



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (Ι)**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΝΑΝΟΪΛΙΚΩΝ ΓΙΑ  
ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ  
ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Δημήτριος Συσής**

**ΕΠΙΒΛΕΨΗ:**

**Ε.Α. ΠΑΥΛΑΤΟΥ**

**Καθηγήτρια Ε.Μ.Π**

**ΑΘΗΝΑ**

**Οκτώβριος, 2022**



**NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS**  
**SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING**  
**DEPARTMENT OF CHEMICAL SCIENCES (I)**  
**GENERAL CHEMISTRY LABORATORY**

**DEVELOPMENT OF HYBRID NANOMATERIALS  
FOR PHOTODYNAMIC THERAPY AND STUDY  
OF THE ROS PRODUCTION MECHANISM**

**DIPLOMA THESIS**

**Dimitris Sypsis**

**SUPERVISED BY:**

**E.A. PAVLATOU,**

**Professor NTUA**

**ATHENS**

**October, 2022**

## Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT .....	6
GRAPHICAL ABSTRACT.....	7
Κεφάλαιο 1 <sup>ο</sup> :.....	8
Η φωτοδυναμική θεραπεία στον καρκίνο .....	8
1.1. Εισαγωγή .....	8
1.2. Φωτοχημική αρχή .....	10
1.3. Δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) .....	11
1.3.1. Μηχανισμοί σχηματισμού ROS .....	11
1.3.2. Επίδραση των ROS στα καρκινικά κύτταρα <sup>[10]</sup> .....	16
1.4. Φωτοευαισθητοποιητές.....	19
1.4.1. Φωτοευαισθητοποιητές πρώτης και δεύτερης γενιάς .....	23
1.4.2. Φυσικο-χημικές ιδιότητες προηγμένων φωτοευαισθητοποιητών τρίτης γενιάς .....	25
1.5. Προκλήσεις στην σημερινή PDT <sup>[14]</sup> .....	28
1.6. Το μέλλον της φωτοδυναμικής θεραπείας <sup>[15]</sup> .....	30
Βιβλιογραφία (Κεφάλαιο 1 <sup>ο</sup> ).....	32
Κεφάλαιο 2 <sup>ο</sup> :.....	35
Σύνθεση και εφαρμογή εναλλακτικών ευαισθητοποιητών στη φωτοδυναμική θεραπεία – Πορφυρίνες (porphyrins) και κβαντικές τελείες άνθρακα (carbon quantum dots) .....	35
2.1. Πορφυρίνες .....	35
2.1.1. Εισαγωγή .....	35
2.1.2. Ταξινόμηση πορφυρινών .....	36
2.1.3. Ιδιότητες πορφυρινών ως φωτοευαίσθητες ουσίες και χρήση τους σε αντιβακτηριακή PDT.....	38
2.1.4. Πορφυρίνες στη θεραπεία του καρκίνου .....	40
2.2. Κβαντικές τελείες άνθρακα (CQDs).....	41
2.2.1. Εισαγωγή .....	41
2.2.2. Τρόποι παρασκευής .....	41
2.2.3. Ιδιότητες κβαντικών τελειών άνθρακα .....	42
2.2.4. Βιολογικές εφαρμογές .....	45
Βιβλιογραφία (Κεφάλαιο 2 <sup>ο</sup> ).....	71
Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> :.....	73
Πειραματική μεθοδολογία.....	73
3.1. Ηλεκτροχημική σύνθεση κβαντικών τελειών άνθρακα .....	73

3.2. Χαρακτηρισμός κβαντικών τελειών άνθρακα.....	76
3.2.1. Περιθλασιμετρία ακτίνων Χ (XRD) .....	76
3.2.2. Φασματοσκοπία FTIR .....	77
3.2.3. Φασματοσκοπία micro-Raman .....	78
3.2.4. Φασματοσκοπία UV-Vis .....	79
3.2.5. Μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).....	79
3.3. Σύνθεση και χαρακτηρισμός πορφυρινών.....	80
3.3.1. Εισαγωγή.....	80
3.3.2. Πειραματική διαδικασία .....	84
3.3.3. Χαρακτηρισμός πορφυρινών .....	87
3.4. Παρασκευή και χαρακτηρισμός υβριδικών συμπλόκων πορφυρίνης-CQDS .....	95
3.4.1. Διαδικασία σύνθεσης συμπλόκων .....	96
3.4.2. Χαρακτηρισμός-ταυτοποίηση υβριδικών ενώσεων .....	96
3.4.3. Μελέτη μηχανισμού παραγωγής ROS υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας.....	100
3.5. Μελέτη κινητικής αποδόμησης ρύπου από σύμπλοκες ενώσεις.....	106
3.6. Μελέτη μηχανισμού παραγωγής ROS .....	110
3.7. Σύνθεση νανοσωματιδίων TiO <sub>2</sub> .....	113
3.7.1. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων TiO <sub>2</sub> .....	114
3.8. Ανάπτυξη συμπλόκων πορφυρινών-TiO <sub>2</sub> .....	117
3.8.1. Σύνθεση συμπλόκων πορφυρινών-TiO <sub>2</sub> .....	117
3.8.2. Χαρακτηρισμός συμπλόκων πορφυρινών-TiO <sub>2</sub> .....	118
3.8.3. Μελέτη φωτοκαταλυτικής δράσης συμπλόκων πορφυρινών-TiO <sub>2</sub> .....	122
3.8.4. Μελέτη κινητικής υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας για τα σύμπλοκα πορφυρινών-τιτανίας.....	125
3.8.5. Παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου ROS .....	127
Βιβλιογραφία (Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> ).....	129
Κεφάλαιο 4 <sup>ο</sup> :.....	134
Συζήτηση και προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	134
4.1. Γενικές παρατηρήσεις και συμπεράσματα .....	134
4.2. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.....	135

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα Εργαστήρια Γενικής και Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022, υπό την επίβλεψη της Καθ. Ευαγγελίας Παυλάτου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθ. Ε. Παυλάτου και την Καθ. Α. Δέτση, που μου πρότειναν έδωσαν τη δυνατότητα να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα.

Θα ήθελα ακόμη, να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Μαριάννα Γάτου και Δημήτρη Μανουσάκη, για τη συνεργασία και τη βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένειά μου και τα φιλικά μου πρόσωπα για τη στήριξη, αγάπη και εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, και συνεχίζουν να δείχνουν, σε όλες τις δυσκολίες και αντιξοότητες της φοιτητικής και μη ζωής μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο για τη θεραπεία του καρκίνου, η οποία περιλαμβάνει την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) σε στοχευμένα σημεία οργανικών ιστών. Σε σύγκριση με άλλες αντικαρκινικές θεραπείες, όπως τη φωτοθερμική θεραπεία, τη χημειοθεραπεία και τη χειρουργική εκτομή, η PDT παρουσιάζει λιγότερες παρενέργειες, όπως αμελητέα φωτο-τοξικότητα του δέρματος, μικρότερες επεμβατικές διαδικασίες και μειωμένη λήψη φαρμάκων.

Οι φωτοευαισθητοποιητές (PSs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην PDT, παράγοντας κυτταροτοξικές δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), με στόχο την καταστροφή των κυττάρων του καρκινικού όγκου, μέσω νέκρωσης και απόπτωσης, όταν εκτίθενται σε ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος.

Οι πορφυρίνες και τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται ευρέως ως PSs στη φωτοδυναμική θεραπεία. Ωστόσο, η μειωμένη διαλυτότητά τους στο νερό και ο σύντομος χρόνος παραμονής στο αίμα, περιορίζουν σημαντικά τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Επομένως, είναι αναγκαία η χρήση φορέων που θα ενισχύσουν την διαλυτότητά τους και την στόχευση των επιθυμητών κυτταρικών ομάδων.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε σύνθεση των πορφυρινών TCPP (tetra-meso carboxylphenyl porphyrin) και THPP (tetra-meso hydroxylphenyl porphyrin), μέσω της μεθόδου Adler, ηλεκτροχημική σύνθεση τελειών άνθρακα, καθώς και σύνθεση νανοσωματιδίων  $\text{TiO}_2$  με την μέθοδο sol-gel, ενώ τέλος, πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με προηγούμενες επιστημονικές δουλειές, σύνθεση και χαρακτηρισμός του υβριδικού νανοϋλικού (πορφυρίνη-CDs/πορφυρίνη- $\text{TiO}_2$ ), μέσω τεχνικών XRD, FT-IR και UV-Vis. Ακόμη, διεξήχθη μελέτη του μηχανισμού παραγωγής ROS, μέσω πειραμάτων φωτοκατάλυσης, ρύπου ροδαμίνης 6G. Αποδείχθηκε πως τα σύμπλοκα πορφυρινών με CDs/ $\text{TiO}_2$  βελτιώνουν την δράση φωτοκατάλυσης στο ορατό φάσμα ενώ παράγουν ROS ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet\text{OH}$ ) σύμφωνα με μηχανισμό παραγωγής τύπου I, που εξουδετερώνουν τον ρύπο ροδαμίνης κατά 50-62%.

**Λέξεις κλειδιά:** νανοϋλικά, νανοσωματίδια  $\text{TiO}_2$ , κβαντικές τελείες άνθρακα, πορφυρίνες, φωτοδυναμική θεραπεία, φωτοθερμική θεραπεία, αντικαρκινικές ιδιότητες, βιοϊατρική, νανοϊατρική, ηλεκτροχημεία

## ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a promising method for cancer treatment, which involves the generation of reactive oxygen species (ROS) at targeted sites in organic tissues. Compared to other anticancer treatments, such as photothermal therapy, chemotherapy, and surgical resection, PDT has fewer side effects, such as negligible skin phototoxicity, less invasive procedures, and reduced drug intake.

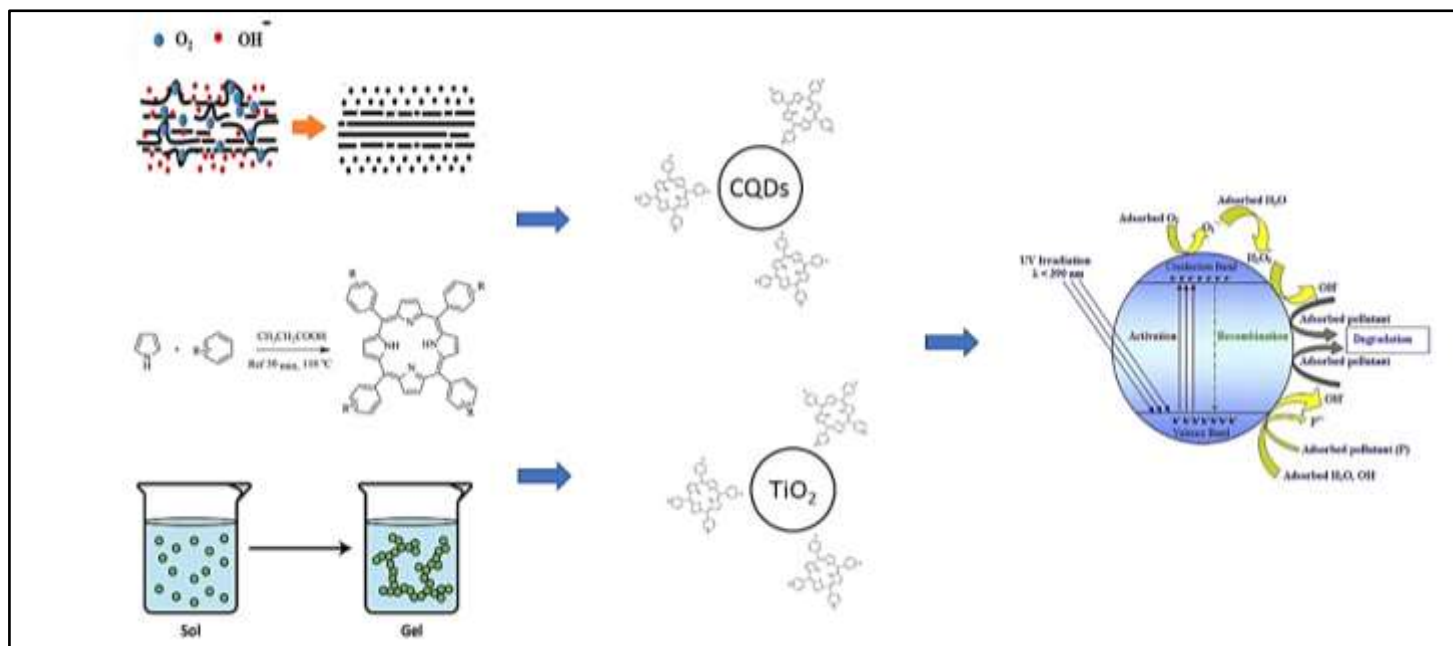
Photosensitizers (PSs) play an important role in PDT, producing cytotoxic reactive oxygen species (ROS), aiming to destroy tumor cells, through necrosis and apoptosis, when exposed to appropriate wavelength radiation.

Porphyrins and their derivatives are widely used as PSs in photodynamic therapy. However, their reduced solubility in water and the short time they stay in the blood significantly limit their use in photodynamic therapy. Therefore, it is necessary to use carriers that will enhance their solubility and the targeting of the desired cell groups.

In the context of this thesis, synthesis of the porphyrins TCPP (tetra-meso carboxylphenyl porphyrin) and THPP (tetra-meso hydroxylphenyl porphyrin) was carried out, through the Adler method, electrochemical synthesis of carbon quantum dots (CDs), as well as synthesis of TiO<sub>2</sub> nanoparticles by the sol-gel method, while finally, synthesis and characterization of the hybrid nanomaterial (porphyrin-CDs/porphyrin-TiO<sub>2</sub>) was carried out, based on previous scientific studies, through XRD, FT-IR and UV-Vis techniques. Furthermore, a study of the mechanism of ROS production, through photocatalysis experiments, of rhodamine pollutant 6G was carried out. It was shown that porphyrin complexes with CDs/TiO<sub>2</sub> improve the photocatalytic activity in the visible spectrum while producing ROS (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, <sup>•</sup>OH) according to a type I production mechanism, which neutralize rhodamine pollutant by 50-62%.

**Keywords:** nanomaterials, TiO<sub>2</sub> nanoparticles, carbon quantum dots, porphyrins, photodynamic therapy, photothermal therapy, anticancer properties, cancer, biomedicine, nanomedicine, electrochemistry

# GRAPHICAL ABSTRACT





## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>:

### Η φωτοδυναμική θεραπεία στον καρκίνο

#### 1.1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος παραμένει η ασθένεια με το υψηλότερο αντίκτυπο στην παγκόσμια υγεία. Ακόμη και με όλες τις πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις, η υποτροπή και η μετάσταση εξακολουθούν να είναι οι κύριες αιτίες θανάτου. Στην πραγματικότητα, η υψηλή θνησιμότητα, ως συνέπεια της μετάστασης, στους ασθενείς παραμένει εμπόδιο για μια αποτελεσματική κλινική θεραπεία. Η μετάσταση χαρακτηρίζεται από μια διαδοχική και πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα εισβάλλουν σε συγκεκριμένα όργανα, συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, του ήπατος, του εγκεφάλου και των οστών. Οι μεταστάσεις είναι συνήθως πολλαπλές και ανθεκτικές στις συμβατικές θεραπείες, θέτοντας σε κίνδυνο την επιτυχή χειρουργική επέμβαση, τη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία.

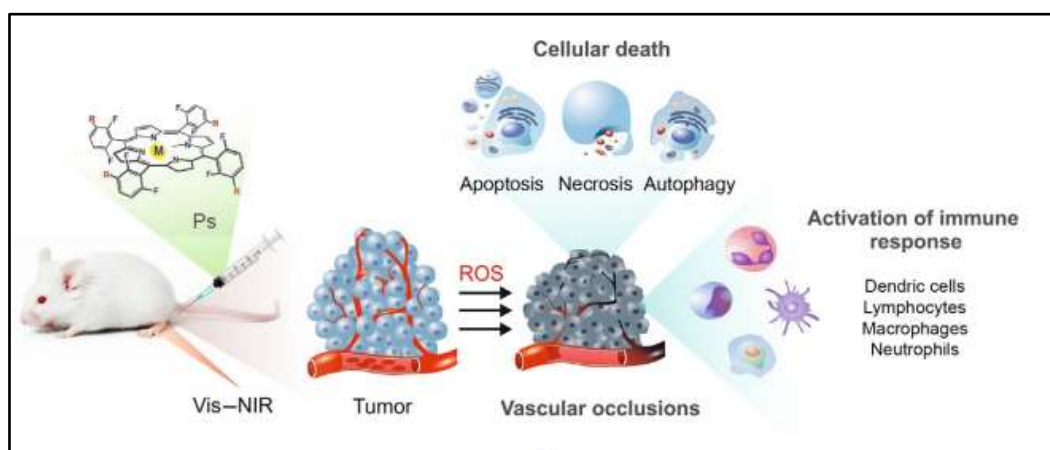
Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) ανακαλύφθηκε κατά λάθος πριν από 100 χρόνια από έναν φοιτητή ιατρικής, τον Oscar Raab που ενώ μελετούσε την αλληλεπίδραση βαφών φθορισμού σε εγχυματικά (infusoria), διαπίστωσε ότι με την εφαρμογή έντονου φωτός στη βαφή οι μικροοργανισμοί καταστρέφονταν. Αυτή η νέα θεραπεία με βάση το φως περιεγράφηκε πιο επίσημα και διασαφηνίστηκε από τους καθηγητές Raab, Jesionek και von Tarpeine. Στις αρχές της δεκαετίας του 1900, οι ασθενείς υποβάλλονταν επιτυχώς σε θεραπεία με αυτή τη διαδικασία για ένα ευρύ φάσμα καρκίνων, ιδιαίτερα του δέρματος. Παρά την πρόιμη αυτή επιτυχία, η PDT σχεδόν «χάθηκε» για 50 χρόνια <sup>[1]</sup>.

Δεδομένου ότι η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) δε θέτει σε κίνδυνο άλλες θεραπευτικές επιλογές και παρουσιάζει μειωμένη μακροπρόθεσμη νοσηρότητα, σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία, εμφανίζεται ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική θεραπεία στην καταπολέμηση κακοήθων ασθενειών.

Η PDT, εκτός από τον καρκίνο, αποτελεί και μια μέθοδο θεραπείας για την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας και τις τοπικές λοιμώξεις, που περιλαμβάνει τη χρήση τριών χωριστά μη τοξικών συστατικών: ενός φωτοευαισθητοποιητικού φαρμάκου ή φωτοευαισθητοποιητή (PS), μια πηγή φωτός που εκπέμπει ορατά και/ή εγγύς υπέρυθρα φωτόνια (NIR) και μοριακό οξυγόνο διαλυμένο στον ιστό-στόχο. Όταν ενεργοποιηθεί, ο PS αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο για να δημιουργήσει *δραστικά είδη οξυγόνου (ROS)*, που προκαλούν μια κυτταροτοξική απόκριση στον ιστό, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο <sup>[1]</sup>.

Τα φωτοπαραγόμενα ROS συμβάλλουν στην καταστροφή του όγκου, που λαμβάνει χώρα σύμφωνα με διάφορους άμεσους και έμμεσους μηχανισμούς. Τα ROS συνήθως οδηγούν στον άμεσο κυτταρικό θάνατο με απόπτωση και/ή νέκρωση. Η αυτοφαγία μπορεί επίσης να

προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο, αλλά από την άλλη πλευρά, οι κυτταρο-προστατευτικές λειτουργίες της είναι καλά τεκμηριωμένες. Εάν η ακτινοβολία του όγκου λάβει χώρα μετά από σχετικά σύντομο *DLI* (Daily Light Integral), τα ROS καταστρέφουν τα αγγεία που σχετίζονται με τον όγκο. Αυτή η στρατηγική είναι γνωστή ως *αγγειο-στοχευμένη φωτοδυναμική θεραπεία* (V-PDT). Η δράση της PDT τελειώνει με την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης και την επαγωγή μακροχρόνιας αντικαρκινικής μνήμης (Εικόνα 1.1).

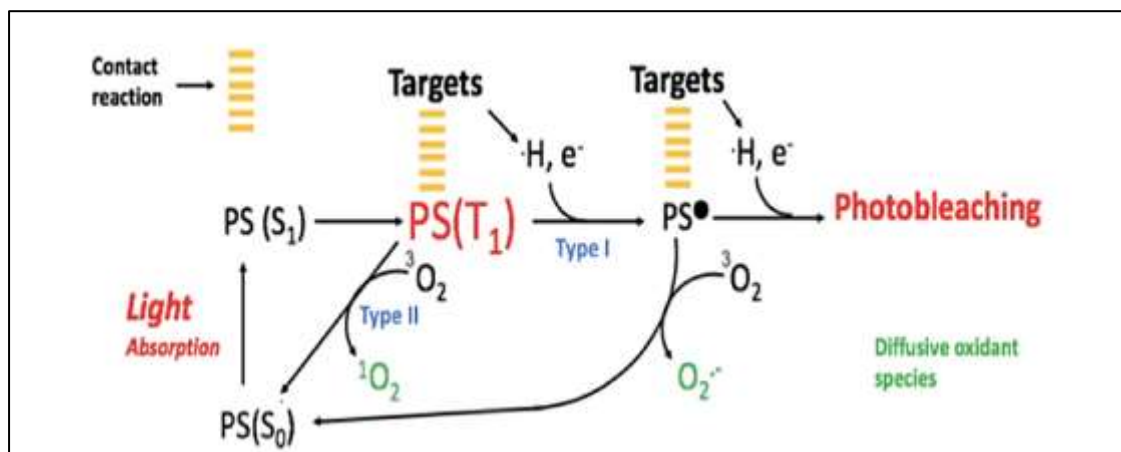


**Εικόνα 1.1: Βασικές αρχές της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT): Χορηγείται φωτοευαισθητοποιητής (Ps) και μετά από ένα συγκεκριμένο διάστημα φαρμάκου προς το φως (DLI), ενεργοποιείται από ορατό ή NIR φως. Τα φωτοπαραγόμενα ROS οδηγούν σε θάνατο καρκινικών κυττάρων και ανοσίας<sup>[3-4]</sup>.**

Η εξαρτώμενη από το ROS οξείδωση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA οδηγεί σε βλάβη των βιομορίων και σε παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, νευρο-εκφυλιστικών ασθενειών και της αθηροσκλήρωσης<sup>[2]</sup>. Διάφοροι χημικοί παράγοντες, όπως φάρμακα, φυτοφάρμακα, ορισμένα μέταλλα και οξειδία μετάλλων που υπάρχουν στην αιθαλομίχλη, ορισμένοι φυσικοί παράγοντες όπως η ακτινοβολία γάμμα ή η υπεριώδης ακτινοβολία, το υψηλό O<sub>2</sub> και η θερμοκρασία, καθώς και φυσιολογικές καταπονήσεις (τραυματισμοί, γήρανση) οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή των ROS. Δημιουργούνται επίσης από ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα (μια κατηγορία πολυμορφοπύρηνων λευκών αιμοσφαιρίων) και μακροφάγα κατά τη διάρκεια της φλεγμονής και τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων που καταλύονται από μιτοχόνδρια. Τα ROS που παράγονται μέσα σε τέτοιες διεργασίες έχουν ως αποτέλεσμα οξειδωτική βλάβη σε πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα και διαταράσσουν τις λειτουργίες των οργάνων και των κυττάρων οδηγώντας κατά συνέπεια σε κυτταρικό θάνατο<sup>[3]</sup>. Αν και αυτή η επιζήμια πτυχή των ROS είναι σωστή, δεν υπάρχουν αμφιβολίες ότι ευθύνονται και για πολλά ευεργετικά αποτελέσματα. Ο σχηματισμός τους διασφαλίζει τη σωστή λειτουργία του μεταβολισμού και πολλές οδούς σηματοδότησης στα κύτταρα. Τόσο το υπεροξείδιο όσο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχουν υποδειχθεί ως αγγελιοφόροι σηματοδότησης.

## 1.2. Φωτοχημική αρχή

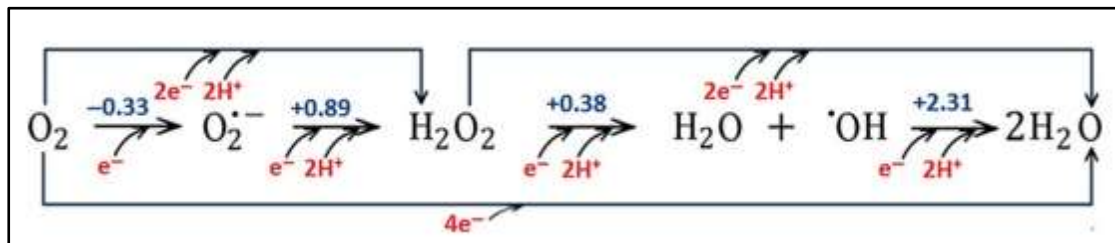
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει την οξειδωση, με τη χρήση φωτοευαισθητοποιητή, των βιομορίων και λαμβάνει χώρα με δύο μηχανισμούς. Στον μηχανισμό τύπου I, η ενέργεια φωτός περνά από τα διεγερμένα μόρια στα βιομόρια μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου/ υδρογόνου (μηχανισμός ριζών) με αντιδράσεις άμεσης επαφής (direct-contact reactions), που πυροδοτούν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων. Στο μηχανισμό τύπου II, η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται στο μοριακό οξυγόνο ( $^3\text{O}_2$ ), με αποτέλεσμα το σχηματισμό μονήρους οξυγόνου (singlet oxygen) ( $^1\text{O}_2$ ), το οποίο είναι εξαιρετικά ηλεκτρόφιλο και ικανό να προκαλέσει βλάβη στις μεμβράνες, τις πρωτεΐνες και το DNA. Οι αντιδράσεις άμεσης επαφής συνήθως προκαλούν πιο σοβαρές βλάβες στα βιομόρια, προκαλούν επίσης τη φωτοαποδόμηση του PS (photosensitizer). Με οποιονδήποτε από τους δύο μηχανισμούς, ο σχηματισμός ειδών στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση (triplet excited species) είναι το βήμα-κλειδί όσον αφορά στην απόδοση του photosensitizer. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την εγγενή αποτελεσματικότητα του PS. Παρόλο που η αναζήτηση νέων PS επικεντρώνεται ως επί το πλείστον στη σύνθεση ενώσεων που παράγουν μονήρες οξυγόνο με μεγαλύτερη απόδοση, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης και της φωτοαποικοδόμησης (photodegradation - photobleaching) (Εικόνα 1.2)<sup>[3-4]</sup>.



*Εικόνα 1.2: Μηχανισμοί φωτοευαισθητοποίησης: ο φωτοευαισθητοποιητής είναι ένα μόριο ικανό να απορροφήσει ενέργεια σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Μόλις διεγερθεί ο φωτοευαισθητοποιητής μεταπηδά στη μονήρη (singlet) διεγερμένη κατάσταση ή στην τριπλή (triplet) διεγερμένη κατάσταση. Σε αυτό το σημείο ο PS ( $T_1$ ) μπορεί να αντιδράσει άμεσα με βιομόρια μέσω φωτοχημικής αντίδρασης τύπου I με αποτέλεσμα το σχηματισμό ριζών ικανών να ξεκινήσουν ριζικές αλυσιδωτές αντιδράσεις. Διαφορετικά ο PS ( $T_1$ ) μπορεί να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο μέσω της φωτοχημικής αντίδρασης τύπου II. Και τα δύο παράγουν οξειδωτικά είδη όπως υπεροξειδίο του οξυγόνου και μονήρες οξυγόνο<sup>18[5]</sup>.*

### 1.3. Δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS)

Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) είναι προϊόντα μερικής αναγωγής του μοριακού οξυγόνου ( $O_2$ ). Δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα spin, που βρίσκονται σε δύο ξεχωριστά τροχιακά μοριακού οξυγόνου το καθιστούν εξαιρετικά ευαίσθητο στο σχηματισμό ριζικών μορφών. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.3, το προϊόν μείωσης ενός ηλεκτρονίου του μοριακού οξυγόνου ονομάζεται ιόν υπεροξειδίου, ενώ η αναγωγή κατά δύο ηλεκτρόνια οδηγεί σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το  $H_2O_2$  είναι ένα μάλλον ουδέτερο ROS, αλλά το επόμενο προϊόν, η ρίζα υδροξυλίου ( $HO^\bullet$ ), είναι ένα από τα ισχυρότερα οξειδωτικά που έχουν περιγραφεί ποτέ. Το τυπικό δυναμικό μείωσης 2,31 V εξασφαλίζει αντιδράσεις σε πολύ χαμηλό ενεργειακό φράγμα ενεργοποίησης και ρυθμούς κοντά στους ελεγχόμενους από τη διάχυση.



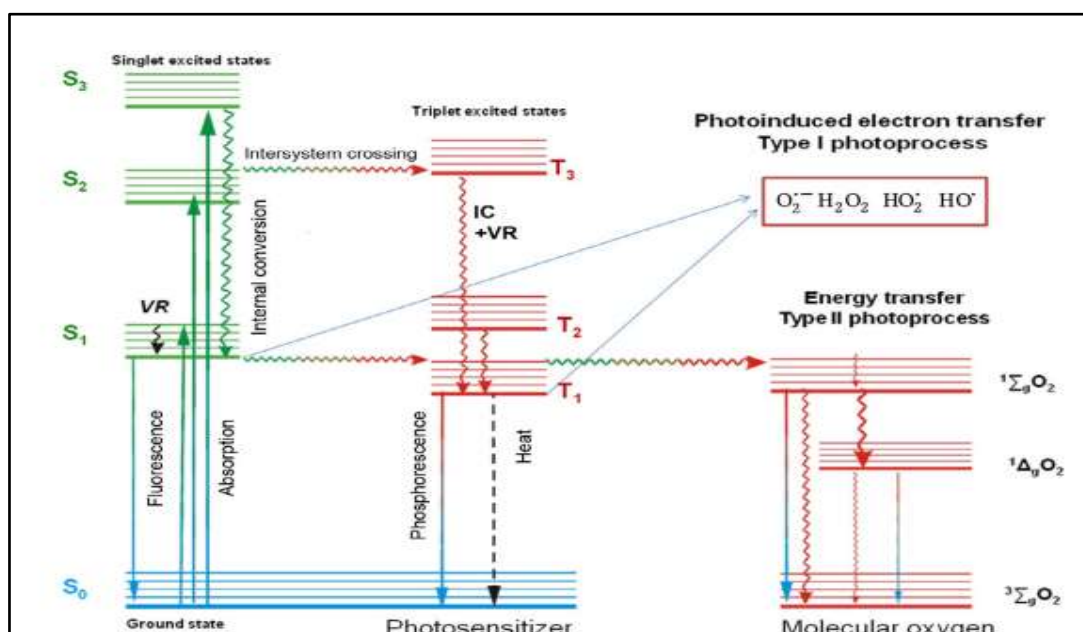
Εικόνα 1.3: Τα επόμενα στάδια της μοριακής μείωσης του οξυγόνου που οδηγούν στη δημιουργία ROS μαζί με τις τυπικές δυνατότητες μείωσης τους<sup>[5]</sup>.

#### 1.3.1. Μηχανισμοί σχηματισμού ROS

Η απορρόφηση ενός φωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό μιας «διεγερμένης κατάστασης» του φωτοευαίσθητοποιητικού παράγοντα. Τα κοινά χαρακτηριστικά της ηλεκτρονικής διέγερσης και των επακόλουθων φωτοχημικών αντιδράσεων μπορούν να περιγραφούν με τη συμμετοχή τριών ηλεκτρονικών καταστάσεων: απλή θεμελιώδη κατάσταση ( $S_0$ ), απλή διεγερμένη κατάσταση ( $S_1, S_2, S_3$ ) και τριπλή διεγερμένη κατάσταση μεγαλύτερης διάρκειας ζωής ( $T_1$ ).

Η ηλεκτρονική απορρόφηση (A) λαμβάνει χώρα μεταξύ των επιπέδων δόνησης και περιστροφικής ενέργειας των διεγερμένων μονών καταστάσεων. Αμέσως μετά την απορρόφηση φωτονίων, συμβαίνουν αρκετές φωτο-διεργασίες, αλλά η πιο πιθανή οδός απενεργοποίησης είναι η χαλάρωση στο χαμηλότερο επίπεδο ενέργειας δόνησης της πρώτης διεγερμένης κατάστασης. Αυτή η πολύ γρήγορη διαδικασία ( $10^{-15}s$ ) ορίζεται είτε ως εσωτερική μετατροπή (IC) είτε ως δονητική χαλάρωση (VR). Ένα διεγερμένο μόριο ( $1 PS^*$ ) υπάρχει στη χαμηλότερη διεγερμένη απλή κατάσταση της τάξης των νανοδευτερολέπτων πριν χαλαρώσει στη θεμελιώδη κατάσταση. Εάν η χαλάρωση από το  $S_1$  συνοδεύεται από εκπομπή φωτονίου, η διαδικασία είναι γνωστή ως φθορισμός (F). Αρκετά άλλα μονοπάτια χαλάρωσης ανταγωνίζονται τις φωτο-διεργασίες που περιεγράφηκαν προηγουμένως, όπως φαίνεται στο

παρακάτω διάγραμμα Jablonski, η πιο σημαντική είναι μια διαδικασία μη ακτινοβολίας στη χαμηλότερη τριπλή διεγερμένη κατάσταση ( $T_1$ ) γνωστή ως διασυστημική διέλευση (ISC). Το τελευταίο συμβάν μπορεί να οδηγήσει είτε σε εκπομπή είτε πιο πιθανά στις φωτοχημικές αντιδράσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μόρια στις διεγερμένες καταστάσεις είναι γενικά πιο ισχυρά οξειδωτικά και αναγωγικά είδη από τα ανάλογα τους στις βασικές καταστάσεις. (Εικόνα 1.4)



**Εικόνα 1.4 :** Φωτοφυσικές και φωτοχημικές διεργασίες που απεικονίζονται από ένα τροποποιημένο διάγραμμα Jablonski: Ο φωτοευαίσθητοποιητής σε κατάσταση διεγέρσεως μονής ( $S_1$ ) μπορεί να υποβληθεί σε διασταύρωση (ISC) σε διεγερμένη τριπλή κατάσταση ( $T_1$ ) και στη συνέχεια να δημιουργήσει ROS<sup>[5]</sup>.

Η πιο σημαντική παράμετρος στο σχεδιασμό συστημάτων παραγωγής ROS για PDT είναι η τριπλή διεγερμένη κατάσταση του PS που ευαίσθητοποιεί τον σχηματισμό ROS. Η σύζευξη περιστροφικής τροχιάς που προκαλείται από άτομα αλογόνου που υπάρχουν στο PS επηρεάζει τις κβαντικές αποδόσεις ISC και τους χρόνους ζωής τριπλής κατάστασης. Η φωτόλυση με φλας με λέιζερ χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για την ανίχνευση της τριπλής κατάστασης PS, καθώς και για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής της τριπλής κατάστασης. Οι μακρόβιες καταστάσεις τριπλέτας (triplet) αυξάνουν την πιθανότητα αλληλεπίδρασης των  $^3PS$  με το μοριακό οξυγόνο για τη δημιουργία ROS.

Ωστόσο, η παρουσία οξυγόνου μειώνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής της τριπλής PS. Οι σταθερές ρυθμού σβέσης ( $k_q$ ) που προσδιορίζονται για βακτηριοχλωρίνες είναι γενικά υψηλότερου μεγέθους από εκείνες των πορφυρινών και χλωρινών. Τα στατιστικά στοιχεία περιστροφής, που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση μεταξύ μιας διεγερμένης κατάστασης τριπλής ( $^3Ps$ ) και μιας άλλης κατάστασης τριπλής ( $^3O_2$ ) απαιτούν  $k_q$  υψηλότερα από  $1/9 k_{diff}$

για μια διαδικασία όπου η απόσβεση προχωρά μέσω ενός καναλιού μονής. Ωστόσο, εάν τόσο το μονό κανάλι όσο και η τριπλέτα συμβάλλουν στην απενεργοποίηση της διεγερμένης τριπλής κατάστασης από το μοριακό οξυγόνο, τότε αναμένεται ότι  $k_q \leq 4/9 k_{diff}$ . Οι τιμές του  $k_q$  για τις πορφυρίνες είναι  $\leq 1/9 k_{diff}$  επιβεβαιώνοντας ένα απλό κανάλι απενεργοποίησης με μεταφορά ενέργειας στο μοριακό οξυγόνο. Τα χλωρικά έχουν ελαφρώς υψηλότερη από  $1/9 k_{diff}$  σταθερά σβέσης και για τα βακτηριοχλωρικά, η σταθερά σβέσης είναι υψηλότερη από  $1/9 k_{diff}$  και χαμηλότερη από  $4/9 k_{diff}$ . Ο μηχανισμός μεταφοράς φορτίου (CT) που παρατηρείται για τις βακτηριοχλωρίνες επιτρέπει τη συμμετοχή τους στις φωτοεπαγόμενες αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι διεγερμένες καταστάσεις τριπλής Ps έχουν αρκετά μεγάλη διάρκεια ζωής για να ξεκινήσουν διαμοριακές αντιδράσεις με μόρια υποστρώματος, συγκεκριμένα, με αντιδράσεις μεταφοράς ενέργειας και μεταφοράς ηλεκτρονίων/υδρογόνου που οδηγούν στη δημιουργία ROS σύμφωνα με τους μηχανισμούς Τύπου I και Τύπου II, αντίστοιχα.

### 1.3.1.1. Μηχανισμός τύπου I

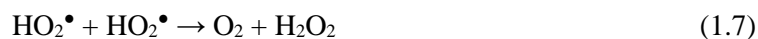
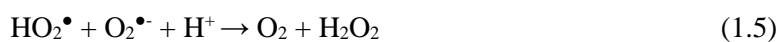
Η πρώτη οξυγονοκεντρική ρίζα που παράγεται σύμφωνα με το μηχανισμό τύπου I είναι το ιόν υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ). Σχηματίζεται όταν ένα ηλεκτρόνιο συλλαμβάνεται από ένα από τα τροχιακά  $\pi^*2p$  του οξυγόνου είτε παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα είτε απευθείας από ένα διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή.



Ανάλογα με το περιβάλλον, το δυναμικό αναγωγής του ιόντος υπεροξειδίου μπορεί να αλλάξει. Σε υδατικό διάλυμα, το  $O_2^{\bullet-}$  είναι ένας ασθενής οξειδωτικός παράγοντας, αλλά εξακολουθεί να είναι σε θέση να οξειδώσει. Από την άλλη πλευρά, δρα ως ισχυρός αναγωγικός παράγοντας που επιτρέπει τη μείωση των συμπλοκών σιδήρου στο κυτόχρωμα c και το EDTA σιδήρου<sup>[4]</sup>. Ο επακόλουθος σχηματισμός μιας ρίζας υπερωδροξυλίου προχωρά, σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:



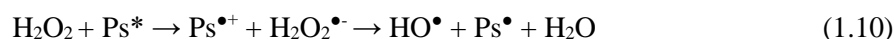
Η ρίζα υπερωδροξυλίου είναι πιο ισχυρό οξειδωτικό από το ιόν υπεροξειδίου, έτσι είναι σε θέση να οξειδώσει το  $O_2^{\bullet-}$  με αποτέλεσμα το σχηματισμό  $H_2O_2$ :



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου χαρακτηρίζεται από πολύ μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από άλλα ROS. Επιπλέον, σε αντίθεση με άλλα ROS, το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να περάσει μέσα από βιολογικές μεμβράνες και να προκαλέσει βλάβη σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα<sup>[5]</sup>. Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  αποτοξινώνεται από το ένζυμο καταλάση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό νερού και μοριακού οξυγόνου, ή μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω είτε με ιόν υπεροξειδίου (Εξίσωση 1.8) είτε με ρίζα υπεροξυδριλίου (Εξίσωση 1.9) και να σχηματίσει ρίζες υδροξυλίου υψηλής αντίδρασης. Οξειδώνουν εύκολα σημαντικά βιολογικά μόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και DNA, αλλά μπορούν επίσης να αδρανοποιήσουν φυσικά αντιοξειδωτικά (π.χ. τοκοφερόλη).



Ενόψει της πιθανής μεταφοράς ηλεκτρονίων από τον φωτοευαισθητοποιητή στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση που συζητήθηκε προηγουμένως, προτάθηκε ο μηχανισμός παραγωγής ριζών υδροξυλίου μέσω φωτοκατάλυσης:



Αν και το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι χειρότερος δέκτης ηλεκτρονίων από το μοριακό οξυγόνο, μια αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων από το  $\text{Ps}^*$  στο  $\text{H}_2\text{O}_2$  μπορεί να συμβεί εάν η διάρκεια ζωής της τριπλής κατάστασης του φωτοευαισθητοποιητή είναι αρκετά μεγάλη. Το ενδιάμεσο  $\text{H}_2\text{O}_2^{\bullet-}$  (Εξίσωση 1.10), μπορεί να προσπελαστεί με μια μετάβαση Franck-Condon σε μια διασπαστική σύνδεση ηλεκτρονίων στο  $\text{H}_2\text{O}_2$  που δίνει  $\text{OH}^\bullet$  και  $\text{OH}^-$ . Οι μεγάλες διάρκειες ζωής τριπλετών των βακτηριοχλωρινών επιτρέπουν φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων στο  $\text{H}_2\text{O}_2$  με σταθερά ταχύτητας  $k_{\text{H}_2\text{O}_2} = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Αυτή είναι μια πολύ υψηλότερη τιμή από τις σταθερές ταχύτητας των αντιδράσεων που παρουσιάζονται στις εξισώσεις (1.8) και (1.9). Ο σχηματισμός  $\text{H}_2\text{O}_2$  είναι πιο ευνοϊκός σε όξινα διαλύματα, αλλά μόνο με την παρουσία ελαφρού υπεροξειδίου του υδρογόνου οδηγεί στην αποικοδόμηση του φωτοευαισθητοποιητή. Λαμβάνοντας όλες αυτές τις πληροφορίες μαζί, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η φωτοκατάλυση μπορεί να είναι ένας κυρίαρχος μηχανισμός για την παραγωγή ριζών υδροξυλίου από βακτηριοχλωρίνες, ακόμα κι αν η μεταφορά ηλεκτρονίων στο  $\text{H}_2\text{O}_2$  ανταγωνίζεται την απόσβεση από το  $\text{O}_2$ , και υπάρχει ανάγκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  για να ξεκινήσει

αυτή η αντίδραση. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου είναι εξαιρετικά υποξικό<sup>[6]</sup> και τα καρκινικά κύτταρα έχουν διαφορετική κατάσταση οξειδοαναγωγής από τα φυσιολογικά κύτταρα, που εκδηλώνεται κυρίως με αυξημένο επίπεδο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και άλλων ROS, αυτός ο μηχανισμός θα πρέπει να είναι ακόμη πιο ευνοϊκός in vivo.

Κάτω από βιολογικές συνθήκες όπου υπάρχουν ιόντα σιδήρου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να υποβληθεί στην αντίδραση Fenton παράγοντας ρίζες υδροξυλίου με αναγωγή ενός ηλεκτρονίου του υπεροξειδίου του υδρογόνου και ο παραγόμενος σίδηρος μπορεί στη συνέχεια να αναχθεί ξανά στην κατάσταση του σιδήρου με υπεροξειδίο. Ο συνδυασμός αυτών των δύο αντιδράσεων ονομάζεται η μεταλλο-καταλυόμενη αντίδραση Haber-Weiss<sup>[6]</sup>.



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το ανιόν ρίζας ευαισθητοποίησης μπορούν να αντιδράσουν για να σχηματίσουν ρίζες υδροξυλίου και ανιόν υδροξειδίου (Εξίσωση 1.13). Αυτό είναι ισοδύναμο με τη μείωση ενός ηλεκτρονίου του υπεροξειδίου του υδρογόνου με τη μεσολάβηση Fe<sup>2+</sup>, που συζητήθηκε προηγουμένως, αλλά σε αυτή τη διαδικασία, το Ps<sup>•</sup> δρα ως αναγωγικός παράγοντας:



Τα αποτελέσματα των ολοκληρωμένων και εν εξελίξει έργων δείχνουν ότι το φωτοδυναμικό φαινόμενο δεν συσχετίζεται με τις κβαντικές αποδόσεις μονής οξυγόνου, αλλά με την ικανότητα των Ps να συμμετέχουν στον μηχανισμό Τύπου I. Είναι σαφές ότι η πιο επιθυμητή κατάσταση είναι όπου η φωτοδυναμική δράση πραγματοποιείται τόσο από τη μεταφορά ηλεκτρονίων όσο και από τους μηχανισμούς μεταφοράς ενέργειας. Ωστόσο, η PDT είναι πιο αποτελεσματική εάν ο Μηχανισμός I είναι λειτουργικός και έχει ολοκληρωθεί με τη δημιουργία ριζών υδροξυλίου υψηλής αντίδρασης<sup>[7-8]</sup>.

### 1.3.1.2. Μηχανισμός τύπου II

Μια αντίδραση τύπου II αποτελείται από τη μεταφορά ενέργειας από μια τριπλή διεγερμένη κατάσταση Ps στη βασική κατάσταση του μοριακού οξυγόνου. Οι περισσότεροι παράγοντες PDT λειτουργούν μέσω μηχανισμού τύπου II με απλή παραγωγή οξυγόνου (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>Δg) που οδηγεί σε οξείδωση οποιουδήποτε κοντινού βιολογικού είδους με κυτταροτοξικές συνέπειες<sup>[9]</sup>.





