

UNIVERZITET U NOVOM SADU PRIRODNO–MATEMATIČKI FAKULTET DEPARTMAN ZA FIZIKU



Karakterizacija magnetnih nanočestica na bazi oksida gvožđa i ugljeničnih nanocevi dopiranih metalnim nanočesticama kao potencijalnih materijala za biomedicinsku primenu

- Master rad -

Mentori: Prof. dr Svetlana Lukić-Petrović dr Monika Jażdżewska Kandidat: Šarolta Cako

r Monika Jażdżewska

Novi Sad, 2019.

Veliku zahvalnost dugujem dr Svetlani Lukić-Petrović, redovnom profesoru Prirodnomatematičkog fakulteta, mentoru ovog rada na svesrdnoj pomoći ne samo tokom izrade master rada već tokom celokupnog studiranja.

Iskreno se zahvaljujem dr Moniki Jażdżewska, sa Fakulteta za Fiziku, Univerziteta "Adam Mickjevič", koja je prihvatila da bude mentor ovog rada, na ukazanom poverenju, korisnim savetima, posvećenosti i prenesenom znanju.

Zahvaljujem se dr Artemu Kozlovskiy-u na ustupljenim uzorcima, kao i dr Vladimiru Pavloviću, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu i saradnicima Objedinjenog Instituta za Nuklearna

Istraživanja (JINR), NanoBioMedical Centre, Fakulteta za Fiziku Univerziteta "Adam Mickjevič", Nacionalnog istraživačkog instituta – Instituta za zaštitu bilja u Poznanju, Fakulteta

za Fiziku Univerziteta Marija Kiri Sklodovska u Lublinu i Fakulteta za Biologiju i Zaštitu Životne Sredine Univerziteta u Lođu koji su omogućili realizaciju eksperimentalnog dela rada. Veliku zahvalnost dugujem dr Miodragu Krmaru, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta i dr Doroti Chudoba iz Frankove Laboratorije za Neutronsku Fiziku (FLNP, JINR), koji su otvorili put ovoj saradnji.

Ipak, najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici i prijateljima, pre svega Aleksandru na beskrajnoj podršci i strpljenju.

Šarolta Cako

Sadržaj

1	Uv	vod	1
2	Ma	agnetni nanomaterijali	3
	2.1	Tipovi magnetnih nanomaterijala	4
	2.2	Magnetne osobine	5
	2.2	2.1 Jednodomenske čestice	9
	2.2	2.2 Superparamagnetizam	10
	2.2	2.3 Magnetna anizotropija	10
	2.2	2.4 Anizotropija oblika	10
3	Pri	imena magnetnih nanočestica	12
	3.1	Magnetna rezonantna tomografija	13
	3.2	Kontrolisana dostava lekova	14
	3.3	Magnetna hipertermija	16
4	Ek	sperimentalne tehnike korišćene u radu	18
	4.1	Difrakcija X-zraka	18
	4.1	1.1 Bragov zakon	18
	4.1	1.2 Difrakcija na kristalnom prahu	19
	4.2	Mikroskopske tehnike	21
	4.2	2.1 Skenirajući elektronski mikroskop	21
	4.2	2.2 Mikroskop atomskih sila	23
	4.2	2.3 Transmisioni elektronski mikroskop	
	4.3	Spektroskopske tehnike	28
	4.3	3.1 Ramanova spektroskopija	28
	4.3	3.2 Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija	29
	4.3	3.3 Mezbauerova spektroskopija	31
	4.4	MTT test - određivanje ćelijskog preživljavanja	
5 Rezultati i diskusija			
	5.1	Analiza strukture i morfologije uzoraka	

	5.2	Magnetne osobine ispitivanih uzoraka	48			
	5.3	Određivanje citotoksičnosti cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa na				
	metab	oličkim aktivnostima HeLa ćelija	54			
6	Zak	ljučak	55			
7	Lite	eratura	56			
Pr	Prilog					

Biografija

1 Uvod

U poslednjih nekoliko godina, obrada, struktura i svojstva materijala sa veličinom zrna u opsegu od nekoliko nanometara do nekoliko stotina nanometara su oblasti istraživanja od velikog značaja. Ovi materijali se nazivaju nanostrukturnim materijalima ili nanomaterijalima i definišu se kao materijali koji poseduju jednu ili više strukturnih ili sastavnih komponenti nanometarskih dimenzija (1-100 nm) [1, 2].

Nanomaterijali su našli primenu kako u biomedicini, farmaciji, kozmetici, tako i u elektronici. Posebno mesto u biomedicini pripada magnetnim nanomaterijalima, zbog njihove potencijalne primene u terapiji i dijagnostici. Danas se magnetni nanomaterijali koriste kao kontrastno sredstvo pri magnetnoj rezonanci [3], a u toku su brojna istraživanja za njihovu primenu u terapiji tumora. Potencijalna terapijska metoda je magnetna hipertermija, koja koristi toplotu za uništenje tumornih ćelija [4]. Druga realizacija primene magnetnih nanomaterijala u terapiji je kontrolisana dostava medikamenta [5].

Pored biomedicinske primene, magnetni nanomaterijali se mogu koristiti i u sistemima za snimanje i čuvanje informacija, u novim stalnim magnetima, u magnetnim sistemima za hlađenje, kao magnetni senzori, itd [3]. Sve ovo objašnjava interes naučnika iz različitih oblasti za ove sisteme.

Cilj ovog rada je karakterizacija nanomaterijala različitih oblika (0D i 1D) u svrhu nalaženje takvih, koji po svojim osobinama mogu biti potencijalni materijali za biomedicinsku primenu, pre svega za kontrolisanu dostavu medikamenta. Organizacija master rada po poglavljama je prikazana u daljem tekstu.

U drugom poglavlju je dat pregled nanomaterijala, navedeni su tipovi magnetnih nanomaterijala i opisane su njihove karakteristične magnetne osobine, pri čemu je naglasena razlika između ponašanja čestica nano veličine i balk analoga. Treće poglavlje je posvećeno mogućnostima primene magnetnih nanočestica u biomedicini. U četvrtom poglavlju su nabrojane eksperimentalne metode koje su korisćene u radu, kao i princip rada odgovarajućih uređaja za ispitivanje uzoraka. U petom poglavlju je opisana metoda sinteze pojedinačnih uzoraka koji su predmet istrazivanja ove teze i u tom poglavlju se nalaze rezultati eksperimenata. Difrakcija X-zraka je izvršena u Objedinjenom Institutu za Nuklearna Istraživanja (JINR, Dubna, Rusija), SEM/EDS merenja su urađena na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu, AFM merenja i EPR

spektroskopija su realizovani na Fakultetu za Fiziku Univerziteta "Adam Mickjevič" (Poznanj, Poljska), TEM slike su snimljene u "NanoBioMedical Centre" na istom univerzitetu, i u Nacionalnon istraživačkom institutu – Institut za zaštitu bilja u Poznanju, Ramanovi spektri su takođe snimljeni u "NanoBioMedical Centre", Mezbauerovi eksperimenti su izvršeni na Fakultetu za Fiziku Univerziteta Marija Kiri Sklodovska u Lublinu, a MTT test za određivanje citotoksičnosti je izveden na Fakultetu za Biologiju i Zaštitu Životne Sredine na Univerzitetu u Lođu (Lođ, Poljska).

Strukturna karakteristika uzoraka je izvršena rendgenskom difrakcijom, morfološke i topografske informacije su dobijene pomoću različitih mikroskopskih tehnika, a energodisperzivna spektroskopija X-zracima je korišćena za elementarnu analizu uzoraka. Pomoću Ramanove spektroskopije su potvrđeni rezultati dobijeni difrakcijom X-zraka i dopunjeni detaljima koje daje ova tehnika. Za ispitivanje magnetnih osobina je korišćena elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija, a na osnovu dobijenih rezultata, izabrani su uzorci čije je magnetno ponašanje bilo detaljnije analizirano Mezbauerovom spektroskopijom. Za određivanje citotoksičnosni na metaboličke aktivnosti HeLa ćelija je korišćen MTT test. U poslednjoj poglavlji je dat zaključak i ukazano je na mogućnostima daljeg istraživanja.

2 Magnetni nanomaterijali

Nanomaterijali su fizički objekti koji se značajno razlikuju po svojstvima od odgovarajućeg balk materijala i imaju najmanje jednu nanometarsku dimenziju (ne više od 100 nm) [3]. Klasifikacija ovih materijala se najčešće vrši po broju dimenzije strukture (D) koje su van naometarskog opsega [2, 6]:

- 1) 0D nanomaterijali: nemaju nijednu dimenziju strukture dužine veću od 100 nm; predstavnici 0D nanomaterijala su nanočestice, nanopore, nanoklastere i nanosfere (Slika 2.1 a));
- 1D nanomaterijali: imaju jednu dimenziju strukture veličine veće od 100 nm; ovoj klasi pripadaju nanotube, nanošipke i nanovlakna/nanožice (Slika 2.1 b));
- 2D nanomaterijali: poseduju dve dimenzije stukture veličine izvan nanometarskog opsega (>100 nm); nanofilmovi, nanoprevlake/nanoslojevi i nanomreže spadaju u klasu 2D nanomaterijala (Slika 2.1 c));
- 3D nanomaterijali: sve tri dimenzije veličine veće od 100 nm; ovi materijali u sebi sadrže neke od 0D, 1D ili 2D nanokomponenti (Slika 2.1 d)).



Slika 2.1 a) 0D nanomaterijali, b) 1D nanomaterijali, c) 2D nanomaterijali, d) 3D nanomaterijali [2, 6]

Nanomaterijali čine most između atoma ili molekula i balk sistema. Njihove fizičke i hemijske osobine se mogu značajno razlikovati od osobine balk analoga. Ove razlike se odnose na strukturu i oblik materijala, fazne promene, hemijsku reaktivnost i katalitičke osobine materijala i posledica su površinskog efekta i efekta veličine [7, 8, 9]. Površinski efekat, tj. povećanje ukupne površinske energije je rezultat toga što broj atoma u površinskom sloju postaje veći u odnosu na broj atoma u unutrašnjosti materijala. Na taj način dolazi do povećanje hemijske reaktivnosti materijala. Kada neka od dimenzija u materijalu dostigne vrednost jednaku ili približnu skali dužina fizičkih fenomena (npr. slobodnoj dužini putanje elektrona ili fonona), javlja se efekat veličine i dolazi do promena u svojstvima materijala [2].

Usled tih efekata menjaju se i magnetne osobine materijala. Pokazano je da magnetizacija (po atomu) i magnetna anizotropija nanomaterijala mogu biti mnogo veće nego kod balk analoga. Razlike u Kirijevim¹ (T_C) i Nelovim² (T_N) temperaturama između nanočestica i odgovarajućih mikroskopskih faza dostižu stotine stepeni. Pored toga, ustanovljeno je da magnetni nanomaterijali poseduju brojne neobične osobine – gigantsku magnetnu otpornost, abnormalno visok magnetokalorični efekat, itd. [3]. Osobine magnetnih nanomaterijala su opisane u poglavlju 2.2.

2.1 Tipovi magnetnih nanomaterijala

Magnetni nanomaterijali se mogu podeliti na magnetne nanosfere, magnetne nanožice i nanošipke, magnetne nanotube i magnetne tanke filmove [5]. Magnetne nanočestice i nanocevi su predmet istraživanja ovog rada i biće opisane detaljnije u daljem tekstu.

Tipični feromagnetni elementi koji se koriste za sintezu magnetnih nanomaterijala su Fe, Co i Ni [10]. Magnetne nanosfere koje se najčešće primenjuju u biomedicini su čestice oksida gvožđa, obično u obliku čestice magnetita (Fe₃O₄) ili maghemita (γ -Fe₂O₃). Da bi se ove čestice mogle koristiti u biomedicini, u većini slučajeva je potrebno da budu suspendovane u nosećoj tečnosti. Pored toga je potrebno da obavljaju određene biomedicinske funkcije. Postoje multifunkcionalne nanosfere koje se mogu realizovati, na primer, funkcionalizacijom magnetnih nanosfera sa različitim funkcionalnim grupama. Multifunkcionalnost se može postići i korisćenjem višekomponentnih nanomaterijala kao što su tzv. core-shell ("jezgro-ljuska" ili

¹ Pierre Curie (1859-1906) – francuski fizičar

² Louis Eugène Félix Néel (1904-2000) – francuski fizičar

prekriveni) nanomaterijali [11]. Jezgro ovih materijala je metal ili oksidi metala, a prekrivač tj. premaz, je neorganski ili polimerni materijal koji štiti jezgro i čini česticu stabilnim i biokompatibilnim [12].

Iako se trenutno u biomedicini najčešće primenjuju magnetne nanosfere, alternativni tipovi nanomaterijala su nanožice, nanošipke i nanocevi su koji imaju značajan potencijal, zahvaljujući njihovoj izduženoj strukturi. Posledica takve strukture je hemijska, električna, magnetna i optička anizotropija, koja može dati prednost u njihovoj primeni u odnosu na sferične nanočestice [13, 14]. Obično su magnetne nanožice i nanošipke dužine do oko 100 μm i prečnika od 5 do 500 nm [5]. Magnetne nanocevi se mogu podeliti u tri grupe:

 nemagnetne nanocevi čije je unutrašnjost ispunjena magnetnim nanomaterijalima (u suštini ovaj tip magnetnih nanocevi se može tretirati i kao magnetne nanožice obložene slojem nemagnetnog materijala);

- nemagnetne nanocevi čiji su zidovi deponovani magnetnim nanomaterijalima;
- nanocevi čija je celokupna struktura napravljena od magnetnih materijala [5].

Unutrašnja i spoljašnja površina nanocevi može biti funkcionalizovana za obavljanje različitih biomedicinskih uloga, a unutrašnji prazni prostor se može koristiti za hvatanje, koncentraciju i oslobađanje bioloških entiteta [5].

2.2 Magnetne osobine

Magnetna svojstva i međusobno dejstvo atoma, jona i molekula koji ulaze u sastav materijala određuju njegove magnetne osobine. Poznavanje ovih karakteristika je od velike važnosti kako za primenu materijala tako i za interpretaciju elemenata strukture elektronskih stanja u kondenzovanim sistemima [8].

Na osnovu njihovih magnetnih osobina, materijali se mogu podeliti na "slabe" i "jake" magnetike. U prvu grupu spadaju: dijamagneti i paramagneti, dok drugu grupu čine: fero-, feri- i antiferomagneti (Slika 2.2).

Magnetizam potiče od magnetnih momenata elektrona koji čine atom i formiraju elektronsku strukturu molekula i kristala [15, 16]. Ukoliko su magnetni momenti svih elektrona orijentisani tako da se međusobno poništavaju, atom kao celina ima nulti magnetni moment i takvo stanje dovodi do pojave dijamagnetizma [17]. Iako je dijamagnetizam osobina svih materijala, ne

dolazi uvek do izražaja [8]. Rezultujući magnetni moment, dijamagnetnih i paramagnetnih materijala je nula u odsustvu spoljašnjeg magnetnog polja nezavisno od temperature (Slika 2.2 a) i b)) [16].



Slika 2.2 Ilustracija orijentacije magnetnih momenata/domena kod različitih klasa materijala (a-e), kako u prisustvu tako i u odsustvu primenjenog polja [8, 18, 19]

Voluminozni feromagnetni uzorak se sastoji od više malih oblasti, tzv. domena, kao što je prikazano na Slici 2.3. Svaka od ovih oblasti je spontano namagnetisana do saturacije. U odsustvu spoljašnjeg polja, magnetni momenti pojedinih domena su haotično orijentisani i ukupna magnetizacija je jednaka nuli (Slika 2.2 c)). Feromagnetizam se javlja samo do tzv. Kirijeve temperature (T_c). Iznad te kritične vrednosti feromagnetik se ponaša kao paramagnetik [8].



Slika 2.3 Šematski prikaz domena u a) polikristalnom i b) monokristalnom uzorku [16]

Stukturu ferimagnetnih i antiferomagnetnih materijala najčešće karakteriše postojanje dve magnetne podrešetke. Magnetni momenti atoma unutar jedne podrešetke su paralelno (feromagnetno) orijentisani, dok su magnetni momenti atoma dve različite podrešetke orijentisani antiparalelno. Pošto je kod antiferomagnetika intenzitet magnetnih momenata koji pripadaju različitim podrešetkama isti (Slika 2.2 d)), ukupna magnetizacija ovih materijala je nula. Nasuprot tome, magnetizacija različitih podrešetki ferimagnetika je različita (Slika 2.2 e)) i kod njih se javlja nenulta spontana magnetizacija. Kod antiferomagnetnika se uvodi magnetizacija podrešetke kao parametar uređenosti. Slično feromagnetnim materijalima, antiferomagnetici se ponašaju kao paramagnetici iznad određene tzv. Nelove temperature (T_N) [20]. Na toj temperaturi je parametar uređenosti jednak nuli.

