

UNIVERZITET U BEOGRADU  
ELEKTROTEHNIČKI FAKULTET

Danica Mamula Tartalja

**OPTIČKE I TRANSPORTNE OSOBINE  
NANOPRAHOVA NA BAZI OKSIDA  
GVOŽĐA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF ELECTRICAL ENGINEERING

Danica Mamula Tartalja

**OPTICAL AND TRANSPORT  
PROPERTIES OF IRON OXIDE  
NANOPARTICLES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

**Mentor:**

**dr. Vitomir Milanović, profesor emeritus, Univerzitet u Beogradu, Elektrotehnički fakultet**

**Članovi komisije:**

**Član 1: dr. Vitomir Milanović, profesor emeritus, Univerzitet u Beogradu – Elektrotehnički fakultet**

**Član 2: dr Nenad Ivanović, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke Vinča, Univerzitet u Beogradu**

**Član 3: dr Jelena Radovanović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Elektrotehnički fakultet**

**Član 4: dr Dejan Raković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Elektrotehnički fakultet**

**Član 5: dr Jovan Radunović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Elektrotehnički fakultet**

**Datum odbrane: \_\_\_\_\_**

Najpre, želela bih da se zahvalim mom mentoru, dr Vitomiru Milanoviću, profesoru emeritusu Elektrotehničkog fakulteta u Beogradu, za sveobuhvatnu podršku i pomoć prilikom izrade ove doktorske disertacije. Veoma sam mu zahvalna za višegodišnji pozitivan pritisak i ohrabrenje da se upustim u poduhvat izrade disertacije.

Svim članovima komisije zahvaljujem za izdvojeno vreme za pregled disertacije i korisne sugestije.

Ova disertacija ne bi ugledala svetlost dana bez izuzetne pomoći dr Nenada Ivanovića, naučnog savetnika u Institutu za nuklearne nauke Vinča. Pre svega, zahvalna sam mu za strpljenje i razumevanje, koje je iskazivao najpre tokom saradnje na projektu iz kojeg su proizašli važni rezultati ove disertacije, a kasnije i kroz ceo tok izrade disertacije. Njegovo izuzetno poznavanje problematike bilo je vrlo korisno, kako pri realizaciji eksperimenta, tako i prilikom obrade i tumačenja dobijenih rezultata.

Dr Milesi Srećković, redovnom profesoru u penziji Elektrotehničkog fakulteta u Beogradu, sam zahvalna za mnoga iskustva koja sam stekla kroz dugogodišnju saradnju. Posebno sam joj zahvalna za koautorstvo na jednom od radova u kojem je objavljen deo rezultata ove disertacije.

Dr Ljubomiru Vulićeviću, redovnom profesoru u penziji Elektrotehničkog fakulteta u Čačku, zahvaljujem na dragocenoj pomoći u proizvodnji uzoraka.

Prostor je mali da bih se pojedinačno zahvalila svima koji su me ohrabivali tokom izrade disertacije i koji će se radovati okončanju ovog višegodišnjeg posla.

# Naslov: OPTIČKE I TRANSPORTNE OSOBINE NANOPRAHOVA NA BAZI OKSIDA GVOŽĐA

## Apstrakt

Nanočestice oksida gvođža, posebno magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), privlače pažnju zbog svojih superparamagnetnih osobina, biokompatibilnosti i niskog nivoa toksičnosti. Od mnoštva metoda za dobijanje nanočestica, elektrohemijska (EH) metoda se pokazala kao jednostavna, jeftina i ekološki prihvatljiva, a pored toga omogućava i dobru kontrolu osobina dobijenih čestica. Struktura, morfologija i veličina čestica, pa time i njihove magnetne, optičke i električne osobine, mogu se menjati promenom uslova u EH ćeliji tokom procesa sinteze i/ili njihovim naknadnim grejanjem u odgovarajućoj atmosferi.

U ovoj disertaciji ispitivane su mogućnosti sinteze nanoprahova oksida gvođža, EH metodom, u opsegu gustina struje  $J = 200\text{-}1000 \text{ mA/dm}^2$  i temperatura  $T = 295\text{-}361 \text{ K}$ . Takođe je proučeno preuređenje katjona i vakancija u magnetitu, prouzrokovano toplotom, kao i fazni prelazi magnetit-maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) i maghemit-hematit ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). U disertaciji su prikazani rezultati ispitivanja strukture, morfologije i raspodele veličine čestica dobijenih nanoprahova, koji su dobijeni različitim tehnikama, kao što su difrakcija X-zračenja (XRD), skenirajuća i transmisiona elektronska mikroskopija (SEM, TEM) i dinamičko rasejanje laserske svetlosti. Magnetne osobine su određene merenjem zavisnosti magnetizacije od temperature Faradejevom metodom i merenjem histerezisa SQUID aparaturom. Izmereni su i infracrveni (IC) spektri dobijenih prahova, kao i temperaturna zavisnost specifične električne otpornosti i specifične toplote.

Da bi se ispitali načini vezivanja različitih organskih supstanci, koje se često koriste za oblaganje nanočestica oksida gvođža, ravnotežne konformacije i vibracioni spektri molekula limunske kiseline, dekstrana (1-5 molekula), polietilen glikola (1-3 molekula), citozana (1-3 molekula) i oleinske kiseline proračunati su polu-empirijskom, kvantno-mehaničkom metodom AM1, a neki od molekula i metodom linearne kombinacija atomskih orbitala (LCAO), sa bazisom talasnih funkcija 631-G, korišćenjem programskog paketa HyperChem.

Mogućnosti primene dobijenih nanoprahova oksida gvožđa u biosistemima, ispitane su tako što su neki neobloženi, kao i neki prahovi obloženi limunskom kiselinom (ferofluid), u različitim koncentracijama parenteralno administrirani Wistar pacovima *in vivo*, ili primenjeni na uzorke humane krvi, *in vitro*. 24 časa posle primene nanoprahova i ferofluida, analizirane su promene krvne slike, diferencijalne krvne slike, i ispitane metaboličke promene, pomoću VSC (Volume-Conductivity-Light Scatter) aparature. Utvrđeno je da primenjeni nanoprahovi i ferofluid na različite načine utiču na krv, ali da u primenjenim koncentracijama nisu štetni, ni na koji način.

**Ključne reči:** Nanočestice oksida gvožđa, Elektrohemijska sinteza, Karakterizacija, Transportne magnetne i optičke osobine, Ferofluid, Proračuni molekula, Bioprimene

**Naučna oblast:** Elektrotehnika

**Uža naučna oblast:** Fizička elektronika

**UDK broj:** 621.3

**Title: OPTICAL AND TRANSPORT PROPERTIES OF IRON OXIDE  
NANOPARTICLES**

**Abstract**

Iron oxide nanoparticles, especially Magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), have attracted attention due to their biocompatibility, low toxicity and superparamagnetic properties. Among the numerous methods for nanoparticles preparation, the electrochemical (EH) method has been recognised as an easily feasible, low cost, and environmental friendly preparation process, which offers good possibility for nanoparticles properties control. Structure, morphology, size, magnetic, optical, and electrical properties of the powders can be tuned by changing the conditions in the EH cell during the powder synthesis, and/or by their subsequent heating in the appropriate atmosphere.

In this dissertation, the EH synthesis of iron oxide nanopowders of specific characteristics is investigated in the range of current density of  $J = 200\text{--}1000 \text{ mA/dm}^2$ , and temperature of  $T = 295\text{--}361 \text{ K}$ . The temperature induced cation-vacancy reordering in magnetite, the magnetite to maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), and the maghemite to haematite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) phase transitions were examined, as well. For that reason structure, morphology and particle size distribution of the produced powders are investigated, using X-ray diffraction (XRD), Scanning and Transmission Electron Microscopy (SEM and TEM), and dynamic light scattering. The magnetic properties are established by temperature dependent magnetisation measurements using Faraday method, and hysteresis measurements by SQUID. Infrared spectra and temperature dependences of specific electrical resistivity and specific heat are also determined.

In order to analyse the attachment of various surfactants, the properties of optimal ground-state conformation, and vibrational spectra of citric acid molecule, dextran (1-5 molecules), polyethylen glycol (1-3 molecules), chitosan (1-3 molecules), and oleic acid molecule are calculated at AM1 quantum-mechanical, and some of the molecules also at ab-initio LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals) 631-G level, using the

HyperChem program package. The calculated results are compared with measured IR spectra, and some literature data.

For the purpose of investigation of their applicability in biosystems, some of the obtained powders were covered with the citric acid layer (ferrofluid), and together with some non-covered powders parenterally administrated to Wistar rats *in vivo*, and human blood *in vitro* in various concentrations. 24 hours after the application of the powders and the ferrofluid, a Volume-Conductivity-Light Scatter apparatus is used to analyse the changes of blood test, differential blood test, and metabolic changes. It has been established that ferrofluid and plane powders influence blood in various ways, but that any of them is by no means harmful in the applied concentrations.

**Keywords:** Iron oxide nanoparticles, Electrochemical synthesis, Characterization, Transport, magnetic and optical properties, Ferrofluid, Molecular calculations, Bioapplications

**Scientific area:** Electrical Engineering

**Scientific subarea:** Physical Electronics

**UDC number:** 621.3



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OSOBINE I NAČINI DOBIJANJA NANOČESTICA.....	4
2.1. Osobine nano-čestica.....	4
2.2. Neke mogućnosti dobijanja nano-čestica.....	6
2.2.1. Sinteza iz tečne faze.....	6
2.2.2. Sinteza iz gasne faze.....	14
2.2.3. Sinteza u čvrstoj fazi.....	17
2.3. Oblaganje i funkcionalizacija nanočestica.....	19
3. PONAŠANJE NANO-ČESTICA U LJUDSKOM ORGANIZMU.....	30
3.1. Uticaj nano-čestica na tkiva i metabolizam.....	35
4. PRIMENE NANO-ČESTICA OKSIDA GVOŽĐA U MEDICINI.....	39
4.1. Nano-čestice kao prenosioci spoljašnje pobude:Primene u hipertermiji.....	39
4.1.1. Osnovni principi hipertermije magnetnog fluida (MFH).....	42
4.1.2. Biološki koncept MFH.....	47
4.1.3. Perspektive primene MFH.....	49
4.2. Prenosenje i usmeravanje lekova pomoću nanočestica.....	52
4.3. Nano-čestice kao kontrasti za merenja magnetnom rezonansom.....	58
5. DOBIJANJE, OSOBINE, OBLAGANJE I PRIMENA NANOČESTICA OKSIDA GVOŽĐA.....	67
5.1. Osobine oksida gvožđa sa strukturom spinela.....	69

5.2. Dobijanje nanoprahova oksida gvožđa elektrohemijskom (EH) metodom.....	72
5.3. Karakterizacija i osobine nanoprahova oksida gvožđa dobijenih EH metodom.....	73
5.4. Oblaganje nano-prahova oksida gvožđa dobijenih EH metodom.....	89
5.4.1. Limunska kiselina.....	89
5.4.2. Dekstran.....	91
5.4.3. Polietilenglikol.....	97
5.4.4. Citozan.....	103
5.4.5. Oleinska kiselina.....	110
6. UTICAJ NANO-PRAHOVA OKSIDA GVOŽĐA NA KRV, in vivo i in vitro.....	113
7. ZAKLJUČAK.....	118
LITERATURA.....	123
BIOGRAFIJA.....	132
Izjava o autorstvu.....	134
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	135
Izjava o korišćenju.....	136

## 1. UVOD

U mnoštvu materijala, koji se koriste u biosistemima nanočestice (NČ) oksida gvožđa, zbog svojih pogodnih osobina i biokompatibilnosti, zauzimaju značajno mesto. Zahvaljujući dimenzijama, poredivim sa dimenzijama subćelijskih komponenti, virusa i gena, NČ mogu da se kreću unutar organizma ne ometajući njegovo normalno funkcionisanje, kao i da stignu do mesta koja su drugim tretmanima nedostupna. Zbog svog značajnog magnetnog momenta NČ oksida gvožđa imaju dodatnu prednost da mogu da se usmeravaju i pobuđuju spoljašnjim magnetnim poljem. “Rezonantni odziv” magnetne nanočestice (MNČ) na spoljašnje, vremenski promenljivo magnetno polje, dovodi do prenosa energije polja na MNČ, što je omogućilo njihove značajne primene u hipertermiji i snimanju magnetnom rezonansom (MRI).

Metod dobijanja u mnogome određuje veličinu, raspodelu veličine i oblik NČ, njihovu površinsku hemiju, koncentraciju strukturnih defekata i nečistoća, i njihovu raspodelu u čestici, pa samim tim i hemijske, magnetne, optičke i transportne karakteristike NČ. Osim od ovih osobina, primena NČ u biološkim sistemima i medicini zavisi od njihove stabilnosti u fiziološkim rastvorima sa različitim pH vrednostima i, pre svega, od njihove biokompatibilnosti, pa se, shodno tim zahtevima, površina NČ oblaže različitim organskim i neorganskim materijalima. Multifunkcionalne NČ su nova generacija biomaterijala od kojih se očekuje da promene standarde lečenja i nege pacijenata. One se obično dobijaju tako što se NČ oblažu biomaterijalima, koji su funkcionalni sami po sebi, ili omogućavaju dalje vezivanje odgovarajućih entiteta, koji su u stanju da prepoznaju specifične vrste ćelija i tkiva, i(ili) omoguće ciljanu isporuku lekova.

Primena nanotehnologija ima potencijal da značajno poboljša život ljudi sa zdravstvenim problemima. One se mogu koristiti za ranu dijagnostiku, prevenciju i lečenje raka i drugih teških i sistemskih bolesti, reparaciju tkiva i organa i kontinuirani zdravstveni nadzor, pomoću implantiranih senzora, antena i drugih sličnih uređaja.

Predmet ove disertacije su istraživanja nanoprahova oksida gvožđa koji su dobijeni elektrohemijском metodom, a motiv za ova istraživanja je da se ispituju mogućnosti primene ovakvih prahova u medicini. Osnovni cilj istraživanja je bio da se, što je moguće detaljnije, odrede karakteristike ovih prahova i njihova zavisnost od uslova dobijanja, kao i mogućnosti da se te karakteristike podese odgovarajućim toplotnim tretmanom u pogodnoj atmosferi. Takođe su ispitane i mogućnosti oblaganja ovako dobijenih NČ oksida gvožđa različitim organskim oblogama, načini vezivanja tih obloga za površinu nanočestice, kao i promene u infracrvenim (IC) spektrima i drugim parametrima molekula, do kojih usled ovog vezivanja dolazi.

U prvom poglavlju dat je pregled nekih metoda za dobijanje, oblaganje i funkcionalizaciju NČ, sa posebnim osvrtom na NČ oksida gvožđa.

Drugo poglavlje posvećeno je ponašanju NČ u biosistemima i njihovom uticaju na biosisteme u kojima se koriste.

Trećim poglavljem obuhvaćen je prikaz mogućnosti korišćenja NČ oksida gvožđa u hipertermiji, ciljanoj isporuci lekova i kao kontrastnih agenasa u MRI oslikavanju.

U četvrtom poglavlju su prikazane osnovne osobine magnetita i maghemita, a opisana je i elektrohemijска metoda kojom su dobijeni nanoprahovi koji su bili predmet istraživanja u ovoj disertaciji. U ovom poglavlju su dati i analizirani detaljni rezultati dobijeni različitim eksperimentalnim metodama kojima su određene:

- struktura, difrakcijom X zračenja (XRD),
- morfologija, skenirajućom i transmisionom elektronskom mikroskopijom (SEM, TEM),
- raspodela veličina čestica, dinamičkim rasejanjem laserske svetlosti,
- IC spektri FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) metodom,
- električne osobine, merenjem specifične otpornosti u funkciji temperature,
- magnetne osobine, merenjem histerezisa SQUID (Superconducting Quantum Interference Device) aparaturom i magnetne susceptibilnosti u funkciji temperature Faradejevom metodom.

- toplotne osobine, merenjem specifične toplote u funkciji temperature metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC).

Programskim paketom HyperChem, na različitim nivoima tačnosti (polu-empirijski, kvantno-mehanički AM1 i ab-initio metod linearne kombinacije atomskih orbitala, LCAO) određeni su svi parametri ravnotežnih konformacija nekih molekula pogodnih za oblaganje NČ oksida gvožđa i njihovi IC spektri. Na osnovu toga su predloženi najverovatniji mehanizmi vezivanja ovih molekula za NČ oksida gvožđa i analizirane moguće promene različitih parametara, koje nastaju usled specifičnih načina njihovog vezivanje za nanočestice.

U petom poglavlju je analiziran uticaj dobijenih nanoprahova (neobloženih i obloženih limunskom kiselinom) na krvnu sliku laboratorijskih pacova *in vivo*, i uzorke ljudske krvi, *in vitro*.

U šestom poglavlju su sumirani rezultati dobijeni u disertaciji i izloženi zaključci koji iz njih proizilaze, a navedeni su i mogući pravci budućih istraživanja

## 2. OSOBINE I NAČINI DOBIJANJA NANOČESTICA

### 2.1. Osobine nanočestica

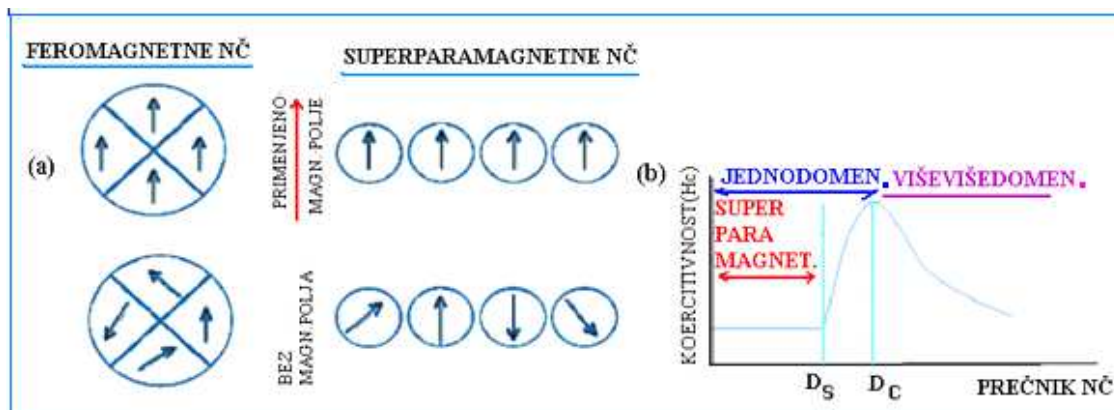
Najopštija definicija nanočestica (NČ) je da su to čestice sa bar jednom karakterističnom dimenzijom između 1 i 100 nm [Leslie-Pelecky D.L., 1996, El-Shall M.S. and Edelstein A.S., 1996]. Strukturne, hemijske, transportne, magnetne i optičke osobine nanomaterijala obično se značajno razlikuju od osobina istih materijala u voluminoznom (bulk) obliku. Osim od veličine, ove specifične osobine NČ zavise i od načina njihovog dobijanja.

Smanjivanje veličine čestica dovodi do izrazitog porasta broja atoma na površini u odnosu na broj atoma u zapremini, čime se povećava energija površine, pa se kao specifična osobina NČ često navodi i veliki odnos površine prema zapremini [Klabunde K, 2001]. Posledica toga je da NČ imaju veliku specifičnu površinu po jedinici mase i visoku reaktivnost.

Male magnetne NČ (MNČ) oksida gvožđa se po veličini obično dele u dve grupe [Boyer C., 2010]: SPION sa prečnicima koji se kreću između 50 i 100 nm, i USPION (ultra-male SPION) sa prečnicima manjim od 50 nm, mada se kritične dimenzije za slične podele često razlikuju od autora do autora. Tako u svojim radovima Elias A. i Thorek L.J. definišu oralne SPIO sa dimenzijama 300 nm-3.5  $\mu$ m, standardne SPIO (SSPIO) 50-150 nm i ultramale SPIO čestice (USPIO) sa prečnikom manjim od 50 nm. Kao podkategorija mogu se definisati MION (monokristalne) i CLIO ("cross-linked", ukršteno povezane) čestice oksida gvožđa. Moguća je i podela prema veličini hidrodinamičkog prečnika, koji uključuje i oblogu čestice [Elias A., 2009., Thorek L.J., 2005].

Kada je veličina MNČ manja od kritične veličine, koja je različita za različite materijale, čestice postaju jednodomenske, tj. imaju samo jedan magnetni domen. MNČ sa još manjim dimenzijama, koje ne dozvoljavaju formiranje domenskog zida mogu pod određenim uslovima (koji osim od dimenzija čestice zavise od magnetnih osobina materijala, oblika čestice, temperature, karakteristične vremenske skala posmatranja, i

spoljašnjeg magnetskog polja) da budu superparamagnetne (SPM). U tom slučaju, svaka čestica se ponaša kao atom, ali sa velikim magnetnim momentom, koji je rezultat slaganja svih magnetnih momenata u čestici. SPM ponašanje se za MNČ određene vrste i uslove posmatranja ispoljava iznad temperature blokiranja ( $T_B$ ), iznad koje su vektori magnetizacije čestica slučajno orijentisani, slično kao kod paramagnetnog gasa slobodnih elektrona.



Slika 2.1. Magnetno ponašanje višedomenskih feromagnetnih i superparamagnetnih NČ u spoljašnjem magnetnom polju. (a) U prisustvu spoljašnjeg magnetnog polja, domeni feromagnetnih NČ i pojedinačne superparamagnetne NČ poravnati su sa primenjenim poljem. U odsustvu spoljašnjeg magnetnog polja, feromagnetne NČ će zadržati određenu makroskopsku magnetizaciju, dok SPM NČ neće. (b) Veza između veličine NČ i strukture magnetnih domena.  $D_C$  je kritična veličina za formiranje jednodomenskih, a  $D_S$  za formiranje SPM čestica [Akbarzadeh A., 2012].

SPION se mogu tretirati kao mali, zasebni magneti, i kao takve imaju veliki potencijal za biološke i medicinske primene. One se relativno jednostavno dobijaju, biokompatibilne su, a njihovi stabilni koloidni rastvori u odgovarajućim nosećim tečnostima, koji se nazivaju ferrofluidi, su posebno pogodni za bioprimene [Berkovski B., and Bashtovoy V., 1996]. Tako se uobičajenim osobinama tečnosti dodaju SPM osobine NČ, što omogućava korišćenje magnetnih sila za njihovo vođenje na željenu lokaciju u telu, pojačanje magnetnog signala pri analizama magnetnom rezonansom (Magnetic Resonance Imaging, MRI), i lokalno zagrevanje područja u koje su čestice smeštene (hipertermija). Površina SPION može se funkcionalizovati različitim oblogama, kao što su mali organski molekuli, polimeri, proteini i antitela.

## 2.2. Neke mogućnosti dobijanja nanočestica

Načinom dobijanja nanočestica može se uticati na njihovu veličinu i raspodelu velične strukturu i morfologiju, a na osnovu toga i na njihove hemijske, električne, optičke i magnetne karakteristike. Pimene NČ u biološkim sistemima i medicini često zahtevaju veoma usku raspodelu veličine oko neke vrednosti koja je obično manja od 100 nm, a u nekim slučajevima i NČ koje imaju veliki magnetni momenat. Zbog toga je sinteza velikih količina nanokristala uniformne veličine, (monodisperzija), sa relativnom standardnom devijacijom veličine čestica <5%, od ključnog značaja za realizaciju kvalitetnih nanouređaja i njihove primene [Faraji M., 2010].

Jedna mogućnost klasifikacije metoda za sintezu nanomaterijala je po tome da li se ona odvija u čvrstoj fazi (različite reakcije u čvrstoj fazi, mehanohemijaska sinteza), tečnoj fazi (elektrohemijaska (EH) metoda, sol-gel metoda, precipitacija, hidrotermalna sinteza,), ili disperznom sistemu (aerosolu) (sprej piroliza, sagorevanje hemijska ili fizička depozicija iz pare).

Kod „top-down“ pristupa sintezi, nanostrukturni materijali se dobijaju usitnjavanjem krupnih zrna osnovnog materijala, a kod „bottom-up“ pristupa, nanostrukture se formiraju u procesu nukleacije, rasta i agregacije atoma ili primarnih čestica [Goya G. F., 2008]

### 2.2.1. Sinteza iz tečne faze

**Hemijska koprecipitacija.** Do homogene precipitacije dolazi kada koncentracija prekursora u rastvoru dođe u zasićenje i otpočne nukleacija i rast čestica kombinacijom procesa difuzije atoma u nukleuse i nepovratne agregacije nukleusa. Slika 2.2.1 prikazuje kako se, po LaMeru, mogu pripremiti monodisperzne čestice sa relativnom standardnom devijacijom veličine od ~ 5%, i koje je uslove za to potrebno ispuniti:

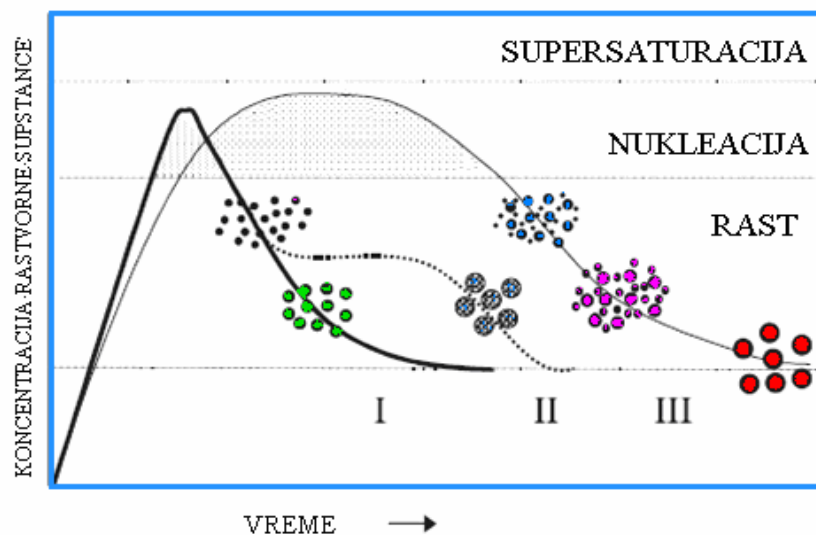


(I) Nukleacija mora da bude dovoljno brza da onemogući dalji rast koncentracije čestica u rastvoru. U suprotnom slučaju, stvoriće se veliki broj nukleusa u kratkom periodu.

(II) Brzina rasta nukleusa mora da bude dovoljno velika da brzo smanji koncentraciju čestica u rastvoru ispod tačke nukleacije. Na ovaj način se stvara samo ograničen broj čestica.

(III) Sa druge strane, brzina rasta čestica mora da bude dovoljno mala da period rasta bude dugačak u poređenju sa periodom nukleacije, što umanjuje uticaj konačnog vremena nukleacije na raspodelu veličine čestica.

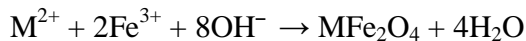
Kontrolom ovih faktora mogu se sintetizovati monodisperzne nanočestice različitih veličina.



Slika 2.2.1. Mehanizam formiranja uniformnih čestica u rastvoru. Kriva I: nukleacija i uniformni rast difuzijom (klasični model LaMer-a i Dinegar-a). Kriva II: nukleacija, rast i agregacija manjih čestica. Kriva III: višestruka nukleacija i rast [Tartaj P., 2003].

Hemijska koprecipitacija je jednostavan i često korišćen način za sintezu nanočestica oksida gvožđa ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ili  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) i drugih ferita. Ovaj postupak obično koristi vodene rastvore soli, u kojima su odgovarajući joni dispergovani u tačno definisanim atomskim odnosima, a taloženje se inicira dodavanjem baze i mešanjem rastvora pri kontrolisanoj

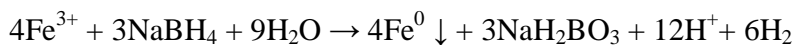
temperaturi i pritisku [Sun Y.P., 2007]. Odgovarajuća hemijska reakcija se može prikazati kao:



gde je  $M^{2+}$  jon metala. Potpuna precipitacija sa stehiometrijskim odnosom  $Fe^{3+}/M^{2+}$  od 2:1 se može očekivati na nivoima pH između 8 i 14 [Faraji M., 2010, Tartaj P., 2003].

Nanočestice magnetita ( $Fe_3O_4$ ) nisu stabilne u ambijentalnim uslovima, jer oksidiraju u maghemit  $\gamma$ - $Fe_2O_3$ , a u kiseloj sredini se rastvaraju. Budući da je i maghemit ferimagnet, sa sličnim magnetnim osobinama kao magnetit, oksidacija magnetita u hemijski stabilniji maghemit obično ne predstavlja problem kod bioloških primena, pa se ona često i namerno inicira. Veličina, oblik i sastav NČ dobijenih koprecipitacijom u velikoj meri zavisi od vrste upotrebene soli (npr. hloridi, sulfati, nitrati), odnosa  $M^{2+}/Fe^{3+}$ , temperature reakcije, pH vrednosti, baze koja dovodi do taloženja, brzine mešanja i jonske snage sredine. Magnetna svojstva ovako dobijenih NČ mogu se kontrolisati prilagođavanjem molarnog odnosa dvo- i trovalentnih katjona, kao i kontrolom veličine i oblika nanočestice, koja se obično ostvaruje podešavanjem pH vrednost, ili koncentracija jona u rastvoru. Optimalne vrednosti koncentracije gvožđa u rastvoru su između 39 i 78 mM, a pH rastvora koji omogućava brzo stvaranje  $Fe_3O_4$  postiže se dodavanjem velikih količina baze [Laurent S., 2008]. Veća brzina mešanja rastvora dovodi do formiranja manjih čestica. Kod hemijske koprecipitacije, temperatura je niža, a vreme reakcije kraće nego kod, npr. termalne dekompozicije i hidrotermalnog metoda. Prinos reakcije je visok, pa se, za relativno kratko vreme, može dobiti znatna količina materijala. Raspodela veličine čestica je relativno uska, sa srednjom vrednošću u intervalu 2-20 nm. Značajno je i to što je rastvarač ekološki prihvatljiv (voda), a čestice mogu biti funkcionalizovane *in-situ*, pomoću odgovarajućih organskih aditiva, ili polimera [Boyer C., 2010]. Međutim, postoje i mišljenja da ova metoda ne obezbeđuje dovoljno dobru kontrolu oblika i raspodele veličine nanočestica oksida gvožđa za biološke primene. Pored toga, često dolazi i do agregacije neobloženih čestica [Wu W., 2008].

Nanočestice sa nula-valentnim gvožđem koje se mnogo koriste u oblasti zaštite životne sredine, obično se pripremaju mešanjem jednakih količina  $NaBH_4$  i  $FeCl_3$ , prema reakciji [Farai M., 2010]



Velika prednost ovog metoda je njegova jednostavnost, a on se može bezbedno koristiti u većini hemijskih laboratorija sa jednostavnim hemijskim reagensima i na sobnoj temperaturi.

**Elektrohemijska (EH) metoda.** Ova metoda sinteze nanočestica oksida gvožđa, najčešće magnetita, omogućava jednostavnu kontrolu veličine i morfologije čestica podešavanjem uslova sinteze, što je značajno, jer mnoge osobine nanočestica zavise od njihove veličine i oblika. EH sinteza NČ se dešava na graničnoj površini elektroda-elektrolit na snovu hemijskih reakcija koje u elektrolitu indukuje struja između elektroda. Metoda je jeftina, jednostavna i veoma prilagodljiva, a krajnji proizvod je „čist”, sa malo nečistoća i ekološki prihvatljiv. [Mohapatra M., 2010]. EH metoda je, u poslednjoj deceniji, postala veoma popularna za sintezu nanoprahova različitih oksida [Marques R.F.C., 2008; Cabrera L., 2008; Franger S., 2007]. Pascal sa saradnicima je, među prvima, EH metodom sintetisao nanočestice maghemita veličine 3-8 nm, u vodenom rastvoru DMF (dimetilformamid) sa katjonskim surfaktantima [Pascal C., 1999]. Veličinu čestice je kontrolisao promenom gustine struje. Posle njega, Zhang sa saradnicima je dobio nanočestice  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  sfernog oblika, veličine 22 nm, koje su imale superparamagnetne osobine [Zhang Z., 2007]. Marques [Marques R.F.C., 2008] je EH metodom dobio nanočestice magnetita u rasponu veličina 4.4 do 9 nm, a Starowicz [Starowicz M., 2011] je ovom metodom dobio nanočestice veličine 20-40 nm, približno sfernog oblika. Čestice su dobijene u vodenom rastvoru etanola, pri čemu je ustanovljeno da na veličinu čestica bitno utiče koncentracija rastvora. Fajarah je među prvima ispitivao uticaj različitih parametara EH sinteze na osobine tako dobijenih nanočestica. Ustanovio je da  $\text{OH}^-$  joni imaju važnu ulogu u formiranju nanočestica magnetita [Fajarah F., 2012], a da se veličina čestica može kontrolisati podešavanjem gustine struje i rastojanja između elektroda, pri čemu formiranje čestica nije moguće kada je rastojanje između elektroda veće od neke kritične vrednosti.

Treba pomenuti i impulsnu EH metodu u kojoj se koristi vremenski promenljiva, impulsna, struja. EH metoda je podjednako pogodna za upotrebu u laboratoriji i za industrijske primene [Karami H., 2012].

**Sol-gel sinteza.** Hidroliza i kondenzacija metal-alkoksida su osnovni procesi koji se koriste pri sol-gel sintezi. Metal-alkoksidi su hemijska jedinjenja opšte formule  $M(OR)_x$ , gde M označava metalni jon a –OR alkoksidnu grupu, tj. konjugovanu alkoholnu bazu nastalu uklanjanjem protona iz hidroksilne grupe odgovarajućeg alkohola. Krajnji proizvod sinteze je gel, čije osobine zavise, kako od internih, tako i od eksternih parametara procesa. Interni parametri su, pre svih, osobine metalnog jona i alkoksidne grupe, a eksterni, molekulski udeo vode u hidrolizi, vrsta rastvarača, pH vrednost i temperatura rastvora, vrsta katalizatora itd. Podešavanjem ovih parametara dobija se gel željene strukture i osobina [Đenadić R.R., 2006]. Prednost metode je što se, korišćenjem relativno jednostavne opreme i po pristupačnoj ceni, mogu dobiti značajne količine čestica neorganskih i organskih materijala uključujući tu i neke metale, uz mogućnost dobre kontrole raspodele veličine. Osnovno ograničenje metode je u tome što je teško sintetisati materijale čija stehiometrija odstupa od standardne.

**Solvotermalna sinteza.** Solvotermalna sinteza je relativno jednostavan metod za pripremu superfinih prahova metalnih oksida kontrolisane veličine i morfologije [Butter K., 2005, Sreeja V., 2003]. Osnovni parametri koji regulišu solvotermalnu reakciju su [Demazeau\_G., 2008]:

- hemijski parametri (priroda rastvarača, priroda reagenasa, koncentracija)
- termodinamički parametri (temperatura, pritisak i vreme trajanja reakcije).

Solvotermalna sinteza obuhvata različite tipove *in-situ* hemijskih reakcija, koje se mogu klasifikovati u pet osnovnih grupa: oksidacija-redukcija, hidroliza, termoliza, stvaranje kompleksnih jedinjenja i reakcije dvostruke izmene. Ove reakcije se odvijaju u zatvorenom sistemu u prisustvu rastvarača, na temperaturi višoj od temperature ključanja

rastvarača (često višoj od 200 °C) i visokom pritisku (često većem od 2000 psi, 1 bar  $\approx$  14.5 psi). Ukoliko se kao rastvarač koristi voda, proces se naziva hidrotermalna sinteza.

Rastvarač najčešće obezbeđuje aktivnu hemijsku komponentu reakcije, ili fluidnu fazu koja, u skladu sa svojim fizičko-hemijskim svojstvima, određuje i usmerava reakciju. On se bira na osnovu karakteristika njegove interakcije sa reagensom (rastvorljivost, reaktivnost, mogućnost stvaranja kompleksa) i hemijskog sastava konačnog materijala koji treba da se dobije. Koncentracija prekursora ima veliki uticaj na oblik nanokristala dobijenih solvotermalnim procesom [Wang Q., 2006].

Polazna suspenzija, koja obično sadrži odgovarajući organo-metalni prekursor, recimo  $\text{Fe}(\text{CO})_5$  se izlaže visokoj temperaturi (do 400 °C) i pritisku (do 100 MPa) [Boyer C., 2010]. U većini slučajeva, porast temperature i pritiska utiče na kinetiku faznih transformacija tako što dovodi do povećanja rastvorljivosti i koncentracije prekursora, podstičući na taj način proces rasta nano i mikrokristala [Demazeau G., 2008], ali i rastvaranje i ponovno formiranje čvrste faze, što omogućava dobijanje nehidratiranih oksidnih čestica [Srđić V.V., 2004]. Ovakav metod sinteze ima nekoliko prednosti:

- krajnji proizvod je nehidratirani oksid koji se dobija u jednostepenom procesu,
- kontrola veličine, morfologije, rasta, starenja i agregacije čestica [Stojanović Z., 2009] je bolja nego kod koprecipitacije,
- moguće je uraditi oblaganje i funkcionalizaciju čestica tokom samog procesa dobijanja,
- moguća je ugradnja drugih metala (Mn, Co, Ni, Zn,...) u osnovnu strukturu magnetita,
- hidrotermalna sinteza nije štetna za okolinu.

Kinetika reakcije je obično spora nezavisno od radne temperature, ali može da se ubrza i do dva reda veličine pomoću lokalizovanog mikrotalasnog super-zagrevanja rastvora. Solvotermalnom sintezom se mogu dobiti nanočestice sa uskom raspodelom veličine. Nedostatak metode je što se pomoću nje mogu dobiti samo oksidni prahovi.

**Termalna dekompozicija.** Odlična kontrola veličine i monodisperznosti nanočestica može se ostvariti visoko temperaturnom dekompozicijom organometalnih prekursora ili karbonila, kao što je gvožđe (penta)karbonil  $\text{Fe}(\text{CO})_5$ , uz korišćenje organskih rastvarača i obloga, kao što su oleinska kiselina i hexadecylamin. Ako je metal u sastavu organometalnih prekursora nula-valentan (kao što je to Fe u  $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ), u početnoj fazi termalne dekompozicije dolazi do formiranja metalnih nanočestica. Međutim, ako je proces praćen oksidacijom, mogu se proizvesti i veoma kvalitetni, monodisperzni prahovi metalnih oksida. Sa druge strane, dekompozicija prekursora sa metalnim katjonima, kao što je  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ , direktno dovodi do formiranja nanočestica metalnih oksida.

Odnosi početnih koncentracija reagenasa, tj. organometalnih jedinjenja, molekula koji se koriste za oblaganje i rastvarača, najviše utiču na veličinu i morfologiju dobijenih NČ, a na njih utiču i temperatura i vreme reakcije, kao i period starenja. Smatra se da je od metoda, koje imaju visok i merljiv prinos, termalna dekompozicija trenutno najbolja za kontrolu veličine i morfologije NČ. Jedan od glavnih nedostataka ove metode je što se pomoću nje dobijaju NČ koje su nestabilne u organskim rastvorima, što ograničava njihovu primenu u biološkim sistemima, pa je neophodno da se njihova površina prilagodi na odgovarajući način. Osim toga, metoda se zasniva na relativno komplikovanim procesima, ili takvim koji zahtevaju relativno visoke temperature.

**Mikroemulzije (emulzijska hidroliza).** Ova metoda se često koristi za sintezu magnetnih nanočestica uniformne veličine. Ona podrazumeva izotropan i termodinamički stabilan sistem, koji se sastoji od tri komponente: vode, koja sadrži reagense, ulja i određene koncentracije nekog molekula, koji služi kao obloga. Molekuli obloge smanjuju površinski napon između vode i ulja što omogućava formiranje providnog rastvora. Sferične nanokapljice vode koje sadrže reagense, ponašaju se kao nanoreaktori, brzo se stapaju (sjedinjaju), što omogućava procese mešanja, spajanja, sinteze i precipitacije NČ. Zidovi nanokapljica obloženi molekulima obloge se ponašaju kao kavezi za rastuće čestice i tako smanjuju prosečnu veličinu formiranih čestica. Tako se veličina sferičnih nanočestica može kontrolisati i podešavati količinom vode u emulziji, tj. molarnim odnosom voda-obloga,  $W_0$ , tako što veće vrednosti  $W_0$  obično daju veće čestice. Ako se

dve mikroemulzije voda-u-ulju koje sadrže željene reaktante pomešaju, mikrokapljice će se sudarati, spajati i opet razdvajati, i konačno će doći do precipitacije u micelama. Mikroemulzije se mogu koristiti za sintezu monodisperznih NČ sa različitom morfologijom. Ova metoda zahteva veliku količinu rastvarača.

**Sonohemijska metoda.** Ova metoda se često koristi kao alternativa onim tehnikama za dobijanje NČ koje zahtevaju mnogo vremena, kao i za proizvodnju novih materijala sa neobičnim svojstvima. Fizičko-hemijske efekte koji su specifični za ovu metodu stvara ultrazvuk koji potiče iz akustične šupljine, koja nastaje implozijom mehurića koji se stvaraju u tečnosti. Ta implozija pomoću adijabatske kompresije proizvodi lokalizovano žarište, ili šok talas, u gasnoj fazi raspadajućeg mehurića. Eksperimentalno je utvrđeno da temperature u ovim žarištima dostižu 5000 K, pritisci 1800 atm, a brzine hlađenja su iznad  $1010 \text{ K s}^{-1}$ . Ovi ekstremni uslovi omogućavaju formiranje specifičnih materijala i sprečavaju aglomeraciju, što je neophodno da bi se pripremile visoko monodisperzne NČ [Mason T.J., 2002]. Vijayakumar sa saradnicima je uspeo da na ovaj način proizvede  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  prah sa dimenzijama čestica od oko 10 nm. [Vijayakumar R., 2000]. Pored NČ oksida gvožđa, ovom metodom se mogu dobiti i različiti nanokompozitni materijali [Bang J.H., 2007].

**Mikrotalasna metoda.** Ova metoda se sve više primenjuje umesto konvencionalnih metoda za dobijanje NČ, jer lokalizovano super-zagrevanje rastvora mikrotalasima omogućava i brzo volumetrijsko zagrevanje, i ekstremno brzu kinetiku kristalizacije. To skraćuje vreme potrebno za dobijanje NČ i povećava količinu proizvoda. Makroskopske temperature pri kojima se proces odvija su značajno niže od temperatura potrebnih za dobijanje NČ klasičnim načinima zagrevanja, pa su vreme procesiranja, utrošak energije i, posledično, troškovi proizvodnje, značajno smanjeni.

### 2.2.2. Sinteza iz gasne faze

**Hemijska depozicija iz pare.** Tokom hemijske depozicije iz pare (CVD), gasni dostavni sistem kontinuirano dovodi prekursore u vakumiranu reakcionu komoru u kojoj se održava visoka temperatura ( $>900\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Karakteristike NČ dobijenih ovim metodom zavise od mogućnosti održavanja niskih koncentracija prekursora u gasu nosiocu, brzine ekspanzije nosećeg gasa, i brzine hlađenja NČ prilikom izlaska iz reaktora. Tako se rast i aglomeracija čestica mogu usporiti brzom ekspanzijom dvofaznog gasnog toka na izlazu iz reakcione komore. Naknadni toplotni tretman ovako dobijenih nanoprahova visoke čistoće omogućava modifikaciju veličine, morfologije, sastava i strukture čestica, uključujući tu i njihovo prečišćavanje i rekristalizaciju.

U poslednje vreme, sve više se koristi hemijska depozicija iz pare uz pomoć katalizatora (CCVD) koja omogućava proizvodnju velikih količina kvalitetnih NČ. Tokom ovog procesa, posebno odabrana podloga, koja je obično zagrejana na visoku temperaturu, izlaže se gasovitom prekursoru koji reaguje, i/ili se razgrađuje na njenoj površini, pri čemu se dobija željeni film, ili prah, dok se nusproizvodi reakcije izbacuju sa neproreagovanim prekursorskim gasovima. Osim za proizvodnju nanočestica, CVD metod je pogodan za dobijanje nanostrukturnih tankih filmova, slojeva i premaza, i kompozitnih materijala veoma visoke čistoće. U zavisnosti od vrste materijala i uslova u reaktoru, njime se mogu dobiti i epitaksijalni, polikristalni i amorfni filmovi različitih debljina, kao i gotovi proizvodi (tranzistori, integrisana kola, senzori i druge elektronske komponente).

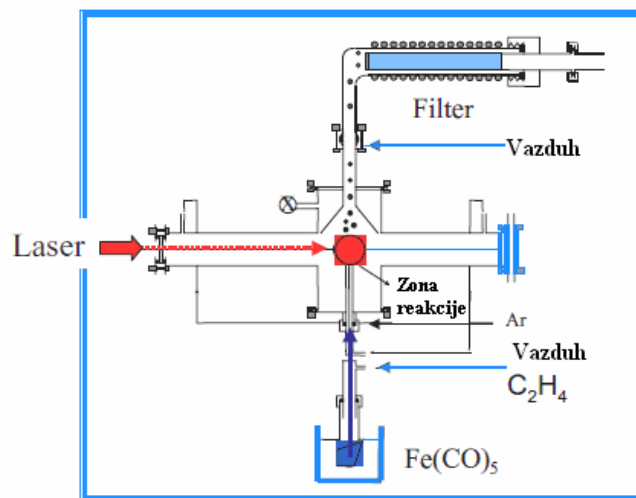
**Fizička depozicija iz pare.** Nasuprot hemijskoj, kod fizičke depozicije iz parne faze željeni prekursor se iz čvrste faze prevodi u gas i nanosi na podlogu.

Hemijska depozicija iz gasne faze ima nekoliko prednosti u odnosu na fizičku depoziciju. Velike brzine protoka gasovitog prekursora omogućava znatno veće brzine dobijanja NČ od onih koje se mogu ostvariti metodom fizičke depozicije, a kontrolom brzine protoka gasovitog prekursora može da se reguliše i njihova stehiometrija. Izborom temperature



podloge i sastava nosećeg gasa može se odabrati odgovarajuća reakcija (piroliza, oksidacija, redukcija, nitrifikacija, karbidizacija itd.), i tako dobiti čestice željenog sastava i osobina.

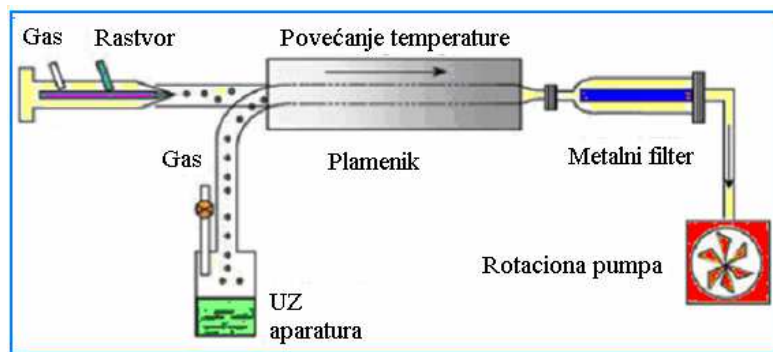
**Laserska piroliza.** Laserski snop odgovarajućih karakteristika može da zagreva i izazove reakciju u gasovitoj mešavini prekursora. Na taj način mogu da se proizvedu male, neaglomerisane NČ, sa uskom raspodelom veličine, u opsegu od 2 do 7 nm [Morales M.P. 2003, Veintemillas-Vendaguer S., 2004]. Za dobijanje NČ baziranih na gvožđu, metodom laserske pirolize, obično se koriste mešavine koje sadrže gvožđe-(penta)karbonil, etilen, kao energetski agens i vazduh, kao oksidans. Zahvaljujući činjenici da je ovaj metod jednostavan i da može da se primeni u ambijentalnim uslovima, očekuje se njegoa sve veća primena za sintezu nanočestica.



Slika 2.2.2. Šematski prikaz aparature za dobijanje nanočestica maghemita dimenzija oko 5 nm laserskom pirolizom [Tartaj P., 2003].

**Sprej-piroliza u plamenu.** Reakcije u disperznom sistemu mogu da se izvedu u kratkom vremenu, na velikoj reakcionoj površini, a omogućavaju dobijanje finih, jedno- ili više-komponentnih nanostrukturnih materijala kontrolisanog sastava, veličine i morfologije, i odličnih svojstava. Sprej-piroliza u plamenu omogućava direktno dobijanje raznih oksida

gvožđa, pored magnetita i maghemita, recimo i hematita  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  i wustite-a FeO [Boyer C., 2010]. Valentno stanje Fe, pa time i dobijanje odgovarajućeg oksida, kontrolišu se korišćenjem pogodnog prekursora ( $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ), i njegovom koncentracijom u plameniku. Metoda je pogodna za dobijanje vrlo finih čestica (6-50 nm) predvidljive veličine i oblika i različitog sastava, u velikim količinama (nekoliko grama na sat) [Tartaj P., 2003]. Ovom metodom se mogu dobiti i druge vrste oksida ( $\text{TiO}_2$ , ZnO, Silica), kao i hibridne NČ (Silica-SPIONs). Mana metode je što u ovako dobijenim nanočesticama često ima i primesa.