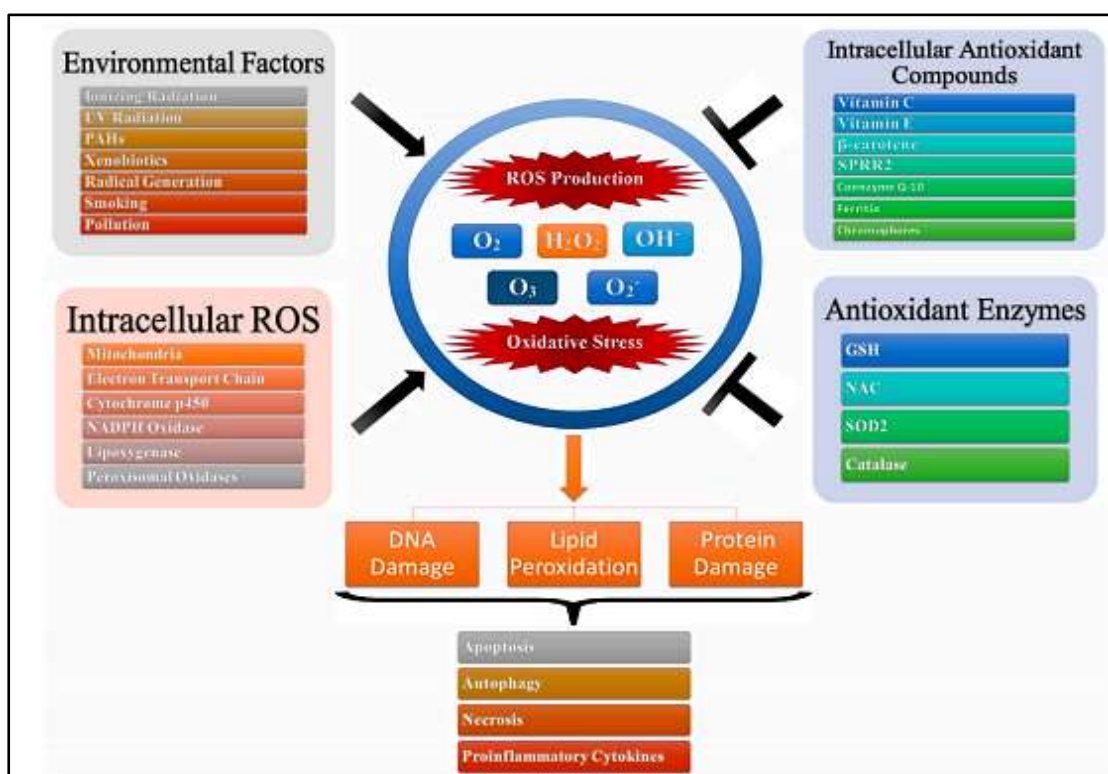
Το μη κατειλημμένο τροχιακό  $\pi^*2p$  του απλού οξυγόνου το καθιστά εξαιρετικά αντιδραστικό προς ενώσεις πλούσιες σε ηλεκτρόνια. Το  ${}^1O_2$  οξειδώνει τα λιπίδια σε υδρο-υπεροξειδία και αντιδρά με αμινοξέα (τρυπτοφάνη, τυροσίνη, ιστιδίνη, μεθειονίνη, κυστεΐνη, κυστίνη) σχηματίζοντας υδρο-υπεροξειδία και ενδοϋπεροξειδία. Τα ενδοϋπεροξειδία είναι επίσης προϊόντα αντίδρασης οξείδωσης μεταξύ  ${}^1O_2$  και δεοξυγουανοσίνης που υπάρχει στο DNA. Αυτές οι αντιδράσεις είναι αργότερα υπεύθυνες για την κυτταρική τοξικότητα, ωστόσο τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα που προκαλούνται από το  ${}^1O_2$  δεν εξαρτώνται από τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

### 1.3.2. Επίδραση των ROS στα καρκινικά κύτταρα<sup>[10]</sup>

Σε ένα φυσιολογικό κύτταρο, τα επίπεδα ROS εξισορροπούνται μέσω πολυάριθμων διεργασιών αποτοξίνωσης που ρυθμίζονται μέσω αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ως εκ τούτου, η ομοιόσταση ROS διατηρείται καλά, γεγονός που συμβάλλει στη διατήρηση της ισορροπίας οξειδοαναγωγής σε υγιή κύτταρα. Το σύμπλοκο I και III της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας υπό υψηλό δυναμικό μεμβράνης, θεωρείται ότι είναι το σημείο προέλευσης των ROS, αλλά πολλοί άλλοι πόροι μπορεί επίσης να διαδραματίσουν κεντρικό ρόλο σε αυξημένες γενιές ROS. Αυτή η αυξημένη παραγωγή ROS ή ο ελαττωματικός αμυντικός μηχανισμός μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες που οδηγούν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Παραδείγματα ενδογενών πηγών ROS περιλαμβάνουν μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση, κυτόχρωμα P450, υπεροξυ-σώματα και από την ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων όπως μακροφάγων και ουδετερόφιλων. Θεωρείται ότι κατά τη διάρκεια της μιτοχονδριακής αναπνευστικής διαδικασίας, το 1-2% του μοριακού οξυγόνου μετατρέπεται σε ROS μέσω αναγωγών ενός έως τριών ηλεκτρονίων και αυτό οδηγεί στο σχηματισμό ριζών υδροξυλίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, υπεροξειδίου και υπεροξυ-νιτρώδους<sup>[11]</sup>.

Το οξειδωτικό στρες (Εικόνα 1.5) είναι μια από τις κύριες αιτίες τοξικότητας που αποδίδεται στις αλληλεπιδράσεις των ROS, καθώς και των ενεργών ειδών αζώτου (RNS) με κυτταρικά μακρομόρια όπως το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες, τα οποία παρεμβαίνουν στις οδούς μεταγωγής σήματος όπως κινάσες, φωσφατάσες και μηχανισμούς μεταγωγής. Οι παθολογικές συνέπειες του οξειδωτικού στρες χαρακτηρίζονται από μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη λόγω του μιτοχονδριακού οξειδωτικού στρες. Αυτό αποδίδεται στα προ-οξειδωτικά που αλλάζουν την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση θειόλης/δισουλφιδίου που οδηγεί σε σακχαρώδη διαβήτη

και καρκίνο ή μέσω της αυξημένης δράσης είτε της οξειδάσης NAD(P)H που οδηγεί σε φλεγμονώδεις οξειδωτικές καταστάσεις που σχετίζονται με χρόνια φλεγμονή και αθηροσκλήρωση ή μέσω της δράση του σχηματισμού ROS που προκαλείται από την οξειδάση της ξανθίνης, που έχει συσχετιστεί με τραυματισμό επαναιμάτωσης και ισχαιμία. Επιπλέον, η διαδικασία γήρανσης μπορεί να αποδοθεί στο επιζήμιο μέγεθος των ελεύθερων ριζών που οδηγεί σε βλάβη του DNA, υπεροξειδωση λιπιδίων και οξείδωση πρωτεϊνών. Η υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση ROS είναι σημαντική για τη βλάβη, αλλά ένα άλλο σημαντικό γεγονός είναι η ισορροπία μεταξύ ROS και αντιοξειδωτικών συστημάτων. Η ισορροπία παραγωγής ROS/αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος απαιτείται για την ομοίωση [11].



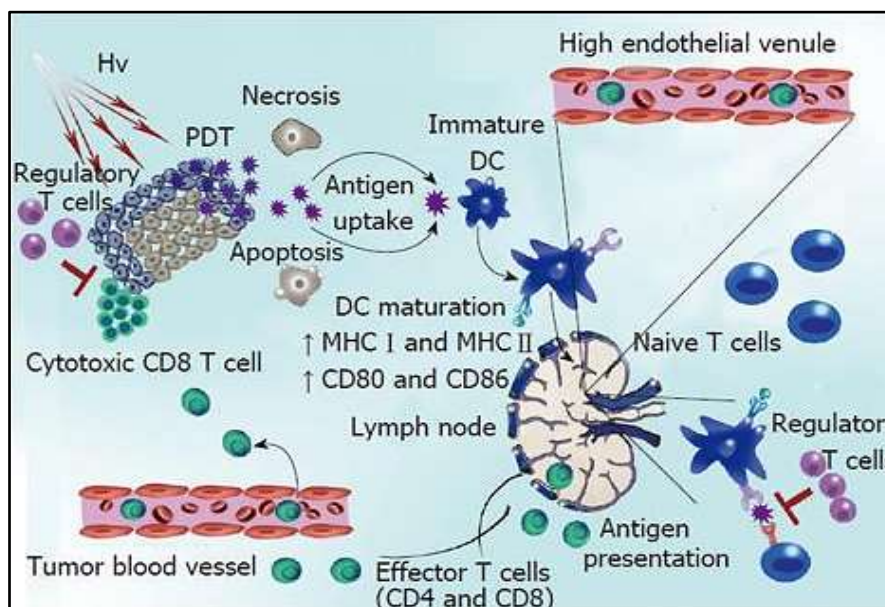
**Εικόνα 1.5:** Οξειδωτικό στρες και παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου. Τα ενδοκυτταρικά ROS και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (εξωγενή ROS) ξεκινούν την παραγωγή ROS που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε αποικοδόμηση DNA/λιπιδίων/πρωτεΐνης με αποτέλεσμα απόπτωση, αυτοφαγία, νέκρωση και παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών.

Υπό κανονικές συνθήκες τα αντιοξειδωτικά υπερिशύουν των οξειδωτικών, αλλά υπό οξειδωτικές συνθήκες τα προ-οξειδωτικά υπερिशύουν των αντιοξειδωτικών.

Το PDT, εάν σχεδιαστεί σωστά, ξεκινά την παραγωγή μιας ποσότητας ROS που επαρκεί για να προκαλέσει ισχυρές και οξείες φλεγμονώδεις αντιδράσεις που μπορούν να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα για να δημιουργήσει τη μακροπρόθεσμη αντικαρκινική μνήμη [12]. Με άλλα λόγια, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την PDT

πυροδοτεί μια απόκριση που ενθαρρύνει τους αμυντικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη διαδικασία να συμμετάσχουν στην εκρίζωση του υπό θεραπεία όγκου. Πολλοί παράγοντες του έμφυτου και προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση μετά από φωτοδυναμική δράση.

Η PDT ξεκινά με τη στρατολόγηση ουδετερόφιλων και στη συνέχεια, ενεργοποιεί μακροφάγα, λευκοκύτταρα, μονοκύτταρα, μαστοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα. Αυτοί οι παράγοντες εμπλέκονται στις πρωτογενείς ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις που ενεργοποιούν τα κοκκιοκύτταρα και επάγουν τη δημιουργία προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-1β, η IL-6, η IL-10 και ο TNF-α. Είναι σημαντικοί μεσολαβητές της φωτοδυναμικής αποτελεσματικότητας επειδή ρυθμίζουν τον βαθμό και τον τρόπο του κυτταρικού θανάτου του όγκου και της αγγειακής βλάβης.



*Εικόνα 1.6: Διέγερση προσαρμοστικής αντικαρκινικής ανοσίας με φωτοδυναμική θεραπεία. Τα καρκινικά κύτταρα που έχουν υποστεί αγωγή με PDT απελευθερώνουν τα αντιγόνα, τα οποία φαγοκυτταρώνονται από τα DCs και παρουσιάζονται σε αφελή T κύτταρα στον λεμφαδένα που παροχετεύει τον όγκο. Τα ενεργοποιημένα τελεστικά T κύτταρα επιστρέφουν στην κυκλοφορία και μεταναστεύουν στον όγκο. Τα ρυθμιστικά T κύτταρα φαίνεται να αναστέλλουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις μετά την PDT. DCs: Δενδριτικά κύτταρα. Hv: Φως; MHC I: Κόρια κατηγορία ιστοσυμβατότητας I [12].*

Η ενεργοποίηση του συμπληρωματικού συστήματος επάγει επίσης την παραγωγή θρομβοξάνης, ισταμίνης, προσταγλανδινών και λευκοτριενίων, που συνήθως επηρεάζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα που προκαλούν ισχαιμία όγκου μετά την ακτινοβόληση. Η προοδευτική ανάπτυξη της φλεγμονής μπορεί επίσης να προάγει τη δημιουργία προσαρμοστικής ανοσίας. Ένα αξιοσημείωτο αποτέλεσμα της PDT είναι η αντικαρκινική ανοσία που μεσολαβείται από T-κύτταρα ειδικά για αντιγόνο. Οι μηχανισμοί επαγωγής προσαρμοστικής ανοσοαπόκρισης σχετίζονται με την ενεργοποίηση κυττάρων που παρουσιάζουν αντιγόνο, όπως ώριμα δενδριτικά κύτταρα, μετά από PDT. Αυτά τα μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα T-κύτταρα μέσω διασταυρούμενης δέσμωσης μεταξύ ενός αντιγόνου που περιέχει κύρια μόρια συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC-I/MHC-II) και υποδοχέων T-κυττάρων.

#### 1.4. Φωτοευαισθητοποιητές

Τα παράγωγα χλωροφύλλης από φυτά και τα βακτήρια είναι εξαιρετικοί φωτοευαισθητοποιητές. Το ίδιο και οι βαφές και η πορφυρίνη. Εγκεκριμένα και εμπορικά διαθέσιμα (Πίνακας 1.1) είναι μόνο τρία από αυτά. Για να χαρακτηριστεί ένας φωτοευαισθητοποιητής αποτελεσματικός σε κλινικές μελέτες πρέπει να ισχύουν τα παρακάτω<sup>[13]</sup>:

- Να μην είναι τοξικός μέχρι να ενεργοποιηθεί.
- Να είναι υδρόφιλος ώστε να διευκολύνεται η εφαρμογή.
- Να ενεργοποιείται σε «κλινικά ωφέλιμο» μήκος κύματος (clinically useful).
- Να συγκεντρώνεται στον όγκο και όχι στους υγιείς ιστούς.
- Να μπορεί να αποβληθεί από τον ασθενή σχετικά γρήγορα.
- Να προσφέρει ευκολία στη σύνθεση και θεραπεία χωρίς πόνο.
- Να μην παράγει τοξικά παραπροϊόντα.
- Να είναι εμπορικά διαθέσιμος.

**Πίνακας 1.1: Εμπορικά διαθέσιμοι φωτοευαισθητοποιητές <sup>[14]</sup>.**

<u>Όνομασία</u>	<u>Προέλευση</u>	<u>Χορήγηση</u>
<i>Hematorporphyrin derivative (HPD)</i>	Μείγμα διαφόρων μονομερών, διμερών και πολυμερών της αιματοφορφυρίνης	Μη τοξικό. Δεν προκαλεί πόνο. Χρόνος θεραπείας: 20 λεπτά ή περισσότερο ανά βλάβη. Διατηρείται σε διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του δέρματος για 6 έως 8 εβδομάδες μετά την εισαγωγή. Ακούσια έκθεση του δέρματος στο ηλιακό φως κατά το χρονικό διάστημα μπορεί να

		προκαλέσει ακούσια PDT και να οδηγήσει σε σοβαρά εγκαύματα.
<i>Temoporfin (Foscan)</i>	Χλωρίνη φυτικής προέλευσης	Χρόνος θεραπείας : μερικά δευτερόλεπτα Είναι εξαιρετικά δραστικό για αυτό οι ασθενείς παραμένουν σε σκοτεινό δωμάτιο για 24 ώρες για την αποφυγή σοβαρών εγκαυμάτων. Η θεραπεία είναι επώδυνη, έτσι τα περισσότερα άτομα υποβάλλονται σε αναισθησία. Ωστόσο, καθώς είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό, το φάρμακο έχει βρει μια θέση στη θεραπεία του καρκινώματος των πλακωδών κυττάρων της κεφαλής και του λαιμού.
<i>Mono-L-aspartyl chlorine e6 (MACE)</i>	Χλωρίνη φυτικής προέλευσης	Σε αντίθεση με το Photofrin ή το Foscan, αυτός ο φωτοευαισθητοποιητής επιτρέπει την έγχυση και τη θεραπεία την ίδια ημέρα.
<i>Aminolevulinic acid (ALA)</i>	Προϊόν που ενζυματικά μετατρέπεται σεProto-Porphyrin IX	Εισάγεται δια του στόματος ή ενδοφλέβια. Ενώ η θεραπεία είναι άβολη όταν τοποθετείται τοπικά. Δεν εμφανίζει όμως συστηματική φωτοτοξικότητα.
<i>Fotosens</i>	PS βαφής που ενεργοποιείται σύντομα μετά την χορήγηση	Επιτρέπει την αυθημερόν θεραπεία σε μία μόνο συνεδρίαση. Χρόνος θεραπείας : 20 λεπτά ανά βλάβη Προκαλεί φωτοευαισθησία του δέρματος για εβδομάδες.

Κάθε φωτοευαισθητοποιητής απαιτεί συγκεκριμένο μήκος κύματος και ένταση φωτός για την επιτυχή ενεργοποίηση. Κλινικά, το κόκκινο φως (~630 nm) μπορεί να διαπεράσει τον ιστό σε βάθος περίπου 0.5 cm επιτρέποντας τόσο την επιφανειακή, όσο και την βαθύτερη ακτινοβολία του όγκου<sup>[15]</sup>. Ανάλογα με το μήκος κύματος ενεργοποίησης ο φωτοευαισθητοποιητής προορίζεται για βαθιά ή επιφανειακή διείσδυση στον ιστό. Επιλέγοντας τον κατάλληλο PS και το κατάλληλο μήκος κύματος βελτιστοποιείται η θεραπεία. Για παράδειγμα, μια επιφανειακή δερματική βλάβη ακτινοβολείται με μπλε φως (~400 nm), που επιτρέπει τη διείσδυση φωτός έως 1 mm ALA, HPD, MACE και Foscan μπορούν να ενεργοποιηθούν σε πολλαπλά μήκη κύματος από μπλε σε πράσινο σε κόκκινο, επιτρέποντας την πιο επιλεκτική ακτινοβολία ανάλογα με το βάθος του κάθε όγκου και με τη θέση του σε συνάρτηση με τις γειτονικές κρίσιμες δομές<sup>[14]</sup> (Εικόνα 1.2). Αυτό είναι ένα «υποτιμημένο» χαρακτηριστικό των PS, που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί καλύτερα σε κλινικό επίπεδο.

Name	Wavelength, nm	Dose, mg/kg	Drug to illumination interval, hr
Photofrin	630	2.0	48
ALA	630	30.0	48
Foscan	660	0.15	96
MACE	664	3.0	6
Fotosens	675	1.0	24

Εικόνα 1.7: Φωτοευαισθητοποιητές στην πνευμονική φωτοδυναμική θεραπεία <sup>[14]</sup>.

Η αντικαρκινική αποτελεσματικότητα εξαρτάται από τη βελτίωση των φωτοευαισθητοποιητών, που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία, την επιλεκτικότητά τους, την ενισχυμένη φωτοπαραγωγή αντιδραστικών ειδών, την απορρόφηση στο κοντινό υπέρυθρο φάσμα και τις στρατηγικές χορήγησης τους. Τόσο οι πειραματικές όσο και οι κλινικές μελέτες, που χρησιμοποιούν φωτοευαισθητοποιητές πρώτης και δεύτερης γενιάς (Εικόνα 1.6), είχαν επισημάνει την ανάγκη ανάπτυξης βελτιωμένων φωτοευαισθητοποιητών με στόχο την επίτευξη καλύτερων θεραπευτικών αποτελεσμάτων. Η βιοσύζευξη και η ενθυλάκωση σε ομάδες που έχουν την ικανότητα να στοχεύουν καρκινικούς όγκους εμφανίζονται ως κύριες στρατηγικές για την ανάπτυξη της τρίτης γενιάς φωτοευαισθητοποιητών.

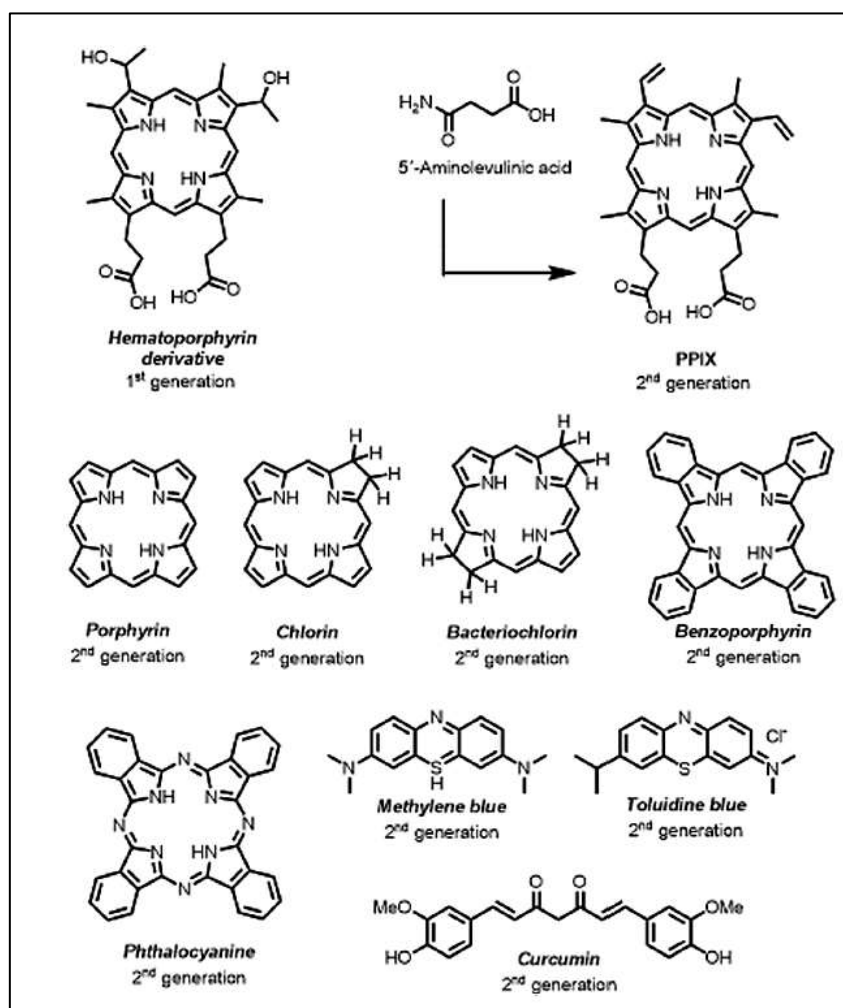
Η αιματοπορφυρίνη (hematoporphyrin) είναι υδατοδιαλυτή και αποτελεί τον πρώτο φωτοευαισθητοποιητή, που χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές μελέτες τη δεκαετία του 1970 στο Ινστιτούτο Καρκίνου του Roswell Park στις Ηνωμένες Πολιτείες. Έκτοτε, η έρευνα γύρω από τη φωτοδυναμική θεραπεία συνέχισε να αναπτύσσεται με σκοπό τη δημιουργία βελτιωμένων φωτοευαισθητοποιητών και ιατρο-τεχνολογικών προϊόντων για την υπέρβαση των μειονεκτημάτων ή/και των περιορισμών προηγούμενων φαρμάκων και πρωτοκόλλων. Στην ιδανική περίπτωση, ένας φωτοευαισθητοποιητής είναι μία χημική ένωση που μπορεί να διεγερθεί από το φως σε συγκεκριμένα μήκη κύματος και έχει χαρακτηριστικά όπως εξειδίκευση όγκου ή επιλεκτική συσσώρευση σε περιοχές όγκων, περιορισμένη τοξικότητα όταν δεν ακτινοβολείται, υψηλή κορυφή απορρόφησης μεταξύ 600 και 800 nm, υψηλή κβαντική απόδοση στην παραγωγή μονήρους οξυγόνου και εξαρτώμενη από το φως υψηλή κυτταροτοξικότητα. Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές, που χρησιμοποιούνται σε φωτοδυναμικές θεραπείες καρκίνου είναι πορφυρίνες, χλωρίνες, βακτηριοχλωρίνες ή φθαλοκυανίνες, από τις οποίες αναπτύσσονται περισσότερες ενώσεις προκειμένου να διατηρηθεί η λειτουργικότητά τους και να βελτιωθεί η χορήγηση τους πιο άμεσα σε στοχευμένες περιοχές. Έτσι, οι φωτοευαισθητοποιητές μπορεί να έχουν υποστεί αρκετές

χημικές τροποποιήσεις πριν από την επίτευξη βελτιωμένης χορήγησης και μειωμένης τοξικότητας σε μη καρκινικά σημεία. Από την ανάπτυξη των νέων ενώσεων προέκυψαν οι φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς που βασίστηκαν στην ανοσοτεχνολογία και νανοτεχνολογία.

Η θανάτωση των κυττάρων του καρκινικού όγκου μπορεί να συμβεί με τρεις χαρακτηριστικούς τρόπους:

- Πρόκληση άμεσης βλάβης και θανάτωση των καρκινικών κυττάρων με τη μεσολάβηση ειδών αντιδραστικού οξυγόνου (reactive oxygen species).
- Αγγειακή βλάβη του όγκου (tumor vascular damage).
- Ενεργοποίηση της ανοσολογικής άμυνας και επακόλουθη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού.

Ο τελευταίος τρόπος έχει προκύψει κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας και χαρακτηρίζεται από μια συγκεκριμένη ανοσολογική απάντηση, η οποία συνδέεται με μια διαρκή αντικαρκινική ανοσία.



Εικόνα1.8: Μοριακές δομές φωτοευαισθητοποιητών πρώτης και δεύτερης γενιάς [16].

### 1.4.1. Φωτοευαισθητοποιητές πρώτης και δεύτερης γενιάς

#### 1.4.1.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες και περιορισμοί

Μέχρι στιγμής, οι φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία ταξινομούνται σύμφωνα με την ιστορική τους ανάπτυξη και τις εννοιολογικές προσεγγίσεις της πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς PS. Στο πλαίσιο αυτό, το παράγωγο της αιματοφορφυρίνης (hematoporphyrin derivative - HpD), ένα σύνθετο φυσικό μείγμα oligομερών HpD, θεωρείται ότι ανήκει στους PS πρώτης γενιάς. Οι PS δεύτερης γενιάς είναι συνθετικές ενώσεις που είτε περιλαμβάνουν είτε προέρχονται από πορφυρίνες, βακτηριοχλωρίνες, φθαλοκυανίνες, χλωρίνες, βενζοπορφυρίνες, κουρκουμίνη, μπλε του μεθυλενίου, κτλ. Είναι καθαρές ενώσεις ενός συστατικού που παρουσιάζουν υψηλή απορρόφηση κοντά στην ορατή και υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, υψηλή κβαντική απόδοση μονήρους οξυγόνου, καθώς και μια πιο προβλέψιμη ερμηνεία της σχέσης μεταξύ δόσης-απόκρισης (dose-response relation), επειδή δεν είναι μείγματα ενώσεων, όπως το HpD.

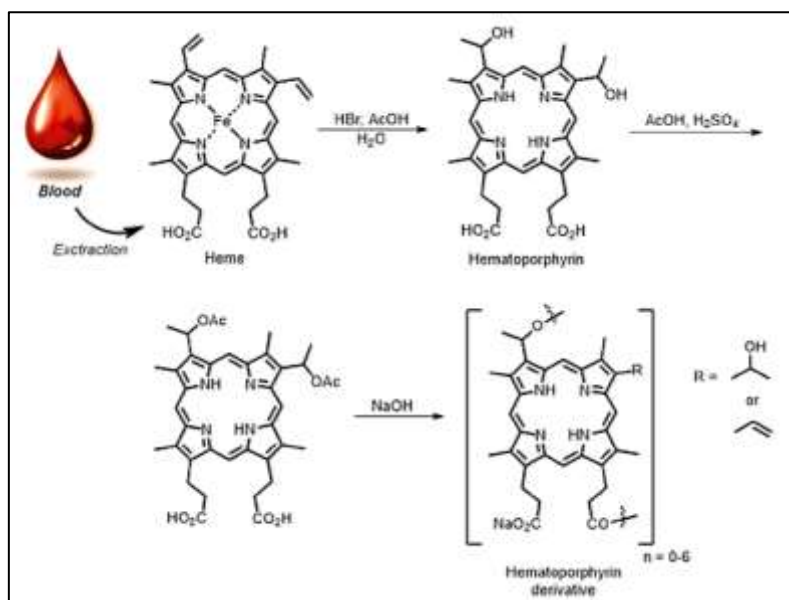
#### 1.4.1.2. Μεθοδολογίες σύνθεσης και εκχύλισης

Η αιματοφορφυρίνη αποτελεί ένα μείγμα με μεγάλο αριθμό διαφορετικών ενώσεων (μονομερή, διμερή και oligομερή). Το μίγμα αυτό εξάγεται από αποξηραμένο αίμα, ακολουθούμενο από συνθετικά βήματα. Εξαιτίας του τρόπου με τον οποίο συντίθεται, η καθαρότητα και η αναπαραγωγιμότητα του δεν είναι υψηλές, καθιστώντας την εφαρμογή του πιο δύσκολη και επηρεάζοντας τελικά την εμπορευματοποίηση αυτού του φωτοευαισθητοποιητή πρώτης γενιάς. Ο διαθέσιμος στο εμπόριο φωτοευαισθητοποιητής πρώτης γενιάς, με την ονομασία Photofrin, λαμβάνεται μέσω ολικής αλκαλικής υδρόλυσης στο τελευταίο στάδιο της συνθετικής διαδικασίας με θέρμανση (Εικόνα 1.9).

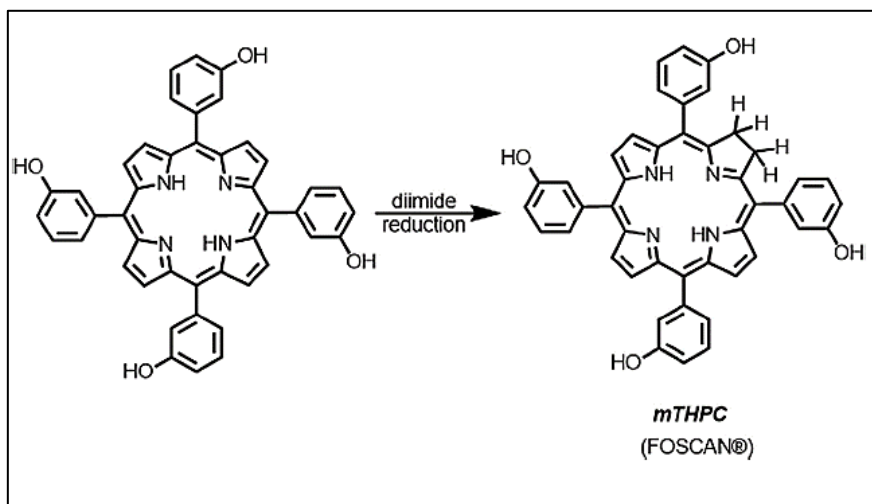
Ο φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς με το εμπορικό όνομα Foscan (Εικόνα 1.10) αποτελεί ένα από τα παλαιότερα παραδείγματα φωτοευαισθητοποιητών, που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία καρκίνων του εγκεφάλου και του λαιμού. Το Foscan ανακαλύφθηκε μέσω της συστηματικής μελέτης γύρω από τη δομή και τις ιδιότητες διαφορετικών πρόδρομων ουσιών μεσο-αρυλικών πορφυρινών. Ένα βασικό μειονέκτημα στη χρήση των πορφυρινών σε βιολογικές εφαρμογές αποτελεί η κακή υδατοδιαλυτότητα τους. Για την αντιμετώπιση αυτού του περιορισμού, οι ερευνητές εισήγαγαν την ομάδα υδροξυλίου (-OH). Επιπλέον, προκειμένου να βελτιωθεί η απορρόφησή τους στις εγγύς υπέρυθρες περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, παρασκευάστηκαν χλωριούχα ανάλογα αυτών των υδροξυπορφυρινών μέσω αναγωγής του διϊμιδίου (diimide reduction). Εν ολίγοις, η συνθετική



προετοιμασία των φωτοευαισθητοποιητών δεύτερης γενιάς αποσκοπούσε στην αντιμετώπιση πολυάριθμων μειονεκτημάτων (σύνθετα μείγματα, δυσχερής ερμηνεία μεταξύ δόσης-απόκρισης, κακή εκκαθάριση από τον οργανισμό) των φωτοευαισθητοποιητών πρώτης γενιάς, σημειώνοντας καλή έως μέτρια επιτυχία.



Εικόνα 1.9: Συνθετική μεθοδολογία του παραγώγου αιματοπορφφρίνης [16].



Εικόνα 1.10: Συνθετική μεθοδολογία του Foscan μέσω αναγωγής διϊμιδίου [16].

#### 1.4.1.3. Διαλυτότητα, κατανομή, στόχευση και οπτικοί περιορισμοί

Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές διαθέτουν στο μόριο τους έναν αρωματικό δακτύλιο για να απορροφούν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Τέτοιες αρωματικές δομές μειώνουν τη υδατοδιαλυτότητα των μορίων, προκαλώντας δυσκολίες στη χορήγηση του φαρμάκου. Η χρήση του Photofrin στα πρωτόκολλα της PDT περιλαμβάνει ενδοφλέβια

χορήγηση ακολουθούμενη από ακτινοβολία μετά από 24 με 48 ώρες. Μετά τη χορήγηση, παρατηρείται βιο-συσσώρευση στους ιστούς του όγκου, στο δέρμα και στα όργανα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, επιβεβαιώνοντας τη χαμηλή ικανότητα στόχευσης του Photofrin σε καρκινικά κύτταρα. Όσον αφορά στην εκκαθάριση του φαρμάκου από το σώμα, κλινικές μελέτες έδειξαν ότι πάνω από 40 έως 72 ώρες μετά τη χορήγηση, οι ιστοί που αποτελούσαν όγκους, το δέρμα και τα όργανα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (συμπεριλαμβανομένου του ήπατος και του σπλήνα) διατήρησαν το Photofrin και αυτή η περίοδος υπό περιπτώσεις παρατάθηκε έως και 2 ή 3 μήνες. Συνολικά, οι φωτοευαισθητοποιητές πρώτης γενιάς εμφανίζουν παρατεταμένη φωτοευαισθησία ασθενών ή κακή εκκαθάριση από το σώμα και χαμηλή απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος της φασματικής περιοχής. Το Photofrin μπορεί να φωτοενεργοποιηθεί, χρησιμοποιώντας ακτινοβολία στα 630 nm, δίνοντας υψηλή κβαντική απόδοση μονήρους οξυγόνου. Παρατηρείται, όμως, χαμηλός συντελεστής μοριακής απορρόφησης, με αποτέλεσμα να απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις φωτοευαισθητοποιητή και μεγάλης διάρκειας ακτινοβολία για επαρκή εξάλειψη του όγκου.

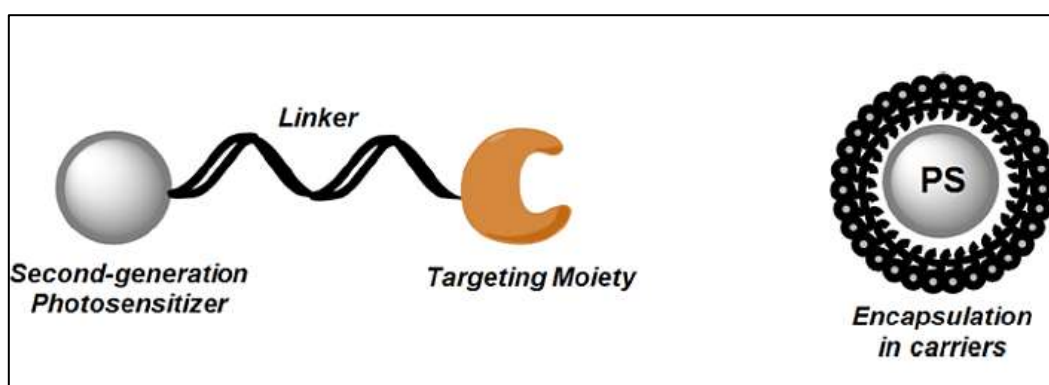
Για να ξεπεραστούν οι παρατηρούμενοι περιορισμοί των φωτοευαισθητοποιητών πρώτης γενιάς αναπτύχθηκαν οι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς, οι οποίοι περιλάμβαναν πορφυρίνες, βακτηριοχλωρίνες, φθαλοκυανίνες, χλωρίνες και βενζοπορφυρίνες. Έγιναν πολλές συνθετικές αλλαγές στη δεύτερη γενιά, με στόχο την αύξηση της διαλυτότητας στα βιολογικά μέσα και τον τριπλασιασμό της κβαντικής απόδοσης. Για παράδειγμα, η αντίδραση φθορίωσης είναι σε θέση να αυξήσει τη διαλυτότητα στο νερό και την κβαντική απόδοση της φθαλοκυανίνης. Μια άλλη στρατηγική που χρησιμοποιείται για την αύξηση της υδροφιλικότητας είναι μέσω της προσθήκης ομάδας υδροξυλίου, που όμως μειώνει την υπό ακτινοβολία φωτοτοξικότητα, εκτός εάν και οι δύο ομάδες υδροξυλίου είναι γειτονικές και χωρίζονται από αλυσίδες αλκυλίων. Οι παραπάνω αλλαγές εξετάστηκαν στη σύνθεση του τύπου χλωρίνης Foscan. Ακόμη το Foscan παρουσιάζει, ως χλωρίνη, βελτιωμένες ιδιότητες απορρόφησης που επιτρέπουν βαθύτερη διείσδυση στους ιστούς. Οι φθαλοκυανίνες παρουσίασαν βελτιωμένες ιδιότητες απορρόφησης και υδατοδιαλυτότητας μετά την προσθήκη σουλφονικών ομάδων και τη χρήση διαφορετικών μετάλλων (Al, In, Ce, Zn), αντίστοιχα. Όμως, οι σουλφονωμένες φθαλοκυανίνες αλουμινίου παρέμεναν για αρκετές εβδομάδες σε ιστούς εκτός του δέρματος, προκαλώντας ευαισθησία στο φως στους ασθενείς.

#### 1.4.2. Φυσικο-χημικές ιδιότητες προηγμένων φωτοευαισθητοποιητών τρίτης γενιάς

Οι φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς (Εικόνα 1.11) προκύπτουν μέσω της σύζευξης με αυτούς της δεύτερης γενιάς με παράγοντες στόχευσης των καρκινικών κυττάρων, όπως είναι

τα αντισώματα, τα αμινοξέα, τα πεπτίδια ή με ενθυλάκωση σε φορείς, για συσσώρευση σε στοχευμένες θέσεις.

Οι πρωταρχικοί σκοποί του σχεδιασμού των φωτοευαισθητοποιητών τρίτης γενιάς είναι η μείωση των δυσμενών επιπτώσεων στα γειτονικά κύτταρα και η βελτίωση τόσο της φαρμακοκινητικής, όσο και της ειδικής συσσώρευσης στον όγκο. Η βιοσύζευξη του φωτοευαισθητοποιητή με τον παράγοντα στόχευσης επιλέγεται με βάση τις κακοήθεις ιδιαιτερότητες των καρκινικών κυττάρων, όπως είναι οι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, οι οποίοι είναι διαφορετικοί από εκείνους των φυσιολογικών κυττάρων. Κάθε στοιχείο της βιοσύζευξης διαδραματίζει το ρόλο του στη διαμόρφωση της απόκρισης της PDT. Για παράδειγμα, οι σύνδεσμοι (linkers) ελαχιστοποιούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φωτοευαισθητοποιητή και των παραγόντων στόχευσης, βελτιώνοντας τον υδρόφοβο/υδρόφιλο χαρακτήρα και την κυτταρική πρόσληψη από τα καρκινικά κύτταρα.



*Εικόνα 1.11: Φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς: (α) σύζευξη φωτοευαισθητοποιητή δεύτερης γενιάς με παράγοντα στόχευσης, (β) ενθυλάκωση φωτοευαισθητοποιητή δεύτερης γενιάς σε φορείς (λιποσώματα, μικκύλια και νανοσωματίδια) <sup>[16]</sup>.*

#### **1.4.2.1. Συνθετικές στρατηγικές βιοσύζευξης**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω δύο τεχνικές κυριαρχούν στην προετοιμασία των φωτοευαισθητοποιητών τρίτης γενιάς. Η πρώτη είναι η βιοσύζευξη με μόρια υδατανθράκων, αντισώματα ή πεπτίδια κυτταρικής διείσδυσης ή υποκυτταρικής στόχευσης. Στη μελέτη των Rosenkranz, Jans και Sobolev βιοσυζευγμένα παράγωγα της χλωρίνης ε6 (chlorin e6) συντέθηκαν για να επιτευχθεί επιλεκτική στόχευση μιας πυρηνικής περιοχής και είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της επίδρασης της PDT κατά  $10^3$ , σε σύγκριση με τον ελεύθερο φωτοευαισθητοποιητή<sup>[17]</sup>. Η δεύτερη στρατηγική είναι η ενθυλάκωση με τη χρήση λιποσωμάτων, μικκυλίων και νανοσωματιδίων ως φορέων. Ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα λιποσωμικών σκευασμάτων είναι το Foslip<sup>[18]</sup>. Οι υδατάνθρακες και τα παράγωγά τους αποτελούν και αυτά ελκυστικά βιομόρια για να συζευχθούν με φωτοευαισθητοποιητές, καθώς έχουν το διπλό όφελος της στόχευσης και, ταυτόχρονα, της

αυξημένης διαλυτότητας στο νερό. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα φωτοευαισθητοποιητών συζευγμένων με υδατάνθρακες.

Το 2010 έγινε από τους Alonso και Boyle<sup>[19]</sup> μια προσπάθεια περαιτέρω ανάλυσης των λεπτομερειών και διαφόρων παραδειγμάτων τέτοιων φωτοευαισθητοποιητών, η οποία συμπεριλήφθηκε σε ένα κεφάλαιο του βιβλίου τους με τίτλο «*Bioconjugates of porphyrins and related molecules for photodynamic therapy*».

Για τη σύζευξη ενός φωτοευαισθητοποιητή σε ένα αντίσωμα χρησιμοποιούνται δύο κύριες μεθοδολογίες, η πρώτη βασίζεται στην άμεση προσκόλληση και η δεύτερη σε έναν ενδιάμεσο. Είναι σημαντικό ότι η σύζευξη θα πρέπει να πραγματοποιείται σε βιολογικά συμβατά μέσα, όπως ρυθμιστικά διαλύματα. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα μεθόδων βιοσύζευξης με αντισώματα, όπως είναι η σύζευξη αμιδίου, η ισοθειοκυανική σύζευξη, η σύζευξη με χημεία "click". Όσον αφορά στη χημεία click, αυτή είναι ένας κλάδος της Πράσινης Χημείας και ορίζεται ως ένα σύνολο αντιδράσεων, το οποίο χαρακτηρίζεται από μικρούς χρόνους αντίδρασης, μεγάλες αποδόσεις, ήπιες συνθήκες αντίδρασης, ακίνδυνα παραπροϊόντα και είναι one-pot αντιδράσεις. Οι Sandland και Boyle στην έρευνα τους ανέφεραν πολλά παραδείγματα αυτών και άλλων μεθόδων<sup>[20]</sup>.

Οι Pereira et al.<sup>[21]</sup> ανέφεραν τη σύνθεση δύο συζευγμάτων πορφυρίνης-γαλακτόζης και ψευδαργύρου (II) χρησιμοποιώντας χημεία κλικ. Ο γαλακτοζυλιωμένος φωτοευαισθητοποιητής επέδειξε εξαιρετικές δυνατότητες στη φωτοδυναμική θεραπεία κατά των καρκινικών κυττάρων στο παχύ έντερο, στο μαστό και στην ουροδόχο κύστη λόγω της ικανότητάς του να στοχεύει γαλακτοζο-δεσμευτικές πρωτεΐνες<sup>[21]</sup>. Οι Setaro et al<sup>[22]</sup> χρησιμοποίησαν μια υπερ-μοριακή στρατηγική ενθυλάκωσης της φθαλοκυανίνης πυριτίου (SiPc) PS σε πολυμερή μικκύλια. Όσον αφορά στην υπερμοριακή χημεία, αφορά σε χημικά συστήματα που αποτελούνται από μικρότερα μόρια και δομικά στοιχεία τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με ασθενείς διαμοριακές δυνάμεις και αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, συναρμογή μεταλλικών ιόντων, αλληλεπιδράσεις π-π).

#### **1.4.2.2. Φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς σε προ-κλινικές και κλινικές μελέτες**

Οι προ-κλινικές και κλινικές μελέτες αποτελούν μείζονα πρόκληση κατά την εφαρμογή νέων ενώσεων, φαρμάκων ή τεχνικών. Οι μελέτες αυτές περιλαμβάνουν τόσο βασικές όσο και σύνθετες έρευνες από μοντέλα κυττάρων έως ζώων (μικρού και μεσαίου μεγέθους), έως ότου η αποτελεσματικότητα και τα αποτελέσματα ασφάλειας είναι ικανοποιητικά για την εισαγωγή σε ανθρώπινες κλινικές δοκιμές. Για την ώρα οι φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς μελετώνται εκτενώς, ώστε να επικυρωθούν κλινικά για τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία (Εικόνα 1.12). Η προσέγγιση που χρησιμοποιεί η φωτοδυναμική θεραπεία με δι-

φωτονική απορρόφηση είναι μια από τις πιο ελπιδοφόρες στρατηγικές και έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στη θεραπεία βαθύτερων όγκων και στην επίτευξη καλύτερης στόχευσης στη Νευρολογία και την Οφθαλμολογία. Η χρήση ακτινοβολιών σε μήκη κύματος εντός του θεραπευτικού (εγγύς υπέρυθρο) παραθύρου θα μπορούσε ενδεχομένως να είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για την ενίσχυση του PS για φωτοδυναμική θεραπεία σε βαθύτερους ιστούς. Στην προσέγγιση της φωτοδυναμικής θεραπείας με δι-φωτονική απορρόφηση χρησιμοποιούνται μεγαλύτερα μήκη κύματος διέγερσης.

Οι Spangler et al.<sup>[23]</sup> απέδειξαν με τη χρήση ξενο-μοσχευμάτων ποντικού ότι η φωτοδυναμική θεραπεία δύο φωτονίων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά in vivo για να προκαλέσει την εξασθένηση όγκων με καλύτερο βάθος διείσδυσης φωτός. Στην έρευνα τους συνέθεσαν πορφυρίνη συζευγμένη με παράγοντες στόχευσης. Το παράθυρο ακτινοβολίας, χάρη στη PDT δύο φωτονίων κυμάνθηκε από 750-1000 nm, και έτσι, ήταν αβλαβές για τους γύρω υγιείς ιστούς.