Do sada je navedeno ponašanje materijala bez prisustva spoljašnjeg magnetnog polja. Ukoliko se dijamagnetik nalazi u spoljašnjem magnetnom polju, u njemu se indukuju magnetni momenti suprotno orijentisani od polja (Slika 2.2 a)) i ukupna magnetizacija ostaje nula [20]. Kod paramagnetnih materijala u prisustvu spoljašnjeg polja dolazi do usmeravanje magnetnih dipola, usled čega se javlja odgovarajuća rezultantna u pravcu polja (Slika 2.2 b)) [8]. Kada se feromagnetik unese u spoljašnje magnetno polje, dolazi do postepene preorijentacije svih oblasti jednake magnetizacije u pravcu spoljašnjeg polja [8]. Granice između ovih oblasti se nazivaju zidovima domena. U njima magnetizacija postepeno menja smer i zato se mogu smatrati kao prelazni slojevi između susednih domena sa različitom orijentacijom magnetnih momenata [16]. Ferimagnetici i antiferomagnetici imaju nenultu rezultantnu magnetizaciju kada se nalaze u spoljašnjem magnetnom polju (Slika 2.2 d) i e)) [20].

Magnetizacija, po definiciji, predstavlja magnetni moment jedinične zapremine i koristi se za iskazivanje ponašanja magnetika u primenjenom spoljašnjem magnetnom polju [8]. Zavisnost magnetizacije od primenjenog polja za različite vrste materijala je prikazana na Slici 2.4. Kao što se može videti, kod feromagnetnih materijala sa povećanjem jačine magnetnog polja iznad određene vrednosti, magnetizacija više ne raste, tj. dostignuta je magnetna saturacija (M_s). Smanjenjem jačine spoljašnjeg polja do nule, materijal i dalje ima rezidualni magnetni moment. Vrednost magnetizacije pri nultom polju se naziva remanentna (zaostala) magnetizacija (M_r). Jačina polja koja je potrebna za razmagnetisavanje materijala, tj. da magnetizacija opadne na nulu, naziva se koercitivno polje (H_c). To polje je suprotnog smera od primarno primenjenog polja [5].



Slika 2.4 Zavisnost magnetizacije od primenjenog polja za različite materijale [12]

Magnetna svojstva nanočestica određuje više faktora, od kojih su ključni hemijski sastav, tip i stepen defektnosti kristalne rešetke, veličina i oblik čestica, morfologija, interakcija čestica sa okolnom matricom i susednim česticama. Promenom veličine, oblika, sastava i strukture nanočestica, može se do određene mere kontrolisati magnetne karakteristike materijala koji se sastoji od njih [3].

2.2.1 Jednodomenske čestice

Balk materijali imaju multidomensku strukturu. Međutim, smanjenjem veličine čestica materijala broj magnetnih domena opada [10]. Kada veličina čestica dostiže kritičnu vrednost, formiranje domenskih zidova postaje energetski nepovoljno. To znači da čestice prečnika manjeg od kritičnog (D_c), nemaju domenske zidove i takve čestice se nazivaju jednodomenskim česticama [5]. Vrednosti D_c za nekoliko magnetnih materijala sfernog oblika su prikazani u Tabeli 2.1.

Materijal	D _c (nm)
Со	70
Fe	14
Ni	55
Fe ₃ O ₄	128
γ -Fe ₂ O ₃	166

Tabela 2.1 Kritični prečnik jednodomenskih sfernih čestica [5, 21]

Čestice veličine blizu D_c imaju visoku koercitivnost (Slika 2.5). Smanjenjem dimenzija materijala ispod jednodomenske granice, površinski atomi i temperatura počinju drastično da utiču na magnetno ponašanje materijala i takav jednodomenski materijal se naziva superparamagnet [10].



Slika 2.5 Zavisnost koercitivnosti od veličine čestica u sistemima ultrafinih čestica [5, 21]

2.2.2 Superparamagnetizam

Superparamagnetizam je vrsta magnetizma koja se javlja u materijalima sa česticama prečnika manjeg od kritičnog D_c . Superparamagnetni materijali nemaju koercitivnost ni remanentnu megnetizaciju [10] i kriva magnetizacije ovih materijala je prikazana na Slici 2.4.

Osnovni mehanizam supermaramagnetizma se zasniva na vremenu relaksacije (τ) magnetizacije magnetne čestice [5, 22]:

$$\tau = \tau_0 \, e^{\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right)}$$

gde ΔE predstavlja energetsku barijeru za promenu magnetnog momenta, a k_BT je termalna energija. τ_0 slabo zavisi od temperature i ima vrednost 10⁻¹⁰-10⁻¹² s za neinteragujuće čestice [5].

Superparamagnetizam zavisi ne samo od temperature već i od vremena eksperimentalnog merenja τ_m [5, 23]. Ako magnetni moment čestice promeni pravac u vremenskim periodima kraćim od eksperimentalnih vremenskih skala ($\tau \ll \tau_m$), sistem je u superparamagnetnom stanju. Ako to nije slučaj, tj. ako je $\tau \gg \tau_m$, on je u takozvanom blokiranom stanju. Temperatura koja razdvaja ova dva režima je tzv. temperatura blokiranja (T_B) i ona zavisi od konstante anizotropije, veličine čestica, primenjenog magnetnog polja i vremena eksperimentalnog merenja [24].

2.2.3 Magnetna anizotropija

Magnetna anizotropija je pojam koji se odnosi na činjenici da magnetne osobine materijala u kristalnom stanju zavise od pravca u kom su mereni [17]. Dokazano je da je energetski povoljnije ukoliko je većina magnetnih momenata susednih atoma orijentisana isto u nekom pogodnom pravcu u kristalu [8]. Taj pravac se naziva osa lake magnetizacije [17].

Energija magnetne anizotropije po čestici (E), koja je odgovorna za održavanje magnetnih momenta duž određenog pravca, može se izraziti na sledeći način:

$$E = KV \sin^2 \theta$$

gde je K konstanta anizotropije, V zapremina čestice i θ je ugao između pravca magnetizacije i lake magnetizacije [5, 24].

2.2.4 Anizotropija oblika

Pored magnetne anizotropije je veoma značajna i anizotropija oblika, pogotovo kod magnetnih nanožica i nanocevi. Na magnetizaciju sfernog objekta ne utiče orijentacija polja kada

se on unosi u spoljašnje magnetno polje. Međutim, magnetizacija nesfernog objekta zavisi od orijentacije spoljašnjeg magnetnog polja. Poznato je da je lakše namagnetisati nesferični objekat kada se magnetno polje primeni duž njegove duže ose, nego duž kraće ose [5].

3 Primena magnetnih nanočestica

Magnetne nanočestice imaju potencijalnu primenu u zaštiti životne sredine, za skladištenje informacije i u biomedicini zahvaljujući njihovim jedinstvenim magnetnim osobinama, netoksičnošću i dobrom biokompatibilnošću [10].

U zaštiti životne sredine, magnetne nanočestice se mogu koristiti za prečišćavanje otpadnih voda, pri čemu je glavni cilj dezinfekcija, uklanjanje i razgradnja zagađivača. To je moguće postići magnetnom adsorpcijom i katalitičkom degradacijom pomoću magnetnih nanomaterijala. Pored toga, ovi materijali mnogo obećavaju u tehnologijama za analizu i praćenje procesa u zaštiti životne sredine kao senzori zagađivača [10].

Magnetne nanočestice su veoma značajne zbog njihove potencijalne primene u medicini za dijagnostiku i terapiju (Slika 3.1). Njihova prednost je što imaju veličinu manju od dimenzija ćelije (10-100 µm) i uporedivu sa veličinom virusa (20-450 nm), proteina (5-50 nm) ili gena (širine 2 nm i dužine 10-100 nm) [23]. Ovo poređenje veličina daje ideju za korišćenje nanočestica kao vrlo malih sondi za ispitivanje ćelija i organizma budući da, upravo zbog dimenzija, ne očekuje se bilo kakav uticaj [16].



Slika 3.1 Primena magnetnih nanomaterijala u biomedicini³ [12]

³ MRT – Magnetna Rezonantna Tomografija

Druga prednost magnetnih nanočestica je što se njima može upravljati gradijentom spoljašnjeg polja. Prodiranjem magnetnih polja u ljudsko tkivo, to "dejstvo na daljinu" omogućuje mnoge aplikacije uključujući transport i imobilizaciju magnetnih nanočestica ili magnetno obeleženih bioloških entiteta [16]. Zahvaljujući tome, magnetne nanočestice se mogu koristiti na primer kao kontrastno sredstvo pri magnetnoj rezonanci i za kontrolisanu dostavu lekova. Primenom spoljašnjeg magnetnog polja se može postići pretvaranje magnetne energije u toplotnu pomoću magnetnih nanočestica [25], što dozvoljava njihovu primenu u magnetnoj hipertermiji.

3.1 Magnetna rezonantna tomografija

Magnetna rezonantna tomografija (engl. *Magnetic Resonance Imaging – MRI*) je neinvazivna dijagnostička tehnika koja se koristi za dobijanje anatomskih i metaboličkih ili funkcionalnih informacija visoke prostorne i vremenske rezolucije. Pomoću ove tehnike se meri promena u magnetizaciji protona vodonika u molekulima vode, koji se nalaze u magnetnom polju, usled dejstva radiofrekventnog (RF) impulsa [26]. Kada se uklanja RF impuls protonski spinovi se vraćaju u svoje niskoenergetsko stanje i ta pojava se naziva relaksacijom [10, 27]. Relaksacija može biti longitudinalna (uzdužna) i transverzalna (poprečna). Ova dva procesa su individualna i njihovo vreme trajanja je veoma različito (longitudinalno vreme relaksacije – T1, transverzalno vreme relaksacije – T2), zavisno od hemijskog i fizičkog okruženja [13, 27]. Tkiva ljudskog tela sa različitim sadržajem protona i sastojcima imaju različita vremena relaksacije (i T1 i T2), što rezultira kontrastima u MR slikama. To je osnova razlikovanja potencijalne lezije od normalnog organa [13, 27]. Međutim, veoma je teško koristiti samo MRI za razlikovanje zdravog i obolelog tkiva i korišćenje kontrastnog sredstva je često neophodno u tom cilju [26].

Kao kontrastno sredstvo pri MRI se mogu koristiti nanočestice oksida gvožđa zahvaljujući njihovom biokompatibilnošću i dugom vremenu cirkulacije krvi [26, 28]. Najčešće se koriste superparamagnetne nanočestice oksida gvožđa (engl.Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle – SPION, veličine 50-500 nm [25]) i ultramale čestice oksida gvožđa (engl. Ultra-small Superparamagnetic Iron Oxide particles – USPIO particles, [25]), koje su manje od 50 nm [26]. Potrebno je da ove čestice budu obložene hemijski neutralnim materijalom da se spreči njihova reakcija sa telesnim tečnostima [29].

Pod dejstvom magnetnog polja MRI uređaja, magnetni nanomaterijali mogu da generišu lokalnu nehomogenost polja. Ovaj fenomen bi mogao da utiče na dipol-dipol interakcije protona, a samim tim i na proces relaksacije okolnih protona. Na primer, koordinacija vode sa magnetnim nanočesticama može da skrati vreme relaksacije T1 koje je povezano sa direktnom hemijskom razmenom između protonskih spinova. S druge strane, prisustvo nehomogenog lokalnog polja ubrzava relaksaciju T2 [10, 30].

Mogućnost ubrzavanje procesa relaksacije čine magnetne nanočestice korisnim kao kontrastna sredstva pri snimanju magnetnom rezonancom, jer kraće vreme relaksacije rezultuje boljim kontrastom na MRI slici [26].

3.2 Kontrolisana dostava lekova

Jedna od potencijalnih primena magnetnih nanomaterijala je kontrolisana dostava lekova. U tom cilju se mogu koristiti funkcionalizovane magnetne "core-shell" nanočestice koje sadrže lekove (kao što je na primer doksorubicin), za koje se očekuje da budu pušteni u maligne ćelije [5]. Najčešće se koriste superparamagnetne nanočestice koje se sastoje od jezgra oksida gvožđa koji je obložen organskim materijalima kao što su masne kiseline, polisaharidi ili polimeri. Ovi materijali poboljšavaju stabilnost čestica i sprečavaju razdvajanje čestica od nosača [31]. Uglavnom se primenjuju nanočestice magnetita i maghemita jer su one biokompatibilne [25].

Potrebno je naglasiti da za razliku od sfernih magnetnih nanočestica, magnetne nanocevi imaju unutrašnju i spoljašnju površinu za ugradnju i imobilizaciju lekova, respektivno. Pored toga, imaju sposobnost da poboljšaju biointerakciju između spoljne površine nanocevi i ciljnih bioloških vrsta. Iz tog razloga, korišćenje magnetnih nanocevi može povećati efikasnost ove metode [5].

Superparamagnetizam je potreban u kontrolisanoj dostavi lekova, jer kada se ukloni spoljašnje magnetno polje, magnetizacija nestaje zbog zanemarljivog remanentnog polja i koercitivnosti i na taj način se može izbeći aglomeracija i moguća embolizacija kapilara [12]. Biorazgradivnost ili netaknuto izlučivanje magnetnog jezgra je takođe jedan od ključnih zahteva. Jezgra koja nisu biorazgradiva oblažu se određenim materijalima i na taj način se može izbeći njihovo ispiranje [12].

Lek/nosač kompleksi se ubrizgavaju u cirkulatorni sistem pacijenta, obično u obliku biokompatibilnog ferofluida⁴ [23]. Nakon što je lek/nosač kompleks ušao u krvotok, primenjuje se spoljašnje magnetno polje visokog gradijenta za usmeravanje i koncentraciju kompleksa na ciljno područje unutar tela (Slika 3.2) [5, 23, 32]. Kada su ćelije tumora obuhvaćene lek/nosač kompleksom, kontrolisano oslobađanje leka se započinje enzimatskom aktivnošću ili promenom fizioloških uslova (kao što su, na primer, pH ili temperatura [23, 33]), što dovodi do povećanog unosa leka u tumorne ćelije na ciljnim mestima. Nakon tretmana, magnetne nanočestice se akumuliraju i metabolišu u organima kao što su slezina i jetra [5].



Slika 3.2 Šematski prikaz sistema za kontrolisanu dostavu lekova na bazi magnetnih nanočestica [23, 32]

Upotreba magnetnih nanočestica za kontrolisanu dostavu lekova ima značajne prednosti u odnosu na konvencionalnu hemoterapiju [5], kao što su:

- sposobnost ciljanja određenih lokacija u telu;
- smanjenje količine leka potrebne za postizanje određene koncentracije u blizini cilja;
- minimiziranje neželjenih dejstva na ne-ciljanim mestima [12, 34].

Navedene prednosti čine ovu metodu atraktivnom u terapiji tumora.

⁴ Stabilne disperzije magnetnih čestica u organskom ili vodenom nosaču [5]

3.3 Magnetna hipertermija

Upotreba toplote za ubijanje tumornih ćelija je pristup koji mnogo obećava u terapiji raka koji se može ostvariti putem hipertermije ili termičke ablacije [26]. Hipertermija se definiše kao zagrevanje tkiva na 42-46 °C [26, 35]. U tom temperaturnom opsegu dolazi do intra- i ekstracelularne degradacije, kao što je denaturacija⁵ ili presavijanje proteina, umrežavanje DNK i do inaktivacije ćelije, odnosno apoptoze⁶. Primenu ove metode u terapiji raka čini atraktivnim to što su na ovim temperaturama ćelije raka osetljivije od zdravih ćelija zbog svoje različite fiziologije, bržeg metabolizma i niske pH vrednosti [25, 36]. Zagrevanje tkiva iznad 46 °C se naziva termičkom ablacijom [25, 37] i ona direktno ubija ćelije indukujući nekrozu [25, 38].

Hipertermija se može indukovati, na primer, radiotalasima, mikrotalasima, ultrazvukom ili direktnim ubrizgavanjem vruće vode u tumor [10, 26, 39]. Međutim, ove metode nisu uspešne u lečenju raka zbog njihove nespecifičnosti, slabe sposobnosti ciljanja i zbog toga što zagrevaju i oštećuju okolna zdrava tkiva [26, 39]. U poređenju sa ovim metodama, regionalna hipertermija bazirana na magnetnim nanočesticama može biti od veće terapijske koristi i pružiti veću bezbednost, naročito za tumore dubokih tkiva [10].

Magnetni materijali imaju sposobnost za pretvaranje magnetne energije u toplotnu. Ta konverzija pomoću magnetnih nanočestica se odvija u skladu sa dva mehanizma: Braunova⁷ i Nelova relaksacija [25]. Ovi relaksacioni gubici se događaju u superparamagnetnim ili jednodomenskim magnetnim česticama, dok u multidomenskim magnetnim česticama gubici nastaju usled histereze i delom usled Braunove rotacije [5]. Nelova relaksacija je rotacija magnetnih momenata unutar čestice bez rotacije čestica, dok se Braunova relaksacija odnosi na rotaciju samih čestica u okolno okruženje [5, 25, 40]. Postoji vreme relaksacije koje odgovara svakom od ovih procesa. Braunovo vreme relaksacije (τ_B) je uglavnom određeno hidrodinamičkim svojstvima tečnosti u kojoj su dispergovane čestice, dok Nelovo vreme relaksacije (τ_N) zavisi od energije magnetne anizotropije superparamagnetnih čestica u odnosu na toplotnu energiju [23]. Pored toga, τ_B i τ_N zavise i od veličine čestica – za određenu veličinu čestica Braunova relaksacija se javlja na nižoj frekvenciji od Nelove relaksacije [5].