Slika 2.2.3. Šematski prikaz uređaja za sprej-pirolizu koji služi za dobijanje nanočestica maghemita. [Tartaj P., 2003].

**Lučno pražnjenje.** Metodom lučnog pražnjenja obično se dobijaju nanočesnice enkapsulirane u ugljeniku, ili metalni karbidi, ali se metoda može koristiti i za oblaganje metalnih NČ bor nitridom (BN) [Sun X., 2000., Kuno M., 2001]. Metalni prekursori se obično smeštaju unutar udubljenja izbušenog u grafitnoj elektrodi, a zatim isparavaju pomoću električnog lučnog pražnjenja. Čestice dobijene ovom metodom obično imaju široku raspodelu veličine, a postoji i problem kontrole debljine obloge. Osim toga, metod nije pogodan za dobijanje velikih količina NČ, tj. za industrijsku proizvodnju. Proizvod se obično sastoji od mešavina različitih jedinjenja ugljenika, a odvajanje čestica od nečistoća je otežano, što ovu metodu čini nepraktičnom.

### 2.2.3. Sinteza u čvrstoj fazi

Sinteza u čvrstoj fazi može da se koristi za dobijanje različitih tipova NČ. Dobar primer su čestice dobijene topljenjem  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  i ugljeničnih prahova na visokim temperaturama, elementarnog Fe i ugljeničnih prahova, ili Co nanočestica i kopolimera. Međutim, veličina, a time i magnetna svojstva čestica dobijenih topljenjem se teško mogu kontrolisati, a superparamagnetne čestice se ne mogu dobiti, jer je početna veličina čestice obično mnogo veća od 10 nm.

**Sinteza sagorevanjem.** Ova metoda je korišćena za dobijanje različitih magnetnih nanočestica [Bystrzejewski M., 2007, Borysiuk J., 2008]. Prosečna veličina čestica dobijenih ovom metodom je veća što su temperature sagorevanja više. Ovaj pristup omogućava dobru kontrolu veličine čestica, a time i dobru kontrolu magnetnih osobina, uključujući tu i mogućnost dobijanja SPM čestica. Čestice dobijene na ovaj način sadrže veoma malo nečistoća, a metod je pogodan i za proizvodnju većih količina materijala.

**Reakcije u čvrstoj fazi.** To je jedan od konvencionalnih načina dobijanja nanoprahova, kod kojeg se reakcije odigravaju bez prisustva rastvarača, u čvrstom stanju, tako što reaktanti međusobno difunduju. Difuzija zavisi od temperature reakcije i kontakne površine na granici zrna. Na proces značajno utiče i prisustvo nečistoća i defekata. Ukoliko ne postoji mehanizam za kontrolu rasta zrna, pri povišenim temperaturama dolazi do formiranja velikih zrna, pa je neophodno naknadno mlevenje kako bi se usitnile sinterovane i aglomerisane čestice. Pored toga, nedostaci metode su i dugo vreme zagrevanja na visokim temperaturama i često, hemijska nehomogenost ovako dobijenih prahova.

**Mehanohemijske metode.** Ove metode podrazumevaju mlevenje jednog, ili smeše prahova, u mlinovima različitih tipova. Na račun energije koja u sistem dospeva delovanjem mehaničkih sila, tokom ovog postupka može doći i do hemijskih reakcija u

čvrstom stanju koje dovode do promene strukture i morfologije materijala, pa čak i nastanka novih jedinjenja. Dve osnovne mehanohemijske metode su mehanička aktivacija i mehaničko legiranje.

*Mehanička aktivacija* je postupak kojim se visokodisperzni nanostrukturni prahovi dobijaju dezintegracijom (mlevenjem) krupnozrnih prahova do nanokristalnog, ili amorfnog stanja. Ovim postupkom može se povećati reaktivnost materijala, bez promene njegovog hemijskog sastava. Međutim, nije isključeno da mehanička energija uneta procesom mlevenja, pored lokalnog zagrevanja neće dovesti i do *mehaničkog legiranja*, ili iniciranja hemijskih reakcija u čvrstom stanju koje dovode do promene strukture i nastanka novih jedinjenja.

*Mehaničko legiranje* je proces do kojeg dolazi pri višestrukum, uzastopnom spajanju i lomljenju zrna reaktanata, tokom mlevenja smeše prahova u mlinu. Na ovaj način se stvaraju uslovi za odigravanje hemijske reakcije u čvrstom stanju i na nižim temperaturama, bez potrebe za spoljašnjim grejanjem. Reakcija se može odvijati, ili u stacionarnom, ili u režimu samorasprostruće reakcije. U prvom slučaju dolazi do stvaranja nanočestica, a u drugom, zbog visokih temperatura, do nastanka čestica mikronskih dimenzija [Tsuzuki T., 2004].

Veličina kristalita prahova dobijenih mehanohemijском metodom, najčešće se kreće između 5–20 nm, a njihova kristalna struktura je obično u određenoj meri narušena [Zdujić M.V., 2001].

Mehanohemijske metode su jednostavne i njima se može tretirati veliki broj različitih neorganskih materijala, uključujući tu keramičke materijale, nanokristalne i amorfne supstance, cement, razne legure, kompozite i intermetalna jedinjenja. Oprema koja se uporebljava nije skupa. Nedostaci metode su što se njome dobijaju čestice sa kristalnom strukturom koja ima dosta defekata, postoji mogućnost da dođe do aglomeracije i kontaminacije praha, a raspodela veličine dobijenih čestica je obično široka.

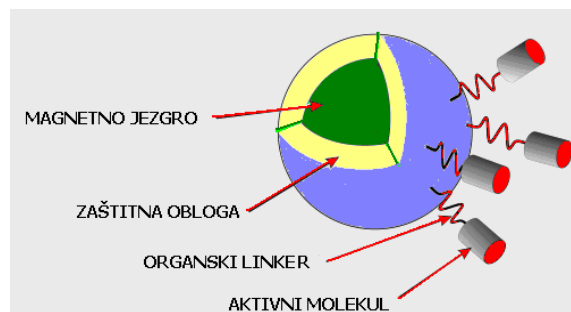
### 2.3. Oblaganje i funkcionalizacija nanočestica

Dizajniranje magnetne nanočestice (MNČ) za primene u medicini zahteva fundamentalno razumevanje njene prirode, kao biokompatibilnog entiteta, koji neće povrediti pacijenta, bilo da se ona koristi kao farmaceutski preparat, koji se kreće kroz telo u potrazi za svojim ciljem, ili kao kontrastni agens koji omogućava prikazivanja različitih biomedicinskih slika. Složene NČ se obično sastoje od više slojeva, ili više faza, koje sadrže različite komponente koje omogućavaju da NČ ispuni željenu funkciju u organizmu. Čestice koje imaju prazno jezgro obično se nazivaju "šuplje čestice". Kada je određena faza u nizu od više njih prazna, struktura se naziva "poroznom". Faza koja je raspršena u nekom sloju, i proteže se kroz ceo sloj, naziva se "filtrirana struktura" i obično ima veliki uticaj na svojstva celog sloja.

Raspon primena magnetnih NČ u biomedicini zavisi od njihove stabilnosti u rastvorima pri različitim fiziološkim pH vrednostima, i stepena do kog se njihove površine mogu funkcionalizovati. Pošto se gotovo sva tkiva i ćelije u organizmu snabdevaju preko krvotoka, intravenozno ubrizgavanje je metod unošenja koji obezbeđuje dopremanje NČ do najvećeg broja različitih tkiva i organa, pa je stabilnost NČ u krvi, od posebne važnosti. Da bi NČ ispunile svoju namenu u organizmu, one ne smeju da izazovu imunološke reakcije, i budu brzo izbačene, od strane mononuklearnih fagocita (MPS, reticuloendotelni sistem), procesima opsonizacije i endocitoze/fagocitoze. Takođe, one ne treba da dožive prerani metabolizam, da budu apsorbovane u tkiva kojima nisu namenjene, niti da budu previše toksične, osim za ciljne ćelije i tkiva (kao što je recimo tumor). Hemijski sastav, veličina i oblik, hidrofobičnost/hidrofiličnost i površinsko naelektrisanje NČ su pri tome od velikog značaja [Pitkethly M.J 2003]. Molekuli i atomi u površinskom sloju NČ su obično aktivniji od onih u unutrašnjosti, čak i u slučaju kada je čestica homogena. Iako je ova osobina površinskog sloja često sama po sebi korisna, da bi se NČ osposobile za specifične primene, one moraju da se prilagode pomenutim zahtevima "opstanka" u organizmu, a mora da se obezbedi i njihovo unošenje samo u željene ćelije i tkiva. Zbog toga se njihova površina modifikuje na različite načine,

najčešće tako što se NČ oblažu spoljašnom oblogom, čije karakteristike zavise od svrhe koju NČ u organizmu treba da ostvari.

Prilikom projektovanja obloga, mora se uzeti u obzir biokompatibilnost korišćenog materijala, njegova molekulska težina, površinska gustina, i arhitektura (linearan odnosno razgranat), koloidna i mehanička stabilnost, otpornost na oksidaciju, mogućnost funkcionalizacije i fagocitna otpornost. Pored toga, materijali koji se koriste za oblaganje treba da budu hidrofilni i da stabilizuju nanočestice u vodenj sredini pri fiziološkoj pH. Iako su hemijski procesi za funkcionalizaciju NČ dobro poznati, potrebno je rešiti još dosta problema koji se tiču njihove biokompatibilnosti, stabilnosti i usmeravanja. Osim toga, oblaganje i strategije imobilizacije mogu na različite načine da utiču na magnetne osobine nanočestica, recimo preko debljine i hidrofobnosti obloge [Duan H.W., 2008; LaConte L.E.W., 2007].



**Slika. 2.3.1.** Tipičan dizajn magnetne nanočestice za primene u biotehnologiji [McBain S.C., 2008].

Iako su  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanočestica intenzivno proučavane sa raznih aspekata, priprema disperzije  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanočestica u tečnom/vodenom medijumu za biomedicinske primene još uvek predstavlja izazov. Izoelektrična tačka  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , na kojoj postoji jednak broj pozitivnih i negativnih površinskih naelektrisanja je na pH 6.8. U slučaju kada nisu obložene,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanočestice imaju tendenciju da se spajaju (Van der Valsove sile, magnetna interakcija) kako bi smanjile svoju veliku površinsku energiju ( $100 \text{ dyn/cm}^2$ ) i minimizirale magnetnu energiju sistema. Jaka tendencija  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  SPION ka aglomeraciji, dovela je do toga da se one retko koriste u biomedicini nemoifikovane, tj. "gole", nego im se, za te

primene, površina oblaže, za vreme, ili posle sinteze. Odbojne sile između molekula obloge sprečavaju aglomeraciju i omogućavaju stvaranje termodinamički stabilne koloidalne suspenzije, poznate kao ferrofluid. Obično se koriste dva mehanizma stabilizacije MNČ: elektrostatička stabilizacija i sterična stabilizacija. Elektrostatička stabilizacija se postiže promenom izoelektrične tačke nanočestica, što dovodi do toga da se površine dve čestice naelektrisane istom vrstom naelektrisanja odbijaju. Elektrostatička stabilizacija je osetljiva na pH rastvora i naelektrisanje jona, pa je njena primena u biomedicini ograničena. Do sterične, ili entropične stabilizacije, dolazi kada se obloga koja sadrže funkcionalne grupe, kao što su karboksilna kiselina, amini, fosfati i sulfati, fizički adsorbuje, ili hemijski veže za površinu NČ. Ovaj metod se najčešće koristi za pripremu ferrofluida za primene u biomedicini. Obloga pomaže i da se ograniči rast magnetnih čestica jezgra, da se pomoću steričnog odbijanja molekula obloge stabilizuje disperzija NČ u nosećem fluidu, tj. spreči njihova aglomeracija i taloženje, i da se ublaži proces opsonizacije NČ u organizmu, obično to efikasnije što je lanac makromolekula obloge duži.

Kada se NČ koriste za ciljane isporuke lekova (target drug delivery), kao obloge se najčešće koriste lipozmi, mali organski molekuli i polimeri [Pitkethly M.J., 2003].

Lipozomi su "objekti" koje formiraju polarni fosfo-lipidi nerastvorljivi u vodi, koji se u vodi samo-organizuju u koncentrične, ili zatvorene membrane. Oni se obično dobijaju tako što se odgovarajuća količina fosfo-lipida rastvori u organskom rastvaraču, koji se zatim otpari. Nakon toga se vodom deluje na osušeni sloj lipida, što dovodi do spontanog formiranja multi-lamelarnih lipozoma različite veličine, koji mogu da se pretvore u jedno-lamelarne odgovarajućim procesom sonifikacije. Dimenzije lipozoma se kreću od 50 nm, za najmanje jedno-lamelarne, do nekoliko mikrometara za multi-lamelarne.

Micele su agregati sa sferoidalnom strukturom, koji se formiraju u rastvoru tako što je hidrofobno jezgro zaštićeno od vode omotačem od hidrofilnih grupa. Prečnik im uglavnom ne prelazi 50 nm [Raković D., 2010]. Lipozomske i micelarne obloge obezbeđuju laku i jednostavnu enkapsulaciju i modifikaciju površine NČ, kao i sekvencijalnu i zaštitu lekova od degradacije do njihovog aktiviranja u ciljnim ćelijama i organima. Lekovi mogu da se smeste u vodenu fazu, unutar lipozoma, ili između

njegovih slojeva, zavisno od njihove hidrofilnosti/hidrofobičnosti. Smeštanje NČ unutar lipozoma može se izvesti na dva načina:

- tako što se u vodi rastvorljivi SPION zatvara u „vodeni“ centar lipozoma nakon sinteze, ili tako što se hidrofobni SPION oblaže micelama.
- direktnim taloženjem (precipitacijom) SPION-a u jezgru lipozoma. Na taj način se dobijaju visoko-uniformne nanočestice prečnika oko 15 nm.

Kada se u lipozome ugrade i magnetne čestice, moguće je ugrađene lekove osloboditi grejanjem magnetnih čestica u naizmeničnom magnetnom polju, slično kao kod Hipertermije, što razara oblogu oko leka i tako ga oslobađa. Primene u ciljanom prenošenju lekova mogu se kombinovati sa primenama istih čestica kao kontrasta za MRI [Boyer C., 2010].

Već je rečeno da neobložene SPION nisu stabilne u vodi i fiziološkom rastvoru, i da pri normalnim pH vrednostima brzo dolazi do njihove aglomeracije i taloženja [Duan H.W., 2008]. Zato se one za upotrebe *in vivo* obložu odgovarajućom oblagom, čija je funkcija da se izbegne aglomeracija, obezbede hemijske veze za molekule leka, i (ili) ligande, i ograniči interakcija SPION sa nespecifičnim ćelijama. Za mnoge biološke primene oblaganje polimerima ima prednost nad oblaganjem malim organskim molekulima, jer polimeri omogućavaju bolju koloidnu stabilnost njima obloženih čestica i bolju dodatnu funkcionalizaciju drugim molekulima [Boyer C., 2010]. Biorazgradljivi polimeri koji služe za ciljanu isporuku lekova se definišu kao sfere, ako su sačinjeni od čvrste polimerne mreže, ili kao kapsule, ako je centralna oblast okružena polimernom oblogom [Pitkethly M.J., 2003]. Zavisno od odabranog polimernog materijala, koriste se i odgovarajuće metode za njegovo dobijanje i oblaganje NČ, recimo, sinteza pomoću emulzije ulje/voda, polimerizacija na granici faza i precipitacija u heterogenom medijumu. Smeštanje leka se obično vrši tokom samog procesa polimerizacije, a njegovo oslobađanje kontroliše, ili brzina difuzije leka kroz polimernu oblogu, ili brzina erozije obloge, ako je polimer biorazgradljiv. U poređenju sa lipozomima, polimeri omogućavaju bolju kontrolu brzine oslobađanja leka, a obično su i stabilniji u biološkim fluidima.

Sličan pristup koristi se i za oblaganje MNČ koje se koriste kao kontrasti za snimanje magnetnom rezonancom MRI, i u hipertermiji [Pitkethly M.J., 2003]. Te MNČ su obično



superparamagnetne, sa dimenzijama od oko 10 nm, ili manje. One se najčešće oblažu tokom samog procesa dobijanja, recimo koprecipitacije odgovarajućih soli gvožđa u alkalnom vodenom rastvoru, tako što se rastvoru dodaju hidrofilni makromolekuli, kao što je oligosaharid dekstran, karboksi-dekstran, i drugi njegovi derivati, citozan, skrob, heparin, ili albumin. Materijali koji se najčešće koriste za oblaganje nanočestica oksida gvožđa za medicinske primene su:

**Dekstran** je polisaharidni polimer koji se sastoji isključivo od jedinica [-D-] glukopiranoze, a može da ima različite dužine lanca i razgranatost. Ovaj polimer je biokompatibilan, biorazgradiv i polaran, zbog čega se široko primenjuje kao sredstvo za oblaganje nanočestica. Dekstran manje molekularne težine se bolje adsorbuje na površini NČ od onoga sa većem molekularnom težinom, a može se desorbovati zagrevanjem na 120 °C, ili se može rastvoriti. Da bi se sprečilo ovako lako uklanjanje dekstrana sa NČ, ponekad mu se dodaje umreživač, kao što je epihloridrin. Oblaganje NČ dekstranom obično se radi *in situ* tehnikama [Molday R.S., 1982], a da bi se kontrolisala hidrodinamička veličina čestica, upotrebljavaju su različiti oblici polimera dekstrana, kao što su karboksi-dekstran i karboksi-metil dekstran [Laurent S., 2008]. Ispitivane su različite mogućnosti kliničke primene NČ čestica obloženih dekstranom [Molday R.S., 1982, Mornet S., 2005, Weissleder R., 1989, Weissleder R., 1990, Stark D.D., 1998].

**Citozan** je netoksičan, biokompatibilan i bioapsorbilan, katjonski, hidrofilni polisaharid, i kao takav je vrlo interesantan materijal za farmaceutsku industriju [Janes K.A., 2001]. Sastoji se od ponavljajućih jedinica glukozamina i N-acetil-glukozamina, u odnosu koji zavisi od stepena deacetilacije polimera. Njegova bioadhezivnost ga čini idealnim materijalom za izradu obloga u primenama koje zahtevaju mukozno dejstvo lekova, jer on olakšava prenos lekova preko sluznog epitela. Citozan ima i amino i hidroksilne funkcionalne grupe, koje omogućavaju njegovo raznovrsnije vezivanje za površinu NČ, a time i raznovrsniju i lakšu funkcionalizaciju NČ za medicinske primene, kao što su MRI, hipertermija i ciljana isporuka lekova [Kim E.H., 2005].

Zbog slabe rastvorljivosti i neodgovarajućih pH vrednosti potrebnih za precipitaciju, direktno oblaganje citozanom je prilično teško [Kumar M., 2004], pa se NČ oblažu citozanom tako što se on adsorbuje na već nanetu oblogu od oleinske kisline. Na ovaj način mogu se dobiti sferne čestice prečnika od oko 15 nm [Kim E.H., 2005].

Odgovarajući nanokompoziti citozan/magnetit mogu se sintetisati i u magnetnom polju, *in-situ* hibridizacijom. Nanočestice Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, koje su sonohemijским metodom ubačene u mikrosfere od citozana, nisu se pokazale kao dobri MRI kontrastni agensi, jer su njihove hidrodinamičke dimenzije, sa prečnikom koji se kretao u rasponu od 100 do 150 μm, bile prevelike.

**Limunska kiselina (CA)** C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, je mali, biokompatibilni organski molekul koji ima tri karboksilne i jednu hidroksilnu grupu. On može da se veže za Fe-OH molekule koji se nalaze na površini nanočestica oksida gvožđa, pomoću svojih negativno naelektrisanih karboksilnih grupa, ostavljajući jednu ili dve od njih slobodne za dalju funkcionalizaciju [de Sousa M.E, 2013]. Ta funkcionalizacija se može ostvariti fluorescentnim bojama, proteinima, lekovima ili hormonima, i ona može da omogućiti usmeravanje NČ i njihove različite primene u biološkim sistemima [Goodarzi B., 2004]. Sa koliko karboksilnih grupa će se limunska kiselina vezati za površinu nanočestica magnetita, zavisi od dostupnog prostora i zakrivljenosti površine NČ [Goodarzi B., 2004]. Utvrđeno je da se dodavanjem limunske kiseline u različitim fazama procesa dobijanja NČ i pri različitim temperaturama, može podešavati veličina jezgra nanočestica i kontrolisati njihov hidrodinamički radijus [Li L., 2013].

Najmanje jedna karboksilna grupa ostaje izložena rastvaraču i obezbeđuje sterično odbijanje i koloidnu stabilnost NČ, ali, na drugoj strani, smanjuje specifičnu apsorbovanu snagu (SAR) pri hipertermiji [de Sousa M.E, 2013]. Kako je molekul limunske kiseline mali, hidrodinamička veličina njome obloženih nanočestica se ne uvećava mnogo, što može biti od značaja u različitim terapijskim primenama [de Sousa M.E, 2013]. Utvrđeno je da oblaganje limunskom kiselinom ne utiče na superparamagnetno ponašanje nanočestica oksida gvožđa veličine između 9 i 25 nm [Li L., 2013].

Zbog pomenutih dobrih osobina, limunska kiselina se široko koristi kao materijal za oblaganje NČ za biomedicinske primene.

**Oleinska kiselina** je još jedan organski molekul koji se često koristi za oblaganje feritnih nanočestica [Park J., 2004; Bloemen M., 2012; Răcuciu M., 2010]. Tokom dobijanja NČ, oleinska kiselina može da formira zaštitni monosloj na njihovoj površini i tako omogući proizvodnju visoko uniformnih i monodisperznih čestica. U odnosu na neobložene NČ oksida gvožđa, prosečan hidrodinamički prečnik NČ obloženih oleinskom kiselinom se povećava za oko 5 nm, dok magnetizacija zasićenja ( $M_S$ ) ostaje gotovo nepromenjena, što je veoma dobro [Wu W., 2008]. Zbog toga MNČ koje su obložene oleinskom kiselinom na optimalan način, imaju malu citotoksičnost i veliku vrednost SAR pri hipertermiji. Na taj način, ove čestice, koje interaguju uglavnom sa membranom tumorskih ćelija, omogućavaju njihovo ubijanje tokom hipertermije procesom ćelijske apoptoze [Jadhav N.V, 2013]. Pokazalo se da koloidna stabilnost nanočestica obloženih oleinskom kiselinom, dispergovanih u različitim vodenim sredinama, uključujući tu i humani serum i plazmu, jako zavisi od pH rastvora [Bloemen M., 2012].

**Polietilen glikol (PEG)** se zbog svojih hidrofilnih, neantigenskih i neimunogenih karakteristika, često koristi kao materijal za oblaganje NČ. PEG je rastvorljiv u polarnim i nekim nepolarnim rastvaračima, biokompatibilan i prilično hemijski stabilan [Karakoti A.S., 2011]. Raspršeni u rastvaraču PEG lanci se snažno odbijaju i poboljšavaju koloidnu stabilnost njima obloženih čestica [Barrera C., 2009], pa PEG-om obložene NČ u rastvaračima, kao što je voda, formiraju stabilne ferofluide. Hidrofilnost PEG-a sprečava interakciju površine njime obloženih NČ sa ćelijama i proteinima, i tako umanjuje njihovu potencijalnu toksičnost. PEG sprečava vezivanje proteina za NČ, tim efikasnije što su njegova gustina na NČ, i njegova molekularna masa veće [Boyer C., 2010]. Zbog svega navedenog PEG obloga pomaže produžavanju vremena zadržavanja NČ u krvotoku i reguliše njihovu interakciju sa ćelijskim membranama [Gupta A.K., 2004]. Određeni PEG derivati poboljšavaju i unos NČ u ćelije, tako što poboljšavaju rastvorljivost njima obloženih čestica u lipidnom dvostrukom sloju ćelijske membrane. Tako oblaganje PEG-

om može da poboljša unos NČ i u ćelije raka. PEG-om obložene SPION ne utiču na adhezivno ponašanje ćelija u ljudskim fibroblastima, a njihovo unošenje u endosome pruža mogućnost za izuzetno efikasno obeležavanje različitih ćelija. MRI eksperimenti na živim pacovima su pokazali da su SPION obložene PEG-om biokompatibilne i da imaju dugo vreme cirkulacije u organizmu, što ih potencijalno čini upotrebljivim za MRI kontrastne agense.

**Poli(laktid-ko-glikolna kiselina) (PLGA)** se, zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradivosti i neotrovnosti, dosta proučava za primene u inženjerstvu tkiva i usmerenom dejstvu lekova. Produkti degradacije PLGA se iz organizma izbacuju uobičajenim metaboličkim putem. Međutim, površinski omotač od PLGA značajno smanjuje magnetizaciju zasićenja ( $M_s$ ) magnetnih nanočestica, što može da bude ozbiljan problem za MRI primene i hipertermiju.

**Polietilenimin (PEI)** je polimer rastvorljiv u vodi, koji može da se formira i u lineranom i razgranatom obliku, i koji se u poslednje vreme dosta koristi za oblaganje SPION [Veiseh O., 2010, Kievit F.M., 2009, McBain S.C., 2008]. Zbog velikog broja „imin“ grupa raspoređenih duž lanca, PEI omogućava aktiviranje elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanom fosfatnom „kičmom“ DNA, i njeno „kačenje“ na površinu čestice. Zato se PEI koristi u isporuci gena, unutarćelijskom prometu i ćelijskoj transfekciji, što su najčešće primene DNA i siRNA nukleotida. Takođe je pogodan za *in vivo* transfer gena u mozak odraslih sisara [McBain SC, 2007]. PEI može da se veže za SPION korišćenjem *in situ* metoda, ali i adsorpcijom, ili graftingom (kalemljenjem), nakon sinteze. Koloidna stabilnost PEI u biološkim rastvorima je slaba.

**Kopolimeri** nastaju polimerizacijom velikog broja različitih monomera od kojih nasleđuju njihove funkcionalnosti, ali takođe imaju i kombinacije osobina homopolimera koje formiraju odgovarajuće monomerne vrste. Blok-kopolimeri obično formiraju nekoliko veza sa SPION, što povećava stabilnost vezivanja obloge, ali može da smanji

njenu gustinu. Postojanje više funkcionalnih grupa u njihovoj strukturi, omogućava njihovu dalju višestruku i raznovrsnu funkcionalizaciju. Arhitektura samog kopolimera je veoma važna, jer postojanje više funkcionalnih grupa dozvoljava i interakciju među polimerima, pa može da dođe do flokulacije. Da bi se to izbeglo, funkcionalne grupe u blok-kopolimerima treba da budu relativno kratke, ne duže od nekoliko molekularnih jedinica.

Jedna od mogućih alternativa linearnim PEG kopolimerima su polimeri (i kopolimeri) poly(oligoethylene oxide (meth)acrylate), koji formiraju oblik “četke”, sa kratkim PEG lancima zakačenim za akrilnu strukturu “kičme”, koja povezuje celi molekul [Boyer C., 2010]. Veiseh, sa saradnicima, je proizveo novu polimernu strukturu i funkcionalnost spajanjem PEI i PEG polimera [Veiseh O., 2010]. U tu svrhu su ispitivani i blok-kopolimeri poloxamer i poloxamine. Njihov centralni region je sačinjen od hidrofobnog poly(propylene oxide) PPO, koji se vezuje za površinu čestice, a on je okružen sa hidrofilnim lancima poly(ethylene oxide), PEO, koji su okrenuti u rastvor. Kako bi se pojačala veza između kopolimera i čestice, često se primenjuje i proces kojim se PEO transformiše u PEG [Pitkethly M.J, 2003].

Postoje dve opšte procedure pomoću kojih se površine SPION oblažu polimerima [Boyer C., 2010]. Kod prve od njih (“oblaganje iz”), odgovarajuća polimerna klica se kači na SPION površinu, i na njoj naknadno dolazi do rasta polimera. U drugoj proceduri, (“oblaganje na”), već formiran polimer se vezuje za površinu SPION. “Oblaganje iz” procedura omogućava da se formira polimerna obloga veće gustine, dok “oblaganje na” procedura omogućava bolju kontrolu strukture polimera i nudi veći izbor mogućnosti za njegovu dalju funkcionalizaciju.

Tabela 2.1. Osobine prirodnih i sintetičkih polimera koji se koriste za oblaganje magnetnih nanočestica. [McBain S.C., 2008]

Polimer	Hidrofobnost	Primene	Reference
<i>Prirodni polimeri</i>			
<u>Karbohidrati</u>			
Dekstran	Hidrofilan	Isporuka lekova Radioimunotestovi MR osikavanje Hipertermija	<a href="#">Yuan et al 2006</a> <a href="#">Li et al 1996</a> <a href="#">Morales et al 2003</a> <a href="#">Jordan et al 1999</a>
Skrob	Hidrofilan	Ciljanje tumora, MR osikavanje, Osikavanje X zracima	<a href="#">Alexiou et al 2001</a>
<u>Proteini</u>			
Albumin	Hidrofilan	MR osikavanje	<a href="#">Roser et al 1998</a>
RGD	Hidrofilan	Fluorescentno i MR osikavanje	<a href="#">Montet et al 2006</a>
<u>Lipidi</u>	Hidrofoban	Imunotestovi	<a href="#">Matsunaga and Takeyama 1998</a>
<i>Sintetički polimeri</i>			
Polietilenglikol (PEG)	Hidrofilan	MR osikavanje  Isporuka lekova	<a href="#">Kohler 2005</a> <a href="#">Veiseh et al 2005</a> <a href="#">Kohler 2005</a> <a href="#">Gupta and Curtis 2004</a>
Polivinil alkohol (PVA)	Hidrofilan	Isporuka lekova	<a href="#">Schulze et al 2005</a> <a href="#">Schulze et al 2006</a>

Prisustvo Fe-OH grupa na površini SPION omogućava da se za njih, različitim postupcima, vežu različite funkcionalne grupe [Boyer C., 2010]. Grupa karboksilne kiseline COOH, je jedna od funkcionalnih grupa koja se, kao vezivna, često koristi pri oblaganju SPION. Njom se na SPIONs vezuju, na primer, oleinska i limunska kiselina [Boyer C., 2010]. Ova veza je prilično slaba i može se lako prekinuti na povišenoj temperaturi, ili u prisustvu drugih aktivnih grupa.

Fosfonska kiselina  $H_3PO_3$ , tj.  $HPO(OH)_2$  takođe ima jak afinitet prema površini SPION. Fe-O-P veza, koja se pri tome formira, je jača od veze koju formira karboksilna grupa, a omogućava i veću gustinu prekrivanja površine čestice.

Zahvaljujući pojačanom prekrivanju orbita elektrona iz benzenovog prstena, Dopamin ( $C_8H_{11}NO_2$ ) se takođe dobro vezuje za površinu SPION. Vezivanje pomoću ove grupe omogućava oblaganje SPION različitim peptidima i amino-kiselinama, ali je primećena određena nestabilnost ove veze u vodi i biološkim tečnostima.

Vezivanje obloge za NČ preko uobičajenih «vezivnih» grupa je obično slabo i umanjuje efikasnost dalje funkcionalizacije [Pitkethly M.J., 2003]. Ovaj problem može da se prevaziđe tako, što se SPION prvo tretiraju silanol grupama ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$ ), koristeći njenu reaktivnost sa alkoholom, i tako formira tanak sloj silicijum dioksida na njihovoj površini [Boyer C., 2010]. Pri tome mora da se pazi da prilikom formiranja  $\text{SiO}_2$  sloja ne dođe do nepovratne agregacije SPION [Boyer C., 2010]. Negativno naelektrisanje na  $\text{SiO}_2$  omogućava se njime obložene NČ efikasno rasprše, i da se tako dobiju disperzije koje su stabilne i u vodi, i u nevodnim rastvorima. Osim toga, obloga od silicijum dioksida je biokompatibilna, netoksična i jako hidrofilna, što usporava uklanjanje nanočestica od strane retikuloendotelnog sistema, u jetri, slezeni i koštanoj srži. Ona takođe štiti magnetno jezgro od biodegradacije i oksidacije i tako pomaže da ne dođe do pogoršanja njegovih magnetnih karakteristika. Na ovaj sloj  $\text{SiO}_2$  posle može da se veže neka organska obloga, recimo dekstran. Silanol grupa je idealna i za kovalentno vezivanje određenih liganda, kao što su amini, koji se na površinu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanočestica obloženih ovom oblogom mogu naneti pomoću hidrolize, ili kondenzacijom organosilana (kao što je aminopropiltrietsilan). Veza između SPION i obloge može da se ojača i formiranjem “umreženih” (cross-linked) nanočestica. Mana ove procedure je što je neophodno intenzivno naknadno prečišćavanje, kako bi se eliminisali tragovi reaktivnih supstanci korišćenih u procesu umrežavanja, i tako omogućila primena ovih čestica *in vivo*.

### 3. PONAŠANJE NANO-ČESTICA U LJUDSKOM ORGANIZMU

Ponašanje NČ *in vivo* je složeno i na njega, pored osobina samih nanočestica, utiču i konvekcija u krvi, difuzija u krvi i tkivu, ekstravazacija tj. prolaženje sastojaka krvi i limfe iz krvnih, ili limfnih sudova i njihovo prodiranje u tkiva i telesne šupljine i različiti spoljašnji uticaji. Mononuklearni fagocitne sistem (MPS) ima zadatak da štiti organizam od bolesnih ćelija, agresivnih mikroorganizama i stranih čestica i stoga predstavlja osnovni faktor koji utiče na bioraspodelu nanočestica u organizmu. [Morenet S., 2004]. Prvi korak u delovanju MPS sistema je proces opsonizacije, pri kome se različite klase proteina (imunoglobulini, proteini, fibronectin, itd...), adsorbuju na površinu bilo kog objekta koji je prepoznat kao invazioni. Ti proteini mogu da komuniciraju sa posebnim receptorima monocita i makrofaga, i tako im omogućavaju da prepoznaju strane čestice. Čestice koje se razlikuju po veličini, obliku, i karakteristikama površine, su izložene različitom tretmanu tokom procesa opsonizacije, pa farmako-kinetika i ćelijski unos NČ *in vivo*, uključujući i njihovu sposobnost da savladaju biološke barijere, značajno zavisi od njihovih fizičko-hemijskih svojstava, morfologije, hidrodinamičke veličine, naelektrisanja i drugih karakteristika površine. Zato je oblaganje površine terapijskih NČ odgovarajućom oblogom od suštinske važnosti. Tip obloge i dužina lanca polimera obloge određuju hidrodinamičku veličinu i koloidnu stabilnost NČ i igraju značajnu ulogu u njihovoj bioraspodeli.

Akumulacija MNČ u organizmu proučavana je u eksperimentima na životinjama i kliničkim eksperimentima na ljudima na osnovu vizuelnog posmatranja, pomoću snimanja magnetnom rezonancom (MRI) i histoloških studija. Pokazalo se da magnetne sile mogu da koncentrišu mikro i nanočestice *in vivo*, ali da detalje te pojave nije lako eksperimentalno odrediti. MRI i vizuelno posmatranje nemaju rezoluciju koja može da pokaže u kojim su krvnim sudovima magnetne sile jače od protoka krvi i gde tačno u samim krvnim sudovima dolazi do akumulacije MNČ. Kako se histološke studije obavljaju nakon žrtvovanja životinje i zaustavljanja krvi, one mogu samo delimično da odgovore na ova pitanja.

Obimna istraživanja su pokazala je da sledeće fizičko-hemijske osobine nanočestica značajno utiču na njihovo ponašanje u organizmu:



## **Veličina i hidrodinamička veličina**

Na bioraspodelu NČ značajno utiču i veličina jezgra, i veličina i vrsta obloge. Te veličine se mogu kontrolisati izborom metoda sinteze NČ, izborom materijala obloge i kontrolom različitih parametara tokom procesa sinteze i oblaganja NČ [Cheng J., 2007]. Utvrđeno je da vreme preživljavanja NČ u krvi opada sa rastom veličine jezgra čestice, dok povećanje molekularne težine, recimo PEG ovojnice, značajno povećava vreme preživljavanja. Rasponi veličina jezgra i obložene NČ određuju opšte mehanizme njihovog čišćenja iz organizma, dok ostale fizičke i hemijske karakteristike utiču na detalje ponašanja NČ u organizmu. Čestice mikrometarskih dimenzija ne mogu da prođu kroz kapilare, zbog čega moraju da se ubrizgavaju što je moguće bliže regiji u organizmu koja treba da bude tretirana, dok NČ mogu, pa su zato pogodne za sistemske primene. Na taj način hidrodinamička veličina reguliše koncentraciju NČ u krvnim sudovima, utiče na mehanizam njihovog uklanjanja iz organizma i određuje propusnost NČ pri njihovom izlasku iz krvotoka.

NČ sa prečnikom 20-100 nm imaju najduže vreme preživljavanja u organizmu, a one sa veličinom između 30 i 150 nm, najviše se talože u jetri, slezini, koštanoj srži, srcu, bubrežima i stomaku. Čestice veće od 200 nm efikasno uklanjaju fagocitne ćelije u slezini, ili makrofagi u krvi, dok se čestice manje od 10 nm, uklanjaju procesom renalnog čišćenja. Ove male NČ MPS sistem teže prepoznaje, jer je apsorpcija proteina na njihovoj površini slabija, što dovodi do njihovog slabijeg uklanjanja u jetri i produženja vremena života u krvotoku. NČ ovih veličina sakupljaju retikulkoendotelne ćelije, uključujući tu i limfne čvorove i koštanu srž [Pankhurst Q.A., 2003].

Prema jednom od modela [Decuzzi P., 2010], manje NČ sferičnog oblika lakše difunduju, povećavajući koncentraciju u središtu krvnog suda, i na taj način ograničavaju interakciju sa endotelnim ćelijama i produžavaju vreme cirkulacije nanočestica u krvotoku.

## **Oblik**

U nekoliko eksperimentalnih studija o uticaju oblika NČ na bioraspodelu, uočeno je da anizotropne NČ bolje izbegavaju eliminaciju od sfernih, što produžava vreme njihovog preživljavanja u organizmu, i utiče na njihovu bioraspodelu [Veisoh O., 2007, Liu Z.,

2007]. Tako se sferne NČ zlata tri puta više apsorbuju u ćelijama nego izdužene, a uočeno je, da za razliku od sfernih, gde je granica 200 nm, eliptične čestice veličine i do 1000 nm mogu da prođu kroz slezinu. I teorijski proračuni ukazuju da čestice izduženog oblika imaju duže vreme poluživota u organizmu nego sferne. Ovi neočekivani rezultati protumačeni su samo-organizacijom eliptičnih čestica u toku telesnog fluida.

U jednoj od studija, [Geng Y., 2007], autori su pokazali "*in vivo*" da je produžena cirkulacija nanocevičica u krvi, u korelaciji sa povećanjem odnosa njihove dužine i visine. "*In vivo*" analiza štapićastih magnetnih nanočestica je pokazala da i one imaju duže vreme cirkulacije krvi nego sferične nanočestice. Ovi neočekivani rezultati protumačeni su samo-organizacijom izduženih čestica u toku telesnog fluida, Pomenuti rezultati su obačavajući, ali je potrebno još mnogo istraživanja da bi se identifikovali svi aspekti koji imaju bitan uticaj na farmakokinetiku nanočestica.

## **Obloge**

Hemija površine NČ, što podrazumeva i sastav obloge i naelektrisanje površine, je kritična osobina koja utiče na njihovu apsorpciju MPS ćelijama i značajno utiče na njihovo zadržavanje u krvotoku i njihovu bioraspodelu [Alexis F., 2008]. Zbog toga, vrsta obloge i njene karakteristike, koje određuju i hidrodinamičku veličinu NČ, imaju značajnu ulogu u bioraspodeli NČ [Roohi F., 2012]. Povećanje molekularne težine obloge značajno povećava vreme preživljavanja, i jako da utiče na kinetiku NČ u krvi [Roohi F., 2012; Almeida J.P., 2011]. Proučavanja NČ magnetita obloženog različitim oblogama pokazalo je da čestice sa većim hidrodinamičkim prečnikom imaju niži stepen ćelijskog unosa, i da efikasnost prolaženja NČ kroz membrane eritrocita zavisi od sposobnosti obloge nanočestica da se efikasno veže za membranu ćelije. Otkriveno je i da DMSA (dimercaptosuccinic acid) obloga može da promeni unutarćelijski metabolizam kalcijuma u glatkim vaskularnim mišićnim ćelijama [Soler M.A.G., 2007], a da oblaganje sa amnio-PVA omogućava, dok oblaganje sa carboxy-PVA sprečava unutarćelijsko nakupljanje SPION [Mehlhorn A., 2006]. Uticaj obloge na magnetne osobine NČ je manje izražen [Roohi F., 2012; Almeida J.P., 2011].

Često je poželjno izabrati oblogu koja omogućava dodatnu funkcionalizaciju NČ i dozvoljava vezivanje liganada za ciljanje i/ili terapeutika. Oblaganje može da se koristi i da bi se olakšala endocitoza: NČ oksida gvožđa hidrodimačkog prečnika 8 nm, obložene monomerom citrita u ćeliju ulaze procesom fagocitoze, dok iste nanočestice obložene karboksidedkstranom, sa hidrodinamčkim prečnikom od 31 nm, u ćeliju ulaze pinocitozom [Mandarano G., 2010]. Obloga NČ ima i direktan uticaj na opsonizaciju proteina, koji povećavaju verovatnoću da dođe do receptorom-posredovane fagocitoze u tkivima kao što su jetra ili slezina. Hidrofilni polimeri, kao što je PEG, koji uz to omogućavaju i sterično odbijanje između NČ, slabe ove nespecifične interakcije proteina.

### **Naelektrisanje i hidrofobnost**

Bioraspodela NČ zavisi i od naelektrisanja i hidrofobnosti njihove površine, jer ove veličine utiču na interakcije NČ sa plazma proteinima, ekstracelularnom matricom, imunim sistemom i neciljanim ćelijama [Davis M.E., 2002].

Vrsta i količina proteina koji se vežu za nanočestice jako zavise od hidrofobičnosti/hidrofilnosti polimera obloge. Hidrofobne i naelektrisane NČ imaju tendenciju da vežu veći broj proteina (IgG, albumine, apoliproteine, fibrinogen), pa su podložnije procesu opsonizacije i imaju kraće vreme cirkulacije u organizmu, dok čestice sa hidrofilnom površinom vežu samo albumine [Chouly C., 1996]. Hidrofobne grupe na površini NČ, mogu nakon injekcije da indukuju aglomeraciju NČ, što takođe može da dovede do njihovog bržeg uklanjanja od strane MPS [Veiseh O., 2007].

Veće neelektrisanje površine obloge dovodi do većeg vezivanja proteina iz plazme. Negativno naelektrisane nanočestice vežu proteine koji imaju izoelektronske tačke veće od 5.5, kao što je IgG, a pozitivno naelektrisane nanočestice vežu proteine koji imaju izoelektronske tačke manje od 5.5, kao što je albumin. Pozitivno naelektrisane NČ generalno imaju veće brzine fagocitoze nego neutralne, ili negativno naelektrisane NČ. One mogu da se vežu i sa neciljanim ćelijama (obično negativno naelektrisanim), što dovodi do njihovog nespecifičnog unosa. Pozitivno naelektrisani polimeri, kao što je polietileneimin, jako interaguju sa proteinima, pa su cito-toksični, i nisu podnesni za *in-vivo* primene. Međutim, oni potencijalno mogu da budu dobri prenosiooci DNA i RNA.

Jaka negativna naelektrisanja na površini NČ su takodje štetna jer mogu da dovedu do njihove povećane apsorpcije u jetri [Schlachter E.K., 2011].

### **Biološke barijere**

Pored pomenutih problema koje imaju u krvotoku i specifičnim organima, NČ moraju da savladaju i različita anatomska ograničenja, koja česticama određenih veličina i osobina ograničavaju pristup ciljnom tkivu (npr. ekstravazacija iz krvnih sudova nanočestica kojima je cilj limfa). Ovaj niz 'bioloških barijera' čini sastavni deo odbrambenog sistema ljudskog tela koji služi da ga zaštiti od stranih entiteta, uključujući tu i one koji su ubačeni u terapijske svrhe, sprečavajući ih tako da dospeju do željenog odredišta. Ove barijere mogu ograničiti funkciju nanočestica u organizmu, blokirajući njihovo kretanje, ili izazivajući negativan odziv domaćina, koji može dovesti do izbacivanja čestica, ili promene njihovih osobina.

Ova ograničenja treba posebno imati na umu kada se za cilj imaju organi kao što su mozak i bubrež. U mozgu, endotelne ćelije zajedno sa astrocitnim ćelijama stvaraju čvrste spojeve između ćelija u krvnim sudovima u okruženju mozga, što dovodi do strukturne i metaboličke barijere koja se naziva „krvno-moždana barijera” (KMB). Samo NČ dovoljno malih dimenzija i odgovarajućih fizičko-hemijskih svojstava mogu proći KMB. NČ čiji je prečnik manji od 150 nm, mogu da prođu većinu endotelnih barijera ali KMB postavlja znatno ozbiljnija ograničenja, i omogućava pasivnu difuziju samo malih, neutralno naelektrisanih molekula, rastvorljivih u lipidima. Tako ona sprečava više od 98% potencijalnih neuroterapeutika, kontrastnih agenasa i većinu uobičajenih NČ, da prođu kroz nju. Zbog toga se problem KMB intenzivno istražuje, kako bi se razvile nove strategije lečenja tumora mozga, Parkinsonove, Alchajmerove i Huntingtonove bolesti. Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju, da na propusnost KMB, u mnaoj ili većoj meri, utiču sva fizičko-hemijska svojstava NČ, i da veličina nije isključivi faktor koji diktira propusnost NČ kroz KMB.

Biološke barijere nisu tipične samo za vanćelijske prostore. Naprotiv, postojanje unutarćelijskih barijera je ključni razlog zbog kojeg ne deluju mnogi lekovi i terapije, uključujući i NČ. Kada se ćelijski-specifična NČ veže za membranu željene ćelije, ćelija

je obično apsorbuje endocitozom pomoću receptora, i transportuje preko endozomalnih kanala, kako bi je obradila i razložila. Većina ovih endozoma se zatim premešta u lizosome gde hidrolitičke i enzimske reakcije potpuno metabolišu makromolekule. Mnogi terapeutici, kao što su DNK i siRNK, osetljivi su na lizozomsko razlaganje, pa ih ćelijska obrada čini neefikasnim. Međutim, moguće je napraviti takve noseće čestice koje će izbeći endozome pre lizozomskog transporta. NČ koje mogu da izbegnu endozome, moraju da savladaju i druge biološke barijere, kao što je membrana nukleusa. Svaka od ovih prepreka ukazuje da se prilikom dizajna jezgra i površine nanočestica mora voditi računa o specifičnim zahtevima koje diktira određena primena.

### **3.1. Uticaj nano-čestica na tkiva i metabolizam**

Poznato je da nanočestice utiču i na neke fiziološke parametre ćelija. Kako se većina terapijskih i dijagnostičkih primena NČ bazira na intravenskoj, ili oralnoj primeni, poznavanje interakcija NČ i biomaterijala, posebno krvnih komponenti, je veoma značajno [Mocan T., 2013]. U krvotoku NČ dolaze u dodir sa eritrocitima i mogu da se čvrsto zakače za površinu ćelije, ili čak da uđu u nju, što u oba slučaja može uticati na fiziološke parametre ćelija [Nádejde C., 2009]. Pošto je očito da je neki oblik interakcije krvnih ćelija sa NČ neizbežan, važno je ispitati odgovor membrana eritrocita na male koncentracije NČ. Utvrđeno je da se NČ oksida gvožđa pojačano vezuju sa crvenim krvnim zncima, a da je tendencija samih NČ da formiraju velike agregate slaba [Mornet S., 2004]. Pokazalo se da i neobložene i obložene (citrati i dendroni) MNČ ne menjaju značajno unutarćelijski sadržaj  $Ca_2^+$ , dok je promena pH vrednosti značajna [Moersdorf D., 2010]. A. Džarova sa saradnicima, je utvrdila da MNČ prodiru kroz membranu eritrocita nekim mehanizmom različitim od fagocitoze i endocitoze, a da njihovo površinsko naelektrisanje nema veliki uticaj na njihov unos u eritrocite. Na osnovu dejstva na limfocite ovi autori su zaključili, da su za bioprimene pogodniji magnetozomi nego NČ magnetita dobijene hemijskom sintezom i obložene natrijum oleatom i PEG [Džarova A., 2010].