3 <sup>rd</sup> generation PS components	Therapeutic agents or PS	Targeted cells	Effects on PDT	Main reported cellular uptake
Monoclonal antibodies (Mab)	Erbtux, IR-700, Foscan, HP	Cancer cells in vitro, in vivo and phase I clinical trials	Direct and increased killing	Target specific, and active binding
Mono-, di-, and oligosaccharides	Chlorins and others	Cancer cells in vitro and in vivo	Direct and increased killing	Warburg's effect, Glucose transport mechanisms (GTU 1, 3 and 4)
Structured nanoparticles	Metallated Phthalocyanines and other 2 <sup>nd</sup> generation PS	Cancer cells in vitro, in vivo	Direct and increased killing	Facilitated diffusion in extracellular space, enhanced permeability and retention (EPR)
Hyaluronic acid	Hypocrellin B, Paclitaxel, Pheophorbide A	Cancer in vitro, in vivo	Direct and increased killing	Enhanced diffusion
Liposomes, polymeric micelles, small molecules and inhibitors	Hemato-,benzo- and proto-porphyrins and derivatives	Cancer cells in vitro, in vivo and preclinical trials	Direct and increased killing	Enhanced diffusion, EPR, target specific and active binding

**Εικόνα 1.12: Ικανότητες ορισμένων συστατικών που χρησιμοποιούνται σε φωτοευαίσθητοποιητές τρίτης γενιάς για τη βελτίωση της στόχευσης, της χορήγησης φαρμάκων στα καρκινικά κύτταρα και την ενίσχυση της θεραπευτικής απόδοσης <sup>[16]</sup>.**

## 1.5. Προκλήσεις στην σημερινή PDT<sup>[14]</sup>

Ενδεικτικά, αναφέρονται ορισμένα από τις συνήθεις προκλήσεις που αφορούν την φωτοδυναμική θεραπεία:

### Αποτελεσματικότητα στόχευσης όγκου

Η έλλειψη καλής αποτελεσματικότητας στόχευσης όγκου που σχετίζεται με τα περισσότερα παραδοσιακά οργανικά PS έχει περιορίσει σε μεγάλο βαθμό την κλινική τους χρήση. Από τη μία πλευρά, ο λόγος για την υψηλότερη συγκέντρωση ορισμένων PS στον ιστό όγκου από τους γειτονικούς υγιείς ιστούς δεν είναι ακόμη σαφής και αυτή η ικανότητα στόχευσης όγκου

αποδίδεται στα μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά των όγκων. Από την άλλη πλευρά, οι εγγενείς ιδιότητες των PSs, όπως η μορφολογία, το μέγεθος των σωματιδίων και η διαμόρφωση της επιφάνειας μπορούν να επηρεάσουν δραματικά την ικανότητα στόχευσης όγκου. Υπό αυτή την έννοια, η βελτίωση της αποτελεσματικότητας στόχευσης όγκου των PSs θα μπορούσε να είναι περίπλοκη και αμφισβητήσιμη. Για να ξεπεραστεί αυτό το ζήτημα, θα μπορούσαν να υιοθετηθούν συνδεδετές στόχευσης συζευγμένοι με PSs και επιφανειακή τροποποίηση των παραγόντων PDT με τμήματα στόχευσης για την παροχή των φωτοευαισθητοποιητικών φαρμάκων ειδικά στους όγκους. Η χρήση νανοϋλικών σε PDT θα παρέχει μεγάλες δυνατότητες για λειτουργικότητα της επιφάνειας που μπορεί να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα στόχευσης όγκου.

### **PDT σε βάθος ιστού**

Κατά τη διάρκεια του PDT με τα παραδοσιακά PS παλαιότερης γενιάς, απαιτείται συνήθως ορατό φως για φωτοδιέγερση. Ωστόσο, το βάθος διείσδυσης του ορατού φωτός είναι μάλλον χαμηλό (<3 mm), λόγω της ισχυρής απορρόφησης φωτός στην ορατή περιοχή από τα περισσότερα χρωμοφόρα ιστών. Επομένως, το φωτοδυναμικό αποτέλεσμα παρεμποδίζεται σημαντικά από την εξασθένηση της έντασης του φωτός μαζί με την αύξηση του βάθους των ιστών. Μια στρατηγική για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος είναι η χρήση PS που μπορούν να διεγερθούν από το φως NIR, το οποίο βρίσκεται μέσα στο «οπτικό παράθυρο» του βιολογικού ιστού. Η χρήση του φωτός NIR στην PDT θα μπορούσε όχι μόνο να προσφέρει βαθύτερη θεραπεία όγκου, αλλά και να μειώσει τη φωτοτοξικότητα σε υγιείς ιστούς σε σύγκριση με την PDT με την υπεριώδη ακτινοβολία ή το ορατό φως. Ωστόσο, το μειονέκτημα που συνοδεύεται από τη χρήση φωτός NIR είναι η χαμηλή ενέργεια που μπορεί να μην ενεργοποιήσει αποτελεσματικά τα PS να παράγουν επαρκή ROS. Επομένως, υπάρχουν αυξανόμενα ενδιαφέροντα για τη χρήση UCNPs για PDT. Τα UCNPs θα μπορούσαν να μετατρέψουν το φως NIR χαμηλής ενέργειας, το οποίο έχει βαθιά διείσδυση στους ιστούς, σε υψηλής ενέργειας UV/ορατό φως που θα μπορούσε να διεγείρει το συνοδευτικό PS για να δημιουργήσει ROS. Η άλλη στρατηγική είναι να χρησιμοποιήσετε την πηγή φωτός που δεν περιορίζεται από το πάχος του ιστού, όπως ακτίνες X και εσωτερικά φώτα. Ωστόσο, η χαμηλή απόδοση παραγωγής ROS και οι παρενέργειες στον υγιή ιστό που σχετίζονται με τις ακτίνες X και η κακή μεταφορά ενέργειας στο PS που σχετίζεται με τα εσωτερικά φώτα υποδεικνύουν ότι χρειάζονται περισσότερες προσπάθειες σε αυτούς τους τομείς. Γενικά, η πραγματοποίηση της PDT σε βάθος ιστού με υψηλή αποτελεσματικότητα εξακολουθεί να είναι μια πρόκληση.

### **Υποξία όγκου**

Προφανώς, το φωτοδυναμικό φαινόμενο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση του περιβάλλοντος οξυγόνου. Ως εκ τούτου, τα αντινεοπλασματικά αποτελέσματα που προκαλούνται από την PDT παρεμποδίζονται σημαντικά σε υποξικούς όγκους, στους οποίους το οξυγόνο καταναλώνεται σε μεγάλο βαθμό από τα κύτταρα όγκου που αναπτύσσονται σε μεγάλο βαθμό. Επιπλέον, η PDT είναι μια διαδικασία που καταναλώνει οξυγόνο που θα επιδεινώσει την υποξία του όγκου, οδηγώντας έτσι σε μειωμένη αποτελεσματικότητα της PDT. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί η υποξία του όγκου, αναπτύχθηκαν νανοπλατφόρμες που αποτελούνται από PS και νανοϋλικό που μπορούν να καταλύσουν την αποσύνθεση του  $H_2O_2$  για την παραγωγή  $O_2$ , όπως τα νανοφυλλά  $MnO_2$  που συζητήθηκαν παραπάνω. Επιπλέον, ορισμένες τεχνικές που μπορούν να συμβάλουν στην επαναιμάτωση του  $O_2$ , όπως η κλασμάτωση του φωτός για ελεγχόμενες περιόδους "ενεργοποίησης" και "απενεργοποίησης" έκθεσης στο φως και η χαμηλή συχνότητα ροής PDT, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση υποξία όγκου. Δυστυχώς, αυτές οι μέθοδοι δεν έχουν αποτέλεσμα στις περιπτώσεις όπου η υποξία του όγκου προκαλείται από την ταχεία ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Εναλλακτικά, τα PS που είναι ανεξάρτητα από το οξυγόνο, όπως το  $TiO_2$  και το  $g-C_3N_4$  και τα PS που μπορούν να μεσολαβήσουν στην αντίδραση τύπου I ανεξάρτητα από το  $O_2$  και τη συνδυαστική θεραπεία με μεθόδους ανεξάρτητες από το  $O_2$  (όπως PTT και χημειοθεραπεία) μπορούν επίσης να υιοθετηθούν για την αντιμετώπιση της υποξίας όγκου.

## 1.6. Το μέλλον της φωτοδυναμικής θεραπείας<sup>[15]</sup>

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός νέων φωτοευαίσθητοποιητών για εφαρμογή PDT έχει οδηγήσει σε μια σημαντική ανακάλυψη στη φωτοϊατρική. Οι επί του παρόντος αναπτυσσόμενοι παράγοντες PDT έχουν βελτιώσει τις περισσότερες τυπικές ιδιότητες, αν και για το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο Photofrin®, πολλά μειονεκτήματα όπως η χαμηλή απορρόφηση φωτός και η κακή διείσδυση φωτός μέσω του ιστού, η κακή κάθαρση από το σώμα, η παρατεταμένη φωτοευαίσθησία και η υποβέλτιστη εκλεκτικότητα όγκου ακόμα υπάρχει. Προκειμένου να αυξηθεί η συσσώρευση Ps στα καρκινικά κύτταρα και στο μικροπεριβάλλον του όγκου, οι φωτοευαίσθητοποιητές συζεύγγονται με αντισώματα, λευκοματίνες ορού, LDL, σάκχαρα, πεπτιδικούς συνδέτες, μη πρωτεϊνικούς συνδέτες (π.χ. φολικό οξύ) και οι πρωτεΐνες επιδεικνύουν ειδική στόχευση. Μια άλλη στρατηγική είναι η χρήση παραγόντων που ενεργοποιούνται με pH ενθυλακωμένοι σε λιπώματα, ή πολυμερικά μικκύλια, που ανταποκρίνονται στην υψηλότερη οξύτητα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, και Ps που ενεργοποιούνται από γλουταθειόνη, καθώς η συγκέντρωση γλουταθειόνης είναι επίσης υψηλότερη στα καρκινικά κύτταρα. Μεταξύ πολλών χαρακτηριστικών για ένα καλό Ps, τα πιο σημαντικά είναι η καθαρότητα, η σταθερότητα, η χαμηλή τοξικότητα, η ισχυρή απορρόφηση στο φωτοθεραπευτικό παράθυρο (630–850 nm) και η ικανότητα δημιουργίας ROS με υψηλή

απόδοση. Επιπλέον, τα Ps θα πρέπει να έχουν προνομιακή κατακράτηση στον ιστό-στόχο και ευνοϊκή φαρμακοκινητική. Στην κυτταρική προσέγγιση της PDT είναι σημαντικό ότι Ps εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια ή ακόμα πιο προτιμητέα σε ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ), όπου ROS είναι ικανά να επάγουν την ανοσογόνο κυτταρικό θάνατο.

Μεταξύ πολλών χαρακτηριστικών για ένα καλό Ps, τα πιο σημαντικά είναι η καθαρότητα, η σταθερότητα, η χαμηλή τοξικότητα, η ισχυρή απορρόφηση στο φωτοθεραπευτικό παράθυρο (630–850 nm) και η ικανότητα δημιουργίας ROS με υψηλή απόδοση. Επιπλέον, τα Ps θα πρέπει να έχουν προνομιακή κατακράτηση στον ιστό-στόχο και ευνοϊκή φαρμακοκινητική. Στην κυτταρική προσέγγιση της PDT είναι σημαντικό το Ps να εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια ή ακόμη πιο προτιμότερο στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ), όπου τα ROS είναι ικανά να επάγουν τον ανοσογόνο κυτταρικό θάνατο. Επομένως κρίνεται αναγκαίος τόσο ο έλεγχος των πιθανών επιπτώσεων της PDT όσο και η εύρεση αποδοτικών φωτοεθαισθητοποιητών για την εκκίνησή της.

Οι πορφυρίνες και τα παράγωγά τους είναι από τους πιο επιτυχημένους παράγοντες PDT. Συγκρίνοντας διάφορες πορφυρινοειδείς δομές, βρέθηκε ότι η συγγένεια του PS για τον ιστό όγκου σχετίζεται άμεσα με τον βαθμό υδροφοβικότητάς του και επομένως η παροχή πολύ υδρόφοβων παραγόντων έγινε ιδιαίτερα επιθυμητή.



## Βιβλιογραφία (Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>)

- [1] Janusz M. Dąbrowski, (2017), Chapter Nine - Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation, Editor(s): Rudi van Eldik, Colin D. Hubbard, *Advances in Inorganic Chemistry*, Academic Press, 70, 343-394.
- [2] Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M. et al., (2016), Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53, 4094-4125.
- [3] Fuchs, J. (2001). *Environmental Stressors in Health and Disease*. CRC Press, New York.
- [4] Gutteridge, J M C., L Maitt, L Poyer, (1990). Superoxide dismutase and Fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II). *Biochemistry Journal*, 269 (1), 169–174.
- [5] Oszejca, M., Małgorzata Brindell, Łukasz Orzeł, Janusz M. Dąbrowski, Klaudyna Śpiewak, Przemysław Łabuz, Michał Pacia, Anna Stochel-Gaudyn, Wojciech Macyk, Rudi van Eldik, Grażyna Stochel, (2016). Mechanistic studies on versatile metal-assisted hydrogen peroxide activation processes for biomedical and environmental incentives, *Coordination Chemistry Reviews*, 327-328, 143-165.
- [6] James P Kehrer, The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology*, Volume 149, Issue 1, 2000, Pages 43-50, ISSN 0300-483X, [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6).]
- [7] Janusz M. Dąbrowski, Luis G. Arnaut, Mariette M. Pereira, Krystyna Urbańska, Sérgio Simões, Grażyna Stochel, Luísa Cortes, Combined effects of singlet oxygen and hydroxyl radical in photodynamic therapy with photostable bacteriochlorins: Evidence from intracellular fluorescence and increased photodynamic efficacy in vitro, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 52, Issue 7, 2012, Pages 1188-1200, ISSN 08915849, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.027>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584912000044>)
- [8] Janusz M. Dąbrowski, Barbara Pucelik, Anna Regiel-Futyra, Małgorzata Brindell, Olga Mazuryk, Agnieszka Kyzioł, Grażyna Stochel, Wojciech Macyk, Luis G. Arnaut, Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers, *Coordination Chemistry Reviews*, Volume 325, 2016, Pages 67-101, ISSN 00108545, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.06.007>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854516301655>)]
- [9] [Maria C DeRosa, Robert J Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews*, Volumes 233–234, 2002, Pages 351-371, ISSN 0010-8545, [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).]

- [10] Aggarwal, V.; Tuli, H.S.; Varol, A.; Thakral, F.; Yerer, M.B.; Sak, K.; Varol, M.; Jain, A.; Khan, M.A.; Sethi, G. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules* 2019, 9, 735. <https://doi.org/10.3390/biom9110735>
- [11] Franco, R.; Schoneveld, O.; Georgakilas, A.G.; Panayiotidis, M.I. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008, 266, 6–11
- [12] (Reginato E, Wolf P, Hamblin MR. Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects. *World J Immunol* 2014; 4(1): 1-11 [PMID: 25364655 DOI: 10.5411/wji.v4.i1.1
- [13] Allison R.R., Moghissi K., 2013. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clinical Endoscopy*, 46 (1), 24-29.
- [14] Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu, X.H., Childs C.J., Sibata, C.H., 2004. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, 1, 27-42.
- [15] Mang T.S., 2004. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, 1, 43-48
- [16] Mfouo-Tynga I.S., Dias L.D., Inada N.M., Kurachi C., (2021). Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 34, 102091.
- [17] Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S., 2000. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunology and Cell Biology*, 78 (4), 452-464.
- [18] Pegaz B., Debeve E., Ballini J.P., Wagnieres G., Spaniol S., Albrecht V., Scheglmann D.V., Nifantiev N.E., van den Bergha H., Konan-Kouakou Y.N., 2006. Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28 (1-2), 134-140.
- [19] Alonso C., Boyle R.W., 2010. Bioconjugates of porphyrins and related molecules for photodynamic therapy. *Handbook of Porphyrin Science*, 121-190.
- [20] Sandland J., Boyle R.W., 2019. Photosensitizer antibody-drug conjugates: past, present, and future. *Bioconjugate Chemistry*, 30 (4), 975-993.
- [21] Pereira P.M.R., Rizvi W., Bhupathiraju N., Berisha N., Fernandes R., Tome J.P.C., Drain C.M., 2018. Carbon-1 versus Carbon-3 linkage of D-galactose to porphyrins: synthesis, uptake, and photodynamic efficiency. *Bioconjugate Chemistry*, 29 (2), 306-315.
- [22] Setaro F., Wennink J.W.H., Makinen P.I., Holappa L., Trohopoulos P.N., Yla-Herttuala S., van Nostrum C.F., de la Escosura A., Torre T., 2020. Amphiphilic phthalocyanines in polymeric micelles: a supramolecular approach toward efficient third-generation photosensitizers. *Journal of Materials Chemistry B*, 8 (2), 282-289.

[23] Spangler C.W., Starkey J., Rebane A., Drobizhev M., Meng F., Gong A., 2008. In: D. Kessel (Ed.), Synthesis, characterization and two-photon PDT efficacy studies of triads incorporating tumor targeting and imaging components, p. 68450S.

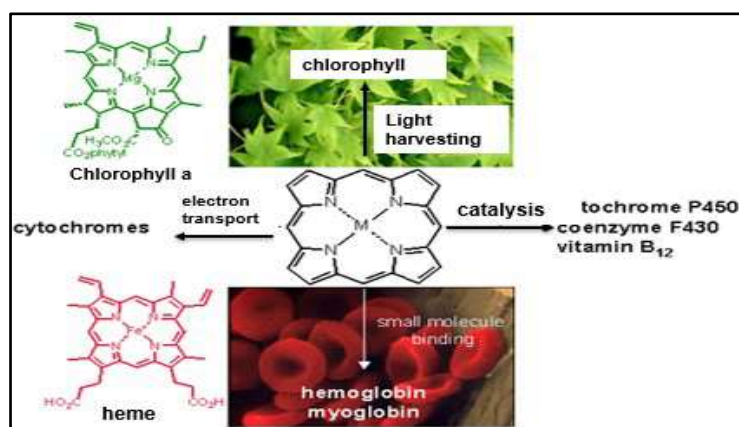
## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>:

# Σύνθεση και εφαρμογή εναλλακτικών ευαίσθητοποιητών στη φωτοδυναμική θεραπεία – Πορφυρίνες (porphyrins) και κβαντικές τελείες άνθρακα (carbon quantum dots)

## 2.1. Πορφυρίνες

### 2.1.1. Εισαγωγή

Οι πορφυρίνες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις, παράγωγα της πορφίνης. Από αυτές προκύπτουν οι φυσικές χρωστικές ύλες των φυτών και των ζώων. Αποτελούν πρόδρομα μόρια της αιμοσφαιρίνης, της χλωροφύλλης και των κυτοχρωμάτων και παίζουν σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο της αναπνοής. Οι πορφυρίνες όπως και πολλά παράγωγά τους είναι ουσίες πολύ σημαντικές στη χημεία, στην επιστήμη των υλικών, τη φυσική, τη βιολογία και την ιατρική. Δίνουν το κόκκινο χρώμα στο αίμα (αίμα), και το πράσινο στα φύλλα (χλωροφύλλη), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.1. Είναι επίσης άριστες στον ρόλο τους ως μόρια προσδέτες (ligands) και μπορούν να συνδεθούν με σχεδόν κάθε μέταλλο του Περιοδικού Πίνακα. Βασισμένες σε φυσικά συστήματα, οι πορφυρίνες είναι ιδιαίτερα ευέλικτες και έχουν τη δυνατότητα να υπόκεινται σε πολλές τροποποιήσεις [1].

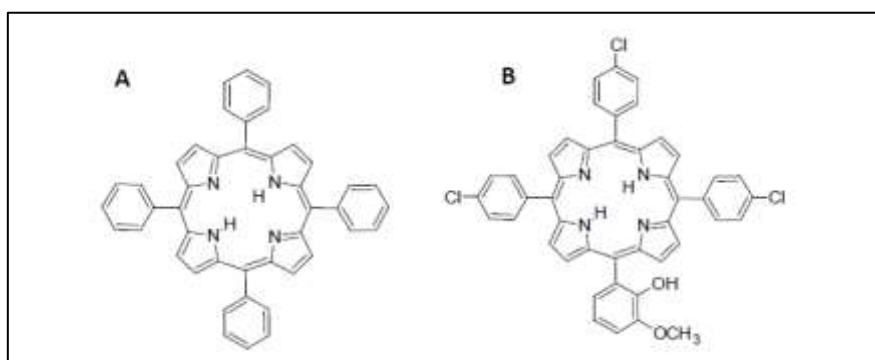


Εικόνα 2.1: Πορφυρίνες φυσικής προέλευσης [1].

Η λέξη «πορφυρίνη» προέρχεται από την ελληνική λέξη «πορφυρό» που σημαίνει «μωβ» [2]. Αποτελούνται από έναν υποκατεστημένο αρωματικό μακροκυκλικό δακτύλιο που αποτελείται από τέσσερα υπολείμματα τύπου πυρόλης, που συνδέονται με τέσσερις ομάδες μεθίνης. Σύμφωνα με τον κανόνα αρωματικότητας του Hückels, ο πυρήνας της πορφυρίνης διαθέτει συνολικά 22 π ηλεκτρόνια, με 18 π ηλεκτρόνια μετατοπίστηκαν πάνω από τον μακρόκυκλο.

Λόγω της αρωματικής τους φύσης, οι πορφυρίνες γενικά συμμετέχουν σε αντιδράσεις ηλεκτρόφιλης υποκατάστασης στις μεσο- θέσεις, οι οποίες είναι οι πιο πυκνές σε ηλεκτρόνια και, ως εκ τούτου, είναι οι πιο αντιδραστικές.

Οι πορφυρίνες έχουν πολύ έντονες ζώνες απορρόφησης στην ορατή περιοχή λόγω της εκτεταμένης μετεγκατάστασης ηλεκτρονίων εντός των μακροκυκλικών μορίων, η οποία με τη σειρά της είναι υπεύθυνη για τα χαρακτηριστικά φωτεινά τους χρώματα. Δείχνουν μια ισχυρή ζώνη απορρόφησης στα ~420 nm, γνωστή ως ζώνη Soret και τις ασθενέστερες δορυφορικές ζώνες απορρόφησης Q μεταξύ 500 nm και 800 nm.

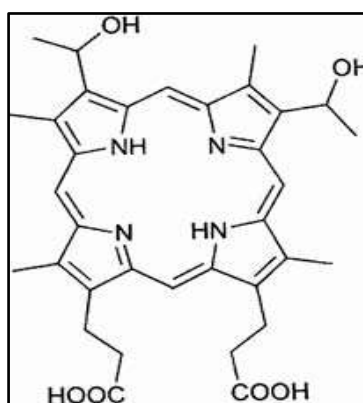


**Εικόνα2.2:** Παραδείγματα πορφυρίνων:(Α) Τετραφαινυλπορφυρίνη και (Β) 5,10,15-Τρις(ρ-χλωροφαινυλ)-20 (2-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ)-21Η πορφυρίνη <sup>[2]</sup>.

### 2.1.2. Ταξινόμηση πορφυρίνων

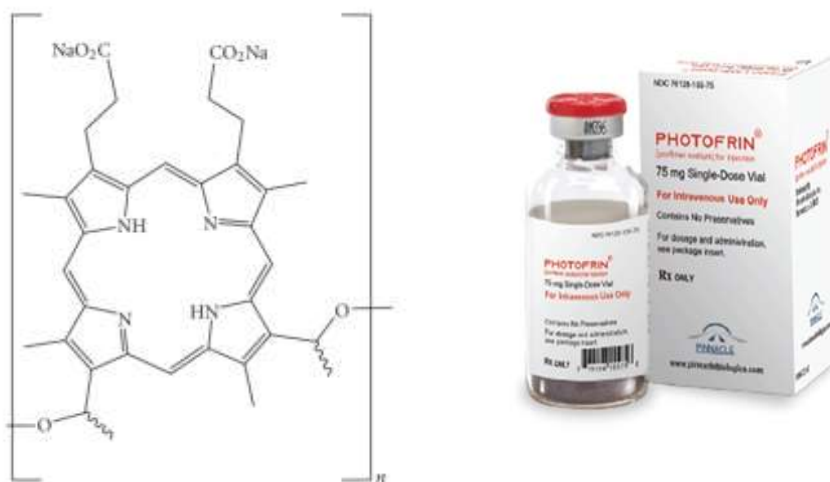
Οι πορφυρίνες μπορούν να ταξινομηθούν ως πρώτης και δεύτερης γενιάς. Οι πορφυρίνες πρώτης γενιάς είναι οι πρωτόγονες πορφυρίνες γνωστές ως παράγωγα αιματοπορφυρίνης (HrD) που υπάρχουν στο πρώτο εμπορικά διαθέσιμο φάρμακο PDT, το Photofrin.

Η αιματοπορφυρίνη είναι μια πορφυρίνη που παρασκευάζεται από αιμίνη. Είναι ένα παράγωγο της πρωτοπορφυρίνης IX, όπου οι δύο ομάδες βινυλίου έχουν ενυδατωθεί. Είναι ένα βαθύ χρωματισμένο στερεό που συνήθως αντιμετωπίζεται ως λύση.



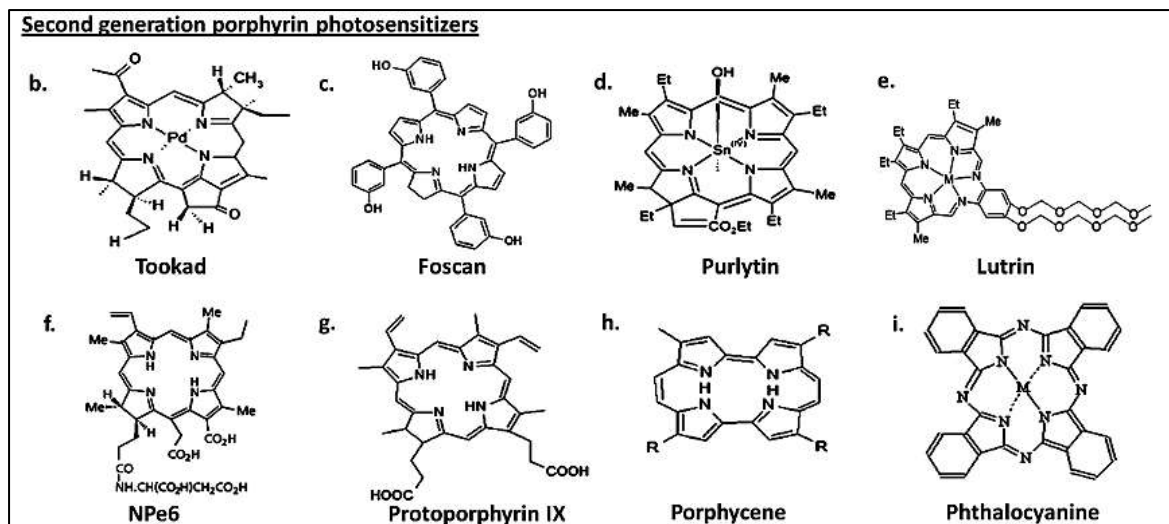
**Εικόνα2.3:** Χημική δομή αιματοπορφυρίνης Hr <sup>[1]</sup>.

Το Photofrin, επίσης γνωστό ως Porphimer sodium και διαματοπορφυρινικός αιθέρας, είναι ένα καθαρισμένο HpD με μέγιστη απορρόφηση 630 nm. Αυτός ο χαμηλός συντελεστής μοριακής εξάλειψης M σημαίνει ότι απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις Photofrin και φωτός για την επαρκή εκρίζωση του όγκου. Το Photofrin έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχει εξαιρετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής 452 ωρών, προκαλώντας φωτοευαισθησία μεγάλης διάρκειας. Η PDT που προκαλείται από το Photofrin περιλαμβάνει ενδοφλέβια (I.V.) χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή ακολουθούμενη από ακτινοβολία 24-48 ώρες αργότερα. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου το Photofrin καθαρίζεται από έναν αριθμό ιστών. Ωστόσο, η κάθαρση από τον ιστό του όγκου, το δέρμα και τα όργανα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος είναι σημαντικά πιο αργή. Κατά την ακτινοβολία, η βλάβη των καρκινικών κυττάρων προκαλείται από τη δημιουργία ROS. Επιπλέον, η αφαίρεση του όγκου προκαλείται επίσης από ισχαιμική νέκρωση που προκύπτει από αγγειακή βλάβη του πάσχοντος ιστού. Αυτές οι πορφυρίνες περιορίζονται από ακαθαρσίες, κακή σε βάθος απορρόφηση φωτός και φωτοευαισθησία. Το τελευταίο είναι μια δυσάρεστη αντίδραση του σώματος που εμφανίζεται λόγω της ενεργοποίησης του φωτοευαισθητοποιητή που παραμένει στο σώμα από το ηλιακό φως μετά από PDT.



**Εικόνα2.4: Χημική δομή και εμπορική συσκευασία Photofrin <sup>[2]</sup>.**

Οι πορφυρίνες δεύτερης γενιάς, όπως το χλώριο, η βακτηριοχλωρίνη και τα παράγωγα φθαλοκυανίνης εμφανίστηκαν για να επιλύσουν ορισμένα από τα προβλήματα που σχετίζονται με τις πορφυρίνες πρώτης γενιάς. Χαρακτηρίζονται από υψηλότερη καθαρότητα, καλύτερη απορρόφηση φωτός σε βάθος και μικρότερη φωτοευαισθησία. Παραδείγματα που εμφανίζουν φαρμακευτική χρήση είναι:



Εικόνα 2.5: Πορφυρίνες δεύτερης γενιάς που δοκιμάζονται για φωτοδυναμική θεραπεία [2].

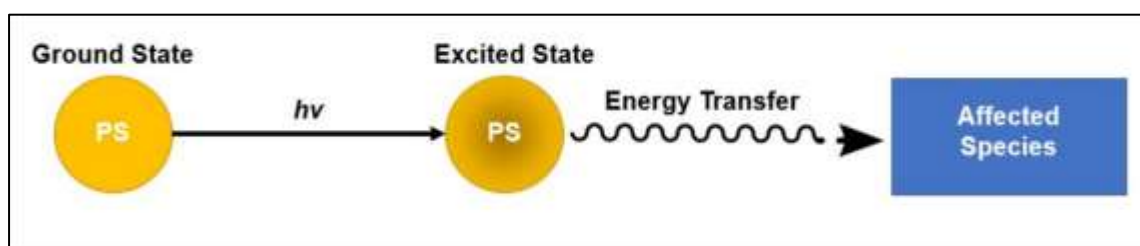
Ενδεικτικά αναφέρεται ότι, το Tookad (φωτοευαισθητοποιητής βακτηριοφοροφορβιδίου του παλλαδίου, WST09) φαίνεται να είναι φωτοχημικά και φαρμακολογικά ανώτερη πορφυρίνη από άλλους κλινικά χρησιμοποιούμενους φωτοευαισθητοποιητές μέχρι σήμερα. Υπάρχει μικρή ή καθόλου φωτοευαισθησία που σχετίζεται με το δέρμα λόγω του εξαιρετικά σύντομου χρόνου ημιζωής του φαρμάκου. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι η ικανότητά του να ενεργοποιείται σε σχετικά μεγάλο μήκος κύματος με αποτέλεσμα μεγαλύτερη διείσδυση στους ιστούς. Το Tookad ξεπερνά αρκετά από τα μειονεκτήματα που σχετίζονται με τους φωτοευαισθητοποιητές πρώτης γενιάς και επίσης φαίνεται να είναι ανώτερος από διάφορους φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς που αναπτύχθηκαν. Αν και δεν έχει ακόμη εγκριθεί κλινικά, οι προκλινικές μελέτες μέχρι σήμερα υποδεικνύουν ότι το Tookad αντιπροσωπεύει έναν πολλά υποσχόμενο φωτοευαισθητοποιητή στη θεραπεία μη επιφανειακών καρκίνων που βασίζεται σε PDT.

### 2.1.3. Ιδιότητες πορφυρινών ως φωτοευαίσθητες ουσίες και χρήση τους σε αντιβακτηριακή PDT

Οι φωτοευαισθητοποιητές παράγουν μια φυσικοχημική αλλαγή σε ένα γειτονικό μόριο είτε δωρίζοντας ένα ηλεκτρόνιο στο υπόστρωμα είτε αφαιρώντας ένα άτομο υδρογόνου από το υπόστρωμα. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας, ο φωτοευαισθητοποιητής επιστρέφει τελικά στη βασική του κατάσταση, όπου παραμένει χημικά άθικτος έως ότου ο φωτοευαισθητοποιητής απορροφήσει περισσότερο φως. Αυτό σημαίνει ότι ο φωτοευαισθητοποιητής παραμένει αμετάβλητος πριν και μετά την ενεργειακή ανταλλαγή, όπως και η ετερογενής φωτοκατάλυση<sup>[3]</sup>. Ένας κλάδος της χημείας που χρησιμοποιεί συχνά φωτοευαισθητοποιητές

είναι η χημεία πολυμερών, που χρησιμοποιεί φωτοευαισθητοποιητές σε αντιδράσεις όπως ο φωτοπολυμερισμός, η φωτοδιασταύρωση και η φωτοαποικοδόμηση.

Οι φωτοευαισθητοποιητές χρησιμοποιούνται επίσης για τη δημιουργία παρατεταμένων διεγερμένων ηλεκτρονικών καταστάσεων σε οργανικά μόρια με χρήσεις στη φωτοκατάλυση, την ανοδική μετατροπή φωτονίων και τη φωτοδυναμική θεραπεία. Γενικά, οι φωτοευαισθητοποιητές απορροφούν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που αποτελείται από υπέρυθη ακτινοβολία, ακτινοβολία ορατού φωτός και υπεριώδη ακτινοβολία και μεταφέρουν την απορροφούμενη ενέργεια σε γειτονικά μόρια. Αυτή η απορρόφηση φωτός καθίσταται δυνατή από τα μεγάλα απεντοπισμένα π-συστήματα των φωτοευαισθητοποιητών, τα οποία μειώνουν την ενέργεια των τροχιακών HOMO και LUMO για την προώθηση της φωτοδιέγερσης. Ενώ πολλοί φωτοευαισθητοποιητές είναι οργανικές ή οργανομεταλλικές ενώσεις, υπάρχουν επίσης παραδείγματα χρήσης κβαντικών κουκκίδων ημιαγωγών ως φωτοευαισθητοποιητές.



**Εικόνα2.6:** Βασικό σχηματικό για όλους τους φωτοευαισθητοποιητές (PS) όπου ο φωτοευαισθητοποιητής απορροφά το φως ( $h\nu$ ) και μεταφέρει ενέργεια για να δημιουργήσει μια φυσικοχημική αλλαγή <sup>[3]</sup>.

Πολλές ομάδες έχουν δείξει ότι οι πορφυρίνες είναι αποτελεσματικές PS για χρήση στην aPDT (αντιβακτηριακή φωτοδυναμική θεραπεία). Οι πορφυρίνες έχουν επιδείξει σημαντικό ευρύ φάσμα δράσης έναντι των βακτηρίων Gram-(+) και Gram-(-) σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (0,1-5  $\mu\text{M}$ ). Η φωτοδυναμική θεραπεία που προκαλείται από την αντιβακτηριακή δράση τους δείχνει τις ακόλουθες μοναδικές ιδιότητες <sup>[2]</sup>:

- Οι πορφυρίνες έχουν σχετικά χαμηλή τοξικότητα *in vitro* και *in vivo* και μπορούν να λειτουργήσουν ως υδατοδιαλυτές ή αδιάλυτες στο νερό.
- Μπορούν να απομακρυνθούν σε εύλογο χρόνο από το σώμα και γρήγορα από το δέρμα για να αποφευχθεί η φωτοευαίσθητη αντίδραση.
- Οι πορφυρίνες μπορούν επίσης να διαθέτουν ικανή αμφιφιλικότητα και ικανότητα για πολλές χημικές τροποποιήσεις.
- Έχουν υψηλή κβαντική απόδοση (πάνω από 0,70) για παραγωγή  $\text{O}_2$  και υψηλό συντελεστή απορρόφησης ενός φωτονίου ( $=500.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).



- Οι πορφυρίνες έχουν υψηλή δέσμευση σε κυτταρικά συστατικά, μεμβράνες, πρωτεΐνες και DNA.
- Επιπλέον, έχουν ένα «θεραπευτικό παράθυρο» όπου είναι ενεργά στη θανάτωση βακτηριακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών σε πολλά φάρμακα βακτηρίων (π.χ. MRSA), ενώ δεν καταστρέφουν τα καλλιεργημένα ανθρώπινα κύτταρα.

Οι Larson και Marley το 1994 περιέγραψαν τρεις τρόπους δράσης με τους οποίους τα ενεργοποιούμενα από το φως αντιμικροβιακά μέσα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το κύτταρο:

1. Το πρώτο είναι ότι το PS εγκαθίσταται έξω από το κύτταρο, δημιουργώντας αντιδραστικά είδη οξυγόνου σε διάλυμα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα κύτταρα του οργανισμού-στόχου και να αντιδράσουν για να προκαλέσουν κυτταρική βλάβη.
2. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι ότι το PS συνδέεται ή εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη (με υδρόφοβες ή κουλομβικές αλληλεπιδράσεις)-με την απορρόφηση φωτός, το PS μεταφέρει ενέργεια (π.χ. ένα ηλεκτρόνιο, άτομο υδρογόνου κλπ.) σε βιομόρια στόχους εντός του κυττάρων, με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS που προκαλούν κυτταρική βλάβη. Οι ανιονικές πορφυρίνες ακολουθούν αυτόν τον μηχανισμό φωτοευαισθητοποίησης.
3. Η τρίτη πιθανότητα είναι ότι το PS διεισδύει στο εσωτερικό του κυττάρου και συνδέεται με έναν ενδοκυτταρικό στόχο, πιθανώς μια πρωτεΐνη (που προκαλεί ενζυματική βλάβη) ή τον πυρήνα (προκαλώντας γενετική βλάβη). Οι κατιονικές πορφυρίνες που συνδέονται ισχυρά με τα πολυ-ανιονικά μακρομόρια, όπως το DNA είναι καλά παραδείγματα αυτού του τύπου φωτο-τοξικού παράγοντα.

#### 2.1.4. Πορφυρίνες στη θεραπεία του καρκίνου

Οι πορφυρίνες μπορούν να συσσωρευτούν στους καρκινικούς ιστούς σε μεγαλύτερο βαθμό από ό,τι στους περιβάλλοντες υγιείς ιστούς και η αναλογία του ιστού όγκου προς τον φυσιολογικό ιστό είναι γενικά περίπου 2-3:1, προσπαθώντας να ξεπεραστούν τα κύρια εμπόδια στη θεραπεία του καρκίνου, έχει κατασκευαστεί μια ποικιλία νανοσωματιδίων για τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου για την επίτευξη υψηλής ποιότητας απεικόνισης του καρκίνου και για την επίτευξη ενισχυμένης θεραπευτικής αποτελεσματικότητας με μη σοβαρή κυτταροτοξικότητα σε φυσιολογικά κύτταρα. Ειδικότερα, τα θερανοστικά νανοσωματίδια ως θεραπεία που συνδυάζει διαγνωστική απεικόνιση καρκίνου και κατά συνέπεια στοχευμένη θεραπεία έχουν προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον. Οι θερανοστικές νανοτεχνολογίες μπορούν

να παρέχουν στους ασθενείς διάφορες θεραπευτικές επιλογές που είναι κατάλληλες για συγκεκριμένα άτομα, γεγονός που οδηγεί σε βελτιωμένες προγνώσεις.

Ωστόσο, ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα των πρώιμων εξελίξεων στο σχεδιασμό του PS ήταν η κακή διαλυτότητά τους σε υδατικό διάλυμα σε φυσιολογικό pH, το οποίο εμπόδιζε την παροχή μέσω ένεσης στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό προώθησε την ενθυλάκωση ή τη σύνδεση του υδρόφοβου PS σε διάφορα νανοσωματίδια για την βελτίωση των ιδιοτήτων τους. Τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα έχουν προκαλέσει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον στον τομέα της PDT για τα αμίμητα οπτικά και μηχανικά τους χαρακτηριστικά, την ευέλικτη χημική λειτουργικότητα, την καλή βιοσυμβατότητα και τη χαμηλή τοξικότητα <sup>[4]</sup>. Υπάρχουν πολλά νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα λόγω πολλών αλλοτροπικών μορφών άνθρακα. Μεταξύ αυτών, οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs), τα φουλερένια και τα νανοϋλικά με βάση το γραφένιο εφαρμόζονται ευρύτερα στην PDT. Συγκεκριμένα, λόγω της μεγάλης επιφάνειας, των εξαιρετικών θερμικών και οπτικών ιδιοτήτων, καθώς και της καλής βιοσυμβατότητας, τα νανοϋλικά βάσης γραφενίου, συμπεριλαμβανομένων των κβαντικών κουκκίδων γραφενίου (GQDs), του οξειδίου του γραφενίου (GO) και του ανηγμένου GO (rGO), έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για θεραπεία καρκίνου, όπως η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων και η PDT <sup>[5]</sup>.

## 2.2. Κβαντικές τελείες άνθρακα (CQDs)

### 2.2.1. Εισαγωγή

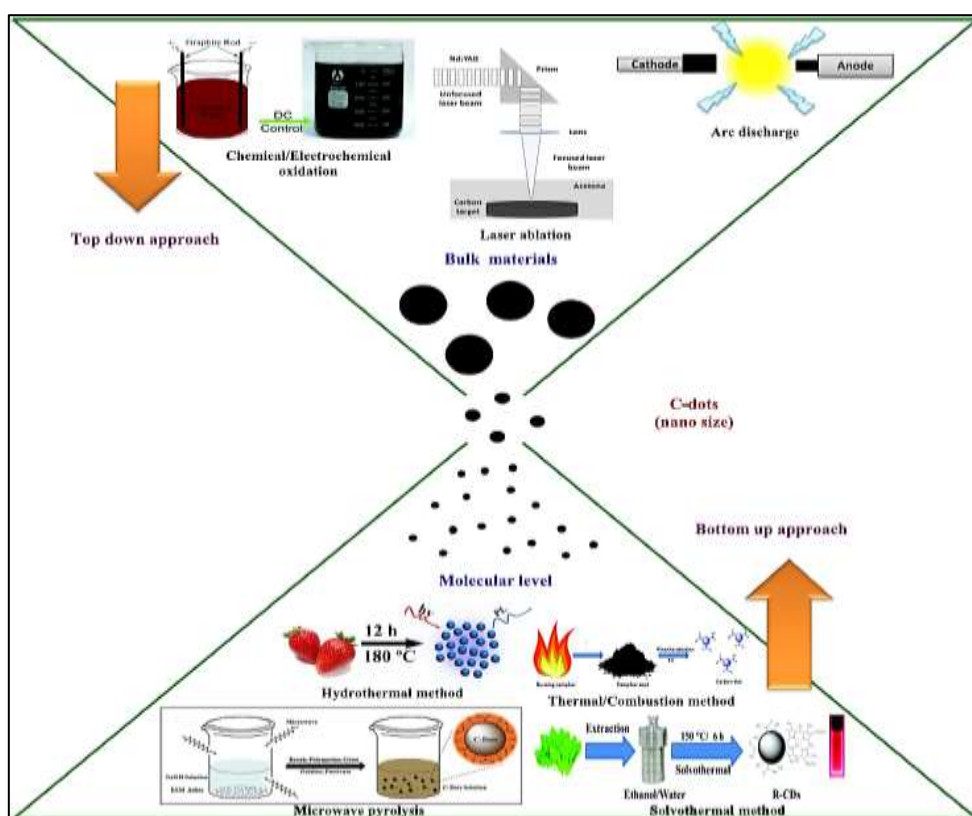
Οι κβαντικές τελείες άνθρακα αποτελούν ένα νέου τύπου νανοϋλικό μηδενικών διαστάσεων (0D) με διατομή που δεν ξεπερνάει τα 20nm. Αποτελούνται από νανοκρυσταλλικούς πυρήνες με  $sp^3$  συζευγμένο άνθρακα που περιέχει σημαντικές ατέλειες. Απομονώθηκαν πρώτη φορά το 2004 <sup>[6-7]</sup> έπειτα από εκχύλιση από νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος. Έκτοτε προέκυψε ότι οι κβαντικές τελείες άνθρακα μπορούν να αντικαταστήσουν τις κβαντικές τελείες μετάλλων, των οποίων η χρήση περιορίζεται σημαντικά σε βιολογικές εφαρμογές λόγω της τοξικότητάς τους.

Οι κβαντικές τελείες άνθρακα διαθέτουν πολλά πλεονεκτήματα που διευκολύνουν τη χρήση τους σε βιολογικές εφαρμογές. Τα βασικότερα από αυτά είναι η βιοσυμβατότητα, η υδροφιλικότητα, η χαμηλή κυτταροτοξικότητα και το χαμηλό κόστος παραγωγής τους.

### 2.2.2. Τρόποι παρασκευής

Οι μέθοδοι σύνθεσης των τελειών άνθρακα ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις bottom up και top down μεθόδους (Εικόνα 2.7). Η βασική διαφοροποίηση τους έγκειται στις

πρόδρομες ενώσεις (precursors). Στις top down μεθόδους, οι τελείες άνθρακα προετοιμάζονται με κατακερματισμό υλικών άνθρακα μεγαλύτερων διαστάσεων, μέσω οξείδωσης οξέων, εκκένωσης τόξου, αφαίρεσης υλικού με λέιζερ (laser ablation), απολέπισης υπερήχων ή ηλεκτροχημικής απολέπισης. Στις bottom up μεθόδους οι κβαντικές τελείες παρασκευάζονται υδροθερμικά, με μικροκύματα, με θερμική πυρόλυση. Το μέγεθος και η ομοιομορφία τους παίζουν βασικό ρόλο στις ιδιότητές τους και μπορούν να βελτιστοποιηθούν περαιτέρω με φυγοκέντριση ή διαχωρισμό. Ακόμη, οι επιφανειακές ιδιότητες, που είναι κρίσιμες για τη διαλυτότητά τους, ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας ή της μετέπειτα επεξεργασίας. Οι τελείες άνθρακα μπορούν να παρασκευαστούν κατάλληλα, ώστε να περιέχουν διάφορες λειτουργικές ομάδες, όπως υδροξύλιο, καρβοξύλιο, καρβονύλιο. Τροποποιούνται ακόμη εύκολα με αμίνη, φωσφόρο, θείο και ετεροάτομα, που περιέχουν βόριο<sup>[8]</sup>.



Εικόνα2.7: Μέθοδοι σύνθεσης τελειών άνθρακα <sup>[9]</sup>.

