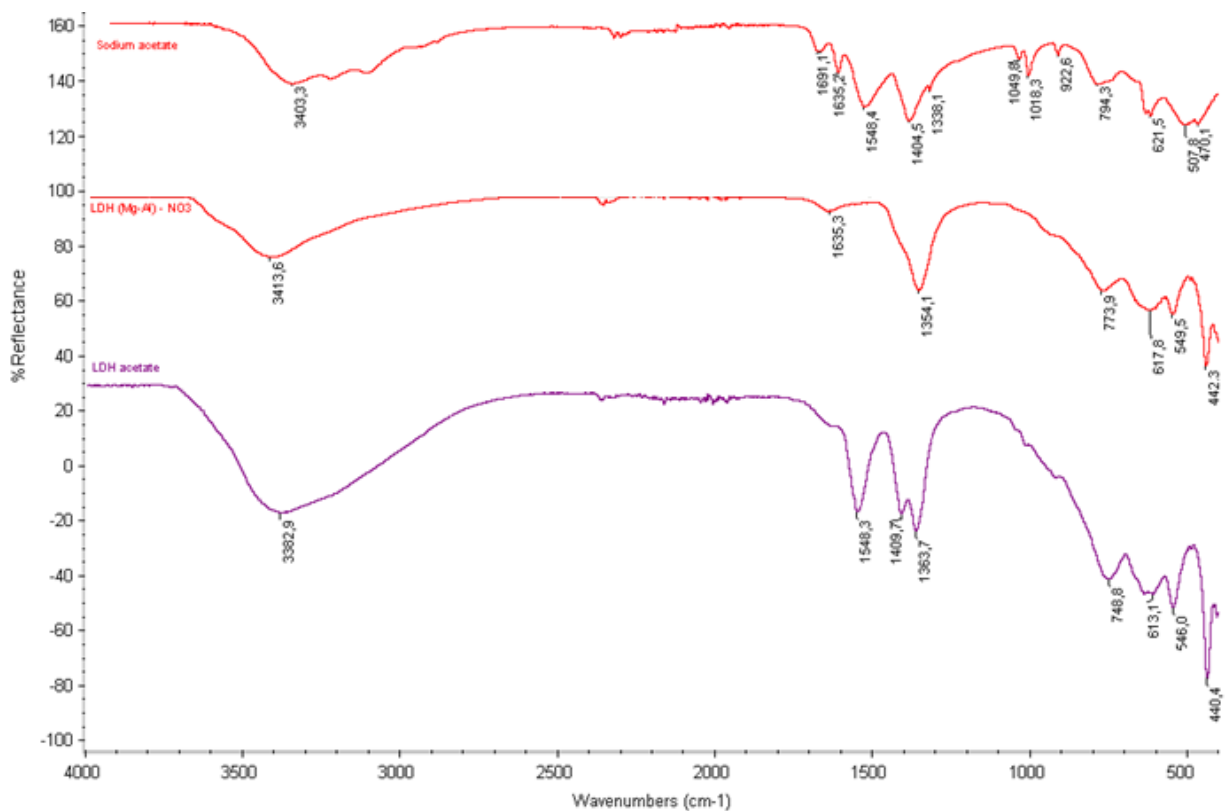
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-οξικού:

Στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH (Mg-Al)-οξικού (εικόνα 3.7) η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων υπολογίστηκε ίση με $12,74\text{ \AA}$. Η απόσταση αυτή αντιστοιχεί στην παρουσία οξικού ανιόντος και συμφωνεί με τη βιβλιογραφία⁶². Η πετυχημένη σύνθεση εξακριβώνεται με φασματοσκοπία IR, καθώς και πειράματα αποφυλλοποίησης του LDH (Mg-Al)-οξικού σε νερό, όπου το απλό LDH-NO₃ ή LDH-CO₃ δε θα μπορεί να αποφυλλοποιηθεί.



Εικόνα 3.7. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ του LDH (Mg-Al)-acetate.

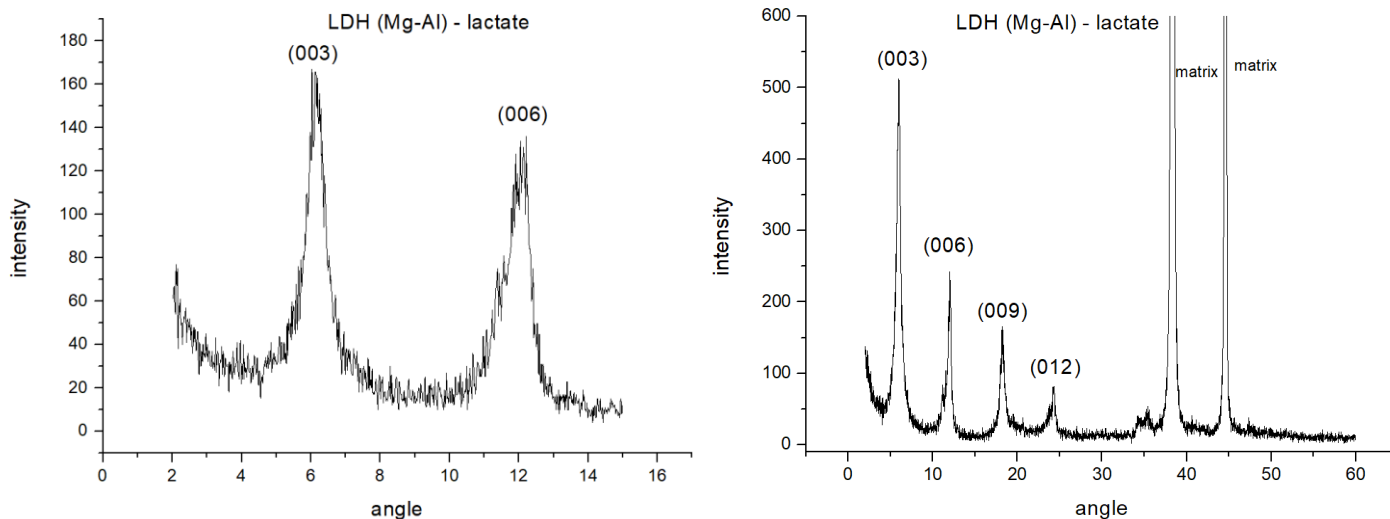
Το φάσμα υπέρυθρου της εικόνας 3.8 εμφανίζει δονήσεις στους $1548,3 \text{ cm}^{-1}$ και $1409,7 \text{ cm}^{-1}$, οι οποίες οφείλονται στην ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση τάσης του $-\text{COO}^-$. Αντίστοιχα, η κορυφή στους $1363,7 \text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στην ομάδα $-\text{CH}_3$ του οξικού. Η ύπαρξη αυτών των κορυφών σε συνδυασμό με τη διαπλάτυνση των στρωμάτων στο αντίστοιχο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ, εξακριβώνουν την εσωτερική παγίδευση του οξικού ανιόντος ανάμεσα στα στρώματα του LDH.



Εικόνα 3.8. Φάσμα υπεράυθρου του LDH (Mg-Al)-acetate.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-γαλακτικού:

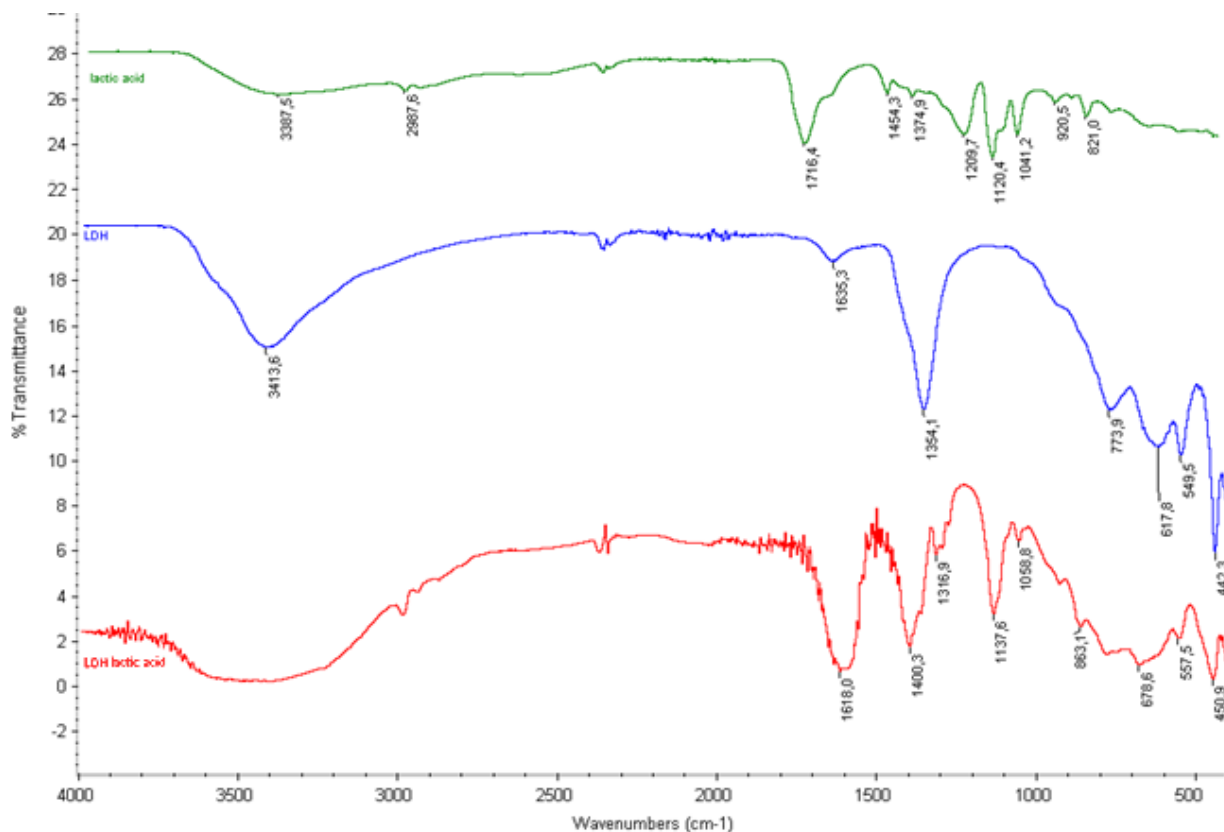
Αναλύοντας τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ του LDH (Mg-Al)-γαλακτικού (εικόνα 3.9) η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων υπολογίζεται ίση με 14,72 Å, κάτι που είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία⁶². Για την εξακρίβωση πως η κορυφή στις 12,01° ανήκει στην (006) απόσταση του γαλακτικού ανιόντος, λήφθηκε XRD μέχρι τις 60°. Βρίσκοντας τους δείκτες Miller των κορυφών που υπολογίζονται, συμπεραίνουμε πως η κορυφή στις 12,01° δεν ανήκει στα ανθρακικά ανιόντα, αλλά στο γαλακτικό ιόν.



Εικόνα 3.9. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ του LDH (Mg-Al)-γαλακτικό.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.10, υπάρχουν ευρείς ζώνες στους 3413 cm^{-1} οι οποίες οφείλονται στις δονήσεις τάσης του υδροξυλίου, καθώς και στο νερό μεταξύ των στρωμάτων. Ιδιαίτερα έντονη κορυφή εμφανίζεται στους 1618 cm^{-1} και 1400 cm^{-1} η οποία οφείλεται στην ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση τάσης του -COO^- . Η κορυφή στους $1137,6\text{ cm}^{-1}$ μαζί με την χαμηλής έντασης κορυφή στους $1058,8\text{ cm}^{-1}$ ανήκουν στις δονήσεις τάσης του C-OH. Η ύπαρξη αυτών των κορυφών μαζί με τις κορυφές στους $400\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ που είναι χαρακτηριστικές των δεσμών μετάλλων του LDH είναι αρκετές για να αποδείξουν την επιτυχή εισαγωγή του γαλακτικού ανιόντος ανάμεσα στις ανόργανες στοιβάδες.

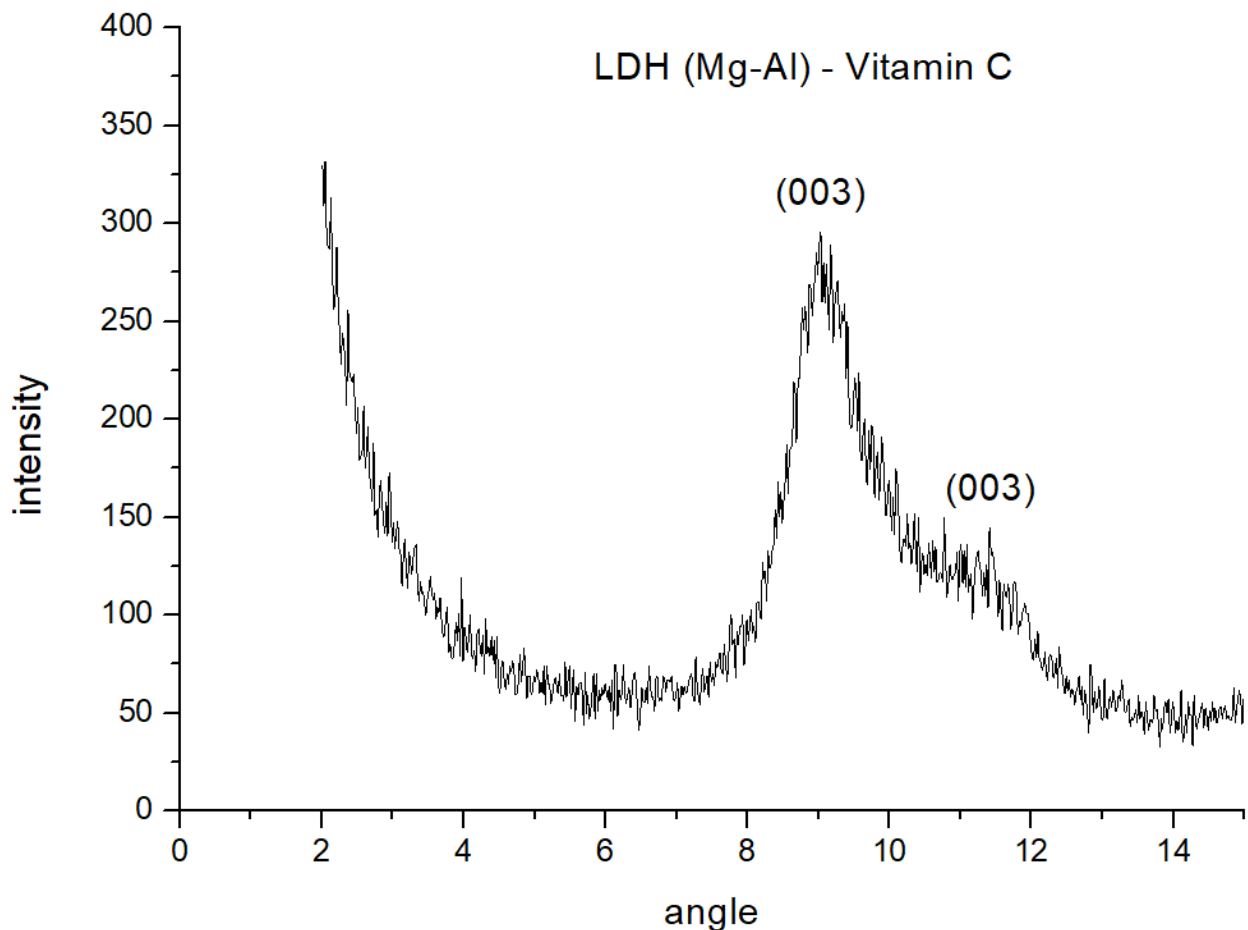
Η πλήρης έλλειψη κορυφής στους 1355 cm^{-1} επαληθεύει τη θεωρία, πως η κορυφή στις $12,01^\circ$ μοίρες του διαγράμματος περίθλασης ακτίνων Χ δεν ανήκει στα ανθρακικά ανιόντα.



Εικόνα 3.10. Φάσμα υπερέυθρου του LDH (Mg-Al)-γαλακτικό.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-βιταμίνη C:

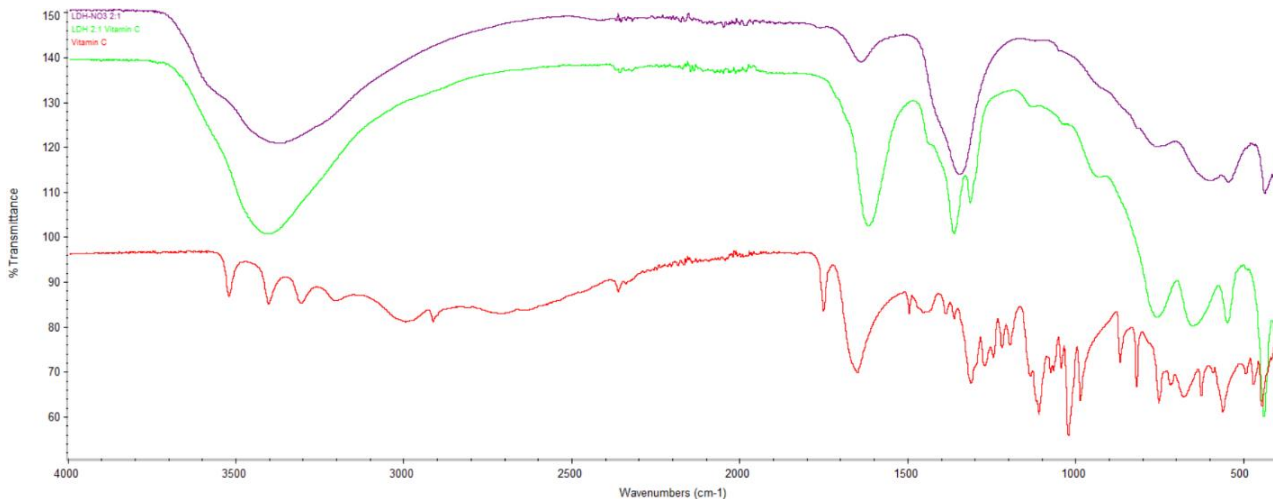
Η κύρια κορυφή που εμφανίζεται στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X της εικόνας 3.11, αντιστοιχεί σε απόσταση 9,78 Å. Η απόσταση αυτή αν και αρκετά κοντά στην απόσταση που έχουν τα νιτρικά ανιόντα, αντιστοιχεί με αυτή της βιβλιογραφίας για την παρουσία βιταμίνης C¹³. Η μικρή αυτή διαφορά στη διαπλάτυνση δικαιολογείται, καθώς η βιταμίνη C συναρμόζεται υπό γωνία, με το δακτύλιο της λακτόνης να «αγγίζει» το ένα φύλλο σε γωνία 53° και το τελικό υδροξύλιο να κάνει δεσμό υδρογόνου με το δεύτερο φύλλο.



Εικόνα 3.11. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ του LDH (Mg-Al)-βιταμίνη C.

Η ταυτοποίηση της παγίδευσης βιταμίνης C ανάμεσα στα στρώματα γίνεται στη συνέχεια με τη μελέτη του φάσματος υπεριώθρου του υβριδίου.

Στο φάσμα που εμφανίζεται στην εικόνα 3.12 εμφανίζονται καθαρά κορυφές στους 1315 έως 1364 και 1615 cm^{-1} . Οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν στις δονήσεις στο εσωτερικό της λακτόνης (C-O-C) και στην ομάδα καρβονυλίου της βιταμίνης C αντίστοιχα. Η έλλειψη από κορυφές που θα αντιστοιχούσαν σε δονήσεις νιτρικών κοντά στους 1380 cm^{-1} , 1760 cm^{-1} και 825 cm^{-1} επαληθεύει πως δεν υπάρχουν νιτρικά ανιόντα στο δείγμα και πως η διαστρωματική απόσταση που υπολογίστηκε από το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ ανήκει στη βιταμίνη C.



Εικόνα 3.12. Φάσμα υπερύθρου του LDH (Mg-Al)-Vitamin C.

3.2 Ανάλυση αποφυλλοποιημένου LDH (dLDH)

Για την αποφυλλοποίηση του LDH δοκιμάστηκαν 5 μέθοδοι: δύο σε νερό, μία σε φορμαμίδιο, μία σε προπυλενογλυκόλη και μία σε γλυκερίνη. Από αυτές, οι πρώτες τρεις είναι εκτενώς μελετημένες στη βιβλιογραφία, ενώ οι δύο τελευταίες δοκιμάζονται για πρώτη φορά στα πλαίσια αυτής της έρευνας^{62, 67, 114-116}.

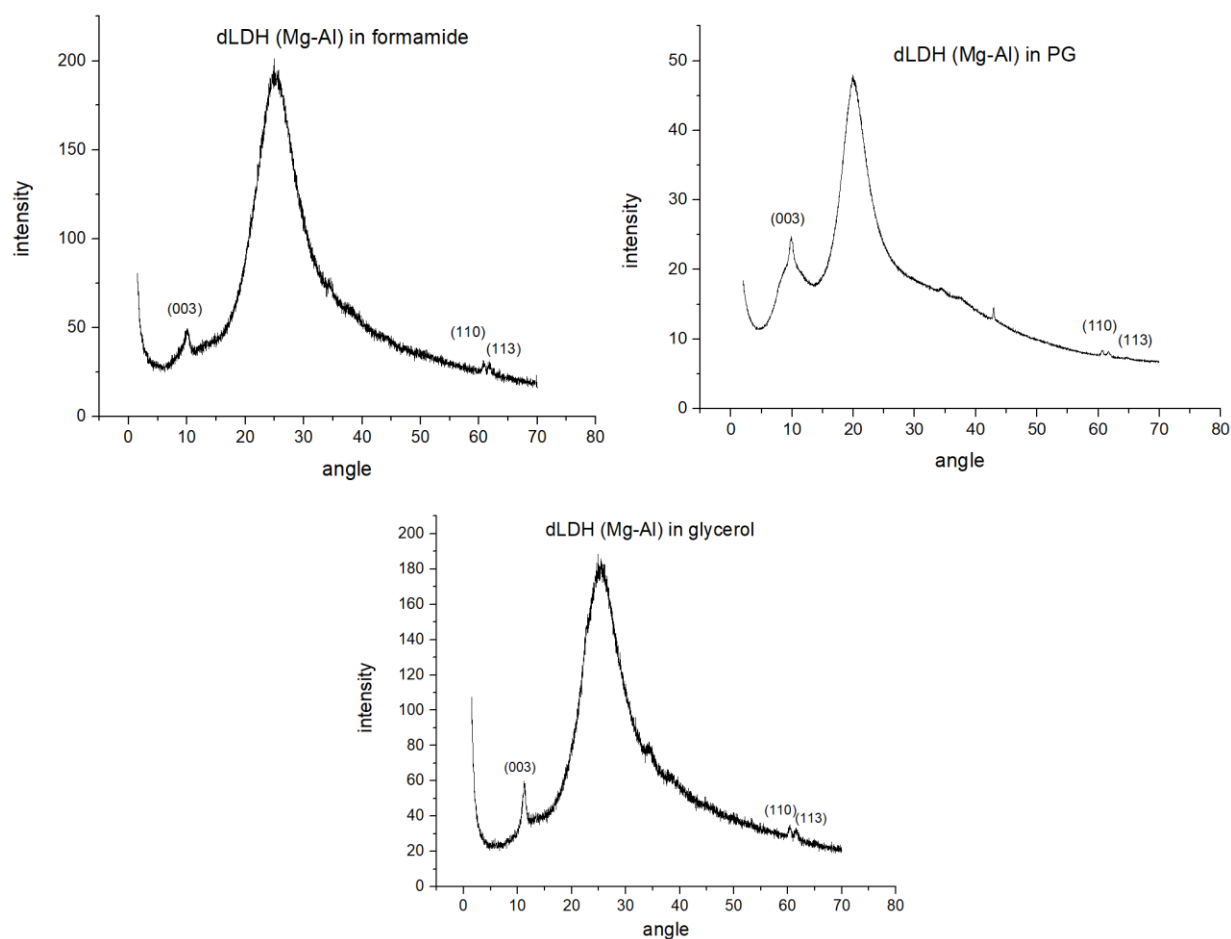
Για να είναι εφικτή η αποφυλλοποίηση πρέπει οι δυνάμεις μεταξύ των διαδοχικών φύλλων να είναι πιο ασθενείς από τις δυνάμεις μεταξύ φύλλου και διαλύτη. Στην αποφυλλοποίηση σε νερό, αυτό επιτυγχάνεται εισάγοντας πρώτα ένα ανιόν που μπορεί να «φουσκώσει» απομακρύνοντας τα στρώματα του LDH, όπως το οξικό, λόγω της βραχείας αλυσίδας καρβοξυλικών που διαθέτει. Στη συνέχεια τα απομακρυσμένα φύλλα διαχωρίζονται με φυσικό τρόπο (έντονη ανάδευση). Καθώς οι δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ φύλλου και νερού δεν είναι ισχυρές όμως, η αποφυλλοποίηση σε νερό έχει μικρή σταθερότητα σε σύγκριση με άλλες μεθόδους.

Εξαιρετική σταθερότητα αποφυλλοποίησης επιτυγχάνει το φορμαμίδιο, το οποίο παραμένει ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης για αποφυλλοποίηση LDH¹¹⁵. Ο διαλύτης αυτός μπορεί εύκολα να εισαχθεί στο εσωτερικό των στρωμάτων και να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τις ομάδες υδροξυλίων, διώχνοντας το νερό και διογκώνοντας τη διαστρωματική κοιλότητα. Αφότου τα στρώματα χωριστούν με φυσικό

τρόπο, τα καρβονύλια του φορμαμιδίου αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα φύλλα του LDH, ενώ τα αμίδια δεσμεύονται ασθενώς από τα νιτρικά ανιόντα¹¹⁷. Έτσι το αιώρημα παραμένει σταθερό για μέχρι και 6 μήνες.

Για την ικανότητά τους να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου και να διογκώνουν το χώρο ανάμεσα στα στρώματα επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν η προπυλενογλυκόλη και η γλυκερίνη σαν νέα, μη τοξικά, μέσα αποφυλλοποίησης.

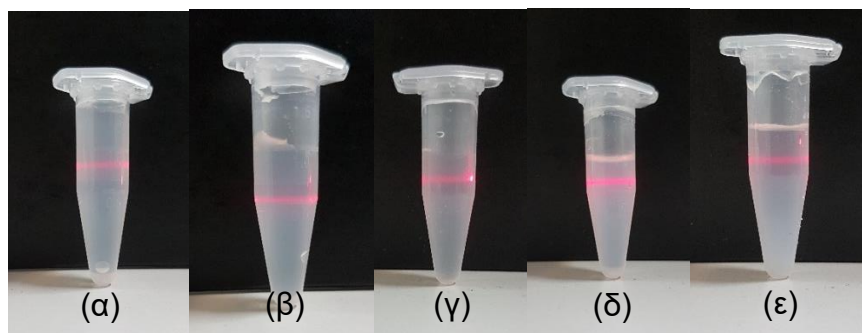
Τα διαγράμματα στην εικόνα 3.13, εμφανίζουν το πρότυπο «φουσκωμένων» ή αποφυλλοποιημένων LDH¹¹⁸. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζεται μία ευρεία κορυφή στις 20 με 30°, η οποία αποδίδεται στη διασκόρπιση που προκαλεί ο διαλύτης. Ταυτόχρονα οι μικρής έντασης κορυφές στις 61 με 62° αποδίδονται στη δυσδιάστατη διάθλαση του LDH. Παρατηρείται πως υπάρχει η κορυφή (003) στο διάλυμα, που δηλώνει την ύπαρξη μίας μικρής ποσότητας στοιβαγμένων LDH. Αυτό συμβαίνει διότι στα πειράματα



Εικόνα 3.13. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X αποφυλλοποιημένου LDH (Mg-Al) διαλυμένου σε φορμαμίδιο, προπυλενογλυκόλη και γλυκερίνη.

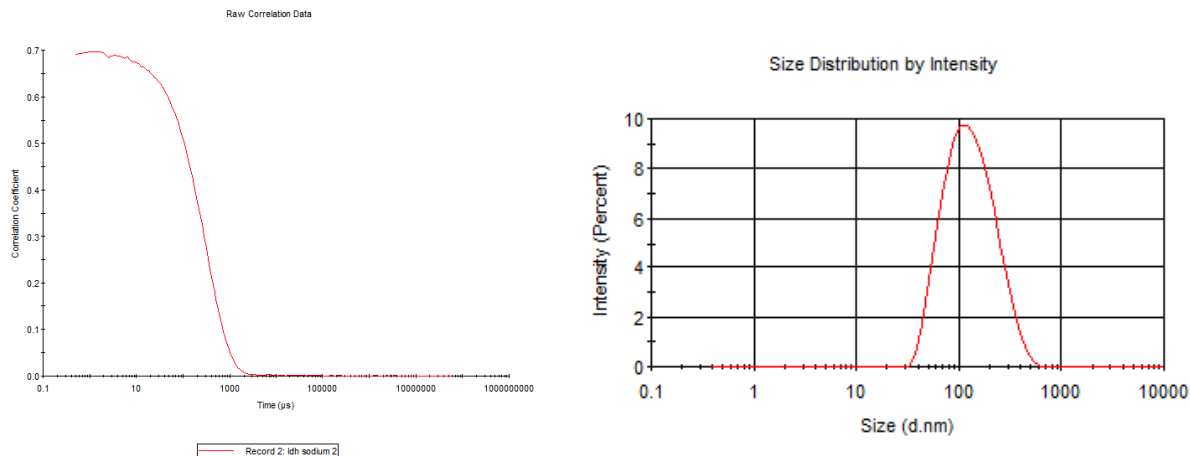
χρησιμοποιήθηκε LDH 2:1 που είναι πολύ πιο δύσκολο να αποφυλλοποιηθεί πλήρως, ενώ υπήρχε μικρή ποσότητα ανθρακικών ανιόντων, που κάνουν την πλήρη αποφυλλοποίηση αδύνατη. Η ένταση της κορυφής όμως δηλώνει πως μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό δεν έχει αποφυλλοποιηθεί. Παρατηρούμε λοιπόν πως η προπυλενογλυκόλη και η γλυκερίνη αναδεικνύουν παρόμοια συμπεριφορά με το φορμαμίδιο και δείχνουν σε πρώτο στάδιο υποσχόμενες εφαρμογές σαν μέσα αποφυλλοποίησης LDH.

Ο δεύτερος έλεγχος για αποφυλλοποίηση γίνεται, εξετάζοντας αν τα αιωρήματα είναι σταθερά και εμφανίζουν φαινόμενο Tyndal. Η εμφάνιση φαινομένου Tyndal, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.14, είναι μόνο μία ένδειξη πως τα παραπάνω διαλύματα είναι αιωρήματα. Η σταθερότητα των αιωρημάτων αποδεικνύεται με τη μελέτη δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).