Zdravi eritrociti izmiču makrofagima i obavljaju svoju funkciju transportovanja kiseonika tokom 110-120 dana, a ovako dugo vreme cirkulacije omogućeno je mnoštvom

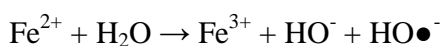
fizičko-hemijskih i fizioloških faktora. Smatra se da eritrociti imaju površinsku zaštitnu barijeru koja ih štiti od hidrofилnih grupa oligosaharida i sprečava adsorpciju opsonina i prepoznavanje od strane makrofaga. [Mornet S., 2004]. Primećeno je da *in vivo* stimulisana Kupffer ćelija neće fagocitovati zdrave eritrocite. Zbog toga se smatra da je razumevanje uzajamnog odnosa stimulisanih fagocita i eritrocita ključ za dizajniranje sintetskih koloida sa dugim periodom cirkulacije u krvi. Znanje koje je stečeno istraživanjem u ovoj oblasti moglo bi pomoći da se okonča i dugotrajno istraživanje proizvodnje veštačkih crvenih krvnih zrnaca.

Jetra i slezina su tkiva poznata po tome što iz krvotoka uklanjaju strana tela, uključujući tu i magnetne materijale [Creangă D.E., 2009]. NČ injektovane *in vivo*, bivaju zahvaćene makrofagima što smanjuje njihovo vreme cirkulacije u krvi i dovodi do njihovog povećanog prisustva u jetri (80-90%), slezini (5-8%) i koštanoj srži (1-2 %) [Varna M., 2012 ]. U jednoj od studija, primećeno je prisustvo oko 55 % NČ u jetri 6 sati nakon injektovanja, odnosno 20% u slezini 24 časa nakon injektovanja. Manje količine uočene su u mozgu, srcu, bubrezima i plućima [Varna M., 2012]. Ove činjenice su iskorišćene za pasivno usmeravanje čestica u ove organe, lečenje metastaza tumora jetre i unutarćelijsko tretiranje infekcija antibioticima. Dugoživeće čestice koje su uspele da izađu iz krvotoka obično se koncentrišu oko mesta na kojima kapilari imaju fenestracije, kao u sinusnom endotelu jetre, ili tamo gde je endotelna barijera poremećena upalnim procesom (kao kod reumatodnog artritisa, infekcija i nekih tipova tumora), što je takođe korišćeno za pasivno usmeravanje nanočestica.

Joni gvožđa iz hemoglobinskog jezgra mogu interagovati sa lokalnim magnetnim poljem MNČ prikaćenim za ćelije crvenih krvnih zrnaca [Creangă D.E., 2009], a višak gvožđa nije poželjan u mozgu, jer dovodi do neuro-degenerativnih bolesti, kao što su Alzheimer-ova i Parkinson-ova bolest. Uprkos tome, ustanovljeno je da su SPION, u koncentracijama koje se koriste u kliničkoj praksi, neškodljive za organizam. Ukupna količina gvožđa u organizmu zdravih odraslih osoba je između 3500 i 4000 mg. Kliničke doze koje se obično koriste su oko 1 mg(Fe)/(kg telesne mase), ili oko 50-200 mg/osoba, su male u poređenju sa ukupnom količinom gvožđa koja se inače nalazi u telu [Elias A., 2009]. Smrtonosna doza SPION obloženih dekstranom je 2000-6000 mg(Fe)/(kg telesne mase), a za neobložene čestice je 300-600 mg(Fe)/(kg telesne

mase). NČ oksida gvožđa se apsorbuju u lizozomima, razlažu u  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ , i tako razloženo gvožđe postaje deo normalnog sadržaja gvožđa u organizmu, tj. ferritin-a, hemosiderin-a, transferritin-a, haemoglobin-a, itd... Međutim, pokazano je da neobložene NČ oksida gvožđa, u nekim slučajevima kada se primene intravenozno, mogu imati štetne posledice na jetru, bubrege i pluća [Schlachter R.K., 2011].

Iako imaju istu kristalnu strukturu, magnetit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , i maghemit  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , imaju donekle različito ponašanje u organizmu [Boyer C., 2010]. Ako dođe do Fenron reakcije, u kojoj se formira slobodan radikal:



magnetit može da bude blago citotoksičan. Sa druge strane, svi joni gvožđa u maghemitu su  $\text{Fe}^{3+}$ , pa do ove reakcije ne može da dođe. Biokompatibilnost magnetita u dobroj meri zavisi od njegove koncentracije u krvnom uzorku kao i od parametara elektromagnetnog polja, pri tretiranju [Nādejdel C., 2009].

U jednoj od studija, unos obloženih NČ maghemita u ćelije, proučavana je uz pomoć Ramanove spektroskopije i transmisiona elektronske mikroskopije (TEM). Poređenje podataka dobijenih Ramanovom spektroskopijom čiste krvi i uzoraka krvi tretiranih visokom koncentracijom magnetnog fluida, pokazalo je da su NČ maghemita biokompatibilne i da njihov unos u eritrocite zavisi od koncentracije i hidrodinamičkog prečnika NČ [Soler M.A.G., 2007].

Proučavanje bioraspodele MNČ, injektovanih u tumor miša, je pokazalo da se većina čestica zadržava u tumoru, a manje od jednog procenta injektovanih čestica detektovano je u jetri i slezini. Na prekliničkom modelu pacova (9L-glioma tumor mozga) pomoću MRI je utvrđeno da se MNČ obložene sa PEG akumuliraju u tumoru dok u zdravom tkivu nisu primećene [Varna M., 2012].

U prisustvu spoljašnjeg pobudnog naizmjeničnog magnetnog polja, SPION može promeniti ćelijsku proliferacije i diferencijaciju, što zavisi od obloge NČ i frekvencije polja. U prisustvu naizmjeničnog magnetnog polja, primećeno je smanjenje proliferacije [Mehlhorn A., 2006]. Oslobođanje hemoglobina je intenzivnije u prisustvu MNČ, bez prisustva spoljašnjeg RF polja, nego pri delovanju RF polja u odsustvu MNČ. Primećeno

je i da delovanje naizmeničnog magnetnog polja na SPION, tokom 4h, može da dovede do pojačanja aktinskog skeleta i slabljenja fokalnih adhezija (priraslica). Pored ovih, nisu uočene nikakve druge morfološke promene. Izgleda da u prisustvu statičkog magnetnog polja SPION čestice nemaju nikakav efekat na ćelijsku proliferaciju ili diferencijaciju. U odsustvu magnetnog polja, SPION čestice ne menjaju ćelijska svojstva MC3T3 i C3H10T1/2 ćelija.

Prisustvo malih količina feromagnetnih materijala u tkivu prvi put je detektovano pri monitoringu fizioloških magnetnih polja koja potiču od električnih struja u srcu. Od tada su urađena obimna istraživanja o uticaju magnetnih materijala na različita tkiva, i većina izveštaja o *in vitro* interakciji ferofluida sa eritrocitima, koji se mogu naći u literaturi je povoljna. Testovi citotoksičnosti uglavnom pokazuju odsustvo hemolitičke aktivnosti koja bi bila posledica odsustva biokompatibilnosti, ili dejstva MNČ na eritrocite. Samo u nekoliko slučajeva eksperimentalnih *in vitro* istraživanja evidentirana je ubrzana hemoliza usled interakcije MNČ sa eritrocitima, pri izlaganju krvi elektromagnetnom zračenju u vidljivoj oblasti [Creangă D. E., 2009]. Nivo hemolize pri istovremenom prisustvu MNČ i dejstvu elektromagnetnog polja, znatno je viši od zbira vrednosti koje se dobijaju RF zračenjem i uticajem MNČ, ponaosob [Nădejde1 C., 2009]. Takođe je pokazano da je brzina hemolize značajno drugačija za različite obloge, recimo PLGA i PEG.

Procene hemolitičkog efekta MNČ koje su date u literaturi dobijene su korišćenjem različitih metoda, pa tako nisu pogodne za poređenje. Čak i kada su korišćeni slični pristupi, faktori kao što su antikoagulantni plazme, vreme inkubacije krvi, centrifugalne sile, talasna dužina elektromagnetne pobude, varirali su od slučaja do slučaja. Za sada je nemoguće precizno zaključiti zašto u nekim slučajevima dolazi do hemolize, i koje su osobine korišćenih MNČ za to odgovorne [Creangă D. E., 2009].

Pored navedenih, vrše se i eksperimenti usmereni ka identifikaciji subćelijske lokalizacije MNČ, optimizaciji MNČ za spajanje sa aksonima i korišćenju magnetnih polja kao inicijatora različitih interakcija MNČ u organizmu.



## 4. PRIMENE NANO-ČESTICA OKSIDA GVOŽĐA U MEDICINI

### 4.1. Nano-čestice kao prenosioci spoljašnje pobude: Primene u hipertermiji

Reč "hipertermija" je grčkog porekla, i označava pregrevanje, tj. povećanje telesne temperature koje prevazilazi normalne granice [Mornet S., 2004]. Zdrave ćelije imaju razvijene mehanizme za odvođenje prekomerne toplote do određenog nivoa, dok obolele ćelije (kao što su ćelije raka) počinju da odumiru pod ekstremnim uslovima. Pošto su visoke temperature opasne i za zdrave i za obolele ćelije, cilj terapije hipertermijom je da zagreje ćelije do nivoa na kome zdrave ćelije preživljavaju, a obolele slabe, ili odumiru. Razvoj nanotehnologije omogućio je da se NČ oksida gvožđa upotrebe za generisanje toplote pod uticajem spoljašnjeg naizmeničnog magnetnog polja, odnosno u hipertermiji. Pošto se za obe primene mogu koristiti iste MNČ, pre nego što se pristupi hipertermiji, njihova raspodela u organizmu se može precizno odrediti MRI metodom.

Istraživanja hipertermije koja za zagrevanje koristi male čestice u naizmeničnom magnetnom polju, počela je krajem 1950-tih, ali je u to vreme, većina studija sprovedena na neodgovarajućim životinjskim vrstama, ili loše odabranim *ex vivo* uzorcima tkiva, a termometrija je bila neprecizna. Pošto ni parametri naizmeničnog (AC) magnetnog polja nisu bili optimizirani, rezultati ovih istraživanja nisu imali poseban klinički značaj [Jordan A., 1999]. Za uspešno vrednovanje metode, bile su potrebne studije sa pouzdanim i uporedivim podacima o *in-vivo* rastu tumora, uključujući i sve važne provere, precizno praćenje temperature i posmatranje patološkog tkiva tokom tretmana, a one su bile retke. Od tada je uloženo mnogo teoretskog i empirijskog rada kako bi se ovi nedostaci uklonili, i na odgovarajući način objasnio terapijski efekat hipertermije na nekoliko najčešće tretiranih tipova tumora [Hiergeist R., 1999].

Čestice oksida gvožđa za grejanje tumora prvi put je upotrebio Gilchrist [Gilchrist R.K., 1957]. On je za to koristio čestice  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , veličine 20-100 nm, koje je grejao u AC magnetnom polju frekvencije 1.2 MHz. 1980-tih, otkriveno je da koloidne disperzije subdomenskih superparamagnetnih (SPM) NČ oksida gvožđa (SPION) imaju izvanrednu specifičnu brzinu apsorpcije snage, SAR [W/g]. SAR je definisana kao snaga grejanja po

gramu magnetnih čestica,  $SAR=C\Delta T/\Delta t$ , gde je  $C$  specifični toplotni kapacitet, koji, u slučaju kada su čestice raspodeljene u tkivu, mora se uzeti u obzir i toplotni kapacitet tkiva. Za klinički tolerantne  $H_0f$  kombinacije ( $H_0$ -intenzitet,  $f$ -frekvencija magnetnog polja), SAR koje omogućavaju SPION su mnogo veće od onih koje se dobijaju pri histerezisnom zagrevanju većih, višedomenskih (MD) čestica. 1993. godine je prvi put pouzdano ustanovljeno koje su amplitude i frekvencije  $H$ -polja pogodne za primene kod ljudi [Jordan A., 1993], a Shinkai sa saradnicima je, u eksperimentu na pacovima, među prvima proizveo i primenio magnetne liposome za unutarćelijsku hipertemiju čvrstog tkiva subkutanog glioma [Shinkai M., 1999].

Za terapiju tumora, generalno se koriste dve varijante hipertermije:

- "Umerena" hipertermija, na temperaturama između 41 i 46 °C ima za cilj da modifikujući različite proteine unutar ćelije tumora, utiče na njihov rast i deobu i izazove nespecifičan imuni odziv organizma, ili dovede do njihove apoptoze, ćelijske smrti izazvane regulativnim sistemom same ćelije [Hilger I., 2002].
- Termoablacija, na temperaturama 46-56 °C koja dovodi do nekroze, koagulacije ili karbonizacije ćelija tumora.

Ova dva mehanizma proizvode potpuno različite biološke reakcije, i imaju različite primene [Jordan A., 1999]. "Umerena" hipertermija indukuje gotovo reverzibilno oštećenje ćelija i tkiva, ali dodatno povećava osetljivost ćelija tumora na zračenje i povećava efikasnost hemoterapije, jer onemogućava obnavljanje ćelija raka oštećenih primenom ovih metoda. Načini tretiranja tumora hipertermijom mogu se podeliti i na osnovu prirode izvora zagrevanja, i mete, koja može biti celo telo, određeno tkivo, ili jedna ćelija tumora [Mornet S., 2004].

Izvori toplote koji se koriste za hipertermiju mogu se grubo podeliti na tri vrste:

- zagrevanje spoljašnjom tečnošću,
- izvori sa beskontaktnim aplikatorom (ultrazvučni, mikrotalasni, radiofrekventni (RF), infracrveni (IC))
- unutrašnji izvori zračenja (sonde, antene, laserski fiberi, i različite vrste medijatora, uključujući i nanočestice).

Osnovni nedostatak većine ovih izvora je što nisu u stanju da predaju dovoljnu energiju ciljanim ćelijama tumora, a da pri tome ne oštete okolno, zdravo tkivo. Zbog toga se i koriste medijatori koji pretvaraju energiju spoljašnjeg elektromagnetnog polja u toplotu. Oni mogu biti kapacitivnog (koriste uglavnom električnu komponentu polja **E**), ili induktivnog tipa (koriste uglavnom magnetnu komponentu polja, **B**). Iako veoma efikasno, korišćenje električne komponente polja, može dovesti do pregrevanja zdravog tkiva, koje takođe dobro apsorbuje **E**-komponentu. Nasuprot tome, tkivo samo po sebi ne apsorbuje induktivnu komponentu polja **B**, pa se zagreva samo ono tkivo koje u sebi ima magnetne čestice (medijatore) koje na takvo polje reaguju. Oksidi gvožđa su posebno pogodni medijatori, jer imaju znatno manju provodnost nego neki metalni magnetni materijali i njihove legure, što čini apsorpciju **E**-komponente polja zanemarljivom. Savremeni pristup hipertermiji kao medijatore koristi magnetne nanočestice u formi koloidnog rastvora (ferofluid), koji može lako da se ubrizga u organizam.

Na osnovu načina ubrizgavanja, hipertermija može da bude:

- Hipertermija arterijalnom embolizacijom (AEH), gde se magnetne čestice unose u arterijski sistem koji snabdeva tumor krvlju. Na ovaj način se ostvaruje odlična raspodela toplote u tumoru, sa ostrim padom na njegovim granicama. Međutim, metod nije pogodan za tumore koji nemaju specifičan sistem snabdevanja krvlju (recimo mikro-metastaze), pa se po pravilu ovaj metod koristi za tumore jetre.
- Hipertermija direktnom injekcijom (DIH), gde se čestice ubrizgavaju direktno u tumor, pa je neophodno da on bude jasno vidljiv i dostupan. Oslobođanje toplote je uglavnom vanćelijsko, a metod je primenjiv za veliki broj tipova tumora. Kod velikih ili nepravilnih tumora, može biti neophodna višestruka injekcija čestica.
- Unutarćelijska hipertermija, kod koje se MNČ ubrizgavaju intravenozno i na odgovarajući način, selektivno šalju u ćelije tumora. Kod ove metode, moguće je kao način unošenja koristiti i arterijsku embolizaciju i direktno ubrizgavanje. Oslobođanje toplote je unutarćelijsko, pa su potrebna slabija magnetna polja za postizanje istog toplotnog efekta. To omogućava sigurniji i efikasniji tretman, a mogu se tretirati i metastaze. Ova metoda čini osnovu Hipertermije magnetnim fluidom (MFH), kojoj će biti posvećeno više prostora u ovom radu.

MFH je mnogo manje invazivna nego laserska, mikrotalasna, ili ultrazvučna hipertermija, jer ne greje zdravo tkivo, u kome je koncentracija magnetnih čestica obično veoma niska, ako ih uopšte ima [Jordan A., 1999].

#### **4.1.1. Osnovni principi hipertermije magnetnog fluida (MFH)**

Zagrevanje čestica magnetnih oksida gvožđa male električne provodnosti, (čime je izbegnut uticaj vrtložnih struja) u spoljašnjem naizmeničnom magnetnom polju nastaje zbog gubitaka koji nastaju zbog promena orijentacije magnetnog momenta čestica. Ako je toplotna energija  $k_B T$  suviše mala da omogući reorijentaciju magnetnih domena, dominiraju gubici usled histerezisa, koji zavise od načina remagnetizacije, što uključuje pomeranja domenskog zida, i (ili) nekoliko tipova rotacije magnetnih momenata. Sa opadanjem veličine čestica, dolazi do SPM ponašanja čestica, koje zavisi od temperature i frekvencije pobude, i do pojave takozvanih Néelovih-gubitaka. Na specifičnu apsorpciju snage može se uticati i modifikacijom magnetizacije MNČ, ali i tu, biokompatibilnost ograničava upotrebu mnogih pogodnih elemenata, kao na primer kobalta.

U slučaju ferofluida, mogu se takođe pojaviti gubici usled Browne-ovog kretanja magnetnih čestica u naizmeničnom magnetnom polju. Pošto pored karakteristika magnetnog polja, prenos snage pri hipertermiji suštinski zavisi i od prirode MNČ, i od karakteristika njihove obloge, ferofluid mora biti detaljno optimiziran, a optimizacija obloge MNČ u tom pravcu, može dodatno da doprinese apsorpciji snage [Jordan A., 1999]. Dosadašnji eksperimentalni rezultati ukazuju na potrebu za detaljnim ispitivanjem rotacije čestica u biološkom tkivu, tokom različitih primena. U zavisnosti od frekvencije pobude, veličine i oblika čestice-jezgra i njenog magnetnog momenta, mogu se optimizovati njegove oscilacije unutar obloge, ako se poznaje struktura materijala obloge i njen viskozitet. Sa druge strane, ako čestica osciluje u polju kao celina (jezgro i obloga zajedno), mogućnosti za podešavanje su mnogo manje, pogotovo što zahtev da ferofluid za medicinske namene bude neka vrsta netoksične vodene disperzije, ograničava izbor materijala obloge i rastvarača. Potrebno još mnogo istraživanja da bi se što preciznije odredila zavisnost SAR u naizmeničnim magnetnim poljima, od 50-100 kHz, od oscilacija NČ obloženih različitim oblogama, koje imaju različito hidrodinamičko

ponašanje. Očekuje se da bi se istovremenom optimizacijom magnetnog jezgra i ovojnice, mogle dobiti vrednosti SAR od 400-500 W/g(Fe) [Mornet S., 2004]. Pri tome se ipak mora voditi računa da obloga mora da ostane netoksična i biokompatibilna i da omogući vezivanje MNČ za ciljane ćelije i tkiva [Kim D.H., 2006].

Koncentracije čestica u ferrofluidu se obično kreću u opsegu od  $10^{21}$ - $10^{23}$  čestica/m<sup>3</sup> [Goya G.F., 2008], a njegova stabilnost zavisi od ravnoteže između privlačnih Van der Walsovih i dipol-dipol magnetnih sila između čestica i odbojnih steričnih i elektrostatičkih sila između samih čestica, i čestica i tečnosti [Jordan A., 1999]. Za datu pobudnu frekvenciju, postoji "idealna" veličina čestice  $d^*$  ferrofluida, koja omogućava maksimalni SAR. Da bi se minimizovala masa ferrofluida koja je neophodna za terapijski tretman određene zapremine ciljnog tkiva (tumora, na primer), potrebno ostvariti usku raspodelu veličine čestica oko idealne. Osim minimizovanja ubrizgane količine MNČ, to kod kliničkih primena omogućava i finu kontrolu predaje toplote obolelom području, uz minimalno oštećenje okolnog zdravog tkiva. Veliki SAR podrazumevaju i kraće vreme izlaganja celog organizma spoljašnjem pobudnom polju [Lima E., 2013].

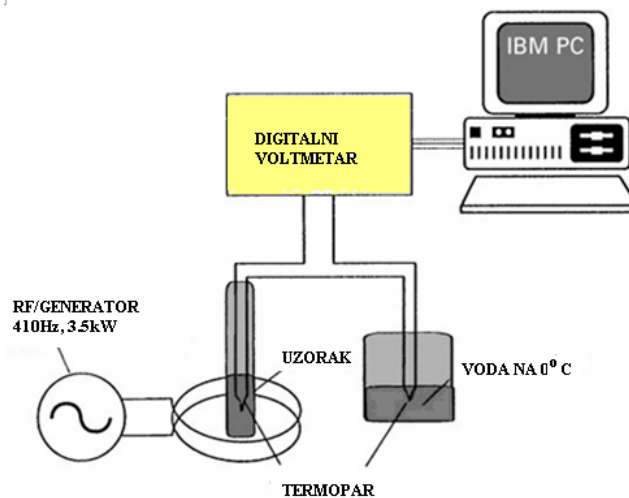
Kod MD fero i feromagnetnih čestica, toplota se oslobađa pretežno zbog histerezisnih gubitaka, nastalih usled pomeranja zidova magnetnih domena. Kod SPION takvih gubitaka nema, jer nema ni domenskih zidova, a energija se predaje česticama tako što njihov magnetni moment rotira preko energetske barijere  $E_b=KV$ , gde je K efektivna konstanta magnetne anizotropije, a V zapremina MNČ. Energija se oslobađa tokom procesa poznatog kao Neel-ova relaksacija, po zakonu:  $t_N=t_0e^{(KV/kT)}$ , gde je  $t_0$  konstanta reda  $10^{-9}$  s,  $k$ –Boltzman-ova konstanta, a T temperatura. Frekvencija f, koja omogućava maksimalno grejanje pomoću ovog mehanizma data je relacijom:  $2\pi f t_N=1$ , koja može i eksperimentalno da se izmeri, jer odgovara maksimalnoj vrednosti imaginarnog dela magnetne susceptibilnosti:  $\chi=\chi'-i\chi''$ . Istraživanja SAR ostvarenog SPION česticama sa dijametrom jezgra između 3 i 150 nm, bez, ili sa oblogom od deostrana, ili nekog njegovog derivata, u opsegu amplituda magnetnog polja od 6.5 do 14 kAm<sup>-1</sup> i frekvencija od 300 do 1000 kHz, rastvorenih u fiziološkom rastvoru, ili vodi, dali su vrednosti SAR od 0.1 do 626 W/g(Fe), u najvećem broju slučajeva, veći od 100 W/g(Fe) [Mornet S.,

2004]. Takođe je ustanovljeno da za MNČ oksida gvožđa, SAR raste kada raste molekularna težina obloge od dekstrana [Mornet S., 2004].

Zbog velikog broja parametara koji utiču na SAR (veličina, raspodela veličine, oblik, hemijski sastav i kristalna struktura čestice, amplituda i frekvencija pobudnog magnetnog polja, mehanizam apsorpcije snage, itd...) teško je teorijski odrediti izraz za SAR koji bi važio u širokom opsegu svih pomenutih parametara, pa su eksperimentalna merenja od suštinske važnosti.

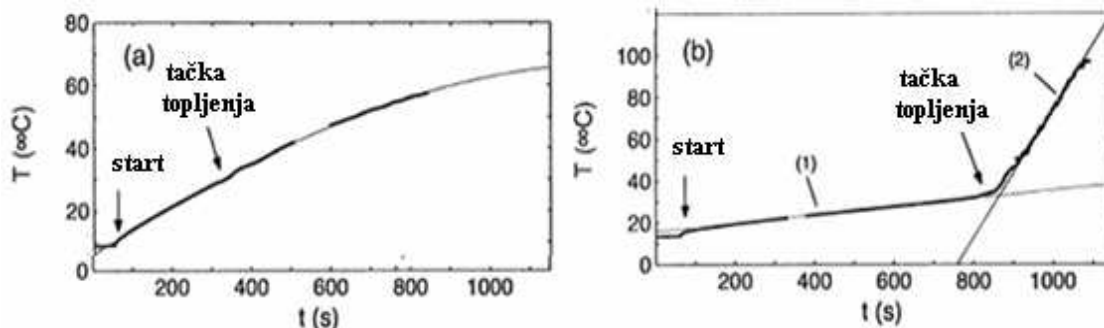
I kod ferrofluida sa MD česticama, i kod onih sa SPION, mogući su gubici energije i usled Brown-ovog kretanja. Vreme relaksacije Brown-ovog kretanja dato je relacijom:  $t_B = 3\eta V_B / kT$ , gde je  $\eta$  viskoznost sredine u kojoj se čestica nalazi, a  $V_B$  hidrodinamička zapremina čestice (zapremina čestice sa oblogom). Maksimalni gubici energije ovim procesom se dobijaju za  $2\pi f t_B = 1$ . Nije lako razdvojiti Neel-ov i Brown-ov doprinosa u predaji energije kod hipertermije [Mornet S., 2004]. Teorijski, kritični prečnik čestice na kome dolazi do promene mehanizma može se odrediti iz uslova  $t_N = t_B$ . Kada je prečnik čestice blizu te kritične veličine, pogodno je koristiti efektivno vreme relaksacije:  $t_{eff} = t_N t_B / (t_N + t_B)$ , na osnovu kojeg je frekvencija pri kojoj dolazi do maksimalnog grejanja definisana kao:  $2\pi f_{eff} t_{eff} = 1$ .

Doprinos Brown-ove relaksacije može se odrediti eksperimentalno, ako se spreči slobodna rotacija čestica [Hiergeist R., 1999]. U tu svrhu su istraživani uzorci, koji su prethodno, na osnovu veličine i vrste gubitaka merenih na 50 Hz, podeljeni u dve grupe: grupu A koja pokazuje SPM ponašanje i grupu B u kojoj su dominantni histerezisni gubici. Veličina i oblik čestica određeni su pomoću TEM mikroskopije i analize širine karakterističnog XRD pika. Srednja veličina čestice različitih uzoraka varirala je od 8 nm za tipične ferrofluide (čestice tipa A) do nekoliko 100 nm za feromagnetne suspenzije (čestice tipa B). Krive magnetizacije su merene u temperaturnom opsegu od 10 do 300 K, i pomoću njih je određena temperaturna zavisnost zaostale magnetizacije i koercitivnog polja. SAR je određen pomoću vremenski zavisnih kalorimetrijskih merenja. Šema eksperimentalne postavke je prikazana na Slici 4.1.1.



Slika 4.1.1. Eksperimentalna postavka za kalorimetrijska merenja vremenske zavisnosti SAR [Hiergeist R., 1999].

Eksperimentalne krive porasta temperature u ovim uzorcima u RF-magnetnom polju frekvencije 410 kHz i amplitude 6.5 kA/m, prikazane su na Slici 4.1.2.



Slika 4.1.2. Rast temperature pri zagrevanju u RF-polju čestica magnetita u komercijalnom gelu: (a) ferofluid (uzorak tipa A) i (b) čestice tipa B. Obeležene su početna tačka RF-pobude i tačka topljenja gela. [Hiergeist R., 1999].

Kod uzoraka tipa B, uočava se znatno veći gubitak snage u tečnosti (prevojna tačka karakteristike na oko 850 s), nego u čvrstom gelu (Slika 4.1.2. (b)). Nasuprot tome, kod rastvorenog ferofluida može se primetiti samo mala devijacija karakteristike na tački topljenja gela (Slika 4.1.2. (a)). Uočena razlika potiče od različitog uticaja Brown-ovih gubitaka na grejanje ove dve vrste čestica. U slučaju čestica B, Brown-ovi gubici su

značajni, što dovodi do značajne razlike između gubitaka snage u gelu (gde je Brown-ova rotacija onemogućena) i u tečnosti, gde je ona moguća. Kod veoma malih čestica, prisutnih u ferrofluidu A, Brown-ov doprinos je mali, i ova razlika je zanemarljiva.

Na osnovu Browne-ove i Neél-ove teorije relaksacije, i eksperimentalnih provera, pokazano je da subdomenske čestice (veličine desetak nanometara) apsorbuju mnogo više snage u, za ljude podesnim oblastima  $H_{0f}$  naizmeničnog magnetnog polja, nego multidomenske čestice (veličine mikrona), koje se zagrevaju prevashodno na osnovu histerezisnih gubitka. Ustanovljena je i odgovarajuća zavisnost,  $SAR = \kappa H_0^2 f$ , gde je  $\kappa$  konstanta materijala za datu  $H_{0f}$  kombinaciju. Za optimalan jednočasovni MHF tretman, proizvod  $H_{0f}$  treba da bude manji od  $4.85 \times 10^8 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pri čemu, zbog karakteristika tkiva, frekvencija treba da se kreće u opsegu 50 kHz do 10 MHz, pa se za amplitude polja biraju vrednosti od nekoliko desetina  $\text{KAm}^{-1}$  [Mornet S., 2004].

Da bi se utvrdile mogućnosti MFH za selektivno regionalno zagrevanje različitih lokacija u telu trebalo je razviti odgovarajuće aparature za regionalno grejanje naizmeničnim magnetnim poljem, a migracije ferrofluida van oblasti tretmana učiniti zanemarljivim. Takođe je bilo potrebno rešiti i tehničke probleme, kao što je gubitak toplote u magnetnom jezgru aparature, mehaničko opterećenje cele konstrukcije, i mnoge druge. Jedan rani prototip aplikatora naizmeničnog magnetnog polja za lokalnu MFH kod malih životinja, prikazan je na Slici 4.1.3.



Slika 4.1.3. Prototip mašine za tretman naizmeničnim magnetnim poljem sa frekvencijom od 500 kHz i amplitudama do 10 kA/m. Vazdušni zazor magnetnog jezgra od 20 mm, je pogodan za tretiranje miševa i drugih malih životinja. Zbog različitog poprečnog preseka tela i provodnosti tkiva, na ljudskim bićima bi trebalo koristiti niže frekvencije, tj. 50-100 kHz [Jordan A., 1999].



Merenje SAR *in-vivo* otežano je činjenicom da je tačna koncentracija čestica na ciljnom (grejanom) mestu obično nepoznata [Goya G.F., 2008]. SAR merenja niza Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ, sa prosečnim veličinama u rasponu od 3 do 26 nm, pokazala su značajnu zavisnost SAR od veličine čestica, što sugeriše da je neophodno koristiti takve metode sinteze MNČ koji omogućavaju podešavanje veličine čestica za date eksperimentalne uslove [Goya G.F., 2008]. Pokazano je da je optimalan prečnik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> čestica koji omogućava maksimalan SAR oko kritične dimenzije za prelaz iz jedno- u više-domenski režim, ali nije oučena jaka korelacije između magnetizacije zasićenja M<sub>S</sub> (ili magnetnog momenta jedne čestice) i SAR vrednosti za MNČ u SPM režimu [Goya G.F., 2008]. Za čestice srednje veličine u SPM režimu, SAR se povećavaju sa frekvencijom, a od amplitude polja zavise po kvadratnom zakonu. Histerezisni gubici u feromagnetnim česticama, od frekvencije zavise linearno [Hergt R., 2006].

#### **4.1.2. Biološki koncept MFH**

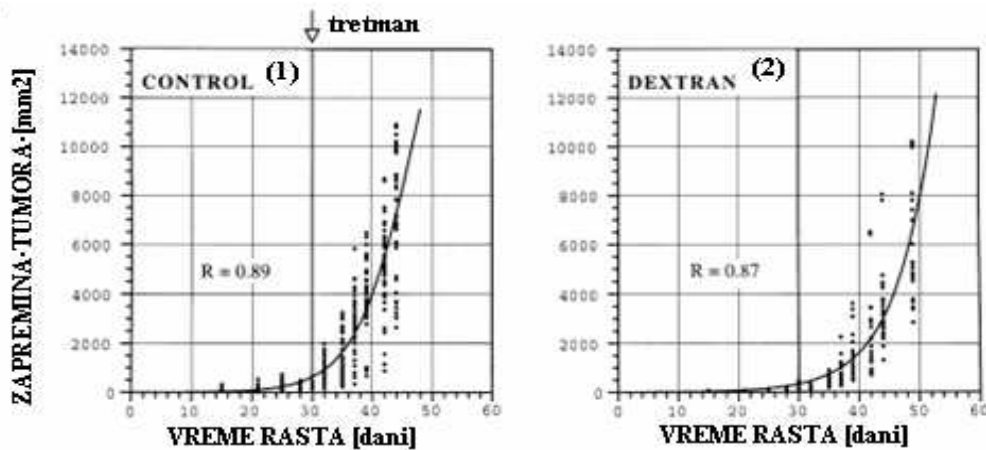
Zagrevanje do temperatura između 41 i 46 C dovodi do umerene inaktivacije ćelija, koja zavisi od deponovane toplotne doze. Iako krive koje prikazuju reakciju tkiva na doze toplote veoma liče na krive koje prikazuju reakciju na doze radijacije ili lekova, kritični mehanizam koji dovodi do toplotne inaktivacije ćelije, još uvek nije poznat. Najverovatniji razlog za to je što, za razliku od poznatog oštećenja DNK zračenjem, ne postoji samo jedan, specifičan deo ćelije na koji deluje hipertermija, pa mnoge osobine ćelije i procesi u njoj utiču na njenu toplotnu inaktivaciju. Hipertermija jako utiče na većinu biomolekula, a posebno na regulatorne proteine kinaze, ili cikline, koji su uključeni u rast i diferencijaciju ćelije, kao i na određene receptorne molekule, koji su uključeni u putanje za prenos signala. Nekoliko minuta nakon hipertermije u ćeliji se stvara posebna klasa proteina, takozvanih proteina toplotnog šoka (hsp), koji štite ćeliju od daljeg zagrevanja i povećavaju verovatnoću preživljavanju ćelija nakon pregrevanja (efekat termotolerancije). Uticaj hipertermija na aktivnost regulatornih proteina dovodi do promena u ćelijskom ciklusu i može čak da indukuje apoptozu, smrt ćelije koju izaziva sam regulatorni sistem ćelije. Delovanje molekularnih mehanizama koje aktivira hipertermija još uvek je predmet obimnih istraživanja.

Poznato je da kombinovani efekat zračenja i hipertermije na nivou ćelije, uglavnom nastaje jer se, nakon oštećenja DNK radijacijom, ćelije, usled delovanja toplote, slabije obnavljaju. Procesi obnavljanja ćelije su manje efikasni, bilo da se toplotom deluje, pre ili posle ozračavanja, a precizno je definisan i vremenski interval za oba ova modaliteta. Treba napomenuti da su oba ova procesa (radijaciono oštećenje i povišena temperatura) istovremeno prisutna pri ozračavanju tkiva teškim jonima, što je pored odlične prostorne kontrole deponovane energije, dodatni razlog za izuzetnu efikasnost ovog tretmana tumora. Poznato je da su ćelije tumora koje imaju malu koncentraciju kiseonika (hipoksične), znatno otpornije na zračenje, ali znatno osetljivije na temperaturu, nego ćelije sa velikom koncentracijom kiseonika (euoksične). Zbog toga je kombinovani tretman tumora zračenjem i hipertermijom znatno efikasniji nego tretman samim zračenjem [Mornet S., 2004]. Savremena istraživanja su usmerena i na razumevanje odnosa između termalne tolerancije i efikasnosti delovanja određenih lekova.

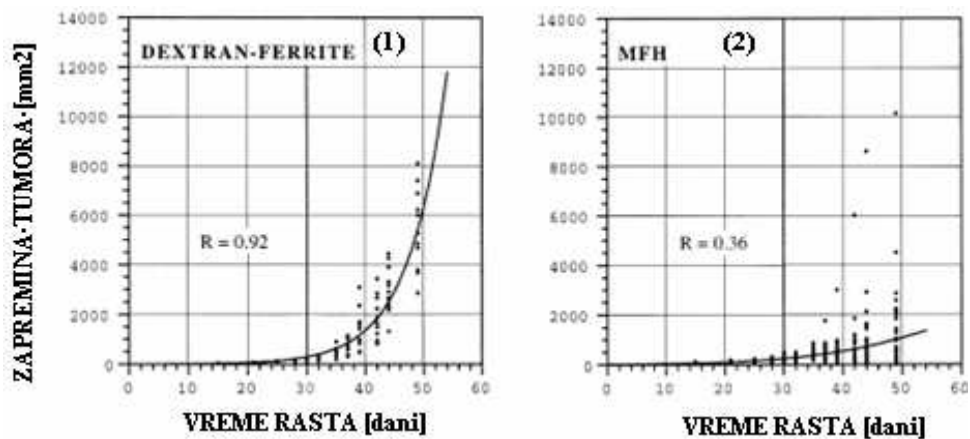
Primećeni su i drugi efekti hipertermije na nivou tkiva, kao što su promene mikrovaskulature, protoka krvi (mnogi tumori imaju specifičan sistem snabdevanja krvlju, koji je bitno različit od normalnog, što otvara različite zanimljive mogućnosti za njihov tretman nanočesticama), statusa energije i kiseonika. *In vitro* je demonstrirano da, zahvaljujući promenama nekih površinskih molekularnih receptora, ćelije raka koje su tretirane toplotom imuni sistem domaćina bolje prepoznaje, pa ih ćelije ubice imunog sistema lakše pronalaze i uništavaju [Multhoff G, 1995].

U jednoj zanimljivoj studiji [Jordan A., 1997] tretmana izogeničnog C3H karcinoma mlečne žlezde miša, koji je transplantiran u njegovu desnu zadnju nogu, magnetni fluid je dat intralezijski, bez anestezije, a pre tretmana naizmeničnim magnetnim poljem, ustanovljeno je da se magnetni fluid u ciljnoj regiji deponovao u skladu sa očekivanjima. Neočekivano je ustanovljeno, da je nakon prve MFH sesije, raspodela magnetnih čestica dodatno homogenizovana. Ovaj novi efekat, koji otvara nove perspektive, ne samo kod hipertermije, već i pri usmeravanju dejstva lekova, genetskoj i imuno-terapiji, nazvan je "termalni *bystander* efekat". Da bi se ispitala mogućnost MFH kao mono-terapije (bez dodatnog zračenja, ili lekova) za lokalnu kontrolu tumora, životinje su tretirane 30 minuta, održavajući temperaturu tumora od 47 °C, koja je neuobičajeno visoka za hipertermiju. Dobra kontrola rasta tumora je ostvarena kod 44% životinja (Slika 4.1.4 (a))

i (b), što ukazuje da bi MFH mogao postati minimalno-invazivni pristup za regionalno selektivno tretiranje toplotom na mikroskopskom nivou, koji obećava bolje rezultate od bilo kog sličnog metoda, korišćenog do sada.



Slika 4.1.4 (a). Krive rasta C3H karcinoma mlečne žlezde miša: (1) netretirani (kontrolni) uzorak, (2) dekstran (Jordan A., 1999).



Slika 4.1.4 (b). Krive rasta C3H karcinoma mlečne žlezde miša: (1) dekstran+ferit, bez tretmana u magnetnom polju i (2) MFH tretirane životinje. Vidi se da do uticaja na rast tumora dolazi tek nakon zagrevanja naizmeničnim poljem, što dovodi do 44% smanjenja tumora 30 dana nakon tretmana [Jordan A., 1999].

### 4.1.3. Perspektive primene MFH

Rezultati in vitro eksperimenata sa različitim tipovima tkiva ukazuju na veliki potencijal pravilno izabranih čestica magnetita za primene u hipertermiji. Kako se obloga može

funkcionalizovati tako da na nju reaguju samo biomolekuli određene vrste, moguća je specifikacija tkiva i ćelija u kojima do apsorpcije toplote treba da dođe. Istraživanja ukazuju da, kad jednom primi čestice, tumor ne može da ih se u potpunosti oslobodi, pa bi i ćelije potomci trebalo da sadrže i do 50% od količine čestica, koje sadrže roditeljske ćelije. Stoga, ne samo da ćelije tumora u kojima se nalaze NČ oksida gvožđa sadrže "markere" za svoju sopstvenu smrt, nego će i potomci imati povećanu smrtnost tokom budućih primena naizmeničnog magnetnog polja. Mogućnost da se ćelije tumora napune hiljadama čestica, koje bi, za razliku od gena, postale aktivne tek nakon primene spoljašnjeg naizmeničnog magnetnog polja i dovele do smrti svih ćelija koje ih sadrže, je zaista fascinantna.

Dobijanje magnetnih fluida od NČ sa funkcionalizovanom površinom, koja omogućava njihovo ciljano smeštanje i selektivnu inaktivaciju ćelija raka, pri minimalnim koncentracijama NČ, takođe je izazov za naučnike. Može se očekivati da će nanotehnologije ponuditi nove strategije funkcionalizacije, i nove tipove funkcionalizovanih čestica, koje će moći da izbegnu delovanje retikulo-endotelnog sistema. Posebnu pažnju treba posvetiti dizajnu onih MFH, koji će omogućiti tretiranje tumora sa lošom prognozom i tumora koje se teško greju, kao što su tumori mozga i organa sa velikom perfuzijom (bubrezi, jetra, pluća).

Pored toga, činjenica da magnetne čestice to prestaju da budu na jasno definisanoj temperaturi (Curie temperatura,  $T_C$ ), bar u principu pruža mogućnost za samo-kontrolu maksimalne temperature pri hipertermiji. Iako je  $T_C$  oksida gvožđa, magnetita i maghemita, dosta visoka (obično preko 570 °C), kod drugih oksidnih materijala ona je znatno niža, i može se podešavati na razne načine (promenom sastava, veličine, oblika čestice, itd...). Tako je kod  $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ ,  $T_C=56$  °C, a kod  $\text{La}_{0.8}\text{Sr}_{0.2}\text{MnO}_3$ ,  $T_C=48$  °C, i oba ova materijala pokazuju dobro definisan plato na temperaturama podesnim za hipertermiju [Mornet S., 2004].

Neophodan je i veliki broj i prekliničkih i kliničkih studija sa postojećim biokompatibilnim ferrofluidima i kliničkim prototipovima aplikatora naizmeničnog magnetnog polja, kako bi MFH prerasla u standardnu kliničku terapiju. Među prvim publikovanim kliničkim iskustvima primene hipertermije je tretman povratnog lokalnog chondrosarcoma [Mornet S., 2004] i primena intersticijalne hipertermije u lečenju

humanog kancera prostate [Johannsen M., 2005]. Zahvaljujući rezultatima ovih obimnih istraživanja, već je konstruisano nekoliko prototipova aplikatora koji omogućavaju tretiranje ljudi, a jedan od njih prikazan je na Slici 4.1.5 [Johannsen M., 2005].

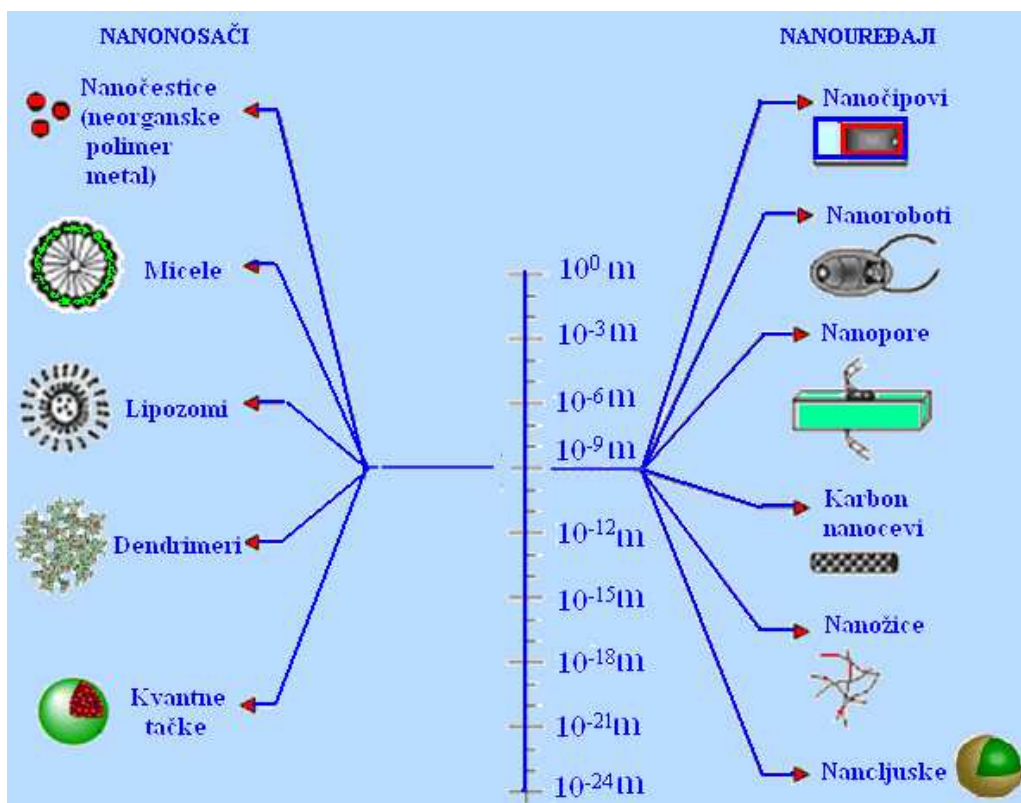


Slika 4.1.5. MFH300, MagForce Nanotechnologies, Berlin, aplikator naizmeničnog magnetnog polja frekvencije 100 kHz i podešljivog intenziteta magnetnog polja  $0-18 \text{ kAm}^{-1}$ .

Širok spektar novih bioloških strategija, nova iskustva sa kliničkom hipertermijom, otkriće "termalnog baistender efekta", upotreba preciznih sistema za vođenje čestica, uz nove metode interventne radiologije i mikrohirurgije, obećavaju pojavu novog efikasnog oružja protiv raka, MHF.

## 4.2. Prenosanje i usmeravanje lekova pomoću nanočestica

Konvencionalne tehnike za isporuku lekova imaju mnogo ograničenja, kao što su niska efikasnost (usled nestabilnosti leka u ćeliji, hemijskih osobina molekula isporučilaca leka, promena u genetskom sastavu površinskih receptora ćelije, promena u putanjama signala usled napredovanja bolesti, degradacije leka...), ograničena biodostupnost (samo deo primenjene doze leka koji dospeva u sistemsku cirkulaciju stiže do željenog cilja), brzo uklanjanje retikuloendotelnim sistemom (RES) i narušavanje imunog sistema [Sletter K.D., 2011]. Mnoga pomenuta ograničenja „klasičnih” metoda isporuke lekova mogu se prevazići primenom nanočestica za kontrolisanu isporuku lekova, što je postalo jedna od vodećih oblasti multidisciplinarnih naučnih istraživanja, koje kao svrhu imaju unapređenje zdravlja pacijenta.



4.2.1. Tipovi nanonosača i nanouređaja [Sletter K.D., 2011].

Osnovni zadaci ciljane isporuke lekova su: da omogući specifično usmeravanje i isporuku leka jasno definisanom cilju, omogući kontrolu prostorne raspodele leka i njegovog otpuštanja, smanji toksičnost i obezbedi biokompatibilnost leka, što bi omogućilo da se razviju „sigurni“ lekovi [De Jong W.H., 2008].

Dakle, kontrolisani sistem lokalne isporuke lekova pomoću NČ ima tu prednost da su toksični i takozvani sporedni efekti njihove sistematske primene, u velikoj meri izbegnuti, ili bar drastično smanjeni. Ovakav sistem je stabilan posle administriranja, primenljiv za mnoge kategorije lekova, ima sposobnost liofilizovanja i relativno nisku cenu [Singh K., 2013], što značajno poboljšava dijagnostički i terapijski potencijal mnogih lekova. Kontrolisana dostava lekova je posebno značajna u slučajevima kada se, iz nekog razloga, lek ne može na drugi način primeniti, ili uneti u organizam.