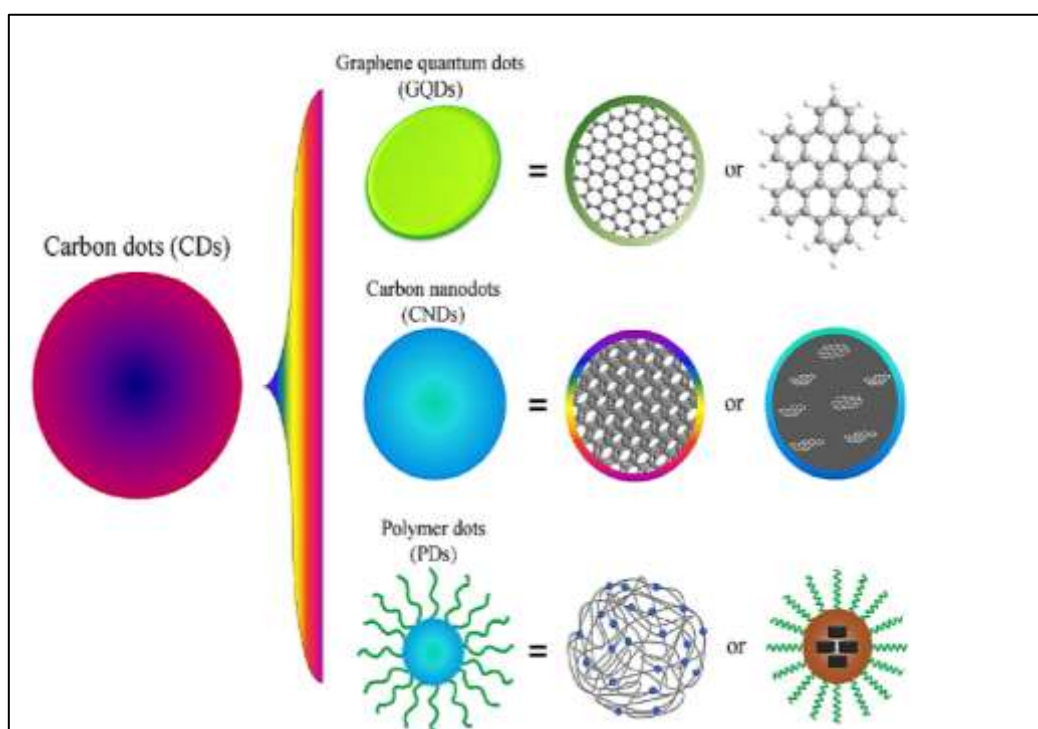
### 2.2.3. Ιδιότητες κβαντικών τελειών άνθρακα

#### 2.2.3.1. Χημική δομή

Στην πραγματικότητα, οι τελείες άνθρακα περιλαμβάνουν ακόμη τις κβαντικές τελείες γραφενίου (GQDs) και τις πολυμερικές τελείες (PDs), πέραν των νανοτελειών άνθρακα

(Εικόνα 2.8). Η χημική δομή διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο σύνθεσης. Για παράδειγμα, οι κβαντικές τελείες γραφενίου διαθέτουν ένα ή παραπάνω στρώματα γραφενίου με συνδεδεμένες χημικές ομάδες στις άκρες. Είναι ανισότροπα και οι πλευρικές τους διαστάσεις είναι μεγαλύτερες από το ύψος τους. Οι GQDs διαθέτουν συγκεκριμένη κρυσταλλικότητα, με σταθερά πλέγματος ίση με 2.4 Å. Οι κβαντικές τελείες άνθρακα είναι πάντα σφαιρικές, και χωρίζονται σε νανοσωματίδια άνθρακα με και χωρίς κρυσταλλικό πλέγμα.

Οι πολυμερικές τελείες είναι συσσωματωμένα ή διασυνδεδεμένα πολυμερή νανοσωματίδια, που προέρχονται από γραμμικό πολυμερές ή μονομερή <sup>[10]</sup>.



*Εικόνα2.8: Χημική δομή τελειών άνθρακα <sup>[10]</sup>.*

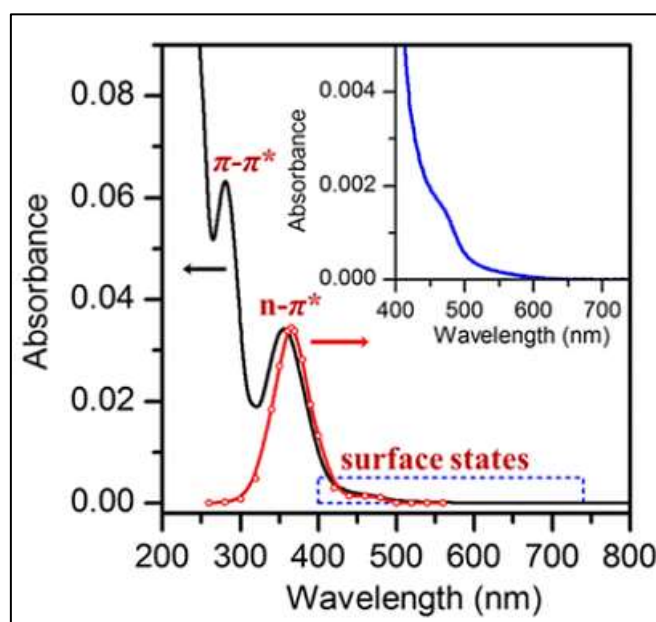
### 2.2.3.2. Οπτικές ιδιότητες

Παρά την ποικιλομορφία των δομών τους, οι τελείες άνθρακα διαθέτουν παρόμοιες οπτικές ιδιότητες όσον αφορά στην οπτική απορρόφηση και στον φθορισμό τους. Οι κβαντικές τελείες άνθρακα συνήθως εμφανίζουν οπτική απορρόφηση στην περιοχή UV (230-320 nm), που μπορεί να εκτείνεται και στην ορατή περιοχή. Μια μέγιστη κορυφή που εμφανίζεται περίπου στα 230 nm οφείλεται σε π-π\* μετάπτωση αρωματικών δεσμών C-C, ενώ μια κορυφή στα 300 nm αποδίδεται σε n-π\* μετάπτωση των δεσμών C=O <sup>[5]</sup> (Εικόνα 2.9).

Τα φάσματα εκπομπής των κβαντικών τελειών άνθρακα είναι σχεδόν συμμετρικά στην κλίμακα του μήκους κύματος. Οι κορυφές των εκπομπών είναι συνήθως πλατιές, με σημαντικές μετατοπίσεις Stokes (Stokes shifts), σε σύγκριση με τα φάσματα εκπομπής οργανικών χρωστικών. Ένα από τα χαρακτηριστικά που ξεχωρίζει τις κβαντικές τελείες

άνθρακα είναι η καθαρή εξάρτηση μεταξύ του μήκους κύματος διέγερσης ( $\lambda_{excitation}$ ) με το μήκος κύματος εκπομπής και την ένταση της εκπομπής (wavelength-dependent behavior). Ο μηχανισμός που προκαλεί αυτό το φαινόμενο δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά πιθανότατα οφείλεται είτε στην ευρεία κατανομή μεγεθών στις κουκκίδες είτε σε επιφανειακές ατέλειες.

Οι ιδιότητες φθορισμού τους εξαρτώνται άμεσα από το μέγεθος τους και την έκταση των λειτουργικών ομάδων, που φέρουν στην επιφάνεια τους. Οι πιο συνηθισμένες κβαντικές τελείες παρουσιάζουν ισχυρή φωτοφωταύγεια από το μπλε έως το πράσινο, ενώ μερικές διαθέτουν τη βέλτιστη εκπομπή σε περιοχές μεγάλου μήκους κύματος <sup>[10]</sup>.



Εικόνα 2.9: Φάσματα απορρόφησης και διέγερσης του κολλοειδούς διαλύματος Si-τελειών άνθρακα<sup>[10]</sup>.

### 2.2.3.3. Τοξικότητα

Η διερεύνηση της τοξικότητας των κβαντικών τελειών είναι μεγάλης σημασίας, ώστε να είναι ασφαλής η χρήση τους σε βιολογικές εφαρμογές. Η χρήση κβαντικών τελειών μετάλλων, όπως το κάδμιο, στην κυτταρική απεικόνιση παρουσιάζει σοβαρά προβλήματα κυτταροτοξικότητας. Το πρόβλημα αυτό δύναται να λύσουν οι τελείες άνθρακα. Οι τελείες άνθρακα θεωρούνται ασφαλείς, χωρίς ζωτική τοξικότητα και έχουν δοκιμαστεί σε σειρές κύτταρων *in vitro*, αλλά και σε πειράματα *in vivo*. Χάρη στη βιοσυμβατότητά τους, ανοίγουν τον δρόμο για πληθώρα βιοϊατρικών εφαρμογών στην απεικόνιση κυττάρων, στη θεραπεία του καρκίνου, ως φορείς φαρμάκων, αλλά και ως βιο-αισθητήρες για τη διάγνωση ασθενειών <sup>[9]</sup>.

Μέχρι στιγμής, η εγγενής τοξικότητα των κβαντικών τελειών άνθρακα έχει εξεταστεί σε μελέτες βιωσιμότητας κυττάρων, αλλά και σε *in vivo* πειράματα σε ποντικούς. Οι τελείες

άνθρακα είναι βιοσυμβατές, με χαμηλή κυτταροτοξικότητα, δεν δημιουργούν φλεγμονές σε γειτονικά όργανα.

#### 2.2.4. Βιολογικές εφαρμογές

##### 2.2.4.1. *In vivo* και *in vitro* κυτταρική απεικόνιση

Οι φθορίζουσες κβαντικές νανοτελείες άνθρακα είναι πολύ αποδοτικές στην κυτταρική απεικόνιση. Η εκπομπή PL στην κοντινή υπέρυθη περιοχή είναι υπεύθυνη για την *in vivo* εφαρμογή. Η εξαιρετική φωτοσταθερότητα και η ικανότητά τους να αντιστέκονται στη φωτοαποικοδόμηση (photobleaching) έκαναν τις τελείες άνθρακα έναν ευνοϊκό ανιχνευτή βιο-απεικόνισης. Η διαφοροποίηση των φυσιολογικών και των αποπτωτικών κυττάρων είναι δυνατή με τις κβαντικές τελείες άνθρακα, μέσω της ανάλυσης της έντασης φθορισμού. Προκύπτει υψηλότερη κατανομή των τελειών άνθρακα στα αποπτωτικά κύτταρα, εξαιτίας της αυξημένης διαπερατότητας της κυτταρικής τους μεμβράνης, με αποτέλεσμα τον έντονο φθορισμό, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα [11-12].

Οι εφαρμογές βιο-απεικόνισης των κβαντικών τελειών άνθρακα μπορούν να επεκταθούν και στη διάγνωση νοσημάτων. Τελείες άνθρακα μικρότερες των 3 nm είναι ικανές να διαπεράσουν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό και να στοχεύσουν επιλεκτικά κύτταρα γλοιώματος, ενεργώντας ως ένας αποτελεσματικός παράγοντας βιο-απεικόνισης και στόχευσης [13-14].

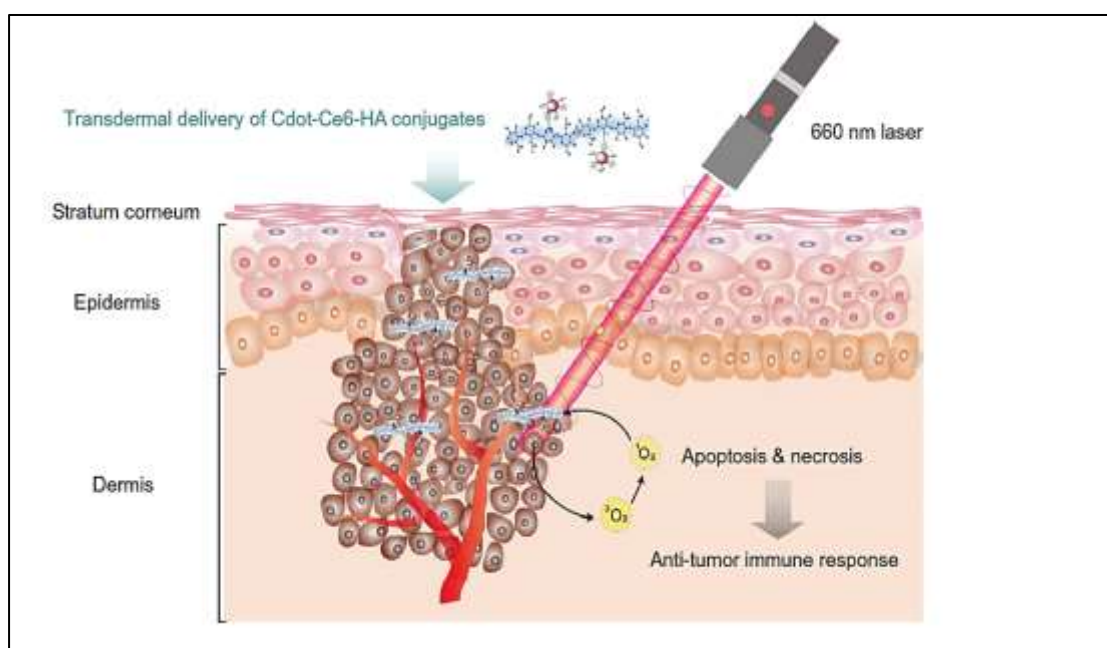
##### 2.2.4.2. Φωτοδυναμική/φωτοθερμική θεραπεία καρκίνου

Ερευνητές ασχολήθηκαν με τη φωτοδυναμική θεραπεία του δερματικού μελανώματος, μέσω διαδερμικής χορήγησης του συμπλόκου Cd<sup>0</sup>-Ce6-HA (carbon dot-chlorine e6-hyaluronate). Το chlorine e6 αποτελεί εγκεκριμένο φωτοευαισθητοποιητή, που χρησιμοποιείται κλινικά στην εφαρμογή της PDT. Η σύνθεση του συμπλόκου Cd<sup>0</sup>-Ce6-HA αποτελεί την πρώτη προσπάθεια για την επίτευξη μιας εύκολης διαδερμικής φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT) του μελανώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή ROS (Reactive Oxygen Species) του συμπλόκου προέκυψε ότι είναι σημαντικότερη από αυτή του chlorine e6 μόνου του. Είναι γνωστό ότι είναι δύσκολο να φτάσουν διαδερμικά φωτοευαισθητοποιητές σε καρκινικούς ιστούς, λόγω του περιορισμένου βάθους διείσδυσης. Ως εκ τούτου, η στοχευμένη διαδερμική παροχή φωτοευαισθητοποιητών είναι απολύτως απαραίτητη για μια αποτελεσματική PDT, αποτρέποντας την καταστροφή των φυσιολογικών κυττάρων.

Η ομάδα των Huang et al. [15] ανέφερε πρώτη την εφαρμογή PDT που χρησιμοποιεί Chlorine e6 (Ce6) συζευγμένο σε τελείες άνθρακα (Cdot), βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την υδατοδιαλυτότητα και το χρόνο ημι-ζωής του Ce6 στο αίμα. Το Ce6 ως φωτοευαισθητοποιητής

έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή απόδοση ROS (0.75), ισχυρό φθορισμό σε μήκη κύματος 660-670 nm και γρήγορη απομάκρυνση από το ανθρώπινο σώμα. Τα μειονεκτήματα του Ce6 είναι η κακή υδατοδιαλυτότητα και η έλλειψη εκλεκτικότητας.

Στο σύμπλοκο Cdote-Ce6 προστέθηκε ένας φυσικός γραμμικός πολυσακχαρίτης υαλουρονικού (HA), ο οποίος έχει διερευνηθεί ευρέως για διάφορες εφαρμογές χορήγησης φαρμάκων (drug delivery). Το HA έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως πολλά υποσχόμενος διαδερμικός μεταφορέας χορήγησης. Αν και ο μηχανισμός δράσης του στη χορήγηση φαρμάκων διαδερμικά δεν είναι ακόμη αρκετά σαφής, το υγροσκοπικό HA μπορεί να ενυδατώσει την κεράτινη στιβάδα, ενισχύοντας τη διαπερατότητά της. Ειδικά, το καρκινικό δέρμα έχει υπερεκφρασμένους υποδοχείς HA (Εικόνα 2.10).

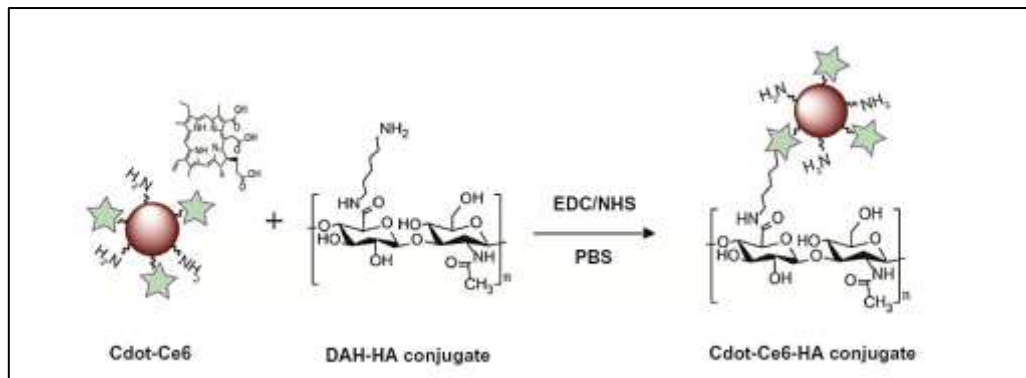


**Εικόνα 2.10:** Σχηματική απεικόνιση της φωτοδυναμικής θεραπείας του δερματικού μελανώματος μετά από διαδερμική χορήγηση Cdote-Ce6-HA [15].

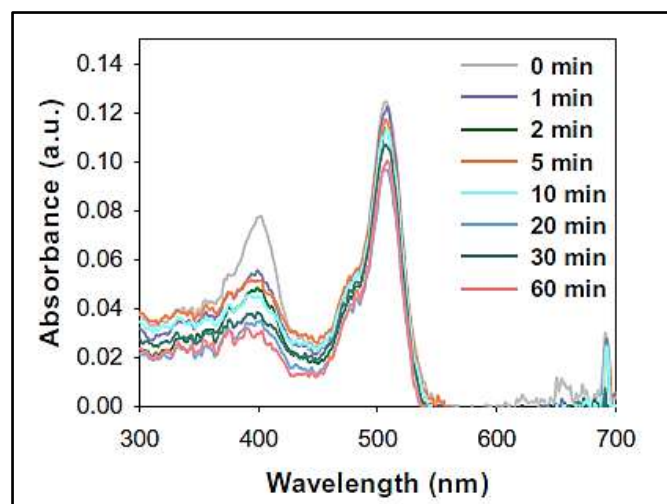
Το σύμπλοκο Cdote-Ce6 συντέθηκε μέσω αντίδρασης σύζευξης Ce6 και κβαντικών τελειών άνθρακα σε διαλύτη DMSO. Το σύμπλοκο Cdote-Ce6-HA προετοιμάστηκε με τον σχηματισμό δεσμών αμιδίων μεταξύ Cdote-Ce6 και DAH-HA σε PBS, χρησιμοποιώντας χημεία EDC (Εικόνα 3.5). Το σύμπλοκο ήταν σταθερό σε διάφορα βιολογικά διαλύματα. Αντίθετα, το Ce6 μόνο του δημιουργεί συσσωματώματα στο νερό, καθώς είναι υδρόφοβο, με αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού του.

Η δημιουργία των ROS από το συζευχθέν Cdote-Ce6-HA επιβεβαιώθηκε μέσω μετρήσεων των μεταβολών της απορρόφησης, της οπτικής πυκνότητας (optical density) και του σήματος φθορισμού του πράσινου αισθητήρα μονήρους οξυγόνου singlet oxygen sensor green (SOSG),

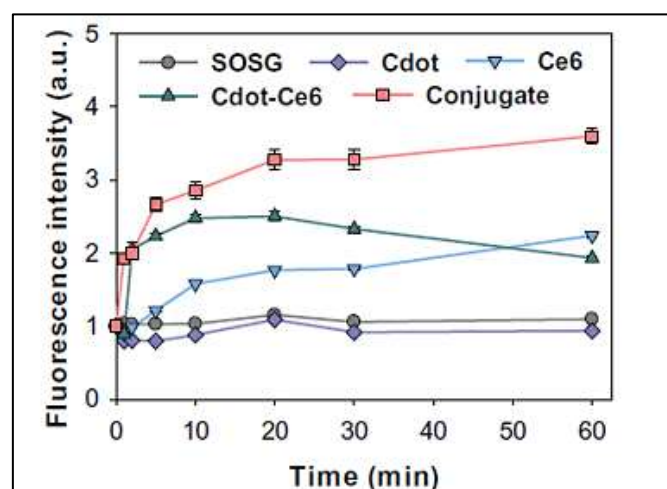
αναμεμιγμένου με το σύμπλοκο (Εικόνα 2.11). Ο SOSG αντιδρά με το μονήρες οξυγόνο και εκπέμπει πράσινο φθορισμό (Εικόνα 2.12).



Εικόνα 2.11: Σύνθεση του συζευγμένου Cdote-Ce6-HA με τη χρήση χημείας EDC/NHS [15].



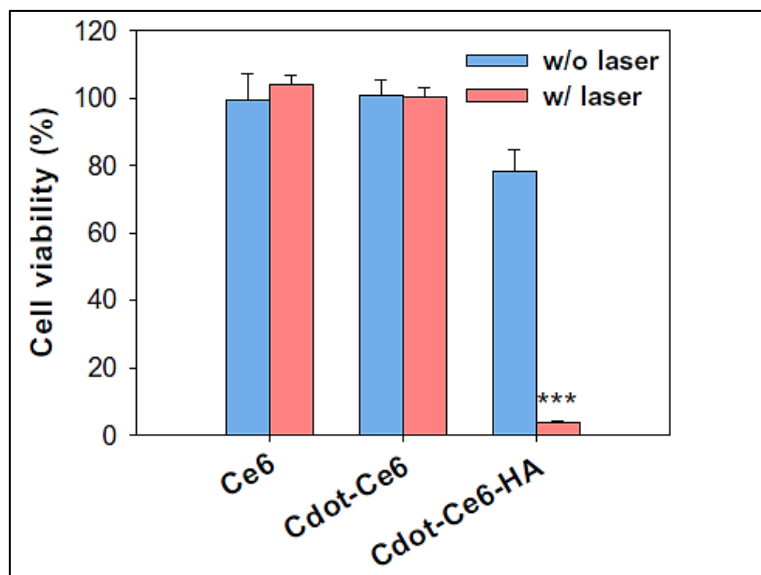
Εικόνα 2.12: Φάσματα απορρόφησης του SOSG εξαρτώμενο από το χρόνο μετά την παραγωγή μονήρες οξυγόνου με το Cdote-Ce6-HA [15].



Εικόνα 2.13: Μεταβολές της έντασης εκπομπών φθορισμού του SOSG σε διαλύματα που περιέχουν διαφορετικούς παράγοντες με αυξανόμενο χρόνο ακτινοβολήσης στα 530 nm [15].



Η φωτοδυναμική δράση του συζευγμένου Cdot-Ce6-HA αναλύθηκε σε κύτταρα μελανώματος B16F10 απουσία και παρουσία ακτινοβολίας κόκκινου λέιζερ 660 nm. Το σύμπλοκο Cdot-Ce6-HA έδειξε πολύ πιο σημαντικό φωτοδυναμικό αποτέλεσμα από τα Ce6 και Cdot-Ce6, το οποίο αποδίδεται στην αποτελεσματικότερη πρόσληψή του στα κύτταρα, μέσω ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση του υποδοχέα HA (Εικόνα 2.14).

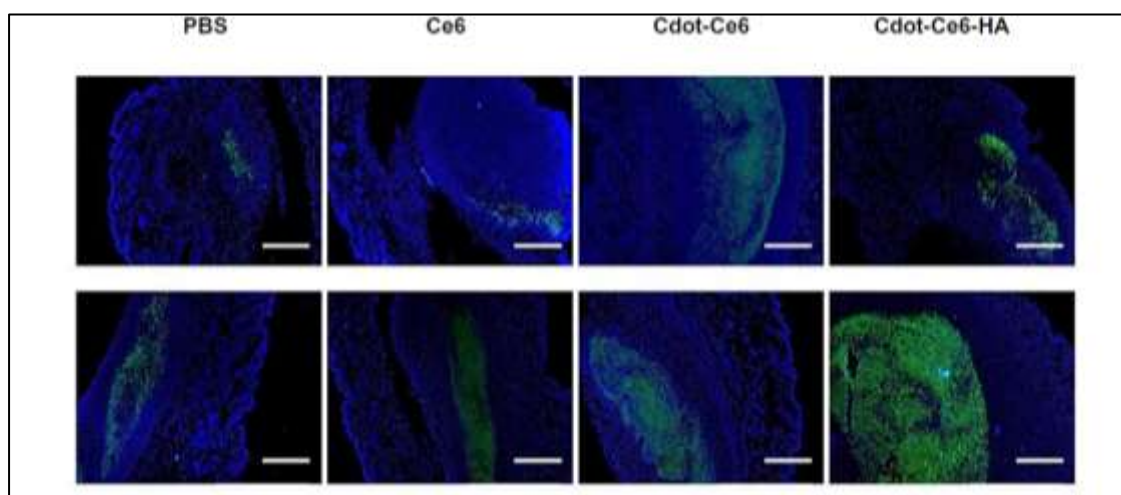


Εικόνα 2.14: Κυτταρική βιωσιμότητα με και χωρίς ακτινοβολήση με λέιζερ (για 10 min) <sup>[15]</sup>.

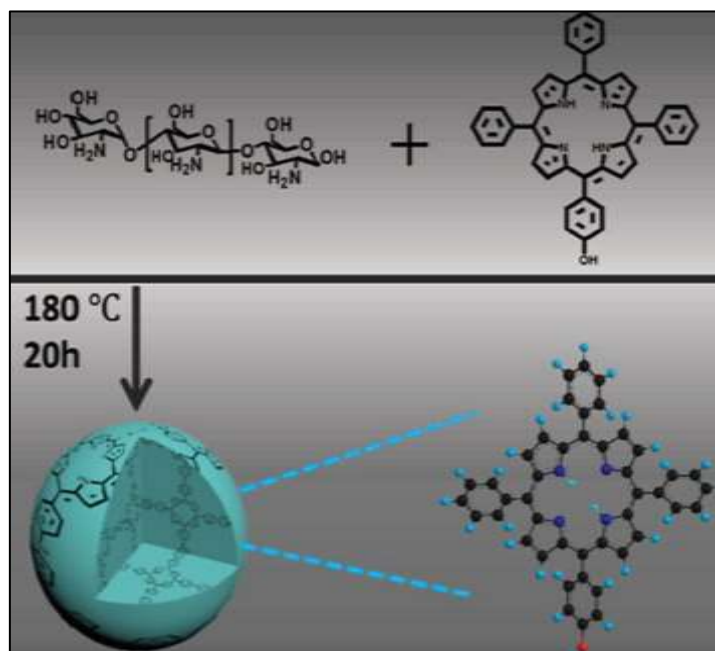
Για την παρατήρηση των αποπτωτικών οδών που δημιουργεί η PDT, διερευνήθηκαν καρκινικά κύτταρα συν-καλλιεργημένα με PBS, Ce6, Cdot-Ce6 και Cdot-Ce6-HA με απουσία και παρουσία ακτινοβολήσης με λέιζερ και αναλύθηκαν σε δοκιμασία φθορισμού TUNEL (Εικόνα 2.15). Η δοκιμασία TUNEL χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA, που προκαλείται από την απόπτωση. Οι φυσιολογικοί κυτταρικοί πυρήνες είναι χρώσης μπλε, ενώ οι περιοχές που ανιχνεύονται από τη δοκιμασία TUNEL είναι πράσινες. Είναι αξιοσημείωτο πως μετά τη θεραπεία με Cdot-Ce6-HA υπό ακτινοβολήση λέιζερ 660 nm, η κυτταρική απόπτωση που παρατηρήθηκε ήταν πολύ σημαντική κάνοντας όλη την περιοχή του όγκου πράσινη. Από τα αποτελέσματα, θα μπορούσαμε να επιβεβαιώσουμε την σκοπιμότητα της σύζευξης Cdot-Ce6-HA για τη διαδερμική PDT του μελανώματος.

Οι πορφυρίνες και τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται ευρέως ως φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία. Η πορφυρίνη κατέχει δύο βασικές απορροφήσεις περίπου στα 420 nm (ζώνη Soret) και μια απορρόφηση στα 630 nm (Q-band) (satellite absorption). Η πορφυρίνη μπορεί να παράγει ROS (reactive oxygen species) αντίστοιχα υπό ακτινοβολία 420 και 630 nm. Μετά την έγκριση του φαρμάκου Photofrin, οι ερευνητές δίνουν μεγάλη βαρύτητα στην ανάπτυξη αποτελεσματικών φωτοευαισθητοποιητών, με βάση τις πορφυρίνες. Ωστόσο, η κακή υδατοδιαλυτότητα και τα μικρά χρονικά διαστήματα κυκλοφορίας τους στο αίμα περιορίζουν σοβαρά την εφαρμογή των παράγωγων πορφυρίνης στην PDT. Λύση στο

πρόβλημα θα μπορούσαν να δώσουν τα νανοσύνθετα με βάση τις τελείες άνθρακα που περιέχουν πορφυρίνη. Η καλή διαλυτότητα και τα μικρά μεγέθη τους θα είναι ένας εναλλακτικός τρόπος για την εφαρμογή της πορφυρίνης. Κατά τη μελέτη αυτή παρασκευάστηκαν τελείες άνθρακα με βάση τη πορφυρίνη (CD-TPP) (mono-hydroxylphenyl triphenylporphyrin-TPP) και τη χιτοζάνη, μέσω μιας εύκολης υδροθερμικής μεθόδου ενός σταδίου (Εικόνα 2.15).

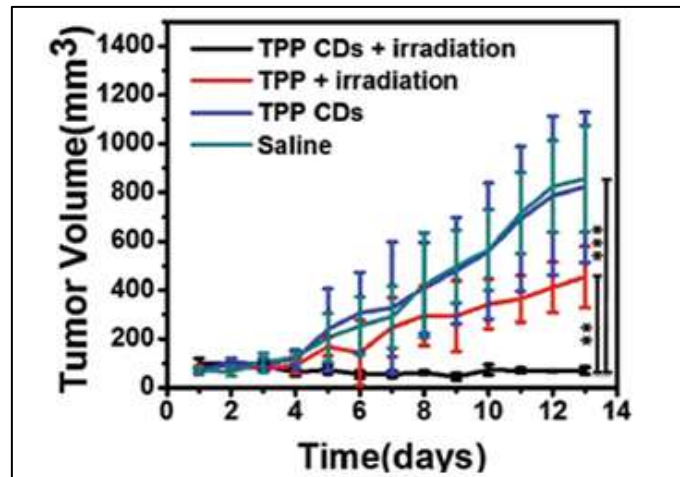


**Εικόνα 2.15:** Δοκιμασίες TUNEL καρκινικών ιστών του δέρματος μετά τη θεραπεία με PBS, Ce6, Cdot-Ce6 και Cdot-Ce6-HA κατά την απουσία (επάνω) και παρουσία (κάτω) ακτινοβολίας λέιζερ (μπλε: φυσιολογικοί πυρήνες κυττάρων, πράσινοι: περιοχή θετική στη δοκιμασία TUNEL) [16].



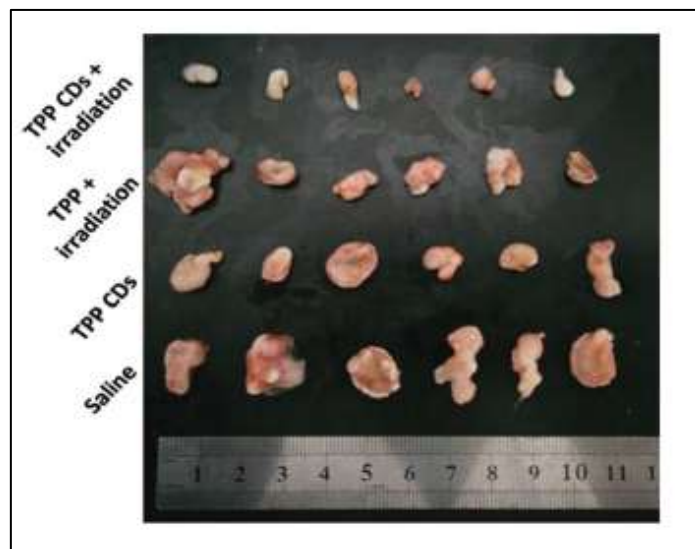
**Εικόνα 2.16:** Σύνθεση τελείων άνθρακα με βάση τη πορφυρίνη (CD-TPP) (mono-hydroxylphenyl triphenylporphyrin (TPP)) και τη χιτοζάνη μέσω υδροθερμικής μεθόδου ενός σταδίου [16].

Για να αξιολογηθεί το θεραπευτικό τους αποτέλεσμα διεξήχθησαν περαιτέρω έρευνες σε ξενομοσχεύματα ηπατοκαρκινώματος (H22), που εισήχθησαν σε ποντικούς. Οι ποντικοί χωρίστηκαν σε 4 γκρουπ ακολουθώντας είτε διαφορετική είτε καμία θεραπεία. Η μείωση ή όχι των όγκων τους καταγράφηκε σε διάστημα 14 ημερών, όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 2.17).



Εικόνα 2.17: Όγκος των καρκινικών ξενομοσχευμάτων των ποντικών ανά ημέρα για τις τέσσερις ομάδες <sup>[16]</sup>.

Προφανής καρυορρηξία παρατηρείται στην ομάδα PDT, γεγονός που σημαίνει ότι τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα έχουν υποστεί βλάβη (Εικόνα 2.18). Τα σύνθετα CDs-TPP, που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο της ανωτέρω εργασίας, παρουσίασαν καλή φωτοσταθερότητα, βιοσυμβατότητα, ικανοποιητική κυτταρική πρόσληψη και ισχυρή κυτταροτοξικότητα μετά από ακτινοβόληση. Τα *in vivo* θεραπευτικά αποτελέσματα επικυρώνουν ότι τα CDs-TPP μπορούν να καταστείλουν την αύξηση του καρκινικού όγκου.



Εικόνα 2.18: Ξενομοσχεύματα των τεσσάρων ομάδων αφότου οι ποντικοί θυσιάστηκαν <sup>[16]</sup>.

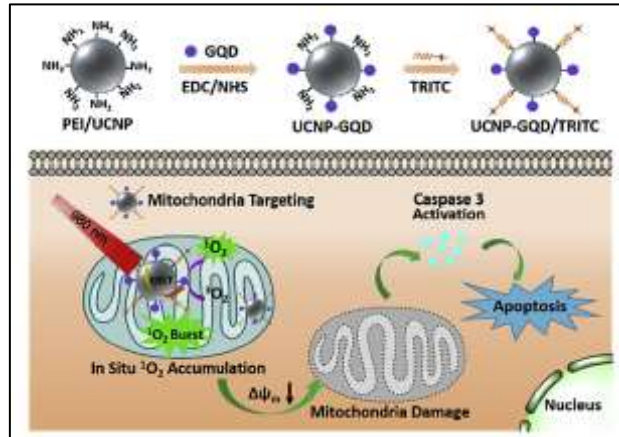
Η εύρεση ενός φωτοευαισθητοποιητή με υψηλή κβαντική απόδοση σε μονήρες οξυγόνο και ταυτόχρονα μετατόπιση του μήκους κύματος διέγερσης στο εγγύς υπέρυθρο φάσμα (NIR), με στόχο την βαθύτερη διείσδυση στους ιστούς αποτελεί ένα ενδιαφέρον ερευνητικό θέμα. Επιπλέον, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ελαχιστοποίηση της απόστασης, όπου διαχέονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου, ώστε το θεραπευτικό αποτέλεσμα να είναι περισσότερο στοχευμένο. Είναι γνωστό ότι τα νανοσωματίδια με προς τα πάνω μετατροπή συχνότητας (UCNP- up conversion nanoparticles) (σωματίδια που όταν απορροφούν ενέργεια 2 φωτονίων και άνω, εκπέμπουν ακτινοβολία σε μήκος κύματος μικρότερο από το αντίστοιχο της διέγερσης) μπορούν να μετατρέψουν το χαμηλής ενέργειας φως (NIR) σε UV-ορατό φως, το οποίο έχει εξεταστεί ευρέως σε βιολογικές εφαρμογές. Το μεγάλο μήκος κύματος διέγερσης των UCNPs αναμένεται να βελτιώσει το ανεπαρκές βάθος διείσδυσης στους ιστούς και την κακή φωτοσταθερότητα. Συνεπώς, εάν η ζώνη διέγερσης ενός φωτοευαισθητοποιητή ταιριάζει με το πεδίο εκπομπών του UCNP, κατά την ακτινοβολία με φως NIR, η εκπεμπόμενη ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί από το UCNP στον φωτοευαισθητοποιητή και να τον διεγείρει, μέσω μεταφοράς ενέργειας φθορισμού. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια είναι ένα από τα σημαντικότερα ενδοκυτταρικά οργανίδια για παραγωγή ενέργειας και η άμεση ζημιά και καταστροφή τους θα προωθούσε γρήγορα την προγραμματισμένη απόπτωση των κυττάρων.

Στη εργασία αυτή, προτείνεται μια νέα στρατηγική, σύμφωνα με την οποία ενσωματώνονται συνεργατικά νανοσωματίδια σπάνιων γαιών (up conversion nanoparticles) σε κβαντικές τελείες γραφενίου (GQD), με στόχο μια εξαιρετικά αποτελεσματική PDT. Η στρατηγική αυτή βασίζεται στα πλεονεκτήματα των UCNPs, τα οποία μπορούν να εκπέμπουν UV-ορατή ακτινοβολία υπό διέγερση στο εγγύς υπέρυθρο φως (NIR) και στα GQDs, που μπορούν να παράγουν αποτελεσματικά δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Επιπλέον, ένα υδρόφιλο παράγωγο της ροδαμίνης, TRITC, δένεται ομοιοπολικά με το νανოსύνθετο (UCNP-GQD/TRITC) (Εικόνα 2.19), εξαιτίας της εκλεκτικότητας που κατέχει ως προς τα μιτοχόνδρια. Κατά συνέπεια, η στοχευμένη στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων PDT προκαλεί απότομη μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η προτεινόμενη στρατηγική αναδεικνύει τα πλεονεκτήματα της στοχευμένης σε οργανίδια φωτοδυναμικής θεραπείας.

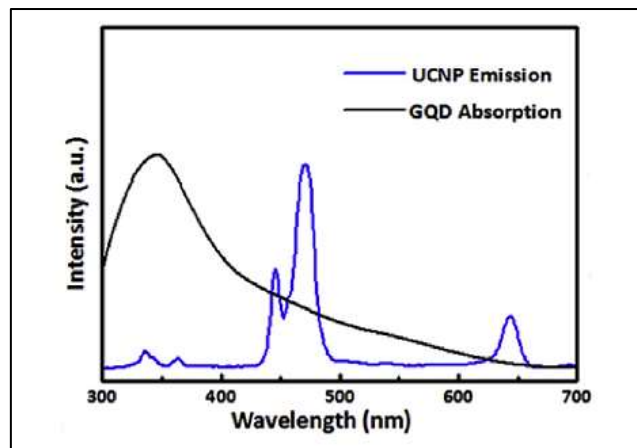
Τα νανοσωματίδια UCNP με σύνθεση αποτελούμενη από 59.5%  $Y^{3+}$  (Υττιριο), 40%  $Yb^{3+}$  (υτέρβιο) και 0.5%  $Tm^{3+}$  (θούλιο) επικαλύφθηκαν με διακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη (PEI), της οποίας οι ομάδες χρησιμοποιήθηκαν για να αντιδράσουν με τις καρβοξυλικές ομάδες στις κβαντικές τελείες άνθρακα. Τα νανοσωματίδια GQDs έδειξαν ένα ευρύ φάσμα απορρόφησης με μέγιστη κορυφή απορρόφησης στα ~340 nm, η οποία ταίριαζε καλά με τις εκπομπές UCNPs στα 336 nm και 363 nm κατά την ακτινοβολία λέιζερ 980 nm (Εικόνα 2.20).

Για την επιβεβαίωση της μεταφοράς ενέργειας από νανοσωματίδια των σπάνιων γαιών στις κβαντικές τελείες άνθρακα μελετήθηκαν τα φάσματα εκπομπών (Εικόνα 2.21) των GQD, UCNP, UCNP-GQD και UCNP-GQD/TRITC με μήκος κύματος διέγερσης στα 980 nm. Η

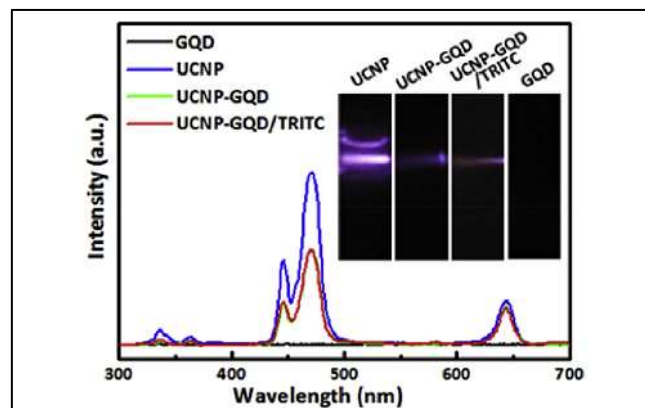
ένταση εκπομπής του UCNP-GQD/TRITC αποσβέστηκε σημαντικά από τις κβαντικές τελείες για την παραγωγή κυτταροτοξικού μονήρους οξυγόνου. Ειδικότερα, η εκπομπή κοντά στην υπεριώδη περιοχή εξαφανίστηκε σχεδόν πλήρως λόγω της ισχυρής απορρόφησης από τα GQDs στα 340 nm, και οι εκπομπές στα ~445 nm και ~470 nm είχαν επίσης μερικώς αποσβεσθεί.



Εικόνα 2.19: Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης του UCNP-GQD/TRITC με εκλεκτικότητα ως προς τα μιτοχόνδρια. Μετά την ακτινοβόληση με λέιζερ, η παραγωγή μονήρους οξυγόνου οδηγεί στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων [17].



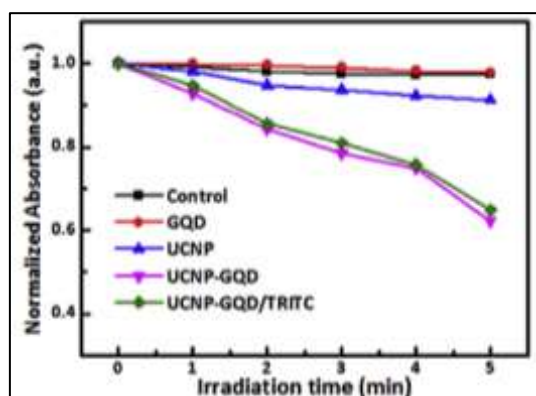
Εικόνα 2.20: Η φασματική επικάλυψη των εκπομπών UCNPs και της απορρόφησης GQDs [17].



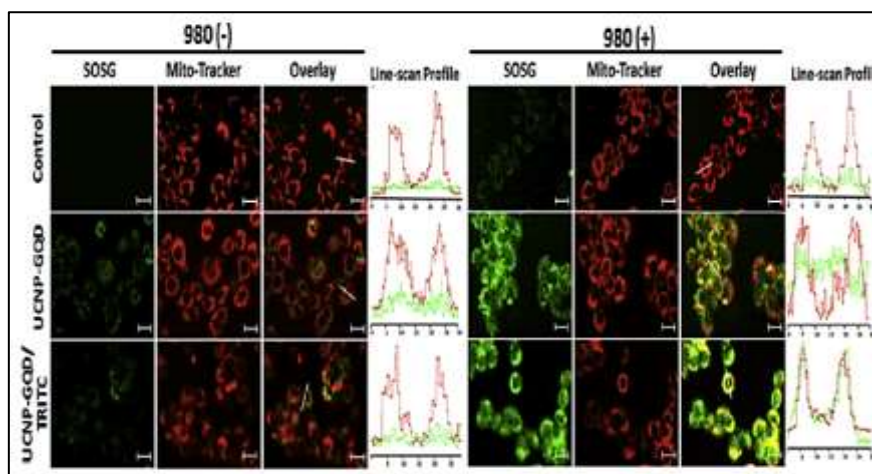
Εικόνα 2.21: Φάσματα φορτισμού για GQD, UCNP, UCNP-GQD και UCNP-GQD/TRITC με  $\lambda_{ex}=980nm$  [17].

Στη συνέχεια, η ικανότητα παραγωγής  $^1\text{O}_2$  από τα νανოსύνθετα εξετάστηκε με τη βοήθεια ενός εμπορικά διαθέσιμου αισθητήρα φθορισμού, που αντιδρά μη αναστρέψιμα με το μονήρες οξυγόνο με αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης του. Παρατηρήθηκε πως σε μεγαλύτερους χρόνους ακτινοβολήσης, η ένταση απορρόφησης μειωνόταν γρηγορότερα (Εικόνα 2.22). Οι κλίσεις των καμπύλων αντιπροσωπεύουν την απόδοση σε  $^1\text{O}_2$  με την παράταση του χρόνου ακτινοβολήσης.

Το υδρόφιλο παράγωγο της ροδαμίνης (TRITC) προσέδωσε στο νανοσύνθετο εκλεκτικότητα ως προς τα μιτοχόνδρια, η οποία παρατηρήθηκε στην CLSM απεικόνιση. Για τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιήθηκε βαφή Mitotracker Deep Red. Στην απεικόνιση, ο πράσινος φθορισμός από το UCNP-GQD/TRITC βρέθηκε να επικαλύπτει τα κόκκινα φθορίζοντα μιτοχόνδρια. Μετά την επιβεβαίωση της μιτοχονδριακής στόχευσης των νανοσύνθετων, η ενδοκυτταρική παραγωγή  $^1\text{O}_2$  ανιχνεύθηκε από το SOSG, που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στο μονήρες οξυγόνο. Το SOSG εκπέμπει πράσινο φθορισμό παρουσία  $^1\text{O}_2$ . Το πιο σημαντικό στην απεικόνιση ήταν ότι στα κύτταρα, που υποβλήθηκαν σε ακτινοβολήση στα 980 nm, το πράσινο SOSG συν-εντοπίζεται με τα κόκκινα μιτοχόνδρια (Εικόνα 2.23).

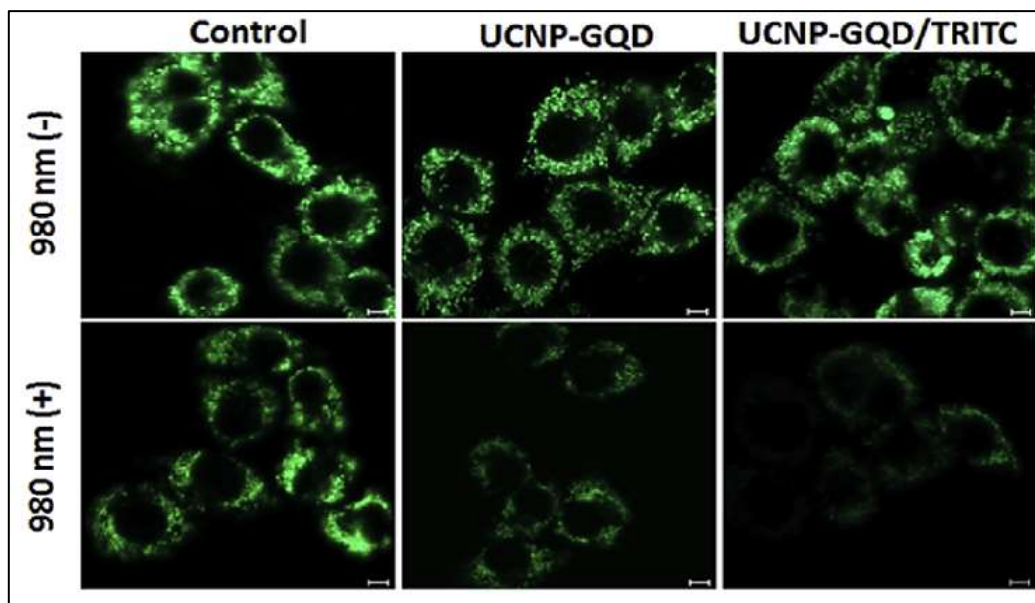


Εικόνα 2.22: Καμπύλες εξασθένισης των εντάσεων απορρόφησης του αισθητήρα φθορισμού στα 420 nm κατά την επεξεργασία με τα νανοσωματίδια και επακόλουθη ακτινοβολήση λέιζερ στα 980 nm, με αυξανόμενη διάρκεια <sup>[17]</sup>.