Εικόνα 3.14. Σκέδαση Tyndall σε διαλύματα αποφυλλοποιημένων α) dLDH-οξικού β) dLDH-γαλακτικού γ) dLDH σε φορμαμίδιο δ) dLDH σε προπυλενογλυκόλη ε) dLDH σε γλυκερίνη.

Τα διαγράμματα, που εμφανίζονται στην εικόνα 3.15, ήταν πανομοιότυπα για όλα τα αποφυλλοποιημένα LDH. Η καμπύλη του συντελεστή συσχέτισης στο φάσμα δυναμικής σκέδασης φωτός δείχνει πως τα αιωρήματα ήταν πολύ σταθερά. Ταυτόχρονα στο διάγραμμα κατανομής μεγέθους φαίνεται το μέσο μέγεθος των αποφυλλοποιημένων φύλλων το οποίο ήταν στα 105-110 nm, το σύνηθες μέγεθος των μεμονωμένων κρυστάλλων LDH.



Εικόνα 3.15. Φάσμα δυναμικής σκέδασης φωτός και διάγραμμα κατανομής μεγέθους αποφυλλοποιημένου LDH-οξικού σε νερό.

Στη συνέχεια η σταθερότητα του αποφυλλοποιημένου LDH εξετάστηκε σε βάθος 12 μηνών. Τη μικρότερη σταθερότητα έδειξαν να έχουν τα LDH αποφυλλοποιημένα σε νερό, που σταμάτησαν να αναδεικνύουν το φαινόμενο Tyndal μόλις μετά από ένα μήνα. Τα dLDH στους οργανικούς διαλύτες έδειξαν να είναι πιο σταθερά παραμένοντας αποφυλλοποιημένα, σε ένα βαθμό, για όλο το πέρασμα του χρόνου. Μετά το πέρασμα των πρώτων μηνών η συμπεριφορά των διαλυμάτων άρχισε να αλλάζει. Τα διαλύματα dLDH αποφυλλοποιημένου σε φορμαμίδιο (εικόνα 3.16) άρχισαν να γίνονται γέλη, μετά το πέρασμα 4 μηνών. Η διαδικασία ήταν σταδιακή, με ποσοστό των διαλυμάτων να γίνεται γέλη, ενώ το υπόλοιπο διατηρούσε το ίδιο ιξώδες. Η γελοποίηση ολοκληρώθηκε μετά από 6 μήνες, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.16. Σημειώνεται ότι τα πιο αραιά διαλύματα δεν υπέστησαν καθόλου γελοποίηση, ενώ στα διαλύματα συγκέντρωσης 5, 10 και 20 g/L, μόνο ένα ποσοστό τους έγινε γέλη. Το διάλυμα που είχε παραμείνει στα δείγματα δεν εμφάνιζε φαινόμενο Tyndal, σε αντίθεση με τη γέλη. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συμφωνούν με τη βιβλιογραφία¹¹⁹.



Εικόνα 3.16. Αποφυλλοποιημένο LDH σε φορμαμίδιο σε συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 10, 20 και 40 g/L, μετά το πέρασμα 12 μηνών.

Στην αποφυλλοποίηση με χρήση προπυλενογλυκόλης (εικόνα 3.17), με το πέρασμα του χρόνου η πλειονότητα του LDH συγκεντρώθηκε στα κατώτερα στρώματα, χωρίς όμως να σχηματιστεί γέλη. Το διάλυμα συνέχισε να εμφανίζει φαινόμενο Tyndal σε κάθε συγκέντρωση και σε όλο το μήκος του.



Εικόνα 3.17. Αποφυλλοποιημένο LDH σε προπυλενογλυκόλη σε συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 10, 20 και 40 g/L, μετά το πέρασμα 12 μηνών.

Το LDH που είχε αποφυλλοποιηθεί σε γλυκερίνη (εικόνα 3.18), ξεκίνησε να σχηματίζει γέλη μετά από 6 μήνες. Η γέλη σχηματίστηκε πρώτα στα πιο πυκνά διαλύματα και μετά το πέρασμα 8 μηνών (από την αρχή) είχε ολοκληρωθεί σε όλα. Σε αντίθεση με την αποφυλλοποίηση σε φορμαμίδιο, όλα τα διαλύματα σχημάτισαν γέλη και σε όλο τους τον όγκο. Το φαινόμενο Tyndal ήταν ξεκάθαρο σε κάθε δείγμα.



Εικόνα 3.18. Αποφυλλοποιημένο LDH σε γλυκερίνη σε συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 10, 20 και 40 g/L, μετά το πέρασμα 12 μηνών.

Το σύνολο των πειραμάτων σταθερότητας ανέδειξαν, όπως ήταν αναμενόμενο, πως η αποφυλλοποίηση σε νερό είναι εξαιρετικά ασταθής σε σύγκριση με την αποφυλλοποίηση σε οργανικούς διαλύτες. Ταυτόχρονα η αποφυλλοποίηση σε φορμαμίδιο είχε πανομοιότυπη συμπεριφορά με τη βιβλιογραφία, παρότι το υγρό XRD έδειξε πως ένα μικρό ποσοστό του LDH δεν είχε αποφυλλοποιηθεί. Οι δύο νέοι διαλύτες που μελετώνται σαν υποψήφιοι για αποφυλλοποίηση, έδειξαν μεγαλύτερη σταθερότητα από το φορμαμίδιο, συνεχίζοντας να εμφανίζουν φαινόμενο Tyndal μήνες αφότου είχε εξαφανιστεί από τα διαλύματα με φορμαμίδιο. Τα XRD που ελήφθησαν στα dLDH γλυκερίνης και προπυλενογλυκόλης, μετά το πέρασμα του ενός έτους, ήταν πανομοιότυπα με τα αρχικά, δείχνοντας πως η αποφυλλοποίηση παρέμεινε σταθερή.

LDH (Mg-Al) με παγιδευμένα αμινοξέα:

Παρότι τα αμινοξέα είναι ουσίες μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος με αρκετές αρνητικά φορτισμένες ομάδες – υπό κατάλληλες συνθήκες – οι μελέτες παγίδευσής τους είναι εξαιρετικά περιορισμένες, και πολλές φορές τα αποτελέσματα που εμφανίζουν διαφωνούν. Η μεγαλύτερη σειρά πειραμάτων στα πλαίσια της διδακτορικής έρευνας αφορούσε την παγίδευση αμινοξέων σε μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μήτρα LDH για τη διαλεύκανση αυτών των διαφορών.

Ταυτόχρονα είναι ευρέως μελετημένο στη βιβλιογραφία^{57, 120, 121} πως η μέθοδος με τη μεγαλύτερη επιτυχία για την παγίδευση αμινοξέων είναι η συγκαταβύθιση. Αυτό ισχύει

διότι, καθώς τα στρώματα σχηματίζονται στο διάλυμα, τα αμινοξέα έχουν την ευκαιρία να αλληλεπιδράσουν μαζί τους και να παγιδευτούν, όταν τα επόμενα στρώματα δημιουργηθούν τριγύρω τους. Αντίθετα, στην ανιονανταλλαγή τα αμινοξέα πρέπει όχι μόνο να εισχωρήσουν και να πλατύνουν τα διαστρωματικά τμήματα, αλλά και να πάρουν τη θέση άλλων ιόντων. Καθώς η συγκαταβύθιση είναι όμως μια πιο ακριβή διαδικασία που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευέλικτα όπως η ανιονανταλλαγή, αποφασίστηκε να μελετηθεί η αποφυλλοποίηση και επαναστοίβαξη με τους νέους διαλύτες σαν μια εναλλακτική μέθοδος που θα επιτρέψει την πιο εύκολη προσέλκυση των αμινοξέων σε κάθε στρώμα, χωρίς όμως να χρειάζεται η σύνθεση νέας μήτρας κάθε φορά. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Επισκόπηση των πειραμάτων παγίδευσης ουσιών σε LDH και dLDH.

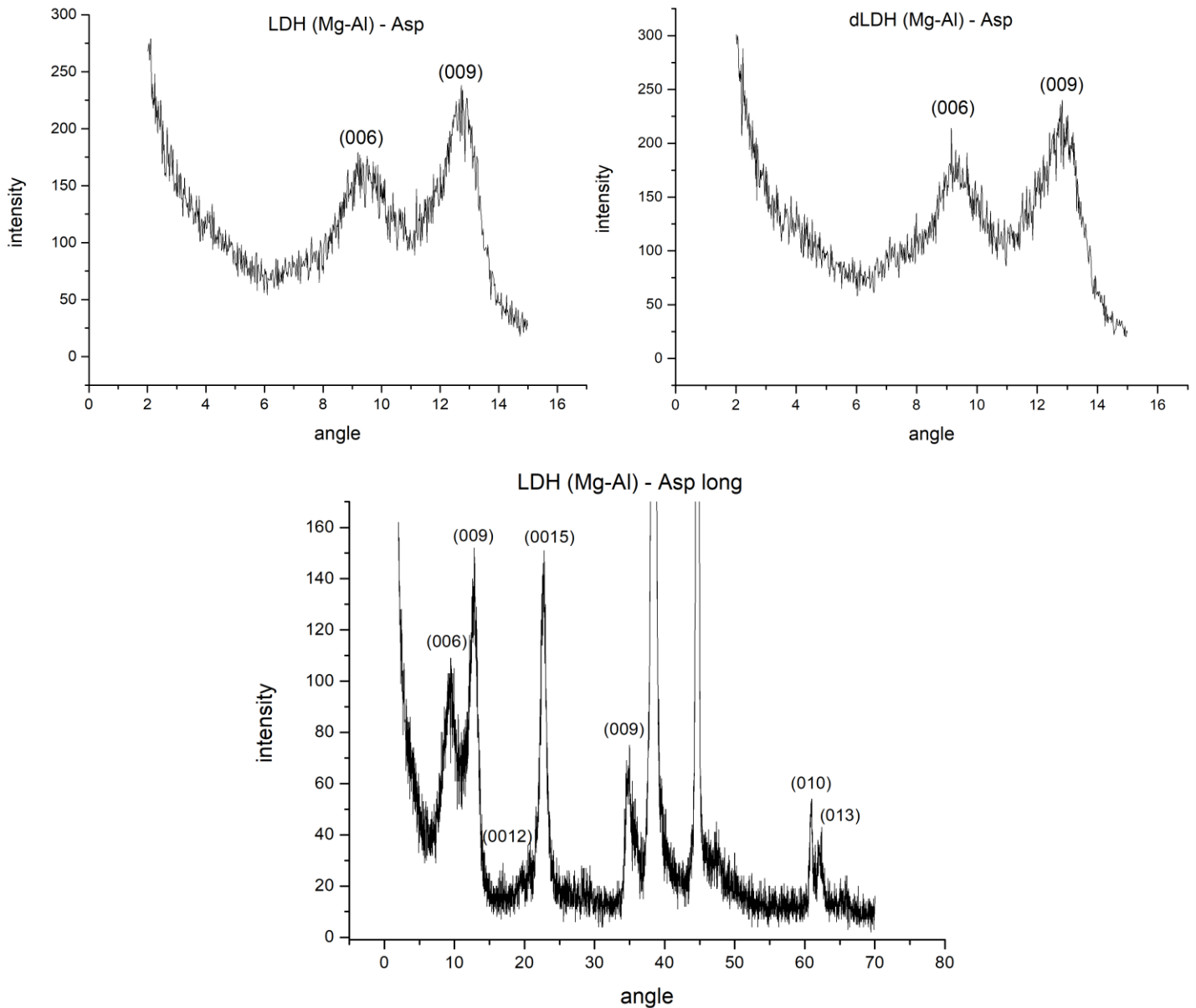
LDH νανοβιοϋβρίδιο	Διαστρωματική απόσταση d (Å) LDH	Διαστρωματική απόσταση d (Å) dLDH
LDH (Mg-Al)-Arg	7,61	7.63
LDH (Mg-Al)-Lys	7,65	7.61
LDH (Mg-Al)-His	7,62	7.60
LDH (Mg-Al)-Asp	9,61	9,65
LDH (Mg-Al)-Glu	7,62	12,63
LDH (Mg-Al)-Gln	7,61	11.31
LDH (Mg-Al)-Val	7,69	7.67
LDH (Mg-Al)-Leu	7,64	14.59
LDH (Mg-Al)-Ile	7,68	13,99
LDH (Mg-Al)-Cys	7,42	9.40
LDH (Mg-Al)-Met	7,66	7.62
LDH (Mg-Al)-Ser	7,66	7.66
LDH (Mg-Al)-Thr	7,60	7.69
LDH (Mg-Al)-Tyr	6.55	16.88
LDH (Mg-Al)-Phe	15,56	7.61
LDH (Mg-Al)-Trp	18,89	18,90

Στη συνέχεια θα εστιάσουμε στην ανάλυση των πιο σημαντικών πειραμάτων, η μελέτη των οποίων οδήγησε σε νέες πληροφορίες για τα νανοβιοϋβρίδια και τις διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων. Οι αναλύσεις των συνθέσεων που εμφανίζουν παρόμοια αποτελέσματα ή δεν προσφέρουν κάποια καινούργια πληροφορία διατίθενται στο Παράρτημα.

Σημειώνεται πως ανεξάρτητα του διαλύτη αποφυλλοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα, όλα τα dLDH είχαν παρόμοιες διαστρωματικές αποστάσεις, διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ και φάσματα IR μετά την εισαγωγή ανιόντων. Για το λόγο αυτό οι αναλύσεις που ακολουθούν γίνονται συγκρίνοντας τις συνθέσεις με ανιονανταλλαγή και τις συνθέσεις με επαναστοιβάξη σε προτυλενογλυκόλη.

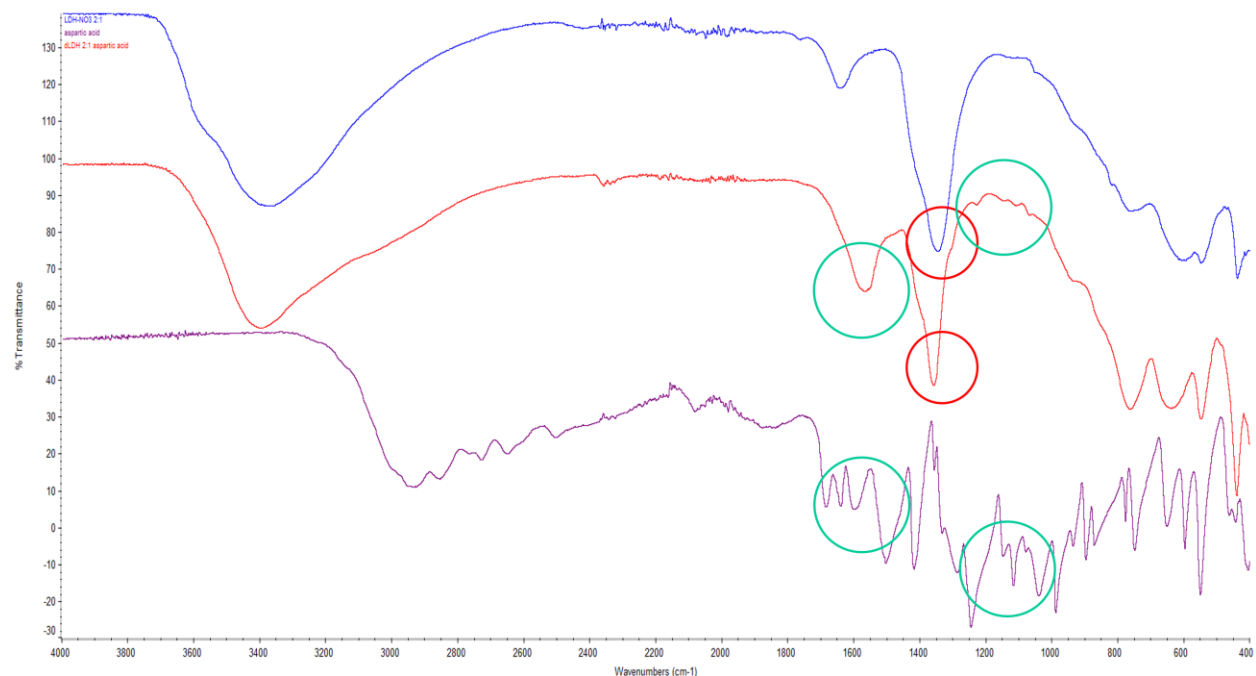
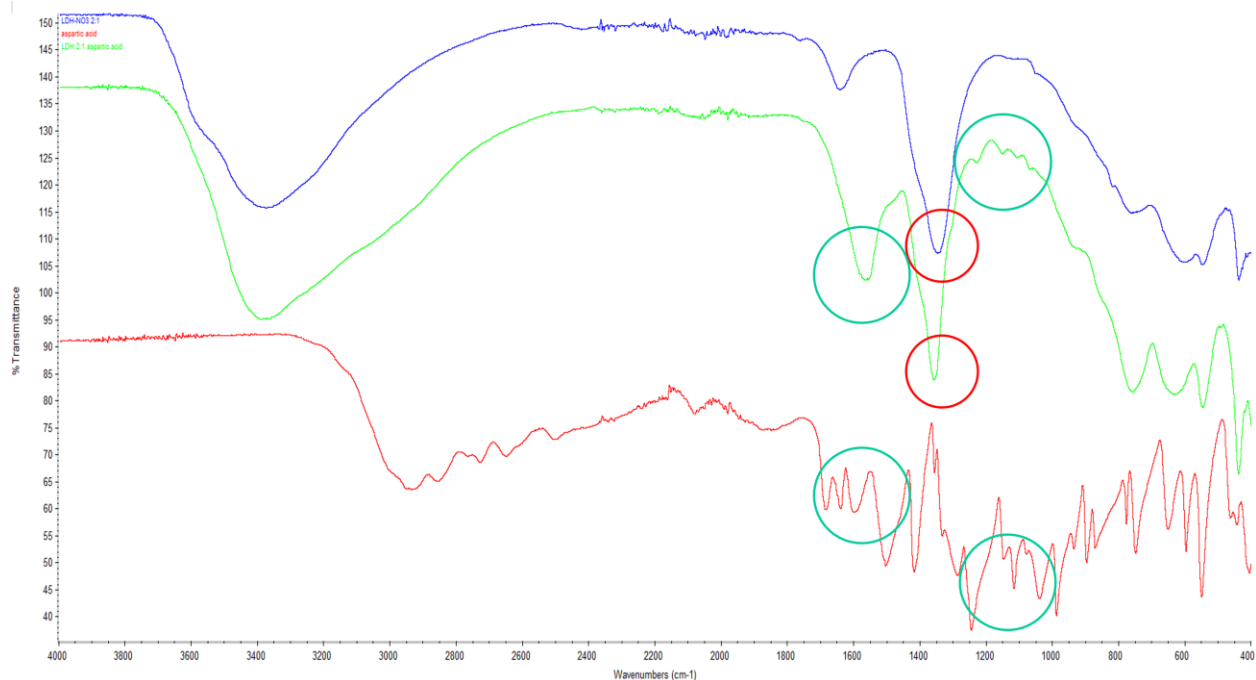
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Asp:

Στο διάγραμμα του LDH (Mg-Al)-Asp (εικόνα 3.19) φαίνεται πως υπήρξε διαπλάτυνση της απόστασης μεταξύ των στρωμάτων. Συγκεκριμένα μέχρι τις 15° εμφανίζονται δύο αποστάσεις στο δείγμα, μία στις $9,19^\circ$ και μία στις $12,73^\circ$. Η πρώτη δίνει απόσταση που δεν συμφωνεί με τη βιβλιογραφία για το ασπαρτικό ($9,61 \text{ \AA}$), ενώ η δεύτερη ($6,94 \text{ \AA}$) είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή των ανθρακικών ανιόντων και δε θα μπορούσε να είναι κορυφή πρώτης τάξης για κάποια παγιδευμένη ουσία. Η διαλεύκανση των αποτελεσμάτων γίνεται λαμβάνοντας διάγραμμα περίθλασης έως τις 70° . Βρίσκοντας τους δείκτες Miller για όλες τις κορυφές, φαίνεται πως αντιστοιχούν σε διαστρωματική απόσταση 19 \AA περίπου διπλάσια από αυτή που εμφανίζεται στη βιβλιογραφία^{122, 123}, δείχνοντας πως η ουσία παγιδεύεται σε διπλοστοιβάδα ανάμεσα στα στρώματα. Στο διάγραμμα δεν εμφανίζεται όμως πρώτης τάξης κορυφή για την ουσία. Αυτό θα μπορούσε να συμβεί μόνο εάν το υβρίδιο για κάποιο λόγο υπέστη αργή αντικατάσταση του παγιδευμένου ανιόντος, το οποίο έχει εξαφανιστεί από τα επιφανειακά του στρώματα. Κάτι τέτοιο εμφανίζεται συστηματικά σε πολλά πειράματα με αμινοξέα στα πλαίσια αυτής της έρευνας, όπως θα δούμε και στη συνέχεια. Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζει και το διάγραμμα του dLDH (Mg-Al)-Asp.



Εικόνα 3.19. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Asp και dLDH (Mg-Al)-Asp.

Στην εικόνα 3.20 η ευρεία κορυφή στους 3413 cm^{-1} που δηλώνει την ύπαρξη υδροξυλίου συνδεδεμένου με μέταλλο, όπως και οι κορυφές που αντιστοιχούν στους δεσμούς μετάλλων στους $400\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ δείχνουν την παρουσία φύλλων LDH και παραμένουν ίδιες και στους δύο τύπους LDH. Ταυτόχρονα στα φάσματα των υβριδίων εμφανίζεται έντονη κορυφή στους 1590 cm^{-1} η οποία οφείλεται στην ασύμμετρη δόνηση



Εικόνα 3.20. Φάσματα υπερέθρου των LDH (Mg-Al)-Asp και dLDH (Mg-Al)-Asp.

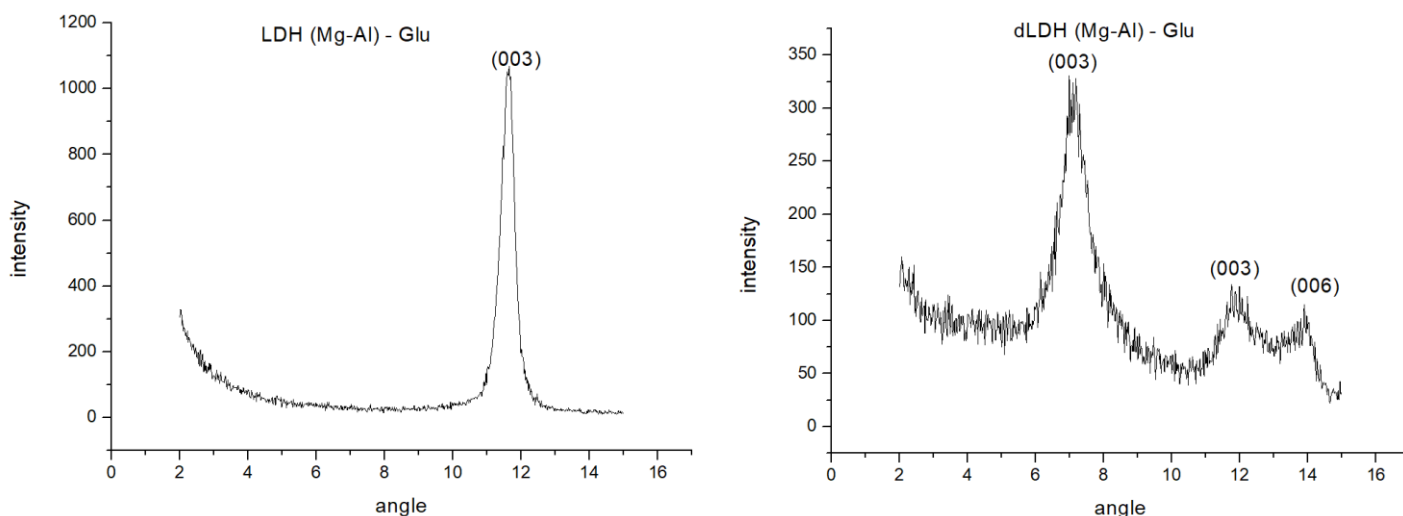
τάσης του -COO^- . Σημειώνεται πως η συμμετρική δόνηση του -COO^- που εμφανίζεται συνήθως κοντά στους 1400 cm^{-1} λείπει. Το πιο πιθανό είναι πως επικαλύπτεται από την κορυφή των ανθρακικών ανιόντων (1355 cm^{-1}) που όπως φάνηκε και από την ένταση της κορυφής (009) στις $35,52^\circ$ στο XRD είχαν εισχωρήσει σε μεγάλη ποσότητα ανάμεσα στα

στρώματα. Στην περιοχή ανάμεσα στους $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται οι κορυφές των δονήσεων σκελετού (C-C, C-N) των αμινοξέων, που στα φάσματα των υβριδίων είναι χαμηλής έντασης, όπως είναι συχνό για τα παγιδευμένα σε μήτρα LDH αμινοξέα¹²⁴.

Παρότι στο φάσμα IR εμφανίζεται έντονη παρουσία ανθρακικών ανιόντων στο δείγμα, το ασπαρτικό οξύ έχει εισαχθεί επιτυχώς ανάμεσα στα φύλλα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για το LDH και το dLDH βλέπουμε πως δεν υπήρχαν διαφορές και η χρήση μεθόδου επαναστοίβαξης δεν επηρέασε αρνητικά την εισαγωγή της ουσίας ή τον χαρακτηρισμό του υβριδίου.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Glu:

Το διάγραμμα XRD του LDH (Mg-Al)-Glu (εικόνα 3.21) είναι ενδεικτικό της πλειοψηφίας των διαγραμμάτων που έδειξαν μοναδική απόσταση μεταξύ $7,4$ και $7,7\text{ \AA}$. Η διαστρωματική απόσταση που υπολογίζεται από την κορυφή του διαγράμματος, σύμφωνα με το νόμο του Bragg, δείχνει την παγίδευση ανθρακικών ιόντων ($\sim 7,62\text{ \AA}$). Η απόσταση όμως δε διαφέρει από αναφορές της βιβλιογραφίας, όπου ακόμα και με πετυχημένη συγκαταβύθιση δίνουν τέτοιες αποστάσεις¹²⁵.



Εικόνα 3.21. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X των LDH (Mg-Al)-Glu και dLDH (Mg-Al)-Glu.

Η έλλειψη διαπλάτυνσης μεταξύ διαδοχικών στρωμάτων δεν είναι αρκετή για να καθορίσει αν η παρασκευή του υβριδίου έχει πετύχει ή όχι. Το αμινοξύ μπορεί να έχει προσκολλήσει επιφανειακά ή σε κάποιες περιπτώσεις να συναρμόζεται κατά μήκος των στρωμάτων και η απόστασή του να μη διαφέρει ιδιαίτερα από αυτή των ανθρακικών ανιόντων. Η μελέτη αυτών των πιθανοτήτων γίνεται με φάσματα IR.

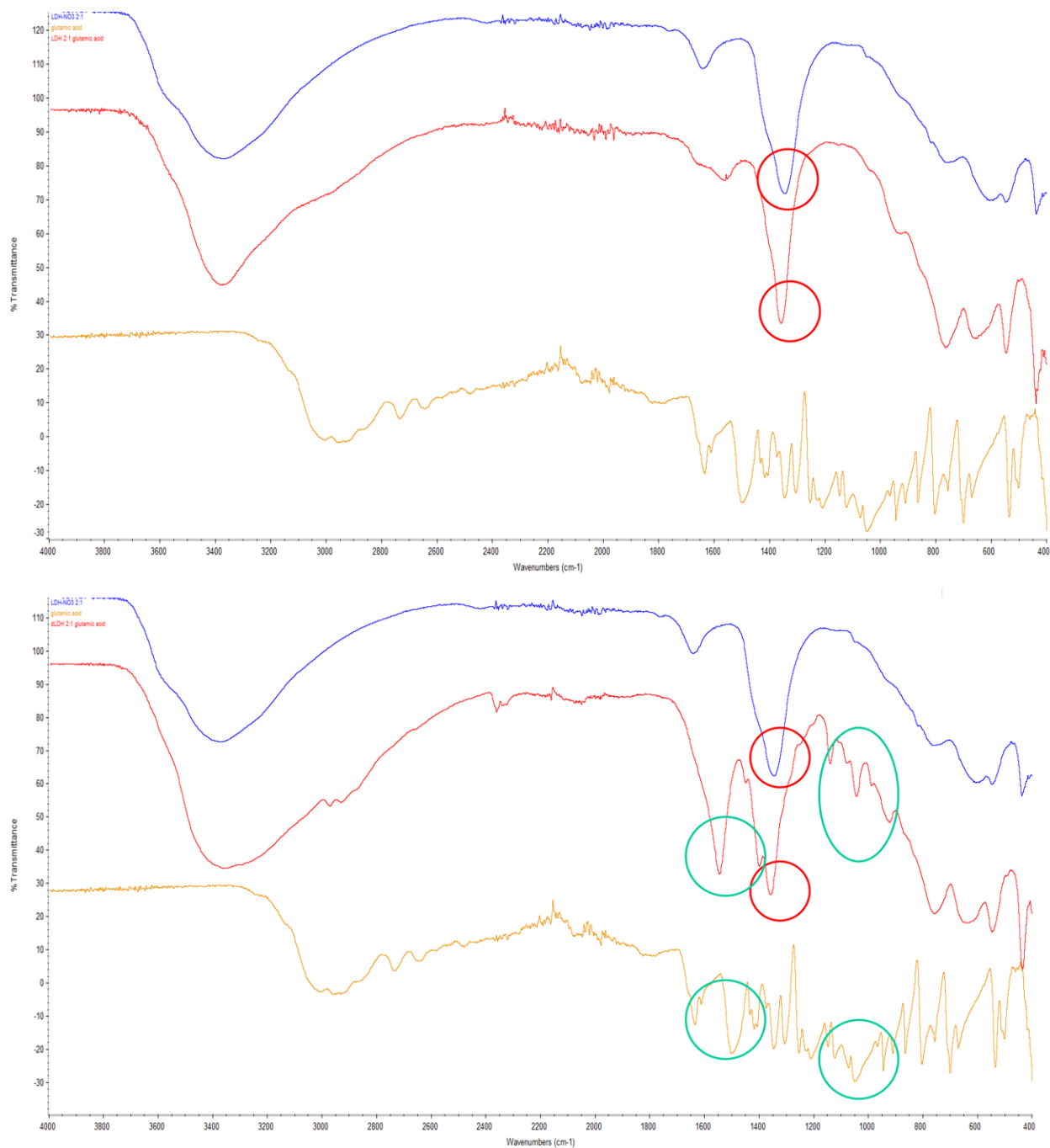
Από την άλλη η κύρια κορυφή που εμφανίζεται σε στο διάγραμμα του dLDH (Mg-Al)-Glu αντιστοιχεί σε διαστρωματική απόσταση 12,63 Å, που επίσης συμφωνεί με τη βιβλιογραφία¹²⁶, ενώ εμφανίζεται και κορυφή για την (006) διάσταση. Ταυτόχρονα η κορυφή των ανθρακικών ανιόντων είναι πολύ μικρότερης έντασης, δείχνοντας πως η ποσότητα που έχει παγιδευτεί ανάμεσα στα στρώματα είναι ανάλογα μικρή.