Prednosti primene ciljane dostave lekova su [Akhtar J., 2009]:

- Difuzija nanočestica u kapilarnoj mreži je brza, pa se postiže efikasna dostava lekova do obolelog tkiva.
- Nanočestice mogu da se kreću i izvan krvnih sudova i tu deponuju lek, što omogućava njegovo odloženo oslobađanje u ciljanom području.
- Postiže se terapijski odgovor u ciljanim organima sa samo jednom desetinom leka od one u slobodnoj dostavi, čime se koncentracije leka u slobodnoj cirkulaciji smanjenjuje se za faktor 100 ili više.
- Moguće je kontrolisati otpuštanje lekova u ciljnom tkivu u intervalima od 30 minuta do 30 časova
- Metod se može koristiti na bilo kom delu tela.
- Problem otpornosti na lek zbog nemogućnosti da se lek transportuje kroz ćelijsku membranu tumora može se prevazići, jer ćelije tumora imaju znatno veću fagocitnu aktivnost od normalnih, pa NČ mogu lakše da se internalizuju

Međutim, uočeni su i neki problemi koji zahtevaju prilagođavanje strategije primene ciljane dostave lekova, posebno u *in vivo* uslovima [Akhtar J., 2009].

- Brzo čišćenje iz organizma, pogotovo nosilaca koji koriste antitela.
- Imune reakcije pri intravenskom unošenju.
- Heterogenost ciljanog tkiva.
- Problem nedovoljne lokalizacije leka u ćelijama tumora

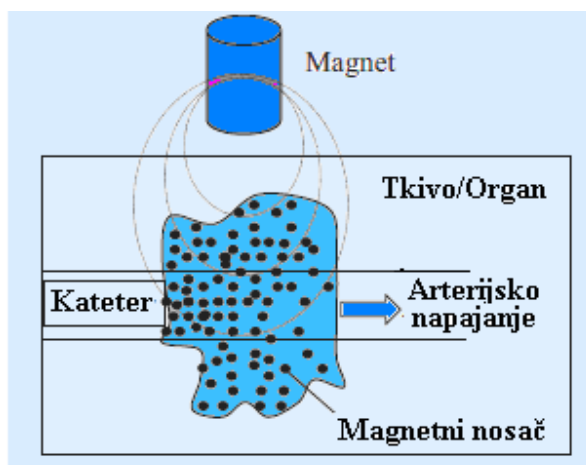
- Difuzija i preraspodela otpuštenog leka može dovesti do nespecifične akumulacije (tj. akumulacije u neželjeno tkivo).
- Nanočestice odgovarajućih karakteristika je teško proizvesti u velikim količinama.
- Ograničeno prihvatanje NČ od strane biosistema
- Lek je teško usmeriti ka organima koji su smešteni duboko u organizmu
- Magnetno vođenje je relativno skupa tehnika koja zahteva specijalizovane proizvođače aparatura i posebnu kontrolu kvaliteta.
- Potreban je specijalizovan magnet za ciljanje, koji mora da ima stabilan gradijent magnetnog polja, da bi se izbeglo lokalno predoziranje toksičnim lekovima.
- Neophodne su napredne tehnika za praćenje NČ i obučeno osoblje, koje će obavljati složene procedure vođenja i aktiviranja leka.

Kada NČ dospeju u krv može da dođe do njihove aglomeracije, promene svojstava i sekvestracije čestica, kao i do nespecifične interakcije između nanočestica i proteina plazme, što može da pokrene delovanje imunog sistema, vanćelijskih matrica i neciljanih ćelijskih površina. Ovi mehanizmi mogu dovesti do toga da NČ budu izbačene iz organizma, ili da se prevremeno vežu za neciljanu ćeliju i tako ne ispune ulogu koja im je namenjena.

Postoje i različita anatomska ograničenja koja ograničavaju pristup ciljnom tkivu nanočesticama određene veličine (npr. ekstravazacija iz krvnih sudova NČ kojima je cilj limfa). Ova ograničenja treba posebno uzeti u obzir kada NČ za cilj imaju organe kao što su mozak i bubreg, jer samo dovoljno male NČ odgovarajućih fizičko-hemijskih osobina mogu proći čak i krvno moždanu barijeru.

Strategija usmeravanja i koncentrisanja MNČ, kao nosilaca lekova, u željenu oblast (tkivo) pomoću spoljašnjeg magnetnog polja je već dobro zasnovana [Boyer C., 2010, Mornet S., 2004]. Kada se ferrofluid intravenski unese u organizam, spoljašnje magnetno polje pomaže u akumulaciji MNČ na željenim mestima u organizmu, tako da je moguće ostvariti značajnu koncentraciju npr. hemoterapijskih agenasa na ciljanom mestu bez većih toksičnih efekata. Osim od jačine primenjenog magnetnog polja, akumulacija MNČ zavisi i od fizioloških parametara, kao što su veličina čestice, karakteristike njene funkcionalne površine, i brzina protoka krvi [Rahisuddin R., 2010].





Slika 4.2.2. Magnetno usmeravanje leka u specifični region. Kateter je umetnut u arteriju koja hrani tumor, a magnet je postavljen iznad ciljanog mesta [Tartaj P., 2003].

MNČ bez obloge mogu u ćelijskom okruženju izazvati denaturizaciju proteina, što dalje može proizvesti toksične efekte [Chomoucka J., 2010]. Neobložene SPION čestice bivaju brzo apsorbovane makrofagama, što je iskorišćeno za njihovo usmeravanje u jetru i slezinu, ali je ovaj metod ograničen uglavnom na ova dva organa.

U primenama *in vivo* MNČ moraju biti obložene biokompatibilnom oblogom, koja sprečava stvaranje velikih agregata, promene u originalnoj strukturi i biodegradaciju MNČ tokom njenog boravka u biološkom sistemu. Lekovi se na oblogu mogu vezati pomoću kovalentne, vodonične, ili neke druge veze polarnog tipa, kao i pomoću hidrofobno/hidrofilne interakcije. Lek se može vezati i direktno na SPION (kao u slučaju citostatika amptohecin-a), pa tek onda obložiti biorazgradljivom oblogom, kao što je kombinacija polivinilalkohol/polivinilamin. Obloge koje se koriste u isporuci lekova moraju da imaju odgovarajuće hemijske karakteristike, da budu rastvorljive u vodi i biorazgradljive [Jokanović V., 2012]. Moguće je da lek promeni karakteristike originalne MNČ, kao što su hidrodinamička veličina, stabilnost i magnetizacija i da utiče na njihovu bioraspodelu [Jain T.K., 2008].

SPION sa organskom oblogom, na koju je vezan lek, pokazale su se veoma korisnim, kako za transport leka u željenu oblast, tako i za bolju vizualizaciju ciljne oblasti u organizmu, pomoću MRI tehnike [Boyer C., 2010]. NČ oksida gvožđa, uglavnom magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) i maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) najčešće se koriste za ove primene, jer su jako

magnetni materijali, kao što su kobalt i nikl, toksični, podložni oksidaciji i stoga manje pogodni za upotrebu [Tartaj P., 2003].

Da bi se povećala verovatnoća da čestice stignu do željenog mesta u organizmu, nakon oblaganja njihove površine odgovarajućom oblogom, oblozi mogu da se dodaju ligandi, koji imaju tendenciju da se vežu za odgovarajuće ćelije, pomoću procesa molekularnog prepoznavanja, kao što je interakcija antitelo-antigen. Ligandi su obično oligo-saharidi, oligo-peptidi (RGD, NGR [Boyer C., 2010]), mali molekuli, kao folna i oleinska kiselina [Boyer C., 2010], aptamer-i, proteini (monoklonalna antitela [Boyer C., 2010]) i njihovi fragmenti, pri čemu ovaj poslednji izbor ima bar dve mane, veličinu antitela (oko 20 nm) i njihovu osobinu da izazivaju imuni odziv organizma. Nasuprot tome, receptori folne kiseline intenzivno interaguju sa površinom ćelija raka, a pored toga pomažu unošenje inkapsuliranih lekova u pronadjene ćelije raka [Boyer C., 2010]. Pomoću ovakvog označavanja ligandima, moguće je delovati na vaskularne embolije i trombove, kao i na metastaze tumora.

Magnetno jezgro se može iskoristiti da se lek oslobodi u željenom trenutku, nakon što se pomoću MRI ustanovi da je čestica stigla do željenog cilja. To se postiže lokalnim zagrevanjem čestice naizmeničnim magnetnim poljem (kao kod hipertermije), koje oslobađa vezani lek iz ovojnice, za koju je do tada bio čvrsto vezan. Ovaj pristup koršćen je u slučaju leka koji je smešten unutar SPION obloge od termo-osetljivog polimera PEG-b-PEO-b-PEG, umreženog želatinom.

Lek se može osloboditi i pomoću kontrole pH vrednosti, što podrazumeva postojanje takve veze između leka i noseće čestice koja je osetljiva na pH vrednost, kao što je to slučaj kod leka doxorubicin-a vezanog za SPION oblogu od poli-oligo- etilenglikola.

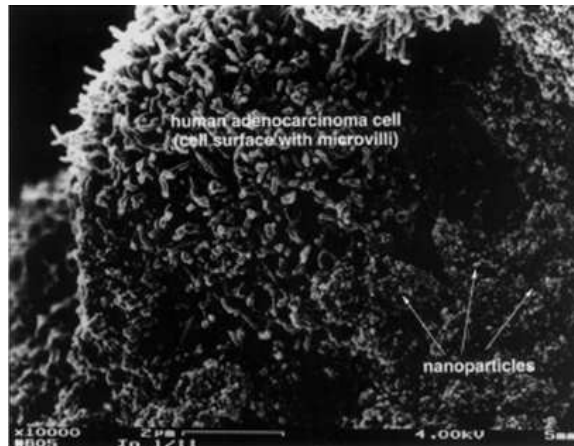
Hidrofobna/hidrofilna interakcija korišćena je da se doxorubicin inkapsulira u hidrofobično jezgro poli(D,L-laktid), stabilisano hidrofилnom ovojnicom, na koju su zakačeni RGD peptidi, kao agensi koji usmeravaju česticu. Oslobađanje leka kontrolisano je uticajem pH vrednosti na biorazgradivost jezgra.

Dugo vreme cirkulacije nanočestica manjih od 500 nm omogućava njihovu akumulaciju u tumorima i oblastima upale u organizmu, pomoću efekta povećane propustljivosti i retenacije (zadržavanja) EPR. Ovaj efekat je omogućen povećanom propustljivošću

vasularnog sistema i neefikasnom limfnom drenažom u okolini tumora. Za čestice veličine 40-100 nm efekat zavisi samo od vremena preživljavanja NČ u organizmu, tj. od karakteristika obloge, dok za čestice veličine ispod 20 nm, efekat zavisi i od veličine NČ. Manjim česticama je potrebno kraće vreme da stignu do tumora, nego većim, ali je i njihovo vreme zadržavanja u tumoru kraće. Raspodela, pa time i efikasnost NČ, zavisi dakle i od njihove veličine, i od vremena njihovog zadržavanja u oblasti tumora. MNC su već korišćene kao nosači vodonerastvorljivih lekova protiv raka [Jain T.K., 2008]. Merenjem promena intenziteta MRI signala karotidne arterije miša, pokazano je da ove MNC imaju produženo vreme cirkulacije u krvotoku, što je bitno za ciljanu isporuku lekova i vaskularna snimanja.

U jednom istraživanju, dva različita ferofluida su primenjena na ćelije primarnog ljudskog glioblastoma formiranog u intraoperativnom materijalu. Jedan se sastojao od čestica magnetita sa oblogom aminosilanskog tipa sa prečnikom jezgra 10 nm, i hidrodinamičkim prečnikom 30 nm, sa uglavnom pozitivnim površinskim naelektrisanjem, a drugi je imao oblogu od dekstrana, sa prečnikom jezgra od 3 nm, i hidrodinamičkim prečnikom od 70 nm, sa neutralnim, ili slabo negativnim površinskim naelektrisanjem [Jordan A., 1999]. Utvrđeno je da obloga od dekstrana nije sasvim pogodna za unutarćelijsku primenu, jer može da bude "napadnuta" od strane enzima i lizozoma.

Primećuje se da čestice magnetnog fluida imaju veliku adheziju za površinu ćelija karcinoma, što nije, ili je izraženo u daleko manjoj meri, kod normalnih ćelija. Primarne ćelije glioblastoma mnogo više (do 1000 puta) su apsorbivale čestice magnetita sa pozitivno naelektrisanom aminosilanskom oblogom, nego one sa oblogom od dekstrana. Takođe je uočeno da je apsorpcija oba tipa čestica, znatno veća u ćelijama glioblastoma (oko 500-2000 puta), nego u normalnim neuronskim ćelijama i fibroblastu [Jordan A., 1999].



Slika 4.2.3. SEM mikrografija ćelije adenokarcinoma debelog creva uzgajane 72 časa u medijumu ispunjenom ferrofluidom od magnetita sa aminosilanskom ovojnicom, prečnika jezgra oko 10 nm, u koncentraciji od 0.6 mg/ml [Jordan A., 1999].

Iako je vezivanje proteina za nanočestice u principu nepoželjno, u nekim slučajevima ono može pomoći da se prođu specifične barijere u organizmu, kao što je slučaj sa apolipoproteinom, koji pomaže prolasku krvno-moždane barijere.

U terapiji je moguće iskoristiti i druge osobine MNČ ili ferrofluida. Usmeravanjem magnetnih NČ pomoću spoljašnjeg magnetnog polja moguće je ostvariti embolizaciju (začepljenje) kapilara koji su napajali tumor i time onemogućiti njegovu ishranu [Akhtar J., 2009].

### 4.3. Nanočestice kao kontrasti za merenja magnetnom rezonansom

Magnetna rezonansa (MRI) je tehnika zasnovana na merenju signala koji nastaje kada se jezgro nekog hemijskog elementa sa neparnim brojem protona nađe u homogenom magnetnom polju indukcije  $\mathbf{B}_0$ , a istovremeno je izloženo drugom, na njega normalnom, promenljivom radio-frekventnom (RF) polju, koje prouzrokuje transverzalnu magnetizaciju. Korišćenje ove tehnike za snimanja u organizmu omogućavaju protoni iz vode, različitih tkiva, membrana lipida, proteina, itd. Nakon prestanka transverzalnog RF signala, vektor magnetizacije teži da se usmeri paralelno sa  $\mathbf{B}_0$ , a protoni teže da se vrate

u ravnotežno stanje. Ovaj proces se naziva relaksacija i ona zavisi i od intenziteta statičkog magnetnog polja i od karakteristika sekvence impulsa RF talasa.

Relaksacija može biti:

- longitudinalna (spin-lattice relaksacija), koja se karakteriše vremenom  $T_1$ , za koje se magnetni momenti u merenom sistemu poravnaju sa pravcem polja  $\mathbf{B}_0$ , (vreme za koje se ponovo uspostavi 63% longitudinalne magnetizacije),
- transverzalna (spin-spin relaksacija), koja se karakteriše vremenom  $T_2$  koje je potrebno da transverzalna magnetizacija opadne na 37% od početne vrednosti (iščezavanja signala u pravcu normalnom na  $\mathbf{B}_0$ ).

Još dva vremena su važna za razumevanje informacije koja se dobija iz MR signala: vreme ponavljanja RF impulsa,  $T_R$  (repetition time), i vreme kašnjenja, odnosno vreme između završetka RF impulsa i početka merenja signala,  $T_E$  (echo time). Od vrednosti  $T_R$  i  $T_E$  zavisi da li će u MRI signalu preovladati  $T_1$  ili  $T_2$  efekat.

Kako intenzitet MRI signala zavisi od trajanja intervala  $T_1$  i  $T_2$  i gustine protona u posmatranoj zapremini, on će se menjati sa promenom navedenih parametara. Intenzitet signala će porasti ako se smanji  $T_1$ , poveća  $T_2$  i poveća gustina protona. Brzine relaksacije u različitim tkivima su različite, što omogućava kontrast između različitih struktura, i kontrast između normalnog i abnormalnog tkiva. Bolje magnetne osobine tkiva (što uglavnom zavisi od broja i koncentracije protona, tj. od gustine i mobilnosti molekula vode u njemu) omogućavaju intenzivniji signal, pa će slika biti svetlija, a važi i obratno. Zato  $T_1$  i  $T_2$  imaju vrednosti koje su karakteristične za određene vrste tkiva. Promene u tkivu, kao što je promena gustine proteina, edem, ili tumor, uticaće na magnetnu interakciju protona iz vode, što će dovesti do promena u MRI snimku. Na primer, u fluidima, koji su obično povezani sa patologijama kao što su unutrašnje povrede i lezije tumora,  $T_2$  je dugačko, pa se  $T_2$  efekat uglavnom koristi za dijagnoze te vrste promena. Tako se maligni tumori i metastaze tumora jetre, koji obično sadrže znatan broj Kupfferovih ćelija, prilikom snimanja zasnovanog na  $T_2$  kontrastu, vide kao sjajne lezije, nasuprot tamnog kontrasta. Dobar primer je i oksihemoglobin (osnovni hemoglobin u arterijskoj krvi), koji je dijamagnetnik, pa ima slab odziv na relaksaciju okolnih protona, dok je dioksihemoglobin paramagnetik, koji znatno bolje reaguje na

protone iz okruženja. To omogućava da se odredi koji su delovi mozga bolje, a koji lošije snabdeveni kiseonikom, kao i merenje varijacija protoka krvi. [Mornet S., 2004].

Treba uzeti u obzir i da promena magnetnog polja u različitim materijalima zavisi od njihove magnetne susceptibilnosti. Za tkiva je ona mala i iznosi oko 9 ppm ( $1 \text{ ppm} = 1 \times 10^{-6}$ ), što znači da je magnetno polje u tkivu samo malo manje nego van njega.

Upotreba kontrastnog agensa može značajno uticati na vremena relaksacije. Kontrastni agensi mogu biti paramagnetna makromolekularna jedinjenja, superparamagnetne (SPM) čestice oksida gvožđa (SPION), ili organski kompleksi jona retkih zemalja [Bahadur D., 2003].

Postoji više kriterijuma za podelu kontrastnih agenasa. Prema načinu na koji se raspodljaju u organizmu (bioraspodela), kontrastni agensi se mogu svrstati u sledeće grupe [Saebo K.B., 2004]:

- materijali male molekularne težine rastvorljivi u vodi, koji se raspodeljuju u vanćelijskomom prostoru. Oni se iz organizma izbacuju renalno i imaju ograničenu biotransformaciju.
- Vodo-rastvorljivi materijali koji u određenoj meri interaguju sa endogenim krvnim materijalom. Ovi agensi se izlučuju renalno, sa ograničenim preuzimanjem od strane RES.
- Unutar-vaskularni čestični kontrastni agensi koji se eliminišu, ili razlažu preko RES.
- Kontrastni agensi koje se unose u specifične ćelije, ili tkiva, pasivnim ciljanjem pomoću sekundarnih mehanizama bioraspodele.
- Kontrastni agensi koji aktivno ciljaju specifične ćelije ili tkiva.

Prema preovlađujućoj vrsti relaksaciji, kontrasti se dele na pozitivne i negativne. Negativni kontrastni agensi su uglavnom SPION čestice, sa hidrodinamičkim prečnikom većim od 50 nm, koje indukuju veliko skraćenje vremena transverzalne relaksacije  $T_2$  protona iz okolne vode, što dovodi do opadanja intenziteta signala, a time i do "zatamnjenja" slike. Pozitivni kontrastni agensi su pretežno paramagnetni helati koji

izazivaju veliko skraćanje vremena longitudinalne relaksacije  $T_1$ , što pojačava intenzitet signala iz posmatranog tkiva i "posvetljava" MRI sliku. Za pravilan izbor kontrasta, neophodno je utvrditi karakteristike ispitivanog tkiva, i na osnovu toga, tip relaksacije koji omogućava optimalan kvalitet slike.

Kontrastni agensi se mogu podeliti i na osnovu specifičnog odnosa  $T_2/T_1$ . Ako je ovaj odnos 1-5, agens je pogodan da generiše pozitivan kontrast pomoću  $T_1$  sekvenci. Ako je ovaj odnos veći od 5, kontrastni agens će najbolju vizualizaciju obezbediti preko  $T_2$  i  $T_2^*$ .

Paramagnetni joni sa nesparenim elektronskim spinom (gadolinijum  $Gd^{3+}$ , gvožđe  $Fe^{2+}$ , mangan  $Mn^{2+}$ ) utiču na kontrast slike i intenzitet signala tako što svojim lokalnim magnetnim poljem efikasno skraćuju vreme relaksacije  $T_1$  protona u svojoj okolini. Zato se razne vrste organo-metalnih kompleksa male molekulske težine koje sadrže pomenute metalne jone koriste kao pozitivni MRI kontrastni agensi. Prva generacija kontrastnih materijala bila je zasnovana baš na materijalima ove vrste, koji su sadržali paramagnetni jon  $Gd^{3+}$  sa sedam nesparenih elektrona i velikim spinom. Međutim, Gd je potencijalno toksičan, a helati, organska jedinjenja u kojima je smešten za ovu primenu, nisu tkivo-selektivni.

Druga vrsta kontrastnih agenasa koristi MNC na bazi oksida gvožđa (SPION). Kao rezultat kolektivne interakcije magnetnih dipola atoma, magnetni moment MNC zavisi od njene veličine, morfologije, kristalne strukture i uniformnosti. Osim od magnetnog momenta, intenzitet MRI signal će zavisiti i od količine i položaja MNC u tkivu, njihove koncentracije u okviru datog voksela, parametara primenjenog, magnetnog polja, i načina prikupljanja podataka [Wang Y.X., 2001]. I u malim koncentracijama, SPION značajno pojačavaju MRI signal, tako što skraćuju vremena relaksacije  $T_1$  i  $T_2$  u tkivima u kojima se nalazi agens. Skraćenje  $T_1$  relaksacije rezultuje hipersignalom, pa utiče na porast pozitivnog kontrasta, dok skraćenje  $T_2$  i  $T_2^*$  pojačava negativan kontrast. U prisustvu statičkog magnetnog polja SPION imaju velike magnetne momente, značajno veće od običnih paramagnetika, što dovodi do jake dipolne interakcije između njih i okolnih protona i povećava brzinu relaksacije (kako longitudinalne tako i transverzalne) protona [Mornet S., 2004]. Efekat je izražen naročito kod čestica sa poluprečnikom manjim od 10 nm [Tartaj P., 2003, Morales M.P., 2003]. To omogućava veliki gradijent magnetnog

polja oko njih, zbog čega je i njihov uticaj na relaksaciju okolnih protona mnogo veći, nego onaj Gd-helata. Do izraženog relaksacionog efekta dolazi usled pojačane difuzije vode kroz jako i nehomogeno magnetno polje koje postoji oko SPION i koje indukuje razuređenje magnetnih momenata protona u vodi, što dovodi do skraćivanja  $T_2$  signala. Takva kontrastna sredstva se takođe nazivaju susceptibilni agensi zbog njihovog uticaja na magnetno polje [Mornet S., 2004]. Slično kao kod ostalih paramagnetnih supstanci, iznad temperature blokiranja,  $T_B$ , kada se ukloni magnetno polje, makroskopska magnetizacija SPION čestica se gubi. Iako se SPION čestice obično koriste kao  $T_2$  kontrastni agensi [Wang Y.X., 2001], ispitivanja su pokazala da se one mogu uspešno koristiti i kao  $T_1$  agensi [Bjornerud A., 2004], jer skraćuju vreme relaksacije  $T_1$  protona iz okolne vode, i povećavaju brzinu "poravnavanja" njihovih magnetnih momenata sa fiksnim magnetnim poljem, pojačavajući signal i stvarajući "pozitivan" kontrast.

Kao i ostali kontrastni agensi, i oni koji se prave od SPION čestica treba da budu biokompatibilni i netoksični, a same čestice treba da imaju uniformnu veličinu, uniforman i veliki magnetni moment i visoku koloidnu stabilnost [Lodhia J., 2010]. Osobine površine i veličina NČ određuju modalitete njihove interakcije sa biološkim sistemima i samim tim i njihovu cirkulaciju i raspodelu u organizmu, pa je izbor jezgra i obloge, od kritičnog značaja. Hemijski sastav obloge određuje površinske interakcije, rastvorljivost i reaktivnost NČ [Lodhia J., 2010], a materijali pogodni za oblaganje su silika, lipidi, polimeri i amfifilni ligandi. Za površinu ovako obloženih čestica mogu dodatno da se vežu lekovi, proteini, enzimi, antitela i druge molekularne grupe koje, pored usmeravanja spoljašnjim magnetnim poljem, omogućavaju dodatne modalitete za ciljanje specifičnih molekula, ćelija i tkiva [Lodhia J., 2010]. Razumevanje mehanizama pomoću kojih obloga MNČ utiče na relaksaciju okolnih protona je od velikog značaja za optimizaciju performansi kontrastnog sredstva. Poznato je da debljina obloge, preko uticaja na ukupni magnetni moment čestice, utiče na  $T_1$  i  $T_2$ . Negativni kontrast ( $T_2$ ) je znatno veći za obloge manje debljine [LaConte L.E.W., 2007]. Zbog toga konjugacija velikih biomolekula, kao što su antitela (prosečan prečnik 10 nm), koja dovodi do povećanja ukupne debljine obloge MNČ može znatno da smanji  $T_2$ . Osim toga osobine biomolekula obloge, recimo dužina polimera, utiču i na broj i raspored molekula u vodi i njenu difuziju u okolini MNČ, pa i na taj način utiču na  $T_2$ . Zbog toga  $T_2$  obično opada sa



dužinom polimernog lanca, odnosno njegovom molekularnom težinom. Takođe, za SPION sa prečnicima u opsegu 10-30 nm, hidrofobne obloge u principu smanjuju  $T_2$  relaksaciju, dok je hidrofilne povećavaju. Ustanovljeno je i da fosfatni ligandi znatno manje utiču na magnetne osobine SPION, nego karboksilati, jer ne dovode do naginjanja spina u površinskoj oblasti čestice.

Postoji i interes za kontrastnim sredstvima sa smanjenim odnosom  $T_2/T_1$ , koji bi se koristili za snimanje krvi [LaConte L.E.W., 2007], pa velike mogućnosti za modifikaciju MNČ govore u prilog njihove upotrebe za *in vivo* MRI snimanja.

Idealane veličine NČ oksida gvožđa za *in-vivo* MRI snimanja su između 5 i 150 nm. Ove NČ treba da imaju visoke vrednosti magnetizacije i velike funkcionalne površine. MNČ sa prečnikom većim od 50 nm, a pogotovo one veće od 200 nm, bivaju zadržane u jetri i slezini i eliminisane preko retikuloendotelnog (RES) sistema (mreža ćelija koje oblažu krvne sudove čija je funkcija da uklone strane supstance iz krvotoka), što dovodi do smanjenja njihovog vremena cirkulacije u organizmu. Ove čestice se uglavnom koriste za oslikavanje jetre i slezine. Manji SPION imaju duže vreme cirkulaciju u krvi, a time i veću mogućnost nakupljanja u određenim organima, ali one sa prečnikom manjim od 5-10 nm, bivaju brzo uklonjene iz organizma preko bubrega [Gupta A.K., Gupta M., 2005]. Uzimajući u obzir činjenicu da je u sastavu organizma veliki procenat vode, jasno je da je za *in vivo* primene hidrodinamička veličina NČ značajnija od veličine samog jezgra čestice. Prema hidrodinamičkoj veličini, kontrastni agensi na bazi NČ oksida gvožđa klasifikovani su kao SPION, ako im je hidrodinamički radijus veći od 40 nm, odnosno kao USPION (ultra-small) ako je taj radijus manji od 40 nm. Za intravaskularnu administraciju, hidrodinamički prečnik NČ na bazi oksida gvožđa veoma retko je veći od 150 nm, a veličina jezgra obično je oko, ili manja od 15 nm. Najčešće se koristi obloga od dekstrana, ili njegovih derivata, male molekulske težine. Kinetika kontrastnih agenasa u krvi je takođe vrlo važan faktor koji treba uzeti u obzir kada se planira upotreba MRI metode, a ključni parametri koji tu kinetiku određuju su veličina čestice i karakteristike obloge [Roohi F., 2012].

Ako nisu apsorbovani u jetri ili slezeni, SPION obično imaju visok specifičan unos u ćelije slične makrofagima, zbog čega se oni intenzivno proučavaju kao MRI markeri za

dijagnozu upalnih i degenerativnih poremećaja, koji su povezani sa visokom aktivnošću fagocita makrofaga. SPION određenih karakteristika se dreniraju kroz limfni sistem i akumuliraju u limfnim čvorovima, i tako omogućavaju dijagnozu tumora limfnih čvorova pomoću MR limfografije. Primećeno je da se nakon intravenskog ubrizgavanja SPION sa prečnikom manjim od 10 nm (USPIO), akumuliraju u limfnim čvorovima, proizvodeći hipointenzivan signal. Za razliku od normalnih limfnih čvorova, čvorovi sa metastazama nemaju makrofaga, pa nakon unošenja kontrasta, oni daju izointenzivan signal u odnosu na snimke bez kontrasta, koje daje normalno tkivo. Zato su USPIO kontrasti potencijalno korisni za otkrivanje metastaza tumora limfnih čvorova [Qiao R., 2009].

Bolji kontrast obično znači i veću osetljivost, što omogućava da se smanji količina kontrastnog agensa potrebnog za snimanje. Ukupna doza gvožđa koja se u kontrastnom agensu koristi prilikom jednog MRI snimanja, obično je manja od one koju sadrži jedna jedinica zdrave krvi, ali je, za dobre MRI snimke *in vivo*, veća nego one potrebne za radiotretsere, za koje su dovoljne nanomolarne koncentracije. [LaConte L.E.W., 2007].

Pored mogućnosti da se koriste kao kontrasti za MRI snimanje, multifunkcionalni SPION imaju i druge, jedinstvene mogućnosti primene u dijagnostici i terapiji, posebno za ranu detekciju različitih bolesti i patoloških procesa [Mandarano G., 2010]. Zahvaljujući interakcijama sa proteinima iz krvi, mononuklearnim fagocitnim ćelijama, biološkim barijerama, ćelijama raka, tkivnim makrofagima, SPION kontrastni agensi su veoma efikasni u otkrivanju različitih bolesti [Lodhia J., 2010, Mandarano G., 2010]. Osim toga, obloga može biti projektovana tako da omogućava hemijsko vezivanje funkcionalnih grupa i liganada koji omogućavaju multimodalno snimanje, ili peptida, terapijskih komponenti i fotosenzibilizatora, koji pomažu u dijagnozi i lečenju [Liu H.M., 2012].

SPION obloženi dekstranom mogu da se zadrže u krvotoku i do dva sata, što omogućava i MR angiografiju. Dekstran je biorazgradiv, a njegova mala molekulska težina smanjuje mogućnosti da dođe do neželjenih reakcija u organizmu. Neki negativni efekti uočeni pri *in vivo* ispitivanju kontrastnog sredstva od dekstranom obloženih USPIO klasifikovani su kao kratkotrajani i slabi [Elias A., 2009]. Zato se SPION obložene dekstranom često upotrebljavaju kao kontrastni agensi koje RES sistem selektivno preuzima, i posle tretmana, izlučuje preko jetre [Pankhurst Q.A., 2003]. Dendrimerne obloge imaju

razgranatu polimernu strukturu koja doprinosi velikoj brzini nespecifičnog ćelijskog vezivanja. One se koriste za lipofekciju agenasa, koji nose DNK u ćelijsko jezgro, i omogućavaju unutarćelijsku ugradnju magnetnih NČ u matičnim ćelijama.

MNČ se takođe koriste u *in vivo* praćenju genske ekspresije [Hoehn M., 2002]. Pogodne su i za enkapsulacija u ciljne, specifične agense, kao što su lipozomi, koji se lokalizuju u koštanoj srži [Pankhurst Q.A., 2003.]. Tako su se magnetolipozomi pokazali kao dobri kontrasti za MRI snimanja kičmene moždine i mononuklearnih ćelija u perifernom krvotoku. Amfifilne obloge produžavaju vreme života i cirkulacije čestica u krvnoj plazmi od reda veličine minuta, do reda veličine sati, čime se poboljšavaju mogućnosti ciljanog usmeravanja kontrastnog agensa [Thorek D.L., 2006].

Komercijalne NČ maghemita (Endorem i Resovit) već su korišćene kao MRI kontrastni agensi za lociranje i dijagnozu tumora, moždanih i srčanih udara i oštećenja jetre. [Kim D.K., 2001]. Pomoću njih je poboljšana osetljivost detekcije i skiciranja patoloških struktura primarnih i metastatičkih tumora mozga, zapaljenja i ishemija [Roberts P.L., 2000]. SHU-55A Resovist ima jezgro veličine 4.3 nm obloženo karbo-dekstranom do prečnika od 60 nm. Ovaj kontrast ima  $T_2$  vreme relaksacije  $151 \text{ mmol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ , i upotrebljava se samo za oslikavanje jetre i slezine. Kako bi se dobile kontrasti pogodni za specifična MIR oslikavanja, za aminima obložene i ukršteno povezane SPION su vezivani protein transferin [Hogemann D., 2000], membransko translocirajući tat-peptid HIV tat protein [Josephson L., 1999; Lewin M., 2000], ili oligonukleotidi različitih sekvenci [Josephson L., 2001]. Posebno funkcionalizovani MRI kontrasti napravljeni od ovih NČ, koriste se i pri vizualizaciji vaskularnog i centralnog nervnog sistema [Pankhurst Q.A., 2003], kao i pri određivanju maligniteta limfnih čvorova, tumora jetre i mozga.

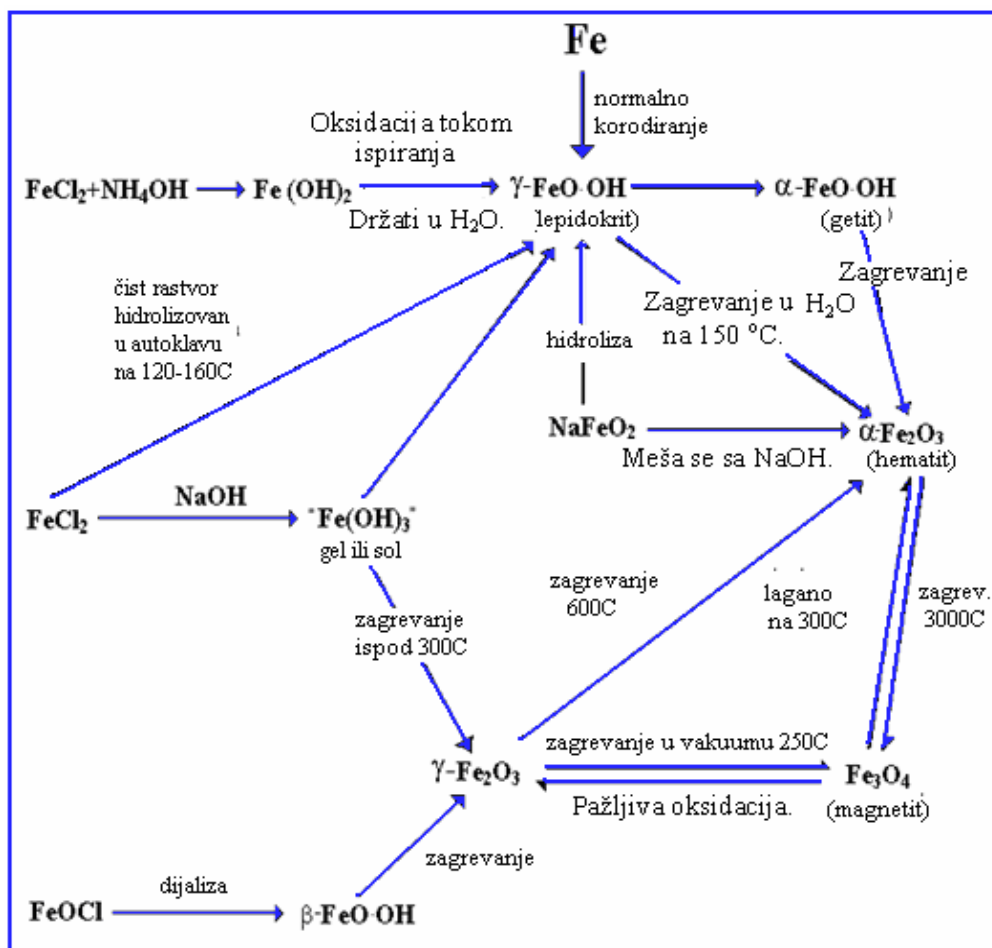
Vršena su i preklinička ispitivanja USPION obloženih dekstranom i karboksi-dekstranom (AMI-227, Sinerem, Combidex i SHU-55C, Supravist) hidrodinamičkog prečnika oko 20 nm, kao kontrastnih agenasa za MRI snimanja limfnih čvorova, koštane srži i inflamatornih procesa. Preklinička ispitivanja MNČ veličine 5-7 nm, obloženih PEG, do hidrodinamičkog prečnika od 20 nm (NC100150, Clariscan), kao MRI kontrasta za angiografiju, limfografiju, otkrivanje tumora i infarkta su obustavljena.

Proizvodi kao OMP (Abdoscan) i AMI-121 (Lumirem, Gastromark) hidrodinamičkog prečnika 300 nm obloženi su polistirenom. Administriraju se oralno i prodaju se u USA i Evropi, kao gastro-intestinalni kontrasti, po prilično visokoj ceni.

Elmiladi i saradnici su razvili novi metod korišćenja SPION kontrastnih agenasa uz primenu ultrazvuka (UZ). Nanočestice, dobijene kombinacijom centrifugalno i magnetno orijentisanog taloženja, tako da se na njihovu površinu mogu dodavati makromolekuli samo sa jedne strane, imaju geometrijski centar koji je različit od centra mase. Kada se tako dobijene čestice ubrzavaju u rezonantnom UZ talasu, one se, zbog svog asimetričnog oblika, povremeno nakrive, što proizvodi dodatne fonone sa UZ frekvencijom koji utiču na vreme relaksacije okolnih protona. Efekat UZ na MRI snimke je primetan, pa upotreba NČ kao lokalne antene u kombinaciji sa UZ, obećava realizovanje novih metoda za dobijanje kontrasta i vizualizaciju dodatnih osobina tkiva.

## 5. DOBIJANJE, OSOBINE, OBLAGANJE I PRIMENA NANOČESTICA OKSIDA GVOŽĐA

Osnovna tema kojom se ova disertacija bavi je proučavanje mogućnosti primene nanoprahova oksida gvožđa, magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) i maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) u medicini. Magnetit i maghemit su feri-magnetici, tj. imaju 2 podrešetke sa suprotno orijentisanim spinovima, slično antiferomagneticima, samo što je magnetni moment na jednoj podrešeci znatno veći nego na drugoj. Odatle potiče znatan makroskopski magnetni moment ovih materijala, tj. njihov magnetizam. Reakcije koje prikazuju različite mogućnosti prelaza između oksida i hidroksida gvožđa, prikazane su na Slici 5.1.



Slika 5.1. Mogućnosti prelaza među različitim hidroksidima i oksidima gvožđa [Cornell R.M., 1996].

Neke osnovne karakteristike gvožđa i njegovih oksida i hidroksida su dat u Tabeli 5.1.

Tabela. 5.1. Neke osnovne karakteristike oksida i hidroksida gvožđa.

Mineral	Strukturni tip	Konstanta rešetke [Å]	Magnetno uređenje	Kritična temperatura $T_C, T_N$ [°C]	T topljenja ili prelaza $T_m$ [°C]	$M_s$ [ $\text{Am}^2/\text{kg}$ ]
Iron, Fe	bcc	2.87	FM	770	1535	
<b>Oksidi</b>						
Magnetite $\text{Fe}_3\text{O}_4$	Spinel, Fd3m	8.397	ferrimagnet	575-585	1594(5)	90-92
Hematite $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Romboedarska	5.04 13.76	canted AFM	675	1565	0.4
Maghemite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Spinel, Fd3m ili Tetraedarska $P2_13$	8.346	ferrimagnet	~600	>300	~80
<b>Oksihidroksidi</b>						
Goethite $\alpha\text{-FeOOH}$	Rombična	4.65 10.02 3.04	AFM, slab FM	~120	200	<1
Lepidocrocite, $\gamma\text{-FeOOH}$	Rombična	3.88 12.54 3.06	AFM	-196		
Feroxyhyte $\delta\text{-FeOOH}$			ferrimagnet	~180		<10

FM = feromagnetno uređenje, AFM = antiferomagnetno uređenje

$T_C$  = Curie,  $T_N$  = Néel temperatura,  $M_s$  = magnetizacija zasićenja na sobnoj temperaturi.

## 5.1. Osobine oksida gvožđa sa strukturom spinela

Spinelni su klasa jedinjenja sa strukturom koja je ime dobila po mineralu spinelu,  $MgAl_2O_4$ . Osim jedinjenja interesantnih za ovaj rad, magnetita  $Fe_3O_4$  i maghemita  $\gamma-Fe_2O_3$ , ovu strukturu imaju, recimo i minerali jakobsit  $MnFe_2O_4$  i hromit  $(Fe,Mg)Cr_2O_4$ .

Spinel struktura se može predstaviti opštom formulom:  $(A_{1-x}B_x)[A_{x/2}B_{1-x/2}]_2O_4$ , gde mala i srednja zagrada označavaju redom tetraedarske i oktaedarske položaje u kristalnoj rešeci,

**A** – (formalno) dvovalentne katjone,

**B** – (formalno) trovalentne katjone,

**O** – dvovalentne anjone kiseonika koji se nalaze u temenima tetraedara, tj. oktaedara.

Idealna spinel struktura je kubna, sa prostornom grupom  $Fd3m$  i gustim pakovanjem kiseonikovih anjona (32 po jediničnoj ćeliji, na kristalografskom položaju 32e). U idealnoj spinel strukturi, parametar položaja kiseonika  $u$  iznosi  $3/8$ , dok u realnim sistemima ovaj parametar ima nešto veću vrednost. Katjoni zauzimaju 8, tj.  $1/8$  od ukupno 64 tetraedarske intersticije (kristalografski položaj 8a), i 16, tj.  $1/2$  od ukupno 32 oktaedarske intersticije (kristalografski položaj 16d), u jediničnoj ćeliji. Oktaedri kiseonika koji su raspoređeni oko kristalografskih položaja 16d formiraju mrežu povezanu zajedničkim ivicama. Tetraedri kiseonika koji su raspoređeni oko kristalografskih položaja 8a, imaju zajedničke vrhove (rogljeve) sa oktaedrima, ali ne i sa drugim tetraedrima.

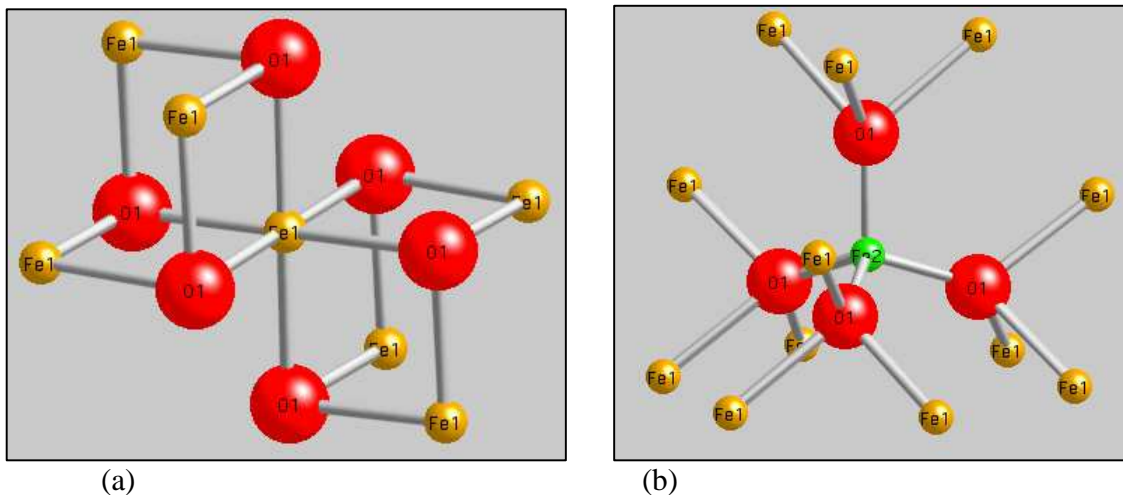
Normalna spinelna struktura se javlja za vrednost faktora inverzije  $x=0$ , pri čemu formula jedinjenja postaje  $(A)[B_2]O_4$ , što znači da svi A (dvovalentni) katjoni zauzimaju tetraedarske položaje a svi B (trovalentni) katjoni oktaedarske položaje.

Inverzna spinelna struktura se formira za  $x=1$ . Oblik jedinjenja je  $(B)[AB]O_4$ , tj. polovina B katjona je u tetraedarskim položajima, a druga polovina, zajedno sa A katjonima zauzima oktaedarske položaje.

Mešovita spinelna struktura se formira za  $x=1/3$ , sa raspodelom katjona između one u normalnoj, i one u inverznoj spinel strukturi.

Koji će od ovih tipova spinela nastati, zavisi od vrste jona koji formiraju jedinjenje, i uslova pri kojima ono nastaje.

Na sobnoj temperaturi, magnetit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ima inverznu spinel strukturu. To znači da je jedan tetraedarski položaj po jedinici formule zauzet sa  $\text{Fe}^{3+}$  katjonima, a da je jedan od dva oktaedarska položaja po jedinici formule zauzet sa  $\text{Fe}^{3+}$ , a drugi sa  $\text{Fe}^{2+}$  katjonom, tj. jedinjenje se može prikazati formulom  $(\text{Fe}^{3+})[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]\text{O}_4$ . Okruženja oko katjona gvožđa na oktaedarskom [Fe1], i tetraedarskom položaju, (Fe2), prikazane su, redom, na Slikama 5.1.1. (a) i (b).



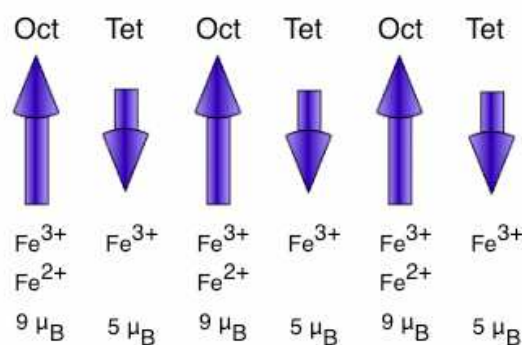
Slika 5.1.1. Okruženja oko katjona gvožđa u: (a) oktaedarskom [Fe1] i (b) tetraedarskom (Fe2) položaju. O1-kiseonik (velike crvene sfere)

Magnetna struktura magnetita je tipična za spinele koji imaju veliku koncentraciju magnetnih katjona i na oktaedarskim i na tetraedarskim položajima. Ona zavisi od veličine i znaka super-izmenske interakcije između susednih Fe atoma, koja opet zavisi od stepena prekrivanja Fe-3d i O-2p orbitala, i ugla Fe-O-Fe veze. Pošto Fe joni zauzimaju i tetraedarske i oktaedarke položaje, u obzir se moraju uzeti *tetraedar-tetraedar (tet-tet)*, *oktaedar-oktaedar (okt-okt)* i *tetraedar-oktaedar (tet-okt)* najbliži susedi. Daleko najjača magnetna interakcija u strukturi magnetita je između  $\text{Fe}^{3+}$  na tetraedarskim i  $\text{Fe}^{3+}$  na oktaedarskim položajima, preko *tet-O-okt* veze koja gradi ugao od oko  $125.2^\circ$ . Ova interakcija je negativna, tj antiferomagnetna, što znači da su magnetni



momenti  $\text{Fe}^{3+}$  jona na tetraedarskim, antiparalelni magnetnim momentima  $\text{Fe}^{3+}$  jona na oktaedarskim položajima. Sledeća interakcija po jačini je ona između najbližih oktaedarskih položaja, sa *okt-O-okt* uglom veze od  $90^\circ$ . U magnetitu je i ova interakcija negativna (antiferomagnetna), ali pošto je prethodno pomenuta *tet-okt* interakcija mnogo jača, ona prisiljava sve magnetne momenate na oktaedarskoj podrešeci da se uredi u istom smeru, tj. feromagnetno. Pošto tetraedri nisu međusobno prvi susedi, pa ne postoji direktna *tet-O-tet* veza, *tet-tet* interakcija je najslabija. Zbog toga je i uređenje na tetraedarskoj podrešeci uslovljeno *tet-okt* interakcijom, pa je zato i ono feromagnetno. Veza između tetraedara koji su međusobno najbliži ima *tet-O-tet* ugao od oko  $80^\circ$ .