Εικόνα 2.23: Συνεστιακή απεικόνιση του  $^1\text{O}_2$  στα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια της βαφής SOSG <sup>[17]</sup>.

Η μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης υποδηλώνει τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η διερεύνηση της μιτοχονδριακής στόχευσης γίνεται με τη βοήθεια της βαφής ροδαμίνης 123 (Rh123), στην οποία η αλλαγή των σημάτων φθορισμού είναι ανάλογη της αλλαγής στο δυναμικό της μεμβράνης. Το σήμα της Rh123 μειώθηκε σημαντικά στην καλλιέργεια κυττάρων η οποία ακτινοβολήθηκε στα 980 nm και συν-καλλιεργήθηκε με τα νανοσύνθετα UCNP-GQD/TRITC, υποδεικνύοντας σοβαρή μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Εικόνα 2.24).



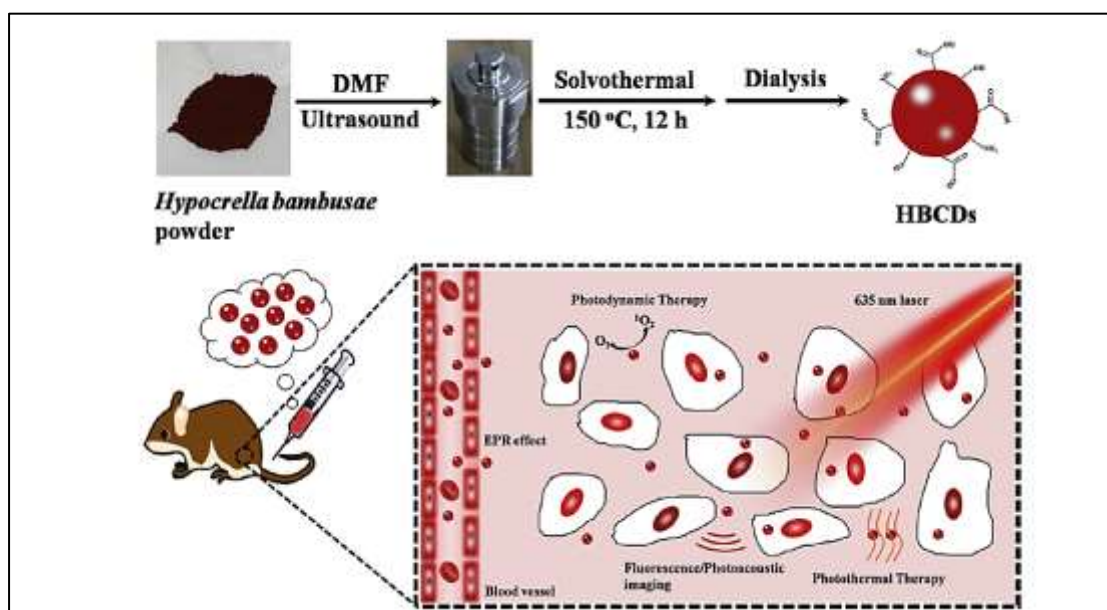
*Εικόνα 2.24: Εικόνες CLSM των κυττάρων Rh123 μετά από διαφορετικές επεξεργασίες. Η σημαντική μείωση του φθορισμού του Rh123 απέδειξε την αποπόλωση των μιτοχόνδρια [17].*

Η αντικαρκινική αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας περιορίζεται σοβαρά από την ταχεία εξάντληση του οξυγόνου σε υποξικό περιβάλλον όγκου. Επιπλέον, προκύπτουν πολλά μειονεκτήματα των επί του παρόντος χρησιμοποιούμενων κλασικών φωτοευαισθητοποιητών στα οποία συμπεριλαμβάνονται η σύνθετη συνθετική διαδικασία, η κακή υδατοδιαλυτότητα, η δυσμενής φωτοσταθερότητα, η αδύναμη απορρόφηση και η μικρή εκλεκτικότητα. Ως εκ τούτου, εκτός από τις σημαντικές προσπάθειες ανάπτυξης νέων φωτοευαισθητοποιητών με ιδανικά εγγενή χαρακτηριστικά για PDT, το συνεργικό μοντέλο της PDT σε συνδυασμό με τη φωτοθερμική θεραπεία (PTT) έχει επίσης ληφθεί υπόψη. Η φωτοθερμική θεραπεία δεν περιορίζεται από το υποξικό περιβάλλον του όγκου καθώς δεν εξαρτάται από την ύπαρξη ή μη οξυγόνου. Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους, που στοχεύουν στη διλειτουργική PDT/PTT βασίζονται στην ενσωμάτωση φωτοευαισθητοποιητών σε φωτοθερμικούς παράγοντες σε μια νανοπλατφόρμα. Η μέθοδος αυτή ενέχει τον κίνδυνο διαρροής του φωτοευαισθητοποιητή στη συστηματική κυκλοφορία

του ασθενούς. Ως εκ τούτου, χρειάζεται ένας απλός φωτοθεραπευτικός παράγοντας που μπορεί ταυτόχρονα να παράγει ROS και να προκαλεί υπερθερμία για συνεργική PDT/PTT.

Προτείνεται η *συνεργική* φωτοθερμική και φωτοδυναμική θεραπεία καρκινικών όγκων με τη χρήση τελειών άνθρακα που προκύπτουν από πράσινες πηγές. Η εργασία αυτή αντιμετώπισε αποτελεσματικά τις αδυναμίες των σύνθετων διαδρομών σύνθεσης και τα υψηλά τους κόστη προτείνοντας μια νέα προσέγγιση για τη σύνθεση νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα από φυσική βιομάζα, με στόχο τη θεραπεία του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν τον μύκητα *Hypocrella bambusae* ως πρόδρομη ένωση. Οι πράσινες τελείες άνθρακα που ελήφθησαν επέδειξαν καλή υδατοδιαλυτότητα, ευρεία απορρόφηση (350-800 nm), υπέρυθρο φάσμα εκπομπών (με μέγιστη κορυφή στα 610 nm) και χαμηλή βιοτοξικότητα. Επιπλέον, οι HBCDs (*Hypocrella bambusae* carbon dots) είχαν ικανοποιητική απόδοση στην παραγωγή ROS (0.38) και στην παραγωγή θερμότητας (27.6%) υπό ακτινοβολία στα 635 nm.

Το *Hypocrella bambusae* (HB) είναι ένας παρασιτικός μύκητας στο μπαμπού, που χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική. Από την εκχύλιση του προκύπτουν οι Hypocrellins, που έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν φωτοδυναμικές, αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι τελείες άνθρακα συντέθηκαν μέσω διαλυτοθερμικής μεθόδου (Εικόνα 2.25).



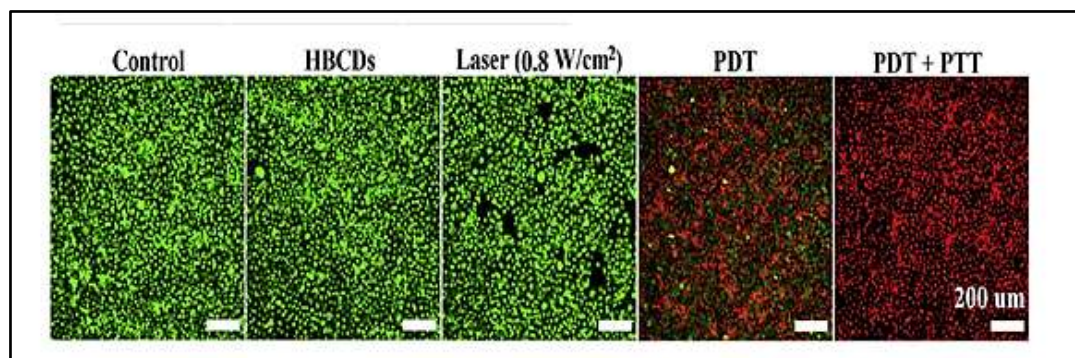
Εικόνα 2.25: Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης και χρήσης των HBCDs <sup>[17]</sup>.

Οι τελείες άνθρακα έδειξαν χαμηλή κυτταροτοξικότητα χωρίς ακτινοβολία λέιζερ. Τα κύτταρα HeLa, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με HBCDs έδειξαν υψηλή κυτταρική βιωσιμότητα (>90%), ακόμη και σε συγκεντρώσεις HBCDs έως 200 mg/mL. Αντιστρόφως, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με HBCDs και ακτινοβολήθηκαν με λέιζερ 0.1 W/cm<sup>2</sup> 635 nm (ομάδα PDT), η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε σταδιακά με την αύξηση της συγκέντρωσης των HBCDs. Ωστόσο, περίπου το 30% των κυττάρων στην ομάδα PDT επέζησε ακόμη και στις



υψηλές συγκεντρώσεις HBCDs, λόγω της ασθενούς αποτελεσματικότητας του PDT στο υποξικό περιβάλλον. Αντιθέτως στην ομάδα PDT + PTT σε πυκνότητα ισχύος  $0.8 \text{ W/cm}^2$  τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν υψηλά, περίπου στο 99%.

Για να επιβεβαιωθεί η συνεργική PDT/PTT αποτελεσματικότητα των HBCDs *in vitro* πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία Calcein AM/PI co-staining. Κανένας κυτταρικός θάνατος δεν παρατηρήθηκε στα κύτταρα HeLa που επώαστηκαν με HBCDs μόνο ή που ακτινοβολήθηκαν μόνο σε  $0.8 \text{ W/cm}^2$  στα 635 nm laser σε ατμόσφαιρα  $\text{N}_2$ . Ωστόσο, ένα μέρος των κυττάρων καταστράφηκαν στην ομάδα PDT και όλα τα κύτταρα καταστράφηκαν πλήρως στην ομάδα PDT + PTT. Ως εκ τούτου, επιβεβαιώνεται πως οι HBCDs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανό διλειτουργικό εργαλείο για συνεργική PDT/PTT σε υποξικό όγκο. Η σημαντική καινοτομία της εργασίας αυτής ήταν η σύνθεση τελειών άνθρακα με πράσινες και χαμηλού κόστους πηγές, που διέθεταν εγγενή χαρακτηριστικά φωτοδυναμικής και φωτοθερμικής δράσης (Εικόνα 2.26).

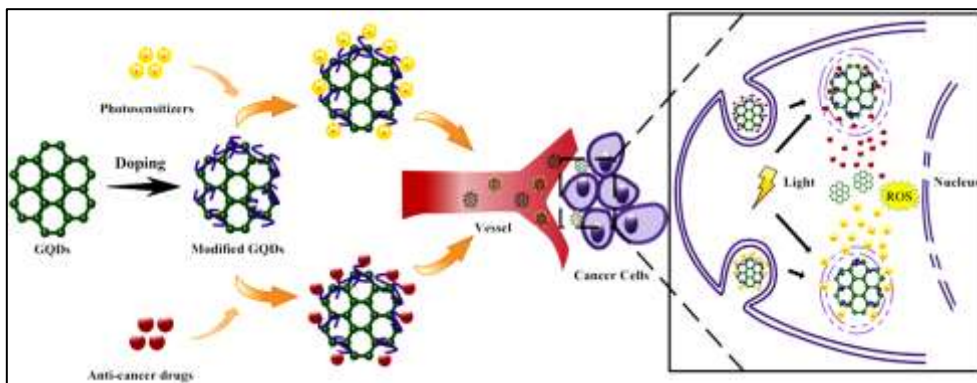


Εικόνα 2.26: Εικόνες φθορισμού της δοκιμασίας Calcein AM/PI σε κύτταρα HeLa <sup>[17]</sup>.

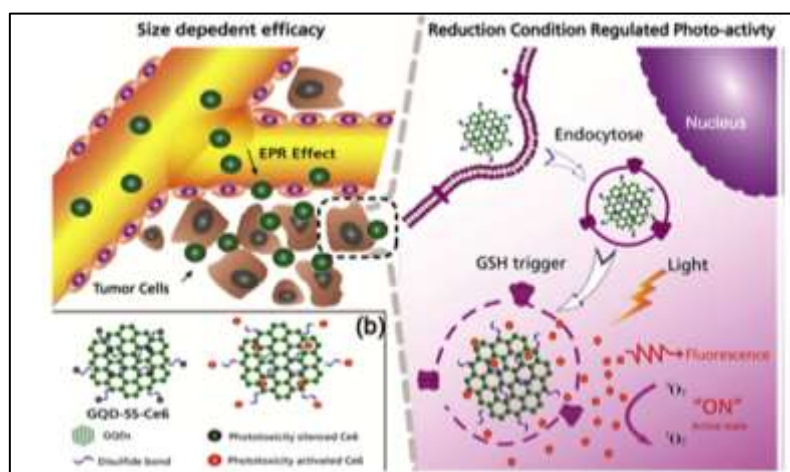
Οι κβαντικές τελείες μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν με άλλα βιοσυμβατά μόρια για την εκτέλεση βελτιωμένης PDT (Εικόνα 2.27). Η πρόσμιξη GQDs με ετεροάτομα είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Μεγάλη σημασία δίδεται στο άζωτο και στη σύνθεση GQDs με πρόσμιξη αζώτου. Οι τρόποι σύνθεσής τους ποικίλουν. Μια ομάδα ερευνητών ανέπτυξε N-GQDs τροποποιημένες με αμινομόρια (amino-N-GQDs). Οι N-GQDs παρουσίασαν βελτιωμένες φωτοχημικές και ηλεκτροχημικές ιδιότητες. Ανθρώπινα τραχηλικά καρκινώματα (KB-50) συν-καλλιεργήθηκαν με N-GQDs. Οι κβαντικές τελείες παρουσίασαν ικανοποιητική βιοσυμβατότητα και υψηλή φωτοδυναμική κυτταροτοξικότητα (two photon excitation).

Εκτός από τη χρήση τους ως φωτοευαίσθητοποιητές, οι ντοπαρισμένες με άζωτο κβαντικές τελείες άνθρακα λειτουργούν αποτελεσματικά και ως «νανοφορείς», μεταφέροντας και ενεργοποιώντας άλλους συμβατικούς φωτοευαίσθητοποιητές. Ερευνητές συνέθεσαν έναν νανοφορέα ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal) βασισμένο σε κβαντικές τελείες. Έπειτα από τη θεραπεία καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου μαστού (MCF-7) με N-GQD-RB με ακτινοβολία λέιζερ στα 480 nm για 10 λεπτά, βρέθηκε ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων

εξαρτιόνταν από τη δόση. Πιο συγκεκριμένα, η βιωσιμότητα μειώθηκε φτάνοντας στο 35%, καθώς οι δόσεις N-GQD-RB αυξάνονταν από 0 έως 60 mL. Οι περισσότεροι από τους συμβατικούς οργανικούς φωτοευαισθητοποιητές, όπως το Chlorin e6 (Ce6) και η Hypelllellin A (HA) παρουσιάζουν κακή υδατοδιαλυτότητα. Οι GQDs είναι ένας κατάλληλος ναυοφορέας για τη βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας και της υδατοδιαλυτότητας αυτών. Μια άλλη ομάδα ερευνητών συνέθεσε ένα ναυοσύνθετο φωτοευαισθητοποιητή Ce6-GQDs, μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Όταν το ναυοσύνθετο GQD-SS-Ce6 φθάσει στον καρκινικό ιστό, η γλουταθειώνη των καρκινικών κυττάρων προκαλεί τη διάσπαση του SS δεσμού και η φωτοτοξικότητα του Chlorin 6 αποκαθίσταται (Εικόνα 2.28). Η γλουταθειώνη (GSH) είναι το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα κύτταρα, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορφών του οξυγόνου, ενώ ταυτόχρονα συντηρεί και εισαγόμενα αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους. Μετά την ανάπτυξη ενός καρκινικού όγκου, αυξημένα επίπεδα γλουταθειώνης μπορεί να δρουν προστατευτικά για τα καρκινικά κύτταρα, προσφέροντάς τους αντίσταση κατά των φαρμάκων.



Εικόνα 2.27: Σχηματική απεικόνιση ναυοζλικών με βάση τα Graphene Quantum Dots για ενισχυμένη PDT και συνδυασμένη θεραπεία [18].



Εικόνα 2.28: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του συμπλόκου GQD-SS-Ce6 όταν έρχεται σε επαφή με τη γλουταθειώνη (GSH) [18].

#### **2.2.4.3. Νανοσύνθετα με βάση τις κβαντικές τελείες γραφενίου (GQDs) για συνδυαστική θεραπεία**

Η μονοθεραπεία, όπως η χημειοθεραπεία, συχνά δεν είναι τόσο αποτελεσματική όσο αναμένεται. Σε αυτές τις περιπτώσεις υιοθετείται μια συνδυαστική θεραπεία. Οι κβαντικές τελείες δύνανται να λειτουργήσουν ως νανοφορείς χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε ένα συνδυασμό φωτοδυναμικής θεραπείας και χημειοθεραπείας. Οι GQDs χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την απελευθέρωση της δοξορουβικίνης (DOX) ενισχύοντας σημαντικά την κυτταροτοξικότητά της.

Η φωτοθερμική θεραπεία (PTT) χρησιμοποιεί ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε υπέρυθρα μήκη κύματος. Αποτελεί μια επέκταση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Στη φωτοθερμική θεραπεία ο ευαίσθητοποιητής ακτινοβολείται και επέρχεται σε μια κατάσταση διέγερσης όπου απελευθερώνει θερμότητα, η οποία σκοτώνει τα κύτταρα. Σε αντίθεση με τη φωτοδυναμική θεραπεία, η φωτοθερμική δεν απαιτεί οξυγόνο για να αλληλοεπιδράσει με τα κύτταρα-στόχους ή τους ιστούς. Τρέχουσες μελέτες δείχνουν επίσης ότι στη φωτοθερμική θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί φως μεγαλύτερου μήκους κύματος, το οποίο είναι λιγότερο επιβλαβές για άλλα κύτταρα και ιστούς.

Οι GQDs παρουσιάζουν εξαιρετική φωτοθερμική αποδοτικότητα, λόγω της καλής απορρόφησης φωτός στην υπέρυθρη περιοχή. Είναι θερμικά αγωγιμες, με χαμηλή τοξικότητα και δύνανται να χρησιμοποιηθούν στη φωτοθερμική θεραπεία. Σχεδιάστηκε μια πολυλειτουργική νανοπλατφόρμα με διαγνωστικές και θεραπευτικές λειτουργίες, αποτελούμενη από κβαντικές τελείες άνθρακα και πορφυρίνη. Στα 980 nm η νανοπλατφόρμα επέδειξε καλή φωτοθερμική αποδοτικότητα και αντίστοιχα στα 635 nm προκλήθηκε παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η συνδυαστική θεραπεία δοκιμάστηκε σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (A549), όπου προκάλεσε σημαντική βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες. Στη συνδυαστική θεραπεία, η αποτελεσματικότητα έφτασε το 86.0%, με τα ποσοστά θανάτου των μονοθεραπειών στα 635 nm και 980 nm να είναι 38.7% και 69.5%, αντίστοιχα.

Η αιχμή της σύγχρονης νανοϊατρικής οραματίζεται μία προσέγγιση πολλαπλών στόχων ικανή να σκοτώνει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα μέσω μίας μη επεμβατικής, καθοδηγούμενης μέσω απεικονίσεων, φωτοθερμικής θεραπείας (imaging-guided photothermal therapy) και την παρακολούθηση της εξέλιξης αυτής. Τα τυπικά υλικά που προτείνονται για την εφαρμογή αυτή είναι οι οργανικές βαφές και τα νανοσωματίδια των ευγενών μετάλλων και των οξειδίων τους, τα οποία έχουν ισχυρό φθορισμό και υψηλή φωτοθερμική ικανότητα. Ενώ η απεικόνιση φθορισμού παρέχει έναν χάρτη για την παρακολούθηση του καρκινικού όγκου, η υπερθερμία είναι ο πιο ισχυρός και εντοπιστικός θεραπευτικός τρόπος για την εξάλειψη μιας μάζας όγκου με ξαφνική αύξηση της θερμοκρασίας (40-45°C), η οποία οδηγεί είτε σε θάνατο

των καρκινικών κυττάρων είτε στην υπερευαισθητοποίηση τους προς τα ξενοβιοτικά, καταστρατηγώντας έτσι το φαινόμενο της πολλαπλής αντοχής σε φάρμακα (multiple drug resistance ή MDR). Η πολλαπλή αντοχή στα φάρμακα ή πολυανθεκτική αντοχή είναι η μικροβιακή αντοχή που εμφανίζεται από ένα είδος μικροοργανισμού σε τουλάχιστον ένα αντιμικροβιακό φάρμακο σε τρεις ή περισσότερες αντιμικροβιακές κατηγορίες. Οι αντιμικροβιακές κατηγορίες είναι ταξινομήσεις αντιμικροβιακών παραγόντων με βάση τον τρόπο δράσης τους και ειδικές για τους οργανισμούς-στόχους. Οι τύποι MDR που απειλούν περισσότερο τη δημόσια υγεία είναι τα βακτήρια MDR, που αντιστέκονται σε πολλαπλά αντιβιοτικά.

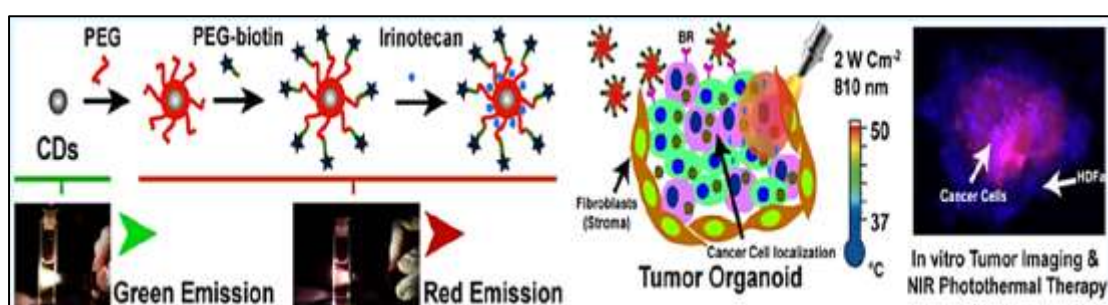
Πολύ πρόσφατα οι νανοτελείες άνθρακα με εκπομπές φθορισμού στο εγγύς υπέρυθρο φάσμα έδειξαν τη δυνατότητα να αξιοποιηθούν ως υπέρυθρα εργαλεία μετατροπής ακτινοβολίας σε θερμότητα ,χρήσιμα στη θεραπεία του καρκίνου. Οι τελείες άνθρακα φαίνονται πολύ ελκυστικά για κλινικές εφαρμογές που συνδυάζουν υπερθερμία, βιοαπεικόνιση και χορήγηση φαρμάκων σε μια ενιαία πλατφόρμα, ικανή να στοχεύει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, στη σύνθεση των τελειών άνθρακα αντιμετωπίζονται προβλήματα διακυμάνσεων dot-to-dot ως προς τα δομικά, οπτικά και χημικά χαρακτηριστικά τους. Στην παρούσα εργασία αναφέρεται για πρώτη φορά μια απλή και ελεγχόμενη σύνθεση στρώμα προς στρώμα τελειών άνθρακα διακοσμημένων με βιοτίνη με μονοδιασπαρμένη κατανομή μεγέθους και καθιερωμένο πάχος πολυμερικού κελύφους και βαθμού λειτουργικότητας της επιφάνειας. Οι νανοτελείες διαθέτουν ισχυρή κόκκινη φωταύγεια και έχουν την ικανότητα μετατροπής του NIR φωτός σε θερμότητα.

Οι τελείες άνθρακα που συντέθηκαν ,στο εξής ονομάζονται CD-PEG-BT, αποτελούνται από ανθρακικό πυρήνα, PEG2000 πολυμερικές αλυσίδες και βιοτίνη. Τα CD-PEG-BT σχεδιάστηκαν για να ενσωματώνουν αποτελεσματικά υψηλή ποσότητα αντικαρκινικών φαρμάκων όπως το irinotecan (16-28%) και να λειτουργούν ταυτόχρονα ως «νανοθερμάστρες» ικανές να προκαλέσουν τοπική υπερθερμία και μαζική απελευθέρωση φαρμάκων μέσα σε όγκους, προκαλώντας έτσι ξαφνικό και αποτελεσματικό θάνατο. Η δυνατότητα των CD-PEG-BT με irinotecan (CD-PEG-BT (CD-PEG-BT@IT) στην απεικόνιση φθορισμού μελετήθηκε σε 2D καλλιέργειες και σε σύνθετα 3D σφαιροειδή που μιμούνται in vivo αρχιτεκτονικές όγκων και έδειξαν την ικανότητά τους να εισέρχονται επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα μέσω υποδοχών βιοτίνης που είναι υπερ-εκφρασμένοι στις κυτταρικές μεμβράνες.

Η παθητικοποίηση PEG αποδίδει CDs με απομονωμένη κόκκινη εκπομπή φθορισμού, επιθυμητή στην βιοαπεικόνιση, η βιοτίνη (BT) μετέχει στη στόχευση. Η χρήση του CD-PEG-BT ως νανοφορέα της ιρινοτεκάνης χρησιμεύει ως τοπική δόση για τα καρκινικά κύτταρα που τελικά δραπετεύσαν από τους κύριους όγκους κατά τη διάρκεια της φυσικής τους διάσπασης ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία μεταστατικών βλαστοκυττάρων (Εικόνα 2.29).

Οι τελείες άνθρακα συντέθηκαν με μέθοδο solvothermal από κιτρικό οξύ και ουρία. Στη συνέχεια, με τη χρήση χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC) (size exclusion chromatography) έγινε εφικτή η απομόνωση του κλάσματος εκείνου με εκπομπή φθορισμού στο εγγύς υπέρυθρο. Προέκυψαν τελικά οκτώ κλάσματα (CD1→CD8) με διακριτά οπτικά χαρακτηριστικά, με ζώνες εκπομπών που κυμαίνονται από μπλε έως κόκκινο.

Αν και αναφέρονται στη βιβλιογραφία CDs με υψηλότερη κβαντική απόδοση QY (~18%), η κβαντική απόδοση στο φάσμα του υπέρυθρου (περίπου 4%) είναι αρκετά υψηλή για να λειτουργήσει καλά στις εφαρμογές βιο-απεικόνισης. Πρέπει να τονιστεί ότι ο φθορισμός και η φωτοθερμική λειτουργικότητα είναι και οι δύο επιθυμητές ιδιότητες αλλά αποτελούν ανταγωνιστικά φαινόμενα: όσο υψηλότερη είναι η φωτοφωταύγεια, τόσο χαμηλότερη είναι η φωτοθερμική μετατροπή. Ως εκ τούτου, αν και η κβαντική απόδοση είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με άλλες συνθετικές μεθόδους που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, παρέχει ικανοποιητική φωτοθερμική μετατροπή. Οι πολυμερικές αλυσίδες PEG2000 αυξάνουν την υδροδυναμική διάμετρο των CDs είναι παρεμποδίζοντας έτσι τη γρήγορη νεφρική τους απέκκριση. Η αργή νεφρική απέκκριση των συστημάτων χορήγησης αποτελεί ένα ενθαρρυντικό χαρακτηριστικό με σκοπό να επιτευχθεί υψηλή συγκέντρωση αντικαρκινικών φαρμάκων για την πρόληψη της MDR.

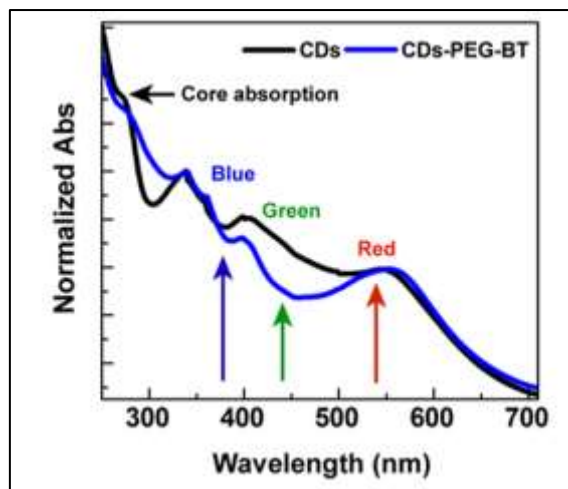


**Εικόνα 2.29:** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της φωτοδυναμικής θεραπείας με την ακτινοβόληση PEG-biotin Carbon Dots που φέρουν το φάρμακο ιρινοτεκάνη <sup>[19]</sup>.

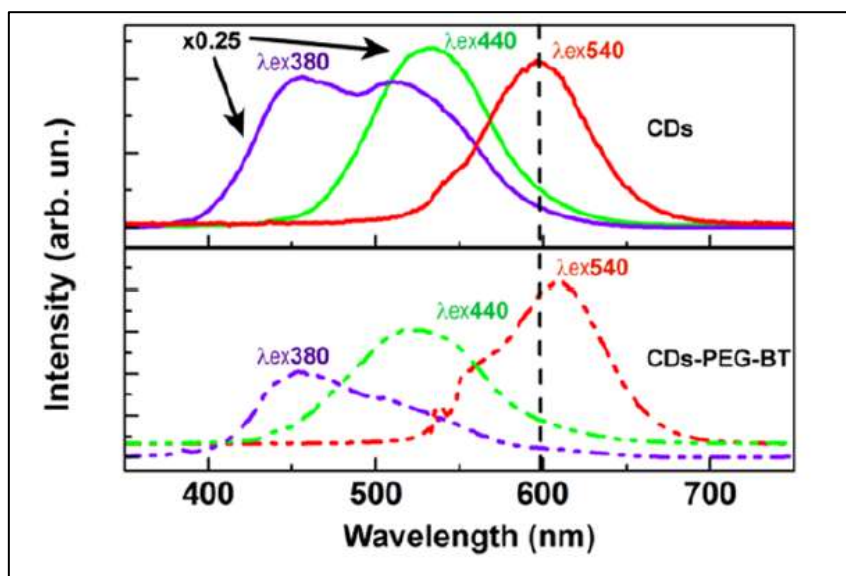
### 2.2.5. Οπτικός χαρακτηρισμός

Το δείγμα τελειών άνθρακα εμφανίζει πολύπλοκο οπτικό φάσμα απορρόφησης με διάφορες διακριτές κορυφές σε ολόκληρη την περιοχή UV-ορατού. Πριν την τροποποίηση με PEG, αυτό το δείγμα παρουσιάζει πολλαπλάσιες εκπομπές που εκτείνονται από μπλε σε κόκκινο, παρόμοιο με πολλές τελείες άνθρακα στη βιβλιογραφία. Ειδικότερα, διέγερση εντός της απορρόφησης στα 340, 400 και 550 nm αποδίδει τρεις διακριτές ζώνες εκπομπής, που κορυφώνονται σε μπλε, πράσινο και κόκκινο, αντίστοιχα. Στην πραγματικότητα, μόλις η επιφάνεια των τελειών τροποποιηθεί με τις πολυμερικές αλυσίδες παρατηρείται απόσβεση των

εκπομπών στο μπλε και στο πράσινο, και μόνο ο κόκκινος φθορισμός παραμένει αμετάβλητος (Εικόνα 2.30 και Εικόνα 2.31).



Εικόνα 2.30: Κανονικοποιημένα φάσματα απορρόφησης υδατικών διαλυμάτων CD και CD-PEG-BT: τα βέλη υποδεικνύουν διαφορετικές μεταβάσεις που σχετίζονται με διαφορετικά χρωμοφόρα και υποδεικνύουν τα μήκη κύματος διέγερσης που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των φασμάτων εκπομπών στον παρακάτω πίνακα <sup>[19]</sup>.

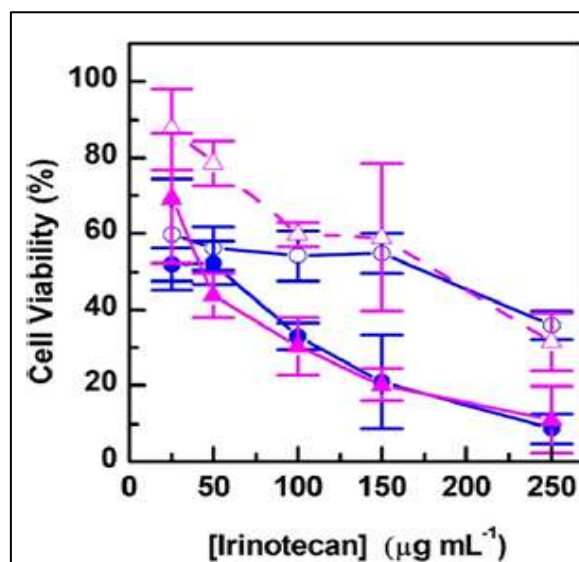


Εικόνα 2.31: Φάσματα εκπομπών που διεγείρονται σε 380, 440 και 540 nm CD και CD-PEG-BT <sup>[19]</sup>.

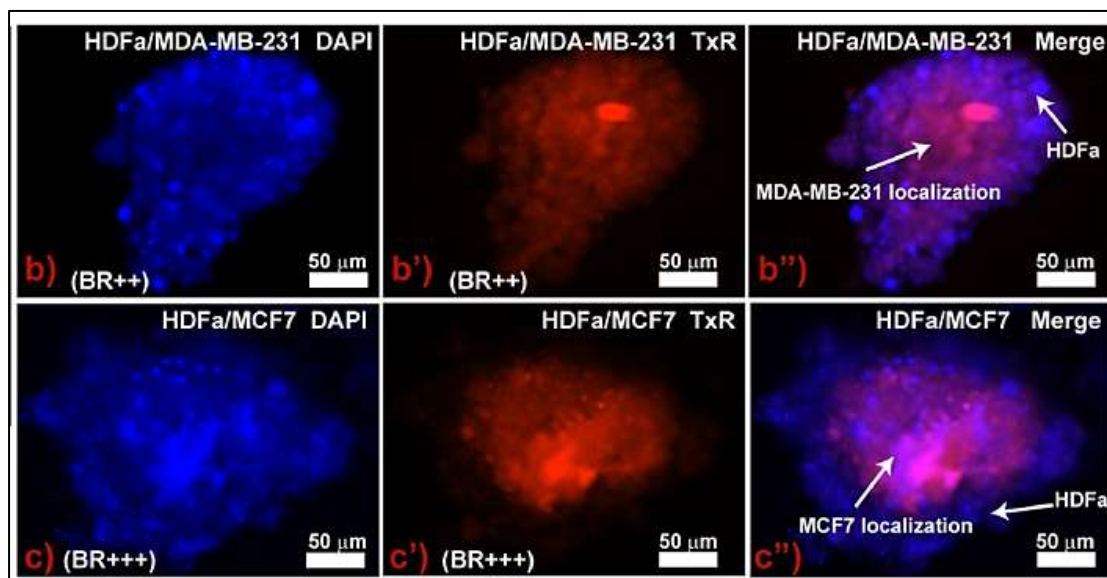
Η *in vitro* κυτταροτοξική δράση των CD-PEG-BT μαζί με την ιρινοτεκάνη πραγματοποιήθηκε σε δύο τύπους ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου του μαστού που υπερεκφράζουν διαφορετικές ποσότητες υποδοχέων (κύτταρα MCF7 και MDA-MB-231).

Η κυτταρική βιωσιμότητα και στις δυο καλλιέργειες μειώθηκε μετά από 48 ώρες θεραπείας και στο δείγμα που περιείχε μόνο ιρινοτεκάνη και στα δείγματα τελειών άνθρακα. Συνολικά, η ευαισθησία των κυττάρων MCF7 στο φάρμακο ήταν μεγαλύτερη. Η κυτταρική βιωσιμότητα

των βιοτινυλιωμένων τελειών άνθρακα ήταν δραστικά χαμηλότερη, σε σύγκριση με νανοσύνθετα CDs-PEG-CC χωρίς βιοτίνη και για τις δύο κυτταρικές σειρές, γεγονός που υποδηλώνει το κρίσιμο ρόλο της βιοτίνης στην επίτευξη υψηλότερης αντικαρκινικής απόδοσης (Εικόνα 2.32 και Εικόνα 2.33).



Εικόνα 2.32: Αντικαρκινική δράση σε 2D καλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού: Δοκιμασία MTS σε κύτταρα MCF7 (διακεκομμένη γραμμή) και MDA-MB-231 (συμπαγής γραμμή) για την ιρινοτεκάνη (μωβ), CD-PEG-CC@IT (κόκκινο) και CD-PEG-BT@IT (μπλε) μετά από 48 ώρες επώασης [19].

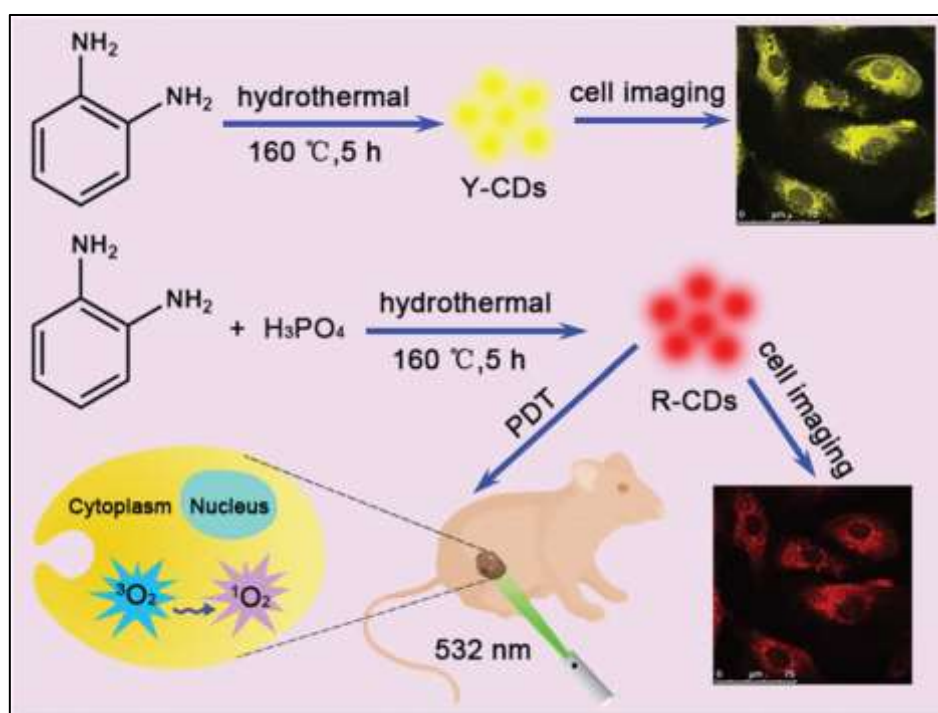


Εικόνα 2.33: Πρόσληψη CD-PEG-BT μετά από 6 ώρες επώαση σε (b-b'') MDA-MB-231 και (c-c'') MCF7 [19].

Το 2019, οι Zhao et al. [20] συνέθεσαν κβαντικές τελείες άνθρακα με πρόσμιξη ετεροατόμων αζώτου και φωσφόρου, χρησιμοποιώντας ως πρώτες ύλες την ο-φαινυλενοδιαμίνη και το

φωσφορικό οξύ, μέσω μιας εύχρηστης και απλής υδροθερμικής μεθόδου. Οι κβαντικές τελείες με ετεροάτομα αζώτου παρουσίασαν φάσμα εκπομπής στο κίτρινο, ενώ σε εκείνες που προστέθηκε το φωσφορικό οξύ το φάσμα εκπομπής τους μετακινήθηκε προς το κόκκινο.

Παρόλο που έχουν μελετηθεί πολλοί τρόποι σύνθεσης κβαντικών τελειών άνθρακα, οι περισσότεροι από αυτούς οδηγούν σε κβαντικές τελείες με φάσμα εκπομπής στο μπλε ή στο πράσινο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην καταφέρνουν να διεισδύσουν αποτελεσματικά στον ανθρώπινο ιστό, πράγμα που περιορίζει τις εφαρμογές τους στον βιολογικό και ιατρικό τομέα. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί αυτό το ζήτημα, είναι απαραίτητη η παραγωγή τελειών άνθρακα με φάσμα εκπομπής στο κόκκινο. Οι ιδιότητες φωταύγειας μπορούν να ρυθμιστούν με επιφανειακή τροποποίηση ή με πρόσμιξη με ετεροάτομα.



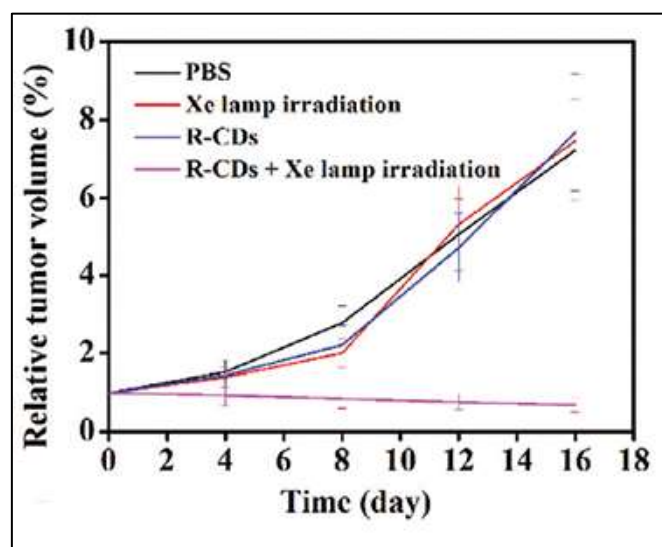
Εικόνα 2.34: Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων σύνθεσης των Carbon Dots [20].

Οι κίτρινες τελείες χρησιμοποιήθηκαν για βιοαπεικόνιση, ενώ οι κόκκινες χρησιμοποιήθηκαν ακόμη και ως φωτοευασθητοποιητές σε φωτοδυναμική θεραπεία (Εικόνα 2.34). Τα *in vivo* πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ποντικούς, οι οποίοι έφεραν ξеноμοσχεύματα A549 καρκινικών όγκων που τους χορηγήθηκαν μέσω ενέσεων σε κομμάτια των 2-4 mm<sup>3</sup> φτάνοντας τελικά στα 40 mm<sup>3</sup>. Στη συνέχεια, οι ποντικοί χωρίστηκαν σε 4 ομάδες και δεν έλαβαν όλες οι ομάδες τη θεραπεία. Οι κβαντικές τελείες χορηγήθηκαν μέσω ενδοογκικής ένεσης των 2 mg/kg. Μετά από 2 ώρες, οι περιοχές του όγκου των ποντικών ακτινοβολήθηκαν με λέιζερ στα 532 nm.

Στους ποντικούς που έλαβαν τη φωτοδυναμική θεραπεία, οι όγκοι αναχαιτίστηκαν σημαντικά, ενώ ταυτόχρονα δεν βρέθηκε καμία αισθητή βλάβη οργάνου ή αλλοιώσεις



φλεγμονής, λόγω της χρήσης των τελειών άνθρακα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 2.35). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει πως οι κβαντικές τελείες είναι βιολογικά ασφαλείς.



Εικόνα 2.35: Όγκος των καρκινικών ξеноμοσχευμάτων των ποντικών ανά ημέρα <sup>[20]</sup>.

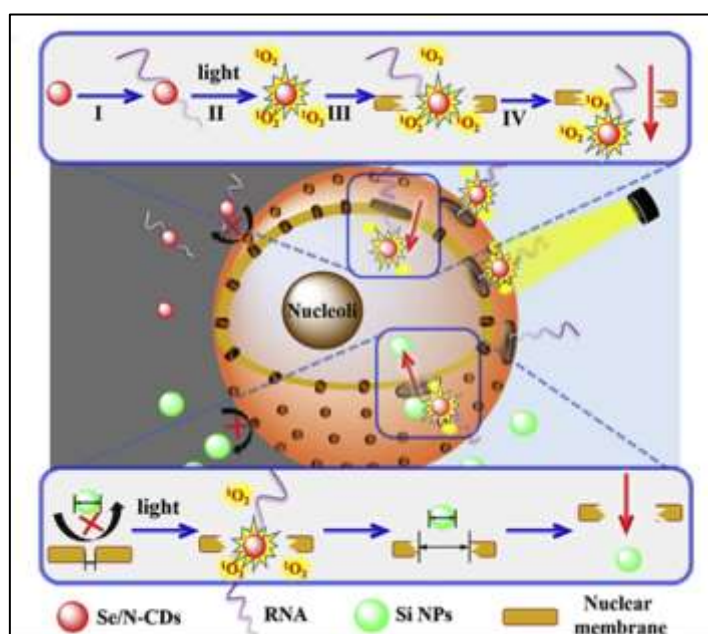
Επειδή η απόδοση των ελευθέρων ριζών, στις οποίες βασίζεται η PDT, εξαρτάται συνήθως από την αποτελεσματικότητα του φωτοευαισθητοποιητή, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στην παραγωγή φωτοευαισθητοποιητών υψηλής απόδοσης. Ωστόσο, στα καρκινικά κύτταρα, η διάρκεια ζωής των ελευθέρων ριζών που παράγονται από έναν φωτοευαισθητοποιητή περιορίζεται δραματικά, στο επίπεδο των νανοδευτερολέπτων, και επομένως, η απόσταση που αυτές καλύπτουν είναι μόνο μερικές δεκάδες νανόμετρα. Ως αποτέλεσμα, τα περισσότερα από τα ROS (δραστικές μορφές οξυγόνου) απενεργοποιούνται πριν καταφέρουν να εξουδετερώσουν επαρκή αριθμό καρκινικών κυττάρων. Έτσι, εξάγεται το συμπέρασμα, ότι η αυξημένη απόδοση δεν συνεισφέρει ιδιαίτερα στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Με στόχο να μεγιστοποιηθεί η χρησιμότητα των ελευθέρων ριζών που παράγονται, θα πρέπει αυτές να βρίσκονται στην κατάλληλη τοποθεσία. Θα πρέπει λοιπόν, ο φωτοευαισθητοποιητής να φτάσει όσο πιο κοντά στον πυρήνα ενός καρκινικού κυττάρου γίνεται, καθώς ο πυρήνας περιέχει το DNA που απαιτείται για την κυτταρική διαίρεση. Επομένως, αναπτύσσονται στρατηγικές ρύθμισης της θέσης του φωτοευαισθητοποιητή (precision medicine) για θεραπείες όγκων σε υποκυτταρικό επίπεδο.