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα μεταξύ τους φαίνεται πως στην απλή ανιονανταλλαγή δεν είχε παρατηρηθεί καθόλου διαπλάτυνση των στρωμάτων, ενώ η αποφυλλοποίηση βοήθησε την εισαγωγή του γλουταμινικού οξέος, το οποίο παγιδεύτηκε κατά την επαναστοίβαξη στη φυγοκέντριση.

Στο φάσμα υπερύθρου του LDH (Mg-Al)-Glu (εικόνα 3.22) κυριαρχούν μονάχα οι κορυφές στους 3415 cm^{-1} και 1355 cm^{-1} που δηλώνουν την ύπαρξη υδροξυλίων και ανθρακικών ανιόντων στο δείγμα. Ο ώμος στους 1557 cm^{-1} είναι ένδειξη ασύμμετρης δόνησης τάσης του -COO^- που υπάρχει στο γλουταμικό ανιόν, αλλά η έντασή του είναι εξαιρετικά χαμηλή δείχνοντας πως η ποσότητά του στο δείγμα είναι ελάχιστη. Η έλλειψη έντονων κορυφών που ανήκουν στο γλουταμικό οξύ, ενισχύει τις ενδείξεις του διαγράμματος XRD πως η επιθυμητή ουσία δεν έχει εισαχθεί ανάμεσα στα φύλλα, αν και η εμφάνιση μιας χαμηλής έντασης κορυφής δηλώνει πως το αμινοξύ πιθανότατα υπάρχει στην επιφάνεια του LDH σε ελάχιστη ποσότητα, λόγω περιορισμένου αριθμού εκπλύσεων. Σημειώνεται πως η μέθοδος καθαρισμού του LDH είναι σύμφωνη με την πλειοψηφία της βιβλιογραφίας, η οποία εμφανίζει παρόμοια αποτελέσματα IR για διαγράμματα XRD γλουταμίνης με κορυφή στις 11,61°¹²⁵.

Από την άλλη στο φάσμα υπερύθρου του dLDH (Mg-Al)-Glu εμφανίζονται πολλές νέες κορυφές που δεν υπήρχαν στο φάσμα του LDH με νιτρικά ανιόντα που χρησιμοποιήθηκε στην αρχή. Πιο συγκεκριμένα εμφανίζονται καθαρά η ασύμμετρη και η συμμετρική δόνηση τάσης του -COO^- στους 1544 cm^{-1} και 1395 cm^{-1} αντίστοιχα.

Επιπλέον εμφανίζονται πολλές από τις δονήσεις σκελετού του αμινοξέος στο διάστημα των 900 με 1150 cm^{-1} . Συνδυάζοντας αυτές τις ενδείξεις με την διαπλάτυνση των στρωμάτων που φαίνεται στο XRD, μπορούμε να πούμε με ασφάλεια πως το γλουταμικό ανιόν έχει εισαχθεί με επιτυχία στη διαστρωματική περιοχή του LDH.

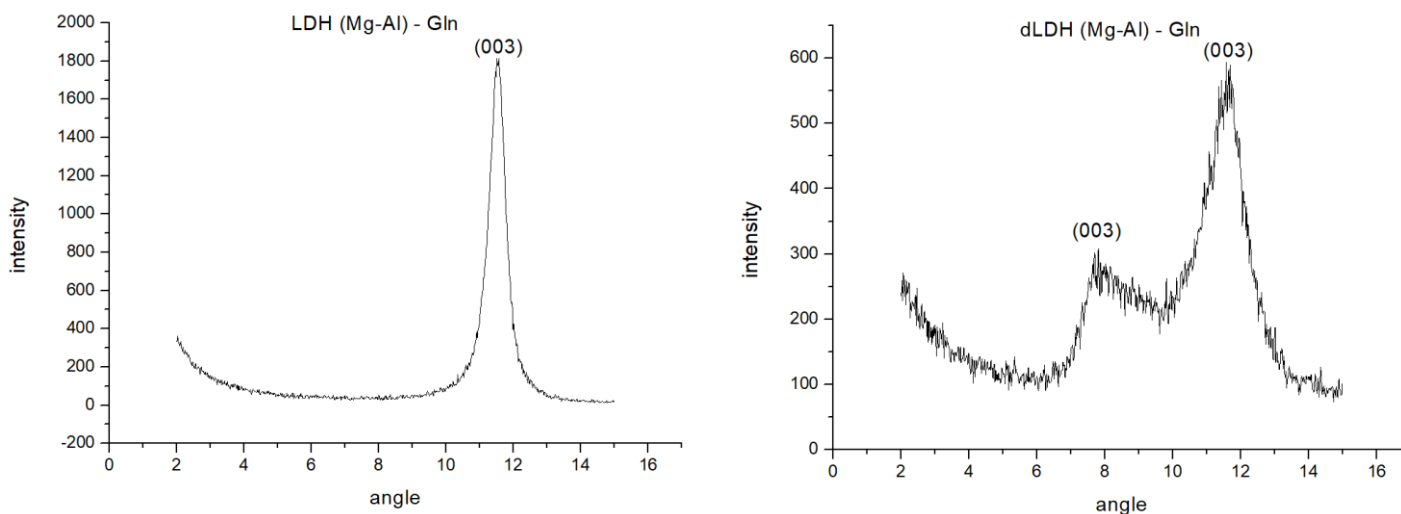


Εικόνα 3.22. Φάσματα υπερώθρου των LDH (Mg-Al)-Glu και dLDH (Mg-Al)-Glu.

Στην προκειμένη περίπτωση λοιπόν, ένα αμινοξύ που λόγο ελαφρώς αυξημένου μεγέθους δυσκολευόταν να εισχωρήσει ανάμεσα στα φύλλα του LDH βοηθήθηκε πολύ από την μέθοδο επαναστοίβαξης. Τα μοναδιαία φύλλα ήταν εξαιρετικά εύκολο να πλησιαστούν από τα μόρια, τα οποία κατά την επαναστοίβαξη εγκλωβίστηκαν ανάμεσά τους.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Gln:

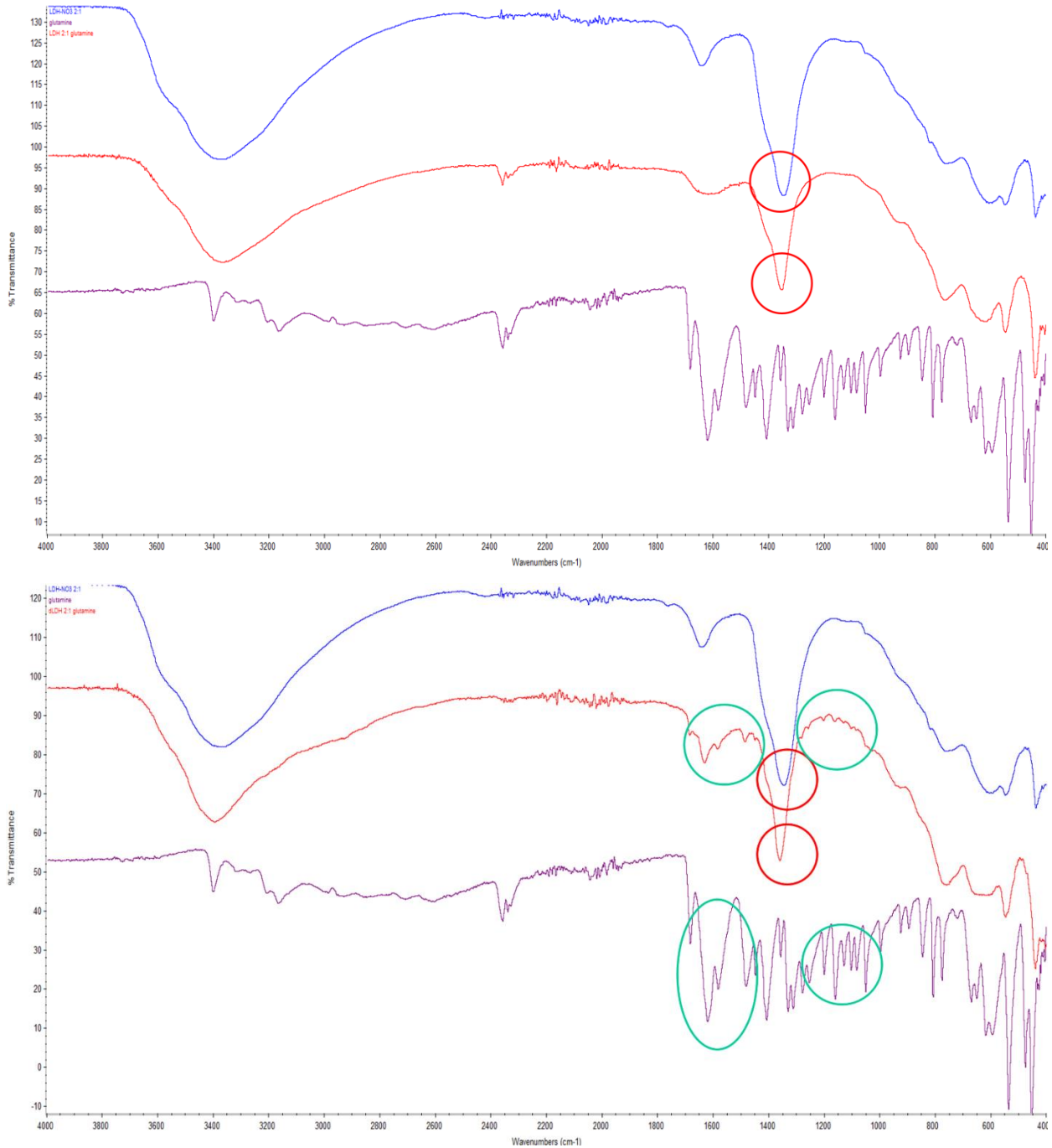
Στην εικόνα 3.23 η κορυφή που εμφανίζεται σε γωνία 2 θήτα $11,61^\circ$ αντιστοιχεί σε απόσταση $7,61 \text{ \AA}$ και συνήθως δηλώνει την ύπαρξη ανθρακικών ανιόντων ανάμεσα στα στρώματα. Η εξακρίβωση της παγιδευμένης ουσίας έγινε με φασματοσκοπία IR, καθώς βιβλιογραφικά και η πετυχημένη σύνθεση LDH (Mg-Al)-Gln δίνει ίδια απόσταση.



Εικόνα 3.23. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X των LDH (Mg-Al)-Gln και dLDH (Mg-Al)-Gln.

Παρόμοια με το προηγούμενο διάγραμμα, έτσι και εδώ φαίνεται πως η αποφυλλοποίηση και επαναστοίβαξη βοήθησε στην εισαγωγή της επιθυμητής ουσίας. Ενώ στο διάγραμμα του LDH (Mg-Al)-Gln φαίνεται μόνο η παρουσία ανθρακικών ανιόντων, η κορυφή που εμφανίζεται στο διάγραμμα του dLDH (Mg-Al)-Gln αντιστοιχεί σε απόσταση $11,31 \text{ \AA}$, αν και για ακόμη μια φορά είναι έντονη και η παρουσία ανθρακικών

(7,62 Å). Αν και η απόσταση δε συμφωνεί με την περισσότερη βιβλιογραφία για τη γλουταμίνη, η διαπλάτυνση των στρωμάτων γίνεται μόνο όταν εισάγεται ένα νέο ανιόν, η ταυτότητα του οποίου εξακριβώνεται με τη μελέτη του φάσματος IR του υβριδίου.



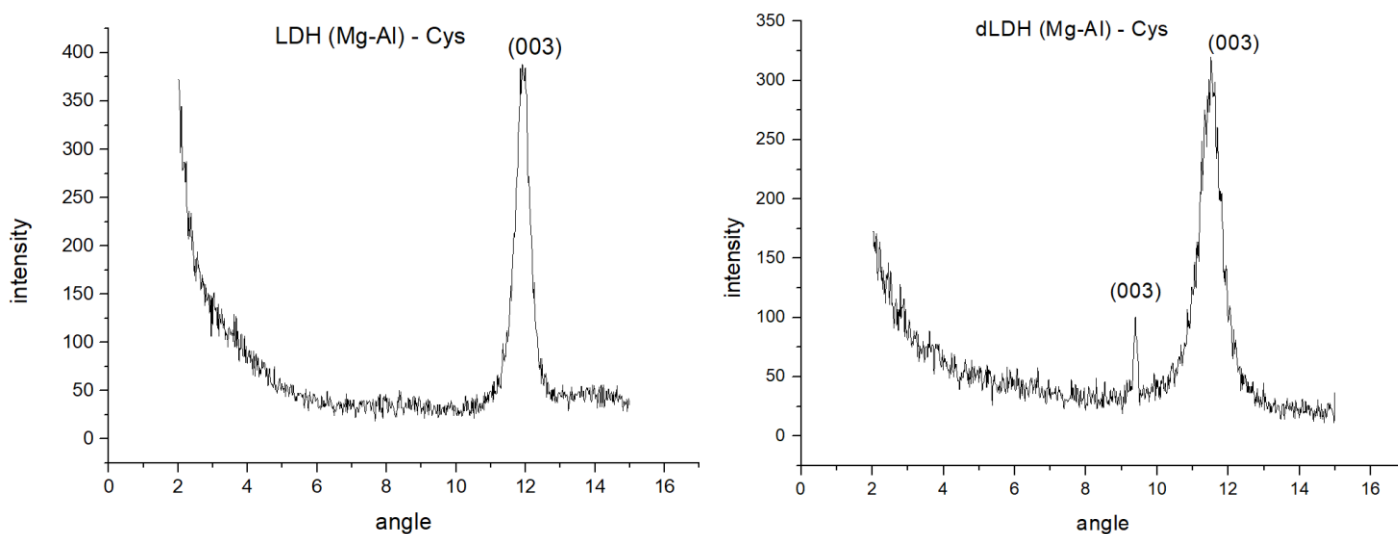
Εικόνα 3.24. Φάσματα υπερώθρου των LDH (Mg-Al)-Gln και dLDH (Mg-Al)-Gln.

Όπως και στην περίπτωση του γλουταμικού οξέως το φάσμα υπέρυθρου του LDH (Mg-Al)-Gln (εικόνα 3.24) εμφανίζει μονάχα κορυφές που αντιστοιχούν σε LDH με ανθρακικά ανιόντα, δείχνοντας πως το υβρίδιο LDH-γλουταμίνης δεν παρήχθησε με επιτυχία.

Το φάσμα υπέρυθρου εμφανίζει κορυφές στους 1684 cm^{-1} και 1584 cm^{-1} όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης και κάμψης του N-H. Ταυτόχρονα στους 1450 cm^{-1} εμφανίζεται η δόνηση κάμψης του $-\text{CH}_3$. Αν και ιδιαίτερα χαμηλής έντασης, πολλές από τις δονήσεις σκελετού του αμινοξέως εμφανίζονται ανάμεσα στους 1000 cm^{-1} με 1300 cm^{-1} , όπως η δόνηση τάσης του C-O (1103 cm^{-1})¹²⁷. Η ύπαρξη των χαρακτηριστικών κορυφών γλουταμίνης σε συνδυασμό με την διαπλάτυνση των στρωμάτων, δείχνουν ότι με τη χρήση της επαναστοίβαξης το υβρίδιο παράχθηκε με επιτυχία.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Cys:

Οι συνθέσεις με κυστεΐνη παρουσιάζουν ένα παρόμοιο προφίλ με τις προηγούμενες. Στην σύνθεση με απλή ανιονανταλλαγή εμφανίζεται μονάχα κορυφή που αντιστοιχεί στην παρουσία ανθρακικών ανιόντων ($7,42\text{ \AA}$). Αν και ίδια κορυφή εμφανίζεται και στο διάγραμμα του dLDH (Mg-Al)-Cys (εικόνα 3.25), δηλώνοντας την μόλυνση από ανθρακικά ανιόντα, επιπλέον φαίνεται μία κορυφή που αντιστοιχεί σε διαστρωματική απόσταση ίση με $9,40\text{ \AA}$.

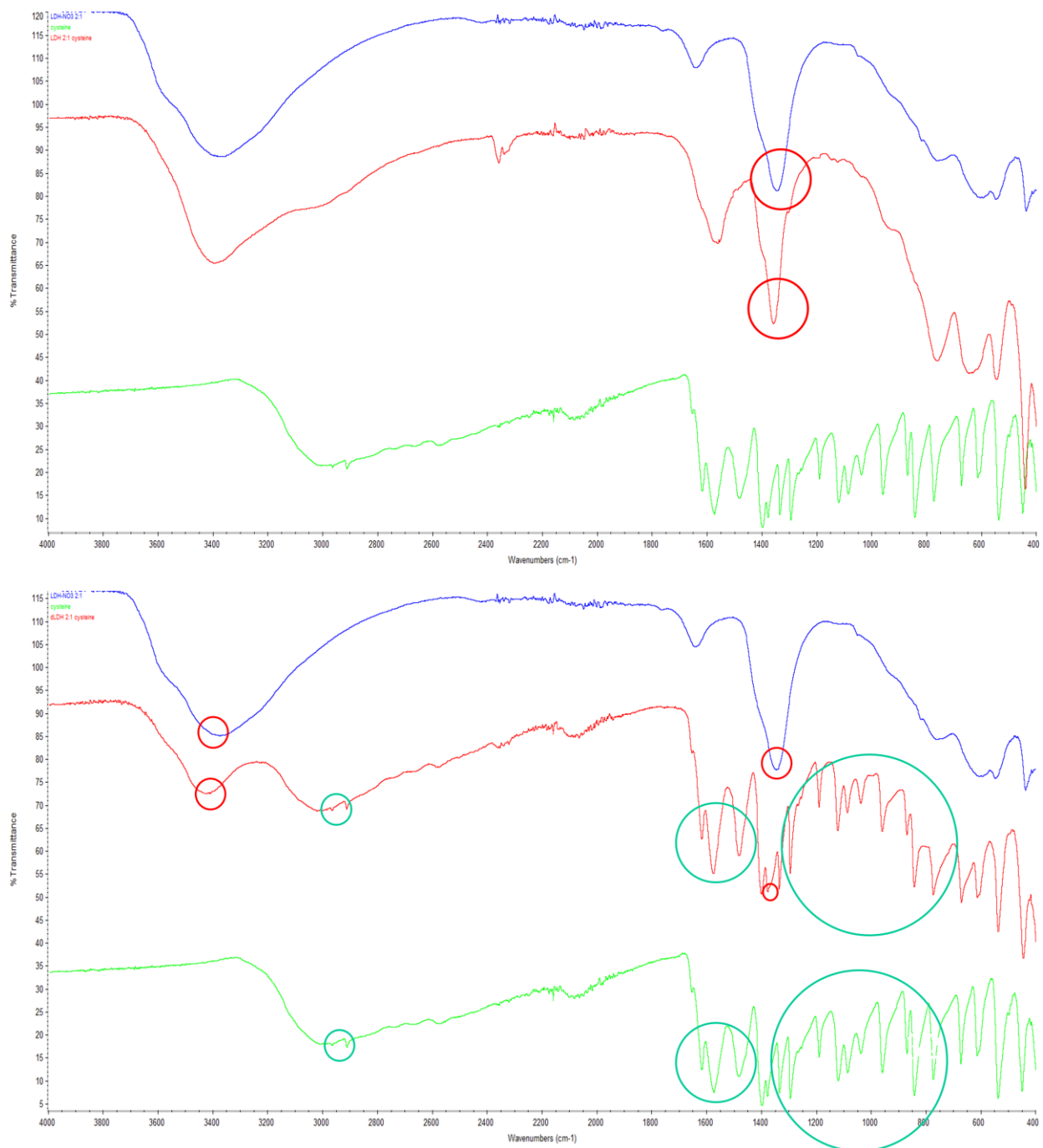


Εικόνα 3.25. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X των LDH (Mg-Al)-Cys και dLDH (Mg-Al)-Cys

Η απόσταση αυτή διαφέρει από την αναμενόμενη της βιβλιογραφίας (8 \AA)^{128, 129} και η ταυτοποίηση του παγιδευμένου ιόντος θα γίνει με φασματοσκοπία IR. Σημειώνεται πως, μία τέτοια απόκλιση δικαιολογείται από τη χρήση LDH (Mg-Al) με διαφορετική αναλογία μετάλλων από τη βιβλιογραφία, που θα επέτρεπε την παγίδευση του αμινοξέος υπό διαφορετική γωνία.

Στο φάσμα υπερύθρου του υβριδίου με ανιονανταλλαγή, όπως εμφανίζεται στην εικόνα 3.26, υπάρχει μόνο μία κορυφή που είναι διαφορετική από το φάσμα του αρχικού LDH με νιτρικά ανιόντα. Η κορυφή αυτή εμφανίζεται στους 1560 cm^{-1} και θα μπορούσε να δηλώνει την ύπαρξη ασύμμετρης δόνησης τάσης του $-\text{COO}^-$ που υπάρχει στην κυστεΐνη. Χωρίς άλλες όμως κορυφές να δηλώνουν την ύπαρξη το αμινοξέος στο δείγμα και χωρίς διαπλάτυνση των διαδοχικών φύλλων του LDH να εμφανίζεται στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X, η σύνθεση δεν μπορεί να θεωρηθεί επιτυχής.

Το φάσμα υπερύθρου του dLDH (Mg-Al)-Cys εμφανίζει τόσο πολλές κορυφές του αμινοξέος που υπερκαλύπτονται οι κορυφές του LDH. Τέτοια φάσματα εμφανίζονται στη βιβλιογραφία¹³⁰, συνήθως σε περιπτώσεις που η ποσότητα της ουσίας είναι έντονη στο δείγμα, κάτι το οποίο δε συμφωνεί με το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του υβριδίου. Η ταυτοποίηση του LDH στο δείγμα γίνεται από τον ώμο που σχηματίζεται στους 1362 cm^{-1} όπου εμφανίζονται τα ανθρακικά ανιόντα που υπήρχαν στο δείγμα και πολύ πιο καθαρά από την κορυφή στους 3431 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης των υδροξυλίων συνδεδεμένων με τα μέταλλα του LDH, η οποία δεν υπάρχει στο δείγμα κυστεΐνης. Στο δείγμα του υβριδίου dLDH (Mg-Al)-Cys υπάρχουν επίσης κορυφές στους 3023 cm^{-1} και 2968 cm^{-1} που ανήκουν στην δόνηση τάσης N-H, μία κορυφή στα 1620 cm^{-1} που ανήκει στην δόνηση του $-\text{COO}^- \text{ cm}^{-1}$ και πολλές κορυφές που ανήκουν στις δονήσεις σκελετού του αμινοξέος ανάμεσα στους 800 cm^{-1} με 1200 cm^{-1} ¹²⁹. Η έντονη παρουσία της κυστεΐνης στο φάσμα υπερύθρου σε συνδυασμό με την διαπλάτυνση των διαδοχικών στρωμάτων του LDH δείχνουν πως η σύνθεση με επαναστοίβαξη βοήθησε για άλλη μια φορά στην παγίδευση του αμινοξέος.



Εικόνα 3.26. Φάσματα υπερέυθρου των LDH (Mg-Al)-Cys και dLDH (Mg-Al)-Cys.

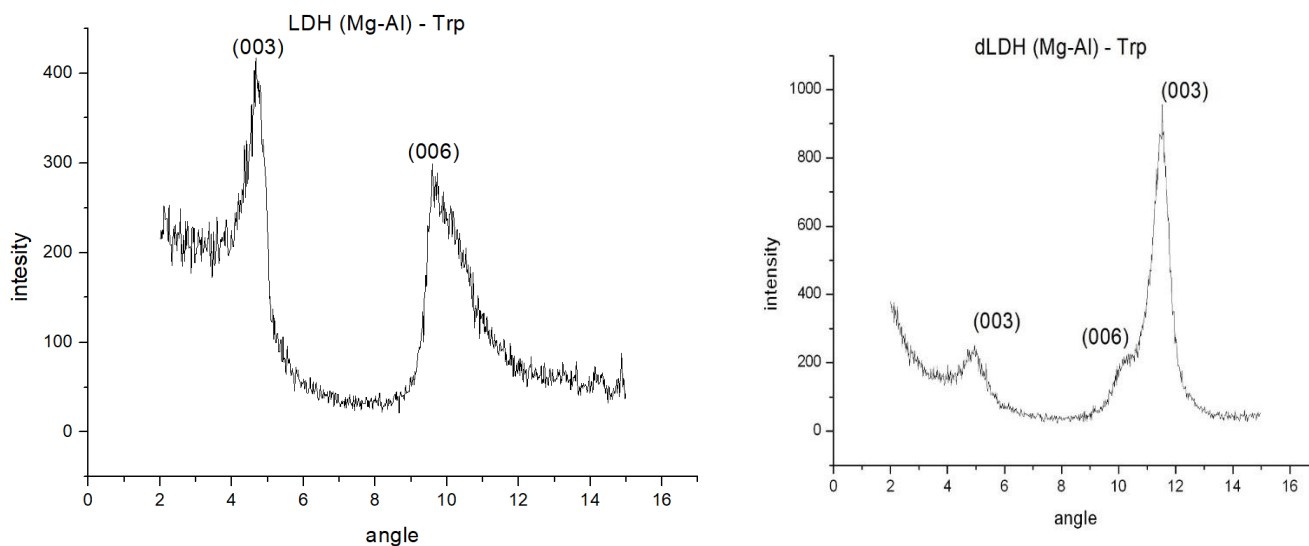
Αν και η φασματοσκοπία IR δείχνει πως υπάρχει μεγάλη ποσότητα κυστεΐνης στο δείγμα dLDH (Mg-Al)-Cys η μελέτη με περίθλαση ακτίνων X διαφωνεί. Αυτό σημαίνει πως η περισσότερη κυστεΐνη που βρίσκεται στο δείγμα δεν έχει συναρμοστεί στο εσωτερικό του και βρίσκεται επιφανειακά ή σαν επιμόλυνση. Εφόσον δεν υπάρχει τρόπος το αμινοξύ

να συναρμοστεί χημικά στην επιφάνεια το πρώτο αποκλείεται. Η μέθοδος καθαρισμού που χρησιμοποιείται όμως, είναι σύμφωνη με τη βιβλιογραφία και η λειτουργία της είναι αποδεδειγμένη. Αυτή η επιμόλυνση λοιπόν μπορεί να υπάρχει στο δείγμα μόνο αν με κάθε έκπλυση με νερό για κάποιο λόγο αποσυναρμόζεται ποσότητα του αμινοξέος από το εσωτερικό του LDH.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Trp:

Στο διάγραμμα του LDH (Mg-Al)-LDH (εικόνα 3.27) εμφανίζονται δύο κορυφές που αντιστοιχούν στις διαδοχικές αποστάσεις συναρμοσμένης τρυπτοφάνης (18.89 \AA)¹³¹. Όπως είναι αναπόφευκτο δίνεται και η ένδειξη της ύπαρξης των αρχικών ανθρακικών ανιόντων του LDH (Mg-Al)-NO₃, στη μορφή ώμου στην κορυφή (006).

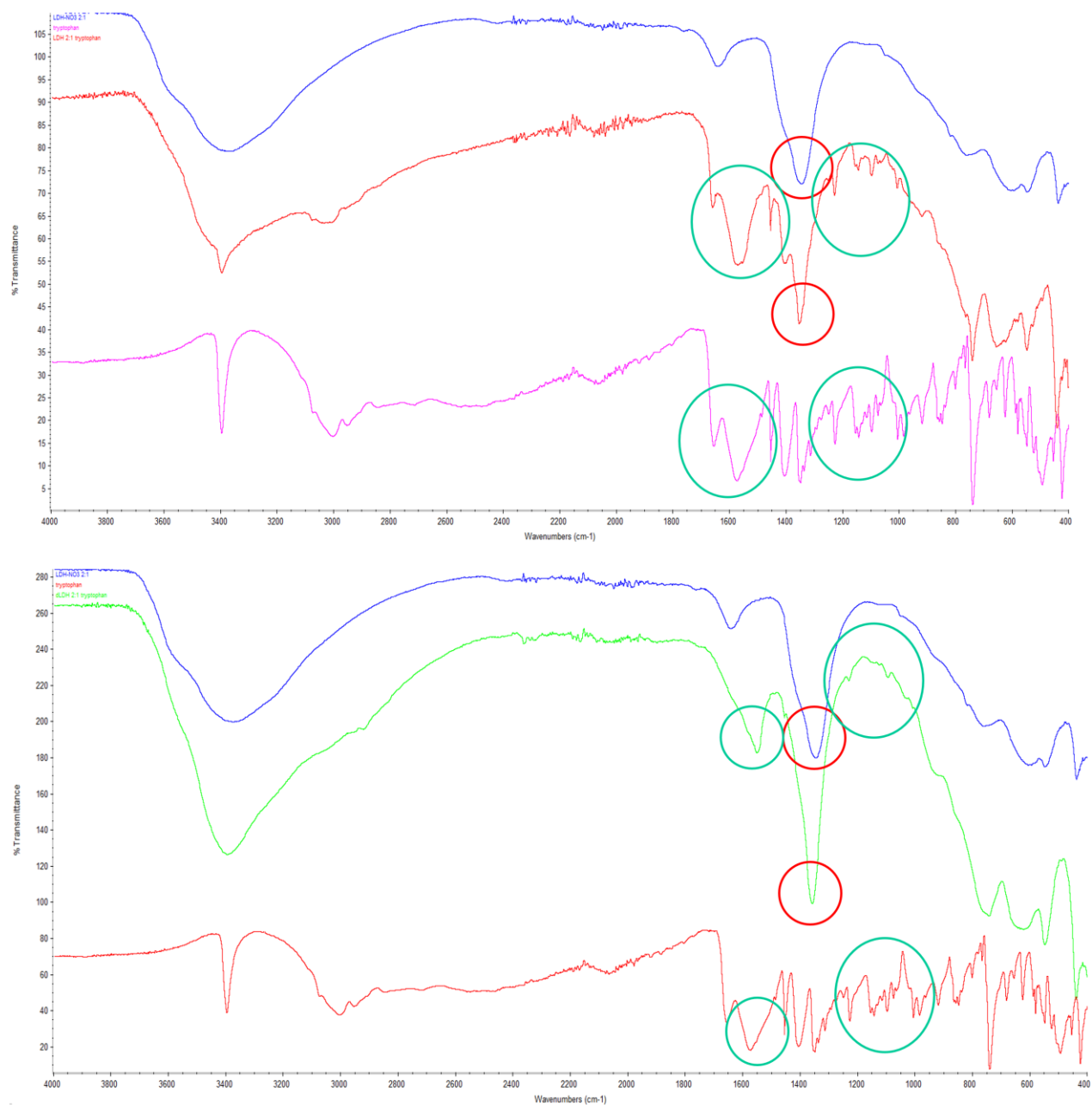
Οι ίδιες κορυφές εμφανίζονται και στο διάγραμμα του dLDH (Mg-Al)-Trp, αλλά με χαμηλότερη ένταση. Αυτό σε συνδυασμό με την κορυφή που αντιστοιχεί σε διαστρωματική απόσταση ίση με $7,51 \text{ \AA}$, δείχνει πως ανθρακικά ανιόντα είτε συναρμόστηκαν ταυτόχρονα με την τρυπτοφάνη, είτε την αντικατέστησαν μερικώς. Η μικρή ποσότητα τρυπτοφάνης στο δείγμα είναι αναμενόμενη, καθώς ο δακτύλιος στην λειτουργική ομάδα της τρυπτοφάνης την κάνει πιο δυσδιάλυτη στους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την αποφυλλοποίηση του LDH, περιορίζοντας τη διαθεσιμότητά της για να εισαχθεί ανάμεσα στα στρώματα.