⁵ Promena strukture proteina pod uticajem nekih fizičkih i hemijskih agenasa

⁶ Programirana ćelijska smrt.

⁷ William Fuller Brown Jr. (1904–1983) – američki fizičar

Oblik magnetnih nanočestica je takođe važan faktor za njihovu primenu u hipertermiji, jer od toga zavisi njihova efikasnost zagrevanja u promenljivom magnetnom polju [25, 41]. Magnetne nanožice i nanocevi pokazuju veću efikasnost od sferičnih nanočestica zahvaljujući svom izduženom obliku [25, 42].

Pored toga, magnetne nanočestice za primenu u hipertermiji moraju biti biokompatibilne i netoksične za ćelije. Nanočestice oksida gvožđa, kao što su magnetitne i maghemitne nanočestice, zadovoljavaju ove zahteve i hemijski su stabilne u obliku core-shell nanočestica i zbog toga se najčešće oni primenjuju u magnetnoj hipertermiji [5].

Prednost magnetne hipertermije u odnosu na konvencionalne metode lečenje raka je što se radi o lokalizovanom fizičkom tretmanu i zbog toga ima manje neželjenih efekata. Ova metoda takođe može povećati efikasnost radioterapije i hemoterapije [26, 43, 44, 45]. Pored toga, razvijeni su i sistemi za kontrolisanu dostavu lekova na bazi hipertermije [25, 46].

4 Eksperimentalne tehnike korišćene u radu

4.1 Difrakcija X-zraka

4.1.1 Bragov zakon

Difrakcija X-zraka (engl. *X-ray diffraction – XRD*) je nedestruktivna analitička tehnika za karakterizaciju materijala. Pomoću ove tehnike se mogu dobiti informacije o sastavu i strukturi uzoraka [47, 48]. Za tumačenje eksperimentalnih rezultata koriste se modeli bazirani na specifičnostima pojedinih tehnika, kao i kristalnoj formi ispitivanog uzorka (kristalni prah, polikristal, monokristal).

Najjednostavniji model interakcije X-zračenja i kristalne rešetke proizilazi iz analogije razmatranja difrakcije monohromatske svetlosti na optičkoj rešeci, te nalaženja uslova pod kojima se zapaža pojava interferencije [8].

Na osnovu opštog teorijskog pristupa ovom fenomenu pokazano je da će rasejani zraci biti u fazi ukoliko su za dati upadni ugao zračenja zadovoljene tri Laueove⁸ jednačine. Međutim, u slučaju da se analizira difrakcija X-zraka na kristalnom prahu/polikristalu, kada je velika verovatnoća da svakako postoje familije ravni sa kojih će biti ostvarena difrakcija, pokazano je da je za određeni upadni ugao moguće na jednostavan način napisati jednačine konstruktivne interferencije [8].

Tako se dolazi do zaključka da se difrakcija i interferencija X-zraka na kristalnoj rešeci može formalno opisati kao ogledalska refleksija na familijama ravni [47].

Položaji refleksije se mogu dobiti pomoću putne razlike (δ) između dva reflektovana zraka sa susednih ravni [47, 49]:

$$\delta = 2d\sin\theta$$

gde je *d* međuravansko rastojanje, a θ je upadni ugao (Slika 4.1). Putna razlika treba da bude jednaka celobrojnom umnošku (*n*) talasnih dužina (λ) da bi bio ispunjen uslov za pozitivnu interferenciju [8]:

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

Ova jednačina je poznata kao Bragov⁹ zakon.

⁸ Max Theodor Felix von Laue (1879-1960) – nemački fizičar

⁹ William Henry Bragg (1862-1942), William Lawrence Bragg (1890-1971) – engleski fizičari



Slika 4.1 Difrakcija na kristalnoj rešeci [47]

4.1.2 Difrakcija na kristalnom prahu

Pri difrakciji na kristalnom prahu, ispitivani uzorak se sastoji od beskonačno velikog broja malih kristalita koji su međusobno nasumično orijentisani. Pošto su sve orijentacije prisutne, potrebno je menjati samo upadni ugao. Pomoću ove tehnike se snima difraktogram praha koji prikazuje intenzitet detektovanog X-zračenja u funkciji ugla između upadnog i difraktovanog snopa. Pikove na difraktogramu karakteriše njihov položaj, intenzitet i profil i oni nose informacije o uzorku [47]. Analizom difraktograma je moguće odrediti parametre kristalne rešetke za strukture visokih simetrija, kristalnu strukturu, veličinu čestica uzorka i kvalitativni i kvantitativni sastav kristalne smeše [2, 47].

U difraktometrima za prah, X-zraci, koji su proizvedeni u rendgenskoj cevi, prolaze kroz primarne optičke komponente (prorezi), ozračuju uzorak, difraktuju se na uzorku, prolaze kroz sekundarne optičke komponente (prorezi i filter) i ulaze u detektor. Pomeranjem cevi ili uzorka i detektora se može promeniti ugao difrakcije. Na taj način se beleže intenziteti i snima se difraktogram [47].

Za ispitivanje uzoraka praha pomoću difraktometra X-zraka postoje dve glavne metode:

- refleksiona geometrija: rendgenski zraci su rasejani sa površine ravnog uzorka;
- transmisiona geometrija: X-zraci prolaze kroz uzorak koji je transparentan za rendgenske zrake [47].

Refleksiona geometrija, kojom su snimljeni uzorci u radu, naziva se još i Brag-Brentano geometrija. Na Slici 4.2 je prikazna postavka difraktometra za prah u ovoj geometriji. Ukoliko je uzorak postavljen pod upadnim uglom θ , potrebno je merenje na dvostruko većem uglu (2θ), gde

se očekuje difraktovani zrak, pa je zbog toga potrebno da se detektor sinhronizovano kreće sa obrtanjem uzorka, ali da njegova brzina bude dvostruko veća [2, 47].



Slika 4.2 Postavka difraktometra za prah u Brag-Brentano geometriji [47]

Standardni Brag-Brentano difraktometar je opremljen sledećim komponentima (Slika 4.2):

- Solerovi prorezi za definisanje aksijalne divergencije upadnog i difraktovanog zraka;
- primarni divergentni prorezi za definisanje dužine ozračenja i maska za definisanje širine snopa;
- β-filter i/ili monohromator;
- prijemni prorezi i prorezi protiv rasejanja u kombinaciji sa tačkastim detektorima ili prorezi protiv rasejanja u kombinaciji sa detektorima osetljivim na položaj [47].

U cilju prikupljanja difrakcionih podataka koji su obrađeni u ovom radu korišćen je difraktometar Empyrean od proizvođača Marvel Panalytical (Slika 4.3).



Slika 4.3 Difraktometar Empyrean od proizvođača Marvel Panalytical [50]

4.2 Mikroskopske tehnike

4.2.1 Skenirajući elektronski mikroskop

Pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (engl. *Scanning Electron Microscope – SEM*) se mogu dobiti topografske i morfološke informacije o ispitivanom uzorku [51]. Ukoliko se ispituju nanočestice, pored oblika čestica, može se odrediti i njihova veličina.

Šematski prikaz SEM-a je dat na Slici 4.4. Elektroni se proizvode u elektronskom topu, zatim se ubrzavaju dole u stubu i prolaze kroz kombinaciju sočiva i proreza da bi se dobio fokusirani snop elektrona koji udara u povšinu uzorka. Uzorak se postavlja na stočić u komori koja se zajedno sa stubom vakuumira kombinacijom pumpi. Položaj elektronskog snopa se kontroliše skenirajućim kalemovima koje se nalaze iznad sočiva objektiva. Ovi kalemovi omogućavaju skeniranje snopa preko površine uzorka. Na taj način se vrši prikupljanje podataka o datoj oblasti na uzorku [52].



Slika 4.4 Šematski prikaz skenirajućeg elektronskog mikroskopa [51]

Kada elektroni interaguju sa uzorkom, oni proizvode sekundarne elektrone, povratno rasejane (engl. *backscattered*) elektrone i karakteristične X-zrake (Slika 4.5). Ovi signali se

prikupljaju odgovarajućim detektorima kako bi se formirale slike koje se prikažu na ekranu računara [52].



Slika 4.5 Šematski prikaz interakcije elektronskog snopa sa uzorkom i različite vrste signala koje koristi SEM [53]

U SEM može biti ugrađen sistem za elektrodisperzivnu spektroskopiju X-zracima (engl. *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy – EDS*), koja daje informaciju o hemijskom sastavu uzorka. Ovi sistemi sadrže osetljivi detektor rendgenskih zraka koji je montiran u komoru za uzorke, Djuarovu bocu sa tečnim azotom za hlađenje i softver za prikupljanje i analizu energetskih spektra. Ukoliko se koriste takozvani silikonski drift detektori (SDD), hlađenje tečnim azotom nije potrebno. EDS detektor sadrži kristal koji apsorbuje energiju upadnih X-zraka jonizacijom. Na taj način se stvaraju slobodni elektroni u kristalima koji postaju provodni. To znači da se energija pojedinih rendgenskih zraka pretvori u proporcionalni električni signal, tj. električni impulsi odgovaraju karakterističnim rendgenskim zracima određenog hemijskog elementa [54].

U eksperimentima je korišćen JEOL JSM-6390LV (Slika 4.6) skenirajući elektronski mikroskop sa filamentom od volframa i X-Max^N SDD od proizvođača Oxford Instruments.



Slika 4.6 JEOL JSM-6390LV SEM sa sistemom X-Max^N SDD na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu

4.2.2 Mikroskop atomskih sila

Trodimenzionalni topografski snimak površine uzorka se može dobiti pomoću mikroskopa atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscope – AFM*) [55]. Informacije koje daje ova tehnika su morfologija uzorka, veličina i oblik čestica i njihova uniformnost.

Stalak mikroskopa, upravljačka elektronika i računar su glavni delovi AFM-a. Stalak sadrži konzolu (mehanizam za pomeranje igle mikroskopa), držač uzorka i senzor za silu. Obično je i optički mikroskop ugrađen u stalak AFM-a za posmatranje uzorka i igle [56].

Šematski prikaz principa rada mikroskopa atomskih sila je dat na Slici 4.7. Kada se vrh igle približava površini uzorka, sile između njega i uzorka pomeraju konzolu prema Hukovom zakonu [57].



Slika 4.7 Šematski prikaz principa rada mikroskopa atomskih sila [58]

Prilikom približavanja vrha igle površini uzorka, van der Valsove¹⁰ privlačne sile počinju da deluju između njih (Slika 4.8). Ove sile se javljaju već na udaljenosti od nekoliko desetina angstrema, dok na udaljenosti od nekoliko angstrema počinju delovati odbojne sile (Slika 4.8). U vlažnom vazduhu na površini uzorka postoji vođeni sloj usled čega se javljaju kapilarne sile, koje povećavaju minimalnu silu interakcije, koja se može ostvariti. Prilično često se može pojaviti i elektrostatička interakcija između igle i uzorka, koja može biti odbojna ili privlačna [59].

Na osnovu interakcije vrha igle i površine uzorka, postoje tri režima rada mikroskopa atomskih sila (Slika 4.8):

- Kontaktni režim (engl. *contact mode*) vrh igle je u direktnom kontatku sa površinom uzorka
- Beskontaktni režim (engl. *non-contact mode*) vrh igle nije u direktnom kontaktu sa površinom uzorka već samo se dovodi blizu površine. Pomeranje konzole je tada rezultat delovanja van der Valsove sile.
- Isprekidano-kontaktni režim (engl. *semi-contact mode*) kontakt između vrha igle i površine uzorka je delimičan [59].

¹⁰ Johannes Diderik van der Waals (1837-1923) – holandski fizičar



Slika 4.8 Režimi rada mikroskopa atomskih sila na osnovu interakcije između vrha igle i površine uzorka [60]

Pomeranje konzole menja refleksiju laserskog snopa koji sa gornje površine konzole osvetljava niz fotodioda. Promena laserskog snopa je merilo primenjenih sila [57]. Kao odgvor na promene u topografiji, piezo-skener se pomera gore-dole da bi se održavala konstantna vibracija konzole [61].

Upravljačka elektronika služi za digitalizaciju signala koji dolaze iz AFM-a, kako bi ih računar mogao prikazati i snimiti. Pored digitalizacije signala, njegov zadatak je da upravlja povratnim informacijama koji izlaze i vraćaju se u stalak AFM-a, u skladu sa parametrima postavljenim putem računara. Računar obično sadrži i poseban program za obradu i analizu dobijenih slika [56].

Park XE7 AFM (Slika 4.9) od proizvođača Park Systems je korišćen u eksperimentima.



Slika 4.9 Park XE7 AFM od proizvođača Park Systems (Fakultetu za Fiziku – Univerzitet "Adam Mickjevič")

4.2.3 Transmisioni elektronski mikroskop

Za razliku od SEM-a, transmisioni elektronski mikroskop (engl. *Transmission Electron Microscope – TEM*) koristi transmitovane eletrone, tj. elektrone, koje prolaze kroz uzorak. Zahvaljujući tome, može da daje informacije o unutrašnjoj strukturi materijala, što je veoma velika prednost u odnosu na SEM i AFM, pri ispitivanju nanocevi i core-shell nanočestica.

U sistemu TEM-a, elektronski top stvara snop elektrona visoke energije koji se usmerava na uzorak pomoću dva ili više kondenzorskih sočiva (Slika 4.10). Stočić uzorka omogućava da se uzorak fiksira ili pomera po potrebi, a takođe da se uzorak stavi u mikroskop ili da se izvadi iz njega. Mehanička stabilnost stočića je važna jer određuje prostornu rezoluciju TEM slike [62].



Slika 4.10 Šematski prikaz transmisionog elektronskog mikroskopa [63]

Sistem za obradu slika se sastoji od najmanje tri sočiva koja zajedno stvaraju uvećanu sliku uzorka na fluorescentnom ekranu, fosfornom ekranu ili u CCD (engl. *Charge-Coupled Device*) kameri [63, 64]. Princip rada sistema za obradu slike određuje uvećanje TEM slika, dok dizajn sočiva za obradu slike (engl. *imaging lenses*) u velikoj meri utiče na prostornu rezoluciju koja se može dostići pomoću mikroskopa [63].

Za pojačanje kontrasta se može koristiti apertura objektiva koja služi za blokiranje elektrona difraktovanih pod velikim uglovima. Slika zatim prolazi kroz posrednih (engl. *intermediate*) i projektorskih sočiva i uvećava se. Uvećana slika pada na zaslon fosfora ili na fluorescenti ekran, omogućavajući korisniku da je vidi. Tamnija područja slike su oni delovi uzorka kroz koja se prenosi manje elektrona, dok su svetlija područja ona područja uzorka kroz koja prolazi više elektrona [64].

U eksperimentima je korišćen Hitachi HT 7700 i JEOL ARM-200F transmisioni elektronski mikroskop visoke rezolucije (engl. *High-Resolution Transmission Electron Microscope – HR-TEM*).

4.3 Spektroskopske tehnike

4.3.1 Ramanova spektroskopija

Ramanova¹¹ spektroskopija daje informacije o hemijskoj strukturi, kristaličnosti, prisutnim nečistoćama i molekularnim interakcijama [65].

Ramanovo rasejanje nastaje kada svetlost (foton) interaguje sa molekularnim vibracijama. Ukoliko usled te interakcije, foton gubi deo energije preko elektrona, koji nakon ekscitacije sa osnovnog nivoa prelazi na viši vibracioni nivo, dobijaju se nove linije, pomerene ka većim talasnim dužinama. Ove linije se nazivaju Stoksove¹² (Slika 4.11). Može se desiti da upadni foton ekscituje elektron koji se nalazi na višem nivou. U tom slučaju je moguće da se prilikom povratka, elektron vraća na osnovni nivo. Time se energija fotona povećava i dobijaju se linije manjih talasnih dužina, koje se nazivaju anti-Stoksove (Slika 4.11) [8].



Slika 4.11 Šema Stoksovog i anti-Stoksovog rasejanja [8]

Glavne komponente Ramanovog spektrometra su izvor za pobuđivanje (laser), sistem za osvetljenja uzorka, optika za prikupljanje svetla, selektor talasne dužine (filter ili spektrofotometar) i detektor (niz fotodioda, CCD ili fotomultiplikator) [66].

Uzorak se osvetljava laserskim snopom u ultraljubičastoj (UV), vidljivoj (VIS) ili bliskoj infracrvenoj (NIR) oblasti. Pomoću sočiva se prikuplja rasejana svetlost, koja zatim prolazi kroz

¹¹ Sir Chandrashekhara Venkata Raman (1888-1970) – indijski fizičar

¹² Sir George Gabriel Stokes, 1st Baronet (1819-1903) – anglo-irski fizičar

interferencionih filtera ili spektrofotometra [66]. Na taj način se dobije Ramanov spektar, koji prikazuje zavisnost intenziteta Ramanovog rasejanja od talasnog broja ili od razlike u talasnim brojevima.