Οι Xu et al. (2020) <sup>[21]</sup>, λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, συνέθεσαν κβαντικές τελείες άνθρακα με πρόσμιξη αζώτου και σεληνίου (Se/N-CDs) και, στη συνέχεια, διερεύνησαν τον τρόπο με τον οποίο αυτές θα μπορούσαν να συνδεθούν με RNA. Το RNA λειτουργεί ως μεταφορέας του φωτοευαισθητοποιητή κοντά στον πυρήνα, οδηγώντας σε σχάση της πυρηνικής μεμβράνης υπό ακτινοβολία. Παρά την μικρή απόδοση σε ελεύθερες ρίζες, μόλις

10.6%, οι Se/N-CDs επέδειξαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία από άλλους εμπορικούς φωτοευαισθητοποιητές υψηλότερης απόδοσης, όπως το μπλε του μεθυλενίου και οι πορφυρίνες. Τα Se/N-CD συντέθηκαν με διαλυτοθερμική μέθοδο ενός σταδίου χρησιμοποιώντας BTPS ως πηγή άνθρακα σε διάλυμα αιθανόλης.

Η απόδοση τους ήταν 75% και η μέση διάμετρος τους, όπως υπολογίστηκε μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης (TEM), ήταν της τάξης των  $3.6 \pm 0.6$  nm. Η κυτταρική απεικόνιση καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7 cells) έδειξε, μέσω ανάλυσης φθορισμού, ότι τα Se/N-CDs βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, που διακρίνεται από τον πυρήνα, ο οποίος ήταν χρώσης Hoechst 33342, μιας ειδικής πυρηνικής βαφής. Μετά την ακτινοβολία, συγκρίνοντας τον συγχωνευμένο φθορισμό της Hoechst 33342 με τις κβαντικές τελείες, επιβεβαιώθηκε ότι εκείνες είχαν εισέλθει στον πυρήνα, ενώ ταυτόχρονα, ο φθορισμός στο κυτταρόπλασμα είχε μειωθεί.

Πειράματα χώνευσης των MCF-7 κυττάρων με RNase A και το DNase I επικύρωσαν τη συγγένεια μεταξύ των τελειών άνθρακα και του RNA. Όταν τα κύτταρα MCF-7 αφομοιώθηκαν από την RNase A, ο κόκκινος φθορισμός στους πυρήνες σχεδόν εξαφανίστηκε, ενώ δεν συνέβη το ίδιο με την DNase I. Πραγματοποιήθηκαν ακόμη πειράματα in vivo σε θηλυκούς ποντικούς, που έφεραν καρκινικούς όγκους 4T1 κυττάρων μέσου όγκου  $200 \text{ mm}^3$ . Σε δύο από τις ομάδες (ομάδες ελέγχου) χορηγήθηκαν μόνο 100 mL PBS (phosphate-buffered saline), ενώ σε εκείνες που έλαβαν τη θεραπεία κανονικά οι καρκινικοί όγκοι συρρικνώθηκαν αισθητά.



Εικόνα 2.36: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού στόχευσης του πυρήνισκου από τα CDots (nucleus-targeting PDT) [21].

Από τους ερευνητές προτάθηκε ο εξής μηχανισμός στόχευσης του πυρήνα από τις τελείες άνθρακα (nucleus-targeting PDT) (Εικόνα 2.36):

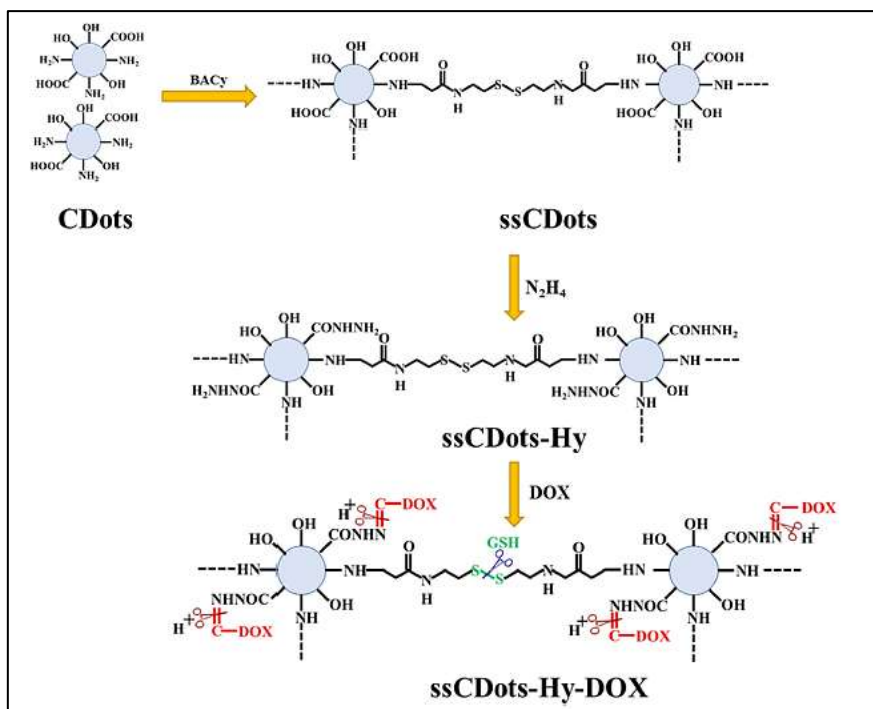
- Ενδοογκική ένεση των φωτοευαισθητοποιητών και δέσμευση από τα Se/N-CDs του RNA μετά από τη διείσδυση στα καρκινικά κύτταρα.
- Εντοπισμός και ενεργοποίηση των Se/N-CD/RNA συμπλεγμάτων με ακτινοβολία φωτός.
- Καταστροφή της πυρηνικής μεμβράνης, η οποία επιτρέπει την είσοδο περισσότερων Se/N-CDs.
- Θανάτωση των καρκινικών κυττάρων.

Τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων στη νανοκλίμακα (nanoscaled drug delivery systems) έχουν διερευνηθεί εντατικά με σκοπό την κατά παραγγελία χορήγηση φαρμάκων στους καρκινικούς ιστούς ή στα κύτταρα. Για να κατανοηθούν εύκολα οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των DDS (Drug Delivery Systems) και να αξιολογηθεί το θεραπευτικό τους αποτέλεσμα, ενσωματώνεται στο σύστημα διαγνωστική λειτουργία απεικόνισης με τη μορφή των nanotheranostics (νανοσωματιδίων με διαγνωστικό και θεραπευτικό ρόλο). Ωστόσο, ένα μεγάλο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι τελείες άνθρακα είναι ότι αποβάλλονται ταχέως από το δικτυο-ενδοθηλιακό σύστημα (reticuloendothelial system) στο σώμα, λόγω του πολύ μικρού μεγέθους τους. Επιπλέον, τα περισσότερα νανοσωματίδια με διαγνωστικό και θεραπευτικό ρόλο που βασίζονται στις τελείες άνθρακα δεν διαθέτουν εκλεκτικότητα ως προς το ενδοκυτταρικό μικροπεριβάλλον του όγκου. Έτσι, η απεικόνιση φθορισμού τους θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μόνο για να καθορίσει τη βιοκατανομή των νανοθεραπευτικών παραγόντων στους φυσιολογικούς, αλλά και στους καρκινικούς ιστούς. Για να επιτευχθεί, σε πραγματικό χρόνο, η παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης, εισάγονται στους νανοθεραπευτικούς παράγοντες ομάδες στόχευσης όγκων.

Μέχρι τώρα, εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση η ανάπτυξη «έξυπνων» nanotheranostics με βάση τις τελείες άνθρακα, που θα επιδεικνύουν διαφορετικές ιδιότητες φθορισμού στους φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς. Οι διαφορετικές ιδιότητες φθορισμού θα μπορούσαν να επιτευχθούν με τη μορφή βιοαισθητήρα, που επιδεικνύει «off-on» φθορισμό κατά την εσωτερίκευση από τα καρκινικά κύτταρα ή φθορισμό με διαφορετικά μήκη κύματος εκπομπής μετά την εσωτερίκευση, ως αντίδραση στα ενδοκυτταρικά σήματα που δέχεται, όπως διαφορές στο pH και αντιδράσεις αναγωγής. Λόγω των οπτικών ιδιοτήτων των τελειών άνθρακα, μέσω πρόσμιξης ή τροποποίησής τους, πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη σύνθεση τελειών άνθρακα ευαίσθητων σε αλλαγές του pH. Ωστόσο, οι περισσότερες έδειξαν έντονο φθορισμό σε υψηλό pH, αλλά πολύ αδύναμο ή και καθόλου φθορισμό σε χαμηλό pH, όπως στο όξινο ενδοκυτταρικό περιβάλλον του όγκου, περιορίζοντας την πρακτική εφαρμογή τους στην απεικόνιση όγκων.

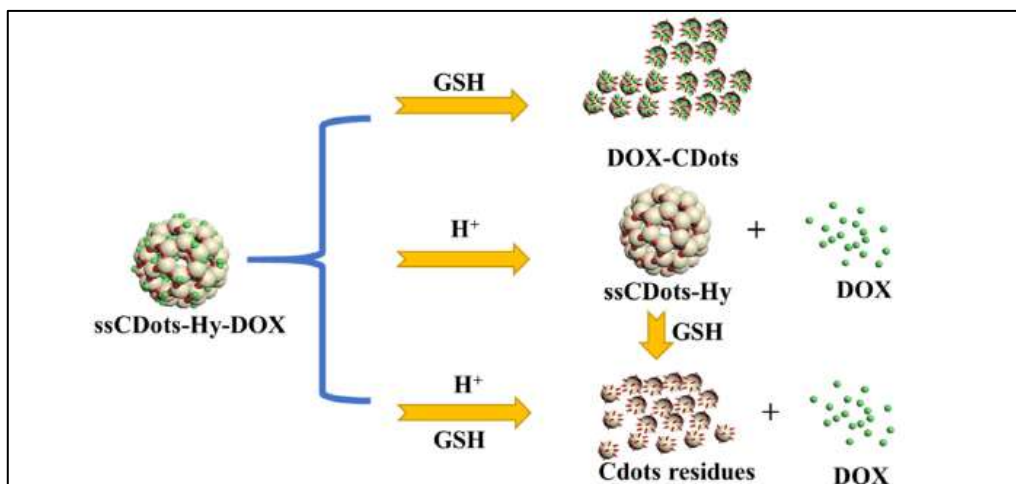
Οι Pei et al. (2020) <sup>[22]</sup> συνέθεσαν nanoclusters με βάση τις τελείες άνθρακα συζευγμένα με δοξορουβικίνη (DOX). Τα nanoclusters μπορούν, μέσω αναγωγής, να διασπαστούν (διάσπαση δισουλφιδικού δεσμού) και να απελευθερώσουν την δοξορουβικίνη στα καρκινικά κύτταρα. Η δοξορουβικίνη (DOX) συνδέεται πάνω στα νανοσωματίδια μέσω δεσμού υδραζόνης. Οι υδραζόνες αποτελούν τη βάση στις στρατηγικές βιοσύζευξης. Οι μέθοδοι σύζευξης με βάση την υδραζόνη χρησιμοποιούνται στην ιατρική βιοτεχνολογία για τη σύζευξη φαρμάκων με στοχευμένα αντισώματα, π.χ. αντισώματα έναντι ενός συγκεκριμένου τύπου καρκινικών κυττάρων. Ο δεσμός με βάση την υδραζόνη είναι σταθερός σε ουδέτερο pH (στο αίμα), αλλά καταστρέφεται γρήγορα στο όξινο περιβάλλον των λιποσωμάτων του κυττάρου. Το φάρμακο απελευθερώνεται έτσι στο κύτταρο, όπου ασκεί τη λειτουργία του. Οι προτεινόμενοι νανοθεραπευτικοί παράγοντες ssCDots-Hy-DOX (Εικόνα 2.37) επέδειξαν σταθερότητα, πολύ μικρή διαρροή φαρμάκου στο φυσιολογικό μέσο και πολύ αδύναμο φθορισμό.

Οι φθορίζουσες, εμπλουτισμένες με άζωτο, τελείες άνθρακα συντέθηκαν μέσω μικροκυμάτων. Κιτρικό νάτριο χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα και αιθυλενοδιαμίνη χρησιμοποιήθηκε ως τροποποιητής για την παροχή των ομάδων αζώτου και την επιφανειακή παθητικοποίηση. Στη συνέχεια, οι επιφανειακά ενεργές ομάδες αμίνης διασταυρώθηκαν με BACy μέσω αντίδρασης Michael (αντίδραση προσθήκης) για την παραγωγή των (ssCDots) με επιθυμητό μέγεθος σωματιδίων. Τέλος, τα προτεινόμενα ssCDots-Hy-DOX nanoclusters προέκυψαν με τη σύζευξη του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου DOX, μέσω δεσμού υδραζόνης, έπειτα από αναγωγή των ssCDots με υδραζίνη (ssCDots-hy).



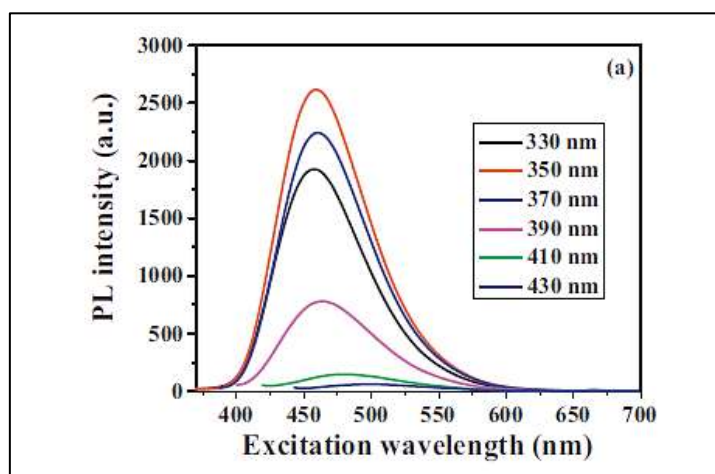
Εικόνα 2.37: Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης των προτεινόμενων ssCDots-Hy-DOX <sup>[22]</sup>.

Στο ενδοκυτταρικό μικροπεριβάλλον του όγκου, τα ssCDots-Hy-DOX nanoclusters (όπου ss ο δισουλφιδικός δεσμός) αποσυντίθενται στα χωρισμένα μόρια τελειών άνθρακα. Δηλαδή, το νανოსύνθετο έχει πολύ αδύναμο φθορισμό, λόγω της απόσβεσης που προκαλείται από την ομοιοπολική σύζευξη και τη σύζευξη με τη δοξορουβικίνη (DOX). Μετά την απελευθέρωση, όμως, του φαρμάκου ο ισχυρός φθορισμός των τελειών άνθρακα επανέρχεται (Εικόνα 2.38).



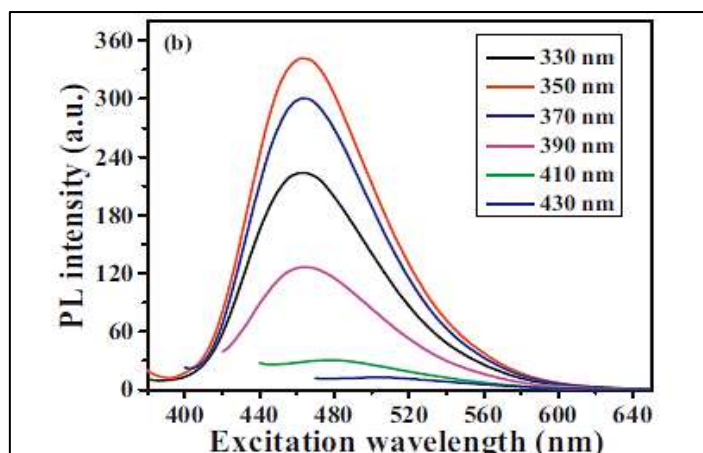
**Εικόνα 2.38:** Αποσύνθεση διπλής απόκρισης (pH και αναγωγή) των ssCDots-Hy-DOX και απελευθέρωση DOX<sup>[22]</sup>.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η εκλεκτικότητα στον φθορισμό των ssCDots-Hy-DOX εξετάστηκαν τα φάσματα εκπομπής τους παρουσία της γλουταθειόνης (GSH) και παρουσία της δοξορουβικίνης (DOX) (Εικόνες 2.39-2.41). Λόγω του όξινου pH στο περιβάλλον του όγκου (H<sup>+</sup>) και της αντίδρασης αναγωγής (σχάση ss δεσμού) που λαμβάνει χώρα, η DOX απελευθερώνεται, ενώ επανέρχεται ο έντονος φθορισμός των τροποποιημένων πλέον τελειών άνθρακα. Με την παρουσία της γλουταθειόνης μένουν μόνο υπολείμματα τελειών άνθρακα.

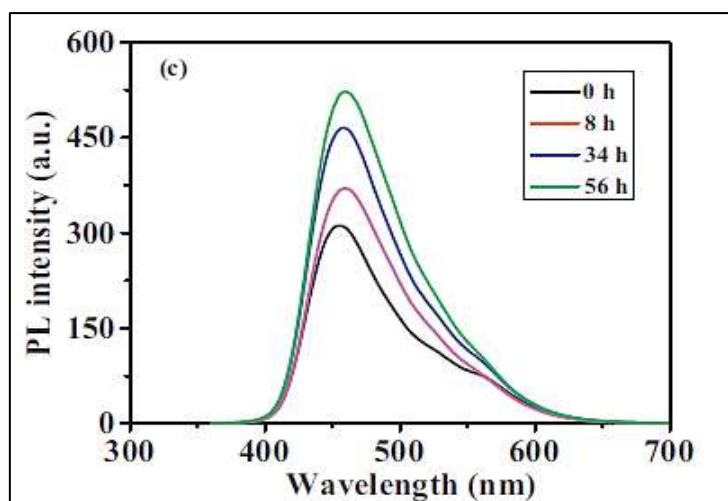


**Εικόνα 2.39:** Φάσματα εκπομπής φθορισμού τελειών άνθρακα (0.01 mg/mL) με διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης από 330 έως 430 nm<sup>[22]</sup>.

Οι τελείες άνθρακα χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση φθορισμού ανεξαρτήτως της διέγερσης, με μέγιστη ένταση φωταύγειας (PL) στα 350 nm.



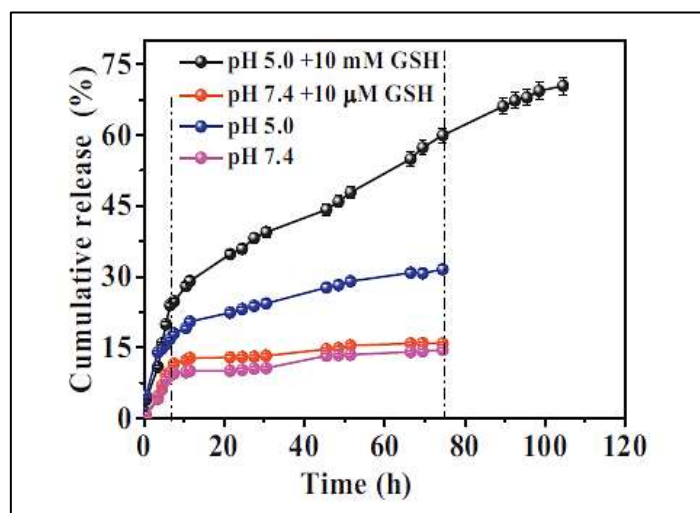
Εικόνα 2.40: Φάσματα εκπομπής φθορισμού nanoclusters ssCDots-Hy (0.01 mg/mL) υπό διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης [22].



Εικόνα 2.41: Φάσματα εκπομπής φθορισμού ssCDots-Hy-DOX nanoclusters (2 mg/mL) σε pH=5.0 + 10 mM GSH (γλουταθειόνη) για διαφορετικούς χρόνους σε  $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$  [22].

Η απελευθέρωση του DOX διερευνήθηκε σε διαφορετικά μέσα με ή χωρίς GSH. Στην οξύτητα του pH 5.0, η σύνδεση υδραζόνης σπάει και η δοξορουβικίνη απελευθερώνεται. Έτσι, η διαφορά στα ποσοστά απελευθέρωσης φαρμάκων με ή χωρίς GSH θα πρέπει να προκαλείται από τις επιδράσεις διάχυσης: τη διάχυση  $H^+$  στα νανοθεραπευτικά για να αποκόψει τη σύζευξη της υδραζόνης, και τη διάχυση του απελευθερωμένου DOX. Για να εξερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση της διάχυσης μετρήθηκαν οι υδροδυναμικές διαμέτροι των ssCDots-Hy-DOX στα αντίστοιχα μέσα με την τεχνική DLS. Πιο συγκεκριμένα, το Dh αυξήθηκε σταδιακά από 140 nm σε περίπου 160 nm μετά τη θεραπεία με pH 5.0 ABS για 48 ώρες, δείχνοντας ότι μετά την απελευθέρωση του DOX τα νανοςύνθετα διογκώθηκαν λόγω της αυξημένης υδροφιλικότητας.

Σε πρώιμο στάδιο, η υδροφιλικότητα των ssCDots-Hy-DOX αυξήθηκε με την απελευθέρωση του φαρμάκου, και ο βαθμός διασταύρωσης (cross-linking) μειώθηκε, επειδή μέρος των διασταυρούμενων ss συνδέσεων αποκόπηκε. Έτσι, η υδροδυναμική διάμετρος αυξήθηκε (4 ώρες και 8 ώρες). Στη συνέχεια, τα nanoclusters με χαμηλό βαθμό διασταύρωσης αποσυντέθηκαν στα διαχωρισμένα υπολείμματα τελειών άνθρακα, με παρόμοια διάμετρο με τις καθαρές τελείες άνθρακα (60 ώρες) (Εικόνα 2.42).



Εικόνα 2.42: Διπλή απόκριση (pH/αντίδραση αναγωγής) με απελευθέρωση DOX από τα νανοσύνθετα ssCDots-Hy-DOX σε διαφορετικά μέσα <sup>[22]</sup>.

## Βιβλιογραφία (Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>)

- [1]. Marshall W., (2000). Κλινική βιοχημεία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, ISBN 960-372-014-3.
- [2]. Amos-Tautua B.M., Songca S.P., Oluwafemi O.S., (2019). Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules*, 24 (13):2456.
- [3]. Photosensitization, (2019). IUPAC Compendium of Chemical Terminology. 2009. [doi:10.1351/goldbook.P04652](https://doi.org/10.1351/goldbook.P04652).
- [4]. Saleem J., Wang L., Chen C., (2018). Carbon-Based Nanomaterials for Cancer Therapy via Targeting Tumor Microenvironment. *Advanced Healthcare Materials*, 7 (20):e1800525.
- [5]. Yang K., Feng L., Shi X., Liu Z., (2013). Nano-graphene in biomedicine: theranostic applications. *Chemical Society Reviews*, 42 (2):530-547.
- [6]. Larson R.A., Marley K.A., (1994). Oxidative mechanisms of phototoxicity. In: Nriagu J.O., Simmons M.S., (Eds.), *Environmental Oxidants*, John Wiley & Sons, New York, pp. 269-318.
- [7]. Xiaoyou Xu, R. R., 2004. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. *Journal of the American Chemical Society*, 126 (40), 12736-7.
- [8]. Selin Sagbas, N. S., 2019. Carbon dots: preparation, properties, and application. *Book: Nanocarbon and its Composites*, 651-676.
- [9]. Jumana Abdul Jaleel, K. P., 2018. Artful and multifaceted applications of carbon dot in biomedicine. *Journal of Controlled Release*, 269, 302-321.
- [10]. Shoujun Zhu, Y. S., 2015. The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): Current state and future perspective. *Nano Research*, 8, 355–381.
- [11]. Wang, Y., Kalytchuk S., Zhang Y., Shi H., Kershaw S., Rogach A., 2014. Thickness-dependent full-color emission tunability in a flexible carbon dot ionogel. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 5, 1412-1420.
- [12]. Dekaliuk M., Pyrshev K., Demchenko A., 2015. Visualization and detection of live and apoptotic cells with fluorescent carbon nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 13, 1-8.
- [13]. Zheng M., Ruan S., Liu S., Sun T., Qu D., Zhao H., Xie Z., Gao H., Jing X., Sun Z., 2015. Self-targeting fluorescent carbon dots for diagnosis of brain cancer cells. *ACS Nano*, 9 11455-11461.



- [14]. Beack S., Kong W.H., Jung S.H., Do I.H., Han S., Kim H., Kim S.K., Yun S.H., Hahn S.K., 2015. Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot-chlorin e6-hyaluronate conjugate. *Acta Biomaterialia*, 26, 295-305.
- [15]. Huang P., Lin J., Wang X., Wang Z., Zhang C., He M., Wang K., Chen F., Li Z., Shen G., Cui D., Chen X., 2012. Light-triggered theranostics based on photosensitizer conjugated carbon dots for simultaneous enhanced-fluorescence imaging and photodynamic therapy. *Advanced Materials*, 24, 5104-5110.
- [16]. Yang L., Xiaohua Z., Xiaoyu Z., Shi L., Qing P., Min Z., Zhigang X., 2016. Porphyrin-based carbon dots for photodynamic therapy of hepatoma. *Advanced Healthcare Materials*, 6 (1).
- [17]. Zhang D, Wen L, Huang R, Wang H, Hu X, Xing D., 2019. Mitochondrial specific photodynamic therapy by rare-earth nanoparticles mediated near-infrared graphene quantum dots. *Biomaterials*, 153, 14-26.
- [18]. Fan H.Y., Yu X.H., Wang K., Yin Y.J., Tang Y.J., Tang Y.L., Liang X.H., 2019. Graphene quantum dots (GQDs)-based nanomaterials for improving photodynamic therapy in cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 182, 111620.
- [19]. Scialabba C., Sciortino A., Messina F., Buscarino G., Cannas M., Roscigno G., Condorelli G., Cavallaro G., Giammona G., Mauro N., 2019. Highly homogeneous biotinylated carbon nanodots: red-emitting nanoheaters as theranostic agents toward precision cancer medicine. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11 (22), 19854-19866.
- [20]. Zhao J., Li F., Zhang S., An Y., Sun S., 2019. Preparation of N-doped yellow carbon dots and N, P co-doped red carbon dots for bioimaging and photodynamic therapy of tumors. *New Journal of Chemistry*, 43, 6332-6342.
- [21]. Xu N., Du J., Yao Q., Ge H., Li H., Xu F., Gao F., Xian L., Fan J., Peng X., 2019. Precise photodynamic therapy: penetrating the nuclear envelope with photosensitive carbon dots. *Carbon*, 159 (10), 74-82
- [22]. Pei M., Li G., Liu P., 2020. Tumor-specific fluorescent Cdots-based nanotheranostics by acid-labile conjugation of doxorubicin onto reduction-cleavable Cdots-based nanoclusters. *Materials Science and Engineering: C*, 110, 110719.

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>:

### Πειραματική μεθοδολογία

#### 3.1. Ηλεκτροχημική σύνθεση κβαντικών τελειών άνθρακα

Οι νανοδομές C, δηλαδή οι κβαντικές τελείες άνθρακα (CQDs), συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιώντας μια ηλεκτροχημική μέθοδο παρασκευής, όπου έγινε χρήση ενός αλκαλικού διαλύματος ηλεκτρολύτη. Το διάλυμα του ηλεκτρολύτη που παρασκευάστηκε είχε συνολικό όγκο 100 mL και αποτελούταν από μίγμα αιθανόλης-νερού, με αναλογία όγκου 99.5/0.5, ενώ προστέθηκαν επίσης 0.3 g NaOH (Εικόνα 3.1). Τόσο για την άνοδο όσο και για την κάθοδο χρησιμοποιήθηκαν ράβδοι γραφίτη (graphite Q70, Meusbürger GmbH)<sup>[1-2]</sup>, οι οποίες συνδέθηκαν με πηγή PowerFlex CPX400A DUAL 60V/20A PSU. Κατά τη συνθετική πορεία εφαρμόστηκε ρεύμα έντασης 30, 60 και 80 mA. Οι ράβδοι γραφίτη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν διάμετρο 5 mm (Εικόνα 3.2) και πριν χρησιμοποιηθούν στην πειραματική διαδικασία υπέστησαν καθαρισμό με διάλυμα αιθανόλης-νερού σε λουτρό υπερήχων. Κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, οι ράβδοι βυθίστηκαν περίπου 30 mm στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη, ενώ η μεταξύ τους απόσταση κατά τη βύθιση ήταν ~25.4 mm (Εικόνα 3.3).



*Εικόνα 3.1: Παρασκευή του αλκαλικού διαλύματος ηλεκτρολύτη.*



*Εικόνα 3.2: Οι ράβδοι γραφίτη που αποτέλεσαν τα ηλεκτρόδια (άνοδο και κάθοδο) για την ηλεκτροχημική σύνθεση των κβαντικών τελειών άνθρακα.*



*Εικόνα 3.3: Η τοποθέτηση των ράβδων γραφίτη στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη.*

Η ένταση ρεύματος εφαρμόστηκε για διάρκεια 1 h, αμέσως μετά τη βύθιση των ράβδων γραφίτη εντός του διαλύματος ηλεκτρολύτη, οπότε και ελήφθη η άχρωμη διασπορά CQDs. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ηλεκτροχημικής οξειδωσης για την παραγωγή των CQDs, ο ηλεκτρολύτης παρέμεινε άχρωμος και η επιφάνεια του ηλεκτροδίου γραφίτη δεν

διογκώθηκε σημαντικά. Αυτό το φαινόμενο είναι σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις προηγούμενων μελετών στις οποίες χρησιμοποιούνταν ράβδος γραφίτη ή άλλα υλικά άνθρακα ως ηλεκτρόδιο εργασίας, όπου παρατηρούνταν διασπορά CQDs καφέ χρώματος και διόγκωση του ηλεκτροδίου<sup>[3]</sup>. Ακολούθως, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για τη σταθεροποίησή τους και τα παραγόμενα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν μεγαλύτερα σωματίδια καθώς και η περίσσεια ιζήματος NaOH και τελικά να ληφθεί μια ομοιογενής διασπορά CQDs. Παρατηρήθηκε ότι όταν η άχρωμη διασπορά CQDs αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου, το χρώμα της μετατράπηκε σε λαμπερό κίτρινο (Εικόνα 3.5), ενώ η διασπορά παρέμεινε άχρωμη όταν αποθηκεύτηκε στους 4°C. Η αρχική συγκέντρωση των CQDs (2.48 mg/mL) υπολογίστηκε με βάση την απώλεια βάρους του ηλεκτροδίου γραφίτη (κάθοδος) και τον τελικό όγκο της διασποράς. Στη συνέχεια, τα προκύπτοντα διαλύματα εξατμίστηκαν, έως ότου φθάσουν τα 5 mL για κάθε 100 mL διαλύματος κβαντικών τελειών.

Μετά την ολοκλήρωση του σταδίου εξάτμισης, τα δείγματα διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας χρωματογραφία στήλης silica gel με ένα μίγμα 100 mL πετρελαϊκού αιθέρα και διαιθυλαιθέρα, σε αναλογία όγκου 30/70. Στη συνέχεια, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων CQDs.



*Εικόνα 3.4: Διάλυμα ηλεκτρολύτη-CQDs που προέκυψε μετά την επιβολή ρεύματος 30 mA.*

Σημειώνεται ότι η παρούσα προτεινόμενη ηλεκτροχημική μέθοδος σύνθεσης, χρησιμοποιώντας ένα αλκαλικό διάλυμα αιθανόλης-νερού ως ηλεκτρολύτη είναι «πράσινη», χαμηλού κόστους και αναπαραγωγίσιμη για την παραγωγή CQDs. Κατά τη συνθετική διεργασία των CQDs το εφαρμοζόμενο ρεύμα ήταν 30 mA (εμβαδό επιφάνειας ηλεκτροδίου:

2 cm<sup>2</sup>), ενώ διαπιστώθηκε, μέσω μετρήσεων δυναμικής σκέδασης, ότι το μέγεθος των παραγόμενων κβαντικών τελειών άνθρακα ήταν 2.9 nm.

Κατά τη διάρκεια των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων, τα αέρια παρήχθησαν τόσο στην άνοδο όσο και στην κάθοδο, λόγω της διάσπασης του νερού, η οποία συνήθως λαμβάνει χώρα σε ένα δυναμικό που φτάνει το 1.23 V, σε μέτρια πυκνά διαλύματα άλατος. Παρ'όλα αυτά, τα δραστικά ενδιάμεσα προϊόντα, όπως ρίζες υδροξυλίου ( $\bullet\text{OH}$ ), μπορούν επίσης να παραχθούν στις διεπαφές γραφίτη σε υψηλό ανοδικό υπερδυναμικό (π.χ. 5V). Οι ηλεκτροχημικές αντιδράσεις που μπορεί να λάβουν χώρα είναι οι ακόλουθες<sup>[4-5]</sup>:

<b>Άνοδος:</b>	$2\text{OH}^- + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2\text{O}_2$ $\text{OH}^- + \text{e}^- \rightarrow \bullet\text{OH}^-$
<b>Κάθοδος:</b>	$2\text{H}_2\text{O} + \text{e}^- \rightarrow 2\text{OH}^- + \text{H}_2$

Οι παραγόμενες ρίζες υδροξυλίου διαβρώνουν το ηλεκτρόδιο γραφίτη στις άκρες. Αυτές οι ρίζες που παράγονται σε αλκαλικό ηλεκτρολύτη χωρίς αλκοόλες είναι μη επιλεκτικές και εξαιρετικά δραστικές, προκαλώντας τη γρήγορη απολέπιση των φύλλων γραφίτη μεγαλύτερου μεγέθους από γραφίτη. Μετά την προσθήκη αλκοολών, η δραστικότητα των ριζών μπορεί να ελεγχθεί μερικώς, οδηγώντας στην ομαλή παραγωγή CQDs<sup>[6-8]</sup>. Ως αποτέλεσμα, τα CQDs με εξαγωνική δομή πλέγματος θα μπορούσαν να απολεπιστούν ηλεκτροχημικά από το ηλεκτρόδιο γραφίτη.

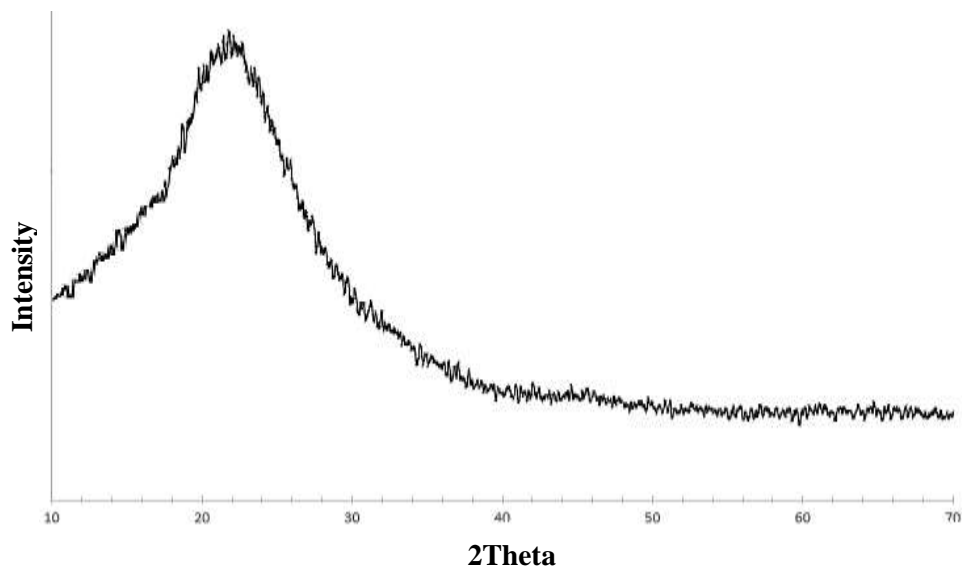
Τέλος, σημειώνεται ότι κάθε πειραματικός κύκλος σύνθεσης έλαβε χώρα κατ' ελάχιστο 3 φορές.

## 3.2. Χαρακτηρισμός κβαντικών τελειών άνθρακα

### 3.2.1. Περιθλασιμετρία ακτίνων X (XRD)

Για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων CQDs της παρούσας έρευνας, χρησιμοποιήθηκε περιθλασίμετρο BRÜCKER D8 ADVANCE, με συνθήκες λειτουργίας τα 30 mA και τα 40 kV. Η περιοχή σάρωσης των δειγμάτων βρίσκεται ανά περίπτωση εντός του εύρους  $10^\circ \leq 2\theta \leq 70^\circ$  και η ταχύτητα σάρωσης ήταν  $0.2^\circ/\text{min}$ .

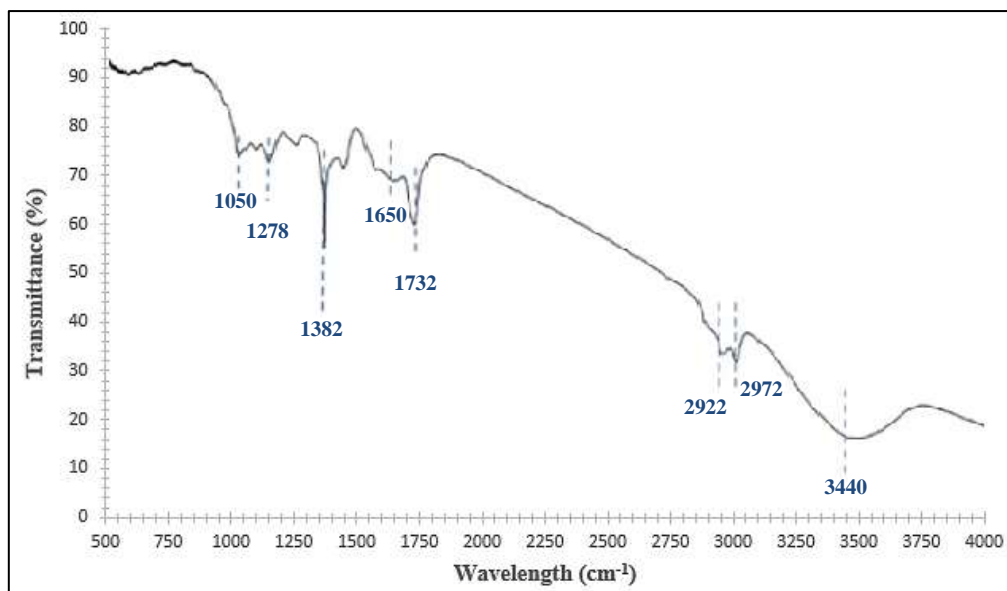
Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.6 που ακολουθεί, οι παραγόμενες κβαντικές τελείες άνθρακα είναι άμορφες, παρουσιάζοντας μόνο μια ευρεία κορυφή περίπου σε  $2\theta = 22^\circ$ , χωρίς κάποια ένδειξη κρυσταλλικής δομής<sup>[9]</sup>. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η θέση αυτής της κορυφής αντιστοιχεί σε διαστρωματική απόσταση ίση με  $\sim 3.77\text{\AA}$ , η οποία είναι μεγαλύτερη από την απόσταση μεταξύ των (002) επιπέδων στον bulk γραφίτη ( $3.34\text{\AA}$ )<sup>[9]</sup>.



*Εικόνα 3.5: Διάγραμμα XRD των παραγόμενων CQDs.*

### 3.2.2. Φασματοσκοπία FTIR

Η διάταξη FTIR που χρησιμοποιήθηκε είναι το FTIR JASCO4200, με κρύσταλλο Ge. Τα φάσματα FTIR των δειγμάτων που συντέθηκαν ήταν στην περιοχή των 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  και επομένως, οι κορυφές δεν μπορούσαν να ανιχνευθούν στο εύρος τιμών της μεθόδου ATR. Η Εικόνα 3.6, που ακολουθεί, παρουσιάζει τα αποτελέσματα.



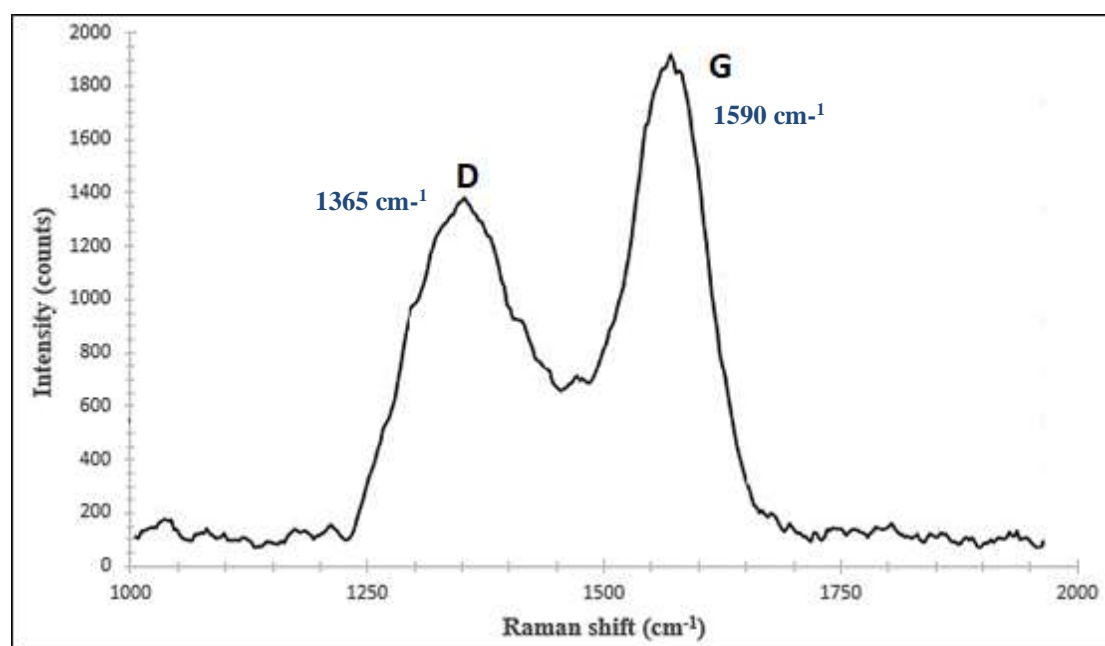
*Εικόνα 3.6: Φάσμα FTIR παραγόμενων κβαντικών τελειών άνθρακα.*

Οι κορυφές στα 1050  $\text{cm}^{-1}$ , 1278  $\text{cm}^{-1}$  και 1382  $\text{cm}^{-1}$  αποδεικνύουν την ύπαρξη ομάδων C-OH και C-O-C στις κβαντικές τελείες άνθρακα<sup>[10]</sup>. Οι κορυφές στα 1650  $\text{cm}^{-1}$  και 1732  $\text{cm}^{-1}$  αποδίδονται στη δημιουργία ομάδων C=C και C=O, αντίστοιχα. Τέλος, η ευρεία και έντονη

κορυφή στα  $3440\text{ cm}^{-1}$  περίπου, αντιστοιχεί στην δόνηση έκτασης O-H, ακολουθούμενη από ασθενείς δονήσεις έκτασης C-H στα  $2922\text{ cm}^{-1}$  και  $2972\text{ cm}^{-1}$  [11].

### 3.2.3. Φασματοσκοπία micro-Raman

Για τον χαρακτηρισμό των παραγόμενων κβαντικών τελειών άνθρακα μέσω της τεχνικής micro-Raman χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο InVia Renishaw με πηγή διέγερσης, εκείνη ενός υψηλής ισχύος λέιζερ διόδου εγγύς υπέρυθρου (NIR), μήκους κύματος ( $\lambda$ ) ίσου με  $785\text{ nm}$ . Οι μετρήσεις Raman πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου σε μια οπισθοσκεδαζόμενη διάταξη και η δέσμη λέιζερ επικεντρώθηκε στα δείγματα μέσω ενός φακού μεγέθυνσης μικρής απόστασης  $\times 50$ , με χαμηλή ισχύ διέγερσης, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η χαμηλή θέρμανση των δειγμάτων, λόγω του λέιζερ. Οι μετατοπίσεις συχνότητας βαθμονομήθηκαν μέσω εσωτερικού προτύπου Si. Δύο έως τρία σημεία μετρήθηκαν για κάθε δείγμα. Ο χρόνος έκθεσης ήταν  $10\text{ s}$ , με 3-10 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φασματομετρίας Raman παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.7.