Εικόνα 3.27. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Trp και dLDH (Mg-Al)-Trp

Τα φάσματα υπέρυθρου (εικόνα 3.26) δείχνουν παρόμοια αποτελέσματα με τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ, εμφανίζοντας όμοιες κορυφές, με τις κορυφές του dLDH (Mg-Al)-Trp να είναι χαμηλότερης έντασης. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζεται μία κορυφή στους 1551 cm^{-1} η οποία αντιστοιχεί στην ασύμμετρη δόνηση τάσης του $-\text{COO}^-$, ενώ κορυφές που αντιστοιχούν στις δονήσεις C-C, C-N και C-O εμφανίζονται ανάμεσα στους 1000 με 1250 cm^{-1} . Η παρουσία της τρυπτοφάνης αναδεικνύεται πιο έντονα στο φάσμα του LDH (Mg-Al)-Trp, όπου φαίνεται επίσης επίσης η δόνηση του δεσμού N-H της ινδόλης (3399 cm^{-1}), ενώ η συμμετρική δόνηση του $-\text{COO}^-$ (1404 cm^{-1}) δεν καλύπτεται από την κορυφή των ανθρακικών ανιόντων (1355 cm^{-1})¹³⁰.

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα του XRD και της φασματοσκοπίας IR φαίνεται πως στην παρασκευή αυτών των υβριδίων, η σύνθεση με επαναστοίβαξη είχε αντίθετα αποτελέσματα, σε σύγκριση με τις προηγούμενες συνθέσεις, δυσκολεύοντας την εισαγωγή της τρυπτοφάνης ανάμεσα στα ανόργανα στρώματα.



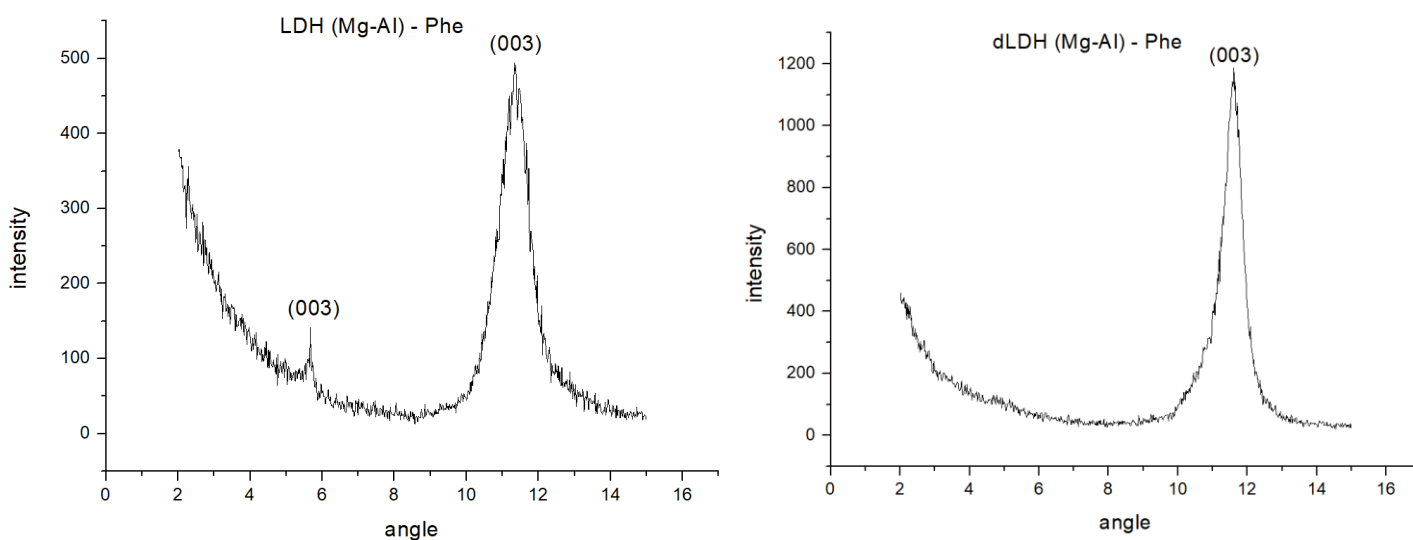
Εικόνα 3.28. Φάσματα υπέρυθρου των LDH (Mg-Al)-Trp και dLDH (Mg-Al)-Trp.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Phe:

Οι δύο κορυφές που εμφανίζονται στο διάγραμμα του LDH (Mg-Al)-Phe (εικόνα 3.29) αντιστοιχούν σε αποστάσεις 15,56 Å και 7,80 Å. Η πρώτη, αν και χαμηλής έντασης,

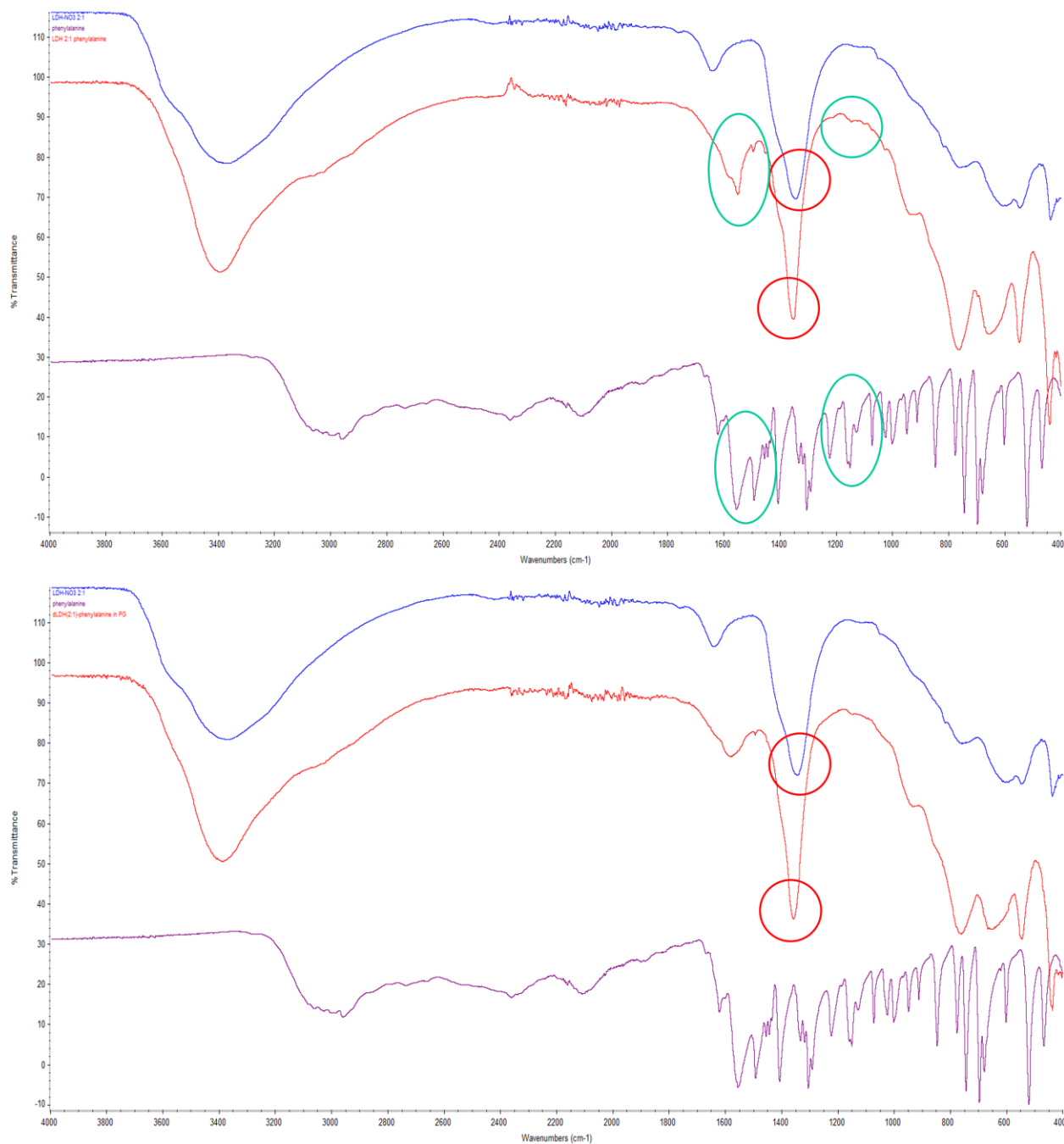
αντιστοιχεί στη (003) της συναρμοσμένης φαινυλαλανίνης, κάτι που είναι εκτενώς μελετημένο στη βιβλιογραφία^{125, 126}. Στη συγκεκριμένη μέτρηση η ύπαρξη (006) κορυφής δεν μπορεί να εξακριβωθεί, καθώς πέφτει ακριβώς πάνω στην κορυφή που συνήθως αποδίδεται στα ανθρακικά ανιόντα και αναμένεται να υπερκαλύπτεται. Η μικρής έντασης κορυφή δηλώνει πως η ποσότητα της φαινυλαλανίνης που είναι παγιδευμένη στη διαστρωματική περιοχή του LDH είναι εξαιρετικά λίγη, κάτι που είναι αναμενόμενο εφόσον το αμινοξύ εισάγεται δύσκολα με ανιονανταλλαγή.

Στο διάγραμμα του dLDH (Mg-Al)-Phe η κορυφή που δηλώνει την ύπαρξη φαινυλαλανίνης ανάμεσα στα φύλλα, έχει εξαφανιστεί και η μόνη κορυφή που υπάρχει αντιστοιχεί σε απόσταση 7,61 Å.



Εικόνα 3.29. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Phe και dLDH (Mg-Al)-Phe

Καθώς η ποσότητα φαινυλαλανίνης που υπάρχει παγιδευμένη στο LDH (Mg-Al)-Phe είναι ελάχιστη, οι κορυφές που αντιστοιχούν στο αμινοξύ είναι εξίσου μικρές, όπως παρουσιάζεται στο φάσμα της εικόνας 3.30.



Εικόνα 3.30. Φάσματα υπερύθρου των LDH (Mg-Al)-Phe και dLDH (Mg-Al)-Phe.

. Εμφανίζονται όμως κορυφές στους 1548 cm^{-1} και 1491 cm^{-1} που αντιστοιχούν στη ασύμμετρη και τη συμμετρική δόνηση του -COO^{-126} . Ταυτόχρονα, υπάρχουν ενδείξεις ανάμεσα στους 1050 με 1250 cm^{-1} που δηλώνουν την παρουσία δονήσεων C-C,

C-N και C-O, δείχνοντας πως πέρα από ανθρακικά ανιόντα, ανάμεσα στα φύλλα του LDH υπάρχει και φαινυλαλανίνη.

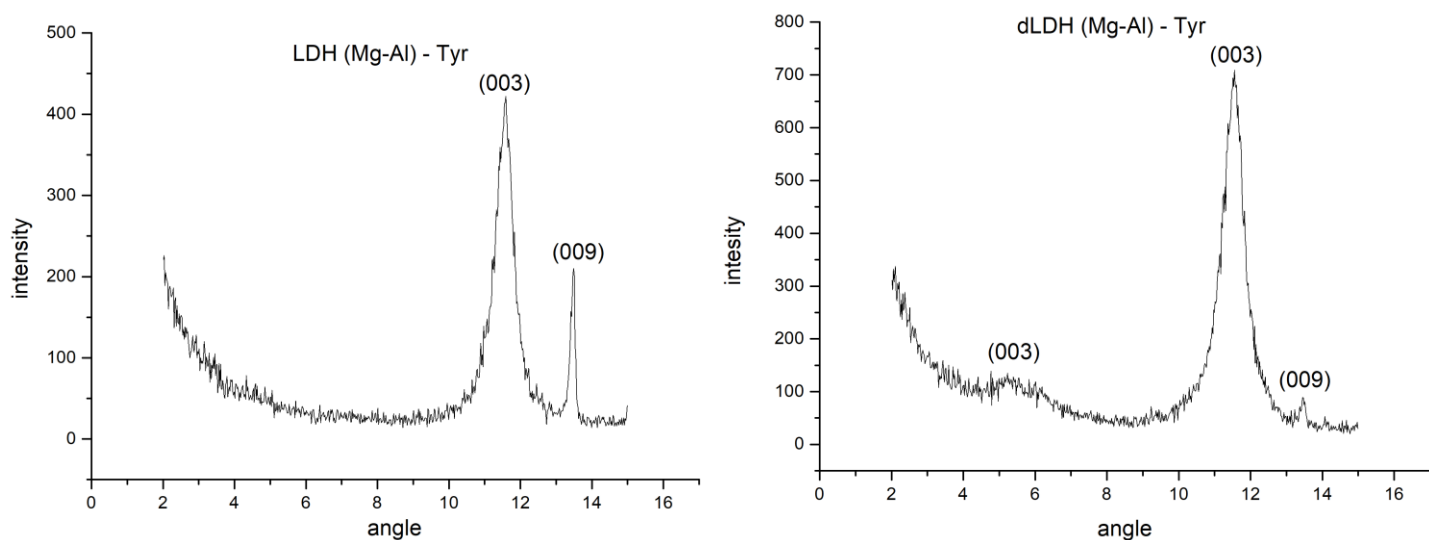
Στο φάρμα του dLDH (Mg-Al)-Phe δεν υπάρχουν σημαντικές κορυφές πέραν αυτών του απλού LDH, δείχνοντας πως όπως και στην περίπτωση της τρυπτοφάνης η μέθοδος επαναστοίβαξης είχε αρνητική επίδραση στην παγίδευση του αμινοξέος.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Tyr:

Στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH (Mg-Al)-Tyr (εικόνα 3.31) εμφανίζονται δύο κορυφές που δίνουν απόσταση 7,62 Å και 6,55 Å αντίστοιχα. Αν και η πρώτη εύκολα χαρακτηρίζεται σαν η αναμενόμενη διαστρωματική απόσταση ανθρακικών ανιόντων, η δεύτερη δεν είναι εύκολα αναγνωρίσιμη. Η κορυφή δεν εμφανίζεται σε XRD μεμονωμένης τυροσίνης και η απόσταση είναι πολύ μικρή για να αντιστοιχεί σε απόσταση της (003) διάστασης. Μία εμβάθυνση στη βιβλιογραφία δείχνει πως η κορυφή εμφανίζεται σε 2θ ίσο με τη διάσταση (009) για την τυροσίνη¹³². Η εμφάνιση μονάχα αυτής της κορυφής θα ήταν αδύνατη, εκτός εάν σε κάποιο σημείο του πειράματος έγινε μερική αντικατάσταση του εσωτερικού ανιόντος, εξαφανίζοντάς το από το διαστρωματικό τμήμα πιο κοντά στην επιφάνεια. Το γεγονός ότι η τυροσίνη είναι ένα δυσκίνητο ανιόν λόγω του αρωματικού κύκλου της, δικαιολογεί γιατί η διαδικασία θα ήταν αργή και η αντικατάσταση μπορεί να μην έγινε ολοκληρωτικά. Η επαλήθευση της θεωρίας γίνεται με τη μελέτη του φάσματος IR.

Στο διάγραμμα του dLDH (Mg-Al)-Tyr υπάρχουν δύο κορυφές που αντιστοιχούν σε απόσταση 16,88 Å για δείκτες Miller (003) και (009) η οποίες συμφωνούν με τη βιβλιογραφία για την παγίδευση τυροσίνης. Και οι δύο κορυφές όμως είναι εξαιρετικά χαμηλής έντασης, επαναλαμβάνοντας τα αποτελέσματα των προηγούμενων συνθέσεων με επαναστοίβαξη και δείχνοντας πως η μέθοδος παρεμποδίζει την παγίδευση μορίων με αρωματικές ομάδες. Σε αντίθεση με το διάγραμμα του LDH (Mg-Al)-Tyr η κορυφή της εξωτερικής στοιβάδας δεν έχει εξαφανιστεί δείχνοντας πως η χρήση των διαλυτών αποφυλλοποίησης προστάτευσε ελαφρώς από την μόλυνση του LDH με ανθρακικά ανιόντα. Σημειώνεται ότι η (006) κορυφή της τυροσίνης θα εμφανιζόταν σε γωνία 2θ πολύ

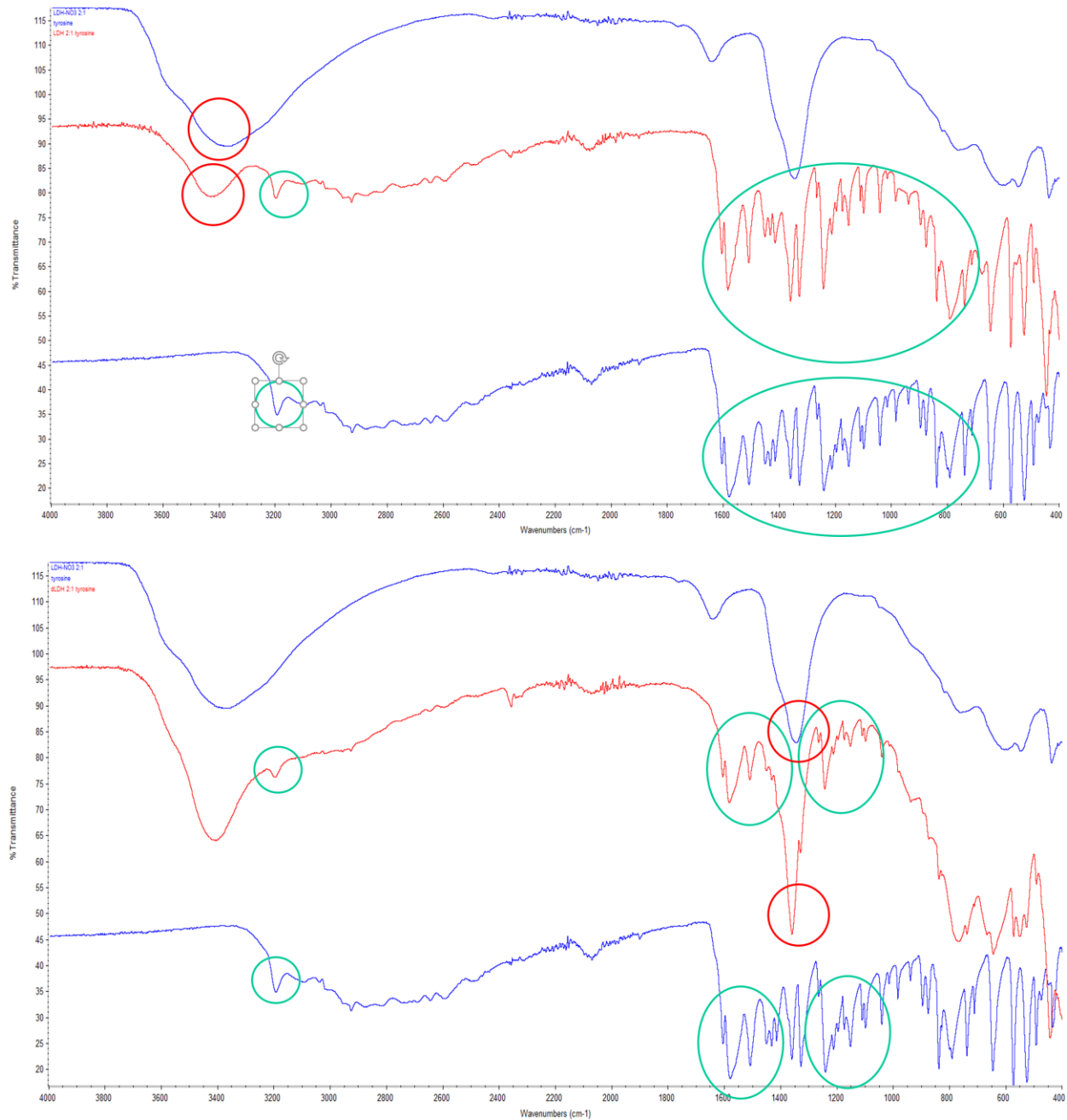
κοντά στα ανθρακικά ανιόντα και αναμένεται πως καλύπτεται από αυτήν, εφόσον η έντασή της θα ήταν επίσης χαμηλή.



Εικόνα 3.31. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Tyr και dLDH (Mg-Al)-Tyr

Μελετώντας το φάσμα υπερύθρου του LDH (Mg-Al)-Tyr (εικόνα 3.32) η παρουσία της τυροσίνης είναι τόσο έντονη που οι κορυφές της καλύπτουν τις κορυφές του LDH δίνοντας ένα φάσμα σχεδόν πανομοιότυπο με αυτό της σκέτης τυροσίνης. Κάτι τέτοιο δεν είναι ανήκουστο και εμφανίζεται στη βιβλιογραφία¹³⁰. Η κορυφή που αναδεικνύει την ύπαρξη ανόργανων φύλλων LDH στο δείγμα εμφανίζεται στους 3432 cm^{-1} , όπου φαίνεται η δόνηση υδροξυλίων συνδεδεμένων με μέταλλα, μία κορυφή που δεν εμφανίζεται καθόλου στη σκέτη τυροσίνη.

Οι κορυφές του LDH φαίνονται πιο καθαρά στο φάσμα του dLDH (Mg-Al)-Tyr. Η παρουσία του αμινοξέος ανάμεσα στα φύλλα ταυτοποιείται με την εμφάνιση πολλών χαρακτηριστικών για την ουσία κορυφών. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη κορυφή που εμφανίζεται στους 3195 cm^{-1} ανήκει στην αμινομάδα, ενώ η δεύτερη έντονη κορυφή στους 1580 cm^{-1} δείχνει την παρουσία της καρβονυλομάδας. Οι κορυφές στους 1507 cm^{-1} , 1454 cm^{-1} , 1429 cm^{-1} ανήκουν στον δεσμό C=C και οι κορυφές στους 1413 cm^{-1} και 1356 cm^{-1} , 1323 cm^{-1} δείχνουν την ύπαρξη μεθυλενίου και υδροξειδίου αντίστοιχα.



Εικόνα 3.32. Φάσματα υπεράθρου των LDH (Mg-Al)-Tyr και dLDH (Mg-Al)-Tyr.

Συμπεράσματα συνθέσεων με αμινοξέα

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα των συνθέσεων με αμινοξέα τα οποία παρουσιάστηκαν στο παραπάνω μέρος, προκύπτει μία σειρά από χρήσιμα συμπεράσματα.

Αρχικά, είναι εμφανές πως η χρήση αποφυλλοποιημένου LDH, το οποίο επαναστοιβάζεται κατά την απομόνωση του υβριδίου με φυγοκέντριση, έχει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι της απλής ανιονανταλλαγής. Δίνοντας την ευκαιρία στα αμινοξέα να πλησιάσουν τα μοναδιαία φύλλα αρκετές συνθέσεις ήταν επιτυχείς, δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα με τις πολύ πιο ακριβές συνθέσεις με συγκαταβύθιση. Συγκριτικά με τη βιβλιογραφία, φαίνεται πως η μικρότερη διαλυτότητα των μέσων αποφυλλοποίησης σε ανθρακικά ανιόντα, προστατεύει το δείγμα από αυτήν την πάρα πολύ συχνή επιμόλυνση, κάνοντας τη διαδικασία να δίνει καλύτερα αποτελέσματα και από την συγκαταβύθιση.

Βεβαίως πρέπει να σημειωθεί ότι λόγω της φύσης των διαλυτών αποφυλλοποίησης, η συγκεκριμένη μέθοδος επαναστοίβαξης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή οποιουδήποτε ανιόντος, αφού όπως φάνηκε και στις συνθέσεις τρυπτοφάνης, φαινυλαλανίνης και τυροσίνης, ουσίες που δεν είναι εύκολα διαλυτές στα μέσα αποφυλλοποίησης θα δυσκολευτούν να έρθουν σε επαφή με τα φύλλα του LDH. Η μέθοδος επαναστοίβαξης λοιπόν δεν μπορεί αντικαταστήσει άλλες μεθόδους, αλλά αποτελεί ένα ακόμη εργαλείο για να χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες συνθέσεις για βελτιωμένα αποτελέσματα.

Ταυτόχρονα ένα σημαντικό φαινόμενο εμφανίστηκε σε αρκετά από τα πειράματα παγίδευσης αμινοξέων. Σε πολλές από τις συνθέσεις υπήρξε αντικατάσταση του εσωτερικού ανιόντος με ανθρακικά ανιόντα. Ιδιαίτερα στις συνθέσεις με ασπαρτικό και τυροσίνη εμφανίστηκαν κορυφές που δηλώνουν την ύπαρξη των αμινοξέων στα εσωτερικά στρώματα, αλλά όχι στα εξωτερικά δείχνοντας στην ουσία μία ημιτελή αντικατάσταση από ανθρακικά ανιόντα. Αυτή η αντικατάσταση δεν εμφανίζεται σε άλλα πειράματα στα πλαίσια της έρευνας, ενώ ένας επιπλέον έλεγχος με τυφλό LDH χωρίς αμινοξύ που πέρασε από τις ίδιες κατεργασίες έδειξε πως τα αρχικά νιτρικά ανιόντα του δεν αντικαταστάθηκαν από ανθρακικά ανιόντα, παρότι έχουν χαμηλότερη συγγένεια με τα φύλλα από τις ομάδες των αμινοξέων. Άρα πρέπει να υπάρχει ένας παραπάνω

παράγοντας που κάνει την επιμόλυνση από ανθρακικά ανιόντα πιο εύκολη σε αυτά τα πειράματα. Επιπλέον, ιδιαίτερα ασυνήθιστο είναι πως τα LDH συνεχίζουν να εμφανίζουν κορυφές πολύ χαμηλής ισχύς, οι οποίες ανήκουν στα αμινοξέα χωρίς να εμφανίζεται διαπλάτυνση των διαδοχικών φύλλων, παρότι χρησιμοποιούνται δοκιμασμένες μέθοδοι καθαρισμού του νανοϋβριδίου. Αυτό το φαινόμενο εμφανίζεται σε μεγάλο βαθμό και στη βιβλιογραφία, πάνω στο οποίο βασίζεται η υποστήριξη επιτυχημένων συνθέσεων LDH με αμινοξέα και τελικά καταλήγοντας σε πολλές επιτυχημένες συνθέσεις να δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα.

Μοναδικό κοινό στοιχείο εμφάνισης των παραπάνω φαινομένων είναι πως αφορούν συνθέσεις με αμινοξέα, ιδιαίτερα μόρια των οποίων το φορτίο μπορεί να αλλάξει με βάση το περιβάλλον που βρίσκονται. Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου αποδείχθηκε πως ακόμη και αν ένα μόριο είναι παγιδευμένο στο εσωτερικό του LDH μπορεί ακόμη να αλληλεπιδράσει με το περιβάλλον του, ακόμη και να καταλύσει αντιδράσεις. Παρομοίως, προτείνεται πως και τα αμινοξέα μπορούν να επηρεαστούν κατά τον καθαρισμό του υβριδίου από το νερό ουδέτερου pH που χρησιμοποιείται και να χάσουν το αρνητικό φορτίο τους, αναγκάζοντάς τα να απομακρυνθούν από θετικά φορτισμένα φύλλα και ωθώντας τα ανθρακικά ανιόντα να πάρουν τη θέση τους πολύ πιο ισχυρά από ότι θα συνέβαινε κατά την απλή ανιόνταλλαγή. Ταυτόχρονα, εφόσον με κάθε έκπλυση επηρεάζεται και απελευθερώνεται ένα κομμάτι μόνο των συναρμοσμένων αμινοξέων, συνεχώς υπάρχουν λίγα ελεύθερα στο δείγμα που απομονώνεται, δίνοντας χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα IR ακόμα και αν αυξηθούν τα βήματα καθαρισμού.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-DNA:

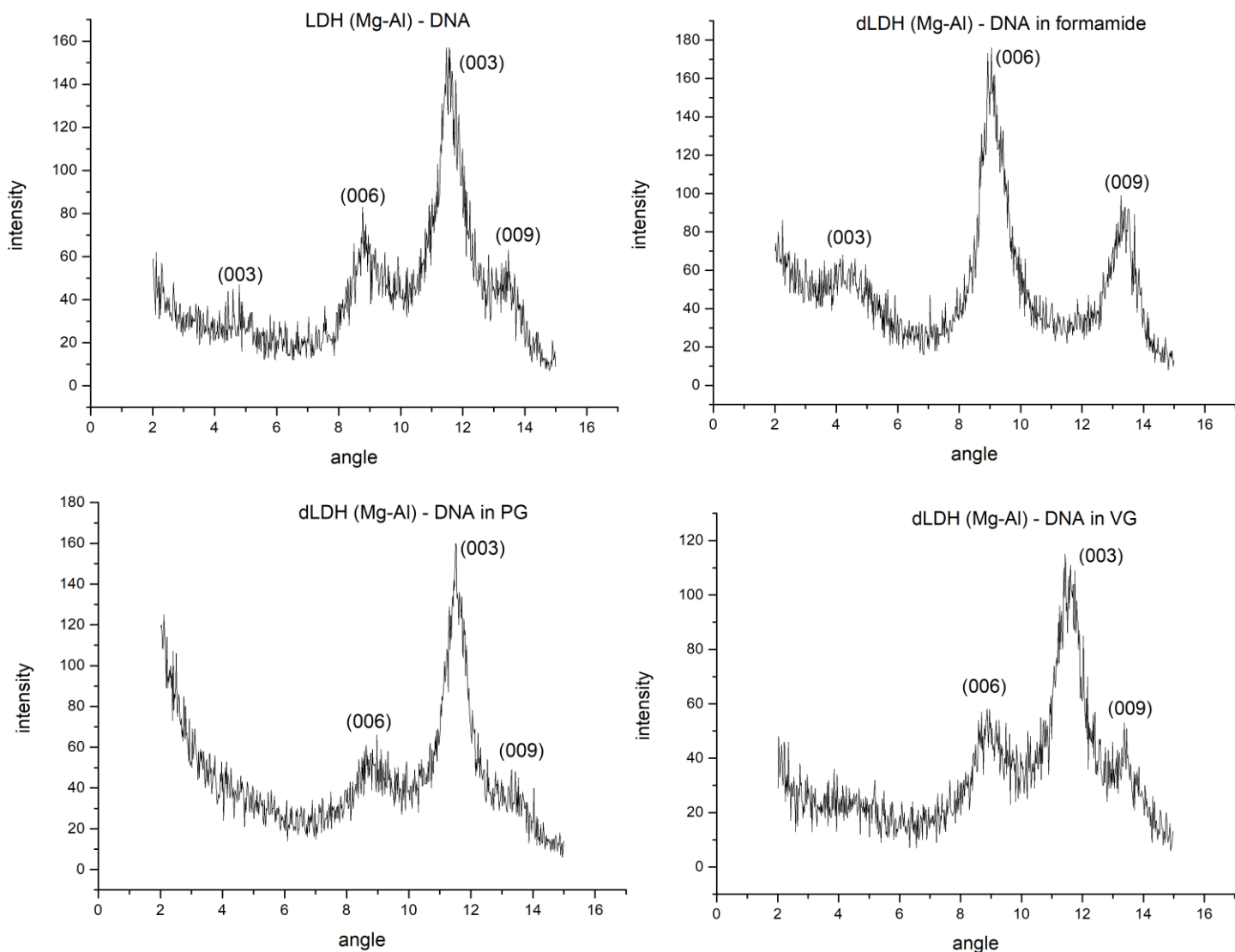
Αν και η ικανότητα του LDH να παγιδεύει DNA στο εσωτερικό του είναι ευρέως μελετημένη^{62, 65, 133, 134}, οι χρήσεις αυτής της ανόργανης μήτρας σαν φορέας σε πειράματα γενετικής τροποποίησης είναι περιορισμένη. Κυρίως παράγοντας αυτού είναι το μέγεθος των μορίων που μπορούν να εισαχθούν μεταξύ των στρωμάτων. Στα πλαίσια της έρευνας δοκιμάστηκε η αποφυλλοποίηση και επαναστοίβαξη του LDH σαν μέθοδος που θα επιτρέψει σε μεγαλύτερα μόρια DNA να παγιδευτούν.