Ramanovi spektri su snimljeni pomoću Renishaw InVia Raman spektrometra (Slika 4.12).



Slika 4.12 a) Renishaw InVia Raman spektrometar (NanoBioMedical Centre – Univerzitet "Adam Mickjevič"); b) šematski prikaz spektrometra [67]

4.3.2 Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija

Elektronska paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija je metoda koja, kao i većina spektroskopskih metoda, meri apsorpciju elektromagnetnog zračenja. EPR spektroskopija se može koristiti za ispitivanje magnetnih osobina materijala sa nesparenim elektronima, koji najviše doprinose magnetnom momentu molekula [68].

Kada se povećava spoljašnje magnetno polje, razmak između dva energetska stanja se širi sve dok se ne poklapa sa energijom mikrotalasa (Slika 4.13). U tom trenutnku, nespareni elektroni se mogu kretati između svoja dva spinska stanja. Po Maksvel¹³-Bolcmanovoj¹⁴ raspodeli, u nižem stanju ima više elektrona i zbog toga dolazi do apsorpcije energije. Ta apsorpcija je praćena i pretvorena u spektar. Često se prikazuje i analizira prvi izvod tog spektra [68].



Slika 4.13 Energetski nivoi spina elektrona u primenjenom magnetnom polju [68, 69]

Blok šema tipičnog EPR spektrometra je prikazana na Slici 4.14. Kao izvor, najčešće se koristi klistron. Klistroni su vakuumske cevi, koji su poznati kao izvori stabilnih mikrotalasa velike snage. Uzorak je postavljen u rezonantnoj šupljini i ozračuje se kontinualno ili impulsno. Šupljina se nalazi u sredini elektromagneta i pomaže u pojačanju slabih signala sa uzorka [68].

Kada je separacija energetskih nivoa jednaka ili vrlo bliska frekvenciji upadnog fotona, apsoprcione liniji se mogu detektovati pomoću određenih dioda koje su osetljive na energiju mikrotalasa [68].

Pored ovih delova, može se uključiti i atenuator, modulator polja i pojačivač, u cilju poboljšanja performansa ovog instrumenta [68].

U eksperimentima je korišćen X – band Bruker EPR/ENDOR EMX – 10 spektrometar.

¹³ James Clerk Maxwell (1831-1879) – škotski fizičar

¹⁴ Ludwig Eduard Boltzmann (1844-1906) – austrijski fizičar



Slika 4.14 Blok šema EPR spektrometra [68, 70]

4.3.3 Mezbauerova spektroskopija

Mezbauerova¹⁵ spektroskopija proučava hiperfine interacije koje su rezultat interakcije jezgara i električnog i magnetnog polja okolnih elektrona i drugih jezgara [71]. Veoma je važna tehnika za karakterizaciju nanočestica jer pomoću ove metode se može eksperimentalno odrediti magnetni moment uzorka [72] i dobiti informacije o međučesticnim interakcijama [73] u sistemu nanočestica. Informacije dobijene putem Mezbauerove spektroskopije mogu dopuniti ili poboljšati podatke dobijene transmisionin elektronskim mikroskopom, diffrakcijom X-zraka ili magnetometrijom [71].

⁵⁷Fe Mezbauerova spektroskopija se zasniva na upotrebi γ fotona koji se emituje iz jezgara radioaktivnog izvora ⁵⁷Co. ⁵⁷Co raspada na ⁵⁷Fe u drugom pobuđenom stanju sa spinom 5/2, zatim sledi prelaz na prvo pobuđeno stanje sa spinom 3/2. Prelaz od 14.41 keV između pobuđenog stanja sa spinom 3/2 i osnovnog stanja sa spinom 1/2 rezultuje emisijom γ fotona koji se koristi u eksperimentima ⁵⁷Fe Mezbauerove spektroskopije. Uprkos činjenici da je prirodna rasprostranjenost ⁵⁷Fe prilično mala (2,19 %), ipak je dovoljna za proizvodnju upotrebljivog γ zračenja [71].

Postavka eksperimenta za Mezbauerovu spektroskopiju je šematski prikazana na Slici 4.15. Fotoni koji su emitovani iz izvora mogu biti apsorbovani ili transmitovani kroz uzorak. Propušteni fotoni stižu do detektora koji ih broji. Izvor je montiran na pogon (engl. *drive*) i konstantno se

¹⁵ Rudolf Ludwig Mössbauer (1929-2011) – nemački fizičar

pomera, približava se apsorberu (uzorku) ili se udaljava od njega. Na taj način se menja energija emitovanog γ zračenja usled Doplerovog efekta. Ovo omogućuje detekciju rezonantnih energetskih nivoa u uzorku i proučavanje interakcije jezgra ⁵⁷Fe sa njegovom okolinom u uzorku [71].



Slika 4.15 Postavka eksperimenta za Mezbauerovu spektroskopiju [74]

Eksperimenti su izvršeni u transmisionom režimu sa konstantnom ubrzavanjem. Glavni moduli eksperimentalnog seta su bili vakuum sistem, izvor i detekcioni put i brojač γ kvanata. Izvor γ -zračenja od 14,4 keV je bio ⁵⁷Co u rodijumovoj matrici.

4.4 MTT test - određivanje ćelijskog preživljavanja

MTT je kvantitativna kolorimetrijska metoda, koja se koristi za određivanje proliferacije ćelija nakon tretmana sa testiranim jedinjenjima [75]. MTT [3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid] je supstanca žute boje [76], koja je rastvorljiva u vodi. Kidanjem tetrazoliumovog prstena uz pomoć sukcinat dehidrogenaze, koja se nalazi u mitohondrijama, ova supstanca se pretvara u nerastvorljivi ljubičasti formazan. Ovo kidanje se odvija samo u živim, metabolički aktivnim ćelijama. Ćelijske membrane ne propuste formazan i zbog toga se akumulira u živim ćelijama. Količina generisanog formazana (ili boje), koja je direktno proporcionalna broju vijabilnih ćelija, može se odrediti spektrofotometrijski [75].
5 Rezultati i diskusija

U okviru eksperimentalnog dela ovog rada su ispitivane strukturne, mikrostrukturne i magnetne osobine šest uzoraka magnetnih nanomaterijala. Pored toga je izvršena ispitivanje citotoksičnosti jednog uzorka.

Od ispitivanih uzoraka su četiri magnetne nanočestice na bazi oksida gvožđa, koje su sintetizovane u grupi dr Artema Kozlovskija¹⁶ iz Instituta za Nuklearnu Fiziku u Kazahstanu.

Dva od tih uzoraka su sintetizovani metodom hemijske depozicije pri čemu su polazni materijali bili gvožđe (II) i (III) hlorid i amonijum hidroksid. Jedan uzorak (Fe_3O_4) je dobijen na sobnoj temperaturi bez naknadnog termičkog tretmana, dok na drugi uzorak (Fe_3O_4 na 600 °C) je primenjen termički tretman na temperaturi od 600 °C.

Treći uzorak (*nanočestice oksida gvožđa dopiranih cerijumom*) je dobijen putem hemijske sinteze od Ce(NO₃)₃·6H₂O, FeCl₃·6H₂O, HCl i NaOH kao polaznih materijala. Nakon sinteze je primenjen termički tretman na 400 °C.

Za sintezu četvrtog uzorka (PVP- Fe_3O_4) je korišćen rastvor od FeSO₄·7H₂O i surfaktanta (želatin i polivinilpirolidon (PVP)). Za regulaciju pH vrednosti je upotrebljen NaOH, a rastvor hidrazin hidrata (N₂H₄·H₂O) je služio kao redukciono sredstvo.

Drugu grupu ispitivanih nanočestica čine ugljenične nanocevi dopiranih 52 wt%¹⁷ nanočestica gvožđa (*CNTs 52 wt% Fe*) i ugljenične nanocevi dopiranih 52 wt% nanočestica kobalta (*CNTs 52 wt% Co*). Ovi materijali su naručeni od "Nanografi Company" i sintetizovani su hemijskom depozicijom iz parne faze (engl. *Chemical Vapor Deposition – CVD*). Kao prekursor, korišćeni su biljni ekstrakti bogati ugljenikom. Nakon isparavanja, transportuju se u reakcionu komoru na unapred katalizovane podloge. Materijali za katalizu su kompleksi gvožđa ili kobalta nano veličine, koji su nanošeni na substrat. Rast dopiranih ugljeničnih nanocevi se odvija u reakcionoj komori, pri kontrolisanoj temperaturi između 500-1100 °C. Dopiranje ugljeničnih nanocevi metalnim nanoprahovima u velikoj meri poboljšava njihove fizičke osobine.

¹⁶ dr Artem L. Kozlovskiy, The Institute of Nuclear Physics, Almaty, Kazakhstan

¹⁷ Maseni procenat

5.1 Analiza strukture i morfologije uzoraka

Indentifikacija prisutne faze i određivanje strukture ispitivanih uzoraka je izvršena metodom difrakcije X-zraka na prahu. Merenja su sprovedena korisćenjem CuK_{α} zračenja (K_{α 1}=1,540560 Å i K_{α 2}=1.544330 Å) u rasponu od 18° do 85° za uzorke *Fe*₃*O*₄ i *Fe*₃*O*₄ *na 600* °*C*, od 15° do 85° za ostale uzorke, osim za uzorka sa PVP-om (od 15° do 80°). Za indeksiranje pikova je korišćena baza podataka iz programa HighScore Plus.

Ritveldova analiza (rešavanje i utačnjavanje kristalne strukture) za dva uzorka (Fe_3O_4 - Slika 5.1 i Fe_3O_4 na 600 °C - Slika 5.2) izvedena je pomoću programa FullProf.



Slika 5.1 Ritveldovo utačnjavanje difraktograma nanočestice magnetita (Fe_3O_4)

Indeksirani pikovi prvog uzorka (Slika 5.1) ukazuju na magnetitnu fazu, koja ima kubnu strukturu i pripada prostornoj grupi $Fd\overline{3}m$ (227) [77]. Refleksije su dobijene sa (220), (311), (400), (331), (422), (511), (440), (620), (533) i (444) ravni Fe₃O₄. Prosečna vrednost parametra elementarne ćelije, izračunata iz podataka dobijenih difraktometrijom, je a=8,369 Å, što je manje od vrednosti u literaturi i može biti rezultat delimične oksidacije Fe²⁺ u strukturi magnetita [78].

Bragov R-faktor¹⁸ utačnjavanja iznosi 2,137, a RF-faktor je 4,035. Ove vrednosti ukazuju na visoku preciznost, što znači da se eksperimentalni podaci dobro slažu da kristalografskim modelom.

Pikovi na difraktogramu su prošireni, kao što se i očekuje za nanočestice, zbog veoma male veličine kristalita.

Prosečna velicina kristalita (L) je računata koristeći Šererovu jednačinu:

$$L = \frac{k\lambda}{B\cos\theta}$$

gde je *k* konstanta, λ talasna dužina korisćenog zračenja, *B* je širina pika na polovini visine (engl. *Full Width at Half Maximum – FWHM*) i θ je Bragov ugao. Konstanta *k* može imati vrednost između 0,89 i 1,39 [80]. U računima je korisćeno k=0,9, što je uobičajeno u ovakvim istraživanjima [81]. FWHM je određena pomoću programa WinPLOTR i Origin.

Dobijena prosečna veličina kristalita za ovaj uzorak je 12,3 nm.

Na Slici 5.2, difrakcioni pikovi dobijeni refleksijom sa ravni (012), (104), (110), (006), (113), (202), (024), (116), (018), (214), (300), (208), (1, 0, 10), (217), (312), (0, 2, 10) i (134), odgovaraju fazi α -Fe₂O₃ (hematit). Njegova kristalna struktura pripada trigonalnom kristalnom sistemu (prostorna grupa 167, simbol $R\bar{3}c$ [77]). Izračunati parametri elementarne ćelije su a=b=5,037 Å i c=13,756 Å, što je u dobroj saglasnosti sa bazom podataka. Oštri, uzani pikovi na difraktogramu ukazuju na visoku kristaličnu fazu, sa prosečnom veličinom kristalita od 28,2 nm. Bragov R-faktor je 5,306, a RF-faktor iznosi 6,228, što ukazuje na visoku preciznost utačnjavanja kristalne strukture.

Ovaj uzorak je sintetizovan istim metodom kao i prvi, ali u ovom slučaju je nakon sinteze primenjen termički tretman (engl. *annealing*) nanočestica na temperaturi od 600 °C. U temperaturnom opsegu između sobne temperature i 600 °C, dolazi do fazne transformacije magnetita u maghemit (γ -Fe₂O₃), a zatim maghemita u hematit (α -Fe₂O₃) prema sledećoj šemi [81]:

$$4Fe_{3}O_{4} + O_{2} \xrightarrow{300-400^{\circ}C} 6 \gamma - Fe_{2}O_{3} \xrightarrow{>500^{\circ}C} 6 \alpha - Fe_{2}O_{3}$$

Tokom termičkog tretmana može doći do aglomercije nanočestica. To je razlog, što je dobijena prosečna veličina kristalita je veća za ovaj uzorak.

¹⁸ R-faktor (faktor pouzdanosti) je mera slaganja kristalografskog modela i eksperimentalnih podataka dobijenih difrakcijom X-zraka [79]. Bragov R-faktor je baziran na intenzitet refleksije, a RF-faktor na strukturni faktor.



Slika 5.2 *Ritveldovo utačnjavanje difraktograma nanočestice hematita* (α -Fe₂O₃)

Za uzorke nanočestice oksida gvožđa dopiranih cerijumom, *PVP-Fe₃O₄*, ugljeničnih nanočevi dopiranih nanočesticama gvožđa, i ugljeničnih nanočevi dopiranih nanočesticama kobalta, Ritveldovo utačnjavanje bi bilo previše komplikovano zbog više različitih faza koje su prisutne. Pikovi na difraktogramima ovih uzorka su manuelno indeksirani na osnovu korišćene baze podataka, i prikazani su na Slici 5.3.

Indeksirani pikovi uzorka cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa (Slika 5.3 a)) potiču od CeO₂, koji ima kubnu (fluoritnu) strukturu i pripada prostornoj grupi pod oznakom 225 ($Fm\overline{3}m$ [77]). Formiranje CeO₂ može biti posledica termičkog tretmana u medijumu koji sadrži kiseonik. Intenzitet pikova koji potiču od oksida gvožđa je mnogo manji od intenziteta pikova cerijum(IV)-oksida i zbog toga se ne mogu indentifikovati na dobijenom difraktogramu Xzračenja. Prošireni pikovi ukazuju na kristalite vrlo male veličine, što potvrđuje i izračunata vrednost od 4,9 nm.

Difraktogram PVP- Fe_3O_4 je prikazan na Slici 5.3 b). Šum na difraktogramu potiče od instrumenta. Indeksirani pikovi su karakteristični za magnetit, što znači da polimerni surfaktant ne utiče na kristalnu strukturu čestica. Prosečna veličina kristalita je 32 nm.

Slika 5.3 c) prikazuje difraktogram ugljeničnih nanocevi dopiranih nanočesticama gvožđa. Prošireni pik na $2\theta=26,2^{\circ}$ odgovara refleksiji sa ravni (002) grafitne strukture, tj. potiče od ugljeničnih nanocevi. Pored pikova koji potiču od gvožđa ($2\theta=44,7, 2\theta=65$ i $2\theta=82,3$), može se identifikovati nekoliko pikova koji odgovaraju gvožđe(II,III)-oksidu (magnetitu).



Slika 5.3 Difraktogram a) cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa, b) PVP-Fe₃O₄, c) CNTs 52 wt% Fe i d) CNTs 52 wt% Co

Difraktogram ugljeničnih nanocevi dopiranih nanočesticama kobalta je prikazan na Slici 5.3 d). Prošireni pik na $2\theta=26,2^{\circ}$, koji potiče od ugljeničnih nanocevi, može se videti i na ovom difraktogramu. Pikovi koji potiču od kobalt(II,III)-oksida (Co₃O₄) su takođe indeksirani.

Formiranje oksida gvožđa i kobalta je moguće tokom sinteze pri visokim temperaturama u reakcionoj peći.

Morfološka i elementarna analiza uzoraka nanočestica na bazi oksida gvožđa je izvršena SEM/EDS tehnikom.

Za pripremu uzoraka je korišćen BAL-TEC SCD005 Sputter Coater (raspršivač), u cilju poboljšanja snimanje uzorka. Raspršivanje je proces fizičke depozicije iz parne faze (engl. *Physical Vapor Deposition – PVD*), koji se koristi za nanošenje vrlo tankog, funkcionalnog sloja na uzorke [82]. Nanošenje sloja zlata na uzorke je trajalo 100 s sa primenjenom strujom od 30 mA. Uzorci u raspršivaču su prikazani na Slici 5.4. SEM ispitivanje je izvršeno za nanočestica na bazi oksida gvožđa. Snimanje ugljeničnih nanocevi SEM tehnikom nije izvršeno, pošto ova metoda ne može dati korisne informacije, jer ne pokazuje njihovu unutrašnju strukturu, samo površinu.