Magnetna struktura koja minimizira totalnu energiju ovih različitih izmenschkih interakcija je jednostavna kolinearna struktura u kojoj postoji feromagnetno uređenje magnetnih momenata i na oktaedarskoj, i na tetraedarskoj podrešeci, i antiferomagnetno uređenje između ove dve podrešetake. Ovakav tip magnetne strukture prikazan na Slici 5.1.2. poznat je kao *ferimagnetna struktura*.



Slika 5.1.2- Šematski prikaz ferimagnetne strukture magnetita

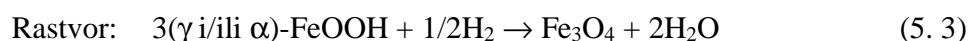
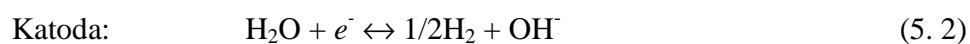
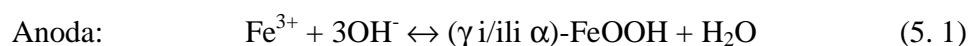
Ukupna magnetizacija tako uredenog spinela određena je razlikom između magnetizacije oktaedarske i tetraedarske podrešetke. Kod magnetita, jedan  $\text{Fe}^{3+}$  katjon (sa momentom  $5 \mu_B$ ) i jedan  $\text{Fe}^{2+}$  katjon (sa momentom  $4 \mu_B$ ) po jedinici formule, nalaze se na oktaedarskim položajima, a jedan  $\text{Fe}^{3+}$  katjon je na tetraedarskom položaju. Prema tome, očekivana magnetizacija magnetita u slučaju potpunog uređenja je  $M_s = (5 + 4) - 5 = 4$

$\mu_B$ . Eksperimentalno ustanovljena vrednost je  $4.1 \mu_B$ , a razlika potiče od malog doprinosa nespregnutih orbitnih magnetnih momenata  $Fe^{2+}$  na oktaedarskom položaju.

## 5.2. Dobijanje nanoprahova oksida gvožđa elektrohemijском (EH) metodom

Da bi se odredila optimalna procedura za dobijanje magnetita EH metodom, urađen je veliki broj eksperimenata pri različitim uslovima sinteze [Vuličević LJ., 2006, Vuličević LJ., 2007a, Vuličević LJ., 2007b, Vuličević LJ., 2008]. Dve elektrode od čelika sa malim sadržajem ugljenika (99.6 masenih% Fe, najzastupljenija primesa je 0.25 masenih% Mn) su uronjene u vodeni rastvor NaCl, na međusobnom rastojanju od 3cm. NaCl je korišćen da bi poboljšao provodnost između elektroda, i nije imao drugih uticaja na EC proces. Mogućnosti za dobijanje prahova oksida gvožđa su ispitivane u opsegu temperatura 293-361 K, i gustina struje u opsegu 200-1000 mA/dm<sup>2</sup>, tokom vremenskog intervala 30-60 min., koji je dovoljno dugačak da se proizvede zadovoljavajuća količina praha, bez značajnije promene pH vrednosti elektrolita. Sintetizovani prahovi su sakupljeni na dnu EH ćelije, i izdvajani procesom filtracije. Da bi se usporilo starenje prahova, tako dobijeni filtrat je ispiran u destilisanjoj vodi dok mu provodnost ne bi pala ispod 10  $\mu$ S/cm.

Procesi u EH ćeliji mogu se prikazati jednačinama:



### 5.3. Karakterizacija i osobine nanoprahova oksida gvožđa dobijenih EH metodom

Pored magnetita, u dobijenim prahovima se može očekivati i mala količina maghemita  $\gamma$ - $Fe_2O_3$ , posebno ukoliko je magnetit bio izložen duže vremena vazduhu i vlazi na povišenoj temperaturi. Magnetit i maghemit se mogu prikazati zajedničkom formulom  $(Fe^{3+})_A [Fe^{2+}_{1-y} Fe^{3+}_{1+y/3}]_B O_4$ , ( -vakancije,  $0 \leq y \leq 1$ ,  $y=0$ -čist magnetit,  $y=1$ -čist maghemit). A označava tetraedarske, a B oktaedarske položaje u strukturi spinela. Na osnovu formule se vidi da se maghemit može smatrati potpuno oksidisanom fazom magnetita, koja nastaje reakcijom:



koja je, u vazduhu, posebno efikasna na temperaturama iznad 550 K.

Karakteristike nekih prahova dobijenih opisanom EH metodom, date su u Tabeli 5.3.1.

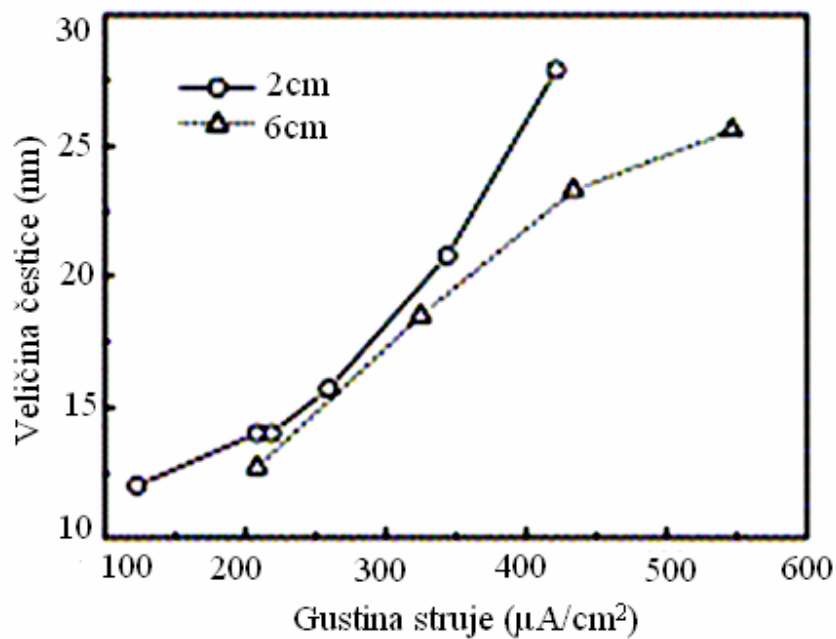
Tabela 5.3.1. Karakteristike nekih prahova magnetita dobijenih opisanom EH metodom [Mamula Tartalja D., 2014a]

Uzorak	J [mA/dm <sup>2</sup> ]	T [K]	$d_{cr}$ [nm]	a [Å]	$\Delta V$ [Å <sup>3</sup> ]	y/3 [nm]	$n_{vac}$ [nm]	T <sub>C</sub> [K]
1	200	293	8	8.364	6.95	0.216	1.7	580
2	200	313	12	8.368	6.11	0.190	1.5	750
3	200	333	18 10-30*	8.35	9.89	0.307	2.5	862
4	200	361	34	8.396	0.21	0.007	0.51	862
5	300	333	24	8.369	5.90	0.183	1.5	758
6	500	333	18	8.32	16.1	0.503	4	690
7	1000	333	20 15-30*	8.37	5.70	0.176	1.4	610
8	1000	361	21 10-30*	8.384	2.75	0.085	0.7	900

J – gustina struje, T – temperatura, u EC ćeliji za vreme sinteze, a-konstanta rešetke,  $d_{cr}$ -veličina kristalita određena pomoću XRD merenja (\*- vrednosti procenjene iz TEM merenja),  $\Delta V$ -izmerena razlika zapremine jedinične ćelije uzorka u odnosu na idealan

magnetit ( $a_{\text{mgn}}=8.397\text{\AA}$ , JCPDS 19-629),  $y/3$ -parametar oksidacije,  $n_{\text{vac}}$ -broj vakancija u jediničnoj ćeliji uzorka, procenjen pod pretpostavkom da je konstanta rešetke maghemita ( $a_{\text{mgh}}=8.346\text{\AA}$ , JCPDS 39-1346),  $T_{\text{C}}$ -Curie temperatura određena merenjem temperaturske zavisnosti magnetizacije.

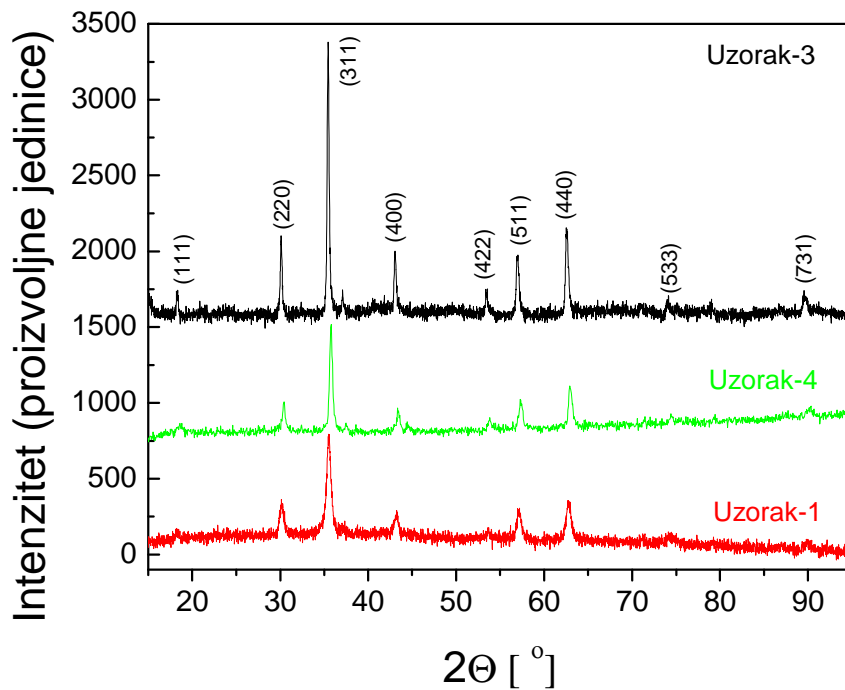
Iz rezultata prikazanih u Tabeli 5.3.1. se vidi da u proučavanom opsegu parametara temperatura  $T$  tokom EH sinteze više utiče na veličinu kristalita  $d_{\text{cr}}$ , nego gustina struje  $J$ . Pri  $J=200\text{ mA/dm}^2$ ,  $d_{\text{cr}}$  raste sa  $T$  po paraboličnom zakonu, dok se recimo, za  $T=333\text{ K}$ ,  $d_{\text{cr}}$  kreće u uskom opsegu između 18 i 24 nm, pri promenama gustine struje  $J$  u celom opsegu od 200 do 1000  $\text{mA/dm}^2$ . Rezultati koje su istom metodom, pri nešto drugačijim uslovima u EH ćeliji dobili drugi istraživači [Fajaroh F., 2012], prikazani su na Slici 5.3.1.



Slika 5.3.1. Efekat gustine struje i rastojanja između elektroda na veličinu čestica magnetita dobijenih EH metodom [Fajaroh F., 2012].

Vidi se da je uticaj razmaka između elektroda pri većim gustinama struje značajan. Na žalost, rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su izvan opsega gustina struja prikazanih na Slici 5.3.1., čime je onemogućeno direktno poređenje. Na osnovu korišćenog razmaka između elektroda od 3 cm, oni bi trebalo da se nalaze između dve zavisnosti prikazane na Slici 5.3.1.

Merenja difrakcije X-zračenja (XRD) vršena su sa Philips difraktometrom, koji koristi Philips PW 1130 generator X-zračenja na 40 kV i Cu-K $\alpha$  doublet sa srednjom talasnom dužinom  $\lambda=1.5418$  Å. Difraktometar je povezan sa Philips PW 1710 kontrolerom i Ni filterom. Merenja su vršena u Bragg-Brentano refleksionoj geometriji, u opsegu uglova  $2\Theta = 10-100$  stepeni, sa korakom od 0.05 stepeni. Neki karakteristični XRD snimci prikazani su na Slici 5.3.2.



Slika 5.3.2. XRD difraktogrami uzoraka 1, 3 i 4. Dominantna (indeksirana) faza u svim uzorcima je magnetit.

Neki strukturni parametri magnetita i maghemita, važni za razumevanje ova dva jedinjenja, dati su u Tabeli 5.3.2.

Tabela 5.3.2. Neki strukturni parametri magnetita i maghemita.

Koordinacija	$d_{Fe-O}$ [Å]	$R_{Fe^{3+}}$ [Å]	$R_{Fe^{2+}}$ [Å]	$\Delta V_{tet}^{3+}$ [Å <sup>3</sup> ]	$\Delta V_{oct}^{3+}$ [Å <sup>3</sup> ]	$\Delta V_{oct}^{2+}$ [Å <sup>3</sup> ]
Tetraedarska	#1.857	0.49 #0.457	0.63	0.37 #0.277		
Oktaedarska	#2.077	0.645(HS) 0.55(LS) #0.609	0.78(HS) 0.61(LS) #0.745		0.332 -0.095 #0.154	1.196 0.159 #0.940

$d_{Fe-O} = 1.99$  Å je “kritična” vrednost oktaedarske  $Fe-O$  veze pri kojoj dolazi do faznog prelaza metal-izolator [Frick M., 2007].

$d_{O-O} = 2.80$  Å je dužina  $O-O$  veze u idealnom magnetitu, pod pretpostavkom da je jonski radijus kiseonika  $R_{O^{2-}} = 1.40$  Å [Slater J., 1965].

$R_{Fe^{3+}}$ , i  $R_{Fe^{2+}}$ , su jonski radijusi gvožđa, (HS) – high spin, (LS) – low spin vrednosti [Shannon R. D., 1976].

#1.857, #2.077 su eksperimentalno određene  $d_{Fe-O}$  distance u uzorku 4, koji ima najbolje definisanu strukturu od svih ispitivanih uzoraka.  $\#R_{Fe^{3+}}$  i  $\#R_{Fe^{2+}}$  su odgovarajuće vrednosti određene iz izmerenih dužina veze pod pretpostavkom da uzorak magnetita ima idealnu strukturu inverznog spinela i da je  $R_{O^{2-}} = 1.40$  Å.

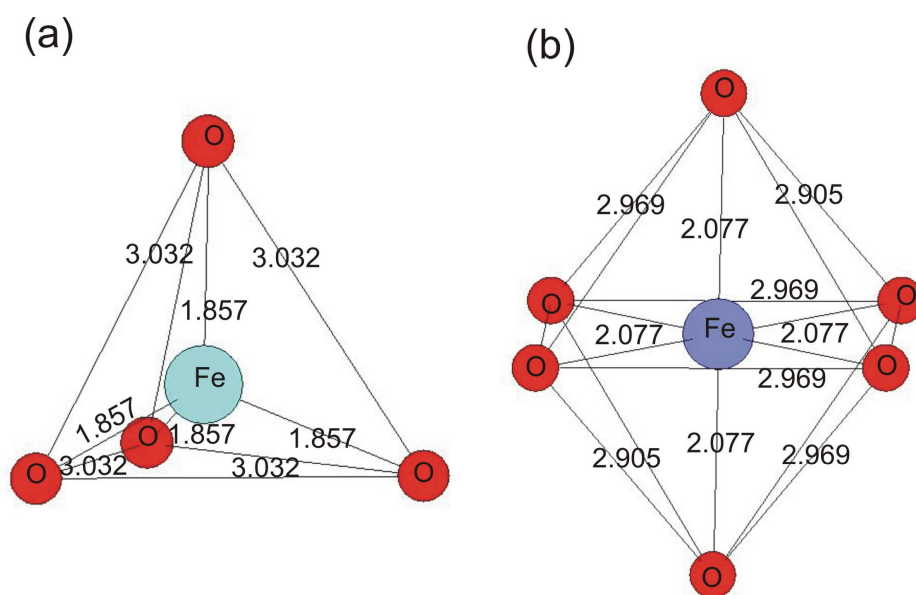
$R_{tet} = 0.308$  Å i  $R_{oct} = 0.574$  Å su radijusi tetraedarske i oktaedarske vakancije, redom za  $R_{O^{2-}} = 1.40$  Å [Gottstein G., 2004].

$\Delta V_{tet}^{3+}$ ,  $\Delta V_{oct}^{2+}$ ,  $\Delta V_{oct}^{3+}$ , su širenja kristalne rešetke uslovljena razlikom u zapremini  $Fe^{3+}$  i  $Fe^{2+}$  jona, i njima dostupnih vakancija.

Konstante rešetke magnetita i maghemita se razlikuju samo za oko 5%, što daje razliku u zapremini jediničnih ćelija dva jedinjenja od  $10.723$  Å<sup>3</sup>. Znajući da u idealnom slučaju maghemit ima  $2^{2/3}$  vakancije po jediničnoj ćeliji više nego magnetit, doprinos jedne

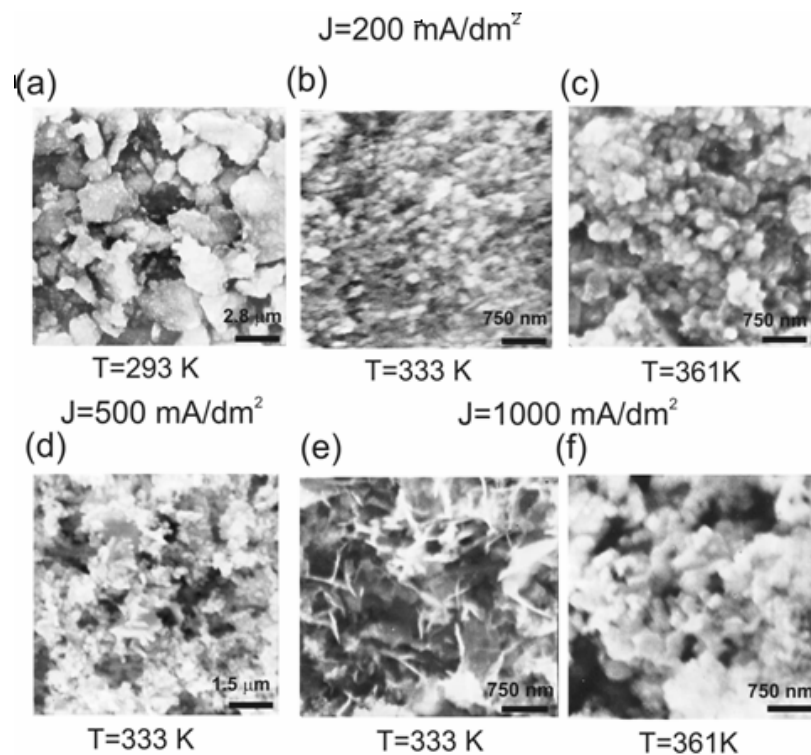
vakancije kontrakciji jedinične ćelije bi trebalo da bude  $V_{vac} = 4.021 \text{ \AA}^3$ , što je mnogo više nego što iznosi razlika u veličini, bilo  $\text{Fe}^{2+}$ , bilo  $\text{Fe}^{3+}$  jona, i njima dostupnih vakancija u strukturi podrešetke kiseonika (Tabela 5.3.2.). Na osnovu toga se može zaključiti da strukturnoj relaksaciji pri prelasku magnetita u maghemit, više od polovine doprinosa daju faktori koji nisu čisto geometrijski.

Na Slici 5.3.3. su prikazani detalji strukture: (a) tetraedarskog (8a), i (b) oktaedarskog (16d) položaja u uzorku 4, određeni utičnjavanjem XRD podataka punom Rietveld metodom.

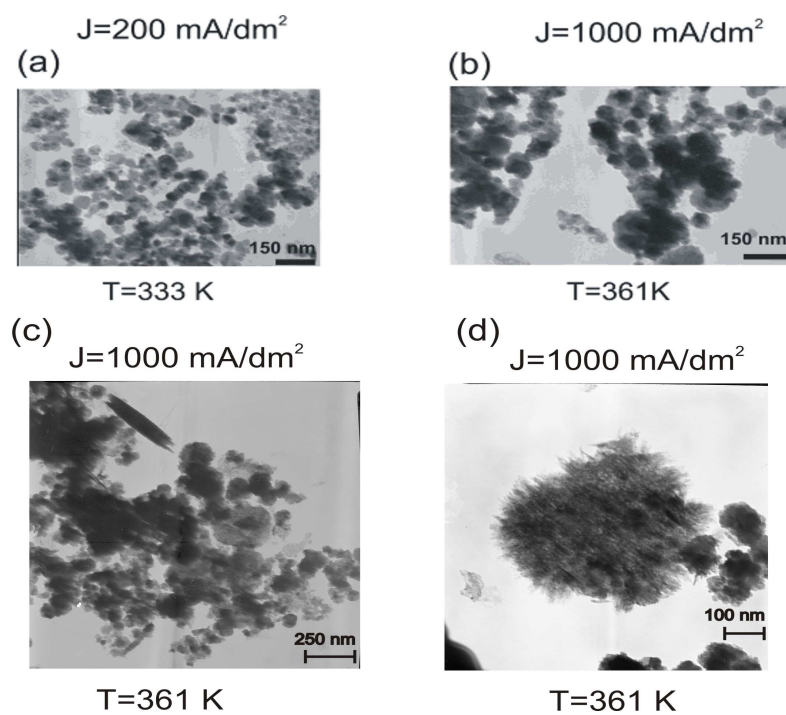


Slika. 5.3.3. Detalji strukture: (a) tetraedarskog (8a), i (b) oktaedarskog (16d) položaja u uzorku 4, određeni utičnjavanjem XRD podataka punom Rietveld metodom

Na Slici 5.3.4. su prikazane mikrografije nekih od dobijenih prahova, snimljene skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) JOEL, JSM-35 pri energiji elektronskog snopa od 25 keV, pri nultom upadnom uglu (snop normalan na uzorak).



Slika 5.3.4. SEM mikrografije uzoraka: 1-(a), 3-(b), 4-(c), 6-(d), 7-(e), i 8-(f) [Vulićević Lj, 2008].



Slika 5.3.5. TEM mikrografije uzoraka: 3-(a) i 8-(b), (c), (d).



Na Slici 5.3.5. prikazane su mikrografije uzorka 3 i uzorka 8, na tri različita uvećanja, dobijene tunelskim elektronskim mikroskopom (TEM) Philips EM 400, pri radnom naponu od 120 kV<sub>m</sub>, sa uzorcima praha deponovanim na ugljenikom presvučenu bakarnu mrežu.

Sa Slika 5.3.3. i 5.3.4. se vidi da se morfologije čestica prahova dobijenih pri različitim uslovima u EH ćeliji, značajno razlikuju. Generalno, prahovi dobijeni pri nižim  $J$  i na nižim  $T$ , imaju veća zrna, pravilnijeg oblika. Svi dobijeni prahovi sastoje od dve bitno različite faze, čiji relativni odnos veoma zavisi od uslova koji su pri dobijanju vladali u EC ćeliji. Prvu fazu, koja najverovatnije potiče od getita ( $\alpha$ -FeOOH) kao prekursora, čine igličasti kristaliti (Whiskers) sa prečnikom od 15 do 80 nm, i njihove formacije, Slika 5.3.4 (d) i (e), Slika 5.3.5 (d). Dimenzije zrna ove faze, koja presudno utiče na makroskopske magnetne osobine prahova, određene magnetnim merenjima, ukazuju da bi ona mogla biti u superparamagnetnom (SPM) režimu na sobnoj  $T$ . Drugu fazu, koja verovatno nastaje od lepidokrita ( $\gamma$ -FeOOH), koji se u prisustvu vodonika brzo transformiše u pločasti magnetit, čine pravilna pločasta zrna sa prečnikom između 300 i 800 nm. Raspodela veličine čestica dobijenih prahova merena je u rastvoru dejonizovane vode metodom dinamičkog rasejanja laserske svetlosti, pomoću uređaja MALVERN Mastersizer 2000. Prethodno su rastvori prahova tretirani u ultrazvučnoj kadi, kako bi se izvršila de-aglomerizacija čestica praha. Rezultati su prikazani u Tabeli 5.3.3. [Mamula Tartalja D., 2014].

Tabela 5.3.3. Raspodele veličine čestica prahova magnetita dobijenih EH metodom izmerene dinamičkim rasejanjem laserske svetlosti.

Uzorak	d [nm]	$\Delta d/d$ [%]	I [%]	$d_{sf}$ [nm]	$\Delta d_{sf}/d_{sf}$ [%]	V [%]	$ (d-d_{sf})/d $ [%]	Polidisper- znost
<b>1</b> <i>J</i> =200 RT	300	30.6	40.7	294	29.7	6.3	2	0.393
	1180	36.6	57.4	1420	38.2	51.9	20.3	
	5240	8.6	1.9	5330	13.4	41.8	1.7	
<b>2</b> <i>J</i> =200 <i>T</i> =313	171	21	42.8	144	21	9	16	0.825
	1180	32	44	1360	33	12	15	
	4950	13	13.2	5140	15	79	4	
<b>3</b> <i>J</i> =200 <i>T</i> =333)	181	22	78.8	149	23	30.0	18	0.511
	940	23	17.2	994	25	7.3	6	
	5400	6	4.1	5470	12	62.7	1	
<b>4</b> <i>J</i> =200 <i>T</i> =361	160	23	77.0	135	21	36.0	16	0.497
	916	25	17.9	978	26	5.7	7	
	5310	7	5.1	5400	12	58.4	2	
<b>5</b> <i>J</i> =300 <i>T</i> =333	1450	23	90.9	1590	25	32.8	10	0.355
	5400	6	9.1	5470	12	67.2	1	
<b>6</b> <i>J</i> =500 <i>T</i> =333	212	40	88.3	148	45	43.1	30	0.263
	2780	43	11.7	3970	32	56.9	43	
<b>7a</b> <i>J</i> =1000 RT	215	45	67.6	134	35	52.3	38	0.368
	938	46	31.4	1190	50	25	27	
	5060	11	1	5200	15	22.7	3	
<b>7</b> <i>J</i> =1000 <i>T</i> =333	258	40	56.8	141	28	13.5	45	0.423
	797	39	37.6	851	48	15.1	7	
	5010	12	5.6	5190	15	71.4	4	
<b>8</b> <i>J</i> =1000 <i>T</i> =361	167	16	40.2	147	17	62.8	12	1
	469	17	59.8	488	20	37.2	4	

$d$  - srednja dimenzija čestice,  $d_{sf}$  – prečnik sferične čestice koja proizvodi isti signal kao  $d$ -čestica,  $\Delta d/d$  i  $\Delta d_{sf}/d_{sf}$  relativna odstupanja veličine čestice u određenoj raspodeli,

$I$  – intenzitet signala koji daje određena raspodela,  $V$  – ukupna zapremina čestica u određenoj raspodeli,  $(d-d_{sf})/d$  – odstupanje srednje dimenzije čestice od prečnika odgovarajuće sferične čestice (“asferičnost”).

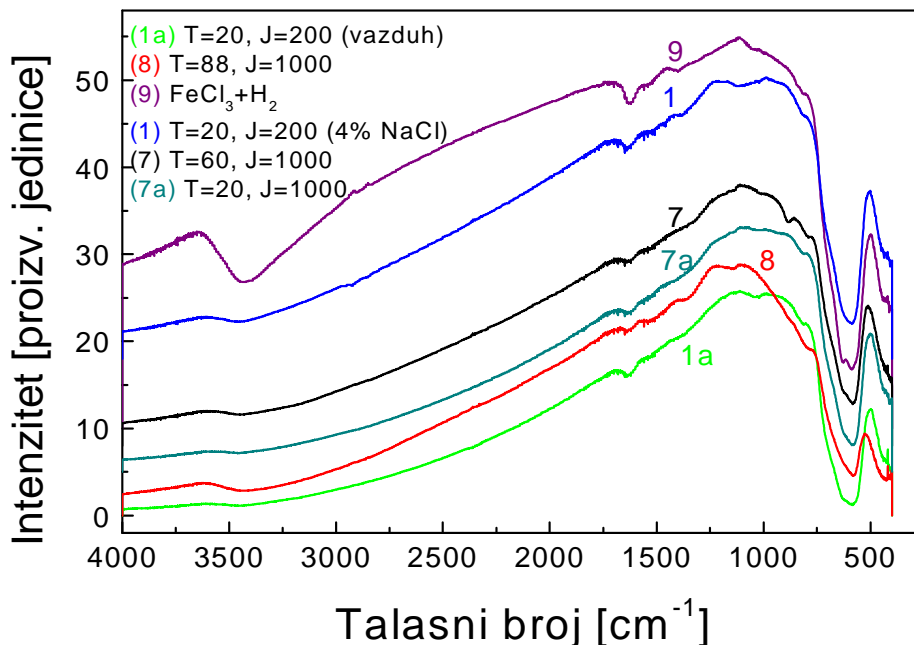
Tabela 5.3.4. Raspodele veličina zrna prahova magnetita dobijenih alternativnim metodama na  $RT$ , merene dinamičkim rasejanjem laserske svetlosti.

Uzorak	d [nm]	$\Delta d/d$ [%]	I [%]	$d_{sf}$ [nm]	$\Delta d_{sf}/d_{sf}$ [%]	V [%]	$ (d-d_{sf})/d $ [%]	
<b>1</b> <i>J=200, RT,</i> (NaCl)	1. dan	300	30.6	40.7	294	29.7	6.3	2
		1180	36.6	57.4	1420	38.2	51.9	20.3
		5240	8.6	1.9	5330	13.4	41.8	1.7
	4. dan	390	35.9	99	446	37.9	46.5	14.4
		5400	0	1	5590	10.4	53.5	0.5
<b>1a</b> <i>J=200, RT,</i> (Vazduh)	1. dan	195	43.4	92.2	131	43.7	45.3	32.8
		3940	27.9	7.8	4620	22.7	54.7	17.3
	2. dan	229	56.8	93.8	127	75.7	54.7	44.5
		3970	27.7	6.2	4630	22.5	45.3	16.6
	4. dan	131	40	100	90.8	34.9	100	30.7
<b>9</b> FeCl <sub>3</sub> , (H)	1. dan	700	41.4	100	849	38.0	100	21.3
	4. dan	234	33.6	97.1	178	44.6	37.4	23.9
		5140	10	2.9	5280	13.6	62.6	2.7

Odgovarajuće raspodele čestica prahova dobijenih na *RT*, sa NaCl (uzorak 1 iz Tabela 5.3.1. i 5.3.3.) i vazduhom rastvorenim u elektrolitu, kao i metodom koprecipitacije iz  $\text{FeCl}_3$ , uz prisustvo vodonika ( $\text{H}$ ), merene na isti način i pod istim uslovima kao prahovi iz Tabele 5.3.3., date su u Tabeli 5.3.4. U tabeli su data i merenja raspodela prahova u različitim vremenskim intervalima, kako bi se procenile brzine taloženja čestica različitih veličina. Oznake kolona su iste kao u Tabeli 5.3.3.

Pored dve faze koje su uočene elektronskom mikroskopijom, analiza veličine čestica laserskom metodom ukazuje i na prisustvo treće faze sačinjene od velikih aglomerata. Činjenica da je ova faza uočena i nakon 10 minuta tretiranja rastvora prahova u ultrazvučnoj kadi, ukazuje da su hemijske i magnetne interakcije među česticama praha veoma jake. Osim toga, analiza dobijenih raspodela ukazuje da, za razliku od veličine kristalita, gustina struje  $J$  tokom sinteze u elektrolitičkoj ćeliji ima veći uticaj na aglomeraciju od temperature  $T$ .

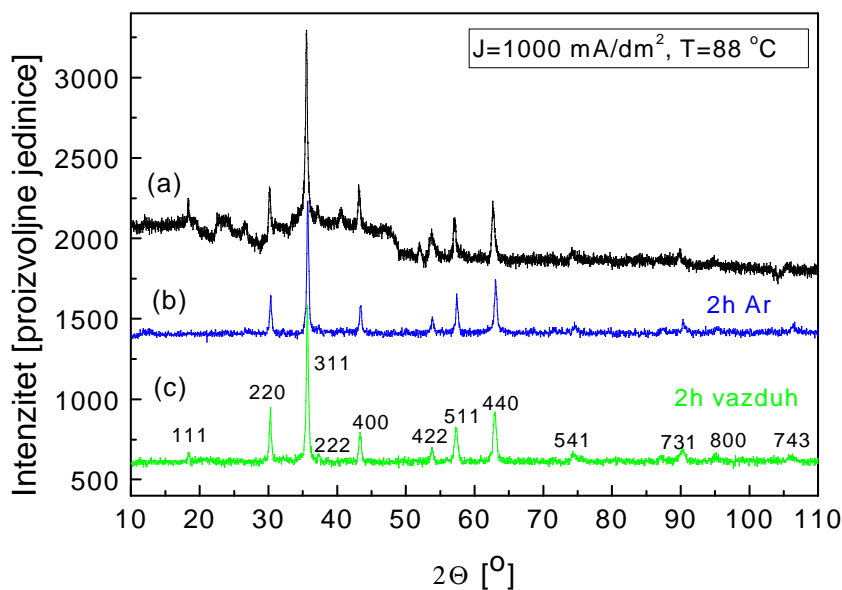
Infracrveni (IC) spektri nekih od dobijenih prahova, prikazani su na Slici 5.3.6. Oni su snimljeni Perkin-Elmer 983G instrumentom, na sobnoj temperaturi (*RT*) u opsegu  $4000\text{--}250\text{ cm}^{-1}$ . Za pripremu uzoraka za snimanje korišćene su KBr palete.



Slika 5.3.6. IC spektri prahova magnetita dobijenih na različite načine.

Trake u spektru u oblasti ispod  $1000\text{ cm}^{-1}$  potiču od magnetita, i govore o kvalitetu i uređenosti njegove kristalne strukture. One su jasno izraženi kod svih uzoraka, osim kod uzorka 8, što je u saglasnosti sa razuređenošću njegove kristalne strukture, koja je uočena i pomoću XRD merenja (Slika 5.3.7.). Trake na visokim frekvencijama potiču od adsorbovane vode i to onaj na  $3400\text{ cm}^{-1}$  od istežućih, a onaj oko  $1600\text{ cm}^{-1}$  od savijajućih vibracija OH grupe. Trake oko  $1100$ ,  $1380$ , i  $2900\text{ cm}^{-1}$  potiču od vibracija OH grupe koja je ugrađena u kristalnu strukturu hidroksida gvožđa, koji bi, u veoma malim količinama (nisu detektovani pomoću XRD merenja), mogli da postoje u uzorcima praha.

Uticaj odgrevanja u atmosferi argona i na vazduhu, na kristalnu strukturu uzorka 8, prikazan je na Slici 5.3.7.

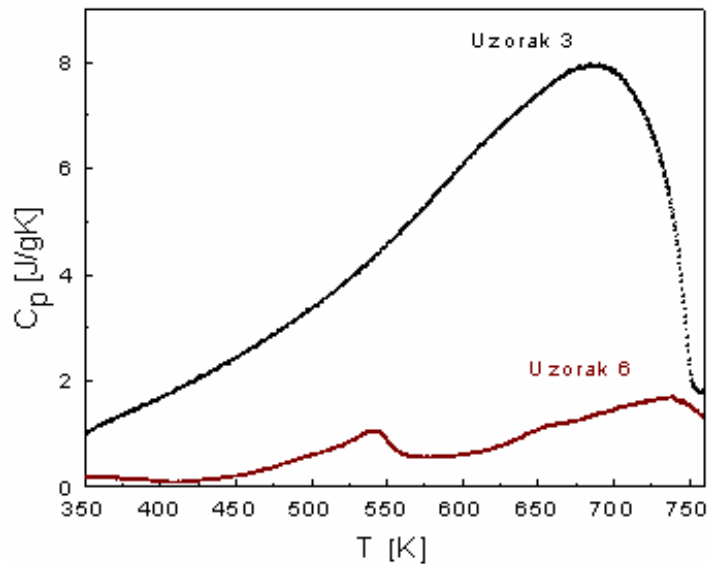


Slika 5.3.7. XRD difraktogrami uzorka 8: (a) neposredno nakon dobijanja, (b) nakon 2 sata odgrevanja u argonu, (c) nakon dva sata odgrevanja na vazduhu. Indeksirana faza je magnetit (maghemit) sa strukturom spinela.

Temperaturska zavisnost specifične toplote  $C_p(T)$  je merena kompjuterski kontrolisanim Perkin-Elmer DSC-2 instrumentom, u atmosferi azota, u opsegu temperatura  $320\text{--}770\text{ K}$ , pri brzini grejanja od  $10\text{ K/min}$ . Korišćeni su aluminijumski nosači uzoraka i safirni

standard.  $C_p(T)$  je određena iz relacije:  $C_p = \frac{W_s \cdot D_s}{W \cdot D} \cdot C_{ps}$ , sa greškom od oko  $\pm 2\%$ .  $W_s$ ,  $D_s$

i  $C_{ps}$  su redom, masa, signal i specifična toplota standarda na određenoj temperaturi, a  $W$  i  $D$  su vrednosti izmerene na uzorku. Rezultati dobijeni za uzorke 3 i 6, prikazani su na Slici 5.3.8.

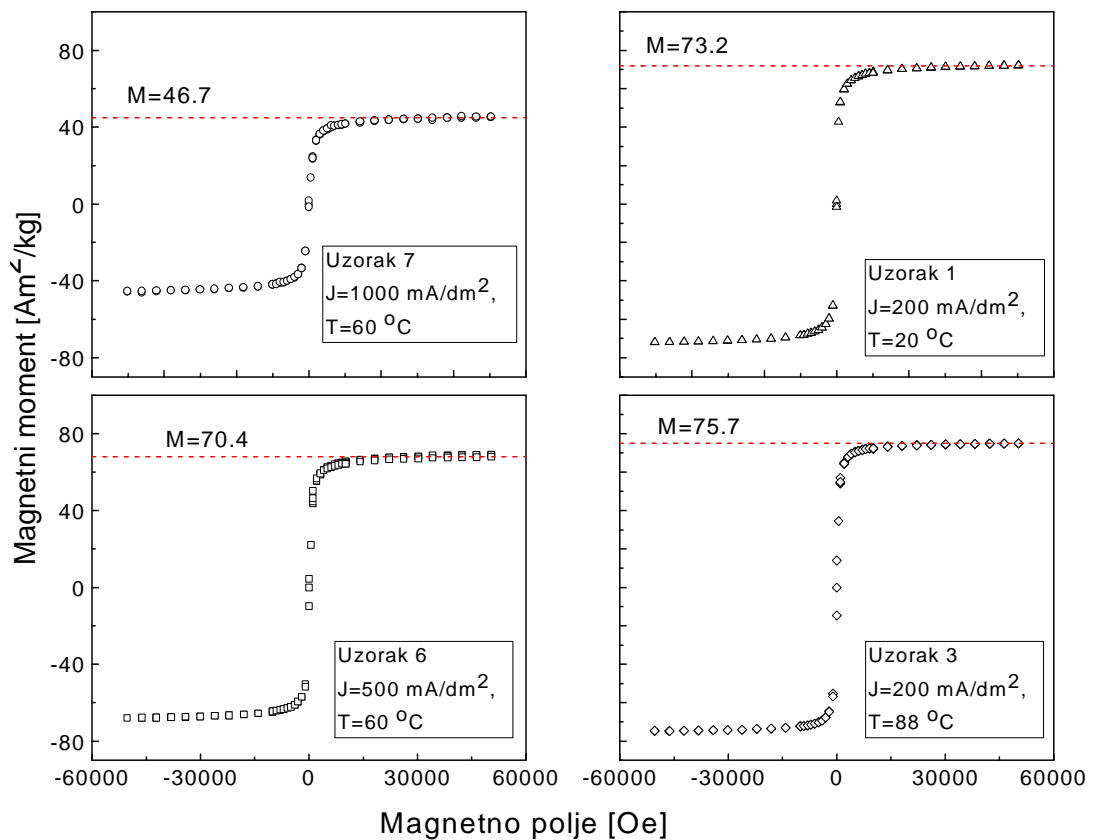


Slika 5.3.8. Temperaturska zavisnost specifične toplote  $C_p(T)$  uzoraka 3 i 6.

Rezultati merenja  $C_p(T)$  pokazuju da se toplotne karakteristike dva praha veoma razlikuju. Iako im je toplotni kapacitet na sobnoj T sličan, i blizak vrednosti iz literature (između 0.7 i 0.8 J/gK) [Weidenfeller B., 2002], toplotni kapacitet uzorka 3 u ispitivanom opsegu temperatura je mnogo veći, a kritična temperatura znatno viša, oko 710 K. Toplotni kapacitet uzorka 6 je mali, a kritična temperatura je znatno niža (oko 540 K), mada se kod ovog uzorka uočava i širok, slabo izražen maksimum iznad 700 K, slično kao kod uzorka 3. Kritična temperatura uzorka 3 je za oko 130 K, a uzorka 6 za oko 150 K niža od Curie temperature ova dva uzorka koje su određene pomoću merenja temperaturske zavisnosti magnetizacije. Ove kritične temperature približno odgovaraju temperaturama na kojima odgovarajuće temperaturske zavisnosti magnetizacije počinju da opadaju (Slika 5.3.10. (b)), tj. na kojima počinje magnetno razuređenje uzorka. Uzorak 3 je u svakom pogledu kvalitetniji od uzorka 6, što pokazuju i XRD i IC merenja

(bolja strukturna uređenost), i znatno viša  $T_C$  (jača magnetna interakcija). Uzorak 6 je izrazito sitno-zrnast (Slika 5.3.4 (d)) i jedino kod njega i uzorka 8 uopšte nije došlo do formiranja krupnih aglomerata (Tabela 5.3.3.). Za sada nemamo potpuno i pouzdano objašnjenje za ovako izraženu razliku u toplotnom ponašanju uzoraka, ali je ona jasna indikacija da će se dva praha ponašati bitno različito i kada se budu zagrevali u RF magnetnom polju, kod primena u hipertermiji, na primer.

Magnetizacija prahova u zavisnosti od jačine magnetnog polja merena je “Quantum Design” MPMS XL-5 SQUID magnetometrom, na sobnoj temperaturi. Rezultati su prikazani na Slici 5.3.9.

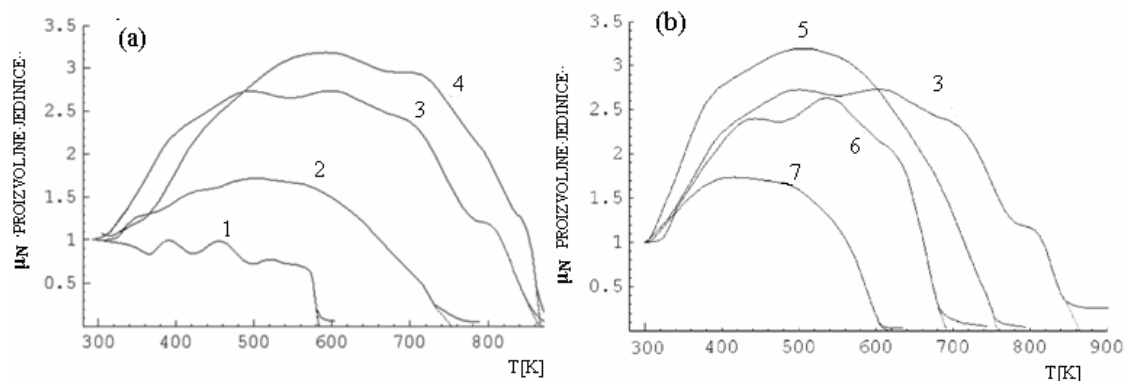


Slika 5.3.9. Magnetizacija u zavisnosti od jačine magnetnog polja, uzorka 1, 4, 6 i 7.

Poredeći rezultate prikazane na Slikama 5.3.9., 5.3.2. i 5.3.4. vidi se da magnetizacija zasićenja  $M_S$  veoma zavisi od uslova dobijanja prahova, tj. njihove morfologije i kvaliteta

njihove strukture. Uočava se da uzorak 7, čiji XRD difraktogram i IC spektri ukazuju na loše definisanu strukturu, ima znatno manju  $M_S$  od ostalih uzoraka.

Temperaturske zavisnosti normalizovane magnetne permeabilnosti  $\mu_N(T)$ , magnetne susceptibilnosti  $\chi_N(T)$  i specifične električne otpornosti  $\rho(T)$ , su merene pri ne-izotermnom zagrevanju (brzina zagrevanja i hlađenja,  $v_H \sim 25$  K/min), na uzorcima u obliku diska, sa prečnikom od 8 mm i masom od oko  $10^{-5}$  kg, koji su dobijeni jedno-osnim presovanjem prahova na pritisku od 400 MPa. Rezultati merenja  $\mu_N(T)$  modifikovanim Faraday-evim metodom, u vazduhu, uzoraka dobijenih pri različitim uslovima u EC ćeliji, prikazani su na Slikama 5.3.10. (a) i (b).

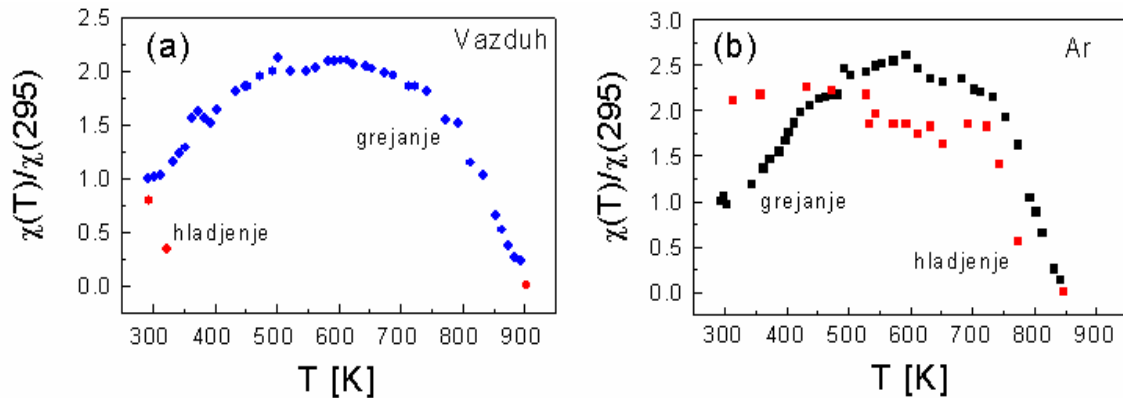


Slika 5.3.10.  $\mu_N(T)$  zavisnosti dobijene pri ne-izotermnom zagrevanjem u vazduhu ( $v_H \sim 25$  K/min) uzoraka sintetisanih na: (a)  $J = 200$  mA/dm<sup>2</sup>, i  $T = 293$  (1), 313 (2), 333 (3) i 361 K (4), (b)  $T = 333$  K, i  $J = 200$  (3), 300 (5), 500 (6) and 1000 (7) mA/dm<sup>2</sup>.

Uočava se značajna razlika Curie temperature  $T_C$  uzoraka dobijenih pri različitim uslovima, što je u saglasnosti sa rezultatima merenja  $C_p(T)$  (Slika 5.3.7.) i merenja magnetizacije u zavisnosti od magnetnog polja (Slika 5.3.8.).

Temperaturska zavisnost normalizovane magnetne susceptibilnosti  $\chi_N(T)$  uzorka 8, pri ne-izotermnom zagrevanju/hlađenju brzinom  $\sim 25$  K/min u vazduhu i argonu, prikazana je redom, na Slikama 5.3.11. (a) i (b).





Slika 5.3.11. Temperaturna zavisnost normalizovane magnetne susceptibilnosti  $\chi_N(T)$  uzorka 8, pri ne-izotermnom zagrevanju/hlađenju brzinom  $\sim 25$  K/min u: (a) vazduhu i (b) argonu.

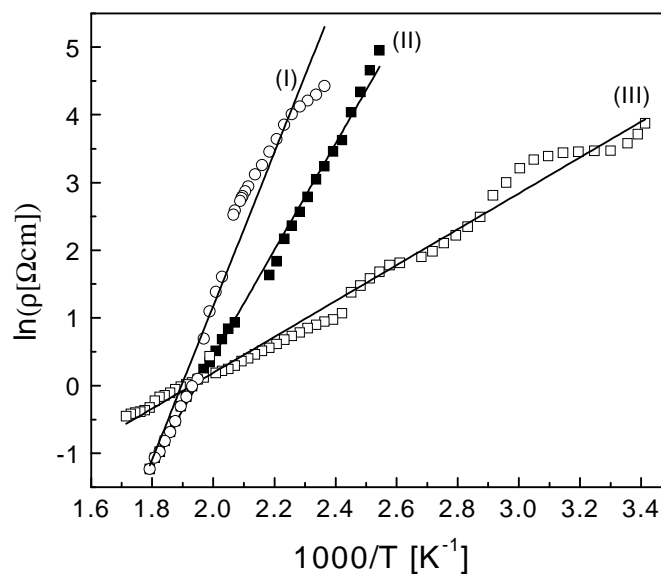
Uočava se da je nakon ciklusa grejanje/hlađenje u argonu, vrednost  $\chi_N(T)$  više od 2 puta veća nego početna, što znači da je grejanje u argonu dovelo do nepovratnog uređenja magnetnih momenata u uzorku, a da je pri tome očuvana kristalna struktura magnetita. Slično nepovratno povećanje  $\chi_N(T)$  pri grejanju u argonu, uočeno je i u drugim uzorcima. Vrednost  $\chi_N(T)$  nakon ciklusa grejanje/hlađenje na vazduhu je znatno manja od početne, što ukazuje da je dobar deo uzorka magnetita doživeo fazni prelaz, prvo u maghemit a zatim u hematit, koji je slabo magnetan materijal (Tabela 5.1.).