Η σύνθεση με επαναστοίβαξη δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας φορμαμίδιο, προπυλενογλυκόλη και γλυκερόλη σαν μέσα αποφυλλοποίησης, ενώ τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη σύνθεση με ανιονανταλλαγή σε νερό:

Όλα τα διαγράμματα της εικόνας 3.33 εμφανίζουν κορυφές που δίνουν διαστρωματική απόσταση διαφορετική από αυτή των ανθρακικών ανιόντων, δείχνοντας την πιθανή εισαγωγή του DNA. Πιο συγκεκριμένα, στο LDH (Mg-Al)-DNA με ανιονανταλλαγή οι κορυφές δείχνουν απόσταση 18,42 Å, ενώ στα dLDH (Mg-Al)-DNA σε φορμαμίδιο, προπυλενογλυκόλη και γλυκερόλη οι κορυφές υπολογίζονται στα 19.66 Å, 19.69 Å και 19,91 Å αντίστοιχα. Παρότι οι διαφορές στις διαστρωματικές αποστάσεις είναι σημαντικές, δικαιολογούνται καθώς τα μόρια νερού ανάμεσα στα στρώματα των dLDH έχουν αντικατασταθεί από μεγαλύτερα, με την γλυκερόλη που είναι το πιο ογκώδες να οδηγεί και στη μεγαλύτερη διαστρωματική απόσταση για το υβρίδιο.

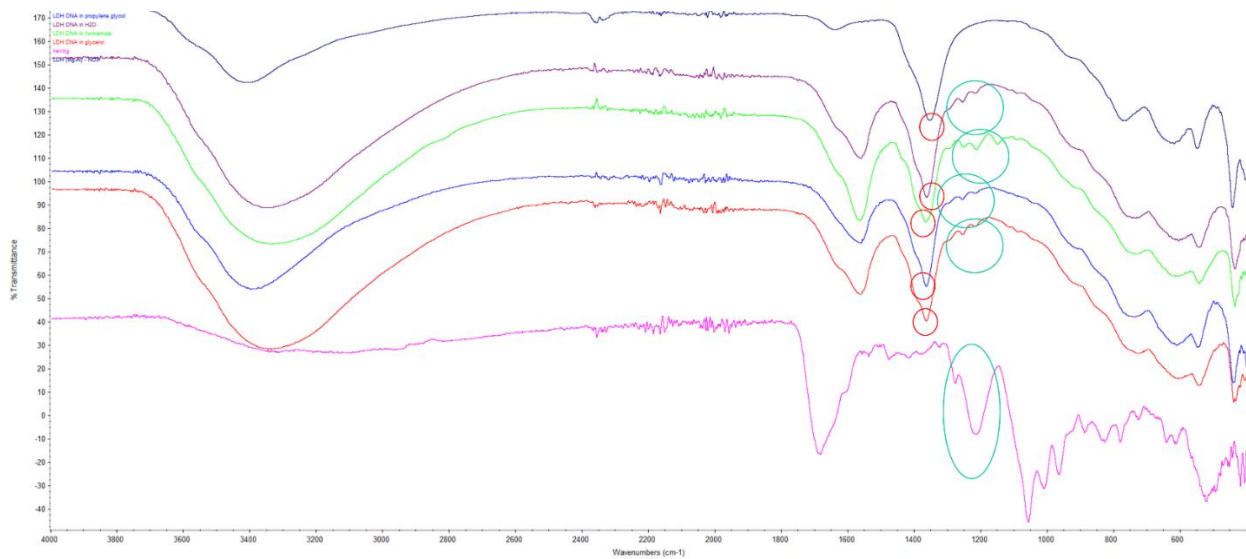
Ταυτόχρονα σημειώνεται πως στα dLDH προπυλενογλυκόλης και γλυκερόλης δεν εμφανίζονται κορυφές με δείκτες Miller (003). Αυτό συμβαίνει λόγω της χαμηλότερης έντασης τη κορυφής σε σύγκριση με τις κορυφές (006) και (009), οι οποίες στα συγκεκριμένα υβρίδια είναι ήδη πολύ χαμηλής έντασης, δείχνοντας πως μικρότερη ποσότητα DNA έχει παγιδευτεί στο εσωτερικό τους, σε σύγκριση με τα άλλα υβρίδια.

Τέλος, και τα 4 διαγράμματα δεν είναι ιδιαίτερα καθαρά και δείχνουν χαμηλή ομοιομορφία στο εσωτερικό των LDH. Αυτό οφείλεται στην ίδια την ουσία που εισάγεται στη μήτρα, καθώς το DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε άνισα θραύσματα, τα οποία δίνουν μικρές διαφορές στις διαστρωματικές αποστάσεις.



Εικόνα 3.33. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-DNA και dLDH (Mg-Al)-DNA αποφυλλοποιημένα σε φορμαμίδιο, προπυλενογλυκόλη και γλυκερόλη.

Τα φάσματα υπέρυθρου που εμφανίζονται στην εικόνα 3.34 έχουν τις χαρακτηριστικές κορυφές ταυτοποίησης των LDH, με τη δόνηση τάσης των υδροξυλίων να εμφανίζεται κοντά στους 3350 με 3400 cm^{-1} και τις τρεις δονήσεις των μετάλλων να εμφανίζονται μεταξύ 500 με 800 cm^{-1} . Οι μόνες νέες κορυφές που εμφανίζονται και ανήκουν στο DNA είναι στους 1214 και 1277 cm^{-1} όπου φαίνονται η αντισυμμετρική δόνηση των φωσφορικών και η δόνηση της θυμίνης αντίστοιχα.



Εικόνα 3.34. Φάσματα υπερύθρου των LDH (Mg-Al)-DNA και dLDH (Mg-Al)-DNA αποφυλλοποιημένα σε φορμαμίδιο, προπυλενογλυκόλη και γλυκερόλη.

Αν και εμφανίζονται κορυφές του DNA στο δείγμα, σημειώνεται η έλλειψη πολλών άλλων κορυφών της επιθυμητής ουσίας στο φάσμα υπερύθρου. Για την περαιτέρω εξακρίβωση της παγίδευσης DNA στο εσωτερικό της μήτρας, καθώς και για την ποσοτικοποίηση της αποδοτικότητας κάθε μεθόδου, λήφθηκαν φάσματα απορρόφησης υπεριώδους από τα υπερκείμενα κάθε φυγοκέντρησης, κατά τη διάρκεια των εκπλύσεων, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Συγκεντρώσεις DNA στα υπερκείμενα κάθε έκπλυσης.

	Sample	C (μg/ml)
1st centrifugation	LDH - DNA	552,5
	dLDH - DNA (glycerol)	1370
	dLDH-DNA (propylene glycol)	617,5
	dLDH - DNA (formamide)	530
2nd centrifugation	LDH - DNA	143
	dLDH - DNA (glycerol)	696
	dLDH-DNA (propylene glycol)	435
	dLDH - DNA (formamide)	130
3rd centrifugation	LDH - DNA	0,245
	dLDH - DNA (glycerol)	3,09
	dLDH-DNA (propylene glycol)	1,42
	dLDH - DNA (formamide)	0,833

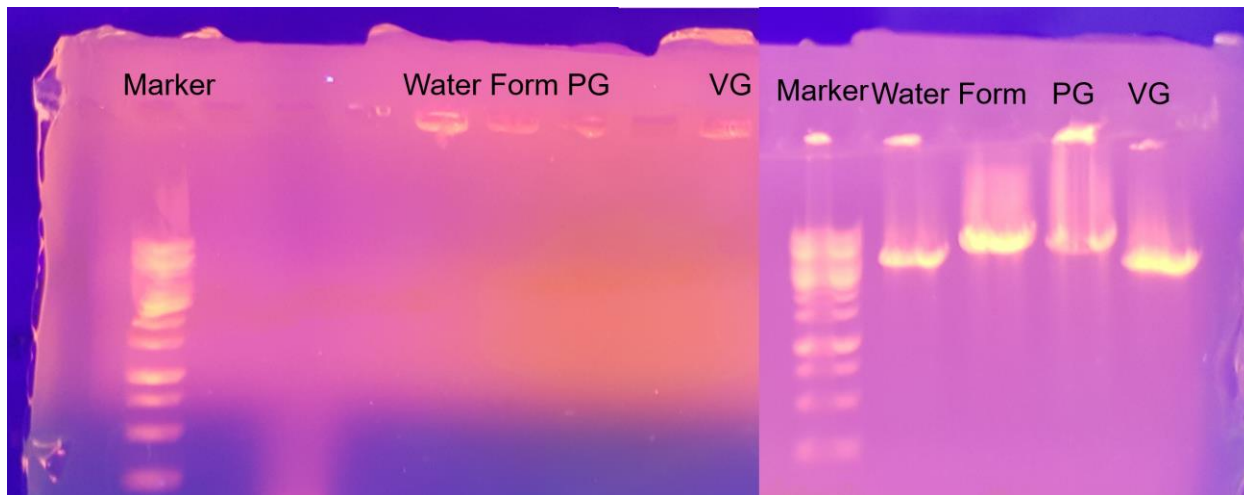
Όπως ήταν αναμενόμενο οι συνθέσεις που είχαν πιο έντονες κορυφές στα διαγράμματα XRD (LDH-DNA, dLDH-DNA σε φορμαμίδιο) είχαν μικρότερες ποσότητες ελεύθερου DNA στα υπερκείμενα κάθε φυγοκέντρισης. Αντίθετα, τα διαγράμματα που οι κορυφές ήταν τόσο χαμηλής έντασης που δεν εμφανιζόταν η κορυφή (003) είχαν μεγαλύτερη περίσσεια που δεν είχε συναρμοστεί. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στο σημαντικά υψηλότερο ιξώδες που έχουν οι δύο αυτοί διαλύτες, οδηγώντας στη σύνθεση να χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να γίνει. Παρόλα αυτά, όλες οι συνθέσεις έδειξαν χαμηλότερη ποσότητα μη συναρμοσμένου DNA από την αρχική (2mg/mL), οδηγώντας στο συμπέρασμα πως DNA έχει εισαχθεί στα LDH.

Οι παραπάνω ποσότητες περίσσειας DNA δείχνουν πως η επαναστοίβαξη σε φορμαμίδιο, οδήγησε στην παγίδευση της μεγαλύτερης ποσότητας DNA. Τα αποτελέσματα όμως είναι πάρα πολύ κοντά σε αυτά της απλή ανιονανταλλαγής με νερό, δείχνοντας πως η μέθοδος επαναστοίβαξης δεν δίνει κάποιο πλεονέκτημα όσον αφορά το μέγεθος ή την ποσότητα DNA που παγιδεύεται στο LDH.

Τέλος, μελετήθηκε εάν η χρήση των παραπάνω μεθόδων παγίδευσης γενετικού υλικού είναι αρκετά βίαιη για να βλάψει τις αλυσίδες DNA.

Στην αριστερή γέλη της εικόνας 3.35 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των υβριδίων πριν εισαχθεί οξύ. Τα τμήματα DNA παραμένουν παγιδευμένα στις πολύ μεγαλύτερες μήτρες οι οποίες δεν μπορούν να κινηθούν λόγω μεγέθους. Ταυτόχρονα αποδεικνύεται πως το γενετικό υλικό δεν βρίσκεται στην επιφάνεια των φύλλων, από όπου θα μπορούσε να απομακρυνθεί και να κινηθεί κατά την ηλεκτροφόρηση.

Στη δεύτερη γέλη της εικόνας 3.35, η παρουσία οξέος έχει καταστρέψει τα ανόργανα φύλλα, απελευθερώνοντας τα παγιδευμένα τμήματα DNA και επιτρέποντάς τους να κινηθούν. Καθώς εμφανίζονται στο ίδιο περίπου ύψος, μπορούμε να συμπεράνουμε πως οι μέθοδοι παγίδευσης DNA που μελετήθηκαν δεν έχουν σημαντική διαφορά στο πώς επηρεάζουν το μήκος του DNA.



Εικόνα 3.35. Γέλη αγαρόζης των LDH (Mg-Al)-DNA και dLDH (Mg-Al)-DNA αποφυλλοποιημένα σε φορμαμίδιο, προπυλενογλυκόλη και γλυκερόλη, πριν και μετά την εισαγωγή οξέος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν νέες μέθοδοι τροποποίησης και σύνθεσης νανοϋβριδίων LDH, με σκοπό τη βελτιστοποίηση αυτών των ανόργανων μητρών στη μεταφορά φαρμάκων.

Σε πρώτο επίπεδο μελετήθηκε η σύνθεση του LDH-NO₃ το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα μετέπειτα πειράματα. Η ικανότητά του για παγίδευση ανιόντων εξακριβώθηκε με την επιτυχημένη σύνθεση νανοβιοϋβριδίων με ουσίες βιολογικής σημασίας. Οι συνθέσεις αυτές ήταν: LDH-cholate, LDH-nitrofurantoin, LDH-acetate, LDH-lactate και LDH-Vitamin C, οι οποίες συντέθηκαν με ανιονανταλλαγή.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν δύο νέες μέθοδοι αποφυλλοποίησης του LDH, οι οποίες συγκρίθηκαν με τις τρεις πιο διαδεδομένες μεθόδους της βιβλιογραφίας. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν η προπυλενογλυκόλη και η γλυκερόλη σαν πιθανοί διαλύτες αποφυλλοποίησης LDH με υπερήχους. Χαρακτηρίζοντας τα τροποποιημένα LDH και συγκρίνοντας τη σταθερότητά τους με αποφυλλοποιημένα LDH σε φορμαμίδιο και νερό, βρέθηκε πως τα δύο νέα μέσα αποφυλλοποίησης παράγουν με επιτυχία dLDH γρήγορα και με μεγάλη σταθερότητα. Το γεγονός πως χρησιμοποιούνται μη τοξικοί διαλύτες για αποφυλλοποίηση της οποίας το κόστος και η ταχύτητα είναι συγκρίσιμη με αυτή του πιο αποτελεσματικού μέσου αποφυλλοποίησης, ανοίγει νέους ορίζοντες για την εφαρμογή των dLDH στη μεταφορά φαρμάκων.

Οι παραπάνω μέθοδοι αποφυλλοποίησης χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τη μελέτη της επαναστοίβαξης σαν μία νέα μέθοδο που προσφέρει πολλά από τα πλεονεκτήματα της σύνθεσης με συγκαταβύθιση σε πολύ μικρότερο κόστος. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την παγίδευση αμινοξέων τα οποία εμφανίζουν πολλές δυσκολίες, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Στα πλαίσια των πειραμάτων αποδείχθηκε πως η επαναστοίβαξη μπορεί να βοηθήσει στην επιτυχημένη εισαγωγή μορίων στο εσωτερικό των LDH, σε συνθήκες που η απλή ανιονανταλλαγή δεν θα μπορούσε. Ταυτόχρονα φάνηκε πως δεν είναι μία μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάθε σύνθεση, αφού η διαλυτότητα των μέσων αποφυλλοποίησης παίζει καθοριστικό ρόλο, όπως έδειξαν οι συνθέσεις LDH-trp, LDH-rhe και LDH-tyr. Στο σύνολό της, η επαναστοίβαξη φάνηκε να συνδυάζει πολλά από τα πλεονεκτήματα άλλων μεθόδων σύνθεσης LDH, όπως το μικρό

κόστος της ανιονανταλλαγής και τη μεγάλη δραστική επιφάνεια της συγκαταβύθισης, χωρίς να επηρεάζει την καλή κρυσταλλικότητα των φύλλων, όπως γίνεται στην αναδόμηση. Εμφανίζει πολλές προοπτικές χρήσης σαν ένα νέο εργαλείο παγίδευσης ανιόντων στο εσωτερικό του LDH, και βελτίωσης με την εξέταση άλλων πιο ομαλών μεθόδων επαναστοίβαξης, από τη φυγοκέντριση

Τα πειράματα σύνθεσης LDH με αμινοξέα ανέδειξαν επίσης μία μεγάλη παράβλεψη που επικρατεί στη βιβλιογραφία, όσον αφορά την παγίδευση αμινοξέων σε LDH. Η ικανότητα που διατηρεί ένα παγιδευμένο μόριο να αντιδρά με το περιβάλλον του, όπως αποδείχθηκε σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου, καθιστά τα βήματα καθαρισμού που ακολουθούνται μετά τη σύνθεση, ικανά να αλλάξουν το φορτίο του παγιδευμένου ανιόντος, αναγκάζοντάς το να απομακρυνθεί από τα φύλλα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να εμφανίζονται συχνά αποτελέσματα όπου αν και το διάγραμμα XRD δείχνει μια αποτυχημένη σύνθεση, το φάσμα IR εμφανίζει κορυφές που εσφαλμένα οδηγούν σε συμπεράσματα πως η αντίδραση έχει πετύχει. Προτείνονται λοιπόν, μελλοντικά πειράματα τα οποία θα επανεξετάσουν πιο σωστά την ικανότητα παγίδευσης των αμινοξέων σε LDH χρησιμοποιώντας νερό κατά τις εκπλύσεις με pH ίσο με το ψηλότερο pK_a του αμινοξέος + 0,5. Ταυτόχρονα η απόδειξη του ρόλου που παίζουν τα μέσα καθαρισμού για την επιτυχημένη παρασκευή νανοβιοϋβριδίων LDH ανοίγει προοπτικές για τις χρήσεις νέων μέσων καθαρισμού που θα σταθεροποιούν καλύτερα το επιθυμητό ανιόν στο εσωτερικό του LDH.

Τέλος, στα πλαίσια της έρευνας εξετάστηκε η πιθανότητα της επαναστοίβαξης με τα παραπάνω μέσα αποφυλλοποίησης να επιτρέψει την εισαγωγή μεγαλύτερων μορίων, όπως του DNA. Τα πειράματα έδειξαν πως αν και οι συνθέσεις με επαναστοίβαξη δεν είχαν καταστρεπτικά αποτελέσματα στις ίδιες τις αλυσίδες του DNA, οι νέοι διαλύτες αποφυλλοποίησης είχαν αρνητικά αποτελέσματα στην παγίδευση γενετικού υλικού, ενώ το dLDH με φορμαμίδιο δεν είχε κανένα πλεονέκτημα έναντι της σύνθεσης με ανιονανταλλαγή σε νερό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gato, M. A.; Naseem, S.; Arfat, M. Y.; Mahmood Dar, A.; Qasim, K.; Zubair, S., Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. *BioMed Research International* **2014**, *2014*, 498420.
2. Astruc, D., Introduction: Nanoparticles in Catalysis. *Chemical Reviews* **2020**, *120* (2), 461-463.
3. Sharma, N.; Ojha, H.; Bharadwaj, A.; Pathak, D. P.; Sharma, R. K., Preparation and catalytic applications of nanomaterials: a review. *RSC Advances* **2015**, *5* (66), 53381-53403.
4. Choi, S.-H., Unique properties of graphene quantum dots and their applications in photonic/electronic devices. *Journal of Physics D: Applied Physics* **2017**, *50* (10), 103002.
5. Kolhatkar, A. G.; Jamison, A. C.; Litvinov, D.; Willson, R. C.; Lee, T. R., Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14* (8).
6. Naghdi, S.; Rhee, K. Y.; Hui, D.; Park, S. J., A Review of Conductive Metal Nanomaterials as Conductive, Transparent, and Flexible Coatings, Thin Films, and Conductive Fillers: Different Deposition Methods and Applications. *Coatings* **2018**, *8* (8).
7. Dwivedi, N.; Kumar, S.; Carey, J. D.; Dhand, C., Functional Nanomaterials for Electronics, Optoelectronics, and Bioelectronics. *Journal of Nanomaterials* **2015**, *2015*, 136465.
8. Willner, M. R.; Vikesland, P. J., Nanomaterial enabled sensors for environmental contaminants. *Journal of Nanobiotechnology* **2018**, *16* (1), 95.
9. Arduini, F.; Cinti, S.; Scognamiglio, V.; Moscone, D., Nanomaterial-based sensors. *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry* **2020**, 329-359.
10. Kumar, N.; Phani, M. K.; Chamoli, P.; Manoj, M. K.; Sharma, A.; Ahmed, W.; Srivastava, A. K.; Kumar, S., Chapter 10 - Nanomaterials for advanced photovoltaic cells. In *Emerging Nanotechnologies for Renewable Energy*, Ahmed, W.; Booth, M.; Nourafkan, E., Eds. Elsevier: 2021; pp 239-258.
11. Patra, J. K.; Das, G.; Fraceto, L. F.; Campos, E. V. R.; Rodriguez-Torres, M. d. P.; Acosta-Torres, L. S.; Diaz-Torres, L. A.; Grillo, R.; Swamy, M. K.; Sharma, S.; Habtemariam, S.; Shin, H.-S., Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* **2018**, *16* (1), 71.
12. Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R., Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, *20* (2), 101-124.
13. Stephen, A. J.; Rees, N. V.; Mikheenko, I.; Macaskie, L. E., Platinum and Palladium Bio-Synthesized Nanoparticles as Sustainable Fuel Cell Catalysts. *Frontiers in Energy Research* **2019**, *7*.
14. Du, S.; Pollet, B., Applications of Nanomaterials in Fuel Cells. 2014.
15. Sikdar, D.; Pendry, J. B.; Kornyshev, A. A., Nanoparticle meta-grid for enhanced light extraction from light-emitting devices. *Light: Science & Applications* **2020**, *9* (1), 122.
16. Sanderson, W. M.; Hoy, J.; Morrison, C.; Wang, F.; Wang, Y.; Morrison, P. J.; Buhro, W. E.; Loomis, R. A., Excitation Energy Dependence of Photoluminescence Quantum Yields in Semiconductor Nanomaterials with Varying Dimensionalities. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2020**, *11* (9), 3249-3256.
17. Alfieri, A.; Anantharaman, S. B.; Zhang, H.; Jariwala, D., Nanomaterials for Quantum Information Science and Engineering. *Advanced Materials* **2022**, *n/a* (n/a), 2109621.
18. Katz, L. M.; Dewan, K.; Bronaugh, R. L., Nanotechnology in cosmetics. *Food and Chemical Toxicology* **2015**, *85*, 127-137.
19. Kaiser, J.-P.; Zuin, S.; Wick, P., Is nanotechnology revolutionizing the paint and lacquer industry? A critical opinion. *Science of The Total Environment* **2013**, *442*, 282-289.
20. He, X.; Deng, H.; Hwang, H.-m., The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of Food and Drug Analysis* **2019**, *27* (1), 1-21.
21. Gómez-López, P.; Puente-Santiago, A.; Castro-Beltrán, A.; Santos do Nascimento, L. A.; Balu, A. M.; Luque, R.; Alvarado-Beltrán, C. G., Nanomaterials and catalysis for green chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2020**, *24*, 48-55.
22. Guerra, F. D.; Attia, M. F.; Whitehead, D. C.; Alexis, F., Nanotechnology for Environmental Remediation: Materials and Applications. *Molecules* **2018**, *23* (7), 1760.
23. Lu, H.; Wang, J.; Stoller, M.; Wang, T.; Bao, Y.; Hao, H., An Overview of Nanomaterials for Water and Wastewater Treatment. *Advances in Materials Science and Engineering* **2016**, *2016*, 4964828.

24. Singh, K. K.; Singh, A.; Rai, S., A study on nanomaterials for water purification. *Materials Today: Proceedings* **2022**, *51*, 1157-1163.
25. Taghipour, S.; Hosseini, S. M.; Ataie-Ashtiani, B., Engineering nanomaterials for water and wastewater treatment: review of classifications, properties and applications. *New Journal of Chemistry* **2019**, *43* (21), 7902-7927.
26. Yang, Z.; Wang, F.; Zhang, C.; Zeng, G.; Tan, X.; Yu, Z.; Zhong, Y.; Wang, H.; Cui, F., Utilization of LDH-based materials as potential adsorbents and photocatalysts for the decontamination of dyes wastewater: a review. *RSC Advances* **2016**, *6* (83), 79415-79436.
27. Mageswari, A.; Srinivasan, R.; Subramanian, P.; Ramesh, N.; Gothandam, K. M., Nanomaterials: Classification, Biological Synthesis and Characterization. In *Nanoscience in Food and Agriculture 3*, Ranjan, S.; Dasgupta, N.; Lichtfouse, E., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 31-71.
28. Niemeyer, C. M., Nanoparticles, Proteins and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (22), 4128-4158.
29. Yu, Y.; Wang, S.; Teng, J.; Zupanic, A.; Guo, S.; Tang, X.; Liang, H., Photocatalytic Material–Microbe Hybrids: Applications in Environmental Remediations. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2022**, *9*.
30. Yoon, J.; Lee, T.; Choi, J.-W., Development of Bioelectronic Devices Using Bionanohybrid Materials for Biocomputation System. *Micromachines* **2019**, *10* (5).
31. Tertuliano, O. A.; Greer, J. R., The nanocomposite nature of bone drives its strength and damage resistance. *Nature Materials* **2016**, *15* (11), 1195-1202.
32. Wardiatno, Y.; Riyanto, B.; Iskandar, N. A.; Kleinertz, S.; Funch, P.; Kurniawan, F., A New Marine Biomaterial: The Shell of Mangrove Horseshoe Crabs, *Carcinoscorpius rotundicauda* (Latreille, 1802) Emphasizing Its Physico-Chemical Characteristics. *Frontiers in Marine Science* **2021**, *8*.
33. Tang, Z.; Kotov, N. A.; Magonov, S.; Ozturk, B., Nanostructured artificial nacre. *Nat Mater* **2003**, *2* (6), 413-418.
34. Kikuchi, M., Hydroxyapatite/Collagen Bone-Like Nanocomposite. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2013**, *36*, 1666-9.
35. Strassburg, S.; Mayer, K.; Scheibel, T., Functionalization of biopolymer fibers with magnetic nanoparticles. *Physical Sciences Reviews* **2020**.
36. Chinnathambi, S.; Shirahata, N., Recent advances on fluorescent biomarkers of near-infrared quantum dots for in vitro and in vivo imaging. *Sci Technol Adv Mater* **2019**, *20* (1), 337-355.
37. Wagner, M.; Li, F.; Li, J.; Li, X.-F.; Le, X. C., Use of Quantum Dots in the Development of Assays for Cancer Biomarkers. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2010**, *397*, 3213-24.
38. Kreuter, J., Nanoparticles - a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *331* (1), 1-10.
39. Kano, M. R., Nanotechnology and tumor microcirculation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, *74* (Supplement C), 2-11.
40. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* **2000**, *65* (1), 271-284.
41. Wu, J., The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *J Pers Med* **2021**, *11* (8), 771.
42. Iyer, A. K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H., Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* **2006**, *11* (17), 812-818.
43. Koltai, T., Cancer: fundamentals behind pH targeting and the double-edged approach. *Onco Targets Ther* **2016**, *9*, 6343-6360.
44. Majerská, M.; Jakubec, M.; Klimša, V.; Rimpelová, S.; Král, V.; Štěpánek, F., Microgel Bioreactors for Cancer Cell Targeting by pH-Dependent Generation of Radicals. *Molecular Pharmaceutics* **2019**, *16* (7), 3275-3283.
45. Aloj, L.; Attili, B.; Lau, D.; Caraco, C.; Lechermann, L. M.; Mendichovszky, I. A.; Harper, I.; Cheow, H.; Casey, R. T.; Sala, E.; Gilbert, F. J.; Gallagher, F. A., The emerging role of cell surface receptor and protein binding radiopharmaceuticals in cancer diagnostics and therapy. *Nuclear Medicine and Biology* **2021**, *92*, 53-64.
46. Shi, T.; Wang, M.; Li, H.; Wang, M.; Luo, X.; Huang, Y.; Wang, H.-H.; Nie, Z.; Yao, S., Simultaneous Monitoring of Cell-surface Receptor and Tumor-targeted Photodynamic Therapy via TdT-initiated Poly-G-Quadruplexes. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 5551.
47. Fernández, M.; Javid, F.; Chudasama, V., Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers. *Chem Sci* **2017**, *9* (4), 790-810.