Slika 5.4 Pripremanje uzoraka u BAL-TEC SCD005 Sputter Coater-u

SEM slike su prikazane na Slici 5.5. Veoma izražena agregacija nedopiranih čestica magnetita i hematita (Slika 5.5 a) i b), respektivno) može biti posledica metode sinteze ili može nastati prilikom nanošenja čestica na nosač uzorka, jer nije korišćeno nikakvo sredstvo za sprečavanje spajanje čestica. Kao što se može videti sa Slike 5.5, agregacija kod čestica magnetita dopiranih cerijumom (Slika 5.5 c)) i sintetizovan u rastvoru sa PVP-om (Slika 5.5 d)) je manje prisutna.



Slika 5.5 SEM slike uzoraka a) Fe_3O_4 , b) α - Fe_2O_3 , c) cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa i d) PVP- Fe_3O_4



Slika 5.6 Mapa distribucije elemenata i rezultati EDS eksperimenata za uzorke a) Fe_3O_4 i b) α - Fe_2O_3

Mape distribucije elemenata i rezultati EDS eksperimenata za uzorke magnetita, hematita, cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa i PVP- Fe_3O_4 nanočestica su prikazani na Slici 5.6 a) i b) i na Slici 5.7 a) i b), respektivno. Ugljenik, prisutan u svim uzorcima može biti posledica kontaminacije površine uzorka i / ili komore. Pikovi koji potiču od zlata, prisutni su zbog prevlake.

U uzorku magnetita (Slika 5.6 a)), sintetizovanog na sobnoj temperaturi, može se primetiti prisustvo hlora (Cl). Tokom sinteze primenjenom metodom se može formirati gvožđe(III)-hlorid (FeCl₃) i ostati u tragovima u uzorku. Temperatura termalne dekompozicije tog jedinjeja je 316 °C [83] zato nije prisutna u uzorcima koji su sintetizovani na višim temperaturama (α -*Fe*₂*O*₃ (Slika 5.6 b)), cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa (Slika 5.7 a))) ili drugom metodom (*PVP*-*Fe*₃*O*₄ (Slika 5.7 b))).

Iako se na difraktogramu uzorka cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa mogu videti samo pikovi koji potiču od CeO₂, EDS analiza otkriva prisustvo gvožđa i kiseonika (Slika 5.7 a)). To je razumljivo budući da je preciznost primenjenih tehnika različita.



Slika 5.7 Mapa distribucije elemenata i rezultati EDS eksperimenata za uzorke a) cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa i b) PVP-Fe₃O₄

Topografija i morfologija uzoraka su proučavane pomoću mikroskopa atomskih sila.

Za pripremu uzoraka je korišćen vodeni rastvor površinski aktivnog materijala (surfaktanta) heksadeciltrimetilamonijum bromida (~2%) kako bi se sprečila agregacija čestica. 1 ml rastvora surfaktanta je dodato na 20 mg od svakog uzorka. Smeše su bile smeštene u ultazvučno kupatilo tokom 30 minuta, kako bi se poboljšala disperzija čestica u rastvoru i adsorpcija surfaktanata na površini uzorka. Na nosač uzorka je stavljeno 1 µl od pripremljene smeše. Završni korak u postupku pripreme uzorka je bilo njihovo sušenje na sobnoj temperaturi dok voda nije isparavala.

AFM slike su dobijene beskontaktnim režimom pomoću softvera SmartScan i analizirane programom XEI. Dvodimenzionalne (2D) i trodimenzionalne (3D) AFM slike su prikazane na Slici 5.8 i 5.9 AFM slike uzoraka magnetnih nanočestica na bazi oksida gvožđa (Slika 5.8 a), b), c) i d)) pokazuju čestice skoro sfernog oblika, relativno uniformne veličine i umerenu agregaciju. Prema AFM slikama, ugljenične nanocevi dopiranih nanočesticama gvožđa (Slika 5.9 a)) i kobalta (Slika 5.9 b)) imaju skoro uniformnu veličinu i oblik. Izmeren prosečni spoljašnji prečnik je približno 50 nm.



Slika 5.8 2D i 3D AFM slike uzoraka a) Fe₃O₄, b) α-Fe₂O₃, c) cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa, d) PVP-Fe₃O₄



Slika 5.9 2D i 3D AFM slike a) ugljeničnih nanocevi dopiranih 52 wt% nanočestica Fe i b) ugljeničnih nanocevi dopiranih 52 wt% nanočestica Co

Transmisioni elektronski mikroskop je korišćen u cilju određivanja veličina čestica i njihovog upoređivanja sa računatim vrednostima na osnovu podataka dobijenih difrakcijom Xzraka za uzorke na bazi oksida gvožđa i za analizu strukture ugljeničnih nanocevi dopiranih metalnim nanočesticama. Uzorci su pripremljeni metodom nakapavanja (engl. *drop casting*) i sušeni pod vakuumom na komercijalno dostupnim bakarnim mrežama. Prosečna veličina nanočestica i spoljašnji prečnik nanocevi su određeni pomoću programa ImageJ.

Na osnovu TEM slika (Slika 5.10 a), b), c) i d)) veličina čestica uzorka Fe_3O_4 , α - Fe_2O_3 , cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa i PVP- Fe_3O_4 je 11,9 nm, 26,7 nm, 5,3 nm i 45,6 nm, respektivno. Rezultati dobijeni za Fe_3O_4 , α - Fe_2O_3 i cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa su u dobroj saglasnosti sa računatim vrednostima na osnovu podataka dobijenih difrakcijom X-zraka. Na Slici 5.10 b) se može videti izražena agregacija čestica u uzorku α - Fe_2O_3 , što potvrđuje rezultete dobijene skenirajućim elektronskim mikroskopom. Velika razlika u veličini čestica za uzorak PVP- Fe_3O_4 može biti posledica prisustva šuma na difraktogramu, koji utičee na tačnost određivanja širine pika na polovini visine. Slika 5.10 e) i f) otkrivaju da u stukturi

ugljeničnih nanocevi se nalaze nanočestice metala različite veličine i nasumično raspoređene. Takva struktura je posledica korišćene metode sinteze. U strukturi ugljeničnih nanocevi dopiranih nanočesticama gvožđa se nalaze čestice približno sfernog oblika koje su jasno vidljive, međutim to nije slučaj kod ugleničnih nanocevi dopiranih nanočesticama kobalta. Izmeren spoljašnji prečnik ispitivanih nanocevi je oko 50 nm, što je u dobroj saglasnosti sa rezultatima AFM merenja.



Slika 5.10 TEM slike uzoraka a) Fe₃O₄, b) α-Fe₂O₃, c) cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa, d) PVP-Fe₃O₄, e) CNTs 52 wt% Fe i f) CNTs 52 wt% Co

Ramanovi spektri su dobijeni na sobnoj temperature korišćenjem softvera Renishaw WiRE 3.3. Ekscitacioni izvor je bio crveni laser (talasne dužine 633 nm i snage 12 mW). Za fokusiranje laserskog snopa na uzorak, korišćena su sočiva objektiva sa uvećanjem 50x.



Slika 5.11 Ramanov spektar uzorka Fe₃O₄ pri intenzitetu lasera od a) 50%, b) 1%

Ramanov spektar uzorka Fe_3O_4 (Slika 5.11 a)) je dobijen pomoću lasera intenziteta 50% (snage 6 mW). Pikovi na 220, 286, 400, 487, 603, 654 i 1300 cm⁻¹ su karakteristični za hematit (α -Fe₂O₃). Do oksidacije uzorka je moglo doći u toku eksperimenta zbog visokog intenziteta korišćenog laserskog snopa [84]. Eksperiment je ponovljen sa intenzitetom lasera od 1% i snimljeni spektar je prikazan na Slici 5.11 b). Pik na ~670 cm⁻¹ je karakteristični pik magnetita.



Slika 5.12 Ramanov spektar uzorka α -Fe₂O₃

Označeni pikovi na Slici 5.12 odgovaraju hematitu, što znači da podaci Ramanove spektroskopije potvrđuju rezultate difrakcije X-zraka.

Na Slici 5.13 a) prikazan je Ramanov spektar uzorka nanočestica gvožđe oksida dopiranih cerijumom. Izraženi pik na 457 cm⁻¹ se pripisuje molekuli CeO₂, dok pikovi oko 654 cm⁻¹ i 1300 cm⁻¹ odgovaraju tipičnim frekcencijama koje se primećuju kod α -Fe₂O₃. Pojava hematite na spektru je posledica oksidacije uzorka u toku eksperimenta. Merenja su ponovljena sa intenzitetom lasera od 1% i dobijeni spektar je prikazan na Slici 5.13 b). Pik na 705 cm⁻¹ je karakterističan za maghemit (γ -Fe₂O₃), koji može nastati u toku termičkog tretmana na 400 °C. Rendgenska difrakcija pokazuje samo pikove koji potiču od CeO₂, EDS analiza otkriva prisustvo gvožđa i kiseonika, ali Ramanova spektroskopija daje informaciju da su oni prisutni u obliku maghemita.



Slika 5.13 Ramanov spektar nanočestica oksida gvožđa dopiranih cerijumom pri intenzitetu laser od a) 50%, b) 1%

Ramanov spektar uzorka PVP- Fe_3O_4 nanočestica (Slika 5.14) je dobijen korišćenjem lasera niskog intenziteta (5%, 0,6 mW) da bi se izbegla degradacija uzorka. Ovaj spektar pokazuje intenzivan pik na ~670 cm⁻¹, što je karakterističan pik magnetita. Polimer korišćen pri sintezi ne utiče u velikoj meri na spektar.



Slika 5.14 Ramanov spektar uzorka PVP-Fe₃O₄

Na Ramanovom spektru ugljeničnih nanocevi dopiranih 52 wt% nanočestica gvožđa (Slika 5.15) se mogu prepoznati trake D (1329 cm⁻¹), G (~1600 cm⁻¹), i 2D (ili G', 2667 cm⁻¹), koje su karakteristične za ugljenične nanocevi. D traka ukazuje na defekte u njihovoj strukturi. Kod dopiranih nanocevi, nesavršenosti nastaju zbog prisustva nanočestica u strukturi. G traka se može povezati sa sp² hibridizacijom atoma ugljenika u zidu nanocevi. G traka na spektru ima dubletnu strukturu sa pikovima G₁ (1584 cm⁻¹) i G₂ (1617 cm⁻¹), koji potiču od tangencijalnih vibracija paralelnih i normalnih na osu nanocevi [85, 86]. 2D traka je drugi harmonik D trake i takođe je povezana sa defektima. Pikovi u opsegu od 150 do 800 cm⁻¹ su karakteristični pikovi hematita. Prilikom snimanja Ramanovog spektra je i u ovom slučaju došlo do oksidacije uzorka. Spektar snimljen sa intenzitetom lasera od 1% je prikazan na Slici 5.15 b). Karakteristični pikovi za magnetit se ne mogu identifikovati zbog šuma, koji je posledica korišćenja lasera niskog intenziteta, ali na spektru se ne javljaju ni pikovi hematita.



Slika 5.15 Ramanov spektar ugljeničnih nanocevi dopiranih 52 wt% nanočestica gvožđa pri intenzitetu lasera od a) 50%, b) 1%

Na Ramanovom spektru ugljeničnih nanocevi dopiranih 52 wt% nanočestica kobalta (Slika 5.16), pored D (1330 cm⁻¹), G (1581 cm⁻¹) i 2D (2657 cm⁻¹) trake se javlja i D+G (2913 cm⁻¹) traka, koja je takođe povezana sa defektima u stukturi nanocevi odnosno sa neuređenoj simetriji sp² mreže ugljenika [87].



Slika 5.16 Ramanov spektar ugljeničnih nanocevi dopiranih 52 wt% nanočestica kobalta

5.2 Magnetne osobine ispitivanih uzoraka

Pomoću elektronske paramagnetne rezonantne spektroskopije je određen g-faktor uzoraka i širina linije od pika do pika (ΔB). Dobijene vrednosti su date u Tabeli 5.1, a EPR spektri uzoraka

su prikazani na Slici 5.17. Eksperimenti su izvšeni na sobnoj temperaturi sa frekvencijom mikrotalasa od ~9,7 GHz i snage ~7.9 mW.

Signali elektronske paramagnetne rezonance se mogu dobiti kada je energija upadnog fotona (hv) jednaka razlici između susednih energetskih nivoa. To je opisano rezonantnim uslovom:

$$h\nu = g\mu_B B$$

gde je *h* Plankova konstanta, *v* frekvencija mikrotalasa, *g* je označen g-faktor¹⁹ (spektroskopski faktor cepanja, Landeov²⁰ g-faktor ili bezdimenzioni magnetni moment), koji određuje položaj linije, μ_B Borov²¹ magneton i *B* indukcija primenjenog magnetnog polja [88].

Uzorak	g-faktor	$\Delta B (mT)$
Fe ₃ O ₄	2,72	81,9
α -Fe ₂ O ₃	2,35	177,3
CeO ₂ -Fe ₂ O ₃	1,98	201,1
PVP-Fe ₃ O ₄	2,73	131,6
CNTs 52 wt% Fe	2,40	176,8
CNTs 52 wt% Co	2,06	185,7

Tabela 5.1 Vrednosti g-faktora i širine linije dobijene EPR spektroskopijom

Na osnovu računate vrednosti veličine kristalita (12,4 nm) iz podataka dobijenih difrakcijom X-zraka za Fe_3O_4 očekuje se da taj uzorak ima jednodomensku strukturu i pokazuje superparamagnetno ponašanje²². Međutim, rezultati EPR spektroskopije (Slika 5.17 a)) ukazuju na to da je taj uzorak jak magnetik i ima multidomensku strukturu, što može biti posledica agregacije sitnih čestica. Uzorak α - Fe_2O_3 (Slika 5.17 b)), na osvnovu računate veličine kristalita nije superparamagnetik što je i potvrđeno rezultatima EPR-a. Spektar ovog uzorka karakteriše dublet, što ukazuje na heterogen materijal. To može da znači da su u tom uzorku prisutni i drugi oksidi gvožđa. EPR spektar uzorka CeO_2 - Fe_2O_3 (Slika 5.17 c)) otkriva promene u magnetnom

¹⁹ Bezdimenziona veličina koja određuje magnetni moment čestice, jezgra ili atoma

²⁰ Alfred Landé (1888-1976) – nemački-američki fizičar

²¹ Niels Henrik David Bohr (1885-1962) – danski fizičar

²² Poznato je da nanočestice oksida gvožđa veličine manje od 20 nm pokazuju superparamagnetno ponašanje [25]

ponašanju multidomenskih čestica. Te promene mogu biti uzrokovane prisutnim superparamagnetnim česticama. Uzorak magnetitnih nanočestica dobijenih u rastvoru sa *PVP*-om (Slika 5.17 d)) je jak magnetik, kao i čist Fe_3O_4 i ne sastoji se od superparamagnetnih čestica. Na spektru uzorka *CNTs 52 wt% Fe* (Slika 5.17 e)), signal koji potiče od ugljenika, nije vidljiv. Široke linije ukazuju na jaku interakciju između nanočestica gvožđa, što može biti posledica sitnih zrna u strukturi nanocevi. Spektar uzorka *CNTs 52 wt% Co* (Slika 5.17 f)) otkriva da je ovaj uzorak jak magnetik i ne pokazuje superparamagnetno ponašanje.



Slika 5.17 EPR spektri uzorka a) Fe₃O₄, b) Fe₂O₃, c) CeO₂-Fe₂O₃, d) PVP-Fe₃O₄, e) CNTs 52 wt% Fe, f) CNTs 52 wt% Co

Na osnovu rezultata elektronske paramagnetne rezonance, izabrani su uzorci Fe_3O_4 , CeO_2 - Fe_2O_3 i CNTs 52 wt% Fe za koje je izvedena detaljna analiza magnetnih osobina korišćenjem Mezbauerove spektroskopije.

Ako atom ima magnetni moment koji je stabilan u prostoru i vremenu (ima magnetno uređenu strukturu), tada u jezgru postoji magnetno polje i u Mezbauerovom spektru se primećuje šest linija (sekstet). Ako se javlja gradijent električnog polja koji potiče od elektronskih ljuski, bez magnetnog polja u jezgru, tada se u spektru primećuju dve linije (dublet). U slučaju simetrične raspodele naelektrisanja, u spektru se javlja samo jedna linija (mono-linija). Stoga, ako se spektar sastoji od seksteta ili više seksteta, može se zaključiti da je uzorak fero- ili ferimagnetik, pojava dubleta ili samo jedne linije ukazuje da je uzorak paramagnetik ili pod određenim uslovima može pokazati superparamagnetna svojstva.