Jednosmerna (DC) specifična električna otpornost je merena u temperaturskom opsegu 293–570 K, u vazduhu, koristeći aparaturu sopstvene izrade, a rezultati merenja uzorka 8, pri zagrevanju na vazduhu (I), argonu prvi prolaz (II) i argonu drugi prolaz (III) su prikazani na Slici 5.3.12.

Ako se pretpostavi temperaturna zavisnost specifične otpornosti u obliku [Guskos N., 2002]:

$$\rho(T) = \rho_o \exp(E_a/kT)$$

gde je  $E_a$  aktivaciona energija,  $\rho_o$  specifična otpornost na visokim T,  $k = 0.862 \times 10^{-4}$  eV/K Boltzmann-ova konstanta, aktivacione energije određene iz zavisnosti (I), (II), and (III) na Slici 5.3.11. su 0.98 eV, 0.68 eV and 0.23 eV, redom.



Slika 5.3.12. Temperaturna zavisnost specifične otpornosti uzorka 8 pri zagrevanju na: vazduhu (I), argonu, prvi prolaz (II), i argonu drugi prolaz (III).

Pri grejanju na vazduhu (I), nakon početnog pada  $\rho(T)$ , oko  $T = 600$  K dolazi do naglog porasta zavisnosti za više od 6 redova veličine, što je pouzdan znak da je došlo do faznog prelaza magnetit-maghemit.

Aktivaciona energija dobijena pri prvom grejanju u argonu (II) je takođe velika, što je prouzrokovno procesom nepovratne preraspodele katjona, koji je uočen takođe pri merenjima  $\chi_N(T)$  u argonu. Aktivaciona energija pri drugom grejanju istog uzorka u argonu (III) je znatno niža (0.23 eV) i bliska vrednostima koje su drugi autori dobijali za kvalitetne uzorke magnetita (teoretska vrednost za monokristal magnetita je 0.1 eV). Ova vrednost približno odgovara polovini energetskog procepa magnetita u merenom temperaturskom opsegu.

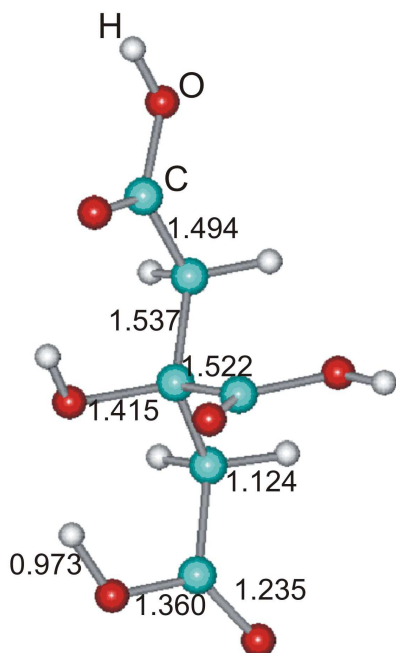
## 5.4. Oblaganje nanoprahova oksida gvožđa dobijenih EH metodom

Da bi se sprečila aglomeracija, poboljšala i inače dobra biokompatibilnost i ostvarila željena funkcionalnost nanočestica oksida gvožđa, oni se oblažu različitim oblogama, o čemu je, uopšteno, bilo reči u poglavlju 2.3. ove disertacije. U ovom poglavlju predstavljeni su rezultati detaljnih proračuna organskih molekula koji se najčešće koriste za oblaganje NČ oksida gvožđa, sa posebnim osvrtom na promene koje bi trebalo očekivati u IC spektrima ovih molekula pri oblaganju. Neki od prahova su obloženi limunskom kiselinom (CA) i na njima je eksperimentalno provereno odstupanje u IC spektrima između slobodnog i vezanog molekula, i to upoređeno sa odgovarajućim proračunom.

### 5.4.1. Oblaganje limunskom kiselinom

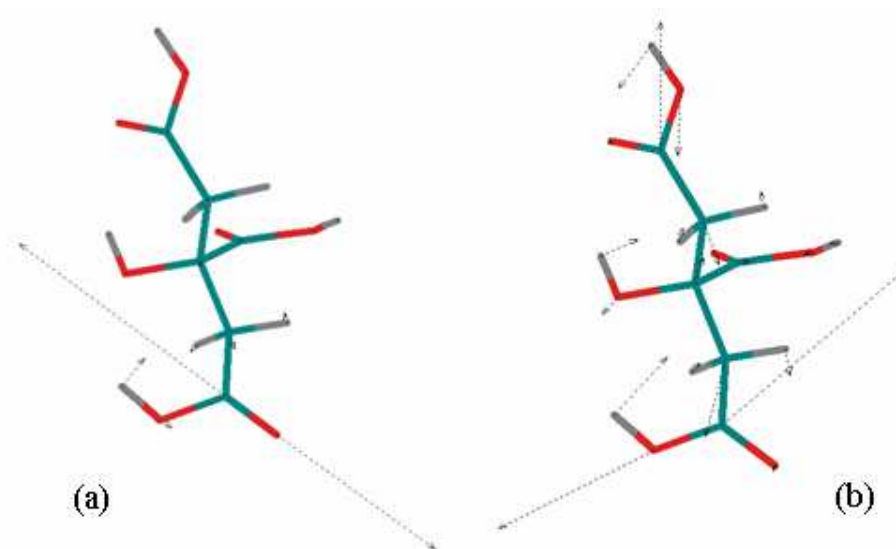
Prahovi oksida gvožđa koji su dobijeni pri  $J=1000 \text{ mA/dm}^2$  i  $T=20 \text{ }^\circ\text{C}$  (p-2), odnosno  $T=60 \text{ }^\circ\text{C}$  (p-3) su oblagani molekulima limunske kiseline (CA)  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , tako što su

odgovarajući prahovi intenzivno mehanički mešani u 25 % vodenom rastvoru CA. Na taj način dobijen je odgovarajući ferofluid (*ff*). Molekul CA, optimiziran programskim paketom HyperChem, semi-empirijskim kvantnim metodom AM1, sa naznačenim dužinama svih karakterističnih hemijskih veza, prikazan je na Slici 5.4.1.



Slika 5.4.1. Molekul limunske kiseline optimiziran programskim paketom HyperChem, na nivou AM1.

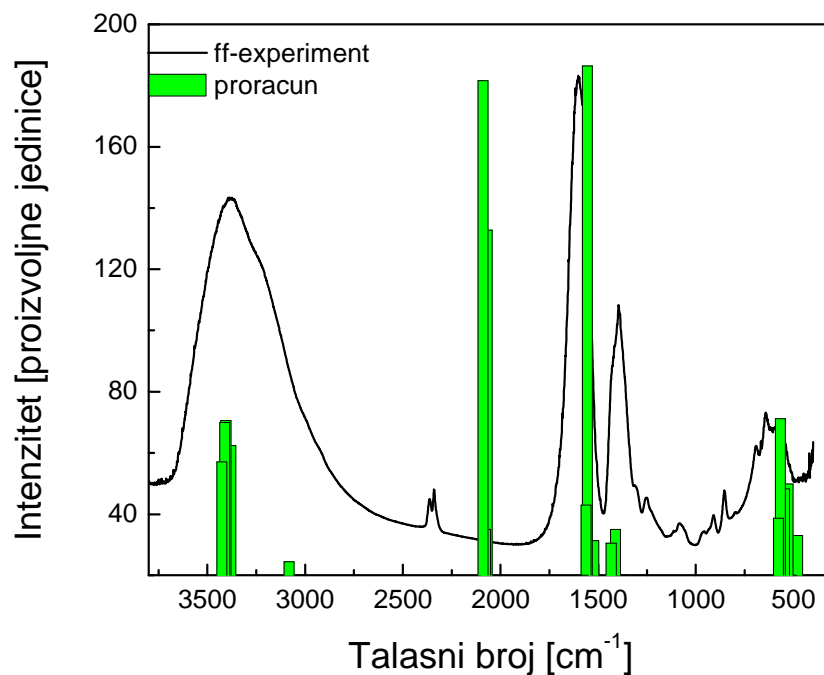
Istim programskim paketom i metodom, koji se pokazao pouzdan pri proračunu vibracionih spektara ove vrste molekula [Ivanović N., 2006], proračunat je i vibracioni spektar CA molekula i dva karakteristična moda, čije se frekvencije najviše menjaju pri oblaganju čestica praha molekulima CA, tj. pri formiranju ferrofluida, prikazane su na Slici 5.4.2.



Slika 5.4.2. Dva karakteristična vibraciona moda molekula CA koji se najviše menjaju pri formiranju ferrofluida. (a) C=O istežuća vibracija ( $2069\text{ cm}^{-1}$ ) i (b) C-OH istežuća vibracija, praćena O-H savijanjem u istoj ravni ( $1555\text{ cm}^{-1}$ ), unutar terminalne COOH grupe CA molekula.

Eksperimentalni IC spektar  $\text{Fe}_3\text{O}_4:(\text{CA})$  ferrofluida, snimljen Perkin-Elmer 983G instrumentom, u refleksionom modu, na sobnoj temperaturi, pomoću KBr paleta, i proračunati IC spektar CA molekula prikazani su na Slici 5.4.3.

Razlika između proračunatih vibracionih spektara CA molekula i eksperimentalno izmerenih IC spektara  $\nu$  ukazuje da se CA molekuli za površinu nanočestica  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  vežu preko terminalnih C=O i C-OH grupa, koje pripadaju COOH grupi. To ukazuje da je površina nanočestica takva da su atomi koji se nalaze na samoj površini atomi Fe, što potvrđuje rezultate nekih skorijih proračuna [Zhu L., 2006], prema kojima je najstabilnija površina nanočestica magnetita ona sa orijentacijom (111) i izloženim Fe atomima.

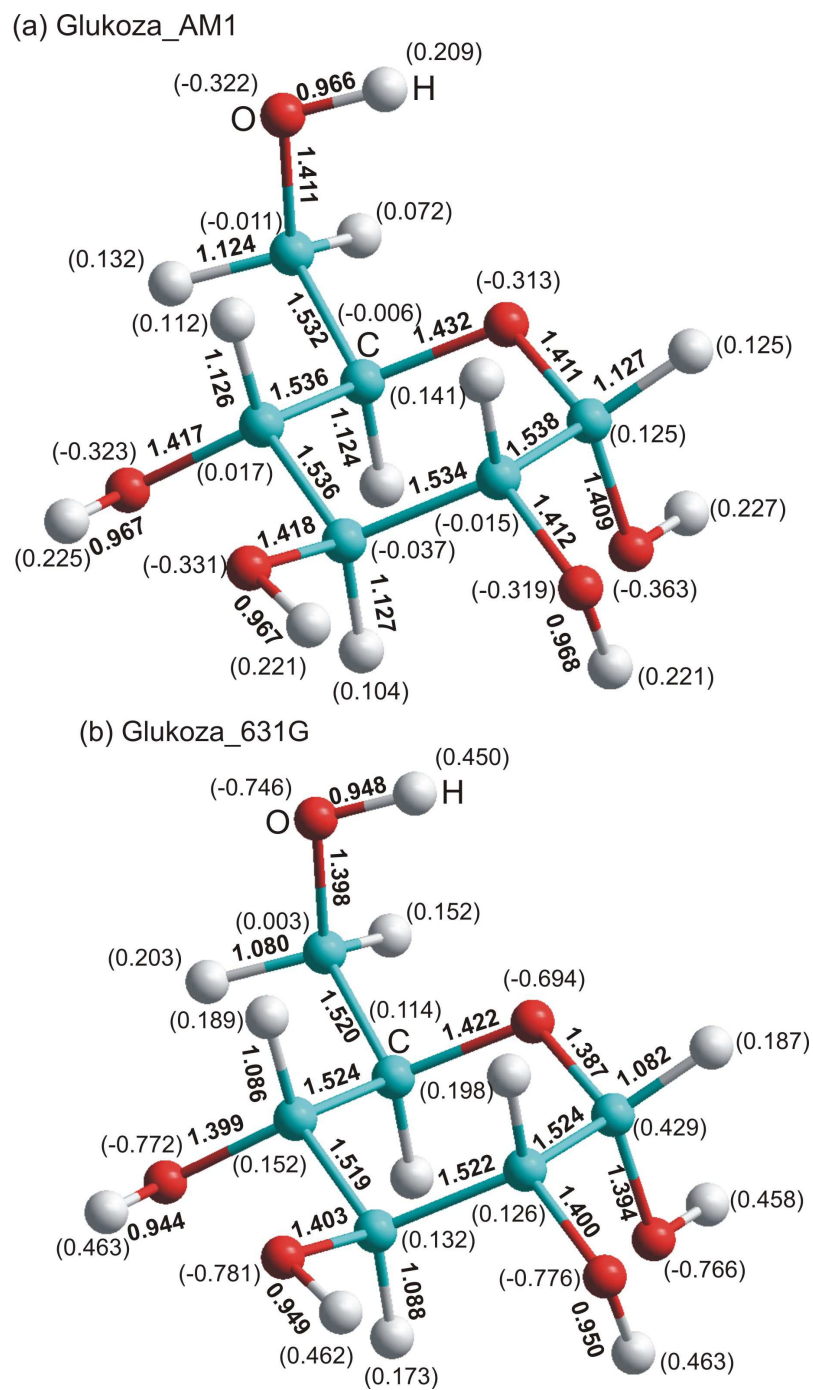


Slika 5.4.3. Eksperimentalni IC spektar  $\text{Fe}_3\text{O}_4:(\text{CA})$  ferofluida i proračunati vibracioni spektar CA molekula.

Pored CA, COOH grupom se za NČ oksida gvožđa, vezuje i oleinska kiselina [Boyer C., 2010]. Veza koju gradi COOH grupa obično je prilično slaba i može se lako prekinuti na povišenoj temperaturi, ili u prisustvu drugih aktivnih grupa.

#### 5.4.2. Dekstran

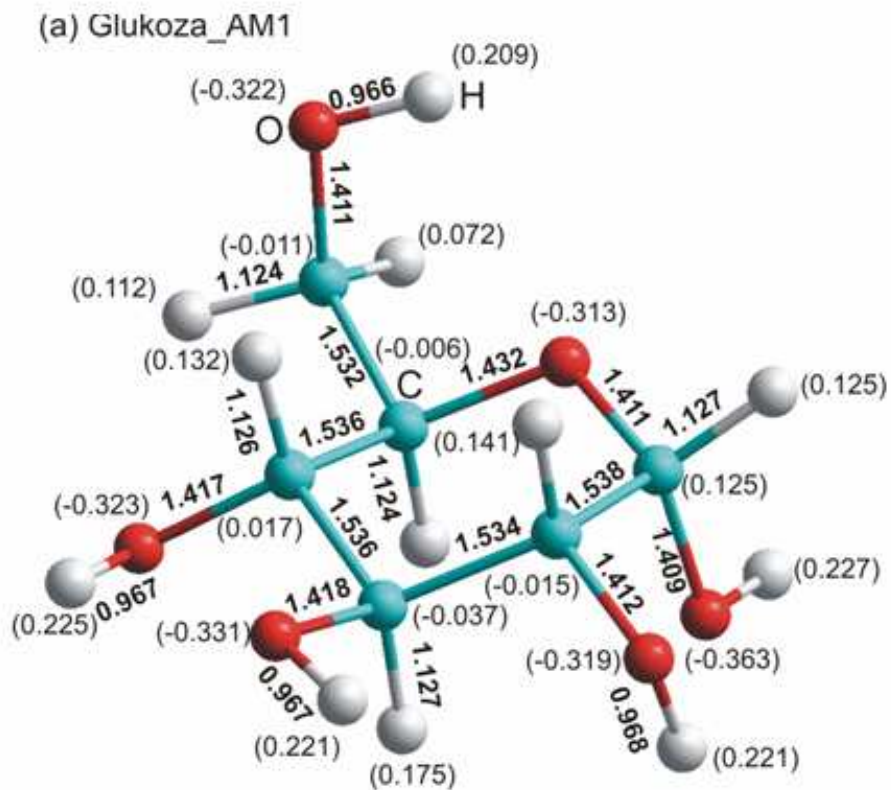
Oligomeri dekstrana različite dužine (1-5 molekula) optimizirani su programskim paketom HyperChem na polu-empirijskom kvantnom nivou AM1, a osnovna konformacija glukoze i kompletnim LCAO (Linearna Kombinacija Atomskih Orbitala) proračunom, sa bazisom atomskih funkcija 631-G, sa kojim se dobijaju veoma pouzdane dužine veza i naelektrisanja na atomimama. Na Slici 5.4.4. mogu se uporediti rezultati AM1 i 631-G proračuna osnovne konformacije glukoze. Dužine veza su označene podebljanim brojevima, a naelektrisanja atoma su data u zagradama. Atomi ugljenika (C) su svetloplavi, kiseonika (O) crveni, a vodonika (H) svetlo sivi. Iste oznake će se koristiti i u proračunima ostalih molekula u ovoj disertaciji, ako nije drugačije naglašeno.



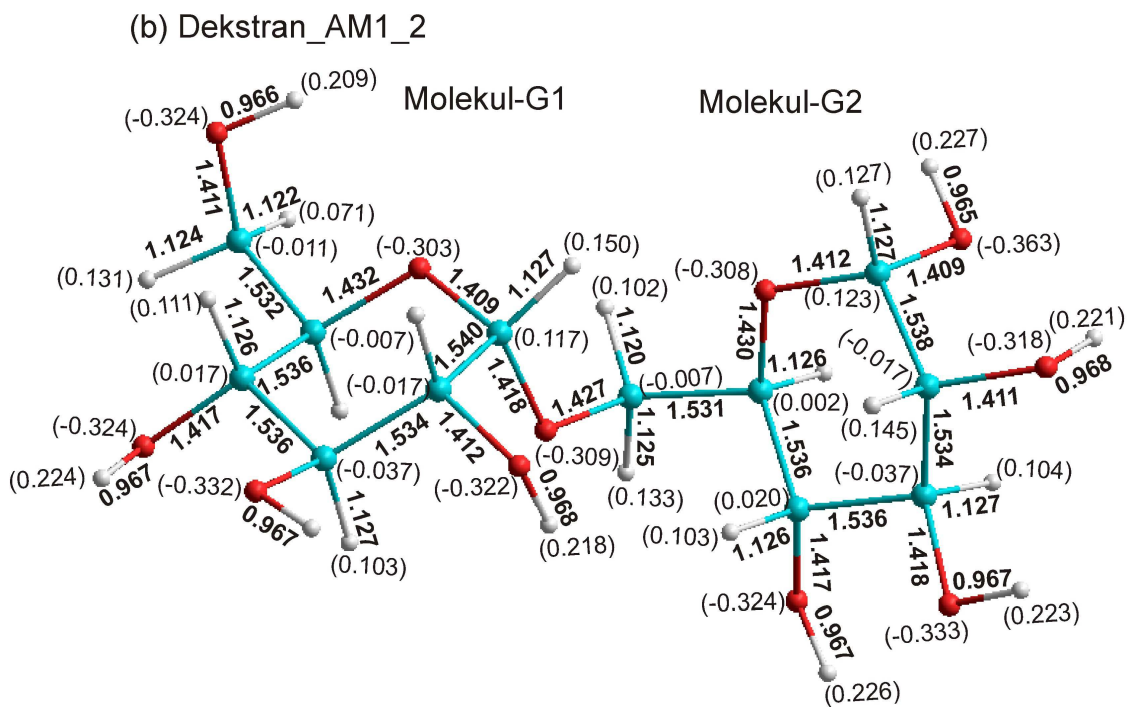
Slika 5.4.4. Osnovna konformacija glukoze optimizirana na: (a) AM1 i (b) 631-G nivou.

Na slici se vidi da su dužine veza dobijene 631-G proračunima nešto kraće, a naelektrisanja na odgovarajućim atomima značajno veća (u nekim slučajevima čak različitog znaka), od onih dobijenih AM1 proračunima, što se odražava i na proračune IC spektara.

Da bi se uočile razlike koje u strukturi molekula nastaju pri formiranju dekstrana vezivanjem molekula glukoze na odgovarajući način, na Slikama 5.4.5. (a) i (b) su prikazani osnovni molekul glukoze i oligomer dekstrana koji sadrži dva povezana molekula glukoze, optimizirani na nivou proračuna AM1.



Slika 5.4.5 (a). Osnovna konformacije glukoze optimizirana na AM1 nivou

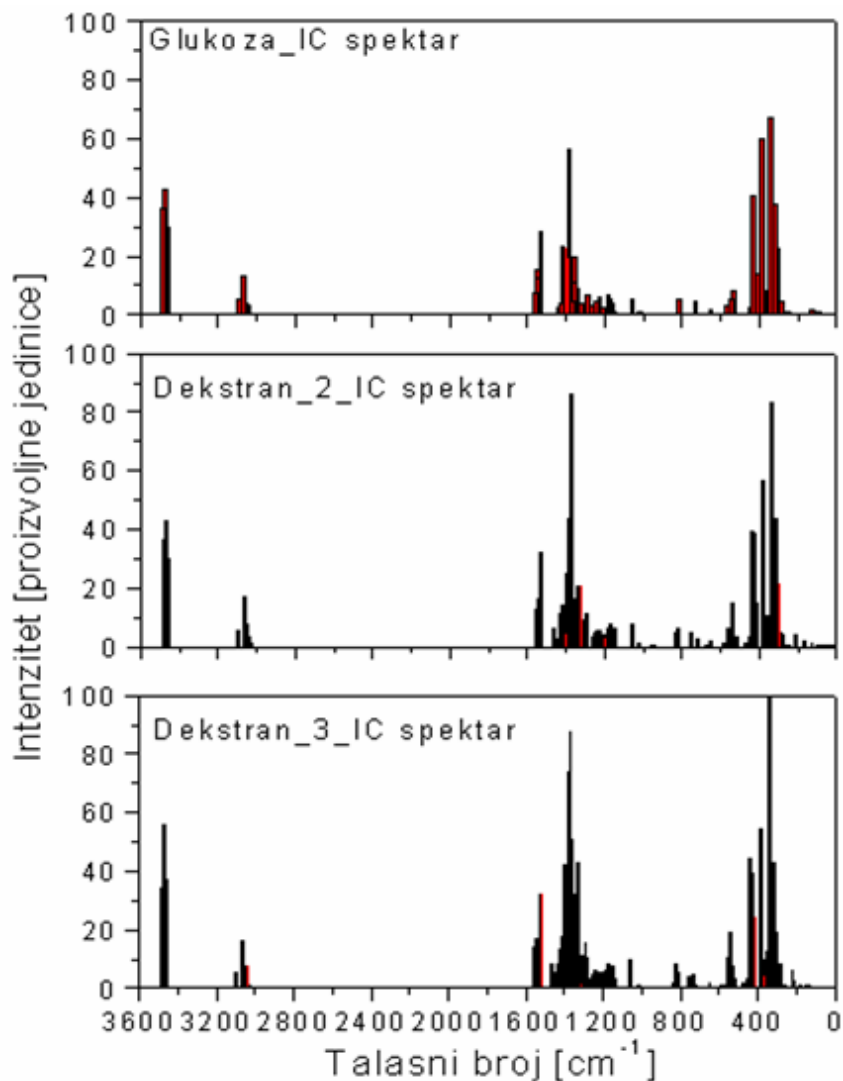


Slika 5.4.5 (b) Oligomer dekstrana koji sadrži dva molekula glukoze G1 i G2, optimiziran na AM1 nivou.

Uočljive razlike između odgovarajućih parametara molekula dekstrana i molekula glukoze, javljaju se samo u oblasti veze dva molekula glukoze (dekstran veza). C-OH veza koja potiče od CH<sub>2</sub>OH grupe preko koje je molekul glukoze G2 vezan u dekstran je značajno duža (1.427 Å) od ostalih veza te vrste u molekulu, uključujući tu i C-O vezu (1.418 Å), koja sa anomernog položaja molekula glukoze G1 kompletira dekstran vezu. Najduža C-O veza (1.432 Å, G1; 1.430 Å, G2) je ona koja povezuje O u benzoidnom prstenu sa C atomom na koji se za prsten veže CH<sub>2</sub>OH grupa. Ova veza se, pri formiranju dekstrana, ne menja ni u jednom od molekula glukoze. Naelektrisanje atoma kiseonika (-0.309 e) koji se nalazi u središtu dekstran veze je manje negativno nego kod ostalih O atoma u OH grupama, i blisko onome koje ima O u benzoidnom prstenu. Naelektrisanje na C atomu (-0.007 e) CH<sub>2</sub>OH grupe molekula G2, koja je uključena u dekstran vezu, i ono na C atomu (0.002 e) za koji je ta grupa vezana za prsten, su nešto pozitivnija nego na istim atomima u molekulima glukoze. Veza koja od tog C atoma vodi do O u benzoidnom prstenu je nešto kraća (1.430 Å), a naelektrisanje na O u prstenu nešto manje negativno (-0.308 e) nego kod osnovnog molekula glukoze. Sve navedene

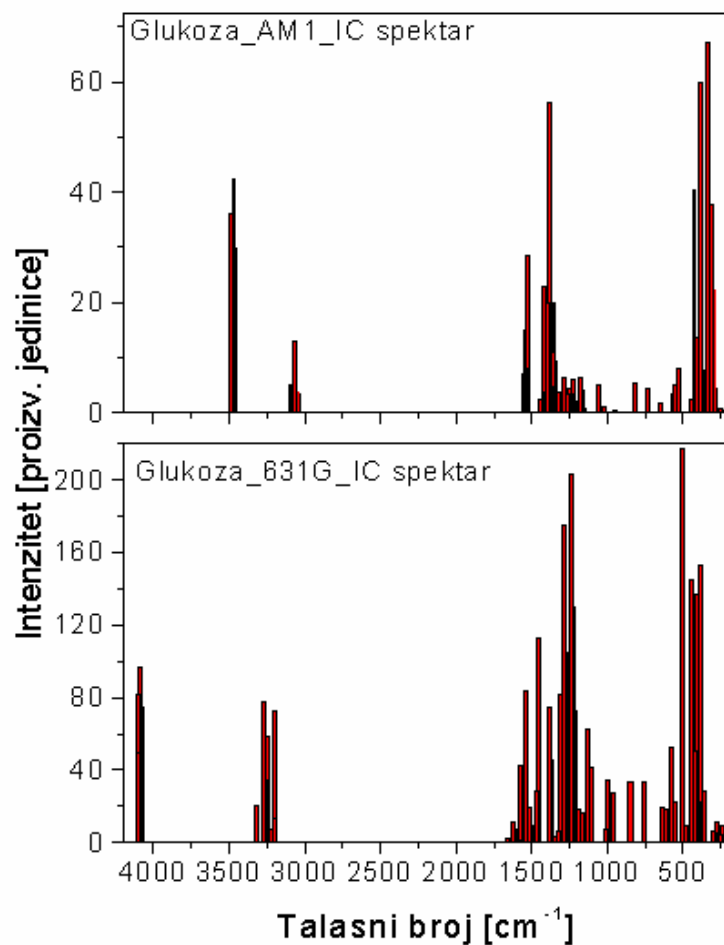


promene dužina veze i naelektrisanja atoma su posledica karakteristične preraspodele naelektrisanja do koje dolazi prilikom formiranja dekstran veze i važne su za razumevanje njene prirode i mehanizma formiranja. IC spektri molekula glukoze, i dva i tri molekula glukoze povezana u dekstran, izračunati na AM1 nivou, prikazani su na Slici 5.4.6.



Slika 5.4.6. IC spektri molekula glukoze, i dva i tri molekula glukoze povezana u dekstran, izračunati na AM1 nivou.

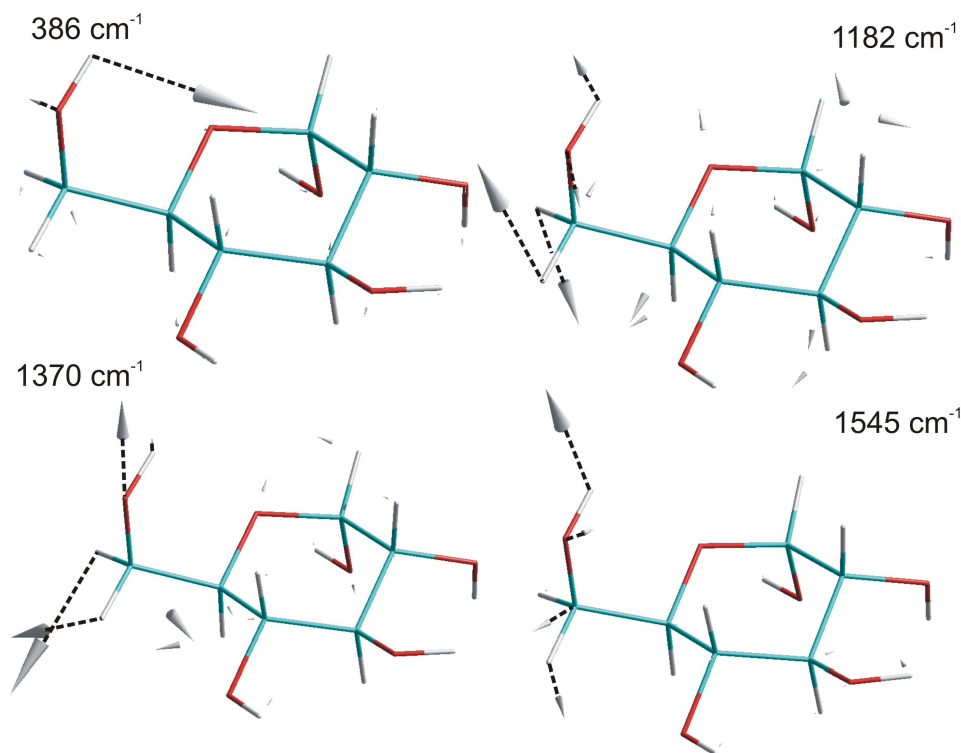
IC spektri molekula glukoze izračunati na 631-G nivou i njihov odnos prema odgovarajućem AM1 spektru prikazani su na Slici 5.4.7.



Slika 5.4.7. IC spektri molekula glukoze izračunati na 631-G i AM1 nivou.

Na slici se vidi da su bitna odstupanja u frekvencijama IC modova dobijenim sa dva korišćena nivoa proračuna, uglavnom na visokim frekvencijama, koje potiču od modova povezanih sa istežućim C-H i O-H vibracijama. Međutim, razlike u relativnim odnosima intenziteta u dve grupe modova na nižim frekvencijama ( $1000-1700\text{ cm}^{-1}$ , i  $250-750\text{ cm}^{-1}$ ), koje daju ova dva nivoa proračuna nisu zanemarljive. Pošto su ove grupe modova od ključne važnosti za razumevanje ponašanja ovih molekula, pri svakoj detaljnijoj analizi, proračunati spektri se moraju korelisati sa eksperimentalno izmerenim.

Karakteristični modovi IC spektra molekula glukoze, koji pripadaju  $\text{CH}_2\text{OH}$  grupi kojom se dekstran obično veže za nanočestice, prikazani su na Slici 5.4.8.



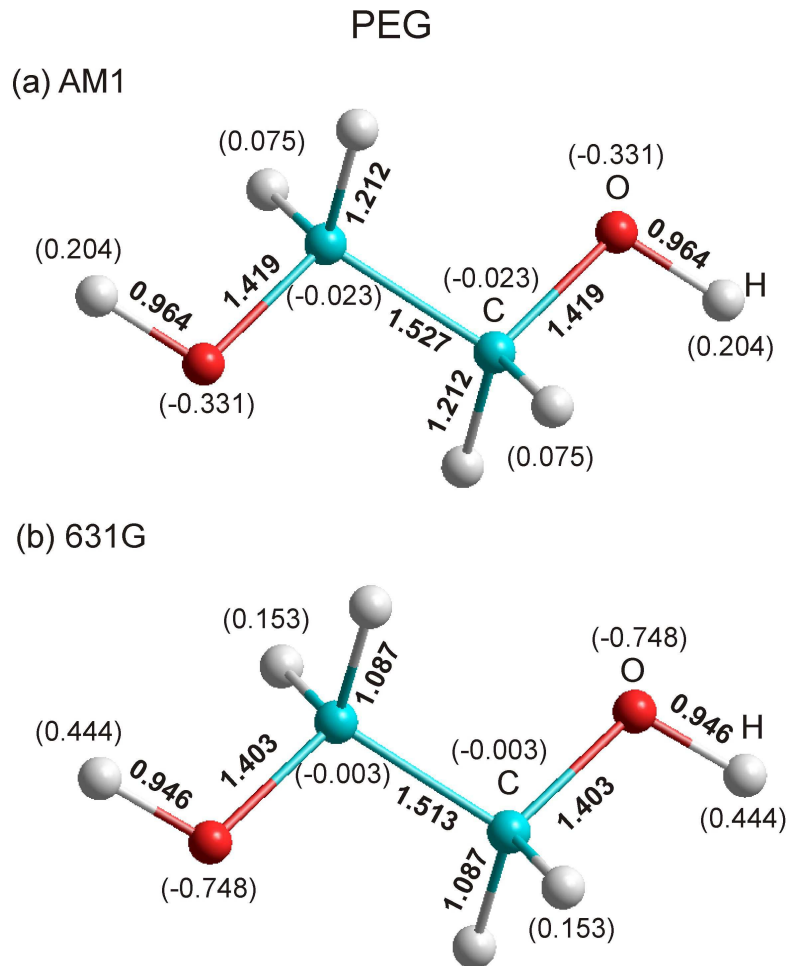
Slika 5.4.8. Karakteristični IC modovi molekula glukoze koji potiču od CH<sub>2</sub>OH grupe za koje se očekuju značajne promene pri vezivanju dekstrana za nanočestice.

Primećuje se da se te karakteristične frekvencije mogu naći u delu spektra sa niskim frekvencijama ( $386\text{ cm}^{-1}$ ), gde potiču od savijajuće (bending) deformacije terminalne OH grupe van ravni CH<sub>2</sub>OH, na srednjim frekvencijama, gde potiču od: ( $1182\text{ cm}^{-1}$ ) – ljuľjajuće (rocking) deformacije CH<sub>2</sub>OH, ( $1370\text{ cm}^{-1}$ ) – deformacije «makaze» (scissors) CH<sub>2</sub>OH i ( $1545\text{ cm}^{-1}$ ) - savijajuće deformacije CH<sub>2</sub>OH grupe u vlastitoj ravni. Naravno, može se očekivati i promena moda na visokim frekvencijama (oko  $3500\text{ cm}^{-1}$ ), koji nije prikazan na slici, a koji potiče od istežućih (stretching) frekvencija OH grupe koja pripada CH<sub>2</sub>OH.

### 5.4.3. Polietilen glikol (PEG)

Oligomeri polietilen glikola (PEG) različite dužine (1-3 molekula) optimizirani su programskim paketom HyperChem na polu-empirijskom kvantnom nivou AM1, a

konformacije sa 1 i 2 molekula i kompletnim LCAO proračunom, sa bazisom atomskih funkcija 631-G, koji daje veoma pouzdane dužine veza i naelektrisanja na atomima. Na Slici 5.4.9. mogu se uporediti rezultati AM1 (a) i 631-G (b) proračuna etilen glikola.



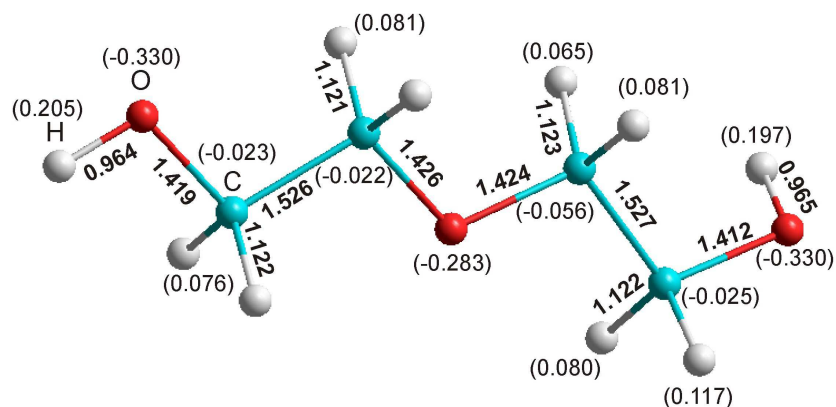
Slika 5.4.9. Konformacije etilen glikola optimizirane na: (a) AM1 i (b) 631-G nivou.

Kao i kod proračuna molekula glukoze, uočava se da su dužine veza 631-G konformacije nešto kraće, a naelektrisanja na odgovarajućim atomima značajno veća, što se odražava i na proračune IC spektara.

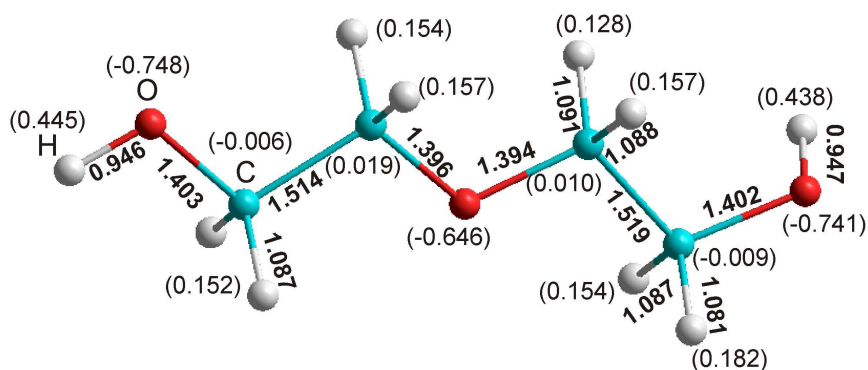
Da bi se utvrdilo kako vezivanje etilen glikola u lance utiče na njegove molekularne parametre, isti ovakvi proračuni, urađeni su i za dietilen glikol, a rezultati su prikazani na Slici 5.4.10. (a) i (b).

## PEG\_2

(a) AM1



(b) 631G

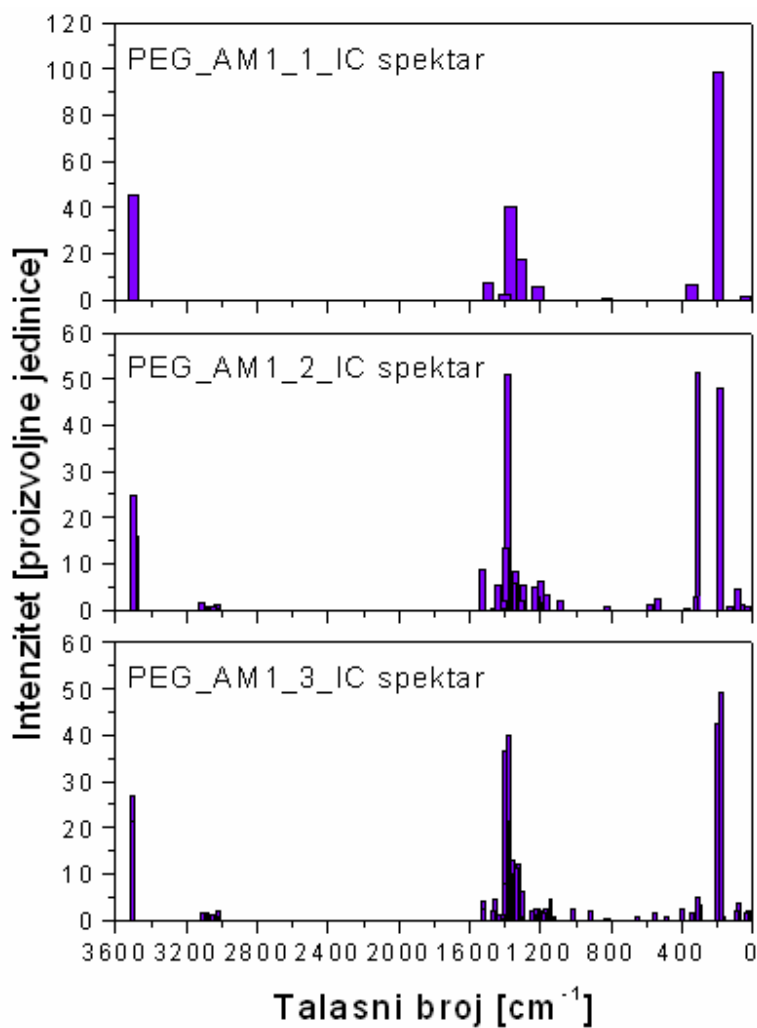


Slika 5.4.10. Konformacije dietilen glikola optimizirane na: a) AM1 i b) 631-G nivou.

Jedine bitne razlike u odnosu na molekule prikazane na Slici 5.4.10. su u naelektrisanju i dužinama veza atoma kiseonika preko kojeg se molekuli etilen glikola vežu. Oba metoda daju niže vrednosti neelektrisanja na ovom, nego na terminalnim atomima kiseonika. Osim toga, i dužine veza od centralnog kisonika do susednih ugljenika su po AM1 metodu nešto duže, a po 631-G nešto kraće od odgovarajućih terminalnih veza. Razlika u znaku promene dužine ovih O-C veza, koju daju dva metoda proračuna, potiče od različitog

znaka naelektrisanja na C atomima za koje je ovaj kiseonik vezan, koja su po AM1 metodu negativna, a po 631-G metodu pozitivna, što bitno utiče i na lokalizaciju naelektrisanja u vezi, pa time i na njenu dužinu.

Infracrveni (IC) spektri jednog, dva i tri povezana molekula PEG, izračunati na AM1 nivou, prikazani su na Slici 5.4.11.

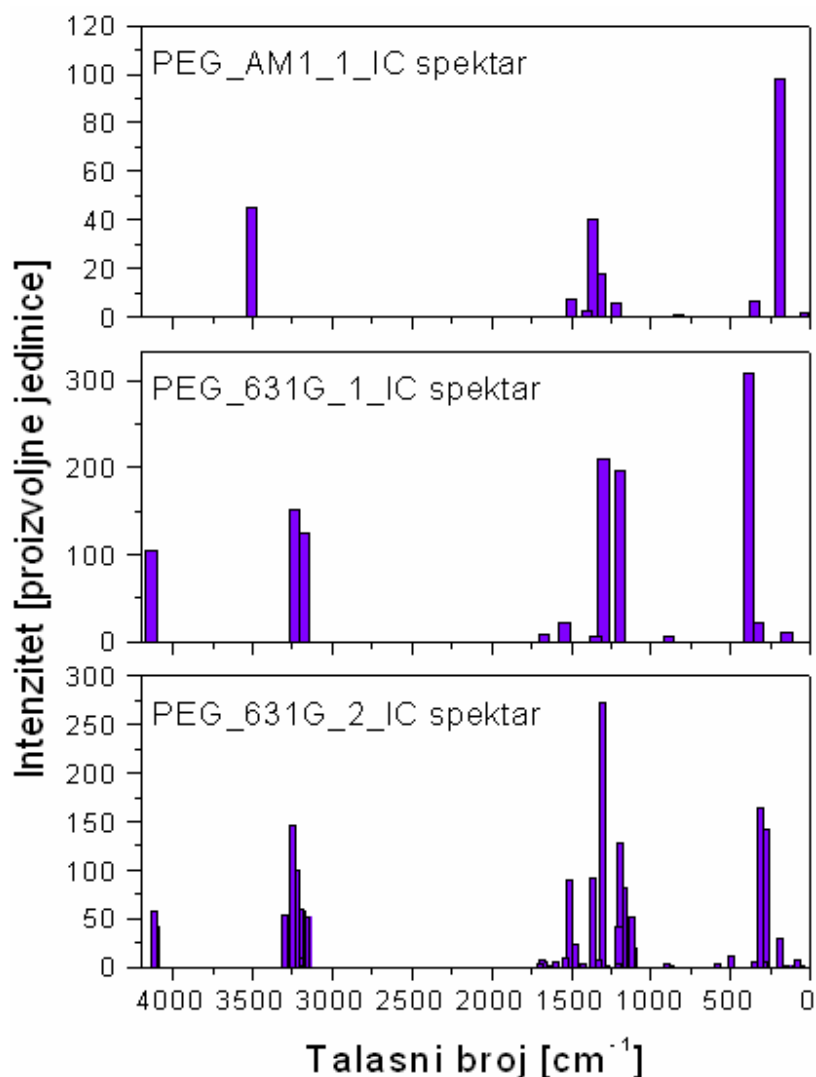


Slika 5.4.11. IC spektri jednog, dva i tri povezana molekula PEG, izračunati na AM1 nivou.

Kao i u slučaju dekstrana, najuočljivije promene u IC spektru potiču od modova koji potiču od veze između dva molekula etilen glikola. Promene u ostalim modovima se ogledaju uglavnom u povećanju broja modova u karakterističnim oblastima spektra i u

promenama njihovih relativnih intenziteta, što je uobičajeno pri povećanju broja gradivnih jedinica u oligomeru (polimeru).

IC spektri izračunati na 631-G nivou i njihov odnos prema odgovarajućem AM1 spektru prikazani su na Slici 5.4.12.

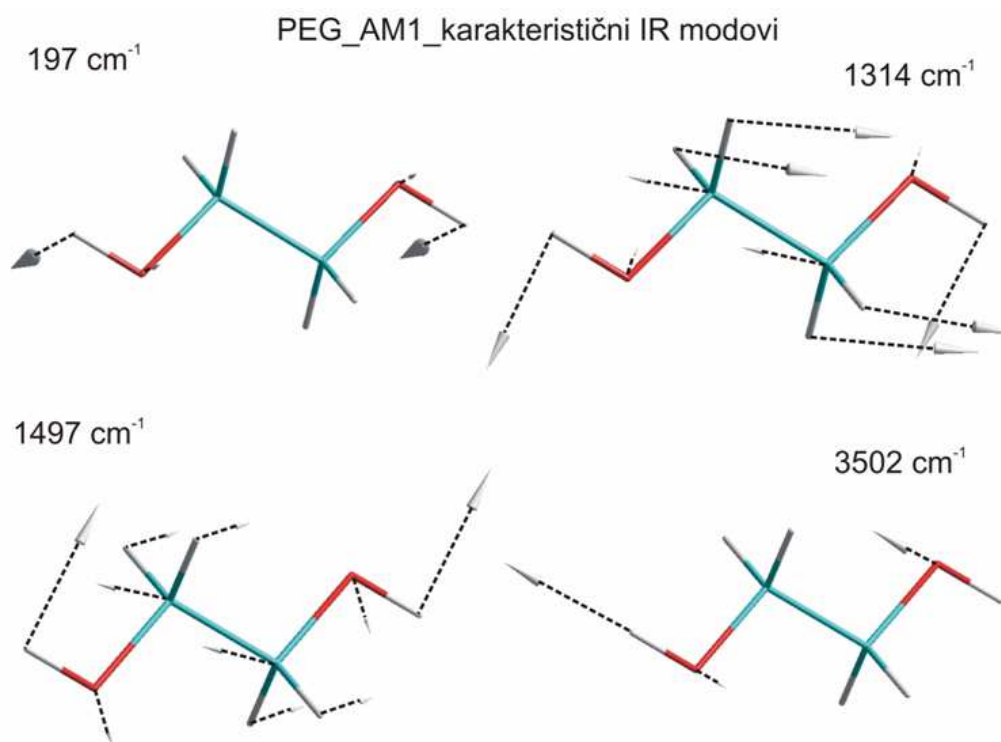


Slika 5.4.12. IC spektri PEG molekula izračunati na 631-G i AM1 nivou.

Bitne razlike u IC spektrima koji su dobijeni sa dva korišćena nivoa proračuna, nalaze se uglavnom na visokim frekvencijama, i potiču od modova koji su povezani sa istežućim C-H i O-H vibracijama. Kao i kod proračuna IC spektara dekstrana, ni razlike koje dva

metoda daju za odnose intenziteta unutar dve grupe modova na nižim frekvencijama ( $1000-1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $200-500\text{ cm}^{-1}$ ), koje su važne za razumevanje ovih molekula, nisu beznačajne, pa svaka detaljna analiza zahteva korelaciju proračunatih sa izmerenim IC spektrima.

Karakteristični modovi IC spektra PEG molekula, koji pripadaju  $\text{CH}_2\text{OH}$  grupi kojom se molekul obično veže za nanočestice, prikazani su na Slici 5.4.13.



Slika 5.4.13. Karakteristični IC modovi  $\text{CH}_2\text{OH}$  grupe PEG molekula za koje se očekuje značajna promena pri njegovom vezivanju za nanočestice.