*Εικόνα 3.7: Φάσμα Raman παραγόμενων κβαντικών τελειών άνθρακα.*

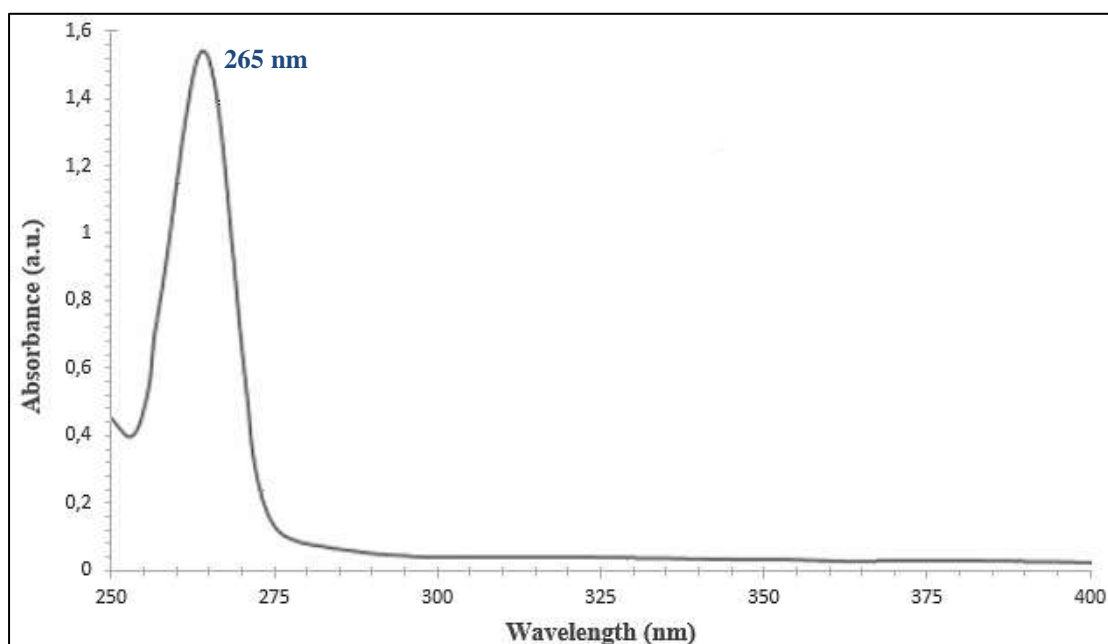
Σύμφωνα με το φάσμα Raman της Εικόνας 3.7, παρατηρούνται δύο ευρείες κορυφές, στα  $1365\text{ cm}^{-1}$  και  $1590\text{ cm}^{-1}$ , κοντά στις ζώνες D (διαταραχή) και G (γραφίτη), αντίστοιχα. Η ζώνη D προέρχεται από τις δονήσεις των ατόμων άνθρακα με αιωρούμενους δεσμούς (dangling bonds) στο τελευταίο επίπεδο του διαταραγμένου γραφίτη ή του υαλώδους άνθρακα, ενώ η ζώνη G σχετίζεται με τη δόνηση  $E_{2g}$  του γραφίτη και τη δόνηση των  $sp^2$  συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα σε ένα δισδιάστατο εξαγωνικό πλέγμα [12]. Η ένταση της ζώνης G είναι υψηλότερη από αυτή της ζώνης D, υποδεικνύοντας ότι υπάρχουν κυρίως  $sp^2$  άνθρακες, με ορισμένους

υβριδικούς  $sp^3$  άνθρακες στις τελείες άνθρακα. Έτσι, οι τελείες άνθρακα αποτελούνται κυρίως από  $sp^2$  γραφικούς άνθρακες, με ατέλειες  $sp^3$  άνθρακα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με αυτά που προέκυψαν από την έρευνα των Mao et al. [13]. Συμπερασματικά, κατά τη σύνθεση, λειτουργικές ομάδες, όπως C=O, C-O και O-H, συνδέονται με τις τελείες άνθρακα. Η ύπαρξη καρβοξυλικών ομάδων και υδροξυλομάδων έχει ως αποτέλεσμα την καλή διαλυτότητα των τελειών άνθρακα στο νερό.

### 3.2.4. Φασματοσκοπία UV-Vis

Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο Thermo Scientific Evolution 200.

Στην Εικόνα 3.8 παρατίθεται το φάσμα UV-Vis των παραγόμενων CQDs. Όπως παρατηρείται στην εικόνα αυτή, η κυρίαρχη κορυφή απορρόφησης εντοπίζεται περίπου στα 265 nm και αποδίδεται, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στις  $\pi \rightarrow \pi^*$  μεταπτώσεις, οι οποίες αντιστοιχούν σε  $sp^2$  δεσμούς C=C [16].



Εικόνα 3.8: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis των παραγόμενων κβαντικών τελειών άνθρακα.

### 3.2.5. Μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)

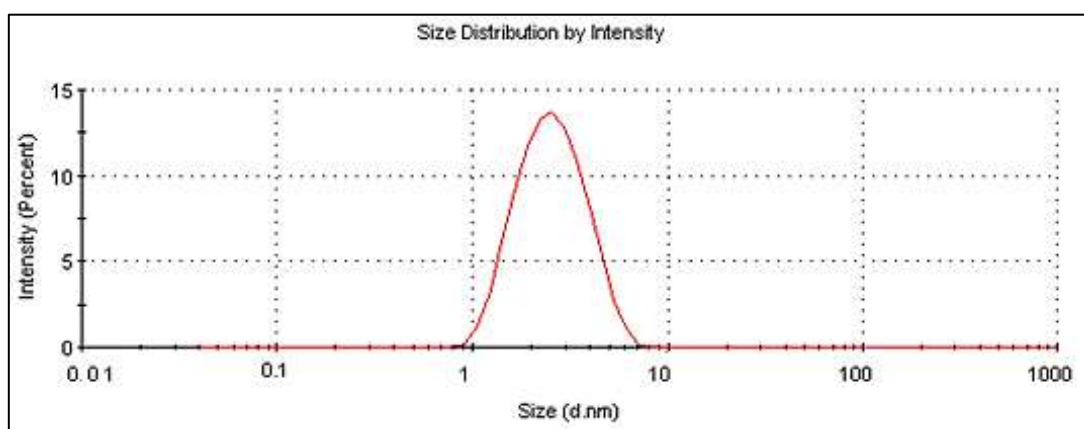
Προκειμένου να ελεγχθεί το μέγεθος των κβαντικών τελειών άνθρακα, προσδιορίστηκε η μέση υδροδυναμική διάμετρος και η κατανομή του μεγέθους των κβαντικών τελειών άνθρακα που συντέθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering - DLS), χρησιμοποιώντας το Zeta Sizer nano S



(Malvern, UK), ενώ το μήκος κύματος του λέιζερ ήταν 633 nm και η γωνία σκέδασης ίση με 173°.

Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων μεγέθους των παραγόμενων κβαντικών τελειών, 1 mL εναιωρήματος CQDs διαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο απιονισμένου νερού σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 2 h, σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τις μετρήσεις μεγέθους, μετρήθηκε η απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος κβαντικών τελειών στα 633 nm. Τα αποτελέσματα για τις CQDs που παράχθηκαν υπό την επιβολή ρεύματος έντασης 30 mA ήταν 0.049 ABS. Είναι επίσης σημαντικό να προστεθεί στο λογισμικό της μέτρησης ο ακριβής δείκτης διάθλασης, ο οποίος μετρήθηκε στις 24.5°C και ο οποίος ήταν ίσος με 1.3351.

Τα αποτελέσματα (Εικόνα 3-9 και Πίνακας 3-1) δείχνουν ότι όλα το δείγμα κβαντικών τελειών άνθρακα παρουσιάζει πολύ ομοιόμορφη κατανομή (χαμηλή τιμή PdI) και το μέγεθος των CQDs βρίσκεται στο αποδεκτό και επιθυμητό εύρος (1-100 nm).



Εικόνα 3.9: Διάγραμμα κατανομής μεγέθους δείγματος CQDs για 30 mA.

Πίνακας 3.1: Μέσο μέγεθος σωματιδίων και δείκτης PdI των παραγόμενων CQDs.

CQDs 30 mA	Z-Average(d.nm): 2.9	Peak 1: 3.2 nm	Intensity (%)	sdev. (d. nm)
	PdI: 0.148 Intercept: 0.886 Result quality: Good Result quality: Good		100 %	1.3

### 3.3. Σύνθεση και χαρακτηρισμός πορφυρινών

#### 3.3.1. Εισαγωγή

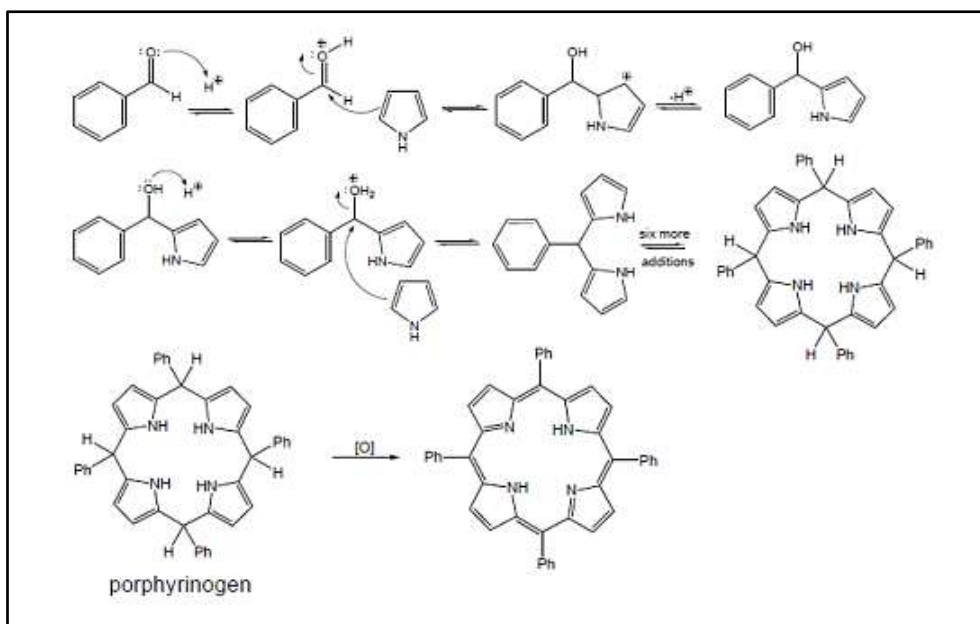
Ο συνθετικός κόσμος των πορφυρινών είναι εξαιρετικά πλούσιος και η ιστορία του ξεκίνησε στα μέσα της δεκαετίας του 1930. Ένας τεράστιος αριθμός συνθετικών διαδικασιών

έχει αναφερθεί μέχρι τώρα και ο λόγος μπορεί να γίνει εύκολα κατανοητός αναλύοντας τον μοριακό σκελετό της πορφυρίνης. Αρχικά, υπάρχουν πολλές χημικές στρατηγικές για τις συνθετικές πορφυρίνες, που περιλαμβάνουν διαφορετικά δομικά στοιχεία, όπως πυρρόλες, αλδεΐδες, διπυρρομεθάνια, διπυρρομεθένια, τριπυρράνες και γραμμικές τετραπυρρόλες.

Η πιο διάσημη οδός πολυμερισμού μονοπυρρολίου για τη λήψη πορφυρινών περιλαμβάνει τη σύνθεση τετραφαινυλο-πορφυρινών, από την αντίδραση μεταξύ πυρρόλης και βενζαλδεΐδης. Η παρούσα μελέτη, όπως και οι περισσότερες διαδικασίες PDT εστιάζουν κυρίως σε μέσο-τετρα-αρυλοπορφυρίνες <sup>[17]</sup>. Αυτό συμβαίνει, διότι ο συγκεκριμένος τύπος παρασκευάζεται εύκολα και η δυνατότητα για ποικίλες χημικές τροποποιήσεις είναι εφικτή. Αυτή η ευρεία γκάμα διαθέσιμων αλδεϋδών παρέχει στις πορφυρίνες διαφορετικούς αρυλικούς ή ετεροαρυλικούς υποκαταστάτες στις μεσο-θέσεις.

Αυτή η διαδικασία αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Rothmund <sup>[18]</sup> και, μετά από τροποποίηση, από τους Adler, Longo, κτλ., τελικά βελτιστοποιήθηκε από την ομάδα του Lindsey. Στη μεθοδολογία Rothmund και Adler/Longo, το ακατέργαστο προϊόν περιέχει μεταξύ 5 και 10% ενός υποπροϊόντος, που ανακαλύφθηκε αργότερα ότι είναι η μεσο-τετραφαινυλοχλωρίνη, που μετατρέπεται στο επιθυμητό πορφυρινικό προϊόν υπό οξειδωτικές συνθήκες.

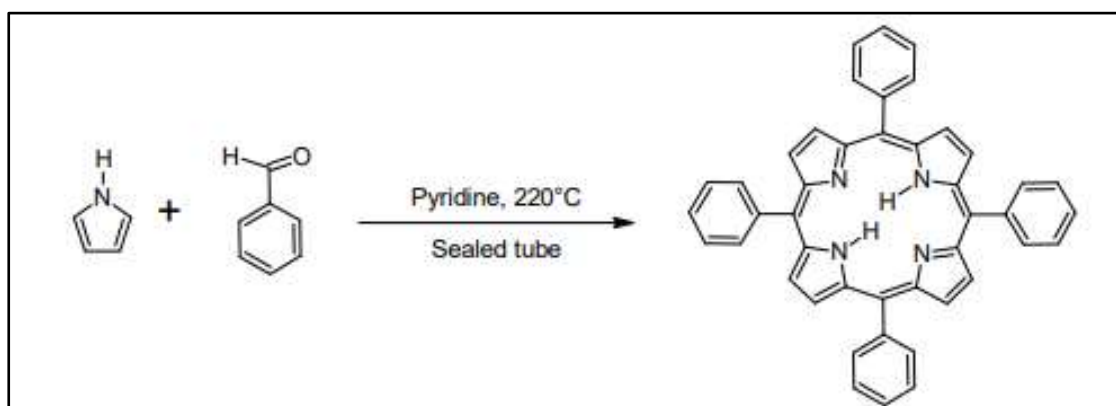
Το γενικό σχήμα εργαστηριακής πορφυρινικής σύνθεσης είναι μια διαδικασία συμπύκνωσης και οξείδωσης, που ξεκινά με πυρρόλη και μια βενζαλδεΐδη (Εικόνα 3.10). Στη φάση του διαλύματος, οι όξινες συνθήκες είναι απαραίτητες, με το μυρμηκικό οξύ, το οξικό οξύ και το προπιονικό οξύ να είναι οι συνήθεις διαλύτες της αντίδρασης, ενώ π-τολουολο-σουλφονικό οξύ ή διάφορα οξέα κατά Lewis μπορούν να χρησιμοποιηθούν μαζί με ένα μη όξινο συστατικό. Η ποσότητα παραπροϊόντων που σχηματίζεται, απομακρύνεται συνήθως με ανακρυστάλλωση ή χρωματογραφία στήλης, με τις συνολικές αποδόσεις να είναι σχετικά μικρές (10-20%), αλλά σε τελευταίες μελέτες <sup>[19]</sup> προκύπτουν περιπτώσεις όπου η απόδοση των συνθετικών αυτών αντιδράσεων ξεπερνά το 50%, φτάνοντας έως και το 80%, γεγονός που οφείλεται: (α) στην πολυπλοκότητα του κεντρικού μορίου των πορφυρινών, (β) στην ικανότητα σύνδεσης με τον επιθυμητό υποκαταστάτη, καθώς και (γ) στις συνθήκες στις οποίες εκτελείται η αντίδραση (θερμοκρασία, όξινος διαλύτης, παρουσία αέρα) <sup>[20]</sup>.



Εικόνα 3.10: Μηχανισμός σχηματισμού πορφυρίνης από αντίδραση πυρρόλης και αλδεΐδης σε όξινο διαλύτη [20].

### 3.3.1.1. Μέθοδος Rothermund

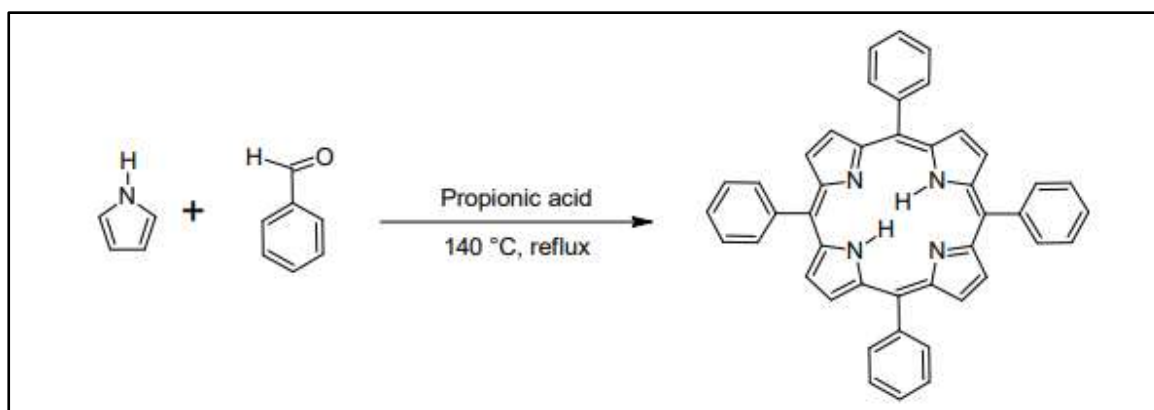
Οι Rothermund και Menotti ήταν οι πρώτοι που συνέθεσαν τη μεσο-τετραφαινυλοπορφυρίνη, πρωτοστατώντας έτσι στην αρχική σύνθεση μεσο-υποκατεστημένης πορφυρίνης. Η ένωση ελήφθη με αντίδραση πυρρόλης και βενζαλδεΐδης σε πυριδίνη, σε σφραγισμένο σωλήνα στους 220°C για 24 h, με απόδοση περίπου 10%. Λόγω των σχετικά χαμηλών αποδόσεων και των έντονων συνθηκών αντίδρασης, οι προσπάθειες στη συνέχεια προσανατολίστηκαν προς την ανάπτυξη περισσότερο αποτελεσματικών συνθηκών αντίδρασης, που θα επέτρεπαν την παρασκευή μιας ευρύτερης ποικιλίας μεσο-υποκατεστημένων πορφυρινών με υψηλότερες αποδόσεις.



Εικόνα 3.11 Σύνθεση τετραφαινυλοπορφυρίνης με τη μέθοδο Rothermund.

### 3.3.1.2. Μέθοδος Alder-Longo <sup>[21]</sup>

Οι Adler και Longo τροποποίησαν αργότερα τη μέθοδο Rothemund και Menotti κάτω από ηπιότερες συνθήκες αντίδρασης. Η τροποποίηση της αντίδρασης περιλάμβανε αναρροή πυρρόλης και βενζαλδεΐδης σε προπιονικό οξύ για 30 min στους 141°C. Αυτό παρέχει πολλούς περισσότερους υποκαταστάτες στη βενζαλδεΐδη που πρέπει να μετατραπούν στις αντίστοιχες πορφυρίνες τους σε αποδόσεις, έως και 20%. Το μειονέκτημα αυτού του μηχανισμού αποτελεί ο δύσκολος και χρονοβόρος καθαρισμός του προϊόντος, λόγω της παραγωγής υψηλού βαθμού πίσσας κατά την αντίδραση. Επίσης, οι προσπάθειες παραγωγής πορφυρινών από βενζαλδεΐδες που φέρουν ευαίσθητες λειτουργικές ομάδες όπως υδροξύλιο, θειόλη και αμινομάδες απέτυχαν κάτω από αυτές τις συνθήκες αντίδρασης (Εικόνα 3.12).



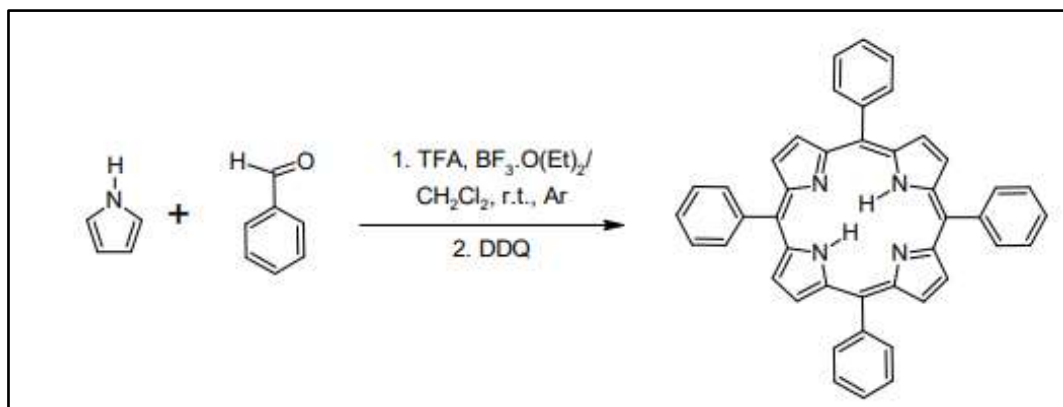
Εικόνα 3.12: Σύνθεση τετρα-φαινολοπορφυρίνης με τη μέθοδο Alder-Longo.

Η μέθοδος Alder-Longo, ακόμα θεωρείται η πιο αποτελεσματική για παραγωγές πορφυρινών μεγάλης κλίμακας. Για αυτόν τον λόγο, επιλέγεται και ως η κύρια μέθοδος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

### 3.3.1.3. Μέθοδος Lindsey

Επιγραμματικά, αναφέρεται ότι ο Lindsey και οι συνεργάτες του [22] ανέπτυξαν ένα νεότερο πρωτόκολλο, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πορφυρινών που απαιτούν τη χρήση ασταθών σε οξύ αλδεϋδών, οι οποίες δεν χρησιμοποιούνται γενικά με τη μέθοδο Adler-Longo. Στην αντίδραση Lindsey, ισομοριακές συγκεντρώσεις πυρρόλης και βενζαλδεΐδης, αντιδρούν με τριφθοροξικό οξύ (TFA) ή αιθερικό τριφθοριούχο βόριο ( $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ ) ως καταλύτες, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου για 1 h σε διχλωρομεθάνιο (DCM) ως διαλύτη, χρησιμοποιώντας έναν καθαριστή νερού (οξικός τριαιθυλεστέρας). Αυτό ακολουθείται από την προσθήκη 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανοβενζοκινόνης (DDQ) για τη μετατροπή του ενδιάμεσου πορφυρινογόνου σε

πορφυρίνη. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει πιο εύκολο καθαρισμό και παρέχει υψηλότερες αποδόσεις (Εικόνα 3.13).



Εικόνα 3.13: Σύνθεση τετρα-φαινολοπορφυρίνης με τη μέθοδο Lindsey.

### 3.3.2. Πειραματική διαδικασία

Κατά την παρούσα μελέτη παρασκευάστηκαν τρεις διαφορετικές μέσο-τετρα-αρυλοπορφυρίνες με διαφορετικούς υποκαταστάτες στα άκρα των βενζολικών δακτυλίων της αλδεΐδης, με σκοπό την σύγκριση τόσο των ιδιοτήτων απορρόφησής τους, όσο και της ικανότητας επιφανειακής σύνδεσης με τις CQDs. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν μέσω της μεθόδου Alder οι ακόλουθες πορφυρίνες:

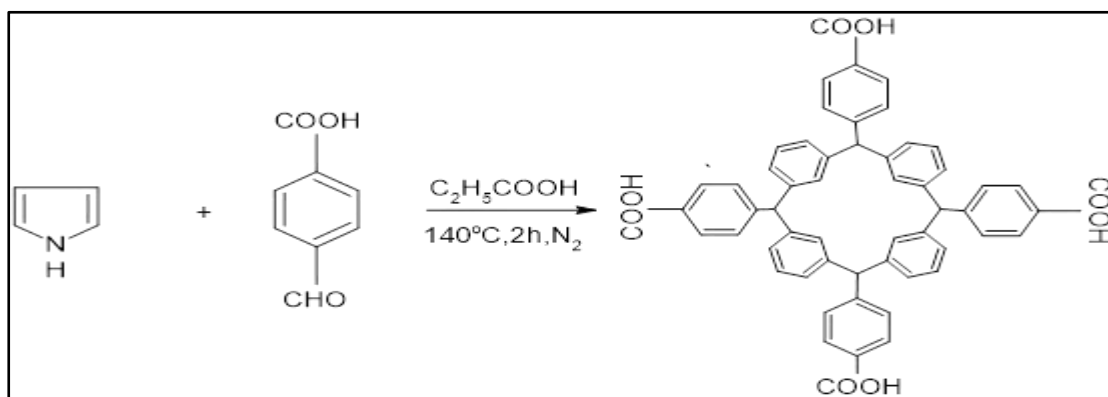
- Meso-Tetra(4-Carboxyphenyl) porphyrin-TCPP
- Meso-Tetra(4-Hydroxyphenyl) porphyrin-THPP

Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η πειραματική διαδικασία παραγωγής των ανωτέρω πορφυρινών, καθώς και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

#### 3.3.2.1. Σύνθεση πορφυρίνης TCPP

<b>Αντιδραστήρια:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 300 mg 4-καρβόξυβενζαλδεΐδη (1,998 mmol)</li> <li>• 138 <math>\mu\text{L}</math> πυρρόλη</li> <li>• 10 mL προπιονικό οξύ</li> </ul>
<b>Διαδικασία:</b>	Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, προστίθεται η αλδεΐδη με το προπιονικό οξύ, μέχρι διαλυτοποίησης της αλδεΐδης (μαγνητική ανάδευση). Έπειτα, προστίθεται η πυρρόλη και η σφαιρική συνδέεται με στήλη συμπίκνωσης με ανακύκλωση (reflux). Η αντίδραση αφήνεται στους 140°C για τουλάχιστον 2 h υπό αδρανή ατμόσφαιρα ( $\text{N}_2$ ). Μετά το πέρας της

αντίδρασης, παραλαμβάνεται σκουρόχρωμο στερεό και λασπώδες μαύρο υγρό.



*Εικόνα 3.14: Αντίδραση παραγωγής TCPP (αναλογία αντιδρώντων-προϊόντος 4:1).*

Η παρακολούθηση της προόδου της αντίδρασης και ένας σύντομος έλεγχος καθαρότητας του επιθυμητού προϊόντος, επιτεύχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC-Thin Layer Chromatography), σε πλάκες αλουμινίου, επιστρωμένες με silica gel F254 της εταιρείας Merck και σε αναλογία (8:2, 5mL) συστήματος διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα (PE)/οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc). Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων εμφανίζονται σε λάμπα UV (254 nm) και με εμποτισμό σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (PMA), σε αναλογία με EtOH 1:2.



*Εικόνα 3.15: Αποτέλεσμα TLC, όπου s1:benzaldehyde, s2:πυρρόλη, R: προϊόν, CO: τοποθέτηση όλων των δειγμάτων.*

Όπως φαίνεται παραπάνω (Εικόνα 3.15), το προϊόν δεν έχει περίσσεια αντιδρώντων, από την στιγμή που καμία κουκκίδα που οφείλεται στο κατά πόσο πολική (προπιονικό) ή μη πολική (πυρρόλη) είναι η ουσία, δεν εμφανίζεται στην στήλη R. Επομένως, το διάλυμα οδηγείται σε

διήθηση υπό κενό και πλύση με H<sub>2</sub>O και DCM, για απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων προπιονικού οξέος ή/και πυρρόλης, αντίστοιχα. Η επιλογή των διαλυτών γίνεται με βάση την πολικότητα. Παραλαμβάνεται μαύρο στερεό και αφού ζυγιστεί, αφήνεται να ξηραθεί in vacuo για μια ημέρα, ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Τέλος, παραλαμβάνεται μαύρο κρυσταλλικό στερεό.



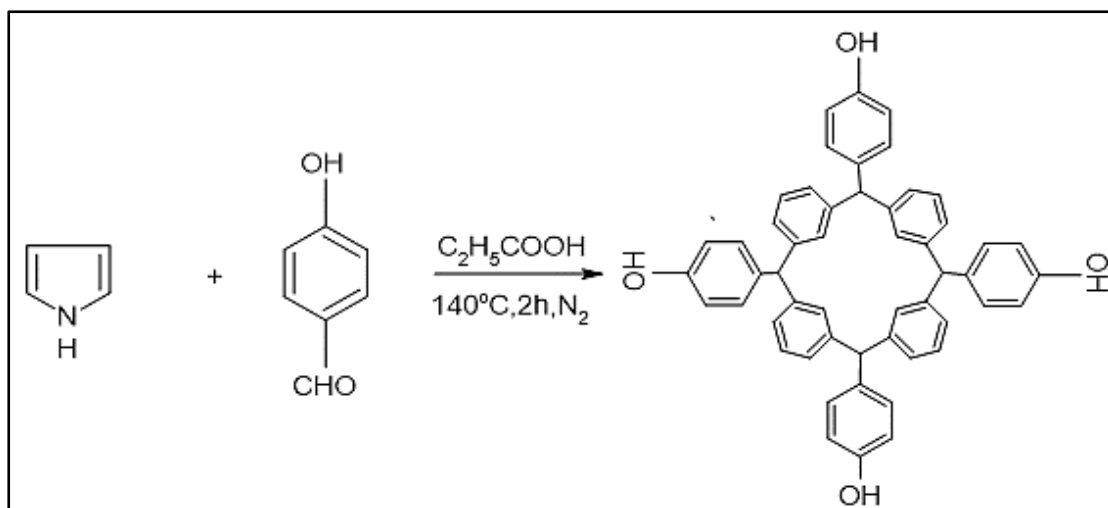
*Εικόνα 3.16: Πορφυρίνη TCPP.*

#### **Αποτελέσματα συνθετικής διεργασίας πορφυρίνης TCPP:**

<i>Μάζα παραγόμενης πορφυρίνης:</i>	260 mg
<i>Απόδοση αντίδρασης:</i>	65,9%
<i>Αναμενόμενη απόδοση αντίδρασης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία <sup>[23]</sup>:</i>	50-60%

#### **3.3.2.2. Σύνθεση πορφυρίνης THPP**

<b>Αντιδραστήρια:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 300 mg 4-υδροξυβενζαλδεΐδη (2,457 mmoles)</li> <li>• 170 μL πυρρόλη</li> <li>• 10 mL προπιονικό οξύ</li> </ul>
<b>Διαδικασία:</b>	Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, προστίθεται η αλδεΐδη με το προπιονικό οξύ, μέχρι διαλυτοποίησης της αλδεΐδης (μαγνητική ανάδευση). Έπειτα, προστίθεται η πυρρόλη και η σφαιρική συνδέεται με στήλη συμπίκνωσης με ανακύκλωση (reflux). Η αντίδραση αφήνεται στους 140°C για τουλάχιστον 2 h υπό αδρανή ατμόσφαιρα (N <sub>2</sub> ). Μετά το πέρας της αντίδρασης, παραλαμβάνεται μαυρο-πράσινο κρυσταλλικό στερεό.



Εικόνα 3.17: Αντίδραση παραγωγής THPP (αναλογία αντιδρώντων-προϊόντος 4:1).



Εικόνα 3.18: Πορφυρίνη THPP.

### Αποτελέσματα συνθετικής διεργασίας πορφυρίνης THPP:

Μάζα παραγόμενης πορφυρίνης:	350 mg
Απόδοση αντίδρασης:	73,36 %
Αναμενόμενη απόδοση αντίδρασης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία <sup>[23]</sup> :	56-70 %

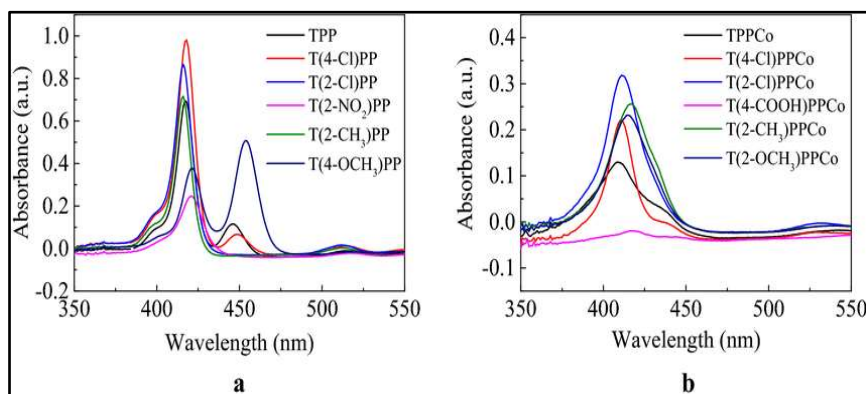
### 3.3.3. Χαρακτηρισμός πορφυρινών

#### 3.3.3.1. Φασματοσκοπία UV-Vis

Σε γενικές γραμμές ισχύει, ότι η ένταση και το χρώμα των πορφυρινών προέρχονται από τα εξαιρετικά συζευγμένα συστήματα ηλεκτρονίων, ενώ το πιο συναρπαστικό χαρακτηριστικό των πορφυρινών είναι τα οπτικά στοιχεία, που λαμβάνονται από το φάσμα υπεριώδους

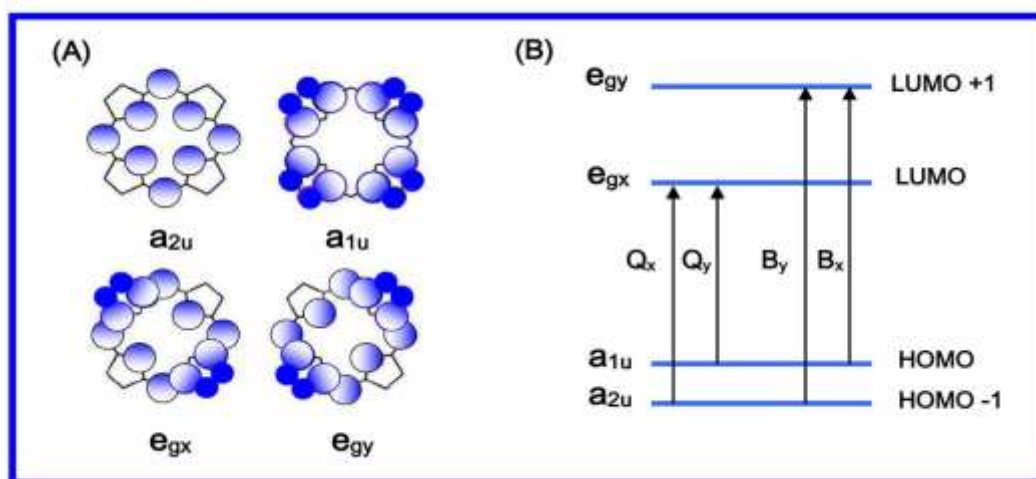


ακτινοβολίας τους, που αποτελείται από δύο διακριτές περιοχές: τη σχεδόν υπεριώδη και την ορατή περιοχή. Έχει τεκμηριωθεί ότι οι αλλαγές στην οδό σύζευξης και στη συμμετρία μιας πορφυρίνης μπορούν να επηρεάσουν το φάσμα απορρόφησης UV-Vis.



Εικόνα 3.19: Φάσματα απορρόφησης για διάφορες πορφυρίνες σύμφωνα με βιβλιογραφική πηγή<sup>[24]</sup>.

Το φάσμα απορρόφησης των πορφυρινών έχει γίνει κατανοητό από καιρό ως προς το εξαιρετικά επιτυχημένο μοντέλο «τεσσάρων τροχιακών» (δύο υψηλότερα κατειλημμένα τροχιακά  $\pi$  και δύο χαμηλότερα μη κατειλημμένα τροχιακά  $\pi^*$ ), που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1959 από τον Martin Gouterman. Στην ουσία, οι ζώνες απορρόφησης στα συστήματα πορφυρίνης προκύπτουν από μεταβάσεις μεταξύ δύο HOMOs και δύο LUMOs (όπου HOMO και LUMO αποτελούν τύπους μοριακών τροχιακών).



Εικόνα 3.20: Πορφυρίνη HOMOs και LUMOs. (A) Αναπαράσταση των τεσσάρων τροχιακών Gouterman σε πορφυρίνες. (B) Σχεδίαση των ενεργειακών επιπέδων των τεσσάρων τροχιακών Gouterman κατά τη μείωση της συμμετρίας από  $D_{4h}$  σε  $C_{2v}$ . Το σύνολο των τροχιακών δημιουργεί ζώνες Q και B.

Τα HOMOs υπολογίστηκαν ότι είναι ένα  $a_{1u}$  και ένα  $a_{2u}$  τροχιακό, ενώ τα LUMOs υπολογίστηκαν ότι είναι ένα εκφυλισμένο σύνολο τροχιακών. Οι μεταβάσεις μεταξύ αυτών των τροχιακών οδήγησαν σε δύο διεγερμένες καταστάσεις. Η τροχιακή ανάμιξη χωρίζει αυτές τις δύο καταστάσεις σε ενέργεια, δημιουργώντας μια υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση με μεγαλύτερη ισχύ ταλαντωτή, δημιουργώντας τη ζώνη Soret και μια χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση με λιγότερη ισχύ ταλαντωτή, δημιουργώντας τις ζώνες Q.

Το ηλεκτρονικό φάσμα απορρόφησης μιας τυπικής πορφυρίνης αποτελείται επομένως από δύο διακριτές περιοχές. Οι πρώτες περιλαμβάνουν τη μετάβαση από τη βασική κατάσταση στη δεύτερη διεγερμένη κατάσταση ( $S_0 \rightarrow S_2$ ) και η αντίστοιχη ζώνη ονομάζεται ζώνη Soret ή B. Το εύρος απορρόφησης είναι μεταξύ 380-500 nm ανάλογα με το αν η πορφυρίνη είναι β- ή μεσο-υποκατεστημένη.

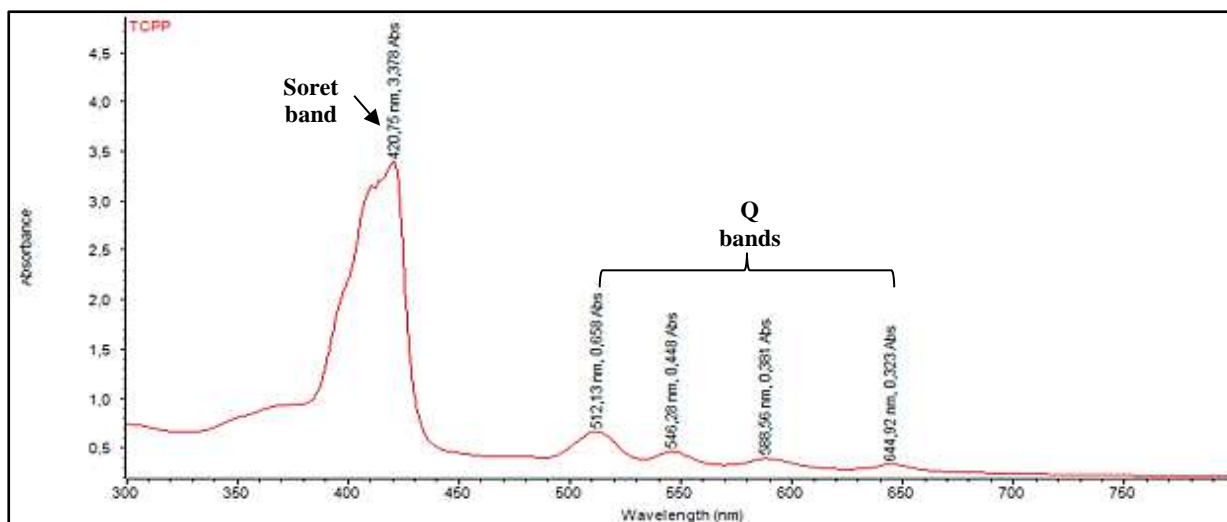
Η δεύτερη περιοχή αποτελείται από μια ασθενή μετάβαση στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση στην περιοχή μεταξύ 500-750 nm (οι ζώνες Q). Αυτά τα ευνοϊκά φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των πορφυρινών οφείλονται στη σύζευξη 18 π ηλεκτρονίων και παρέχουν το πλεονέκτημα της εύκολης και ακριβούς παρακολούθησης των διεργασιών δέσμευσης φιλοξενουμένων με φασματοσκοπικές μεθόδους ορατού-UV.

Οι χλωρίνες (2,3-διυδροπορφυρίνες) διακρίνονται από τις μητρικές τους πορφυρίνες με την παρουσία ενός μειωμένου περιφερειακού διπλού δεσμού και αυτή η αλλαγή στη συμμετρία οδηγεί σε ισχυρή απορρόφηση στο τμήμα μεγάλου μήκους κύματος του ορατού φάσματος. Το τετραεδρικό σύστημα με δύο αντίθετες ανηγμένες πυρρολικές μονάδες ονομάζεται βακτηριοχλωρίνη, ενώ το τοποϊσομερές με δύο γειτονικές ανηγμένες πυρρολικές μονάδες είναι η ισοβακτηριοχλωρίνη. Το οπτικό φάσμα των βακτηριοχλωρινών βρίσκεται στην «ιδανική» περιοχή για PDT. Οι ισοβακτηριοχλωρίνες έχουν φάσματα πολύ παρόμοια με τις χλωρίνες και η συνθετική προσπάθεια για τη δημιουργία μιας δεύτερης ανηγμένης θέσης δεν ανταμείβεται με ένα βελτιωμένο φάσμα και, κατά συνέπεια, η έρευνα για νέους φωτοευαίσθητοποιητές έχει επικεντρωθεί στην παρασκευή χλωρινών και βακτηριοχλωρινών <sup>[23]</sup>.

Η τοποθέτηση ενός μετάλλου σε πορφυρίνη παρέχει φάσματα στα οποία η ζώνη Q (η πιο απομακρυσμένη υπέρυθρη ζώνη) είναι γενικά μετατοπισμένη προς το υπεριώδες. Εκτός από αυτή την ανεπιθύμητη μετατόπιση, ένα άλλο μειονέκτημα των φαρμάκων που περιέχουν ένα μέταλλο μπορεί να είναι η πιθανή τοξικότητα των μετάλλων.

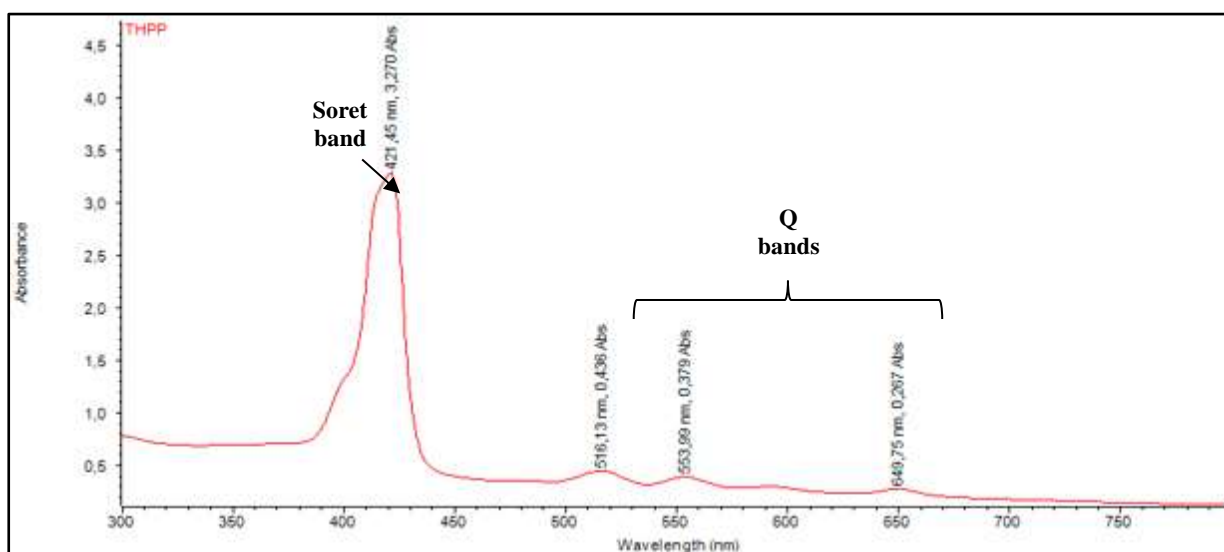
### **Φάσματα TCPF και THPP**

Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο Thermo Scientific Evolution 200. Λαμβάνονται τα παρακάτω φάσματα:



Εικόνα 3.21: Φάσμα UV-Vis πορφυρίνης TCPP.

Η κορυφή απορρόφησης στα ~420,75 nm αποδίδεται στη μετάπτωση  $\pi \rightarrow \pi^*$  ( $a_{1u} \rightarrow eR^*$ ) της TCPP, ενώ οι τέσσερις αδύναμες κορυφές απορρόφησης στα 512, 548, 588 και 645 nm συνδέονται με την  $\pi \rightarrow \pi^*$  ( $a_{2u} \rightarrow eR^*$ ) μετάβαση της TCPP.



Εικόνα 3.22: Φάσμα UV-Vis πορφυρίνης THPP.

Η κορυφή απορρόφησης στα ~421,45 nm αποδίδεται στη μετάπτωση  $\pi \rightarrow \pi^*$  ( $a_{1u} \rightarrow eR^*$ ) της THPP, ενώ οι τέσσερις αδύναμες κορυφές απορρόφησης στα 516, 554, 600 και 650 nm συνδέονται με την  $\pi \rightarrow \pi^*$  ( $a_{2u} \rightarrow eR^*$ ) μετάβαση της THPP.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, για της ζώνες Soret και Q ισχύουν τα ακόλουθα (Πίνακας 3.2):

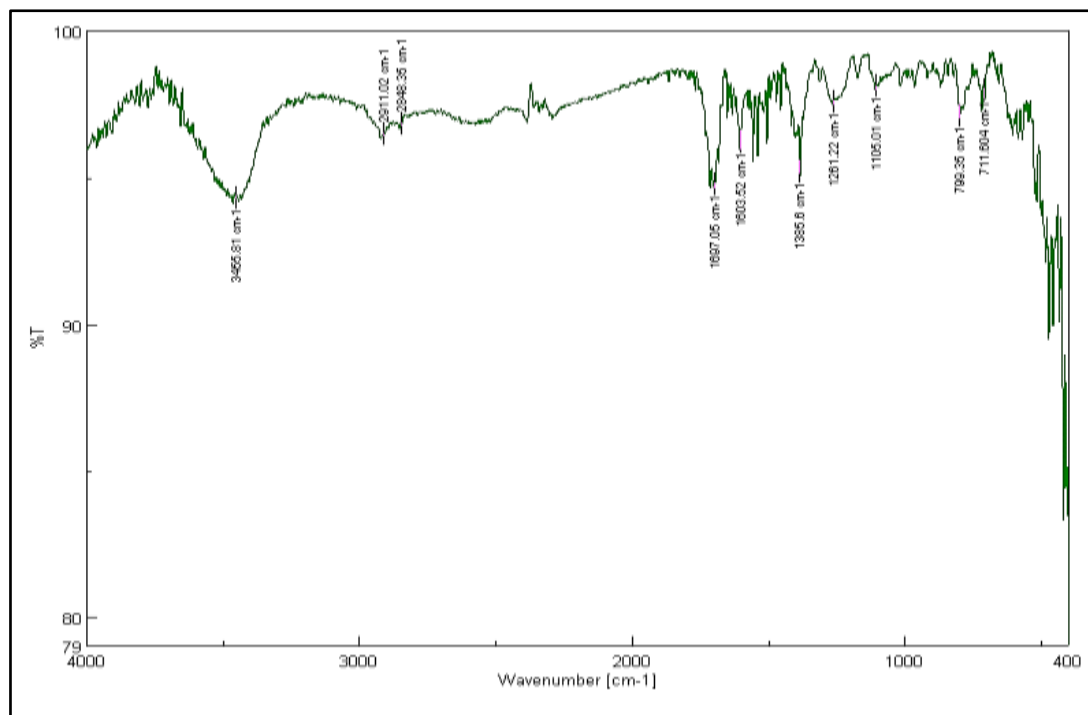
**Πίνακας 3.2: Βιβλιογραφικές τιμές ζωνών Soret και Q των εξεταζόμενων πορφυρινών.**

Πορφυρίνη	Ζώνη Soret (nm)		Ζώνη Q (nm)	
	Πειραματικά προσδιοριζόμενη τιμή	Βιβλιογραφική τιμή [25-26]	Πειραματικά προσδιοριζόμενη τιμή	Βιβλιογραφική τιμή [25-26]
<b>TCPP</b>	420,75	419	512,1	514
<b>THPP</b>	421,45	420	516,1	515

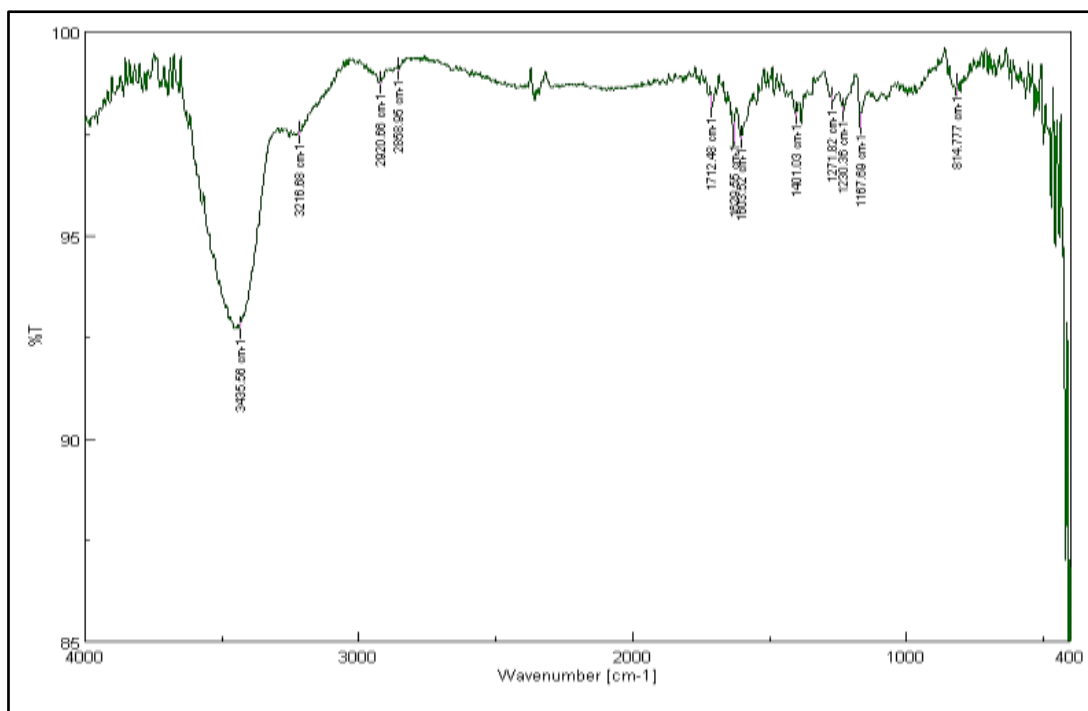
Τα φάσματα φαίνεται ότι έχουν την αναμενόμενη μορφή, καθώς είναι αρκετά κοντά στις βιβλιογραφικές τιμές .