Mezbauerova spektroskopska merenja izabranih uzoraka – Fe_3O_4 , CeO_2 - Fe_2O_3 i CNTs 52 wt% Fe – su izvedena na sobnoj temperaturi (295 K) i spektri su prikazani na Slici 5.18, Slici 5.19 i Slici 5.20, respektivno.



Slika 5.18 Mezbauerov spektar nanočestice magnetita

Na spektru uzorka Fe_3O_4 se može videti tri seksteta. Komponenta povezana sa Fe jonima koji se nalaze u oktaedralnim položajima je označena crvenom linijom. Plava linija označava komponentu sa Fe jonima koji se nalaze u tetraedralnim položajima, a treći sekstet (ljubičasta linija) je komponenta povezana sa Fe atomima koji se nalaze na površini nanočestica. Seksteti na spektru potvrđuju rezultate EPR-a, tj. da uzorak Fe_3O_4 ima uređenu magnetnu strukturu i da nije superparamagnetičan. Agregacija, koja se vidi i na SEM slikama je neizbežna u slučaju ovih čestica.

Dobijeni spektar za uzorak CeO_2 - Fe_2O_3 (Slika 5.19) se sastoji samo od superparamagnetnih dubleta. To znači da su sve nanočestice u uzorku u superparamagnetnom stanju. Ovaj rezultat ukazuje na to da se uzorak sastoji od vrlo malih nanočestica sa vrlo uskom raspodelom veličina kristalita, što je u skladu sa rezultatima dobijenim difrakcijom X-zraka i transmisionom elektronskom mikroskopom.



Slika 5.19 Mezbauerov spektar nanočestice oksida gvožđa dopiranih cerijumom

Na Slici 5.20 je prikazan spektar ugljeničnih nanocevi dopiranih nanočesticama gvožđa dobijen na sobnoj temperaturi (295 K). U analiziranom spektru su označena tri seksteta i dva dubleta, tj. postoje i magnetne i paramagnetne komponente. U prethodnom delu teksta (poglavlje 5.1) je već opisano da difraktogram ovih nanocevi pokazuje proširene pikove koji ukazuju na prisustvo vrlo malih čestica gvožđa i magnetita. Magnetna svojstva nanočestica se mogu značajno razlikovati od balk analoga. Ukoliko postoje sve manje i manje čestice, može se videti da za neke kritične veličine kristalita energija magnetne anizotropije postaje uporediva sa termalnom energijom. Kao rezultat toga, termičke oscilacije magnetnih momenata čestica ispoljavaju superparamagnetno ponašanje. Može se zaključiti da su dubleti u centralnom delu spektra povezani sa superparamagnetnim oscilacijama magnetnih momenata u jednodomenskim nanočesticama najmanje veličine. Dobijeni Mezbauerov spektar pokazuje koegzistenciju feromagnetne i superparamagnetne faze u ovom uzorku. Neke od nanočestica najmanjih veličina osciluju u pravcu ose magnetne anizotropije i ponašaju se poput paramagnetnih atoma. Ostale nanočestice u kojima je energija magnetne anizotropije veća od termalne energije ostaju u stabilnom stanju.



Slika 5.20 Mezbauerov spektar ugljeničnih nanocevi dopiranih 52 wt% nanočestica gvožđa

5.3 Određivanje citotoksičnosti cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa na metaboličkim aktivnostima HeLa ćelija

Određivanje citotoksičnosti cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa na metaboličke aktivnosti HeLa²³ ćelija je izvršeno MTT testom i rezultati su prikazani na Slici 5.21. Na osnovu ovih rezultat se može reći da je uticaj ispitivanih nanočestica na metaboličku aktivnost HeLa ćelija minimalan. Važno je naglasiti da ni serije uzoraka bez fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum – FBS*²⁴) nisu pokazale toksično ponašanje, što je neobično za veliku većinu nanočestica [75]. Ovi rezultati su optimistični i ukazuju na to da se ispitivane nanočestice mogu smatrati potencijalnim sistemom za kontrolisanu dostavu lekova. Ipak, treba naglasiti da citotoksičnost nanočestica može biti različita za različite ćelijske linije.



HeLa

Slika 5.21 Rezultati MTT testa za CeO₂-Fe₂O₃

²³ HeLa ćelijska linija je prva besmrtna ćelijska linija. Potiče od Henrijete Laks (*Henriette Lacks*) i koristi se za naučna istraživanja [89].

²⁴ Najčešće korišćeni dodatak za rast ćelije [90]

6 Zaključak

U okviru master rada su karakterizovane magnetne nanočestice na bazi gvožđe oksida i ugljenične nanocevi dopirane metalnim nanočesticama.

Strukturna analiza nanočestica magnetita i hematita, koje su dobijene hemijskom depozicijom, ukazuje na to da ove čestice imaju tendenciju za agregaciju, što je nepoželjno za primenu nanočestica u biomedicini. Zbog prisutnih agregata nanočestice magnetita ne pokazuju superparamagnetno ponašanje koje je potrebno za njihovu primenu kao kontrastno sredstvo pri MRI. Ukoliko se nanočestice magnetita dobijaju u rastvoru sa polimerom (PVP), ne dolazi do agregacije, međutim, veličina dobijenih čestica je iznad superparamagnetne granice, što ograničava njihovu biomedicinsku primenu. Ugljenične nanocevi dopirane sa kobaltnim nanočesticama na osnovu EPR spektra, ponašaju se kao jak magnetik.

Rezultati Mezbauerove spektroskopije za uzorke CeO₂-Fe₂O₃ i ugljeničnih nanocevi dopiranih sa nanočesticama gvožđa, ukazuju na superparamagnetno ponašanje ovih materijala. Kod prvog uzorka je ova osobina očekivana na osnovu prosečne veličine kristalita, koja je računata iz podataka difrakcije X-zraka i potvrđena analizom TEM slika. U strukturi ugljeničnih nanocevi su prisutne nanočestice gvožđa i oksida gvožđa različite veličine kao rezultat sinteze CVD metodom. Veličina nekih od tih čestica je ispod superparamagnetne granice. Magnetne osobine ovih uzoraka ukazuju na njihovu potencijalnu primenu u biomedicini.

Pored toga, analiza citotoksičnosti uzorka CeO₂-Fe₂O₃ otkriva da je njegova toksičnost na metaboličku aktivnost HeLa ćelija minimalna, što znači da se ove nanočestice mogu smatrati potencijalnim materijalima za kontrolisanu dostavu lekova.

Mogućnosti daljeg istraživanja uključuju dodatno proučavanje toksičnosti na različitim ćelijskim linijama, funkcionalizaciju nanočestica i vezivanje odgovarajućih medikamenta za njih.

7 Literatura

[1] V. Pokropivny, I. Hussainova, S. Vlassov, *Introduction to nanomaterials and nanotechnology*, University of Tartu, Tartu, 2007.

[2] S. Lukić-Petrovic, S. Carić, G. Štrbac, F. Skuban, I. Gut, T. Ivetić, D. Petrović, *Eksperimentalne tehnike za dobijanje i karakterizaciju materijala*, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 2018.

[3] S. P. Gubin, Y. A. Koksharov, G. B. Khomutov, G. Y. Yurkov, Russ Chem Rev. (2005) 74 (6) 489 - 520.

[4] S. Nagarajan and Z. Yong, Recent Pat. Biomed. Eng., 1 (2008) 34-42

[5] V. K. Varadan, L. Chen, J. Xie, *NANOMEDICINE - Design and applications of magnetic nanomaterials, nanosensors and nanosystems*, John Wiley & Sons, 2008.

[6] D. L. Schodek, P. Ferreira, M. F. Ashby, Nanomaterials, *Nanotechnologies and Design - An Introduction for Engineers and Architects*, Butterworth-Heinemann, 2009.

[7] Y. Gogotsi, Nanomaterials Handbook, CRC, 2006.

[8] D. Petrović, S. Lukić, *Eksperimentalna fizika kondenzovane materije*, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 2000.

[9] G. Cao, *Nanostructures & nanomaterials - synthesis, properties & applications*, Imperial College Press, 2004.

[10] Y. Hou, D. J. Sellmyer, *Magnetic Nanomaterials - Fundamentals, Synthesis and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017.

[11] S. J. Hurst, E. K. Payne, L. Qin, C. A. Mirkin, Angew. Chem. Int. Ed., 45 (2006) 2672–92.

[12] M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, R. M. Ibarra, J. Santamaría, Nano Today. (2007) 2 (3): 22–32.

[13] L. A. Bauer, N. S. Birenbaum, G. J. Meyer, J. Mater. Chem, 14 (2004) 517–26.

[14] A. L. Kozlovskiy, I. V. Korolkov, G. Kalkabay, M. A. Ibragimova, A. D. Ibrayeva, M. V. Zdorovets, V. S. Mikulich, D. V. Yakimchuk, A. E. Shumskaya, E. Yu. Kaniukov, J. Nanomater., (2017) ID 3060972, 9.

[15] R. Skomski, Simple Models of Magnetism, Oxford University Press, Oxford, 2008.

[16] S. P. Gubin, *Magnetic Nanoparticles*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.

[17] B. D. Cullity, C. D. Graham, *Introduction to magnetic materials, Second Edition*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009.

[18] C. Tapeinos, Smart Nanoparticles for Biomedicine, Chapter 9 – Magnetic Nanoparticles and Their Bioapplications, 131-142, Elsevier, 2018.

[19] Quora - What is the difference between ferromagnetism and ferrimagnetism?, https://www.quora.com/What-is-the-difference-between-ferromagnetism-and-ferrimagnetism

[20] K. H. J. Buschow, F. R. de Boer, *Physics of Magnetism and Magnetic Materials*, Kluwer Academic Publishers, 2004.

[21] D. L. Leslie-Pelecky, and Rieke, R.D., Chem. Mater., 8 (8) (1996)1770-83.

[22] W. F. Jr. Brown, Phys. Rev., 130 (1963) 1677-86.

- [23] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, J. Phys., 36 (2003) R167-R181.
- [24] A-H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, Angew. Chem. Int. Ed., 46 (2007) 1222 1244.

[25] S. H. Bossmann, H. Wang, *Magnetic Nanomaterials - Applications in Catalysis and Life Sciences*, Royal Society of Chemistry, 2017.

[26] C. Kumar, Magnetic nanomaterials, Wiley – VCH, 2009.

[27] Z. P. Liang, P. C. Lauterbur, *Principles of Magnetic Resonance Imaging: A Signal Processing Perspective*, Wiley-IEEE Press, 1999.

[28] J. Halavaara, P. Tervahartiala, H. Isoniemi, K. Hockerstedt, A cta Radiologica, 43 (2) (2002) 180 – 5.

[29] D. Koltsov, M. Perry, Phys. World, 17(7), 31-5, 2004.

[30] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, Chem. Rev., 108 (2008) 2064.

[31] R. Tietze, J. Zaloga, H. Unterweger, S. Lyer, R. P. Friedrich, C. Janko, M. Pöttler, S. Dürr,

C. Alexiou, Biochem. Biophys. Res. Commun, 468 (2015) 463-470.

[32] J. Dobson, Drug Dev. Res. (2006) 67:55–60.

[33] C. Alexiou, W. Arnold, R. J. Klein, F. G. Parak F G, P. Hulin, C. Bergemann, W. Erhardt, S. Wagenpfeil, A. S. Lubbe, Cancer Res. 60 (2000) 6641–8.

[34] J. A. Ritter, et al., J. Magn. Magn. Mater. 280 (2008) 184.

[35] I. Hilger, K. Fruhauf, W. Andra, R. Hiergeist, R. Hergt, W. A. Kaiser, Acad. Radiol., 9 (2) (2002) 198 – 202.

[36] J. van der Zee, Ann. Oncol, 13 (2002) 1173–1184.

[37] I. Hilger, W. Andra, R. Hergt, R. Hiergeist, H. Schubert, W. A. Kaiser, Radiology, 218 (2)
(2001) 570 – 5.

[38] W. C. Dewey, Int J Hyperthermia, 10 (4), 457 – 83, 1994.

[39] P. Moroz, S. K. Jones, B. N. Gray, Int J Hyperthermia, 18 (4) (2002) 267 – 84.

[40] R. Hergt, S. Dutz, R. Muller, M. Zeisberger, J. Phys.: Condens. Matter, 18 (2006) S2919– S2934.

[41] E. C. Abenojar, S. Wickramasinghe, J. Bas-Concepcion, A. C. S. Samia, Prog. Nat. Sci.: Mater. Int., 26 (2016) 440–448.

[42] Z. Nemati, J. Alonso, L. M. Martinez, H. Khurshid, E. Garaio, J. A. Garcia, M. H. Phan, H. Srikanth, J. Phys. Chem. C, 120 (2016) 8370–8379.

[43] J. Overgaard, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 16 (3) (1989) 535 – 49.

[44] J. Overgaard, D. Gonzalez Gonzalez, M. C. Hulshof, G. Arcangeli, O. Dahl, O. Mella, S. M. Bentzen, ESHO, Lancet, 345 (8949) (1995) 540 – 3.

[45] R. Engelhardt, Recent Results Cancer Res 104 (1987) 136 – 203.

[46] C. S. S. R. Kumar, F. Mohammad, Adv. Drug Delivery Rev., 63 (2011) 789–808.

[47] M. Ermrich, D. Opper, X-ray powder diffraction, XRD for the analyst, Getting acquainted with the principles, The Analytical X-ray Company, PANanlytical GmbH, 2011.

[48] Y. Waseda, E. Matsubara, K. Shinoda, X-Ray Diffraction Crystallography Introduction, *Examples and Solved Problems*, Springer, 2011.

[49] R. Guinebretière, X-ray Diffraction by Polycrystalline Materials, ISTE Ltd, 2007.

[50] JINR, Frank Laboratory of Neutron Physics, Department of Neutron Investigations of Condensed matter, *Laboratory Equipment*,

http://flnph.jinr.ru/images/content/Books/List_of_equipment_2018.pdf

[51] O.P. Choudhary, P. Choudhary, Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 6(5): (2017) 1877-1882.

[52] Scanning Electron Microscopy, https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electronmicroscopy/

[53] A. Nanakoudis, What is SEM? Scanning electron microscope technology explained, https://blog.phenom-world.com/what-is-sem

[54] J. Goodge, *Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS)*, Geochemical Instrumentation and Analysis, https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/eds.html

[55] How AFM Works, https://www.parksystems.com/index.php/en/medias/nano-academy/how-afm-works

[56] P. Eaton, P. West, *Atomic Force Microscopy*, Oxford University Press Inc., New York, 2010.[57] The Atomic Force Microscope (AFM), https://www.microscopemaster.com/atomic-force-microscope.html

[58] Atomic Force Microscope – Block Diagram, http://www.circuitstoday.com/nanotechnologytools-and-instruments/atomic-force-microscope-block-diagram

[59] Solver P47H SPM Instruction Manual,

http://www2.kuas.edu.tw/prof/dragon/solid/4afm/Instruction-Manual.pdf

[60] NT-MDT Spectrum Instruments, Amplitude Modulation AFM, https://www.ntmdtsi.com/resources/spm-principles/atomic-force-microscopy/amplitude-modulation-afm

[61] S. A. James, L. C. Powell, C. J. Wright, *Atomic Force Microscopy of Biofilms – Imaging, Interactions, and Mechanics*, IntechOpen, 2016.

[62] R. F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy, An Introduction to TEM, SEM, and AEM*, Springer, 2005.

[63] Y. Leng, Materials Characterization Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods, JohnWiley & Sons (Asia) Pte Ltd, 2008.

[64] Transmission Electron Microscopy (TEM),

https://warwick.ac.uk/fac/sci/physics/current/postgraduate/regs/mpagswarwick/ex5/techniques/st ructural/tem/

[65] What is Raman Spectroscopy?, https://www.horiba.com/en_en/raman-imaging-and-spectroscopy/

[66] Princeton Instruments – Raman spectroscopy basics,

http://web.pdx.edu/~larosaa/Applied_Optics_464

564/Projects_Optics/Raman_Spectrocopy/Raman_Spectroscopy_Basics_PRINCETON-

INSTRUMENTS.pdf

[67] D. Casimir, H. Alghamdi, I. Y. Ahmed, R. Garcia-Sanchez, P. Misra, *Raman Spectroscopy of Graphene, Graphite and Graphene Nanoplatelets*, IntechOpen, 2019.

[68] N. Hilal, A. F. Ismail, T. Matsuura, D. Oatley-Radcliffe, *Membrane Characterization*, Elsevier, 2017.

[69] UC Davis ChemWiki,

http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_Spectrosc opies/Electron_Paramagnetic_Resonance/EPR%3A_Theory

[70] J. Kwon, H. M. Shahbaz, J. Ahn, *Advanced Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy for the Identification of Irradiated Food*, American Laboratory[®],

https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/154111-Advanced-Electron-

Paramagnetic-Resonance-Spectroscopy-for-the-Identification-of-Irradiated-Food/

[71] N. T. K. Thanh, Magnetic Nanoparticles, *From Fabrication to Clinical Applications*, CRC Press, 2012.