48. Lee, M. Y.; Jeon, J. W.; Sievers, C.; Allen, C. T., Antigen processing and presentation in cancer immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **2020**, *8* (2), e001111.
49. Durgeau, A.; Virk, Y.; Corgnac, S.; Mami-Chouaib, F., Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* **2018**, *9*.
50. Wang, C.-H.; Weng, C.-H.; Che, Y.-J.; Wang, K.; Lee, G.-B., Cancer cell-specific oligopeptides selected by an integrated microfluidic system from a phage display library for ovarian cancer diagnosis. *Theranostics* **2015**, *5* (4), 431-442.
51. Long, X.; Wang, Z.; Xiao, S.; An, Y.; Yang, S., Transition metal based layered double hydroxides tailored for energy conversion and storage. *Materials Today* **2016**, *19* (4), 213-226.
52. Hobbs, C.; Jaskaniec, S.; McCarthy, E. K.; Downing, C.; Opelt, K.; Güth, K.; Shmeliov, A.; Mourad, M. C. D.; Mandel, K.; Nicolosi, V., Structural transformation of layered double hydroxides: an in situ TEM analysis. *npj 2D Materials and Applications* **2018**, *2* (1), 4.
53. Hobbs, C.; Downing, C.; Jaskaniec, S.; Nicolosi, V., TEM and EELS characterization of Ni-Fe layered double hydroxide decompositions caused by electron beam irradiation. *npj 2D Materials and Applications* **2021**, *5* (1), 29.
54. Gu, Z.; Atherton, J. J.; Xu, Z. P., Hierarchical layered double hydroxide nanocomposites: structure, synthesis and applications. *Chemical Communications* **2015**, *51* (15), 3024-3036.
55. Parello, M. L.; Rojas, R.; Giacomelli, C. E., Dissolution kinetics and mechanism of Mg-Al layered double hydroxides: a simple approach to describe drug release in acid media. *J Colloid Interface Sci* **2010**, *351* (1), 134-9.
56. Hibino, T., Anion Selectivity of Layered Double Hydroxides: Effects of Crystallinity and Charge Density. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2018**, *2018* (6), 722-730.
57. Mishra, G.; Dash, B.; Pandey, S., Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials. *Applied Clay Science* **2018**, *153*, 172-186.
58. Allou, N. g. B.; Saikia, P.; Borah, A.; Goswamee, R. L., Hybrid nanocomposites of layered double hydroxides: an update of their biological applications and future prospects. *Colloid and Polymer Science* **2017**, *295* (5), 22.
59. Mallakpour, S.; Hatami, M.; Hussain, C. M., Recent innovations in functionalized layered double hydroxides: Fabrication, characterization, and industrial applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **2020**, *283*, 102216.
60. Hibino, T., Delamination of Layered Double Hydroxides Containing Amino Acids. *Chemistry of Materials* **2004**, *16* (25), 5482-5488.
61. Hibino, T.; Kobayashi, M., Delamination of layered double hydroxides in water. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15* (6), 653-656.
62. Wang, J.; Bao, W.; Umar, A.; Wang, Q.; O'Hare, D.; Wan, Y., Delaminated Layered Double Hydroxide Nanosheets as an Efficient Vector for DNA Delivery. *Journal of biomedical nanotechnology* **2016**, *12* (5), 922-33.
63. Bao, W.; Wang, J.; Wang, Q.; O'Hare, D.; Wan, Y., Layered Double Hydroxide Nanotransporter for Molecule Delivery to Intact Plant Cells. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 26738.
64. Hou, W.; Kang, L.; Sun, R.; Liu, Z.-H., Exfoliation of layered double hydroxides by an electrostatic repulsion in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *312* (2), 92-98.
65. Li, Y.; Bao, W.; Wu, H.; Wang, J.; Zhang, Y.; Wan, Y.; Cao, D.; O'Hare, D.; Wang, Q., Delaminated layered double hydroxide delivers DNA molecules as sandwich nanostructure into cells via a non-endocytic pathway. *Science Bulletin* **2017**, *62* (10), 686-692.
66. Wang, Q.; O'Hare, D., Recent Advances in the Synthesis and Application of Layered Double Hydroxide (LDH) Nanosheets. *Chemical Reviews* **2012**, *112* (7), 4124-4155.
67. Mao, N.; Zhou, C. H.; Tong, D. S.; Yu, W. H.; Cynthia Lin, C. X., Exfoliation of layered double hydroxide solids into functional nanosheets. *Applied Clay Science* **2017**, *144*, 60-78.
68. Goldstein, J.; Newbury, D. E.; Joy, D. C.; Lyman, C. E.; Echlin, P.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J. R., *SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND X-RAY MICROANALYSIS: THIRD EDITION*. Springer: 2013.
69. Schärfl, W., *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2007.
70. Roduner, E., Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35* (7), 583-592.
71. Prasad, P. N., *Nanophotonics*. John Wiley and Sons: New York, 2004.
72. Pazoki, F.; Bagheri, S.; Shamsayei, M.; Nejad, M. J.; Heydari, A., BiPO₄ decorated with Ni-Fe layered double hydroxide as a highly efficient and reusable heterogeneous catalyst for aldol condensation in green solvent. *Materials Chemistry and Physics* **2020**, *253*, 123327.

73. Liu, Y. N.; Feng, J. T.; He, Y. F.; Sun, J. H.; Li, D. Q., Partial hydrogenation of acetylene over a NiTi-layered double hydroxide supported PdAg catalyst. *Catalysis Science & Technology* **2015**, *5* (2), 1231-1240.
74. Mantovani, K. M.; Molgero Westrup, K. C.; da Silva Junior, R. M.; Jaeger, S.; Wypych, F.; Nakagaki, S., Oxidation catalyst obtained by the immobilization of layered double hydroxide/Mn(III) porphyrin on monodispersed silica spheres. *Dalton Transactions* **2018**, *47* (9), 3068-3073.
75. Buffet, J.-C.; Turner, Z. R.; Cooper, R. T.; O'Hare, D., Ethylene polymerisation using solid catalysts based on layered double hydroxides. *Polymer Chemistry* **2015**, *6* (13), 2493-2503.
76. Fan, G.; Li, F.; G Evans, D.; Duan, X., *ChemInform Abstract: Catalytic Applications of Layered Double Hydroxides: Recent Advances and Perspectives*. 2014; Vol. 43.
77. Theiss, F. L.; Couperthwaite, S. J.; Ayoko, G. A.; Frost, R. L., A review of the removal of anions and oxyanions of the halogen elements from aqueous solution by layered double hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science* **2014**, *417*, 356-368.
78. Mostafa, M. S.; Bakr, A.-S. A.; El Nagggar, A. M. A.; Sultan, E.-S. A., Water decontamination via the removal of Pb (II) using a new generation of highly energetic surface nano-material: Co+2Mo+6 LDH. *Journal of Colloid and Interface Science* **2016**, *461* (Supplement C), 261-272.
79. Cao, L.; Guo, J.; Tian, J.; Xu, Y.; Hu, M.; Wang, M.; Fan, J., Preparation of Ca/Al-Layered Double Hydroxide and the influence of their structure on early strength of cement. *Construction and Building Materials* **2018**, *184*, 203-214.
80. Xu, S. L.; Chen, Z.; Zhang, B.; Yu, J.; Zhang, F. Z.; Evans, D. G., Facile preparation of pure CaAl-layered double hydroxides and their application as a hardening accelerator in concrete. *Chemical Engineering Journal* **2009**, *155*, 881-885.
81. Matusinovic, Z.; Feng, J.; Wilkie, C. A., The role of dispersion of LDH in fire retardancy: The effect of different divalent metals in benzoic acid modified LDH on dispersion and fire retardant properties of polystyrene- and poly(methyl-methacrylate)-LDH-B nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability* **2013**, *98* (8), 1515-1525.
82. Zhu, K.; Wang, Y.; Tang, D.; Wang, Q.; Li, H.; Huang, Y.; Huang, Z.; Wu, K., Flame-Retardant Mechanism of Layered Double Hydroxides in Asphalt Binder. *Materials (Basel)* **2019**, *12* (5), 801.
83. Leroux, F.; Belkacen, M. B.; Guyot, G.; Taviot-Guého, C.; Léone, P.; Cario, L.; Desigaux, L.; Pitard, B., LDH-DNA Nanohybrids: a complete biophysical characterization. *MRS Proceedings* **2011**, *847*.
84. Balcomb, B.; Singh, M.; Singh, S., Synthesis and Characterization of Layered Double Hydroxides and Their Potential as Nonviral Gene Delivery Vehicles. *ChemistryOpen* **2015**, *4* (2), 137-145.
85. Wen, J.; Yang, K.; Huang, J.; Sun, S., Recent advances in LDH-based nanosystems for cancer therapy. *Materials & Design* **2021**, *198*, 109298.
86. Luengo, C. V.; Crescitelli, M. C.; Lopez, N. A.; Avena, M. J., Synthesis of Layered Double Hydroxides Intercalated With Drugs for Controlled Release: Successful Intercalation of Ibuprofen and Failed Intercalation of Paracetamol. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, *110* (4), 1779-1787.
87. Chakraborty, M.; Ray, S.; Saha, S.; Ghosh, J.; Ghosh, S.; Mitra, M. K.; Chakraborty, J., Methotrexate Intercalated CaAl Layered Double Hydroxide Nanohybrid for Drug Delivery. *Advanced Science, Engineering and Medicine* **2016**, *8* (6), 450-459.
88. Káfuňková, E.; Taviot-Guého, C.; Bezdička, P.; Klementová, M.; Kovář, P.; Kubát, P.; Mosinger, J.; Pospíšil, M.; Lang, K., Porphyrins Intercalated in Zn/Al and Mg/Al Layered Double Hydroxides: Properties and Structural Arrangement. *Chemistry of Materials* **2010**, *22* (8), 2481-2490.
89. Nakagaki, S.; Castro, K.; Ucoski, G.; Halma, M.; Prevot, V.; Forano, C.; Wypych, F., Anionic Iron(III) Porphyrin Immobilized on/into Exfoliated Macroporous Layered Double Hydroxides as Catalyst for Oxidation Reactions. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2014**, *25*.
90. Tavares, S. R.; Carvalho, C.; Mantovani, K. M.; Wypych, F.; Nakagaki, S.; Leitão, A. A., Adsorption of an iron(III)porphyrin onto a 2:1 Zn/Al-CO₃ layered double hydroxide and its use as an oxidation catalyst with different counter ions: An experimental and DFT study. *Applied Clay Science* **2020**, *185*, 105410.
91. Hu, H.; Gatti, R. A., New approaches to treatment of primary immunodeficiencies: fixing mutations with chemicals. *Current opinion in allergy and clinical immunology* **2008**, *8* (6), 540-546.
92. Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, P.; Greenblatt, J. J.; Rosenberg, S. A.; Klein, H.; Berger, M.; Mullen, C. A.; Ramsey, W. J.; Muul, L.; Morgan, R. A.; Anderson, W. F., T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA⁻ SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* **1995**, *270* (5235), 475-480.

93. Bordignon, C.; Notarangelo, L. D.; Nobili, N.; Ferrari, G.; Casorati, G.; Panina, P.; Mazzolari, E.; Maggioni, D.; Rossi, C.; Servida, P.; Ugazio, A. G.; Mavilio, F., Gene Therapy in Peripheral Blood Lymphocytes and Bone Marrow for ADA^[−] Immunodeficient Patients. *Science* **1995**, *270* (5235), 470-475.
94. Bulaklak, K.; Gersbach, C. A., The once and future gene therapy. *Nature Communications* **2020**, *11* (1), 5820.
95. Papanikolaou, E.; Bosio, A., The Promise and the Hope of Gene Therapy. *Frontiers in Genome Editing* **2021**, *3*.
96. Cavazza, A.; Moiani, A.; Mavilio, F., Mechanisms of retroviral integration and mutagenesis. *Human gene therapy* **2013**, *24* (2), 119-31.
97. Meekings, K. N.; Williams, C. S.; Arrowsmith, J. E., Orphan drug development: an economically viable strategy for biopharma R&D. *Drug Discov Today* **2012**, *17* (13-14), 660-4.
98. Sung, Y. K.; Kim, S. W., Recent advances in the development of gene delivery systems. *Biomaterials Research* **2019**, *23* (1), 8.
99. Balazs, D. A.; Godbey, W., Liposomes for Use in Gene Delivery. *Journal of Drug Delivery* **2011**, *2011*.
100. Blankenstein, T.; Leisegang, M.; Uckert, W.; Schreiber, H., Targeting cancer-specific mutations by T cell receptor gene therapy. *Current opinion in immunology* **2015**, *33*, 112-9.
101. Kouprina, N.; Earnshaw, W. C.; Masumoto, H.; Larionov, V., A new generation of human artificial chromosomes for functional genomics and gene therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2013**, *70* (7), 1135-1148.
102. Zittersteijn, H. A.; Gonçalves, M. A. F. V.; Hoeben, R. C., A primer to gene therapy: Progress, prospects, and problems. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **2021**, *44* (1), 54-71.
103. Guan, S.; Rosenecker, J., Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems. *Gene Ther* **2017**, *24* (3), 133-143.
104. Milla, P.; Dosio, F.; Cattel, L., PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Current drug metabolism* **2012**, *13* (1), 105-19.
105. Newby, G. A.; Yen, J. S.; Woodard, K. J.; Mayuranathan, T.; Lazzarotto, C. R.; Li, Y.; Sheppard-Tillman, H.; Porter, S. N.; Yao, Y.; Mayberry, K.; Everette, K. A.; Jang, Y.; Podracky, C. J.; Thaman, E.; Lechauve, C.; Sharma, A.; Henderson, J. M.; Richter, M. F.; Zhao, K. T.; Miller, S. M.; Wang, T.; Koblan, L. W.; McCaffrey, A. P.; Tisdale, J. F.; Kalfa, T. A.; Pruetz-Miller, S. M.; Tsai, S. Q.; Weiss, M. J.; Liu, D. R., Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice. *Nature* **2021**, *595* (7866), 295-302.
106. Ribeil, J.-A.; Hacein-Bey-Abina, S.; Payen, E.; Magnani, A.; Semeraro, M.; Magrin, E.; Caccavelli, L.; Neven, B.; Bourget, P.; El Nemer, W.; Bartolucci, P.; Weber, L.; Puy, H.; Meritet, J.-F.; Grevent, D.; Beuzard, Y.; Chrétien, S.; Lefebvre, T.; Ross, R. W.; Negre, O.; Veres, G.; Sandler, L.; Soni, S.; de Montalembert, M.; Blanche, S.; Leboulch, P.; Cavazzana, M., Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine* **2017**, *376* (9), 848-855.
107. Southwell, A. L.; Patterson, P. H., Gene Therapy in Mouse Models of Huntington Disease. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **2011**, *17* (2), 153-162.
108. Ji, W.; Sun, B.; Su, C., Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy. *Genes* **2017**, *8* (1), 21.
109. Clark, I.; Dunne, P. W.; Gomes, R. L.; Lester, E., Continuous hydrothermal synthesis of Ca₂Al-NO₃ layered double hydroxides: The impact of reactor temperature, pressure and NaOH concentration on crystal characteristics. *Journal of Colloid and Interface Science* **2017**, *504*, 492-499.
110. Shigeo, M., THE SYNTHESSES OF HYDROTALCITE-LIKE COMPOUNDS AND THEIR STRUCTURES AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES *Clays and Clay Minerals* **1975**, *23*, 369-375.
111. Liang, D.; Yue, W.; Sun, G.; Zheng, D.; Ooi, K.; Yang, X., Direct Synthesis of Unilamellar MgAl-LDH Nanosheets and Stacking in Aqueous Solution. *Langmuir* **2015**, *31* (45), 12464-12471.
112. Chakraborty, M.; Dasgupta, S.; Sengupta, S.; Chakraborty, J.; Ghosh, S.; Ghosh, J.; Mitra, M. K.; Mishra, A.; Mandal, T. K.; Basu, D., A facile synthetic strategy for Mg–Al layered double hydroxide material as nanocarrier for methotrexate. *Ceramics International* **2012**, *38* (2), 941-949.
113. Gao, X.; Lei, L.; O'Hare, D.; Xie, J.; Gao, P.; Chang, T., Intercalation and controlled release properties of vitamin C intercalated layered double hydroxide. *Journal of Solid State Chemistry* **2013**, *203*, 174-180.
114. Bao, W.; Wang, J.; Wang, Q.; O'Hare, D.; Wan, Y., Layered Double Hydroxide Nanotransporter for Molecule Delivery to Intact Plant Cells. *Sci Rep* **2016**, *6*, 26738-26738.
115. Yu, J.; Wang, Q.; O'Hare, D.; Sun, L., Preparation of two dimensional layered double hydroxide nanosheets and their applications. *Chemical Society Reviews* **2017**, *46* (19), 5950-5974.

116. Liu, Z.; Ma, R.; Osada, M.; Iyi, N.; Ebina, Y.; Takada, K.; Sasaki, T., Synthesis, Anion Exchange, and Delamination of Co–Al Layered Double Hydroxide: Assembly of the Exfoliated Nanosheet/Polyanion Composite Films and Magneto-Optical Studies. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (14), 4872-4880.
117. Wu, X.; Wang, S.; Du, N.; Zhang, R.; Hou, W., Facile synthesis of deoxycholate intercalated layered double hydroxide nanohybrids via a coassembly process. *Journal of Solid State Chemistry* **2013**, *203*, 181-186.
118. Huang, G.; Ma, S.; Zhao, X.; Yang, X.; Ooi, K., Topotactic intercalation of a bulky organic anion (thiacalix[4]arene) into LDH through an osmotic swelling/restoration reaction in formamide. *Chemical Communications* **2009**, (3), 331-333.
119. Wu, Q.; Olafsen, A.; Vistad, Ø. B.; Roots, J.; Norby, P., Delamination and restacking of a layered double hydroxide with nitrate as counter anion. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15* (44), 4695-4700.
120. Kura, A. U.; Hussein, M. Z.; Fakurazi, S.; Arulsevan, P., Layered double hydroxide nanocomposite for drug delivery systems; bio-distribution, toxicity and drug activity enhancement. *Chemistry Central Journal* **2014**, *8* (1), 47.
121. Wang, J.; Zhang, W.; Hao, L.; Sun, J.; Zhang, W.; Guo, C.; Mu, Y.; Ji, W.; Yu, C.; Yuan, F., Amino acid–intercalated layered double hydroxide core @ ordered porous silica shell as drug carriers: Design and applications. *Journal of Materials Research* **2019**, *34* (22), 3747-3756.
122. Whilton, N. T.; Vickers, P. J.; Mann, S., Bioinorganic clays: synthesis and characterization of amino- and polyamino acid intercalated layered double hydroxides. *Journal of Materials Chemistry* **1997**, *7*, 1623-1629.
123. Yuan, Q.; Wei, M.; Wang, Z.; Wang, G.; Duan, X., Preparation and Characterization of L-Aspartic Acid-Intercalated Layered Double Hydroxide. *Clays and Clay Minerals* **2004**, *52* (1), 40-46.
124. Chen, J.; Fang, L.; Wu, F.; Xie, J.; Hu, J.; Jiang, B.; Luo, H., Corrosion resistance of a self-healing rose-like MgAl-LDH coating intercalated with aspartic acid on AZ31 Mg alloy. *Progress in Organic Coatings* **2019**, *136*, 105234.
125. Nakayama, H.; Wada, N.; Tshuhako, M., Intercalation of amino acids and peptides into Mg–Al layered double hydroxide by reconstruction method. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *269* (2), 469-478.
126. Choi, G.; Yang, J.-H.; Park, G.-Y.; Vinu, A.; Elzatahry, A.; Yo, C. H.; Choy, J.-H., Intercalative Ion-Exchange Route to Amino Acid Layered Double Hydroxide Nanohybrids and Their Sorption Properties. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2015**, *2015* (6), 925-930.
127. Wang, Y.; Wu, P.; Hou, Y.; Zhu, N.; Dang, Z., Intercalation of l-Alanyl-Glutamine Dipeptide into Layered Double Hydroxides: Configuration Stabilization in Confined Interlayer Region. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2012**, *51* (34), 11128-11136.
128. Wang, P.; Yin, L.; Wang, X.; Zhao, G.; Yu, S.; Song, G.; Xie, J.; Alsaedi, A.; Hayat, T.; Wang, X., l-cysteine intercalated layered double hydroxide for highly efficient capture of U(VI) from aqueous solutions. *Journal of Environmental Management* **2018**, *217*, 468-477.
129. Zhang, H.; Li, G.; Deng, L.; Zeng, H.; Shi, Z., Heterogeneous activation of hydrogen peroxide by cysteine intercalated layered double hydroxide for degradation of organic pollutants: Performance and mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science* **2019**, *543*, 183-191.
130. Chen, Y.; Wang, X.; Luo, S.; Bao, Y., Synthesis of new Tb-doped Zn-Al LDH/tryptophan hybrids and their fluorescent property. *Journal of Rare Earths* **2016**, *34* (11), 1095-1102.
131. Aisawa, S.; Takahashi, S.; Ogasawara, W.; Umetsu, Y.; Narita, E., Direct Intercalation of Amino Acids into Layered Double Hydroxides by Coprecipitation. *Journal of Solid State Chemistry* **2001**, *162* (1), 52-62.
132. Wei, M.; Yuan, Q.; Evans, D. G.; Wang, Z.; Duan, X., Layered solids as a “molecular container” for pharmaceutical agents: l-tyrosine-intercalated layered double hydroxides. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15* (11), 1197-1203.
133. Andrea, K. A.; Wang, L.; Carrier, A. J.; Campbell, M.; Buhariwalla, M.; Mutch, M.; MacQuarrie, S. L.; Bennett, C.; Mkandawire, M.; Oakes, K.; Lu, M.; Zhang, X., Adsorption of Oligo-DNA on Magnesium Aluminum-Layered Double-Hydroxide Nanoparticle Surfaces: Mechanistic Implication in Gene Delivery. *Langmuir* **2017**, *33* (16), 3926-3933.
134. Chen, L.; Sun, K.; Li, P.; Fan, X.; Sun, J.; Ai, S., DNA-enhanced peroxidase-like activity of layered double hydroxide nanosheets and applications in H₂O₂ and glucose sensing. *Nanoscale* **2013**, *5* (22), 10982-10988.

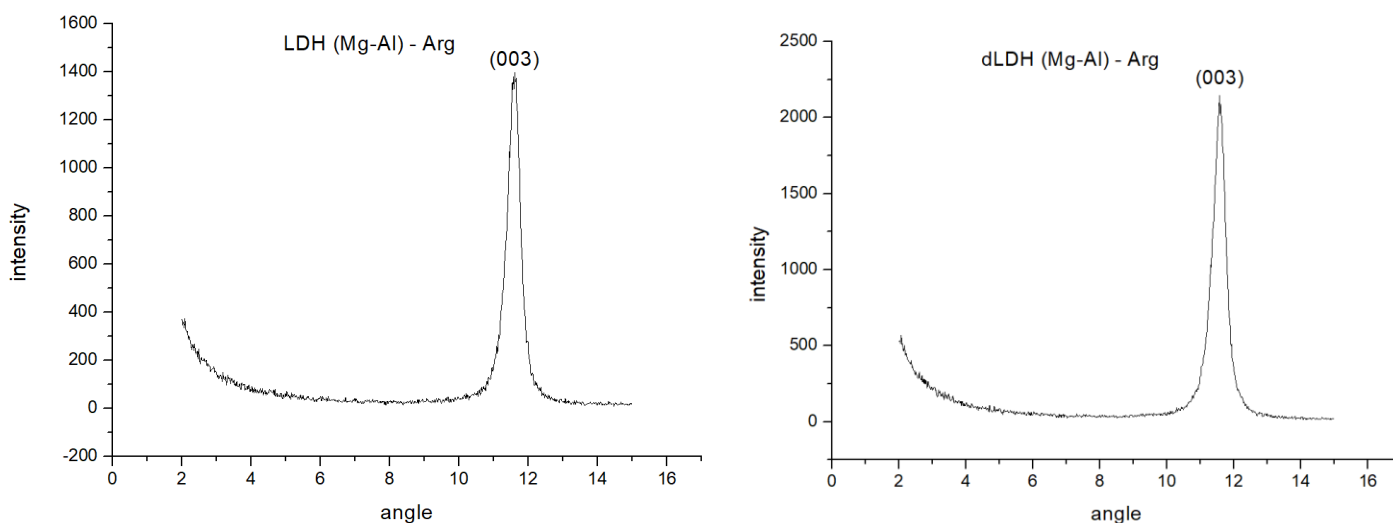
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Arg:

Το XRD του LDH (Mg-Al)-Arg (εικόνα Π.1) δείχνει διαστρωματική απόσταση 7,61 Å ίση δηλαδή με την απόσταση που έχουν διαδοχικά στρώματα LDH όταν έχουν παγιδευτεί ανθρακικά ανιόντα. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο, καθώς αν και το αμινοξύ έχει αρνητικό φορτίο, υπάρχει και ένα εξίσου ισχυρό θετικό φορτίο στο άλλο άκρο, που απωθεί τα στρώματα και κάνει την εισαγωγή του σχεδόν αδύνατη.

Αν και η αντίδραση έγινε σε συνθήκες που το αμινοξύ θα ήταν μόνο αρνητικά φορτισμένο, οι εκπλύσεις έγιναν με νερό ουδέτερου pH το οποίο πιθανόν να επηρέασε την εγκλωβισμένη ουσία.

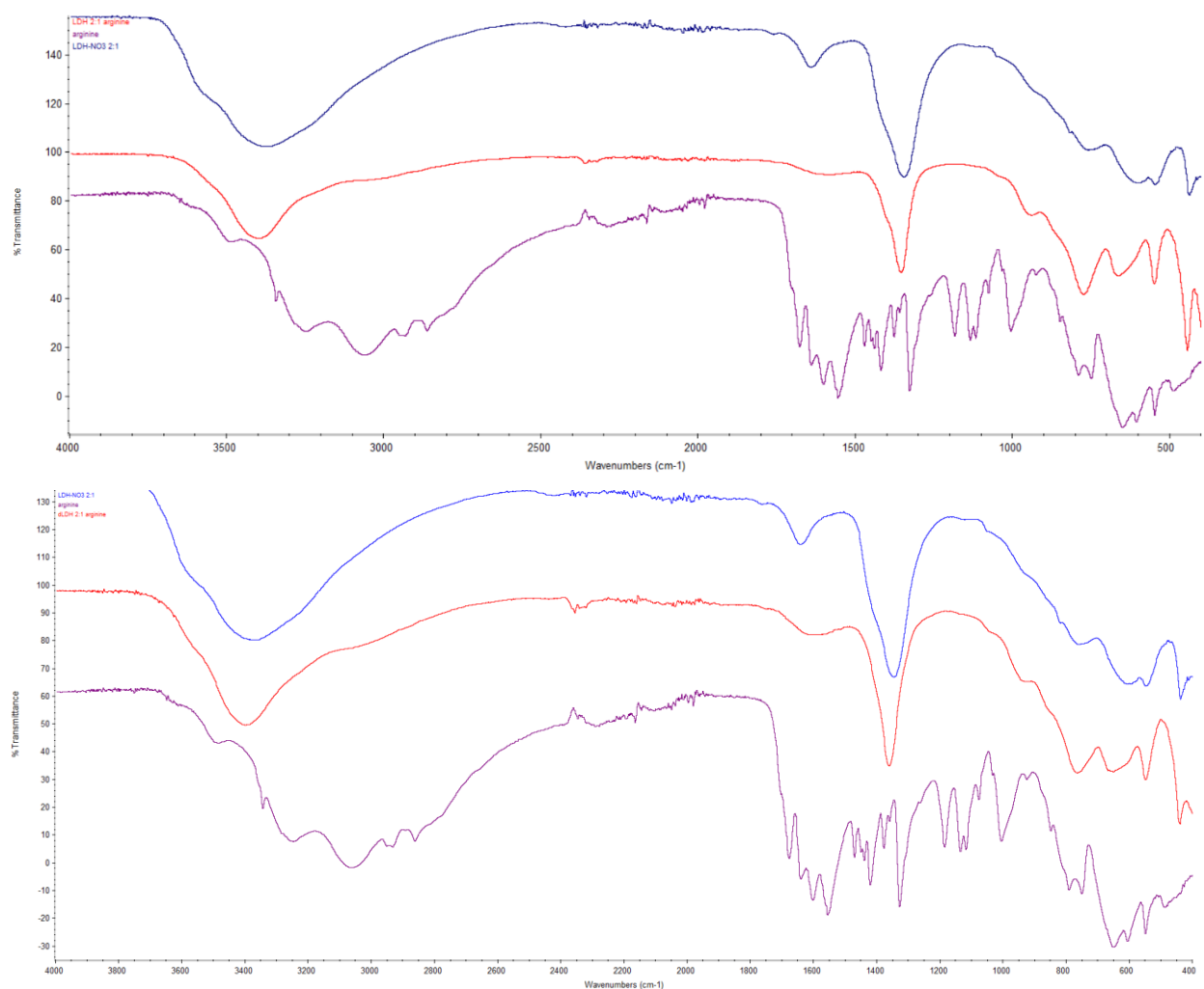
Το διάγραμμα του dLDH (Mg-Al)-Arg έδειξε παρόμοια αποτελέσματα για τη σύνθεση, δείχνοντας διαστρωματική απόσταση ίση με 7,63 Å.



Εικόνα Π.1. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X των LDH (Mg-Al)-Arg και dLDH (Mg-Al)-Arg.

Τα φάσματα υπερέθρου για τα νανοϋβρίδια (εικόνα Π.2 επαληθεύουν την παραπάνω υπόθεση πως οι συνθέσεις δεν πέτυχαν. Και στις δύο περιπτώσεις εμφανίζονται μόνο οι κορυφές των υδροξυλίων (3409 cm^{-1}) και των δεσμών μετάλλων

στους $500-800\text{ cm}^{-1}$. Δεν εμφανίζεται κάποια νεότερη κορυφή που να δηλώνει την παγίδευση ενός νέου ανιόντος.