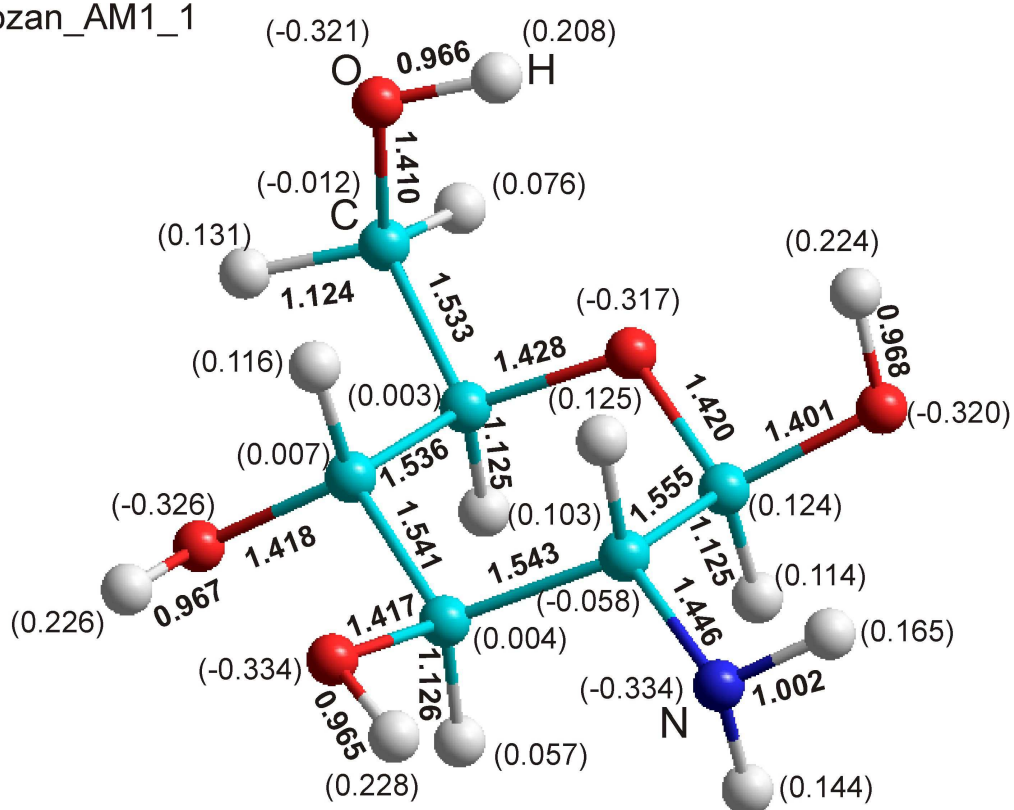
Te frekvencije u delu spektra na niskim frekvencijama ( $197\text{ cm}^{-1}$ ) potiču od savijajućih (bending) vibracija terminalnih OH grupa van ravni molekula, na srednjim frekvencijama ( $1300-1500\text{ cm}^{-1}$ ) potiču od savijajućih vibracija terminalnih OH grupa u ravni molekula, a na visokim frekvencijama (iznad  $3500\text{ cm}^{-1}$ ) potiču od istežućih (stretching) frekvencija OH grupa.



#### 5.4.4. Citozan

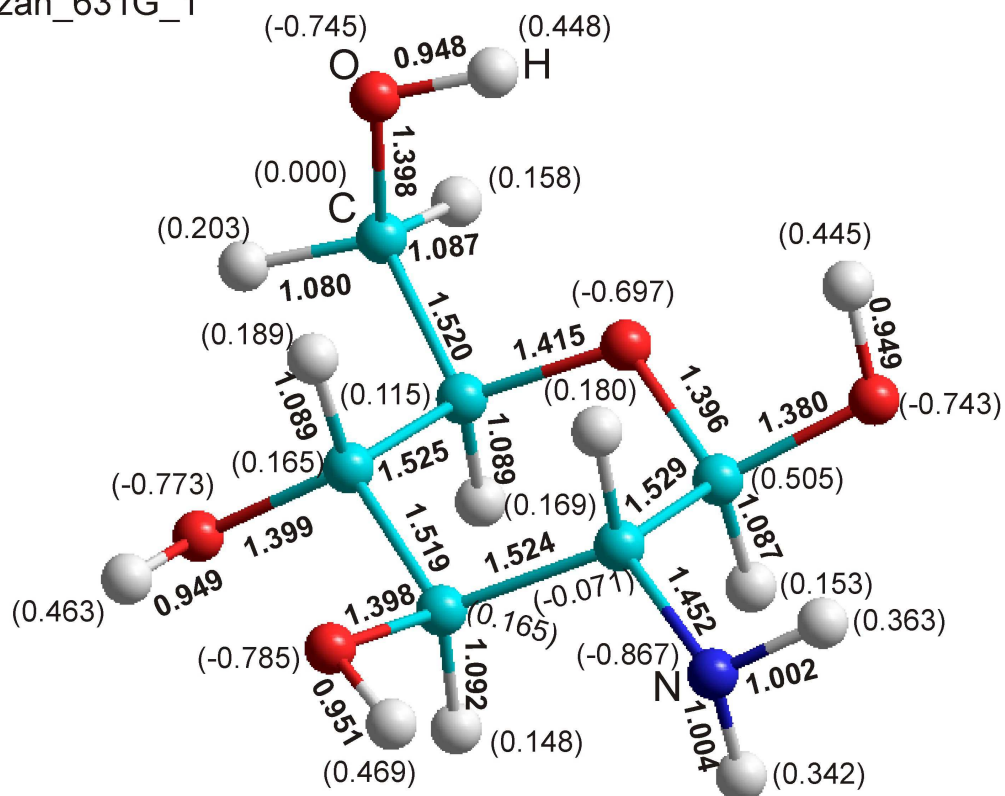
Oligomeri citozana različite dužine (1-3 molekula) optimizirani su programskim paketom HyperChem na polu-empirijskom kvantnom nivou AM1, a osnovna konformacija i kompletnim LCAO proračunom, sa bazisom atomskih funkcija 631-G. Na Slikama 5.4.14 (a) i (b) mogu se uporediti rezultati AM1 i 631-G proračuna osnovne konformacije molekula citozana.

(a) Citozan\_AM1\_1



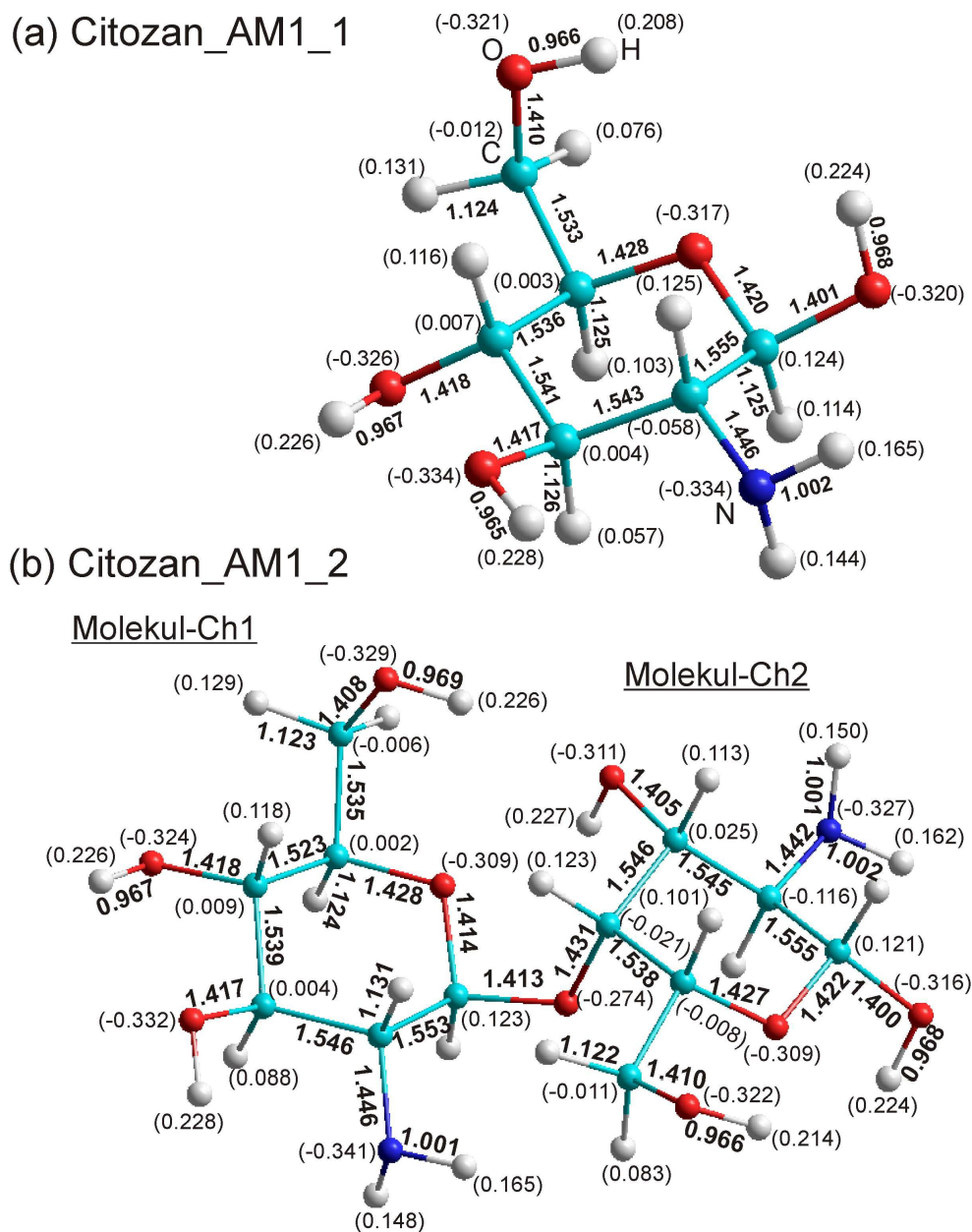
Slika 5.4.14 (a). Osnovna konformacija molekula citozana, optimizirana na AM1 nivou.

(b) Citozan\_631G\_1



Slika 5.4.14 (b). Osnovna konformacija molekula citozana, optimizirana na 631-G nivou.

Kao i kod proračuna PEG i dekstran ologomera, uočava se da su, sa izuzetkom C-N veze, dužine veza 631-G konformacije nešto kraće, a naelektrisanja na odgovarajućim atomima značajno veća, što utiče i na proračune IC spektara. Da bi se uočile razlike koje u strukturi molekula citozana nastaju pri formiranju oligomera višeg reda, na Slici 5.4.15. su prikazani osnovni molekul citozana i njegov oligomer koji sadrži dva povezana molekula, optimizirani na AM1 nivou.

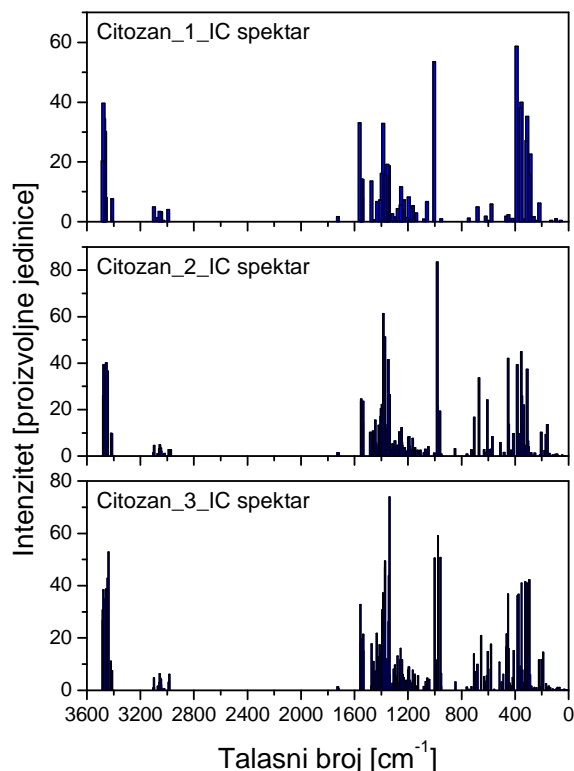


Slika 5.4.14. Osnovna konformacija citozana (a) i njegov oligomer koji sadrži dva molekula (b), optimizirani na AM1 nivou.

Prema očekivanju, bitnije razlike parametara oligomera, u odnosu na osnovni molekul, uočavaju se u oblasti veze između dva osnovna molekula (citozan veza). C-O veza koja potiče od C<sub>1</sub>-OH grupe molekula Ch2 je značajno duža (1.431 Å) od ostalih C-O veza u molekulu, uključujući tu i C-O vezu (1.413 Å) koja sa anomernog položaja molekula Ch1 kompletira citozan vezu. Naelektrisanje atoma kiseonika koji se nalazi u središtu citozan

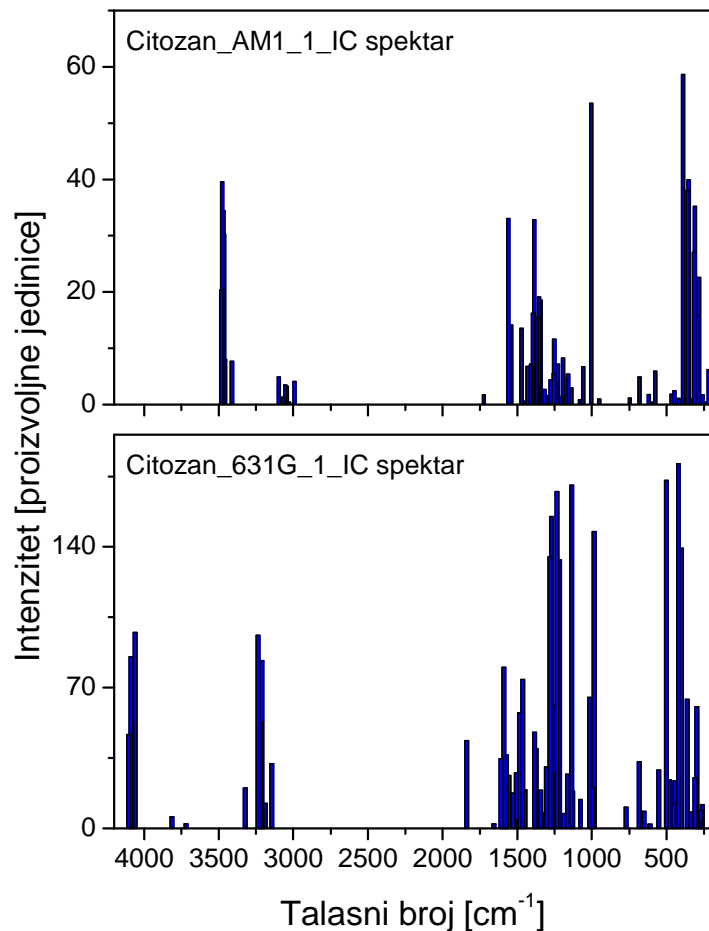
veze (-0.274 e) je manje negativno nego kod ostalih O atoma u OH grupama, čak manje i od onog koje imaju O u benzoidnim prstenovima. Naelektrisanja na C atomu (0.123 e) sa anomerne strane citozan veze (molekul Ch1) se praktično ne menja, ali je njegova veza prema O u benzoidnom prstenu kraća (1.414 Å), a naelektrisanje na benzoidnom O (-0.309 e) manje negativno nego kod osnovnog molekula citozana. Naelektrisanje C1 atoma, koji pripada molekulu Ch2 sa druge strane citozan veze je blago negativno (-0.021 e), dok je u osnovnom molekulu citozana ono blago pozitivno (0.007 e), a veze C1 prema susednim C atomima u benzoidnom prstenu su nešto duže (1.546 Å, 1.538 Å), nego u osnovnom molekulu citozana (1.541 Å, 1.536 Å). Navedene promene dužine veza i naelektrisanja na atomima su posledica karakteristične preraspodele naelektrisanja prilikom formiranja citozan veze i važne su za razumevanje njene prirode i mehanizma formiranja.

IC spektri osnovnog molekula, i oligomera citozana sa dva i tri molekula, izračunati na AM1 nivou, prikazani su na Slici 5.4.16.



Slika 5.4.16. IC spektri osnovnog molekula, i oligomera citozana sa dva i tri molekula, izračunati na AM1 nivou.

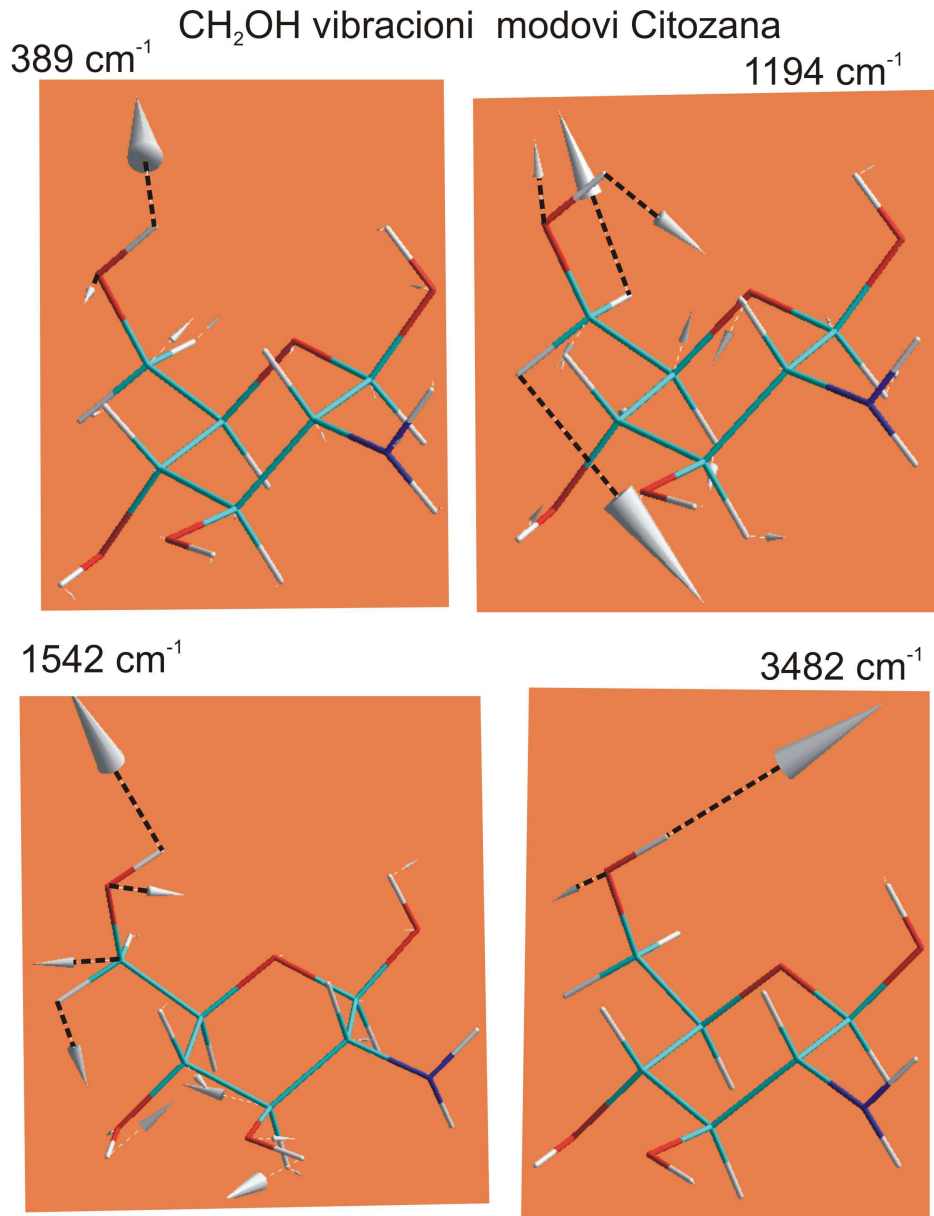
IC spektri molekula chitozana izračunati na 631-G nivou i njihov odnos prema odgovarajućem AM1 spektru prikazani su na Slici 5.4.17.



Slika 5.4.17. IC spektri molekula citozana izračunati na 631-G i AM1 nivou.

Kao i kod ostalih računatih molekula, u IC spektrima dobijenim sa dva korišćena metoda proračuna, najviše se razlikuju frekvencije modova koje potiču od istežućih C-H i O-H, i u ovom slučaju N-H vibracija, u oblasti iznad 3000 cm<sup>-1</sup>. U ovom slučaju postoje i značajne razlike, ne samo u relativnim intenzitetima odgovarajućih modova, nego i u njihovom rasporedu, u oblastima frekvencija 1000-1700 cm<sup>-1</sup> i 250-750 cm<sup>-1</sup>, pa je za pouzdano tumačenje rezultata neophodno poređenje izračunatih i eksperimentalno izmerenih IC spektara.

Karakteristični modovi IC spektra molekula citozana, koji potiču od CH<sub>2</sub>OH grupe, kao jedne od mogućnosti da se citozan veže za nanočestice, prikazani su na Slici 5.4.18.

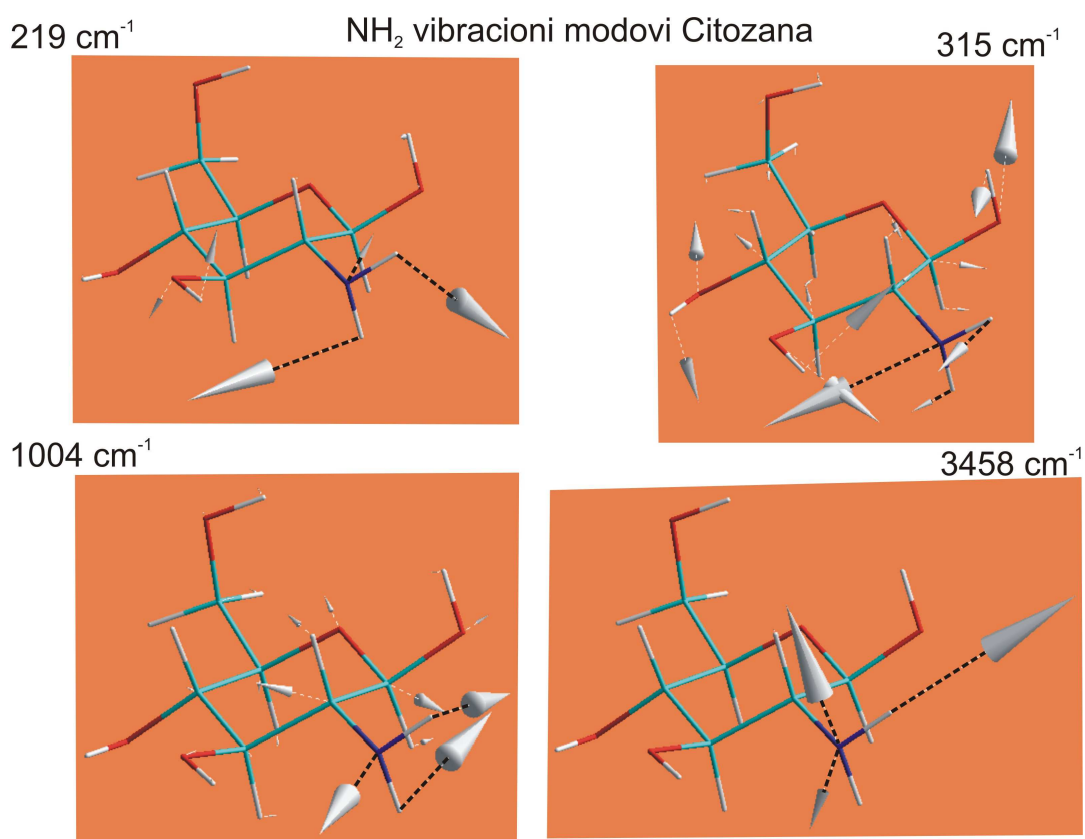


Slika 5.4.18. Karakteristični IC modovi molekula citozana koji potiču od CH<sub>2</sub>OH grupe i za koje se očekuje značajna promena ako se molekul pomoću nje veže za nanočestice.

Karakteristična frekvencija CH<sub>2</sub>OH grupe, na niskim frekvencijama (389 cm<sup>-1</sup>), potiče od savijajuće (bending) deformacije terminalne OH grupe van ravni CH<sub>2</sub>OH. Na srednjim frekvencijama mod na (1194 cm<sup>-1</sup>) potiče od asimetrične ljuļajuće (rocking) deformacije

CH<sub>2</sub>OH, a mod na (1542 cm<sup>-1</sup>) od savijajuće deformacije CH<sub>2</sub>OH grupe u vlastitoj ravni, vrlo slično kao kod glukoze (dekstrana). Mod na visokim frekvencijama (oko 3482 cm<sup>-1</sup>), potiče od istežućih (stretching) frekvencija OH grupe koja pripada CH<sub>2</sub>OH.

Karakteristični modovi IC spektra molekula citozana, koji potiču od NH<sub>2</sub> grupe, koja je druga grupa kojom se citozan često veže za nanočestice, prikazani su na Slici 5.4.19.

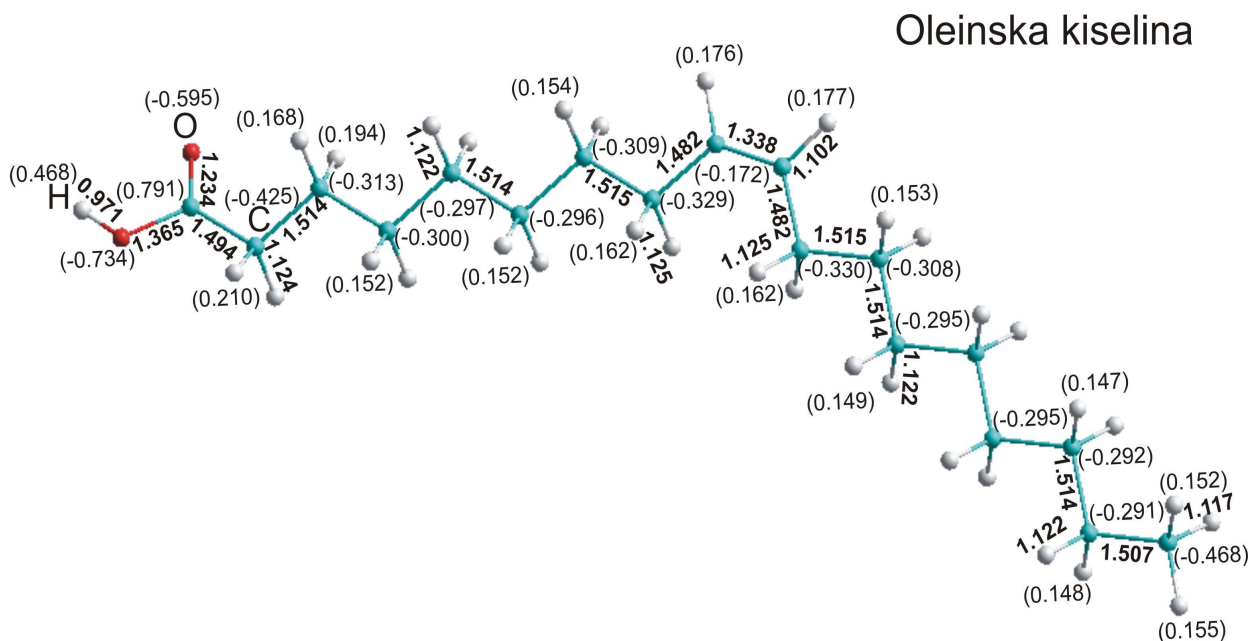


Slika 5.4.19. Karakteristični modovi IC spektra molekula citozana, koji potiču od NH<sub>2</sub> grupe, za koje se očekuje značajna promena ako se molekul pomoću nje veže za nanočestice.

Modovi na niskim frekvencijama potiču od asimetrične (219 cm<sup>-1</sup>), i simetrične (315 cm<sup>-1</sup>) savijajuće (bending) deformacije NH<sub>2</sub> grupe van ravni grupe. Mod na srednjim frekvencijama (1004 cm<sup>-1</sup>) potiče od «ljudajuće» (rocking) deformacije NH<sub>2</sub> grupe, a mod na visokim frekvencijama (3458 cm<sup>-1</sup>) od asimetrične istežuće (stretching) deformacije NH<sub>2</sub> grupe.

### 5.4.5. Oleinska kiselina

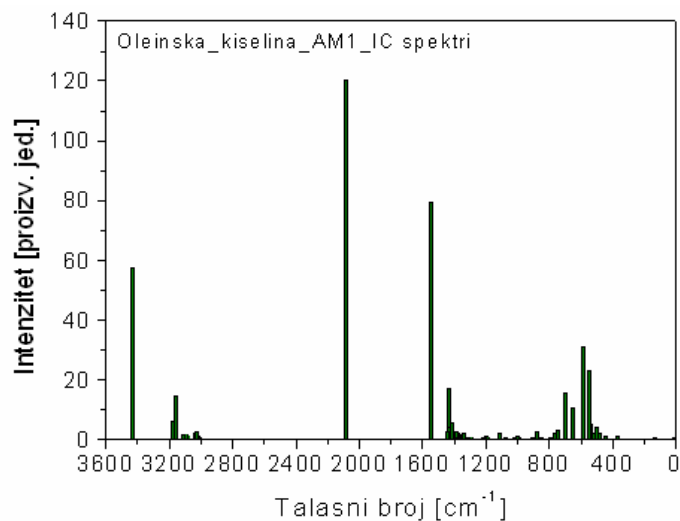
Molekul oleinske kiseline, optimiziran programskim paketom HyperChem na poluempirijskom kvantnom nivou AM1, prikazan je na Slici 5.4.20.



Slika 5.4.20. Molekul oleinske kiseline optimiziran na AM1 nivou.

Uočava se bitna razlika u dužini dvostruke C=O, i jednostruke C-OH veze u COOH grupi, kao i razlika naelektrisanja odgovarajućih O atoma.

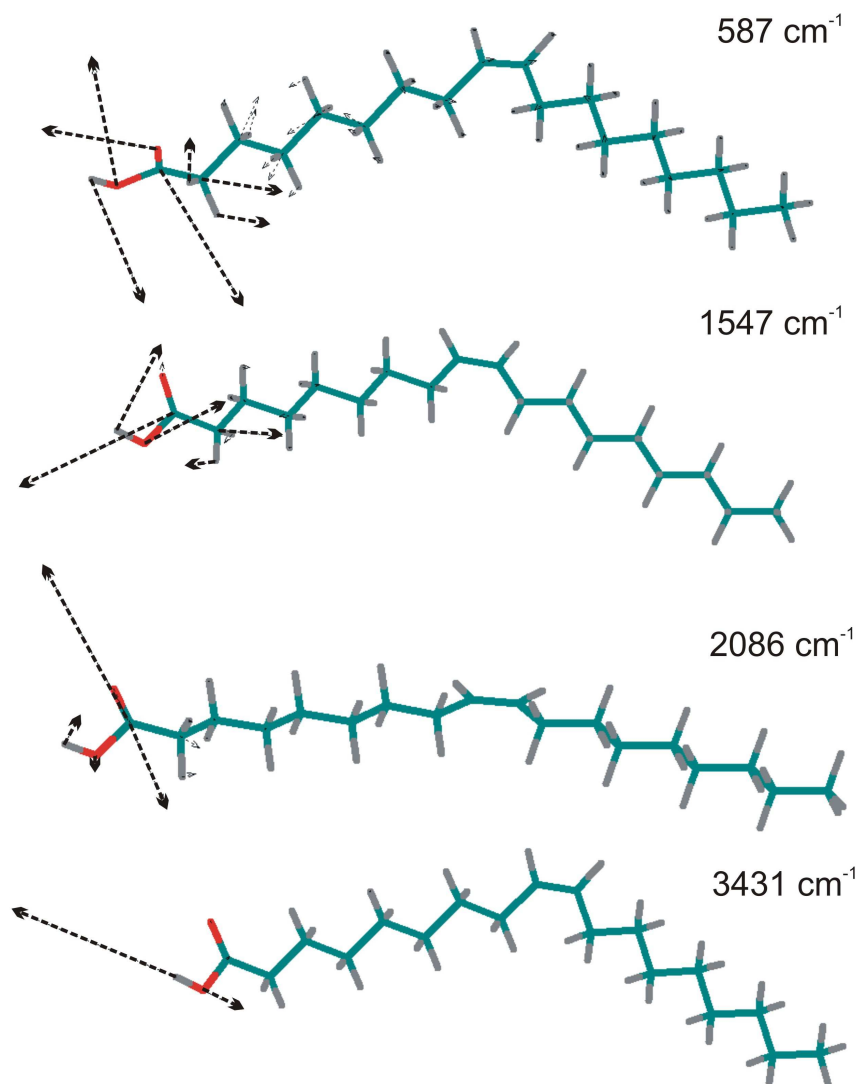




Slika 5.4.21. IC spektri molekula oleinske kiseline, izračunati na AM1 nivou.

IC spektri molekula oleinske kiseline, izračunati na AM1 nivou, prikazani su na Slici 5.4.21

Kao i kod limunske kiseline, dva karakteristična intenzivna moda koja potiču od COOH grupe, kojom se molekul obično veže za nanočestice, jasno su vidljiva su na frekvencijama oko 2100 i 1550  $\text{cm}^{-1}$ . Zajedno sa ostalim karakterističnim IC modovima koji potiču od COOH grupe molekula oleinske kiseline, oni su prikazani na Slici 5.4.22.

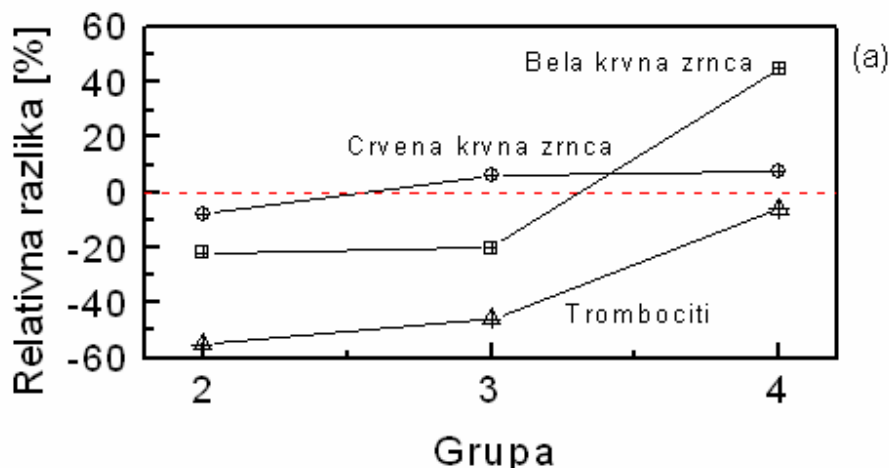


Slika 5.4.22. Karakteristični IC modovi molekula oleinske kiseline koji potiču od COOH grupe, a za koje se očekuje značajna promena kada se molekul pomoću nje veže za nanočestice.

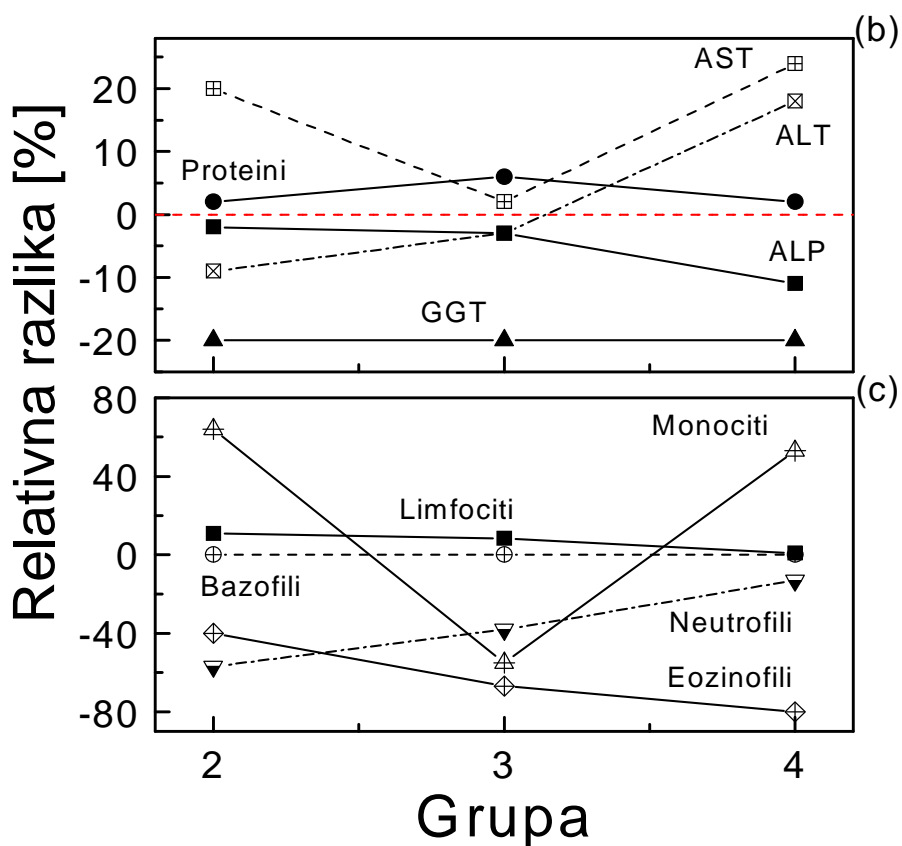
Karakteristična frekvencija COOH grupe, na niskim frekvencijama ( $587 \text{ cm}^{-1}$ ), potiče od savijajuće (bending) deformacije terminalne OH grupe van ravni, i savijajuće deformacije atoma O u ravni COOH grupe. Vibracioni mod na srednjim frekvencijama ( $1547 \text{ cm}^{-1}$ ) potiče od asimetrične savijajuće deformacije C-OH, u ravni COOH molekula, a mod na ( $2086 \text{ cm}^{-1}$ ) uglavnom od istežuće (stretching) deformacije C=O veze u COOH grupi. Mod na visokim frekvencijama (oko  $3431 \text{ cm}^{-1}$ ), potiče od istežuće deformacije OH grupe koja pripada COOH.

## 6. UTICAJ NANOPRAHOVA OKSIDA GVOŽĐA NA KRV, *in-vivo* I *in-vitro*

Istraživanje je sprovedeno na 22 Albino pacova soja Wistar, kojima je intravenski ubrizgano 0,5 ml rastvori čistih prahova *p-2* ( $J = 1000 \text{ mA/dm}^2$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ ) i *p-3* ( $J = 1000 \text{ mA/dm}^2$ ,  $T = 60^\circ\text{C}$ ), i ferofluida (*ff*) koji je dobijen oblaganjem ovih prahova limunskom kiselinom (CA). I prahovi i *ff* su ubrizgani u razblaženjima od 1:10 i 1:100. Uzorak *p-2* je ubrizgan u grupu 2, (broj pacova  $n=6$ ), uzorak *p-3* u grupu 3, ( $n=6$ ), a ferofluid u grupu 4, ( $n=6$ ). Grupa 1 ( $n=4$ ) je bila kontrolna grupa [Mamula Tartalja D., 2012]. Aplikaciju navedenih rastvora ekperimentalne životinje su podnele dobro. Samo jedan pacov je nakon ubrizgavanja pokazao znake plućne embolije, ali se i on brzo oporavio. Životinje su žrtvovane 24 sata nakon unošenja prahova, a krv dobijena punkcijom srca, analizirana je pomoću automatskog hematološkog VCS (Volume, Conductivity, Light Scattering) analizatora, HmX-Coulter, koji je, kao referentna metoda, preporučen u ovu svrhu od Svetske zdravstvene organizacije. Urađene su analize krvne slike (WBC-bela krvna zrnca, neutrofili, eozinofili, monociti i limfociti), diferencijalne krvne slike (% neutrofila, bazofila, limfocita i monocita), i ispitane metaboličke promene (ukupni proteini, enzimi, AST-ALT-ALP, i GGT). Dobijeni rezultati prikazani su na Slikama 6.1 (a), (b) i (c).



Slika 6.1. (a). Relativne promene (u odnosu na kontrolnu grupu) krvne slike krvi albino Wistar pacova 24 sata nakon unošenja 5 ml, 1:10 rastvora prahova *p-2* i *p-3* i ferofluida. Linije su povučene da vode oko.



Slika 6.1. Relativne promene (u odnosu na kontrolnu grupu): (b) metaboličkih parametara i (c) diferencijalne krvne slike, krvi albino Wistar pacova 24 sata nakon unošenja 5 ml, 1:10 rastvora prahova *p-2* i *p-3* i ferofluida. Linije su povučene da vode oko.

Primena nanoprahova i ferofluida utiče na neke parametre u sve tri vrste testova, ali na različit način. Ni jedan od tri primenjena agensa (*p-2*, *p-3*, *ff*) nije imao značajan uticaj na crvena krvna zrnaca. Međutim, agensi *p-2* i *p-3* značajno smanjuju nivo belih krvnih zrnaca, što je efekat koji ponekad prati imuno-invazivne terapije, dok ga *ff* značajno povećava, što bi mogao biti znak upalnog procesa. *p-2* i *p-3* takođe smanjuju nivo trombocita (još jedna karakteristika imunog odgovora), dok je uticaj *ff* na trombocite neznan.

Što se tiče parametara diferencijalnih testova krvi, sva tri agensa slabo utiču na bazofile i limfocite, a *ff* i na neutrofile, što ukazuje da uvođenje nanoprahova u krv ne izaziva

ozbiljne infekcije ili upale. Sva tri agensa smanjuju nivoe eozinofila (*ff* i do -80 %) i neutrofila, a *p-3* i monocita. Sa druge strane *p-2* i *ff* značajno povećavaju nivo monocita, što bi mogao biti znak brze reakcije anti-inflamatornog sistema.

Primena *p-3* agensa ne izaziva značajne metaboličke promene, osim promena GGT (Gama-glutamil transferaza), koju sva tri upotrebljena agensa smanjuju za oko 20 %. Međutim, nizak nivo GGT obično nije pokazatelj koji izaziva zabrinutost. *p-2* takođe smanjuje ALT (alanin aminotransferaza) za 9 %, što je beznačajno, ali povećava AST (aspartat aminotransferaza) za 20 %. Ferofluid smanjuje ALP (alkalna fosfataza) za 11 % i povećava ALT(18 %) i AST(24 %), parametri koji su potencijalni pokazatelji poremećaja jetre. Na osnovu svih izloženih rezultata, može se zaključiti da nijedan od ispitivanih rastvora nije izazvao značajne upalne niti nekrotične promene, i da nijedan nije toksičan, posebno ne hepatotoksičan.

*In-vitro* istraživanje je sprovedeno na uzorcima ljuske krvi, tako što je venepunkcijom uzeta krv od 30 različitih osoba i razvrstana u odgovarajuće podgrupe. Analizani su sledeći parametri: krvna slika (WBC-bela krvna zrnca, neutrofili, eozinofili, monociti i limfociti), diferencijalna krvna slika (% neutrofila, bazofila, limfocita i monocita), i metaboličke promene: ukupni proteini, enzimi (AST-ALT-ALP, i GGT). Uzorci su razvrstani u 3 grupe:

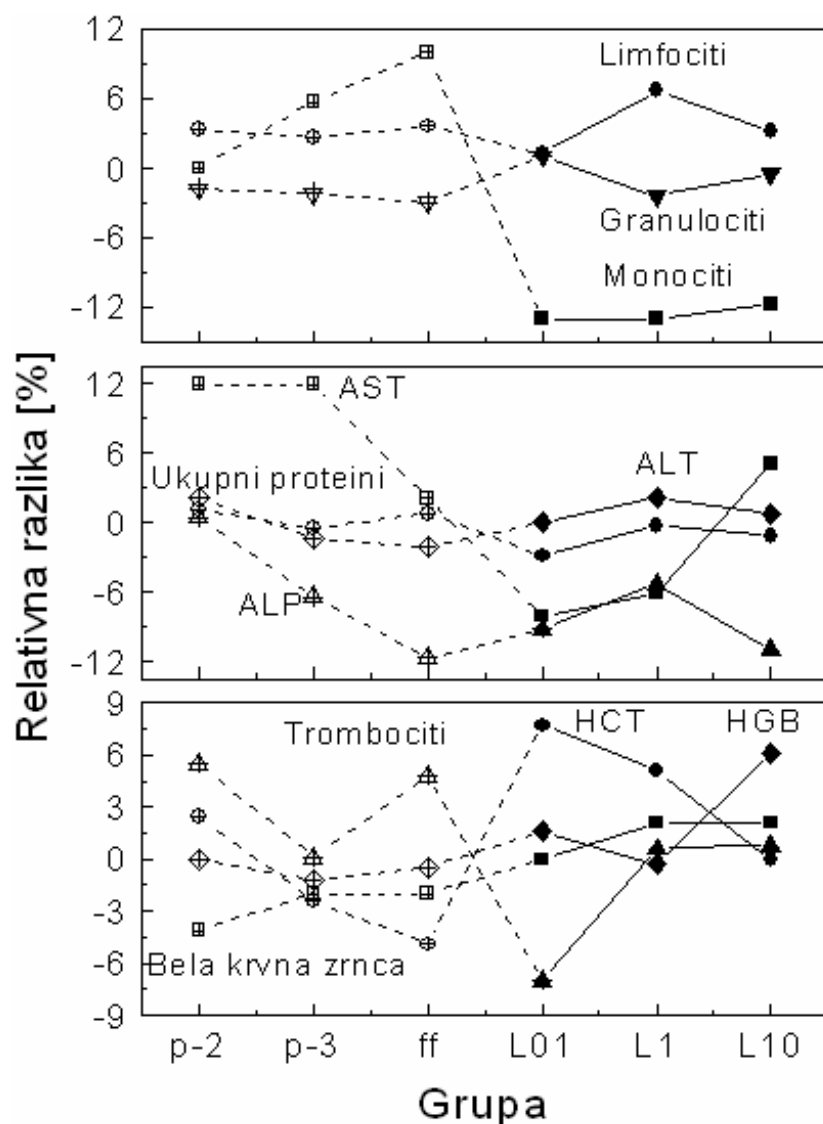
**grupa 1:** kontrolna grupa, u kojoj je uzeto i analizirano n=10 uzoraka sa po 15 ml krvi po uzorku, bez dodatnih intervencija, tj. tretmana.

**grupa 2:** u kojoj je uzeto n=10 uzoraka sa po 45 ml krvi po uzorku, pa je svaki od uzoraka dodatno podeljen u 3 podgrupe od po 15 ml krvi, kojima je dodat rastvor praha *p-2*, *p-3*, ili *ff*, u razblaženju 1:100.

**grupa 3:** u kojoj je uzeto n=10 uzoraka sa po 45 ml krvi po uzorku, pa je svaki od uzoraka dodatno podeljen u 3 podgrupe od po 15 ml krvi, kojima je dodat tečni rastvor *ff* u razblaženju od 1:100, a koje su zatim, redom, izložene laserskom zračenju gustine 0,1, 1 i 10 J/cm<sup>2</sup>.

Korišćen je laser izlazne snage 100 mW, talasne dužine 904 nm, sa trajanjem impulsa 5000 ps, i gustinom snage od 20 mW/cm<sup>2</sup>.

Za 3 ispitivane gustine laserskog zračenja od 0,1, 1 i 10 J/cm<sup>2</sup>, vreme delovanja laserskog snopa bilo je, redom, 5, 50 i 500 s. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 6.2.



Slika 6.2. Relativne promene (u odnosu na kontrolnu grupu): (a) krvne slike, (b) metaboličkih parametara i (c) diferencijalne krvne slike, krvi 30 ljudskih davalaca nakon unošenja 5 ml, 1:100 rastvora prahova *p-2* i *p-3* i ferrofluida. Punim simbolima označene su relativne promene nakon ozračavanja odgovarajućih uzoraka laserom, gustinama energije od: 0.1 (L01), 1 (L1) i 10 (L10) J/cm<sup>2</sup> u odnosu na rezultate dobijene nakon unošenja ferro-fluida. Linije na slici su povučene da vode oko.

Rezultati dobijeni nakon unošenja ispitivanih rastvora u ljudsku krvlju su, generalno, veoma sličani rezultatima dobijenim primenom istih agenasa na pacovima. Dodatno ozračavanje laserom nije značajno uticalo na većinu ispitivanih parametara, osim možda na monocite i AST (smanjenje) i Hematokrite (HCT, povećanje), gde je najmanja gustina energije (  $0,1 \text{ J/cm}^2$  ) proizvela veće promene nego najveća (  $10 \text{ J/cm}^2$  ). Iako se nivo AST i ALP menja sa primenom agenasa i laserskog zračenja, nivo ukupnih proteina je veoma stabilan u svim slučajevima. Hemoglobin (HGB) je jedini parametar koji pokazuje jasan porast posle ozračavanja najvećom gustinom snage, i u odnosu na kontrolnu grupu, i u odnosu na uzorak kome je dodan *ff*.