[72] C. R. H. Bahl, M. F. Hansen, T. Pedersen, S. Saadi, K. H. Nielsen, B. Lebech, S. Mørup, J. Phys. Condens. Matter, 18 (2006) 4161–4175.

[73] C. Frandsen, H. K. Rasmussen, S. Mørup, J. Phys. Condens. Matter, 16 (2004) 6977–6981.

[74] M. D. Dyar, *Mössbauer Spectroscopy*, Geochemical Instrumentation and Analysis, https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/mossbauer.html

[75] K. Adach, M. Fijalkowsky, G. Gajek, J. Skolimowski, R. Kontek, A. Blaszczyk, Chem Biol Interact, 254 (2016) 156-166.

[76] T. Mosmann, J Immunol Methods, 65 (1983) 55-63

[77] T. Hahn, International Tables for Crystallography, Springer, 2005.

[78] J. F. de Carvalho, S.N. de Medeiros, M.A. Morales, A.L. Dantas, A.S. Carrico, Appl Surf Sci.275 (2013) 84–87.

[79] Online Dictionary of CRYSTALLOGRAPHY – R-factor,

http://reference.iucr.org/dictionary/R_factor

[80] C. Suryanarayana, M. Grant Norton, *X-Ray Diffraction, A Practical Approach*, Springer Science+Business Media, LLC, New York, 1998.

[81] A. L. Kozlovskiya, A. E. Ermekovaa, I.V. Korolkova, D. Chudobac, M. Jazdzewska, K. Ludzikc, A. Nazarovad, B. Marciniak, R. Kontekf, A.E. Shumskayah, M.V. Zdorovetsa, Vacuum, 163 (2019) 236-247.

[82] ANGSTROM SCOENCES – Sputter Coating - Sputter Deposition,

https://www.angstromsciences.com/sputter-coating

[83] LTS Research Laboratories, Inc., Safety Data Sheet, Iron chloride,

https://www.ltschem.com/msds/FeCl3.pdf

[84] PC. Panta, CP. Bergmann, J Material Sci Eng (2015) 5:1

[85] E. I. Bîru, H. Iovu, Graphene Nanocomposites Studied by Raman Spectroscopy, IntechOpen, 2018.

[86] M. Yakemseva, I. Dierking, N. Kapernaum, N. Usoltseva, F. Giesselmann, Eur. Phys. J. E (2014) 37: 7.

[87] Y. Estévez-Martínez, C. Velasco-Santos, AL. Martínez-Hernández, G. Delgado, E. Cuevas-Yáñez, D. Alaníz-Lumbreras, S. Duron-Torres, V. M. Castaño, J. Nanomater., (2013), ID 702157,
9

[88] B. Dobosza, R. Krzyminiewskia, J. Kurczewskab, G. Schroederb, J. Magn. Magn. Mater, 429 (2017) 203-210

[89] medicaonline - Henrietta Lacks halhatatlansága,

http://medicalonline.hu/tudomany/cikk/henrietta_lacks_halhatatlansaga

[90] Fetal Bovine Serum (FBS) for cell culture, https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/cell-culture-products.html?TablePage=9628642

Prilog

Rezultati, diskusija i zaključak na engleskom jeziku

Results and discussion

Within the experimental part of this thesis, structrual, microstructural and magnetic properties of six samples of magnetic nanoparticles were investigated. In addition, the cytotoxicity of one sample was examined.

Four of the samples are iron oxide-based magnetic nanoparticles which were synthetized by the group of dr Artem Kozlovskiy from The Institute of Nuclear Physics in Kazakhstan.

Two of these nanoparticles were synthetized by chemical deposition whereby the source components were iron(II) and (III) chloride and ammonium hydroxide. One of the samples (Fe_3O_4) was obtained at room temperature without subsequent thermal treatment, while the other sample ($Fe_3O_4 \ 600 \ ^{\circ}C$) was annealed at temperature of 600 $^{\circ}C$.

The third sample (*cerium doped iron oxide nanoparticles*) was obtained by chemical synthesis of $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, HCl and NaOH as source materials. After the synthesis, thermal treatment was applied at 400 °C.

For the synthesis of the fourth sample (PVP- Fe_3O_4), a solution of FeSO₄·7H₂O and surfactant (food gelatin and poly-vinyl-pyrrolidone (PVP)) was used. NaOH was used to regulate the pH, and hydrazine hydrate solution (N₂H₄·H₂O) was used as the reducing agent.

The other group of the investigated nanoparticles consist of the carbon nanotubes doped with 52 wt% Fe (*CNTs 52 wt% Fe*) and with 52 wt% Co (*CNTs 52 wt% Co*) nanoparticles. They are ordered from Nanografi Company, and they were synthetized by chemical vapor deposition (CVD). Carbon-rich herbal extracts were used as precursor materials. After evaporation, the vapor is transported to the furnace onto various different pre-catalyzed substrates. Catalysis materials were nano-sized forms of iron or cobalt complexes coated on substrates. The growth of doped carbon nanotubes took place in the furnace at controlled temperatures between 500-1100 °C. Doping of carbon nanotubes with metal nanoparticles effectively improves their physical properties.

Structural and morphological analysis of the samples

Phase identification and structure determination from the samples were performed by Xray powder diffraction method. XRD measurements were carried out using CuK_{α} (K_{α 1}=1.540560 Å and K_{α 2}=1.544330 Å) in the range of 2 θ from 18° to 85° for the *Fe*₃*O*₄ and *Fe*₃*O*₄ at 600 °C, from 15° to 85° for the other samples, except *PVP-Fe*₃*O*₄ (from 15° to 80°). HighScore Plus database was used to index the peaks.

Rietveld analysis (structure profile refinement) for two samples (Fe_3O_4 – Figure 5.1 and Fe_3O_4 at 600 °C – Figure 5.2) was performed using FullProf program.

According to the results, the first sample (Figure 5.1) could be indexed to cubic Fe₃O₄ phase ($Fd\overline{3}m$ (227) sapce group [77]). The major diffractions were observed from (220), (311), (400), (331), (422), (511), (440), (620), (533) and (444) planes of Fe₃O₄. The average unit cell parameter calculated from the XRD data is a=8.369 Å, which is smaller than the value in literature and may be the results of partial oxidation of Fe²⁺ in the magnetite structure [78].

Bragg R-factor²⁵ for the refinement is 2.137 and the RF-factor is 4.035. These values indicate a good refinement, which means that experimental data is in good agreement with the crystallographic model.

Diffraction peaks are broadened, as it is expected for nanoparticles because of the small crystallite size. The average crystallite size (L) was calculated using the Scherrer equation:

$$L = \frac{k\lambda}{B\cos\theta}$$

where k is a constant, λ is the wavelength of the used radiation, B is the half-breadth of a peak (*Full Width at Half Maximum – FWHM*) and θ is the Bragg angle. The constant k can have a value between 0.89 and 1.39 [70]. In the calculation k=0.9 was used, which is common is such research [81]. FWHM was determined using the programs WinPLOTR and Origin.

The calculated average crystallite size for Fe_3O_4 is 12.3 nm.

In Figure 5.2, the diffraction peaks observed from crystal planes (012), (104), (110), (006), (113), (202), (024), (116), (018), (214), (300), (208), (1 0 10), (217), (312), (0 2 10) and (134) matched with the phase of α -Fe₂O₃ (hematite). Its crystal form belongs to trigonal crystal system (space group number 167, symbol $R\overline{3}c$ [77]). The calculated unit cell parameters are a=b=5.037 Å

²⁵ R-factor (reliability factor) is a measure of agreement between a crystallographic model and the original X-ray diffraction data [79]. Bragg R-factor is based on the reflection intensity, while the RF-factor is based on the structural factor.

and c=13.756 Å, which is in good agreement with the database. Narrow, sharp peaks on this XRD pattern indicate the crystalline phase of the material. For this refinement the Bragg R-factor is 5.306 and the RF-factor is 6.228, which also indicate a good refinement. The calculated crystallite size is 28.2 nm.

This sample is synthetized by the same method as the first one, but in this case thermal annealing at 600 °C was applied to the synthetized particles. In the temperature range between room temperature and 600 °C, phase transformation of magnetite to maghemite (γ -Fe₂O₃) and maghemite to hematite takes place according to the following scheme [81]:

$$4Fe_{3}O_{4} + O_{2} \xrightarrow{300-400^{\circ}C} 6 \gamma - Fe_{2}O_{3} \xrightarrow{>500^{\circ}C} 6 \alpha - Fe_{2}O_{3}$$

During this treatment, agglomeration of nanoparticles can occur. It is the reason why the calculated particle size for this sample is larger than for the first one.

For the samples *cerium doped iron oxide nanoparticles*, *PVP-Fe₃O₄*, *CNTs 52 wt% Fe* and *CNTs 52 wt% Co*, Rietveld refinement would be too complicated because of the many different phases that are present. The reflection of the obtained diffraction patterns for these samples were manually indexed according to the used database and shown in Figure 5.3.

Indexed peaks of the sample *Ce doped iron oxide nanoparticles* (Figure 5.3 a)) originate from CeO₂, which has cubic (fluorite) stucture and belongs to space group 225 ($Fm\bar{3}m$) [77]. The formation of CeO₂ may be due to thermal treatment (annealing) in an oxygen-containing medium. The intensity of the peaks originating from iron oxide is much smaller than the intensity of the peaks of cerium(IV)-oxide and therefore cannot be identified on the obtained XRD pattern. Broad diffraction peaks indicate very small size crystallites, the calculated average value is 4.9 nm. The diffraction pattern of *PVP-Fe₃O₄* is shown in Figure 5.3 b). The background originates from the equipment. The indexed peaks are characteristic for magnetite, which means that the polymeric surfactant cannot affect the crystal structure of the particles. The average crystallite size is 32 nm.

Figure 5.3 c) shows the XRD diffraction pattern of carbon nanotubes doped with 52 wt% Fe nanoparticles. The broadened peak at $2\theta=26.2^{\circ}$ corresponds to diffranction from the plane (002) of the graphitic structure, i.e. originates from carbon nanotubes. In addition to peaks originating from iron ($2\theta=44.7$, $2\theta=65$ i $2\theta=82.3$), several peaks corresponding to iron(II,III) oxide (Fe₃O₄) can be identified.

The XRD diffraction pattern of carbon nanotubes doped with 52 wt% Co nanoparticles is shown in Figure 5.3 d). The broadened peak at at $2\theta=26.2^{\circ}$ originating from carbon nanotubes can

also be seen on this diffraction pattern. Peaks originating from cobalt(II,III)-oxide (Co₃O₄) were also identified and indexed.

The formation of iron and cobalt oxides is possible during the synthesis at high temperatures in the furnace.

Morphological and elemental analysis of the samples were performed using SEM/EDS technique.

BAL-TEC SCD005 Sputter Coater was used for sample preparation for this examination in order to improve the imaging of the samples. Sputter coating is a physical vapor deposition (PVD) process, which is used to apply a very thin, functional coating on the samples [82]. The duration of gold sputtering was 100 s with current of 30 mA. Prepared samples are shown in Figure 5.4. SEM investigation was performed for magnetite based nanoparticles. SEM examination of carbon nanotubes cannot give useful information, because it cannot show their inner structure only their surface, thus it was not performed.

SEM images are shown in Figure 5.5. The well-pronounced aggregation of the undoped magnetite and hematite particles (Figure 5.5 a) and b) respectively) may be due to the synthesis method or may occur during placing the samples on the sample holder, since no methods for aggregation prevention was applied. As it can be seen from the Figure 5.5, the aggregation of cerium-doped (Figure 5.5 c)) and *PVP-Fe*₃O₄ (Figure 5.5 d)) iron oxide particles is less prominent.

The element distribution maps and the EDS results for Fe_3O_4 , α - Fe_2O_3 , Ce doped iron oxide nanoparticels and PVP- Fe_3O_4 are shown in Figure 5.6 a) and b) and in Figure 5.7 a) and b), respectively. The carbon present in all samples may be due to contamination of the sample surface and / or the chamber. Peaks originating from gold are present because of the coating.

In the sample Fe_3O_4 (Figure 5.6 a)), synthetized at room temperature, the presence of chlorine (Cl) can be observed. During the synthesis by the used method, iron(III)-chloride (FeCl₃) can be formed and remain traces in the sample. The decomposition temperature of this compound is 316 °C and therefore it is not present in samples synthetized at higher temperatures (α -*Fe*₂*O*₃ (Figure 5.6 b)) and Ce doped iron oxide nanoparticles (Figure 5.7 a))) or by another synthesis method (*PVP*-*Fe*₃*O*₄ (Figure 5.7 b))).

Although, only peaks originating from CeO_2 can be seen on the XRD pattern of the sample Ce doped iron oxide nanoparticles, EDS analysis reveals the presence of iron and oxygen (Figure 5.7 a)). This is understandable since the precision of the used techniques is different.

Topography and morphology of the samples were studied by AFM.

For sample preparation, aqueous solution of hexadecyltrimethylammonium bromide surfactant (~2%) was used in order to prevent aggregation. 1 ml of surfactant solution was added to 20 mg of each sample, and the mixtures were ultrasonicated for 30 minutes, in order to improve the dispersion of the particles in the solution and the surfactant adsorption on the sample surface. 1 μ l of the mixtures were dropped on the sample holders. The final step in the sample preparation process was the drying the samples at room temperature until the water has evaporated.

AFM images were obtained by non-contact mode using SmartScan software and analyzed by program XEI. Two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) AFM images are shown in Figure 5.8 and Figure 5.9 AFM images of the samples Fe_3O_4 , α - Fe_2O_3 , Ce doped iron oxide nanoparticles and PVP- Fe_3O_4 (Figure 5.8 a), b), c), d) respectively), show nearly spherical particles, relatively uniform particle size and moderate aggregation. According to the AFM images, carbon nanotubes doped with 52 wt% Fe and 52 wt% Co nanoparticles ((Figure 5.9 a) and b), respectively), have nearly uniform size and shape. The obtained average outside diameter is about 50 nm.

Transmission electron microscope was used to determine the particle size and compare it with the calculated ones from X-ray diffraction data for iron oxide-based samples and also, to analyze the structure of carbon nanotubes doped with metallic nanoparticles. The samples were prepared by drop casting and dried under vacuum on commercially available copper grids. The average particle size of the nanoparticles and the outer diameter of the nanotubes were determined using the program ImageJ.

According to TEM images (Figure 5.10 a), b), c) and d)), the particle size of Fe_3O_4 , α - Fe_2O_3 , PVP- Fe_3O_4 and Ce doped iron oxide nanoparticles is 11.9 nm, 26.7 nm, 5.3 nm and 45.6 nm, respectively. The results obtained for Fe_3O_4 , α - Fe_2O_3 and Ce doped iron oxide nanoparticles are in good agreement with the calculated values based on the data obtained by X-ray diffraction. In Figure 5.10 b), a pronounced particle aggregation can be seen for the sample α - Fe_2O_3 , which confirms the results obtained by SEM. The large difference in particle size for PVP- Fe_3O_4 may be due to the presence of the background in the diffractiogram, which affects the accuary of determing FWHM. Figure 5.10 e) and f) reveal that the structure of carbon nanotubes contain metallic nanoparticles of different size and randomly distributed. Such a structure is due to the used synthesis method. The structure of carbon nanotubes doped with iron nanoparticles contains particles of approximately spherical shape that are clearly visible, however, this is not the case with carbon nanotubes doped with cobalt nanoparticles. The measured outer diameter of the nanotubes is about 50 nm, which is in good agreement with the AFM results.

Raman spectra were obtained at room temperature using Renishaw WiRE 3.3 software. The excitation source was red laser (wavelength 633 nm and power 12 mW). 50x objective lens were used to focus the laser beam on the sample.

The Raman spectrum of Fe_3O_4 (Figure 5.11 a)) was recorded by laser intensity of 50% (power 6 mW). Peaks at 220, 286, 400, 487, 603, 654 and 1300 cm⁻¹ are characteristic to hematite (α -Fe₂O₃). Oxidation of the sample of Fe₃O₄ can occur during the experiment because of the high intensity of the laser [84]. The experiment was repeated with laser intensity of 1% and the recorded spectrum is shown in Figure 5.11 b). The peak at ~670 cm⁻¹ is the characteristic peak of magnetite.

The marked peaks in Figure 5.12 correspond to hematite, thus, the data from the Raman spectrum confirmed the XRD results for this sample.

The expressed peak around 457 cm⁻¹ in Figure 5.13 is attributed to the molecule CeO₂, while the peaks around 654 cm⁻¹ and 1300 cm⁻¹ correspond to the typical frequencies observed for α -Fe₂O₃. The appearance of hematite on the spectrum is due to the oxidation of the sample during the experiment. The measurement was repeated with laser intensity of 1% and the obtained spectrum is shown in Figure 5.13. The peak at 705 cm⁻¹ is characteristic of maghemite (γ -Fe₂O₃), which can occur during thermal treatment at 400 °C. X-ray diffraction shows only the peaks originating from CeO₂, EDS analysis reveals the presence of iron and oxygen in the sample, but Raman spectroscopy provides information that they are present in the form of hematite. The formation of hematite may be due to the thermal treatment (annealing) after synthesis.