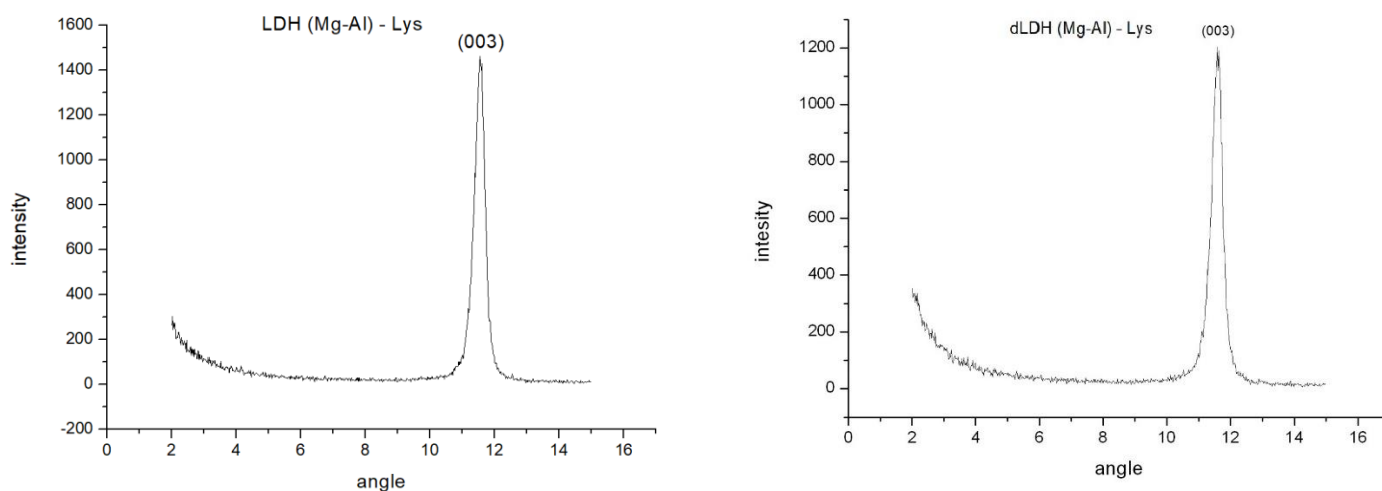


Εικόνα Π.2. Φάσματα υπερύθρου των LDH (Mg-Al)-Arg και dLDH (Mg-Al)-Arg.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Lys:

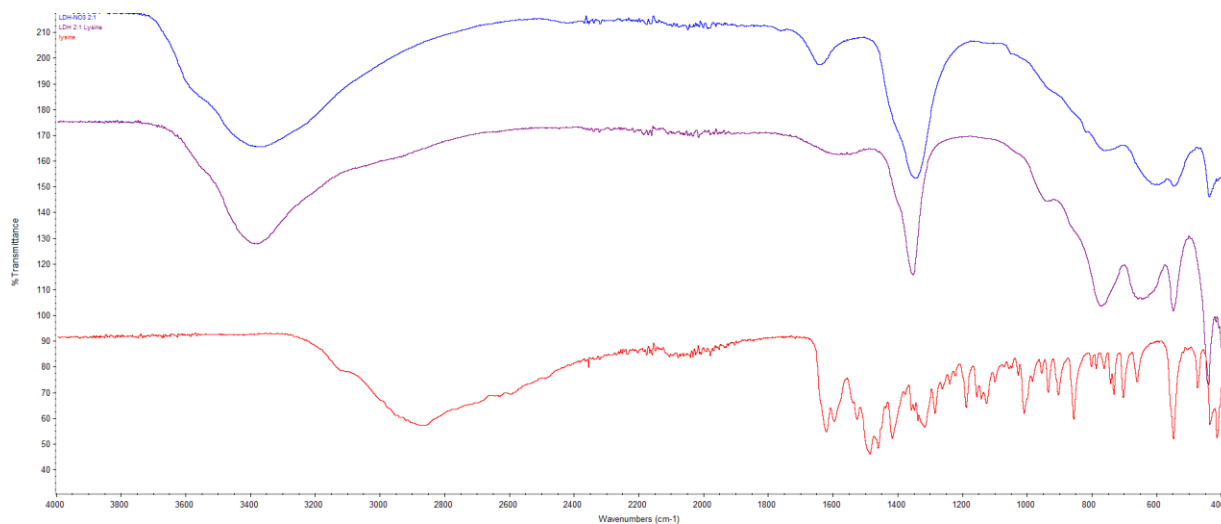
Παρόμοια με το προηγούμενο διάγραμμα, το XRD του LDH (Mg-Al)-Lys (εικόνα Π.3) δίνει διαστρωματική απόσταση που δηλώνει πιο πιθανή την παγίδευση ανθρακικών ανιόντων ($7,65\text{ \AA}$). Η ομοιότητα στη χαρακτηριστική ομάδα της λυσίνης και του αργινικού δικαιολογεί και παρόμοια συμπεριφορά κατά την ανιονανταλλαγή. Η σύνθεση με

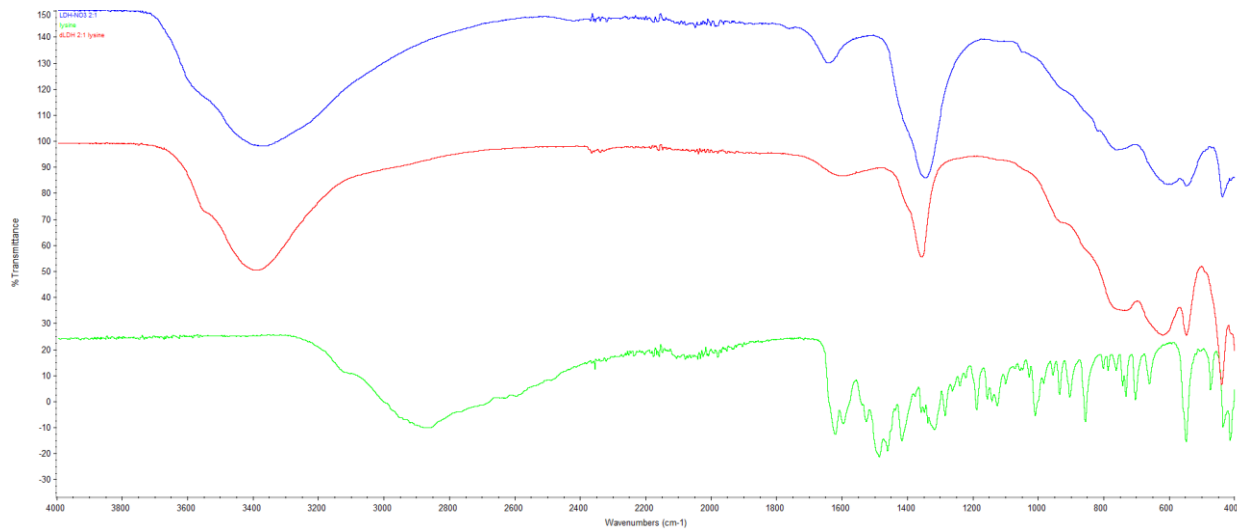
επαναστοίβαξη δίνει παρόμοια αποτελέσματα με διαστρωματική απόσταση ίση με 7.72 Å.



Εικόνα Π.3. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Lys και dLDH (Mg-Al)-Lys.

Από τα φάσματα υπερέθρου, που εμφανίζονται στην εικόνα Π.4, μπορούμε να δούμε ότι και στις δύο συνθέσεις η κύρια κορυφή είναι στους 1350 cm^{-1} , δείχνοντας πως στο εσωτερικό των φύλλων υπάρχουν παγιδευμένα ανθρακικά ανιόντα. Τα φάσματα είναι σχεδόν πανομοιότυπα με αυτό του αρχικού LDH-NO₃ δείχνοντας πως το αμινοξύ δεν έχει εισαχθεί.

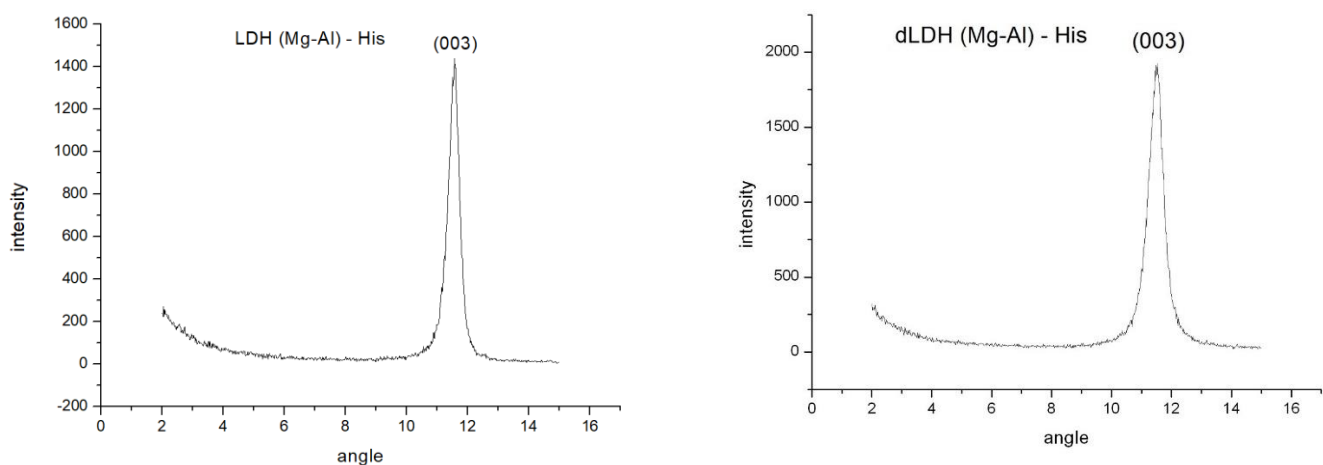




Εικόνα Π.4. Φάσματα υπερώθρου των LDH (Mg-Al)-Lys και dLDH (Mg-Al)-Lys.

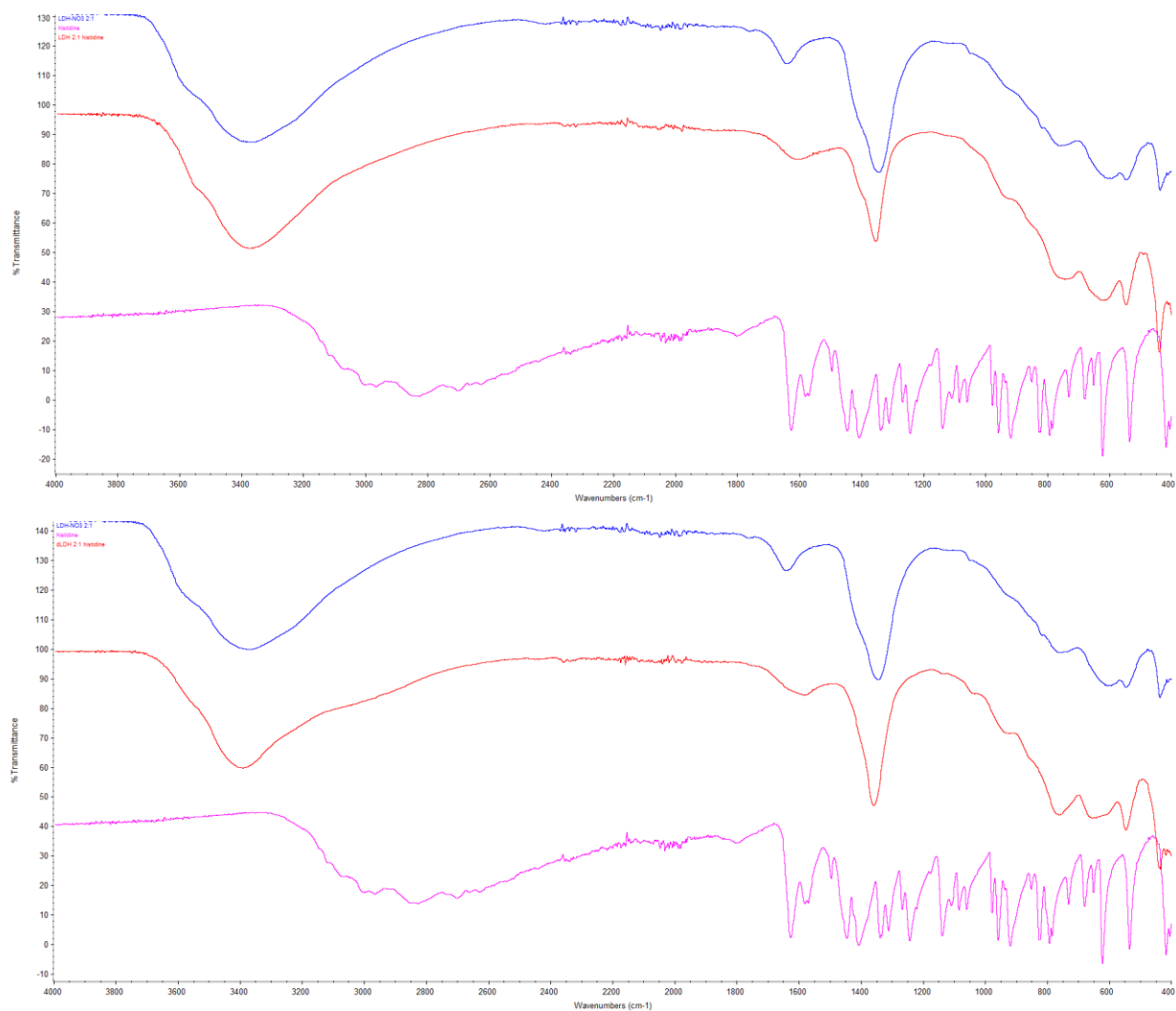
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-His:

Παρόμοια με τα υπόλοιπα θετικά φορτισμένα αμινοξέα (σε ουδέτερο pH) τα XRD της ισιδίνης (εικόνα Π.5) δηλώνουν την ύπαρξη ανθρακικών ανιόντων ($7,62 \text{ \AA} / 7,60 \text{ \AA}$). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία, που δηλώνει απόσταση $17,5 \text{ \AA}$ αλλά σε LDH (Mg-Al) 3:1. Εφόσον η μήτρα που εξετάζεται σε αυτά τα πειράματα έχει αναλογία 2:1, διαφορές στα ιόντα που μπορούν να παγιδευτούν είναι αναμενόμενες.



Εικόνα Π.5. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-His και dLDH (Mg-Al)-His.

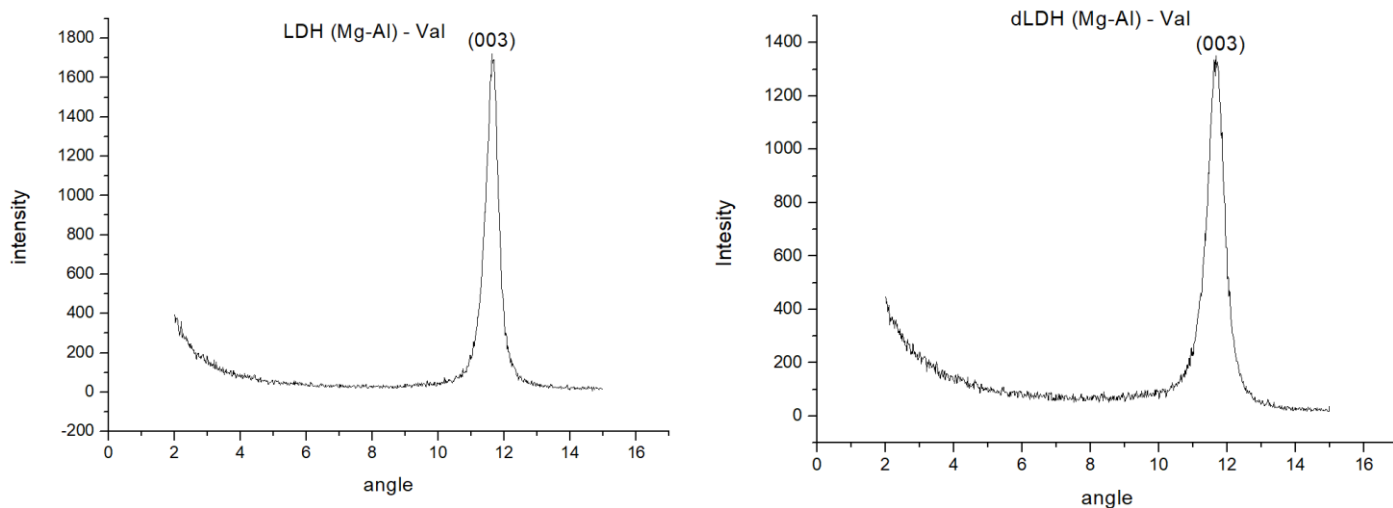
Η ευρεία κορυφή που εμφανίζεται στη εικόνα Π.6 στους 3413 cm^{-1} που δηλώνει την ύπαρξη υδροξυλίου συνδεδεμένου με μέταλλο. Οι κορυφές ανάμεσα στους $500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ δείχνουν την παρουσία φύλλων LDH και παραμένουν ίδιες και στους δύο τύπους LDH. Η κορυφή στους 1360 cm^{-1} ανήκει στο παγιδευμένο ανάμεσα στα φύλλα ανιόν το οποίο είναι ανθρακικά ανιόντα. Τα φάσματα συμφωνούν με τα διαγράμματα XRD των συνθέσεων πως δεν έχουν πετύχει στην παγίδευση αμινοξέων.



Εικόνα Π.6. Φάσματα υπεράυθρου των LDH (Mg-Al)-His και dLDH (Mg-Al)-His.

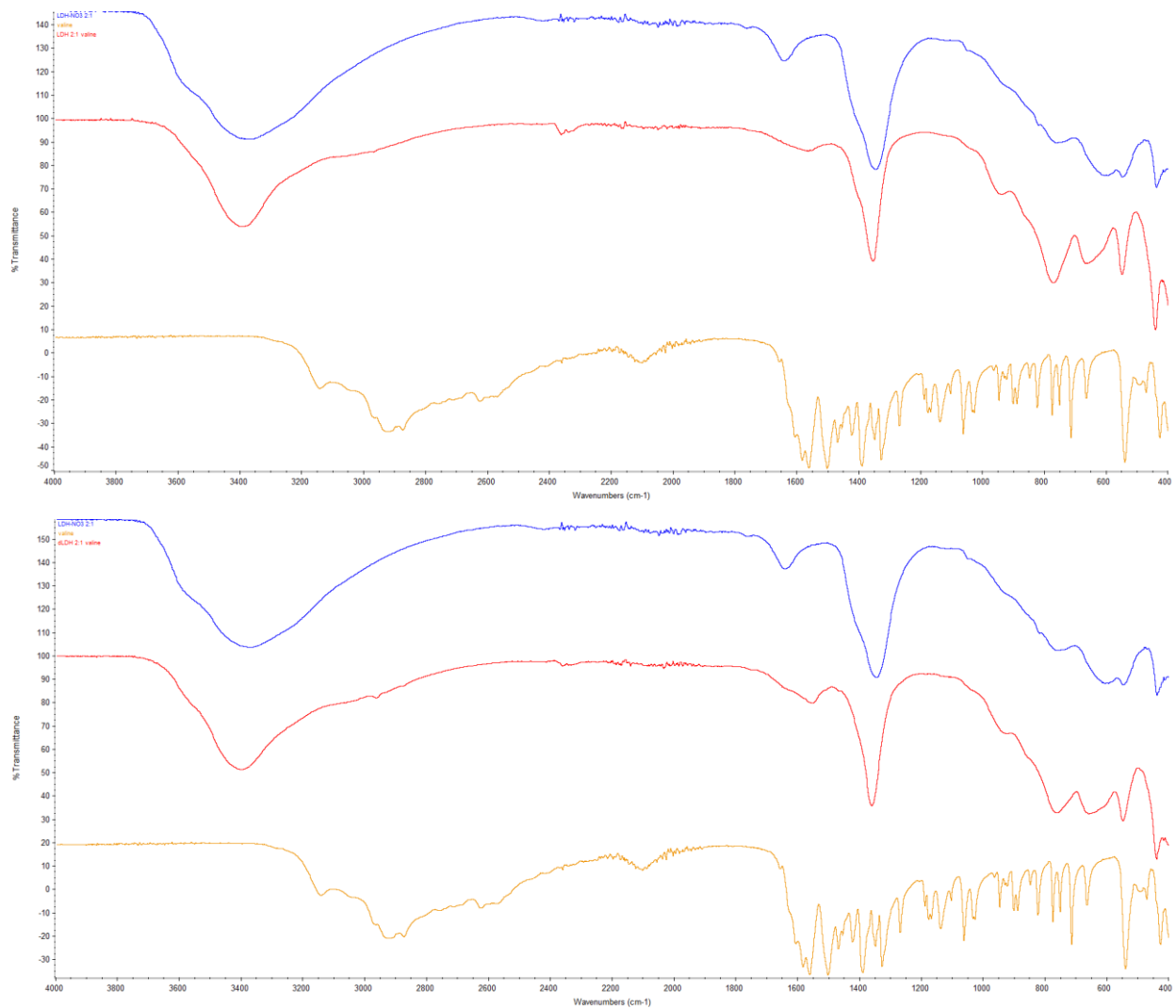
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Val:

Στο διάγραμμα XRD της εικόνας Π.7 εμφανίζεται πως η διαστρωματική απόσταση είναι ίση με 7,69 Å. Παρομοίως στη σύνθεση με επανστοίβαξη η διαστρωματική απόσταση υπολογίζεται στα 7,67 Å. Η μελέτη για την πιθανότητα επιφανειακής συναρμογής της ουσίας εξετάζεται στα φάσματα υπερύθρου.



Εικόνα Π.7. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Val και dLDH (Mg-Al)-Val.

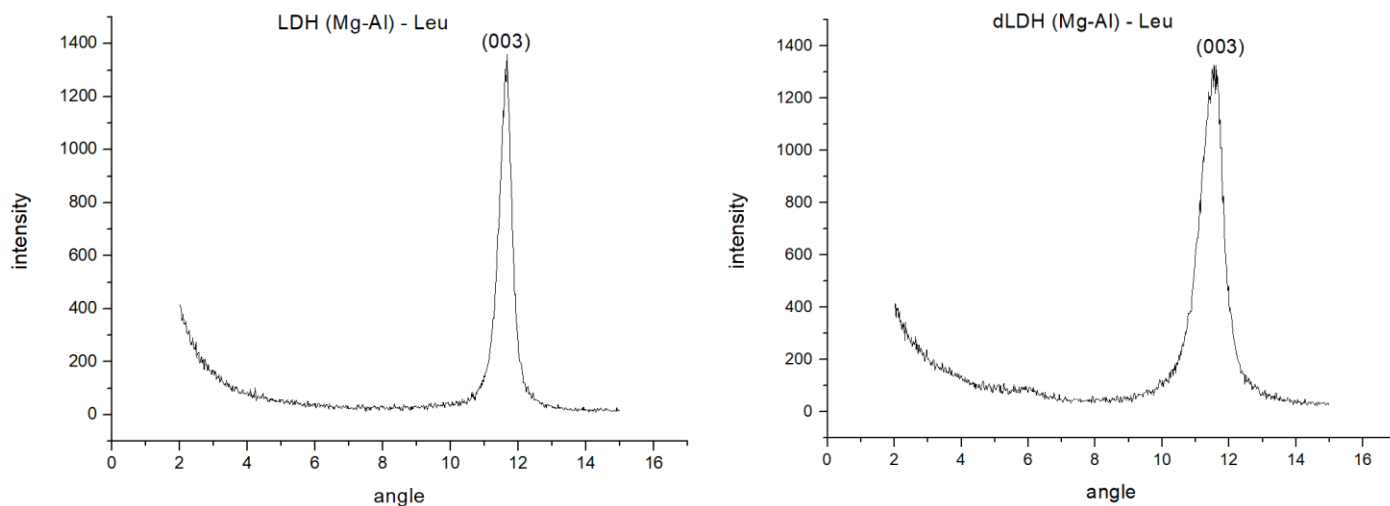
Τα φάσματα υπερύθρου (εικόνα Π.8) δείχνουν πως δεν υπάρχει η παρουσία του επιθυμητού αμινοξέος στο δείγμα. Οι κορυφές που κυριαρχούν στα φάσματα είναι αυτές που εμφανίζονται και στο απλό LDH-NO₃, δείχνοντας πως η κορυφή των διαγραμμάτων XRD ανήκει σε ανθρακικά ανιόντα.



Εικόνα Π.8. Φάσματα υπερέυθρου των LDH (Mg-Al)-Val και dLDH (Mg-Al)-Val.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Leu:

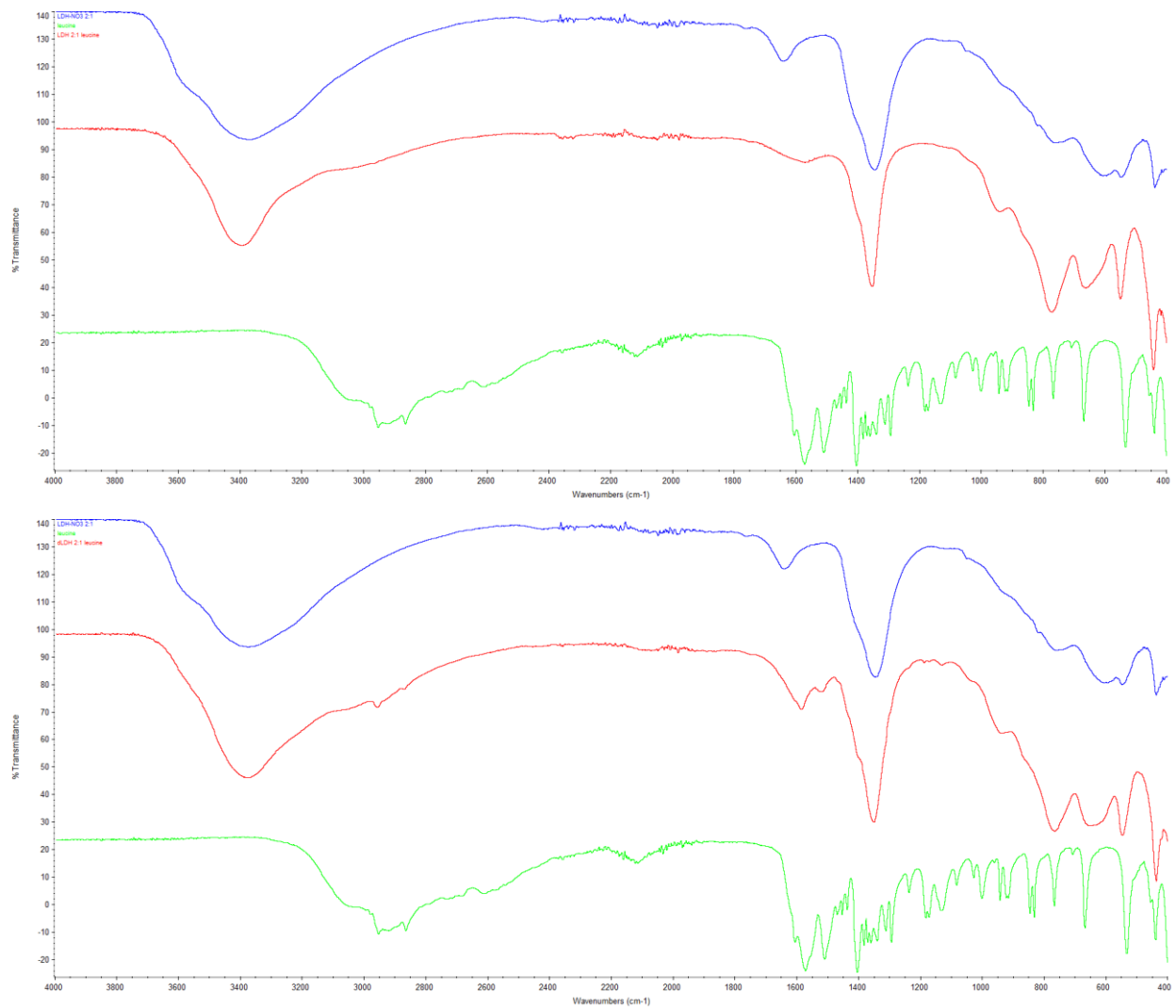
Η διαστρωματική απόσταση που δίνεται για το LDH (Mg-Al)-Leu είναι 7,64 Å (εικόνα Π.9). Παρόμοια κύρια διαστρωματική απόσταση εμφανίζει και το dLDH (Mg-Al)-Leu. Σε αυτό το διάγραμμα υπάρχει και μια πολύ μικρή καμπύλη στις 6.05° η οποία αντιστοιχεί σε απόσταση 14.59 Å και συμφωνεί με αναφορές τις βιβλιογραφίας για την παρουσία λευκίνης¹²⁵. Παρόλα αυτά η καμπύλη είναι πολύ χαμηλής έντασης και σχεδόν χάνεται στο θόρυβο. Η διαλεύκανση της καμπύλης γίνεται με τη μελέτη του φάσματος υπερέυθρου.



Εικόνα Π.9. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Leu και dLDH (Mg-Al)-Leu.

Αν και το φάσμα του LDH (Mg-Al)-Leu, όπως εμφανίζεται στην εικόνα Π.10 δεν έχει ουσιαστική διαφορά με αυτό του αρχικού LDH, το LDH που συντέθηκε με επαναστοίβαξη εμφανίζει νέες κορυφές. Στους 2957 cm^{-1} εμφανίζεται μια μικρής έντασης κορυφή που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του N-H. Στους 1585 cm^{-1} και 1519 cm^{-1} εμφανίζονται η ασύμμετρη και η συμμετρική δόνηση τάσης του -COO^- αντίστοιχα. Ταυτόχρονα αν και ελάχιστης έντασης στους 1100 cm^{-1} με 1200 cm^{-1} εμφανίζονται κορυφές που ανήκουν στις δονήσεις C-C, C-N και C-O. Η ύπαρξη αυτών των δονήσεων δηλώνει και την ύπαρξη αμινοξέος στο δείγμα.

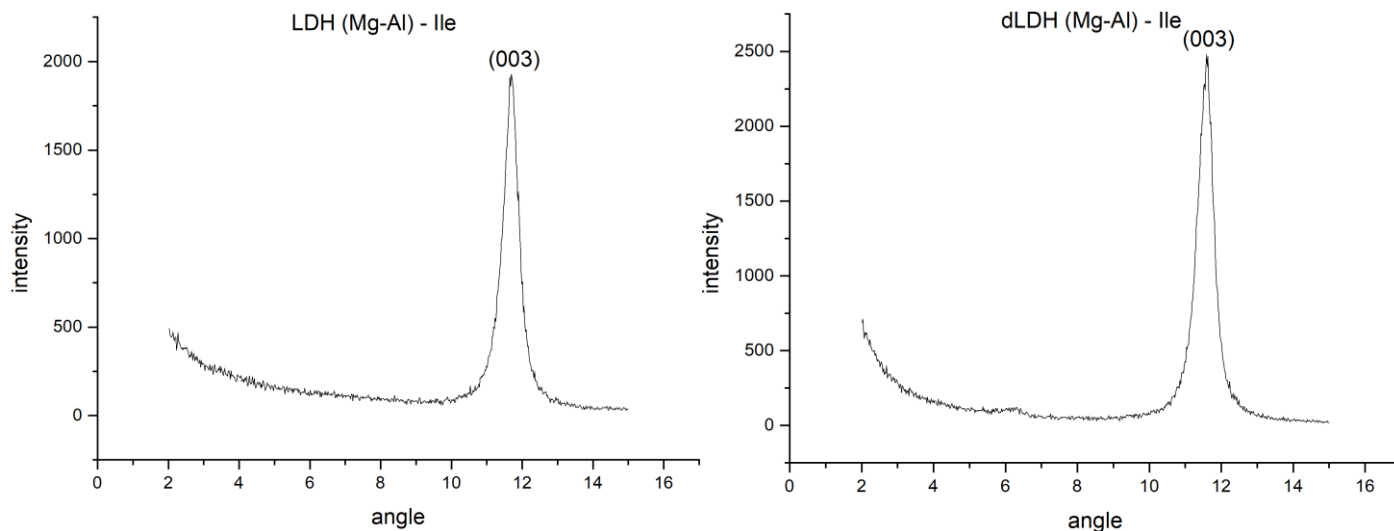
Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα με το παραπάνω διάγραμμα XRD του dLDH (Mg-Al)-Leu μπορούμε να συμπεράνουμε πως ανάμεσα στα στρώματα υπάρχει λευκίνη αν και σε πολύ μικρές ποσότητες.