Rezultati ispitivanja krvne slike i metaboličkih promena nakon unošenja rastvora prahova *p-2*, *p-3* i *ff* su u saglasnosti sa sličnim objavljenim rezultatima, koji su pokazali da se prilikom degradacije dekstranom obloženih NČ oksida gvožđa, i dekstran i gvožđe uključuju u normalne metaboličke puteve organizma, bez primetnog uticaja na nivo metabolizma, pa se može reći da ove supstance ne prouzrokuju nikakav dugoročan loš efekat u organizmu [Mandarano G., 2010].

Mada je primećen određeni nivo toksičnosti neobloženih NČ oksida gvožđa na jetru, bubrege i pluća kada se oni administriraju intravenozno pomoću injekcije [Schlachter E.K., 2011], njihova akutna toksičnost do sada nije prijavljena, a mehanizmi degradacije ćelije u okolini nanočestice još uvek nisu poznati [Lévy M., 2010]. NČ oksida gvožđa nisu prouzrokovale ni dugotrajne promene u nivou enzima jetre [Varna M., 2012], a pri ispitivanju dekstranom obloženih USPIO, kao kontrastnog sredstva u *in-vivo* primeni, povremeno je uočena samo kratkotrajna mučnina i vrtoglavica [Andrew A., 2009].

## 7. ZAKLJUČAK

U ovoj disertaciji su prikazani rezultati proučavanja nanoprahova oksida gvožđa, koji su dobijeni elektrohemijском (EH) metodom i mogućnosti njihove primene u medicini. EH metoda je odabrana zato što omogućava da se na jednostavan (promenom gustine struje  $J$ , temperature  $T$ , pH vrednosti i sastava elektrolita, razmaka između elektroda), brz i jeftin način dobije znatna količina čestica različitih veličina i oblika, pa samim tim i različitih karakteristika, koje dalje utiču na makroskopska svojstva prahova. Zbog toga su detaljno ispitane struktura, morfologija, optičke, električne i magnetne osobine prahova dobijenih pod različitim uslovima, i nakon njihovog toplotno tretmana u atmosferi argona (Ar) i u vazduhu. Da bi se omogućila bolja kontrola EH procesa i osobina tako dobijenih prahova, one su upoređene sa karakteristikama sličnih prahova oksida gvožđa dobijenih drugim metodama, kao što je precipitacija. Osim toga, ispitane su i mogućnosti modifikacije i oblaganja dobijenih nanočestica određenim molekulima, koji se najčešće koriste pri njihovoj primeni u biološkim sistemima i medicini.

Mogućnosti dobijanja nanoprahova EH metodom su ispitivane u opsegu temperatura 293-361 K i gustina struje u opsegu 200-1000 mA/dm<sup>2</sup>, tokom vremena dovoljno dugog (30-60 min) da se proizvede zadovoljavajuća količina praha, bez značajnije promene početne pH vrednosti elektrolita. Rezultati dobijeni XRD merenjima ukazuju da tokom EH sinteze  $T$  više utiče na veličinu kristalita  $d_{cr}$ , nego  $J$ , i da za  $J=200\text{mA/dm}^2$ ,  $d_{cr}$  raste sa temperaturom po paraboličnom zakonu. Nasuprot tome, za konstantnu  $T$ ,  $d_{cr}$  se kreće u uskom opsegu vrednosti (za  $T=333^0\text{K}$ ,  $d_{cr}=18\text{-}24\text{ nm}$ ), pri promenama  $J$  u celom ispitivanom opsegu. Prahovi dobijeni pri manjim gustinama struje i na nižim temperaturama, po pravilu imaju veća zrna, pravilnijeg oblika. Analizom dobijenih prahova elektronskom mikroskopijom (SEM, TEM) utvrđeno je da se oni sastoje od dve, bitno različite faze, čiji relativni odnos bitno zavisi od uslova koji su tokom sinteze vladali u EH ćeliji. Prvu fazu, koja najverovatnije potiče od getita ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ) kao prekursora, čine igličasti kristaliti (Whiskers) sa prečnikom od 15 do 80 nm i od njih sačinjene formacije. Dimenzije zrna ove faze i izvršena magnetna merenja ukazuju da bi ona mogla biti u superparamagnetnom režimu na sobnoj temperaturi i da presudno utiče



na makroskopske magnetne osobine prahova. Drugu fazu čine pravilna pločasta zrna sa prečnikom između 300 i 800 nm, a pretpostavka je da ova faza nastaje od lepidokrita ( $\gamma$ -FeOOH), koji se u prisustvu vodonika u elektrolitu brzo transformiše u pločasti magnetit.

Dodatna analiza raspodele veličine čestica koja je urađena na osnovu merenja dinamičkog rasejanja laserske svetlosti, ukazuje i na prisustvo treće faze koja se sastoji od velikih aglomerata. Činjenica da je ova faza uočena i nakon 10 minuta tretiranja rastvora prahova u ultrazvučnoj kadi, ukazuje da su hemijske i magnetne interakcije među česticama praha koje dovode do aglomeracije, veoma jake. Osim toga, analiza ovako dobijenih raspodela je pokazala da, za razliku od uticaja na veličinu kristalita, gustina struje tokom sinteze u elektrolitičkoj ćeliji ima veći uticaj na aglomeraciju od temperature.

Na osnovu analize rezultata XRD merenja zaključeno je i da više od polovine doprinosa strukturnoj relaksaciji pri oksidaciji magnetita u maghemit daju faktori koji nisu čisto geometrijski, tj. ne mogu se objasniti razlikom u veličini  $\text{Fe}^{2+,3+}$  jona i njima dostupnih položaja u kristalnoj strukturi ova dva jedinjenja.

Merenja zavisnosti specifične toplote od temperature su pokazala da je toplotni kapacitet različitih prahova na sobnoj temperaturi (RT) sličan, ali da se temperaturske zavisnosti toplotnog kapaciteta, i kritične temperature ( $T_C$ ) različitih prahova bitno razlikuju. Potpuno objašnjenje za ovako izražene razlike u toplotnom ponašanju uzoraka, za sada nije nađeno, ali je uočena određena korelacija sa raspodelom veličine i morfologijom čestica praha, kao i sa  $T_C$  dobijenim iz magnetnih merenja. Važnost uočene razlike u toplotnim karakteristikama pojedinih prahova ogleda se u tome što se slično ponašanje može očekivati i kada se prahovi budu zagrevali u RF magnetnom polju, što je od presudnog značaja za njihove primene u hipertermiji.

Merenja magnetizacije prahova u zavisnosti od jačine magnetnog polja (histerezis) su pokazala da uslovi dobijanja prahova, preko raspodele veličine i morfologije čestica, u velikoj meri određuju magnetizaciju zasićenja  $M_S$ .

Temperaturne zavisnosti normalizovane magnetne permeabilnosti  $\mu_N(T)$  i magnetne susceptibilnosti  $\chi_N(T)$ , merene u opsegu od RT do 900 K, sa brzinom zagrevanja 20 K/min, takođe se znatno razlikuju od uzorka do uzorka, a veoma zavise i od atmosfere

(Ar, vazduh) u kojoj je merenje rađeno. Tokom početne faze odgrevanja u obe atmosfere dolazi do uređenja strukture i magnetne strukture uzoraka. Ova promena je pri odgrevanju u Ar nepovratna (nakon hlađenja do RT magnetni moment uzorka je 2-3 puta veći nego pre odgrevanja), dok dalje zagrevanje na vazduhu dovodi do oksidacije magnetita i njegovog prelaska u maghemit.  $T_C$  koje su izmerene u uzorcima grejanim u Ar u potpunoj su saglasnosti sa onima koje se u literaturi navode kao karakteristične za magnetit. Velika odstupanja  $T_C$  koja su primećena pri merenjima u vazduhu potiču od toga što maghemit, koji nastaje pri zagrevanju magnetita na vazduhu, pri određenim uslovima formira super-strukture, koje imaju specifično uređenje katjona i vakancija. Postojanje ovih super-struktura može se ustanoviti na osnovu slabih, ali karakterističnih XRD refleksija, koje su zaista uočene u difraktogramima pojedinih prahova. Ustanovljeno je da ti prahovi imaju znatno više  $T_C$  od onih u kojima te refleksije nisu uočene.

Temperaturne zavisnosti jednosmerne specifične električne otpornosti  $\rho(T)$  merene su u Ar i vazduhu, u opsegu temperatura 293–600 K, pri brzini zagrevanja od 20 K/min. Rezultati merenja odgovaraju onima koje su drugi autori dobijali za slične uzorke magnetita, a na osnovu njih su određene aktivacione energije i druge karakteristike nekoliko procesa („electron hopping“, skokovito kretanje elektrona, uređenje strukture praćeno preraspodelom katjona, oksidacija magnetita u maghemit) do kojih u prahovima dolazi tokom njihovog odgrevanja u različitim atmosferama, pod različitim uslovima. Značajan pad specifične otpornosti  $\rho(T)$  u početnoj fazi odgrevanja, potvrdio je da u uzorcima dolazi do uređenja strukture i preraspodela katjona, što je uočeno i pri magnetnim merenjima. Takođe je potvrđena nepovratnost ovih promena pri odgrevanju u Ar, jer nakon prvog, sva naredna odgrevanja nisu dovela do značajnijih promena  $\rho(T)$ . Ustanovljeno je da pri ovim uslovima u vazduhu, do faznog prelaza magnetita u maghemit dolazi na temperaturi nešto nešto nižoj od 600 K, što je praćeno drastičnim porastom specifične otpornosti za oko 6 redova veličine.

Infracrveni (IC) spektri prahova dobijenih pri različitim uslovima su mereni u opsegu talasnih vektora od 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Analiza karakterističnih vibracija koje se manifestuju u spektru je pokazala da je dominantna faza u svim uzorcima zaista magnetit. Kao i na osnovu rezultata prethodno opisanih merenja, pokazalo se da među različitim prahovima postoje značajne razlike u kvalitetu i uređenosti strukture, ali i u higroskopsnosti.

Ovakva temeljna karakterizacija ispitivanih nanoprahova omogućava izbor onih koji imaju optimalne osobine za određene primene u biosistemima i medicini, što pored visoke efikasnosti podrazumeva svođenje neželjenih efekata na najmanju moguću meru.

U cilju sprečavanja aglomeracije, poboljšanja i inače dobre biokompatibilnost i ostvarivanja željene funkcionalnosti nanočestica oksida gvožđa, neki od prahova su obloženi molekulima limunske kiseline (CA)  $C_6H_8O_7$ . Da bi se ispitao načini vezivanja CA za površinu nanočestica i promene u do kojih dolazi usled vezivanja, izmereni su IC spektri neobloženih, i prahova obloženih sa CA. Osim toga, molekul CA je optimiziran na osnovu polu-empirijskih kvantno-mehaničkih proračuna modelom AM1 iz programskog paketa HyperChem, i za tako određenu molekularnu konformaciju urađen je proračun IC spektara. Na osnovu razlike između proračunatih i eksperimentalnih IC spektara CA molekula zaključeno je da se oni za površinu nanočestica oksida gvožđa vežu preko terminalnih C=O grupa, koje pripadaju COOH grupi. To ukazuje da se na samoj površini nanočestica nalaze atomi Fe, što potvrđuje rezultate nekih skorijih proračuna površine monokristalnog magnetita drugih autora.

Pored molekula CA, slični proračuni su urađeni i za nekoliko drugih molekula koji se često koriste za oblaganje nanočestica oksida gvožđa. Oligomeri citozana različite dužine (1-3 molekula), dekstrana (1-5 molekula), polietilen glikola (PEG) (1-3 molekula) i molekul oleinske kiseline, takođe su optimizirani programskim paketom HyperChem na polu-empirijskom kvantnom nivou AM1, a osnovne konformacije dekstrana, citozana i PEG molekula i kompletnim LCAO (Linearna kombinacija atomskih orbitala) proračunom, sa bazisom atomskih funkcija 631-G, koji daje veoma pouzdane dužine veza i naelektrisanja na atomima. U IC spektrima dobijenim pomoću dva korišćena nivoa proračuna (AM1 i LCAO) značajnije se razlikuju uglavnom C-H, N-H i O-H istežuće vibracije na visokim frekvencijama. Te razlike potiču od razlike u dužinama veze, a posebno u naelektrisanju pojedinih atoma, koju daju dva modela. Utvrđeno je koji modovi potiču od grupa kojima bi se ovi molekuli mogli vezati za površinu nanočestica i karakteristične molekularne vibracije koje ih proizvode su posebno prikazane. Na taj način su određene oblasti IC spektra na koje posebno treba obratiti pažnju tokom eksperimentalnih merenja nanočestica obloženih ovim molekulima.

Ovako dobijeni i okarakterisani nanoprahovi su upotrebljeni u istraživanju koje je sprovedeno na Wistar miševima *in vivo* i na 30 uzoraka humane krvi *in vitro*. Miševima, podjeljenim u nekoliko grupa, je intravenski ubrizgano 0,5 ml rastvori čistih prahova *p-2* i *p-3*, kao i fero-fluida (*ff*) sa česticama obloženim sa CA, u razblaženjima od 1:10 i 1:100. Tri grupe uzoraka humane krvi su posle apliciranja nanoprahova i *ff* dodatno ozračene laserskom svetlošću, talasne dužine 904 nm, sa trajanjem impulsa 5 ns, pri izlaznoj snazi lasera od 100 mW i gustom snage na uzorku od 20 mW/cm<sup>2</sup>, do ukupnih gustina energija ozračavanja od 0.1, 1 i 10 J/cm<sup>2</sup>.

24 sata nakon ubrizgavanja prahova i *ff* urađene su analize krvne slike (WBC-bela krvna zrnca, neutrofili, eozinofili, monociti i limfociti), diferencijalne krvne slike (% neutrofila, bazofila, limfocita i monocita) i ispitane su metaboličke promene (ukupni proteini, enzimi, AST-ALT-ALP, i GGT). Dobijeni rezultati pokazuju da korišćeni prahovi i *ff* ne prouzrokuju nikakve ozbiljne imune, metaboličke, ili inflamatorne promene u krvi, pa se mogu bezbedno koristiti za različite biološke i medicinske primene.

Dalji rad zahteva precizniju sistematizaciju i karakterizaciju prahova na osnovu veličine i oblika zrna, i eksperimentalno ispitivanje mogućnosti korišćenja prahova sa uskom monodisperznom raspodelom veličine i oblika za različite medicinske primene. Takođe bi trebalo ispitati mogućnosti oblaganja ovakvih monodisperznih prahova različitim organskim molekulima, koristeći eksperimentalno-teorijsku proceduru koja je u ovoj disertaciji primenjena za nekih od njih koji se u tu svrhu najčešće koriste. Na taj način bi se dobio egzaktn uvid u fizičko-hemijske procese koji su odgovorni za vezivanje organskih molekula za nanočestice gvožđa, od čega bitno zavisi vreme cirkulacije i usmeravanje ovakvih složenih čestica, pa samim tim i njihova primena. Kao naredni korak, ista procedura bi mogla da se primeni i na "kačenje" određenih aktivnih supstanci na organsku oblogu nanočestica.

## LITERATURA

- Akbarzadeh A., Samiei M., Davaran S., (2012) Magnetic Nanoparticles: Preparation, Physical Properties, and Applications in Biomedicine, *Nanoscale Research Letters* 7(1), p.1-13
- Akhtar J., R.Chaturvedi, J.Sharma, D.Mittal, P.Pardhan, (2009) Magnetized Carrier as Novel Drug Delivery System, *International J. of Drug Delivery Technology* 1(1), p.28-35
- Alexis F., Pridgen E, Molnar L.K., Farokhzad O.C., (2008) Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles, *Mol.Pharm.* 5(4), p.505-515
- Almeida J.P., Chen A.L., Foster A., Drezek R., (2011); In Vivo Biodistribution of Nanoparticles, *Nanomedicine* 6(5), p.815–835
- Bahadur D, Giri J., (2003) Biomaterials and Magnetism, *Sadhana* 28(3-4), p.639–656
- Bang, J. H.; Suslick, K. S., Suslick, J., (2007) Sonochemical Synthesis of Nanosized Hollow Hematite, *J.Am. Chem. Soc.* 129, p.2242-2243
- Barrera C., Herrera A.P., Rinaldi C., (2009) Colloidal Dispersions of Monodisperse Magnetite Nanoparticles Modified With Poly(Ethylene Glycol), *Journal of Colloid and Interface Science* 329, p.107–213
- Berkovski B. and Bashtovoy V., Eds.,(1996) *Magnetic Fluids and Applications Handbook*, Begel House inc., New York,
- Bjornerud A, Johansson L., (2004) The Utility of Superparamagnetic Contrast Agents in MRI: Theoretical Consideration and Applications in the Cardiovascular System, *NMR Biomed.*17, p.465-477
- Bloemen M., Brullot W., Luong T.T., Geukens N., Gils A., Verbiest T., (2012) Improved Functionalisation of Oleic Acid- Coated Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications, *J Nanopart Res* 14(9), p.1100-1110
- Borysiuk J., Grabias A., Szczytko J., Bystrzejewski M., Twardowski A., Lange H., (2008) Structure and Magnetic Properties of Carbon Encapsulated Fe Nanoparticles Obtained by Arc Plasma and Combustion Synthesis, *Carbon* 46, p.1693-1701
- Boyer C., Whittaker M.R., Bulmus V., Liu J., Davis T.P., (2010) The Design And Utility Of Polymer-Stabilised Iron-Oxide Nanoparticles For Nanomedicine Applications NPG, *Asia Materials* 2, p.23-30
- Butter K, Kassapidou K., G.J. Vroege, A.P. Philipse, (2005) Preparation and Properties of Colloidal Iron Dispersions, *J. Colloid Interface Sci.* 287(2), p.485-495
- Bystrzejewski M., Huczko A., Lange H., Cudziło S., Kiciński W., (2007) Combustion Synthesis route to Carbon-Encapsulated Iron Nanoparticles, *Diamond Relat. Mater.* 16, p.225-228
- Cabrera L., Gutierrez S., Menendes N., Morales M.P., Herrasti P., (2008) Magnetite Nanoparticles: Electrochemical Synthesis and Characterization, *Electrochem. Acta* 53, p.3436–3441
- Cheng J., Teply B.A., Sherifi I., Sung J., Luther G., Gu F.X., Levy-Nissenbaum E.,Radovic-Moreno A.F., Langer R., Farokhzad O.C., (2007) Formulation of Functionalised PLGA-PEG Nanoparticles for In Vivo Targeted Drug Delivery, *Biomaterials* 28(5), p.869-876
- Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D., Adam V., Kizek R., Hubalek J., (2010) Magnetic Nanoparticles and Targeted Drug Delivering, *Pharmacological Research* 62, p.144-149

- Chouly C., Pouliquen D., Lucet I., Jeune J.J., Jallet P., (1996) Development of Superparamagnetic Nanoparticles for MRI: Effect of Particle Size, Charge and Surface Nature on Biodistribution, *Journal of Microencapsulation* 13, p.245–255
- Creangă D.E., Culea M., Nădejde C., Oancea S., Curecheriu L., Racuciu M., (2009) Magnetic Nanoparticle Effects on the Red Blood Cells, *Journal of Physics: Conference Series* 170, 012019
- Davis M.E., (2002) Non-Viral Gene Delivery Systems, *Current Opinion in Biotechnology* 13, p.128–131
- Decuzzi P, Godin B, Tanaka T, Lee SY, Chiappini C, Liu X, Ferrari M., (2010) Size and Shape Effects in the Biodistribution of Intravascularly Injected Particles. *J Control Release* 141, p.320–327
- De Jong W.H., Borm P.J.A., (2008) Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards, *Int J Nanomedicine* 3(2), p. 133–149
- De Silva M.N., Almeida M.V., Goldberg J.L., Developing Super-Paramagnetic Nanoparticles for Central Nervous System Axon Regeneration, *Nanotech 2007, Technical Proceedings of the 2007 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show* 2, p.791–794
- De Sousa M.E., van Raap M.B.F., Rivas P.C., Zélis P.M., Girardin P., Pasquevich G.A., Alessandrini J.L., Muraca D., Sánchez F.H., (2013) Stability and Relaxation Mechanisms of Citric Acid Coated Magnetite Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia, *J. Phys. Chem. C* 117, p. 5436 – 5445
- Demazeau G., (2008). Solvothermal Processes: New Trends in Materials Chemistry, *Journal of Physics: Conference Series* 121(8), 082003
- Demazeau G., (2008). Solvothermal Reactions: an Original Route for the Synthesis of Novel Materials, *J. Mater Science* 43, p.2024-2029
- Duan H.W., Kuang M., Wang X.X., Wang Y.A., Mao H, Nie S.M., (2008) Reexamining the Effects of Particle Size and Surface Chemistry on the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanocrystals: New Insights Into Spin Disorder And Proton Relaxivity, *Journal of Physical Chemistry C* 112, p.8127–8131.
- Đenadić R.R., (2006) Niskotemperaturska sinteza olovo-titanatnih nanoprahova iz tečne faze, magistarski rad, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
- Džarova A., Dubničková M., Zavišova V., Konerecka M., Kopčanský P., Gojzewski H., Timko M., (2010) Influence of Magnetite Nanoparticles on Human Leukocyte Activity, *8th International Conference on The Scientific and Clinical Applications Of Magnetic Carriers, AIP Conference Proceedings* 1311, p.337-344
- Elias A., Tsourkas A., (2009) Imaging Circulating Cells and Lymphoid Tissues with Iron Oxide Nanoparticles, *Hematology* 1, p.720-726
- Elmiladi N., Höhl C., Mende J., Schlichtenmayer M., Habenstein B., Maier K., (2008) Influence of Ultrasound on Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents (SPIO), *DPG Frühjahrstagung des Arbeitskreises Festkörperphysik*, Berlin
- El-Shall M.S., Edelstein A.S., (1996) Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications Formation of Clusters and Nanoparticles from Supersaturated Vapor and Selected Properties in: A. S. Edelstein, R. C. Cammarata, *Nanomaterials: Synthesis, properties and Applications*, Institute of Physics Publishing, Bristol, Philadelphia, p.13-54

- Fajarah F., Setyawan H., Widiyastuti W., Winardi S., (2012) Synthesis of Magnetite Nanoparticles by Surfactant-free Electrochemical Method in an Aqueous System, *Adv. Powder Tech* 23(3), p.328-333
- Faraji M., Yamini Y, Rezaee M., (2010) *J. Iran. Chem. Soc.* 7(1), pp. 1-37.
- Feng J, Liu H., Bhakoo K.K., Lu L., Chen Z., (2011) A Metabonomic Analysis of Organ Specific Response to USPIO Administration, *Biomaterials* 32(27), p. 6558-6569.
- Franger S., Berthet P., Dragos O., Large Influence of the Synthesis Conditions on the Physico-Chemical Properties of Nanostructured Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, (2007) *J. Nanopart. Res.* 9, p.389-402
- Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, Discher DE. (2007) Shape Effects of Filaments Versus Spherical Particles in Flow and Drug Delivery., *Nat Nanotechnol* 2, p.249-255
- Goodarzi B., Sahoo Y., Swihart M.T., Prasad P.N., (2004) Aqueous Ferrofluid of Citric Acid Coated Magnetite Particles, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* N6.6.1, p. 789
- Goya G. F., Grazú V., M. R. Ibarra, (2008) Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy, *Current Nanoscience* 4, p.1-16
- Gupta A.K., Wells S., Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies, (2004) *IEEE Transactions Nanobioscience* 3(1), p. 66-73
- Gupta AK, Gupta M., (2005) Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications, *Biomaterials* 26(18), p.3995-4021
- Guskos N., Papadopoulos G.J., Likodimis V., Patapis S., Yarmis D., Przpiera A., Przpiera K., Majszczyk J., Typek J., Wabia M., Aidinis K., Drazek Z., (2002) Photoacoustic, EPR and Electrical Conductivity Investigations of Three Synthetic Mineral Pigments: Hematite, Goethite and Magnetite, *Materials Research Bulletin* 37, p.1051-1061
- Sattler K., ed. (2011) *Handbook of Nanophysics: Nanomedicine and Nanorobotics* CRC Press
- Hergt R, Dutz S., Muller R., Zeisberger M., (2006) Magnetic Particle Hyperthermia: Nanoparticle Magnetism And Materials Development for Cancer Therapy, *J.Phys.:Condens. Matter* 18, p.2919-2934
- Hiergeist R., Andrä W., Buske N., Hergt R., Hilger I., Richter U., Kaiser W., (1999) Applications of Magnetite Ferrofluids for Hyperthermia, *J. Magn. Magn. Mater.* 201, p. 420-422
- Högemann D, Josephson L, Weissleder R, Basilion J.P., (2000) Improvement of MRI Probes to Allow Efficient Detection of Gene Expression. *Bioconjugate Chemistry* 11, p.941-94
- Hoehn M, Küstermann E, Blunk J., Wiedermann D., (2002) Monitoring of Implanted Stem Cell Migration In Vivo: a Highly Resolved in Vivo Magnetic Resonance Imaging Investigation of Experimental Stroke in Rat, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, p.16267-72
- Jadhav N.V., Prasad A.I., Kumar A., Mishra R., Dhara S., Babu K.R., Prajapat C.L., Misra N.L., Ningthoujam R.S., Pandey B.N., Vatsa R.K., (2013) Synthesis of Oleic Acid Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles and Studying Their Interaction with Tumor Cells for Potential Hyperthermia Applications, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 108, p.158-168
- Jain T.K., Richey J., Strand M., Leslie-Pelecky D.L., Flask C., V.Labhasetwar, (2008) Magnetic Nanoparticles with Dual Functional Properties: Drug Delivery and Magnetic Resonance Imaging, *Biomaterials* 29(29), p. 4012-4021

- Janes K.A., Calvo P, Alonso M.J., (2001) Polysaccharide Colloidal Particles as Delivery systems for Macromolecules, *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, p.83–97.
- Johannsen M., Gneweckow U., Eckelt L., Feussner A., Waldöfner N., Scholz R., Deger S., Wust P., Loening S.A., Jordan A., (2005) Clinical Hyperthermia of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Presentation of a New Interstitial Technique, *Int. J. of Hyperthermia* 21, p.637-647
- Jokanović V., (2012) *Nanomedicina: Najveći Izazov 21. Veka*, Datastatus, Beograd
- Jordan A., Scholz R., Wust P., Föhling H., Felix R., (1999) Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH): Cancer Treatment With Ac Magnetic Field Induced Excitations of Biocompatible Superparamagnetic Nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater* 201, p. 413-419
- Jordan A., Scholz R., Wust P., Föhling H., Krause J., Włodarczyk W., Sander B., Vogl Th., Felix R., (1997) Effects of Magnetic Fluid Hyperthermia on C3H Mammary Carcinoma in vivo, *Int.J.Hyperthermia*13(6), p.587-605
- Josephson L, Tung CH, Moore A, Weissleder R., (1999) High-efficiency Intracellular Magnetic Labeling with Novel Superparamagnetic-Tat Peptide Conjugates, *Bioconjugate Chemistry* 10, p.186–191
- Karakoti A.S., Das S., Thevuthasan S., Seal S., (2011) PEGylated Inorganic Nanoparticles, *Angewandte Chemie*, p.1980–1994
- Kievit F.M., Veiseh O., Bhattarai N., Fang C., Gunn J.W., Lee D., Ellenbogen R.G., Olson J.M., Zhang M., (2009) PEI–PEG–Chitosan-Copolymer-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Safe Gene Delivery: Synthesis, Complexation, and Transfection, *Advanced Functional Materials* 19(14), p. 2244–2251
- Kim E.H., Lee H.S., Kwak B.K., Kim B.K., (2005) Synthesis of Ferrofluid with Magnetic Nanoparticles by Sonochemical Method for MRI Contrast Agent, *J. Magnetism and Magnetic Materials* 289, p.328–330
- Kim D.H., Lee S.H., Im K.H., Kim K.N., Kim K.M., Shim I.B., Lee Y.K., Lee M.H., (2006) Surface Modified Magnetite Nanoparticles for Hyperthermia: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies, *Current Appl. Phys.* 6S1, p.242-246
- Klabunde K. J., ed., (2001) *Nanoscale Materials in Chemistry*, John Willy & Sons, New York
- Kumar M., R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A.J. Domb, (2004) Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives, *Chemical Reviews* 104, p.6017–6084.
- Kuno M., Oku T., Suganuma K., (2001) Encapsulation of Cobalt Oxide Nanoparticles and Ar in Boron Nitride Nanocapsules, *Scr. Mater.* 44, p.1583-1586.
- LaConte L.E.W., Nitin N., Zurkiya O., Caruntu D., O'Connor C.J., Hu H.P., Bao G., (2007) Coating Thickness of Magnetic iron Oxide Nanoparticles Affects R-2 Relaxivity, *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 26, p.1634–1641.
- Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L.V., Muller R.N., (2008) Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications, *Chemical Reviews* 108(6), p.2064–2110
- Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, (2000) Tat Peptide-derivatized Magnetic Nanoparticles Allow in vivo Tracking and Recovery of Progenitor Cells. *Nature Biotechnology* 18, p. 410–414



- Li L., Mak K.Y., Leung C.W., Chan K.Y., Chan W.K., Zhong W, Pong P.W.T., (2013) Effect of Synthesis Conditions on the Properties of Citric-Acid Coated Iron Oxide Nanoparticles, *Microelectronic Engineering* 110 , p.329–334
- Lima E., Torres T.E., Rossi L.M., Rechenberg H.R., Berquo T.S., Ibarra A., Marquina C., Ibarra M.R., Goya G.F., (2013) Size Dependence of The Magnetic Relaxation and Specific Power Absorption in Iron Oxide Nanoparticles, *J Nanopart Res* 15, p.1654-166
- Liu H.M., Hsiao J.K., (2012) Magnetic Nanoparticles: Its Effect on Cellular Behaviour and Potential Applications, *Smart Nanoparticles Technology*, Dr. Abbass Hashim (Ed.), ISBN: 978-953-51-0500-8, InTech
- Liu Z., Cai W.B., He L.N., Nakayama N., Chen K., Sun X.M., Chen X.Y., Dai H.J., (2007) In Vivo Biodistribution and Highly Efficient Tumour Targeting of Carbon Nanotubes in Mice, *Nature Nanotechnology* 2, p.47–52
- Leslie-Pelecky, D.L., Rieke, R. D., (1996) Magnetic Properties of Nanostructured Materials. *Chem. Mater.* (8), p. 1770-1783
- Lodhia J., Mandarano G., Ferris N.J., Cowell P Eu SF, (2010) Development and Use of Iron Oxide Nanoparticles (Part 1): Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles for MRI, *Biomed Imaging Interv J* 6(2):e12
- Lohrke J, Briel A, Mäder K., (2008) Characterization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles by Asymmetrical Flow-Field-Flow-Fractionation, *Nanomedicine (Lond)*. 3(4), p.437-52
- Maehara T., Konishi K., Kamimori T., Aono H., Hirazawa H., Naohara T., Nomura S., Kikkawa H., Watanabe Y., Kawachi K., (2005) Selection of Ferrite Powder for Thermal Coagulation Therapy with Alternating Magnetic Field, *J. of Material Science* 40, p.135-138
- Mamula Tartalja D., Konstantinović Lj., Ivanović N., Randelović Ćirić V., Andrić V., Jovanović U., Vulićević Lj., (2012) In Vivo and In Vitro Investigations of Iron Oxides Nanopowders Influences on Blood, *Advanced Science Letters* 17, p.179-183
- Mamula-TartaljaD., Vulićević LJ., Radisavljević I., Mitrić M., Andrić V., Kuzmanović B., Medić M., Ivanović N., (2014a) Effects of Manufacturing Conditions and Heating on Properties of Electrochemically Produced Magnetite Nano-Powders, *Ceramics International* 40, p.3517–3525
- Mamula Tartalja D., Srećković M., Survey of Approaches for Morphological, Optical, and Transport Characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles, (2014b) *Physica Scripta* (rad primljen za štampu)
- Mandarano G., Lodhia J., Eu P., Ferris N.J., Davidson R., CowellS.F., (2010) Development and Use of Iron Oxide Nanoparticles (Part 2):The Application of Iron Oxide Contrast Agents in MRI *Biomed Imaging Interv J* 6(2):e13 6
- Marinković K., (2009) *Strukturne, morfološke i funkcionalne karakteristike nanostrukturnih oksida retkih zemalja dobijenih aerosol sintezom*, magistarska teza, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu
- Marques R.F.C., Garcia C., Lecante P., Ribeiro J.L., Noe L., Silva N.J.O., Amaral V.S., Millan A., Verelst M., (2008) Electro-Precipitation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles in Ethanol, *J. Magn. Mater.* 320, p. 2311–2315.
- Mason T.J., Lorimal J.P., (2002) *Applied Sonochemistry*, ISBN-10: 3527302050 | ISBN-13: 978-3527302055 | Edition: 1, Wiley, New York

- McBain S.C., Yiu H.H.P., Dobson J., (2008) Magnetic Nanoparticles for Gene and Drug Delivery, *Int J Nanomedicine* 3(2), p.169–180
- McBain S.C., Griesenbach U., Xenariou S., Keramane A., Batich C.D., Alton E., Dobson J., (2008) Magnetic Nanoparticles as Gene Delivery Agents: Enhanced Transfection in the Presence of Oscillating Magnet Arrays, *Nanotechnology* 19(40) pp ISSN:0957-4484
- McBain SC, Yiu HHP, El Haj A, Dobson J., (2007) Polyethyleneimine Functionalized Iron Oxide Nanoparticles as Agents for DNA Delivery and Transfection. *Journal of Materials Chemistry* 17, p.2561–2565
- Mehlhorn A., Utchiyama K., Schmal H., Petri-Fink A., Hofmann H., Südkamp N., (2006) Biocompatibility of Super-Paramagnetic Nanoparticles and its Effect on the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells, *Joint German Congress of Orthopaedics and Trauma Surgery*, Berlin
- Merbach A.E., Tóth E., (2001) The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, UK: Wiley, Chichester
- Mocan T., (2013) Hemolysis as Expression of Nanoparticles-Induced Cytotoxicity in Red Blood Cells, *Biotechnology, Molecular Biology And Nanomedicine* 1(1), p.7-12
- Molday R.S., MacKenzie D., (1982) Immunospecific Ferromagnetic Iron-Dextran Reagents for the Labeling and Magnetic Separation of Cells, *Journal of Immunological Methods* 52, p.353–367.
- Morales M.P., Bomati-Miguel O., Perez de Alejo R., Ruiz-Cabello J., Veintemillas-Vendaguer S., Ogrady K., (2003) Contrast Agents for MRI Based on Iron Oxide Nanoparticles Prepared by Laser Pyrolysis, *J. Magn. Mater.* 266(1-2), p.102-109
- Mornet S., Portier J., Duguet E., A Method For Synthesis And Functionalization of Ultrasmall Superparamagnetic Covalent Carriers Based on Maghemite and Dextran, (2005) *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293, p.127–134
- Mornet S., Vasseur S., Grasset F., Duguet E., (2004) Magnetic Nanoparticle Design for Medical Diagnosis and Therapy, *J.Mater.Chem* 14, p. 2161–2175
- Moersdorf D., Hugounenq P., Phuoc L.T., Mamlouk-Chaouachi H., Felder-Flesch D., Begin-Colin S., Pourroy G., I.Bernhardt, (2010) Influence of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles on Red Blood Cells and Caco-2 Cells, *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1, p.439-443
- Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C., (2001) Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice, *Pharmacol Rev* 53(2), p.283–318
- Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Müller E, Meier T, Wilmanns W, Issels R. (1995) A Stress-Inducible 72 kDa Heat Shock Protein is Expressed on the Cell Surface of Human Tumor Cells but not on Normal Cells, *Int J Cancer* 61, p.272–279
- Nacev A., Beni C., Bruno O., Shapiro B., (2011) The Behaviors of Ferro-Magnetic Nanoparticles in and Around Blood Vessels under Applied Magnetic Fields, *J Magn Mater.* 323(6), p.651–668
- Nădejde C., Creangă D.E., Goiceanu C., (2009) Radiofrequency Electromagnetic Wave And Paramagnetic Particle Effects On The Red Blood Cells, *Rom. Journ. Phys.*54(1–2), p.105–114
- Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J., (2003) Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, p.167–181

- Park J, An K, Hwang Y, Park J-G, Noh H-J, Kim J-Y, Park J-H, Hwang N-M, Hyeon T., (2004) Ultra-Large-Scale Syntheses of Monodisperse Nanocrystals, *Nat. Mater.* 3, p.891–895
- Pascal C., Pascal J.L., Favier F., Elidrissi Moubtassim M.L., Payen C., (1999) Electrochemical Synthesis for the Control of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. *Chem. Mater.* 11, p. 141-147.
- Pitkethly M.J., 2003. Nanoparticles as Building Blocks. *Nanotoday*, :36–42,
- Răcuciu M., Creangă D.E., Airinei A., (2006) Citric-Acid-Coated Magnetite Nanoparticles for Biological Applications, *The European Physical Journal E* 21(2), p.117-121
- Răcuciu M., Creangă D.E., Airinei A., Chicea D., Bădescu V., (2010) Synthesis and Properties of Magnetic Nanoparticles Coated with Biocompatible Compounds, *Materials Science-Poland* 28(3), p.609-616
- Raković D. i grupa autora, (2010) *Biomaterijali*, ISBN 978-86-80321-23-3, Institut Tehničkih Nauka Srpske Akademije Nauka i Umetnosti i Društvo za Istraživanje Materijala Srbije, Beograd
- Rahisuddin R., Pramod K. Sharma, Mohd Salim, And Garima Garg, Application of Ferrofluid: As A Targeted Drug Delivery System in Nanotechnology, (2010) *Int. J. of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 5(3), Article-020
- Roberts TPL, Chuang N, Roberts HC, Neuroimaging, (2000) Do We Really Need New Contrast Agents for MRI, *Eur. J. Radiol.* 34, p.166-178
- Roohi F., Lohrke J., Ide A., Schütz G., Dassler K., (2012) Studying the Effect of Particle Size and Coating Type on the Blood Kinetics of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine* 7, p.4447–4458
- Saebo K.B., (2004) *Degradation, Metabolism and Relaxation Properties of Iron Oxide Particles for MRI*, PhD thesis Acta Universitatis, Uppsala
- Singh K., Mishra A., Water Soluble, (2013) Chitosan Nanoparticle for the Effective Delivery of Lipophilic Drugs: A Review, *Int J App Pharm* 5(3), p.1-6
- Shinkai M., Yanase M., Suzuki M., Honda H., Wakabayashi T., Yoshida J., Kobayashi T., Intracellular Hyperthermia for Cancer Using Magnetite Cationic Liposomes, (1999) *J. Magn. Magn. Mater.* 194, p.176-184
- Sletter K.D., (2011) *Handbook of Nanophysics: Nanomedicine and Nanorobotics*, CRC Press
- Schlorf T., Meincke M., Kossel E., Glüer C.C., Jansen O., Mentlein R., (2011) Biological Properties of Iron Oxide Nanoparticles for Cellular and Molecular Magnetic Resonance Imaging, *Int. J. Mol. Sci.* 12, p.12-23
- Soler M.A.G., Bão S.N., Alcântara G.B., Tibúrcio V.H. S., Paludo G. R., J.F. Santana B., Guedes M.H., Lima E.C.D., Lacava Z.G.M., Morais P.C., (2007) Interaction of Erythrocytes with Magnetic Nanoparticles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7, p.1069–1071
- Sreeja V., Joy P.A., (2007) Microwave-Hydrothermal Synthesis of Gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles and Their Magnetic Properties, *Mater. Res. Bull.* 42, p.1570-1582
- Srdić V.V., (2004) *Procesiranje novih keramičkih materijala*, doktorska teza, Tehnološki fakultet Univerzitet u Novom Sadu
- Stark D.D., Weissleder R., Elizondo G., Hahn P.F., Saini S., Todd L.E., Wittenberg J., Ferrucci J.T., (1988) Superparamagnetic Iron-Oxide - Clinical-Application as A Contrastagent Formrimagingof The Liver, *Radiology* 168, p.297–301

- Stojanović Z., (2009) magistarska teza, *Hidrotermalna sinteza nanostrukturnih oksidnih prahova i njihova karakterizacija*, Tehnološko metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu
- Sun Y.P., Li X.Q., Zhang W.X., Wang H.P. (2007) A Method for the Preparation of Stable Dispersion Of Zero-Valent Iron Nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 308, p. 60–66
- Sun X., Gutierrez A., Yacaman M.J., X Dong, S Jin, (2000) Investigations on Magnetic Properties and Structure for Carbon Encapsulated Nanoparticles of Fe, Co, Ni, *Materials Sci. and Eng, A* 286 (1), p.157-160.
- Sun Y., Ma M., Zhang Y., Gu N., (2004) Synthesis of Nanometer-Size Maghemite Particles From Magnetite Colloids and Surfaces A: *Physicochem. Eng. Aspects* 245, p.15-19
- Tartaj P., Morales M.P., Veintemillas-Verdaguer S., Gonzalez-Carreno T., Serna C.J., (2003) The Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, p.182–197.
- Thorek D. L. J., Chen A.K., Czupryna J., Tsourkas A., (2006) Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Probes for Molecular Imaging, *Annals of Biomedical Engineerin*, 34(1), p.23-38.
- Tsuzuki T., McCormick P.G., (2004) Mechanochemical Synthesis of Nanoparticles, *Mater. Sci.*39, p. 5143—5149.
- Varna M., Ratajczak P., Ferreira I., Leboeuf C., Bousquet G., Janin A., (2012) In Vivo Distribution of Inorganic Nanoparticles in Preclinical Models, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 3, p.269-279
- Veintemillas-Vendaguer S., Morales M.P., Bomati-Miguel O., Batista C., Zhao X., Bonville, P., Perez de Alejo, R., Ruiz-Cabello J., Santos M., Tendillo-Cortijo J., and Ferreiros J., (2004). Colloidal Dispersions of Maghemite Nanoparticles Produced by Laser Pyrolysis with Applications as NMR Contrast Agents. *J. Phys.*37, p.2054-2059.
- Veisheh O., Gunn J., Zhang M., Design and Fabrication of Magnetic Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and Imaging, (2010) *Adv Drug Deliv Rev.* 62(3), p.284–304
- Vijayakumar R, Koltypin Y., Felner I., Gedanken A., (2000) Sonochemical Synthesis and Characterisation of Pure Nanometer-sized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles, *Mater. Sci. Eng. A* 286, p.101-105
- Vuličević Lj., Ivanović N., Maričić A., Vučković A., Popović N., S.Vardić, (2006) Structural, Magnetic, And Electrical Characteristics Of Metastable Iron Oxide Nano-Sized Powders, *Materials Science Forum* 518, p.113-119
- Vuličević Lj., Ivanović N., Popović N., Kusigerski V., Srećković M., Tomić Ž., Vardić S., (2007) Reduction of Nanometric Magnetite Powder, *Materials Science Forum* 555, p.273-279
- Vuličević Lj., Ivanović N., Maričić A., Vučković A., Popović N., S.Vardić, (2007) Hydrothermal Treatment of Electrochemically Synthesised Nanocrystalline Iron Oxide Powder, *Science of Sintering* 39, p.85-91
- Vuličević Lj., Ivanović N., Popović N., Novaković M., Popović M., Mitrić M., Andrić V., Babić D. (2008) Investigation of Properties of Electrochemically Synthesised Iron Oxides Nano-Powders, *Journal of Microscopy* 232(3) p.629-633
- Wang YX., Hussain S.M., Krestin G.P., (2001) Superparamagnetic Iron Oxide Contrast Agents: Physicochemical Characteristics and Applications in MR Imaging., *Eur Radiol* 11, p. 2319–2331

- Wang Q., Pan D., Jiang S., Ji X., An L., Jiang B., (2006) A Solvothermal Route to Size- and Shape-Controlled CdSe and CdTe Nanocrystals, *Journal of Crystal Growth* 286(1), p.83-90.
- Weissleder R., Stark D.D., Engelstad B.L., Bacon B.R., Compton C.C., White D.L., Jacobs P., Lewis J., (1989) Superparamagnetic Iron-Oxide-Pharmacokinetics and Toxicity, *American Journal of Roentgenology* 152, p.167–173
- Weissleder R., Elizondo G., Wittenberg J., Lee A.S., Josephson L., Brady T.J., (1990) Ultrasmall Superparamagnetic Iron-Oxide - an Intravenous Contrast Agent For Assessing Lymph-Nodes with MR Imaging, *Radiology* 175, p.494–498.
- Wu W., He Q., Jiang C., (2008) Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies, *Nanoscale Res Lett* 3, p.397–415
- Zdujčić M.V., (2001) Mehanohemijski tretman neorganskih materijala, *Hem.ind* 55(5), p.191-206
- Zhang Z., Qiang Z., Li-na X., Yi-ben X., (2007) Preparation of Nanometer  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by an Electrochemical Method in Non-aqueous Medium and Reaction Dynamics. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry* 37, p.53–56
- Yang H.M., Park C.W., Lim S., Park S.I., Chung B.H., Kim J.D., (2011) Cross-linked Magnetic Nanoparticles from Poly(ethylene glycol) and Dodecyl Grafted Poly(succinimide) as Magnetic Resonance Probes, *Chem. Commun.* 47, p.12518-12520
- Qiao R., Yang C., Gao M., (2009) Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: from Preparatins to in vivo MRI Applications, *J. Mater. Chem.* 19, p.6274–6293

## **BIOGRAFIJA**

Mr Danica Mamula Tartalja je rođena 1959. godine u Beogradu, gde se i školovala. Maturirala u Prvoj beogradskoj gimnaziji. Diplomirala na Elektrotehničkom fakultetu u Beogradu, na odseku Tehnička fizika, smer Biomedicinska elektronika. Magistarirala na istom fakultetu, smer Primenjena nuklearna fizika, 1990. godine. Od oktobra 1987. godine do danas radi, najpre u zvanju asistenta, a zatim predavača i višeg predavača na Visokoj školi za informacione i komunikacione tehnologije. Kao asistent držala je vežbe iz predmeta Osnovi elektrotehnike i Fizika, na smerovima Telekomunikacije i PTT saobraćaj, do 1991. godine. U toku školske 1987/88 godine držala je vežbe iz Fizike na Višoj elektrotehničkoj školi u Beogradu. Od 1995. godine radila je u zvanju višeg predavača. Predavala je sledeće predmete: Fizika, Elektrotehnika, Električna kola, Baze podataka, Medicinska instrumentacija 1 i 2, Dozimetrija i zaštita od zračenja. U periodu od 2005. do 2012. godine bila je šef studijskog programa Medicinska informatika. Od 2009. godine obavlja funkciju predsednika Saveta Škole.

Do sada je objavila 52 naučna rada:

poglavlje u monografiji (1)

objavljeni u međunarodnim časopisima (3)

objavljeni u zbornicima međunarodnih konferencija (11)

objavljeni u zbornicima domaćih konferencija (30)

referisani na poster sekcijama međunarodnih konferencija (5)

referisani na poster sekcijama domaćih konferencija (2)

Koautor je dve zbirke zadataka.

Učestvovala je na dva naučna projekta nadležnog Ministarstva (Projekat republičkog fonda nauke Srbije "Mikroelektronika", 1988., i inovacioni projekat: "Proizvodnja nanoprahova oksida gvožđa pogodnih za primene u medicini", evidencioni broj 451-01-00065/2008-01/70).

U užoj oblasti teze mr Danica Mamula Tartalja objavila je kao prvi autor tri koautorska rada u međunarodnim časopisima (sa impakt faktorom): dva u kategoriji M21 i jedan u kategoriji M23 (prihvaćen za štampu). Takođe, bila je prvi autor dva koautorska rada iz uže oblasti teze, prezentovana na međunarodnim konferencijama.

Izradi doktorske disertacije je prethodio rad na projektu Ministarstva nauke Republike Srbije sa nazivom „Proizvodnja nanoprahova oksida gvožđa pogodnih za primenu u medicini“, 2008. i 2009. godine, pod rukovodstvom dr Nenada Ivanovića, naučnog savetnika. Deo rezultata do kojih je došla na ovom projektu opisan je i obrazložen u doktorskoj disertaciji.

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписана Даница Мамула Тартаља

број индекса \_\_\_\_\_

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

**Оптичке и транспортне особине нанопрахова на бази оксида гвожђа**

---

---

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Даница Мамула Тартаља

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада Оптичке и транспортне особине нанопрахова на бази оксида гвожђа

Ментор др Витомир Милановић, професор емеритус

Потписани Даница Мамула Тартаља

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Оптичке и транспортне особине нанопрахова на бази оксида гвожђа

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_