Raman spectrum of PVP coated magnetite nanoparticles (Figure 5.14) was obtained with low incident laser power (5%, 0.6 mW) in order to avoid sample degradation. This spectrum shows an intensive peak around 670 cm⁻¹, which is the characteristic peak of magnetite. The polymer used during the synthesis does not strongly affect the spectrum.

In the Raman spectra of carbon nanotubes doped with 52 wt% of iron nanoparticles (Figure 5.15 a)), D (1329 cm⁻¹), G ((~1600 cm⁻¹) and 2D (or G', 2667 cm⁻¹) bands can be observed, which are characteristic for the carbon nanotubes. The D band indicates defects in the structure of the nanotubes. In doped nanotubes, imperfections are due to the presence of nanoparticles in their structure. The G band can be associated with the sp² hybridization of carbon atoms in the nanotube

wall. The G band in the spectrum has a doublet structure with peaks G1 (1584 cm⁻¹) and G₂ (1617 cm⁻¹), which originate from tangential vibration parallel and normal to the axis of the nanotubes [85, 86]. The 2D band is the second harmonic of the D band. Peaks in the range of 150 to 800 cm⁻¹ are characteristic peaks of hematite. During the experiments, the sample was oxidized in this case well. The spectrum recorded with laser intensity of 1% is shown in Figure 5.15 b). Characteristic peaks for magnetite cannot be identified due to low resolution, which is the result of the use of low-intensity laser, but no hematite peaks occur in the spectrum.

In addition to the bands D (1330 cm⁻¹), G (1581 cm⁻¹) and 2D (2657 cm⁻¹), Raman spectrum of carbon nanotubes doped with 52 wt% cobalt nanoparticles, shows the D+G (2913 cm⁻¹) band, which is also related to the defect in the nanotubes structure as well as to the disordered symmetry of sp² carbon networks [87].

Magnetic properties of the samples

Electron paramagnetic resonance spectroscopy was used to determine the g-factor of the samples and the line width from peak to peak (ΔB). The obtained values are given in Table 5.1, and the EPR spectra of the samples are shown in Figure 5.17. The experiments were performed at room temperature with a microwave frequency of ~9.7 GHz and power of ~7.9 mW.

EPR signals can be obtained when the energy of the incident photon (hv) is equal to the difference between adjacent energy levels. This is described by the resonant condition:

$h\nu = g\mu_B B$

where *h* is the Planck constant, v microwave frequency, *g* is labeled by the g-factor (spectroscopic splitting factor, Landé's²⁶ g-factor or dimensionless magnetic moment), which determines the line position, μ_B is Bohr²⁷ magneton, and B is the induction of the applied magnetic field [88].

Based on the particle size obtained by XRD and TEM for Fe_3O_4 , it is expected that this sample has a single-domain structure and exhibit superparamagnetic behavior. However, the results of EPR spectroscopy (Figure 5.17 a)) indicate that this samples is a strong magnetic and has a multidomain structure, which may due to the aggregation of fine particles. The sample α - Fe_2O_4 (Figure 5.17 b)), based on the calculated crystallite size, is not superparamagnetic, and it is

²⁶ Alfred Landé (1888-1976) – German-American physicist

²⁷ Niels Henrik David Bohr (1885-1962) – Danish physicist
confirmed by the EPR results. The spectrum of this sample is characterized by a doublet, indicating heterogeneous material. This may indicate that other iron oxides are present in the sample. The EPR spectrum of the CeO_2 - Fe_2O_3 (Figure 5.17 c)) reveals changes in the magnetic behavior of multidomain particles. These changes can be caused by superparamagnetic particles present in the sample. Sample PVP- Fe_3O_4 (Figure 5.17 d)) is a strong magnetic as well as pure Fe_3O_4 and does not consist of superparamagnetic particles. In the spectrum of CNTs 52 wt% Fe (Figure 5.17 e)), the signal of carbon is not visible. Broad lines indicate a strong interaciton between the iron nanoparticles, which may be due to the fin grains in the nanotube structure. The spectrum of CNTs 52 wt% Co (Figure 5.17) reveals that this sample is a strong magnetic and does not exhibit superparamagnetic hebavior.

Based on the results of EPR spectroscopy, three samples (Fe_3O_4 , CeO_2 - Fe_2O_3 and CNTs 52 wt% Fe) were selected which magnetic properties were analyzed in detail using Mössbauer spectroscopy.

If the atom has a magnetic moment which is stable in space and time (it is in a magnetically ordered structure) then at the nucleus there is a magnetic field and in the Mössbauer spectrum the six lines (which is called sextet) are observed. If an electric field gradient from the electron shell without a magnetic field occurs at the nucleus then in spectrum two lines (doublet) are observed. In the case of symmetrical distribution of charge in the spectrum, a single line (monoline) is observed. Therefore, if the spectrum consists of a sextet or several sextets it can be concluded that the sample is a ferro- or ferrimagnetic, while the appearance of a doublet or a mono-line indicates that the sample is paramagnetic or under specific conditions can exhibits superparamagnetic properties.

Mössbauer spectroscopic measurements of selected samples – Fe_3O_4 , CeO_2 - Fe_2O_3 and CNTs 52 wt% Fe – were performed at room temperature (295 K) and the spectra are shown in Figure 5.18, Figure 5.19, Figure 5.20, respectively.

Three sextets can be seen in the spectrum of Fe_3O_4 . The component associated with Fe ions located in octahedral positions is indicated by a red line. The blue line indicates the component with Fe ions located in the tetrahedral positions and the third sextet (purple line) is the component associated with Fe atoms located at the surface of the nanoparticles. Sextets in the spectrum confirm the results of EPR, i. e. that the sample Fe_3O_4 has an ordered magnetic structure and is not

superparamagnetic. Aggregation, which is also seen in SEM images, is inevitable in the case of these particles.

The obtained spectrum for CeO_2 -Fe₂O₃ nanoparticles is composed only of superparamagnetic doublets. This means that all nanoparticles in the sample are in a superparamagnetic state. This result indicates that the sample consists of very small nanoparticles with a very narrow crystallite size distribution. These studies are consistent with the results obtained from the XRD method.

The spectrum obtained for CNTs doped with 52 wt% Fe nanoparticles at room temperature is presented in Figure 5.20. Three sextets and two doublets are marked in the analyzed spectrum. There are both magnetic components and paramagnetic components (doublets). XRD spectra of these nanotubes presented significantly broadened diffraction peaks which indicate the presence of very small, i.e. nanometer sized iron and magnetite particles. The magnetic properties of nanoparticles can differ significantly from the same compounds in mass form. Considering smaller and smaller sizes, it can be seen that for some critical crystallite size the energy of magnetic anisotropy becomes comparable to thermal energy. As a result the thermal oscillations of the magnetic moments of the particles appear as superparamagnetic behavior. We can concluded that the doublets observed in the central part of spectrum are associated with superparamagnetic oscillations of magnetic moments in single-domain nanoparticles of the smallest size. The obtained Mössbauer spectrum show the coexistence in this sample the ferromagnetic and superparamagnetic phases. Some of the nanoparticles with the smallest size oscillate towards the direction of the magnetic anisotropy axis and behave like the paramagnetic atoms. The other nanoparticles in which the magnetic anisotropy energy is higher than the thermal energy remain in a steady state.

Determination of cytotoxicity of cerium doped iron oxide nanoparticles on the metabolic activities of HeLa cells

The determination of cytotoxicity of cerium doped iron oxide nanoparticles on the metabolic activities of HeLa cells was performed by MTT assay and the results are shown in Figure 5.21. It can be said that the impact of investigated nanoparticles on the metabolic activity of HeLa cell is marginal. As well, in the experimental series the tested nanoparticles exhibited no toxic behavior also in series without fetal bovine serum (FBS), what is unusual for vast majority of nanoparticles [75]. These results are optimistic and indicate that presented nanoparticles can be

considered as a potential drug delivery system. Nevertheless, it should be pointed that cytotoxicity of nanoparticles may be different for various cell lines and can be determined for example by particle size.

Conclusion

In this master thesis, iron oxide-based magnetic nanoparticles and carbon nanotubes doped with metallic nanoparticles were characterized.

Structural analysis of magnetite and hematite nanoparticles obtained by chemical deposition indicates that these particles tend to aggregate, which is undesirable for their application in biomedicine. Due to the aggregates present, magnetite nanoparticles do not exhibit superparamagnetic behavior required for their application as a contrast agent in MRI. For magnetite nanoparticles obtained in polymer solution (PVP), no aggregation occurs, however, the size of the obtained particles is above the superparamagnetic limit, which limits their biomedical application. Carbon nanotubes doped with cobalt nanoparticles based on the EPR spectrum act as a strong magnetic.

The results of Mössbauer spectroscopy of the samples CeO_2 - Fe_2O_3 and carbon nanotubes doped with iron nanoparticles indicate the superparamagnetic behavior of these materials. In the first sample, this property was expected based on the average crystallite size, which was calculated from X-ray diffraction data and confirmed by TEM image analysis. Iron and iron oxide nanoparticles of various size are present in the structure of carbon nanotubes as a result of CVD synthesis. The size of some of these particles is below the superparamagnetic limit. The magnetic properties of these samples indicate their potential application in biomedicine.

In addition, cytotoxicity analysis of the CeO_2 - Fe_2O_3 sample reveals that its toxicity to the metabolic activity of HeLa cells is minimal, which means that these nanoparticles can be considered as potential materials for controlled drug delivery.

Opportunities for further research include the additional study of toxicity on various cell lines, the functionalization of nanoparticles and the binding of appropriate drugs to them.

Biografija



Šarolta Cako je rođena 19.03.1995. godine u Senti. U rodnom gradu je završila osnovnu školu "Stevan Sremac" i "Srednju Medicinsku Školu – Senta", obe kao đak generacije. Osnovne akademske studije fizika – istraživački smer na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu je upisala 2014. godine, a završila 2018. Iste godine je upisala master akademske studije na Departmanu za Fiziku, smer Fizika materijala.

2017. godine je prisustvovala na Međunarodnoj Konferenciji Studenata Fizike (ICPS) u Torinu, gde je prezentovala svoj rad. 2018. godine je učestvovala na letnjoj stručnoj praksi u institutu Wigner u Budimpešti, Mađarska i na Međunarodnoj Studentskoj Praksi u Objedinjenom Institutu za Nuklearna Istraživanja u Dubni, Rusija.

Dobitnik je stipendije Mađarskog Nacionalnog Saveta (MNT), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Fonda za stipendiranje i podsticanje napredovanja darovitih studenata i mladih naučnih radnika i umetnika Univerziteta u Novom Sadu, Fonda za mlade talente Republike Srbije – Dositeja kao i Varadi stipendije izuzetnosti.

UNIVERZITET U NOVOM SADU PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET KLJUČNA DOKUMENTACIJA INFORMACIJE

Redni broj:	
RBR	
Identifikacioni broj:	
IBR	
Tip dokumentacije:	Monografska dokumentacija
TD	
Tip zapisa:	Tekstualni štampani materijal
TZ	
Vrsta rada:	Master rad
VR	
Autor:	Šarolta Cako
AU	
Mentori:	Prof. dr Svetlana Lukić-Petrović
	dr Monika Jażdżewska
MN	
Naslov rada:	Karakterizacija magnetnih nanočestica na bazi oksida
	gvožđa i ugljeničnih nanocevi dopiranih metalnim
	nanočesticama kao potencijalnih materijala za
	biomedicinsku primenu
NR	
Jezik publikacije:	srpski (latinica)
JP	
Jezik izvoda:	srpski / engleski
JI	
Zemlja publikovanja:	Republika Srbija
ZP	

Uže geografsko područje:	Vojvodina
UGP	
Godina:	2019
GO	
Izdavač:	Autorski reprint
IZ	
Mesto i adresa:	Prirodno-matematički fakultet,
	Trg Dositeja Obradovića 4, Novi Sad
MA	
Fizički opis rada:	7 poglavlja / 61 strana / 90 literaturni citat / 2 tabele /
	43 slika / 1 prilog
FO	
Naučna oblast:	Fizika
NO	
Naučna disciplina:	Fizika materijala
ND	
Predmetna odrednica / ključne reči:	Nanomaterijali, magnetizam, superparamagnetizam,
	biomedicina,
PO	
KR	
Čuva se:	Biblioteka Departmana za fiziku, PMF-a Novom Sadu
ČU	
Važna napomena:	Nema
VN	
Izvod:	U ovom radu su prikazani rezultati karakterizacije
	uzoraka magnetnih nanočestica na bazi oksida gvožđa i
	magnetne nanocevi dopirane metalnim nanočesticama.
	Strukturna analiza i određivanje veličina magnetnih
	nanočestica je izvedena pomoću difrakcije X-zraka. Za
	ispitivanje morfologije uzoraka su korićeni SEM, AFM i
	TEM. Elementarna analiza magnetnih nanočestica je

urađena EDS tehnikom, ispitivanje magnetnih osobina je izvedena EPR i Mezbauerovo spektroskopijom, a za određivanje citotoksičnosti je korišćen MTT test. Ustanovljeno je da nanočestice dobijene hemijskom metodom bez korišćenja surfaktanta imaju tendenciju za agregaciju, aukoliko se koristi surfaktant pri sintezi, dobijaju nanočestice veličine iznad se superparamagnetne granice. Rezultati pokazuju da superparamagnetizam se javlja kod cerijumom dopiranih nanočestica oksida gvožđa i ugljeničnih nanocevi dopiranih 52 wt% nanočestica gvožđa. Ustanovljeno je da cerijumom dopiranie nanočestice gvožđe oksida imaju minimalni uticaj na metaboličku aktivnost HeLa ćelija, što ukazuje na to da su ove nanočestice potencijalni materijali za biomedicinsku primenu.

IZ

12. septembar 2019.

DP

Datum odbrane:

Datum prihvatanja teme:

DO

Članovi komisije:

Predsednik:

Mentor:

Član:

ко

27. septembar 2019.

dr Olivera Klisurić, redovni profesor Prirodnomatematičkog fakulteta u Novom Sadu dr Svetlana Lukić-Petrović, redovni profesor Prirodnomatematičkog fakulteta u Novom Sadu dr Petar Mali, docent Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD FACULTY OF SCIENCES KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:	
ANO	
Identification number:	
INO	
Document type:	Monograph publication
DT	
Type of record:	Textual printed material
TR	
Content code:	Master thesis
CC	
Author:	Šarolta Cako
AU	
Mentors:	Svetlana Lukić-Petrović Prof. PhD
	Monika Jażdżewska PhD
MN	
Title:	Characterization of iron oxide-based magnetic
	nanoparticles and carbon nanotubes doped with metallic
	nanoparticles as potential materials for biomedical
	application
TI	
Language of text:	Serbian (Latin)
LT	
Language of abstract:	English
LA	
Country of publication:	Republic of Serbia
СР	

Locality of publication:	Vojvodina
LP	
Publication year:	2019
PY	
Publisher:	Author's reprint
PU	
Publication place:	Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 4,
	Novi Sad
PP	
Physical description:	7 chapters / 61 pages / 90 references / 2 tables /
	43 pictures / 1 appendix
PD	
Scientific field:	Physics
SF	
Scientific discipline:	Material Physics
SD	
Subject / Key words:	Nanomaterials, magnetism, superparamagnetism,
	biomedicine
SKW	
Holding data:	Library of Department of Physics,
	Trg Dositeja Obradovića 4, Novi Sad
HD	
Note:	None
Ν	
Abstract:	This thesis presents the results of characterization of iron
	oxide-based magnetic nanoparticles and magnetic
	nanotubes doped with metallic nanoparticles. Structural
	analysis and particle size was performed using X-ray
	diffraction. SEM, AFM and TEM were used for
	morphological analysis. Elemental analysis of the
	magnetic nanopartciles was done by EDS technique,

investigation of the magnetic properties was performed by EPR and Mössbauer spectroscopy and MTT assay was used to determine cytotoxicity. The results of the stuctural analysis show that nanoparticles sinthetized by chemical method without using a surfactant tend to aggregate. If a surfactant is used in the synthesis, the size of the obtained nanoparticles is above the superparamagnetic limit. According to the results of Mössbauer spectroscopy, superparamagnetism occurs in cerium doped iron oxide nanoparticles and carbon nanotubes doped with 52 wt% iron nanoparticles. Cerium doped iron oxide nanoparticles have minimal impact on the metabolic activity of HeLa cells, which indicates thath these nanoparticles can be considered as potential materials for biomedical application.

Accepted by the Scientific Board:	September 12, 2019
ASB	
Defended on:	September 27, 2019
DE	
Thesis defend board:	
President:	Olivera Klisurić PhD, Full Professor, Faculty of
	Sciences, Novi Sad
Mentor:	Svetlana Lukić-Petrović PhD, Full Professor, Faculty of
	Sciences, Novi Sad
Member:	Petar Mali PhD, Assistant Professor at Faculty of
	Sciences, Novi Sad

DB

AB