Εικόνα Π.10. Φάσματα υπερέυθρου των LDH (Mg-Al)-Leu και dLDH (Mg-Al)-Leu.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Ile:

Οι συνθέσεις με ισολευκίνη εμφανίζουν πανομοιότυπα αποτελέσματα με αυτές της λευκίνης. Πιο συγκεκριμένα και τα δύο διαγράμματα (εικόνα Π.11) δείχνουν κύριες κορυφές που αντιστοιχούν σε αποστάσεις ενδεικτικές για παγιδευμένα ανθρακικά ανιόντα. Ταυτόχρονα μια μικρή καμπύλη που δείχνει μεγαλύτερη διαστρωματική απόσταση εμφανίζεται στο διάγραμμα της σύνθεσης με επαναστοίβαξη. Η καμπύλη δίνει απόσταση ίση με 13.99 Å και αν και χαμηλής έντασης θα μπορούσε να δηλώνει την ύπαρξη ισολευκίνης στο εσωτερικό των στρωμάτων.

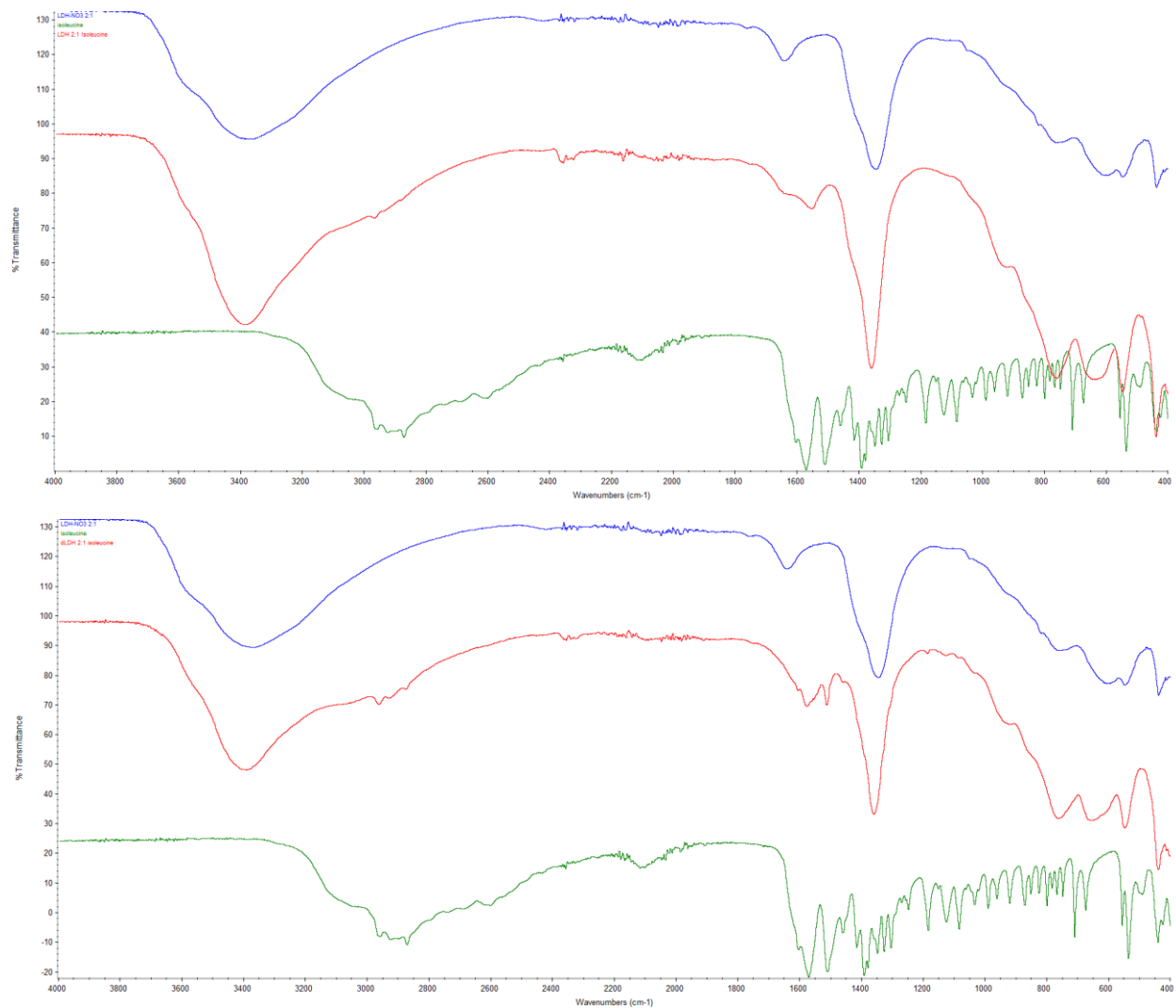


Εικόνα Π.11. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Ile και dLDH (Mg-Al)-Ile.

Η ανάλυση των φασμάτων της εικόνας Π.12 δίνει παρόμοια αποτελέσματα με τις συνθέσεις λευκίνης. Αυτή τη φορά μερικές χαμηλής έντασης κορυφές εμφανίζονται στο φάσμα του LDH (Mg-Al)-Ile, αλλά είναι λίγες και δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με σιγουριά.

Αντίθετα στο φάσμα του dLDH (Mg-Al)-Ile εμφανίζονται πολλές κορυφές που ανήκουν σε αμινοξέα. Πιο συγκεκριμένα στους 2967 cm^{-1} εμφανίζεται η δόνηση τάσης του N-H. Ακριβώς μετά, οι κορυφές στους 2925 cm^{-1} και 2878 cm^{-1} οφείλονται στις δονήσεις C-H. Η ασύμμετρη και η συμμετρική δόνηση τάσης του -COO^- του αμινοξέος εμφανίζονται στους 1581 cm^{-1} και 1514 cm^{-1} , ενώ κορυφές που αντιστοιχούν στις δονήσεις σκελετού της ουσίας εμφανίζονται μεταξύ των 1100 και 1200 cm^{-1} .

Για ακόμη μία φορά μπορούμε να συμπεράνουμε πως η παγίδευση του αμινοξέος ήταν επιτυχής αν και όχι αποδοτική, αφού ο χαρακτηρισμός του νανοϋβριδίου δείχνει μικρή ποσότητα της επιθυμητής ουσίας να έχει παγιδευτεί.

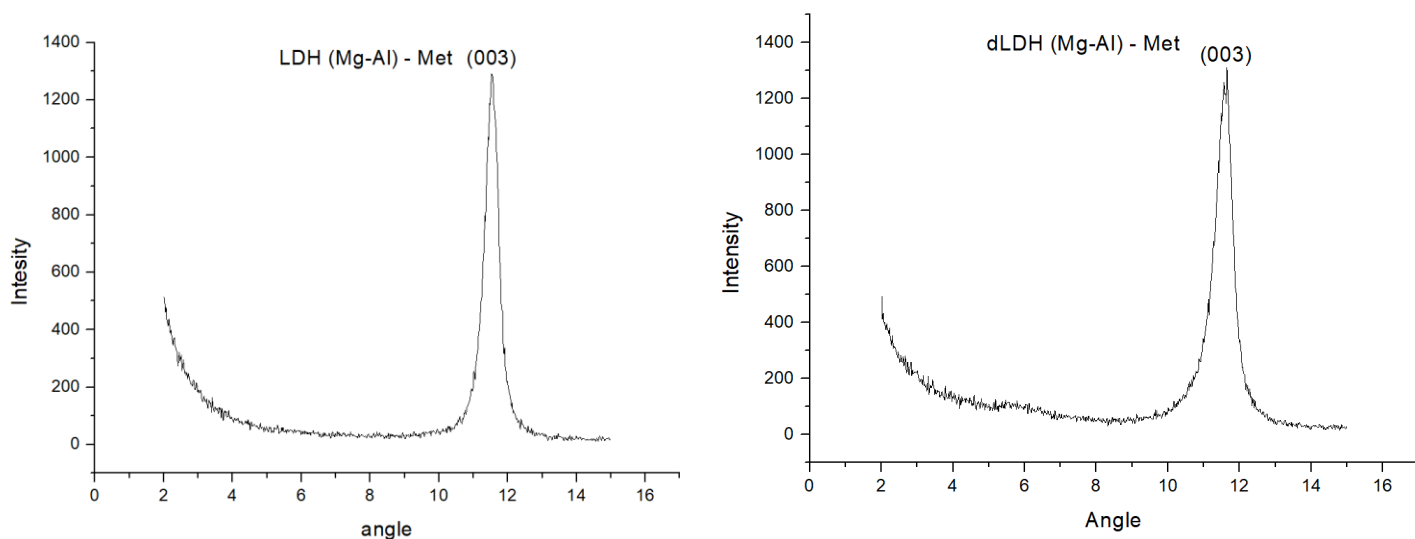


Εικόνα Π.12. Φάσματα υπεράυθρου των LDH (Mg-Al)-Ile και dLDH (Mg-Al)-Ile.

Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Met:

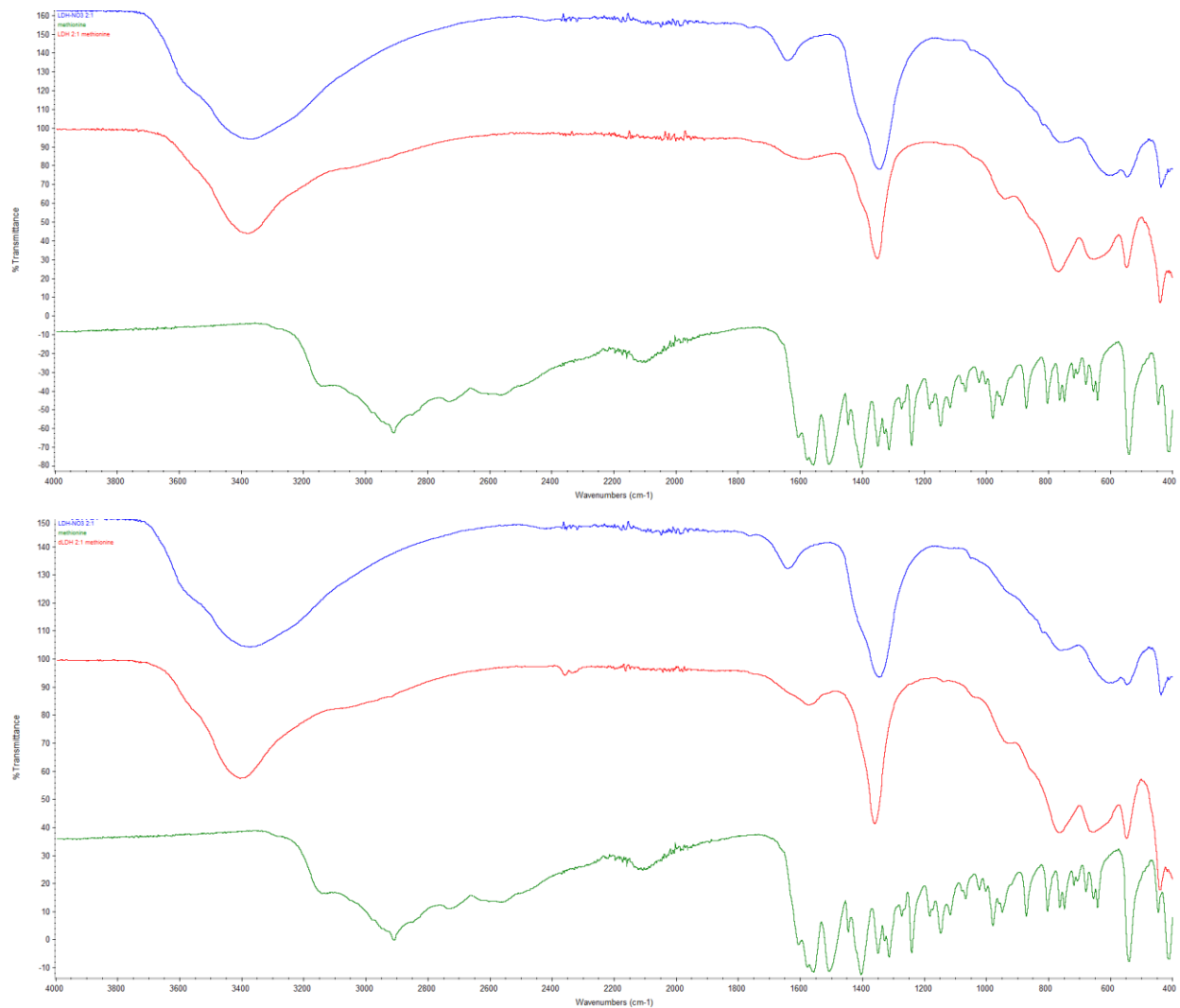
Από τα διαγράμματα XRD και των δύο συνθέσεων (εικόνα Π.13), με τη χρήση του νόμου του Bragg, υπολογίζεται κύρια διαστρωματική απόσταση ίση με 7.66 Å και 7.59 Å. Στην περίπτωση του dLDH (Mg-Al)-Met εμφανίζεται και μία πολύ μικρής έντασης καμπύλη, η οποία αντιστοιχεί σε διαστρωματική απόσταση ίση με 14.96 Å, η οποία είναι σύμφωνη με αυτή της βιβλιογραφίας¹²⁵. Καθώς η ένταση της καμπύλης είναι πολύ κοντά στο θόρυβο του διαγράμματος όμως, θα πρέπει να διασταυρώσουμε τα αποτελέσματα

με αυτά της φασματοσκοπίας υπερύθρου για να εξακριβώσουμε την ύπαρξη μιας ουσιαστικής δεύτερης διαστρωματικής απόστασης.



Εικόνα Π.13. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Met και dLDH (Mg-Al)-Met.

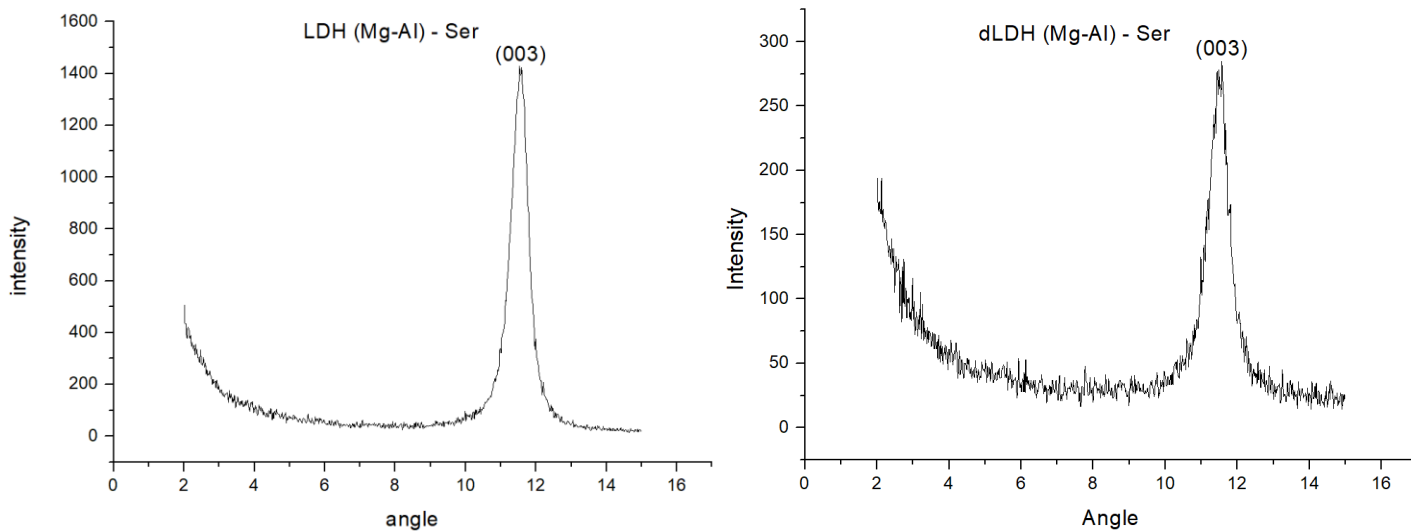
Τα φάσματα υπερύθρου της εικόνας Π.14 εμφανίζουν παρόμοιες κορυφές και για τις δύο συνθέσεις. Πιο συγκεκριμένα εμφανίζεται μία κορυφή στους 3407 cm^{-1} η οποία ανήκει στη δόνηση του υδροξυλίου. Επιπλέον εμφανίζονται τρεις κορυφές ανάμεσα στους 763 , 658 και 548 cm^{-1} οι οποίες ανήκουν στις δονήσεις των μετάλλων. Η κύρια κορυφή στους 1361 cm^{-1} δηλώνει την ύπαρξη ανθρακικών ανιόντων στο δείγμα. Στο φάσμα του dLDH (Mg-Al)-Met δεν υπάρχει καμία νέα κορυφή που να επαληθεύει την υποψία πως στο νανοϋβρίδιο έχει παγιδευτεί επιτυχώς το αμινοξύ.



Εικόνα Π.14. Φάσματα υπερύθρου των LDH (Mg-Al)-Met και dLDH (Mg-Al)-Met.

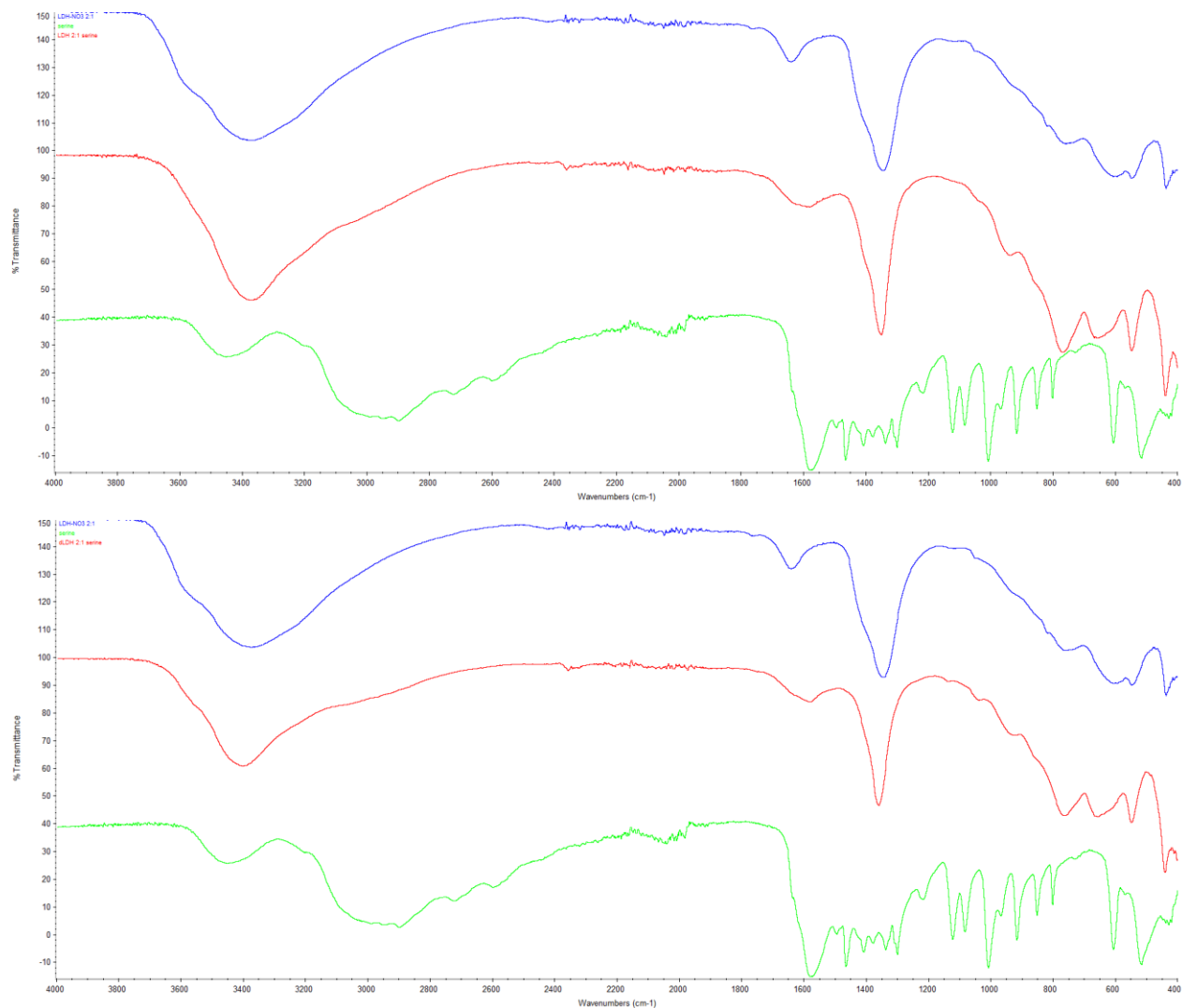
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Ser:

Τα διαγράμματα XRD των LDH (Mg-Al)-Ser και dLDH (Mg-Al)-Ser (εικόνα Π.15) δείχνουν καθαρά, πως το παγιδευμένο στο εσωτερικό του ανιόν είναι το ανθρακικό. Σημειώνεται πως σε αναφορές της βιβλιογραφίας η σερίνη δίνει απόσταση ίση με αυτή του ανθρακικού και ο πλήρης χαρακτηρισμός του νανοϋβριδίου γίνεται με την ανάλυση του φάρματου υπερύθρου.



Εικόνα Π.15. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Ser και dLDH (Mg-Al)-Ser.

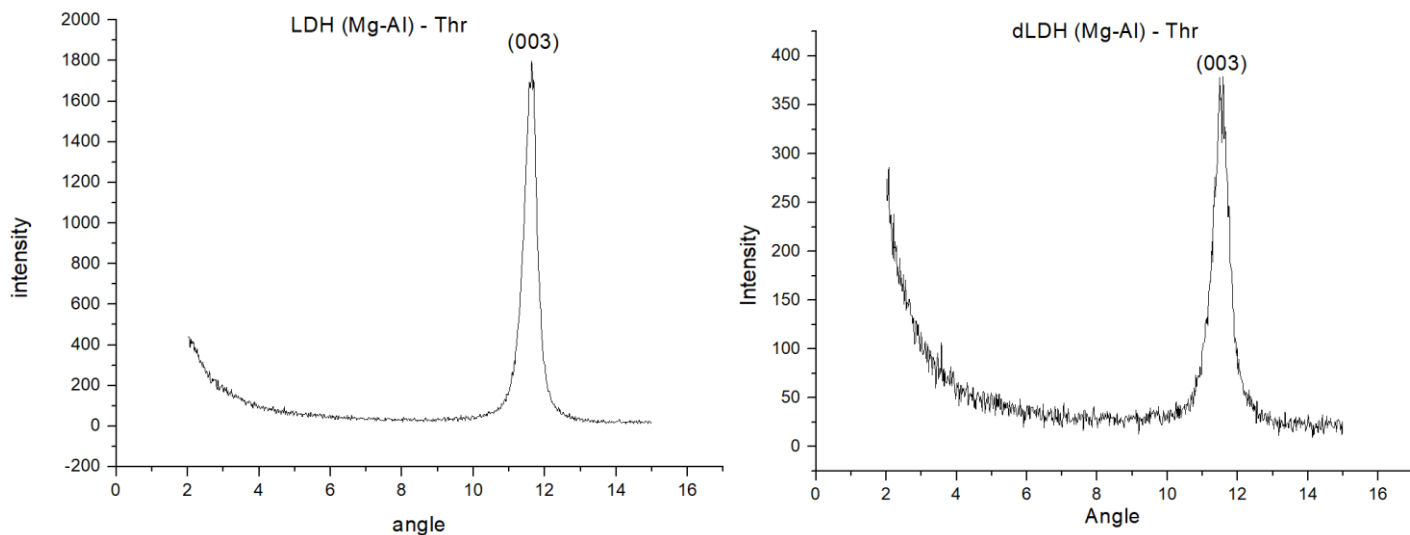
Τα φάσματα υπερύθρου των νανοϋβριδίων (εικόνα Π.16) δεν εμφανίζουν ουσιαστικές διαφορές από αυτό του αρχικού LDH. Η κύρια κορυφή στους 1361 cm^{-1} δηλώνει πως η παγιδευμένη ουσία ανάμεσα στα φύλλα είναι το ανθρακικό ανιόν. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο φάσμα του dLDH (Mg-Al)-Ser εμφανίζεται μία νέα κορυφή στους 1139 cm^{-1} , αλλά η έντασή της είναι πολύ χαμηλή για να δηλώσει την παρουσία άλλης συναρμοσμένης ουσίας.



Εικόνα Π.16. Φάσματα υπερύθρου των LDH (Mg-Al)-Ser και dLDH (Mg-Al)-Ser.

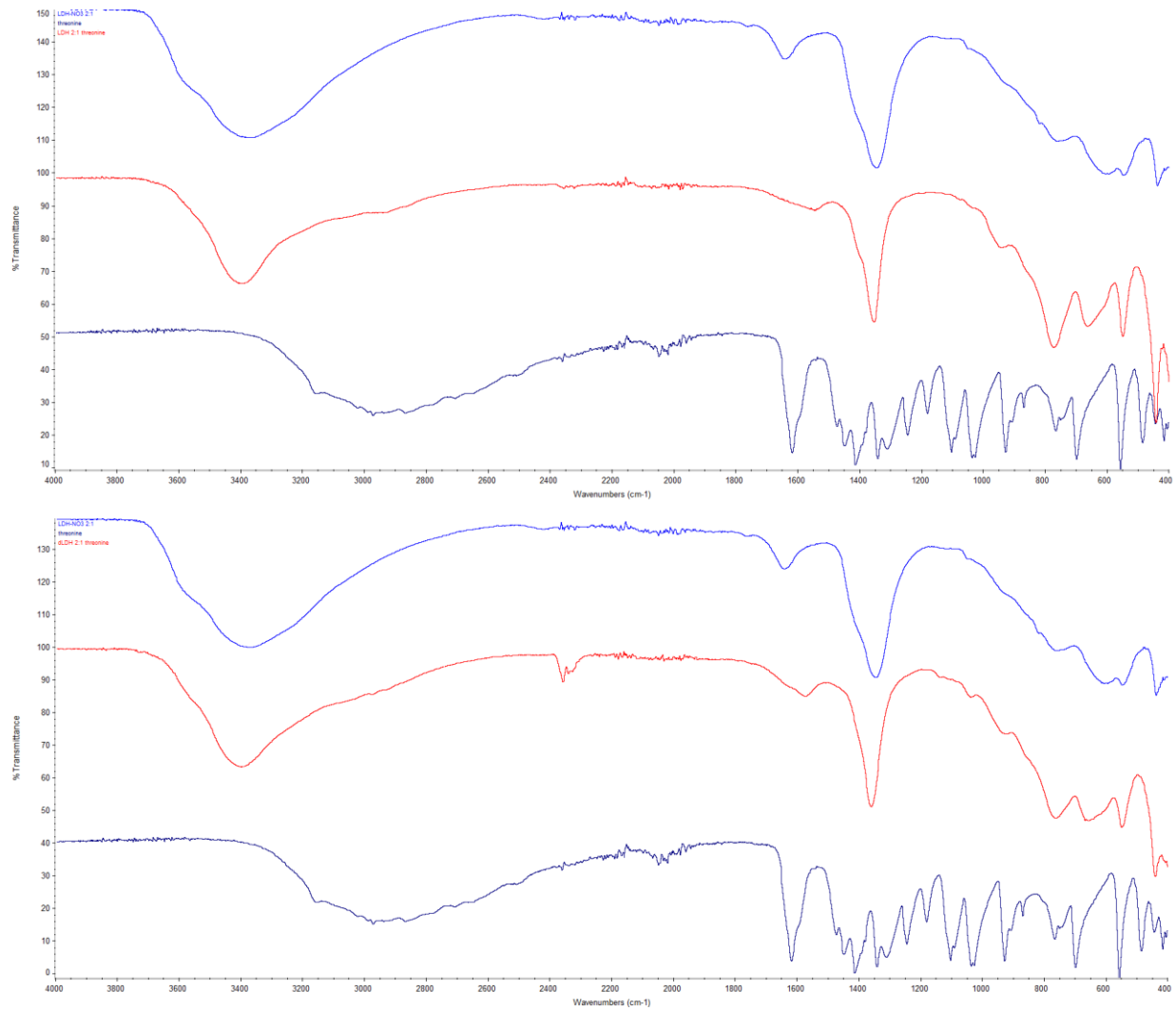
Ανάλυση LDH (Mg-Al)-Thr:

Με τη χρήση του νόμου του Bragg στις κορυφές των διαγραμμάτων της εικόνας Π.17, υπολογίζεται διαστρωματική απόσταση ίση με $7,60 \text{ \AA}$ για το LDH (Mg-Al)-Thr και $7,69 \text{ \AA}$ για το dLDH (Mg-Al)-Thr. Για ακόμη μία φορά η απόστασή αυτή εμφανίζεται στη βιβλιογραφία για το επιθυμητό αμινοξύ και η ταυτοποίησή της γίνεται με την ανάλυση του φάσματος υπερύθρου.



Εικόνα Π.17. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH (Mg-Al)-Thr και dLDH (Mg-Al)-Thr.

Από την ανάλυση των φασμάτων υπεράυθρου των LDH (Mg-Al)-Thr και dLDH (Mg-Al)-Thr (εικόνα Π.18) προκύπτει ότι και τα δύο νανοϋβρίδια έχουν παγιδευμένα στο εσωτερικό τους μόνο ανθρακικά ανιόντα. Η μικρή κορυφή που εμφανίζεται στους 1139 cm^{-1} δεν είναι αρκετή για να δικαιολογήσει την ύπαρξη άλλης συναρμοσμένης ουσίας.



Εικόνα Π.18. Φάσματα υπέρυθρου των LDH (Mg-Al)-Thr και dLDH (Mg-Al)-Thr.