### 3.3.3.2. Φασματοσκοπία FTIR

Οι δομές των πορφυρινών εξετάστηκαν με την συσκευή που αναφέρθηκε παραπάνω χρησιμοποιώντας παστίλιες(pellets) KBr, οι οποίες ως μέσο έχουν διαπερατότητα 100%, για μεγαλύτερη ακρίβεια στο φάσμα 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Έτσι, προέκυψαν τα ακόλουθα φάσματα:



**Εικόνα 3.23: Φάσμα FTIR πορφυρίνης TCPP.**



**Εικόνα 3.24: Φάσμα FTIR πορφυρίνης THPP.**

Όπως προκύπτει βιβλιογραφικά <sup>[27-28]</sup>, οι συχνότητες δόνησης και κάμψης του δεσμού N-H των πορφυρινών ελεύθερης βάσης βρίσκονται κοντά στα  $\sim 3.300\text{ cm}^{-1}$  και  $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ , αντίστοιχα. Οι κορυφές στα  $2.923\sim 3.133\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχίστηκαν στον δεσμό C-H του δακτυλίου βενζολίου και του δακτυλίου πυρρολίου, γεγονός που επιβεβαιώνει τον σχηματισμό του τελικού προϊόντος. Οι ζώνες στα  $1.494\sim 1.682\text{ cm}^{-1}$  και  $1.334\sim 1.352\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχίστηκαν στη δόνηση έκτασης C=C και στη δόνηση έκτασης C=N, αντίστοιχα. Οι κορυφές στα  $800\text{ cm}^{-1}$  και  $\sim 750\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχίστηκαν στη δόνηση κάμψης του δεσμού C-H του παρα-υποκατεστημένου και του ορθο-υποκατεστημένου φαινολικού δακτυλίου.

Για την THPP στο φάσμα απορρόφησης IR σε χαμηλές συχνότητες, εντοπίζονται κορυφές γύρω στα 535, 560, 597, 729, 814 και  $983\text{ cm}^{-1}$ . Οι τρεις πρώτες ζώνες σχετίζονται με την ταλαντευόμενη δόνηση των δεσμών C-H στους δακτυλίους βενζολίου και την παραμόρφωση του δακτυλίου της πορφυρίνης. Οι επόμενες τρεις ζώνες παρατηρούνται και για τις δύο πορφυρίνες και σχετίζονται με την ταλαντευόμενη δόνηση των δεσμών N-H. Έχουν επίσης, πρόσθετα συστατικά που σχετίζονται με την αναπνοή του δακτυλίου πυρρολίου στον δακτύλιο πορφυρίνης. Στα φάσματα απορρόφησης IR παρατηρούνται αρκετά ισχυρές κορυφές, που σχετίζονται με τη δόνηση έκτασης των δεσμών C-C και C=C στους δακτυλίους πορφυρίνης και βενζολίου. Βρίσκονται στα 1465, 1508, 1586 και  $1605\text{ cm}^{-1}$  για την THPP και στα 1473, 1505, 1564 και  $1605\text{ cm}^{-1}$  για την TCPP.

Και για τα δύο δείγματα οι ζώνες στα  $1230\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν στη δόνηση έκτασης του δεσμού C-C μεταξύ του δακτυλίου πορφυρίνης και των ομάδων αρυλίου είναι επίσης ορατές.

Στα  $1381/1358\text{ cm}^{-1}$ ,  $1459/1440\text{ cm}^{-1}$ ,  $1516/1495\text{ cm}^{-1}$ ,  $1544/1545\text{ cm}^{-1}$  και  $1608/1605\text{ cm}^{-1}$  που παρατηρήθηκαν για THPP/TCPP, αντίστοιχα, εντοπίζονται οι κορυφές, που σχετίζονται κυρίως με τη δόνηση έκτασης των δεσμών C-C, C=C και C-N και την ταλαντευόμενη δόνηση των δεσμών CH και NH. Στα φάσματα απορρόφησης IR της THPP παρατηρούνται επιπλέον ζώνες στα  $1169\text{ cm}^{-1}$  και  $1263\text{ cm}^{-1}$ , που σχετίζονται με τη δόνηση κάμψης του C-O-H και τη δόνηση έκτασης των δεσμών C-O.

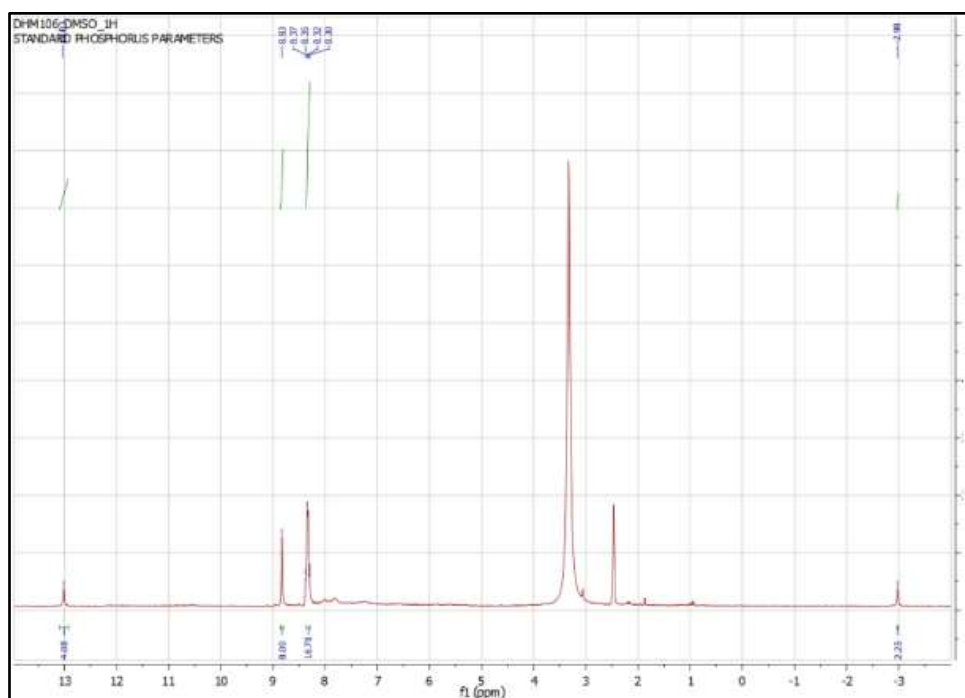
Για την TCPP, η πολύ ισχυρή κορυφή στα  $1691\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στη δόνηση έκτασης του δεσμού C=O στην καρβοξυλική ομάδα. Εκτός από το ότι ορισμένες από τις κορυφές έχουν πρόσθετα στοιχεία. Για παράδειγμα, οι κορυφές στα  $1176$  και  $1220\text{ cm}^{-1}$  σχετίζονται επίσης με τη δόνηση κάμψης των δεσμών C-O-H. Αυτή η δόνηση στις ομάδες αρυλίου επηρεάζει τη θέση και το σχήμα των κορυφών, που σχετίζονται με τη δόνηση στον δακτύλιο της πορφυρίνης. Οι κορυφές που σχετίζονται με τη δόνηση έκτασης των δεσμών C-H και O-H, που βρίσκονται πάνω από τα  $3400\text{ cm}^{-1}$ , φαίνονται έντονα και στα δύο φάσματα και οφείλονται στην ύπαρξη των ομάδων -OH και -COOH στα άκρα των τολουενικών δακτυλίων των THPP και TCPP, αντίστοιχα.

### **3.3.3.3. Φασματοσκοπία NMR**

Η ταυτοποίηση της δομής των πορφυρινών ελέγχθηκε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), μέθοδος αποτελεσματική τόσο για τον προσδιορισμό της δομής, όσο και της καθαρότητας του τελικού προϊόντος.

Οι πορφυρίνες ελεύθερης βάσης έχουν δύο πρωτόνια στο εσωτερικό μέρος του σκελετού. Οι πρώτες πληροφορίες για τον εντοπισμό αυτών των υδρογόνων στο πλαίσιο των τεσσάρων ατόμων αζώτου προήλθαν από κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων X. Ωστόσο, οι περισσότερες από τις πειραματικές παρατηρήσεις που παρουσιάζουν ενδιαφέρον σχετικά με τη μετανάστευση αυτών των δύο υδρογόνων μεταξύ των τεσσάρων αζώτων έχουν ληφθεί από φασματοσκοπία NMR διαλύματος.

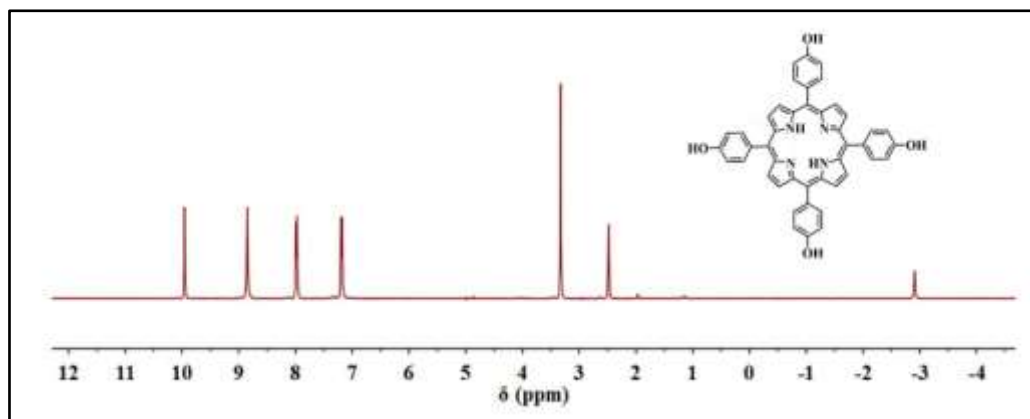
### Φάσμα πορφυρίνης TCP



Εικόνα 3.25:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$  298 K,  $\delta$  [ppm]) 13.14 (4H, br, -COOH), 8.86 (8H, s, Py  $\beta$ -H), 8.38 (16H, dd, phenyl H), -2.93 (2H, s, NH).

Στα -2,98 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια που βρίσκονται στο κέντρο της πορφυρίνης. Μεταξύ 8,30 και 8,37 ppm εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές που ολοκληρώνονται για 8 πρωτόνια η κάθε μία (σύνολο 16), τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των φαινολικών δακτυλίων. Στα 8,83 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για 8 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των πυρολικών δακτυλίων. Τέλος, στα 13,14 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για 4 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των καρβοξυλίων.

### Φάσμα πορφυρίνης THPP



Εικόνα 3.26:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 20°C)  $\delta$ , ppm: 9.97 (s, 4H), 8.86 (s, 8H), 8.00 (d, 8H,  $J = 8.8$  Hz), 7.21 (d, 8H,  $J = 8.4$  Hz), -2.70 (s, 2H, NH).

Στα -2,70 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια που βρίσκονται στο κέντρο της πορφυρίνης. Μεταξύ 8,00 και 7,21 ppm εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές που ολοκληρώνονται για 8 πρωτόνια η κάθε μία (σύνολο 16), τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των φαινολικών δακτυλίων. Στα 8,86 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για 8 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των πυρολικών δακτυλίων. Τέλος, στα 9,97 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για 4 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των υδροξυλίων.

Τόσο από τα γραφήματα  $^1\text{H}$ NMR όσο και βιβλιογραφικά <sup>[19]</sup>, επιβεβαιώνεται η επιτυχής σύνθεση των πορφυρινών TCPP και THPP.

### 3.4. Παρασκευή και χαρακτηρισμός υβριδικών συμπλόκων πορφυρίνης-CQDS

Η συσσωμάτωση και ο διμερισμός των πορφυρινών και των μεταλλοπορφυρινών σε υδατικό διάλυμα έχουν διερευνηθεί ευρέως <sup>[29]</sup> και έχει συναχθεί ότι εξαρτάται αυστηρά από φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως η ιοντική ισχύς, το pH και τη σύνθεση διαλύτη. Ο συνδυασμός αυτών των παραγόντων μπορεί να διευκολύνει τις διαδικασίες συνάθροισης.

Το χαρακτηριστικό του μορίου πορφυρίνης με 22 π-ηλεκτρόνια προκαλεί μια ισχυρή αλληλεπίδραση π-π <sup>[30]</sup>, διευκολύνοντας τον σχηματισμό δύο τύπων δομής: «τύπου H» με βαθοχρωμική μετατόπιση ζωνών Soret και Q και "Τύπος J" με μπλε μετατόπιση της ζώνης Soret και μετατόπιση προς το κόκκινο της ζώνης Q, σε σχέση με αυτές του μονομερούς.

Τα συσσωματώματα J σχηματίζονται με τα μονομερή μόρια διατεταγμένα σε μία διάσταση έτσι ώστε η μεταβατική ροπή των μονομερών να είναι παράλληλη και η γωνία μεταξύ της μεταβατικής ροπής και της γραμμής που ενώνει τα μοριακά κέντρα να είναι μηδέν. Η ισχυρή σύζευξη των μονομερών οδηγεί σε μια συνεκτική διέγερση με μια μετατόπιση κόκκινου σε σχέση με τη ζώνη του μονομερούς.

Τα συσσωματώματα H είναι πάλι μια μονοδιάστατη διάταξη ισχυρά συζευγμένων μονομερών, αλλά οι μεταβατικές ροπές των μονομερών είναι κάθετες (ιδανική περίπτωση) στη γραμμή των κέντρων. Αντίθετα με τα συσσωματώματα J, η διάταξη στα συσσωματώματα H είναι πρόσωπο με πρόσωπο. Η διπολική σύζευξη μεταξύ των μονομερών οδηγεί σε μια μπλε μετατόπιση της ζώνης απορρόφησης. Τα συσσωματώματα H δεν είναι γνωστό ότι έχουν αιχμηρά φάσματα όπως τα J. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά παραδείγματα όπου παρατηρήθηκε η φασματοσκοπική μπλε μετατόπιση, εμφανής για το σχηματισμό συσσωματωμάτων H.

Τα φωτοδιεγερμένα μόρια πορφυρίνης συμπεριφέρονται ως δότες ηλεκτρονίων και τα CQD ως δέκτες και οι μελέτες αλληλεπίδρασης δείχνουν ότι η απόσβεση των παραγώγων



πορφυρίνης λαμβάνει χώρα μέσω ενός συνδυασμένου στατικού και δυναμικού μηχανισμού απόσβεσης στα νανοσύνθετα POR-CQDs.

### 3.4.1. Διαδικασία σύνθεσης συμπλόκων

Για τη δημιουργία των συμπλόκων <sup>[31]</sup>, ποσότητα 60 mg CQDs σε μορφή σκόνης, προστίθενται σε φιαλίδια με 30 mg πορφυρίνης (αναλογία POR:CQDs = 1:2). Στο μίγμα των στερεών, προστίθενται 7,5 mL ακετονιτρίλιου, και εν συνεχεία, τα δείγματα αφήνονται σε υπέρηχο για περίπου 45 min.

Από την ανάμιξη TCPP-CQDs, προκύπτει κοκκινωπό υγρό προϊόν, ενώ από την ανάμιξη THPP-CQDs πρασινωπό προϊόν, που υπόκειται σε φυγοκέντριση (9000rpm, 10 min) .Το στερεό που παραλαμβάνεται από την φυγοκέντριση του εκάστοτε δείγματος, οδηγείται σε ξήρανση για την απομάκρυνση της υγρασίας και την παραλαβή του τελικού υδατοδιαλυτού στερεού προϊόντος.

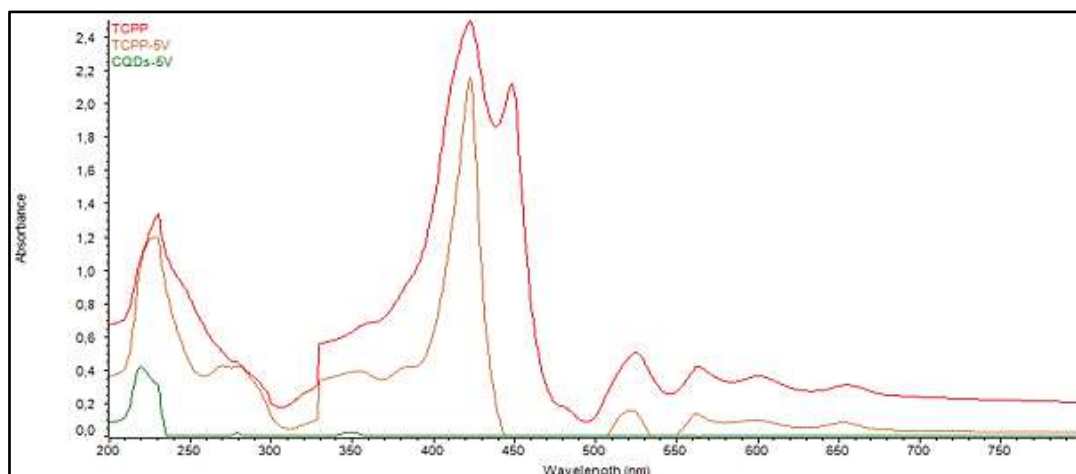


*Εικόνα 3.27: Τα δείγματα των συμπλόκων όπως φαίνονται μετά την σύνθεση με ακετονιτρίλιο:TCPP-CQDs (κόκκινο), THPP-CQDs (πράσινο).*

### 3.4.2. Χαρακτηρισμός-ταυτοποίηση υβριδικών ενώσεων

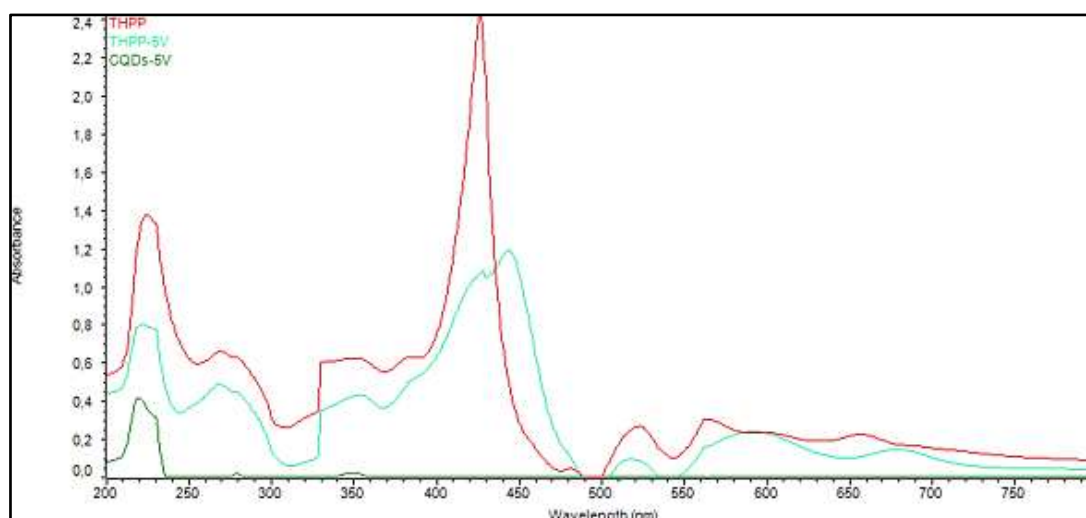
Για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των υβριδικών ενώσεων TCPP-CQDs και THPP-CQDs, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φασματοσκοπίας UV-Vis και FTIR.

### 3.4.2.1. Φασματοσκοπία UV-Vis



Εικόνα 3.28: Συγκενρωτικό φάσμα UV-Vis για TCPP (κόκκινο), CQDs (πράσινο) και TCPP-CQDs (κίτρινο).

Αρχικά, σημειώνεται πως για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης (blank) μίγμα ακετονιτριλίου και νερού, σε αναλογία 3:1. Από την παρατήρηση των φασμάτων, φαίνεται πως στην περίπτωση του σύνθετου TCPP-CQDs, η συνολική απορρόφηση των επιμέρους κορυφών μειώθηκε. Συγκεκριμένα, η χαρακτηριστική κορυφή Soret εμφανίζεται περίπου στο ίδιο μήκος κύματος (από 422,90 nm στα 423,04 nm) με μειωμένη απορρόφηση (από 2,495 στα 2,159, αντίστοιχα), γεγονός που οφείλεται στην παρουσία και πιθανότατα στη σύνδεση της πορφυρίνης με τις CQDs, ενώ φαίνεται πως οι ζώνες Q παρουσιάζουν μειωμένη απορρόφηση με παράλληλες μικρό-μεταβολές στο μήκος κύματος, ενώ μια από τις κορυφές φαίνεται να χάνεται, με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να εμφανίζει 3 ζώνες Q αντί για 4, που διέθετε αρχικά η πορφυρίνη.



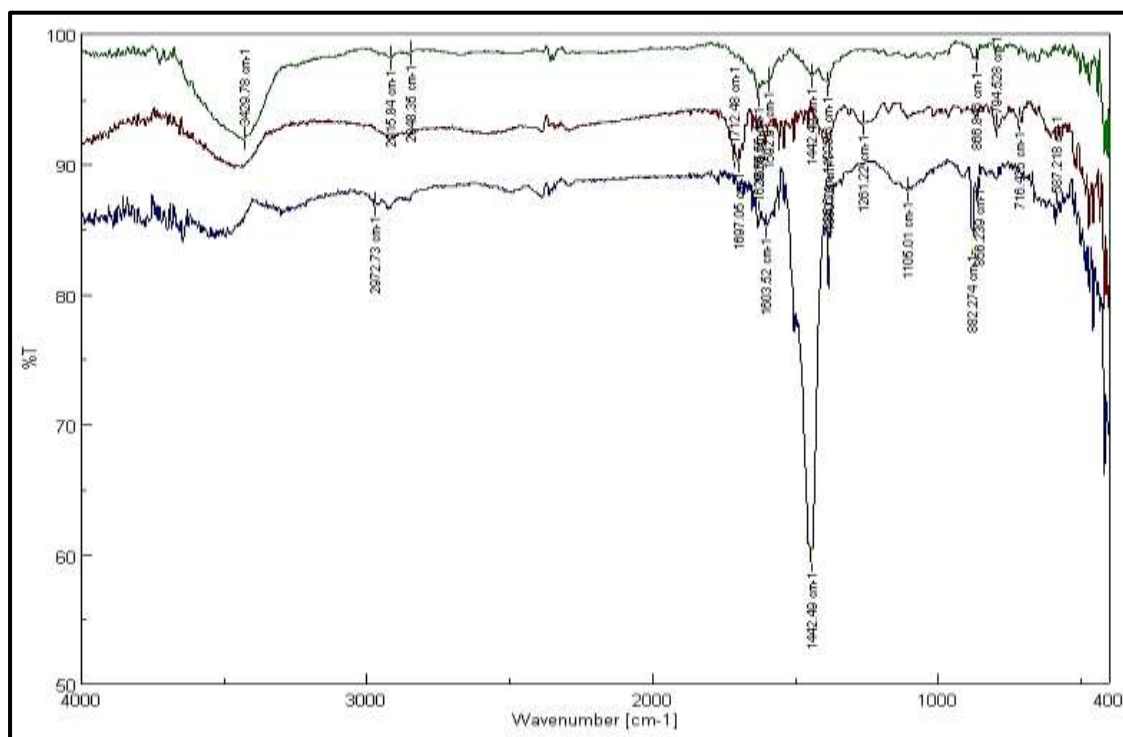
Εικόνα 3.29: Συγκενρωτικό φάσμα UV-Vis για THPP (κόκκινο), CQDs (πράσινο) και THPP-CQDs (κυανό).

Στην περίπτωση του συμπλόκου THPP-CQDs, παρατηρείται πως μαζί με τη μείωση της απορρόφησης, η κορυφή Soret έχει μετατοπισθεί από τα 421,62 nm στα 444,09 nm, ενώ δε χάνεται καμία ζώνη Q. Ακόμη, φαίνεται πως οι κορυφές των ζωνών Q αποκτούν μεγαλύτερο πλάτος με παράλληλες μετακινήσεις στο μήκος κύματος.

Η μείωση απορρόφησης των κορυφών επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά <sup>[31]</sup>, ενώ φαίνεται πως οι CQDs είχαν ισχυρότερη αλληλεπίδραση με την THPP, παρά με την TCPP. Παρόλα αυτά, για την εξακρίβωση της ικανότητας σύνδεσης των πορφυρινών με τις κβαντικές τελείες άνθρακα, απαιτείται πιο εκτενής έλεγχος και χρήση μεθόδων που δίνουν περισσότερες πληροφορίες για τη δομή της τελικής ένωσης, όπως την ύπαρξη καινούργιων δεσμών ή την απουσία δεσμών και ομάδων των μονομερών.

### 3.4.2.2. Φασματομετρία FTIR

Παρακάτω φαίνονται τα συνδυαστικά φάσματα FTIR των κβαντικών τελειών ,πορφυρινών και συμπλόκων:



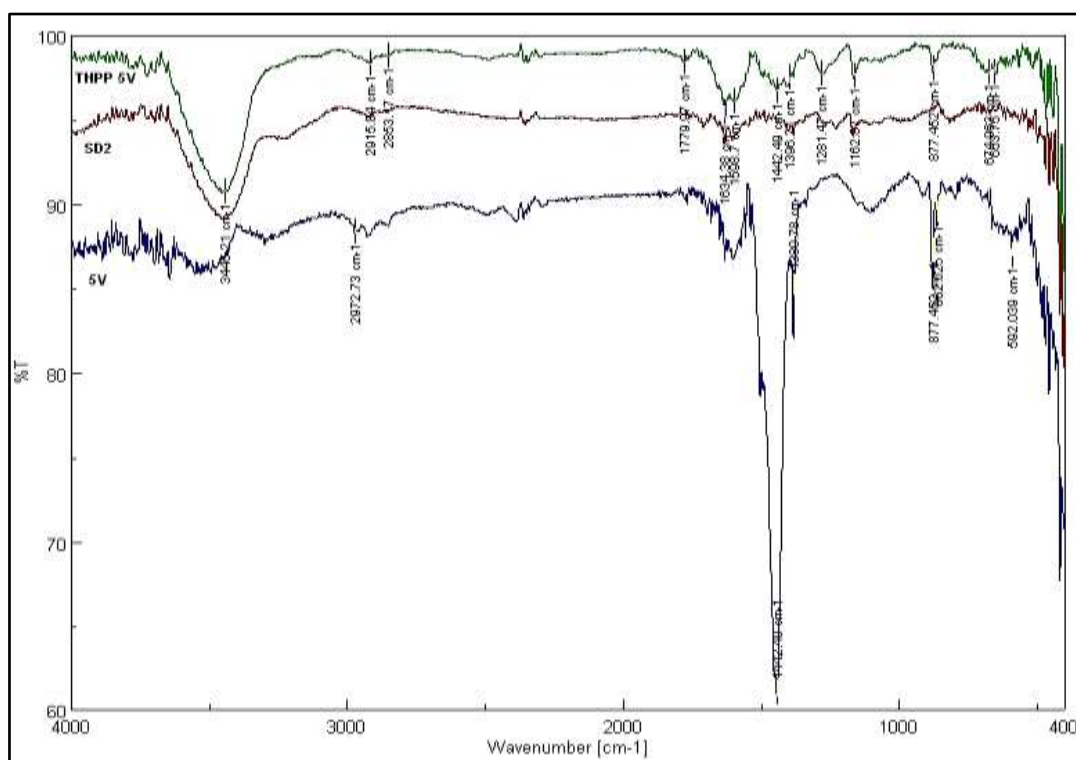
Εικόνα 3.30: Φάσματα FTIR του υβριδικού υλικού (πράσινο), TCPP (κόκκινο), CQDs (μπλε).

Από την παρατήρηση του παραπάνω γραφήματος, σε σύγκριση με αυτά της πορφυρίνης (TCPP) και των CQDs, συμπεραίνονται τα ακόλουθα για την ένωση TCPP-CQDs:

- Αρχικά, σε ό,τι αφορά την πορφυρίνη, παρατηρείται πως οι κορυφές στα  $1261\text{ cm}^{-1}$  και  $1603\text{ cm}^{-1}$ , που σχετίζονται με τους δεσμούς άνθρακα μεταξύ πορφυρίνης-

αρυλομάδων, καθώς και σε έκταση των διπλών δεσμών άνθρακα ή κάμψη δεσμών C-N αντίστοιχα, χάνονται εντελώς.

- Παράλληλα, φαίνεται πως οι κορυφές των κβαντικών τελειών στα  $1442\text{ cm}^{-1}$  και  $1390\text{ cm}^{-1}$  μειώνονται αισθητά, ενώ η κορυφή στα  $1608\text{ cm}^{-1}$ , που οφείλεται στους διπλούς δεσμούς C=C στον σκελετικό δακτύλιο των CQDs, συμπίπτει με τις κορυφές τάνυσης των δεσμών C=C των πορφυρινών, πιθανότατα λόγω ανταλλαγής ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο διαφορετικών οργανικών μορίων. Οι κορυφές αυτές μπορεί να οφείλονται επίσης σε διπλούς δεσμούς άνθρακα και ομάδες C–O ή C–N στην επιφάνεια των CQDs.



Εικόνα 3.31: Φάσματα FTIR για το υβριδικού υλικού (πράσινο), THPP (κόκκινο), CQDs (μπλε).

Από την παρατήρηση του παραπάνω γραφήματος, σε σύγκριση με αυτά της πορφυρίνης (THPP) και των CQDs, συμπεραίνονται τα ακόλουθα για την ένωση THPP-CQDs:

- Οι κορυφές της πορφυρίνης (THPP) στα  $814\text{ cm}^{-1}$ ,  $1230\text{ cm}^{-1}$  και  $1401\text{ cm}^{-1}$ , που σχετίζονται με τις ταλαντευόμενες δονήσεις των δεσμών N-H, τους δεσμούς άνθρακα μεταξύ πορφυρινικού και αρυλικού δακτυλίου και έκταση ή περιστροφή δεσμών C-C και C-H αντίστοιχα, χάνονται εντελώς.
- Παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση αισθητή μείωση της έντασης των κορυφών των CQDs στα  $1442\text{ cm}^{-1}$  και  $1390\text{ cm}^{-1}$ .

Συγκεντρωτικά, φαίνεται ότι τόσο στην πορφυρίνη TCPP, όσο και στην πορφυρίνη THPP, οι ομάδες άνθρακα και αζώτου του πορφυρινικού και του αρυλικού δακτυλίου, αλληλεπιδρούν

με τις ομάδες C-O-C, -COOH και -C=C-, που βρίσκονται στην επιφάνεια των CQDs. Σημειώνεται, επίσης, ότι στην περιοχή πάνω από  $3000\text{ cm}^{-1}$ , εντοπίζονται οι κορυφές που σχετίζονται με τη δόνηση τάνυσης των δεσμών C-H και O-H, ενώ παρατηρούνται ευδιάκριτες μεταβολές. Στις υβριδικές δομές, οι κορυφές είναι πιο διακριτές. Η κορυφή που σχετίζεται με τη δόνηση O-H μετατοπίζεται έντονα, ακόμη και κατά περίπου  $10\text{-}20\text{ cm}^{-1}$ , και παρατηρείται σε  $3445\text{ cm}^{-1}$  και  $3434\text{ cm}^{-1}$  στα THPP-CQDs και TCPP-CQDs, αντίστοιχα.

Στα φάσματα των THPP-CQDs και TCPP-CQDs, η κορυφή στα  $2915\text{ cm}^{-1}$  περίπου, αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική ζώνη τάνυσης  $sp^3$  C-H. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πιθανότατα ότι τα μόρια THPP και TCPP έχουν συνδεθεί μη ομοιοπολικά με τις κβαντικές τελείες άνθρακα, οι οποίες διατηρούν τις βασικές κορυφές δόνησής τους, με στοιβαξη π-π και με παρόμοιο τρόπο, όπως τα συσσωματώματα πορφυρινών J, για τα οποία έγινε αναφορά παραπάνω <sup>[28,32]</sup>.

### 3.4.3. Μελέτη μηχανισμού παραγωγής ROS υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας

Η ροδαμίνη 6G (Rh6G) ή αλλιώς ροδαμίνη 590 είναι μία από τις φθορίζουσες οργανικές βαφές, που ανήκει στην κατηγορία των χρωστικών ξανθάνης. Στην ουσία αυτή, η ομάδα του φαινυλίου υποκαθιστά το R στον κύριο δακτύλιο της ξανθάνης. Η ροδαμίνη 6G αποτελεί μια χάλκινη/κόκκινη σκόνη, με χημικό τύπο  $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ , που έχει ως κατιόν το ιόν χλωρίου. Αν και εξαιρετικά διαλυτή, η ουσία αυτή είναι πολύ διαβρωτική, σε σύγκριση με άλλες βαφές για όλα τα μέταλλα, εκτός από τον ανοξειδωτο χάλυβα, ενώ η παρουσία της στο οικοσύστημα προκαλεί αισθητική ρύπανση, ευτροφισμό και διαταραχές στην υδρόβια ζωή <sup>[33]</sup>.

Η απορρόφηση του διαλύματος Rh6G αυξάνεται γραμμικά από 0,1 σε 30  $\mu\text{M}$  και υπακούει στο νόμο Beer-Lambert, ενώ πέρα από τα 30  $\mu\text{M}$ , το φάσμα απορρόφησης έχει συνεισφορές από τα διμερή και τη συσσωμάτωση των μορίων που οδηγεί σε συγκέντρωση, που εξαρτάται από τις διατομές απορρόφησης με αποτέλεσμα, η απορρόφηση να αποκλίνει από τον νόμο Beer-Lambert και να μην ενισχύεται γραμμικά <sup>[34]</sup>. Σημειώνεται πως ο ρύπος αντιδρά έντονα με ρίζες οξυγόνου και καταναλώνεται.

Στην παρούσα διπλωματική, η συγκέντρωση του διαλύματος ρύπου, που παρασκευάζεται και χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή όλων των φωτοκαταλυτικών πειραματικών μετρήσεων που διεξάγονται, είναι 3  $\text{mg/L}$  ή 6  $\mu\text{M}$ . Πιο συγκεκριμένα, κάθε φορά πριν την έναρξη των φωτοκαταλυτικών δοκιμών, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα της ροδαμίνης 6G με τη χρήση του αναλυτικού ζυγού ακριβείας, και στην συνέχεια, διαλυτοποιείται σε 250 mL απιονισμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση για 1 h. Ακολούθως, το διάλυμα του ρύπου τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο (bubbler) (Εικόνα 3.32), προκειμένου να πραγματοποιηθεί οξυγόνωσή του με υπερκάθαρο αέριο  $O_2$  για 30 min περίπου υπό σκοτάδι.



*Εικόνα 3.32: Παρασκευή διαλύματος ρύπου ροδαμίνης 6G συγκέντρωσης 3ppm.*

Έπειτα, ζυγίζονται 2 mg της εκάστοτε προς μελέτη ουσίας (TCPP-CQDs, THPP-CQDs, TCPP, THPP, CQDs). Ακολούθως, η εκάστοτε εξεταζόμενη ουσία, μαζί με 5 mL ρύπου εισάγεται σε ειδικά γυάλινα δοχεία-κυψελίδες, εσωτερικής διαμέτρου 4cm και συνολικής χωρητικότητας 30 mL, οι οποίες είναι κατασκευασμένες από γυαλί τύπου Pyrex και δεν απορροφούν ακτινοβολία υψηλότερη των 320 nm.

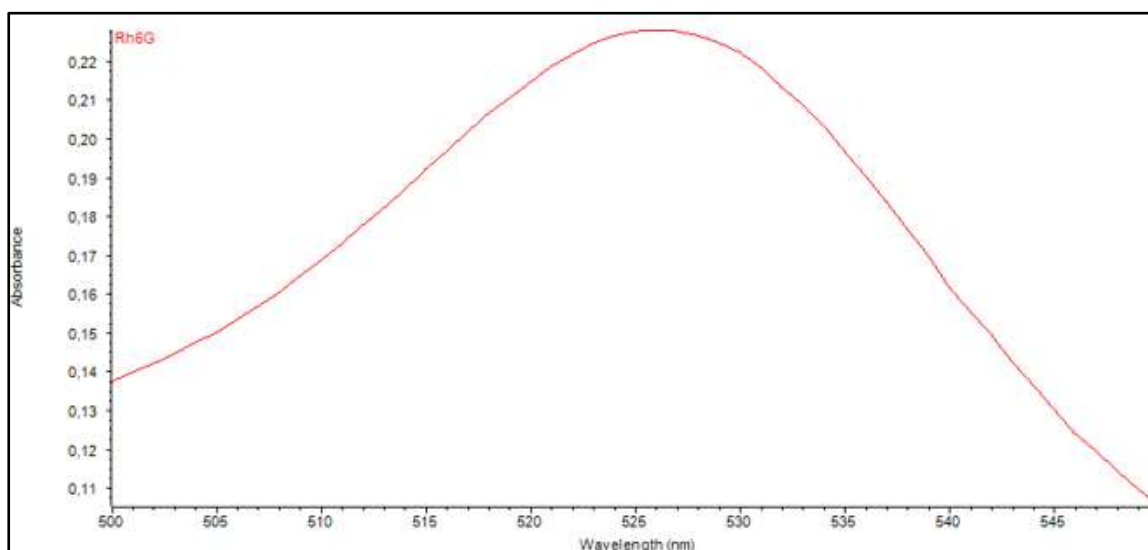


*Εικόνα 3.33: Pyrex κυψελίδες φωτοκατάλυσης.*

Οι κυψελίδες τοποθετούνται έπειτα στο εσωτερικό του φωτοαντιδραστήρα, ο οποίος διαθέτει 4 λαμπτήρες LED cool daylight 15W της εταιρίας OSRAM, και ενεργοποιείται η συσκευή της μαγνητικής ανάδευσης ώστε το εσωτερικό των κυψελίδων να βρίσκεται υπό ανάδευση καθόλη την διάρκεια της ακτινοβολήσης.

Κάθε 15 min, οι κυψελίδες αφαιρούνται από τον αντιδραστήρα, με σκοπό τη μέτρηση της συγκέντρωσης του ρύπου. Το περιεχόμενο διάλυμα, που ενδεχομένως περιλαμβάνει τον μερικώς διαλυτό ή αδιάλυτο στο νερό καταλύτη σε μορφή σκόνης, οδηγείται στη συσκευή φυγοκέντρησης NEYA-16 στα 9000 rpm για 10 min, ώστε να γίνει διαχωρισμός των δυο φάσεων. Έπειτα, με χρήση πιπέτας παραλαμβάνεται δείγμα του διαλύματος και εισάγεται σε ειδικές κυψελίδες χαλαζία για την μέτρηση της απορρόφησης.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της απορρόφησης πραγματοποιείται μέτρηση με την χρήση του φασματόμετρου UV-Vis Thermo Scientific Evolution 200, ενώ η κυψελίδα που χρησιμοποιείται καθαρίζεται κάθε φορά για την χρήση της στην επόμενη μέτρηση. Σημειώνεται πως για τη μέτρηση της φωτοσταθερότητας της ροδαμίνης 6G υπό την εκάστοτε ακτινοβολία, ακολουθείται η ανωτέρω διαδικασία, χωρίς το στάδιο εισαγωγής του φωτοκαταλύτη, και συνεπώς και την ανάγκη για φυγοκέντριση του διαλύματος. Τα πειράματα μέτρησης απορρόφησης επαναλήφθηκαν για τρεις κύκλους. Ακολούθως, λαμβάνεται το φάσμα UV-Vis για τον εξεταζόμενο ρύπο (Rh6G):



*Εικόνα 3.34: Καμπύλη απορρόφησης αραιωμένης ροδαμίνης (Rh6G) σε νερό.*

Στη συνέχεια, ελέγχεται η φωτόλυση του ρύπου υπό την επίδραση της ορατής ακτινοβολίας. Έτσι, σε κυψελίδα προστίθενται 5 mL ροδαμίνης, χωρίς την προσθήκη πορφυρινικών συμπλόκων ή νανοσωματιδίων.

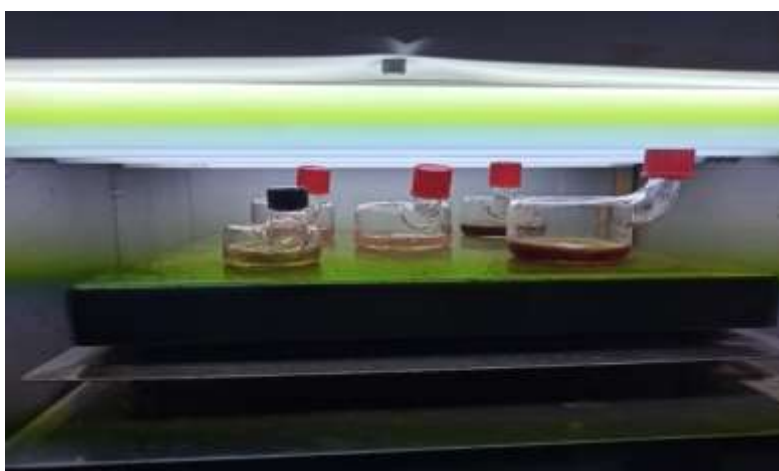
*Πίνακας 3.3: Τιμές απορρόφησης για την φωτόλυση της ροδαμίνης υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας.*

<b>Time (min)</b>	0	15	30	45	60
<b>Απορρόφηση ροδαμίνης (ABS)</b>	0,257	0,252	0,25	0,24	0,218
<b>Απόδοση (yield %)</b>	<b>15,18</b>				

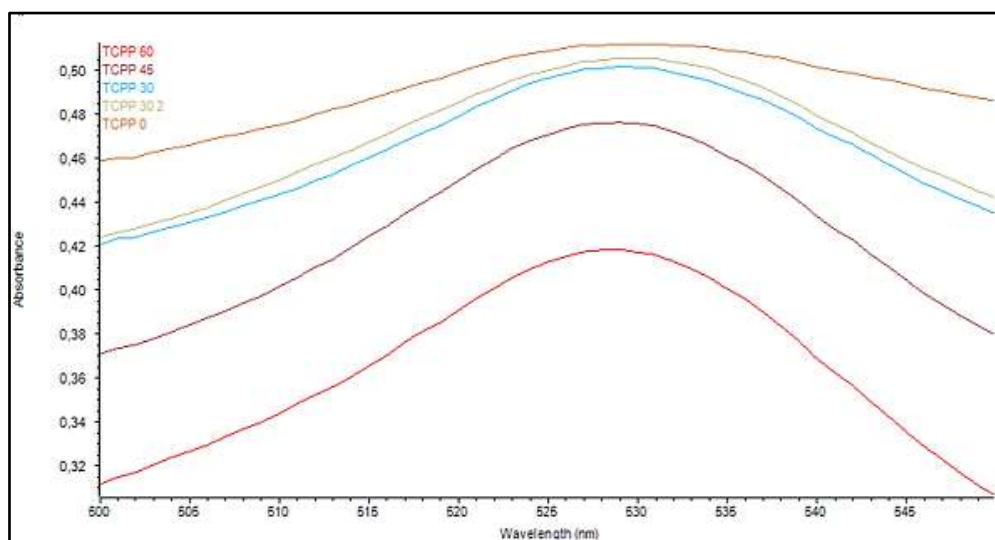
Σκοπός της προαναφερόμενης διαδικασίας είναι η ανίχνευση των παραγόμενων ROS, η οποία διαπιστώνεται με τη μείωση της απορρόφησης της χαρακτηριστικής καμπύλης του ρύπου στα 525,97 nm, αποδεικνύοντας έτσι την κατανάλωση του ρύπου από τις παραγόμενες ρίζες οξυγόνου.

Αρχικά, οι παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται για τις απλές πορφυρίνες TCPP, THPP και τα CQDs σε όμοιες ποσότητες, ενώ στην συνέχεια γίνεται το ίδιο για τις υβριδικές ενώσεις TCPP-CQDs, THPP-CQDs και γίνεται σύγκριση.

Επισημαίνεται πως επειδή οι δύο πορφυρίνες έχουν διαφορετική πολικότητα εξαιτίας διαφορετικών υποκαταστατών στα άκρα, η διαλυτότητά τους στον υδατικό ρύπο διαφέρει [35].

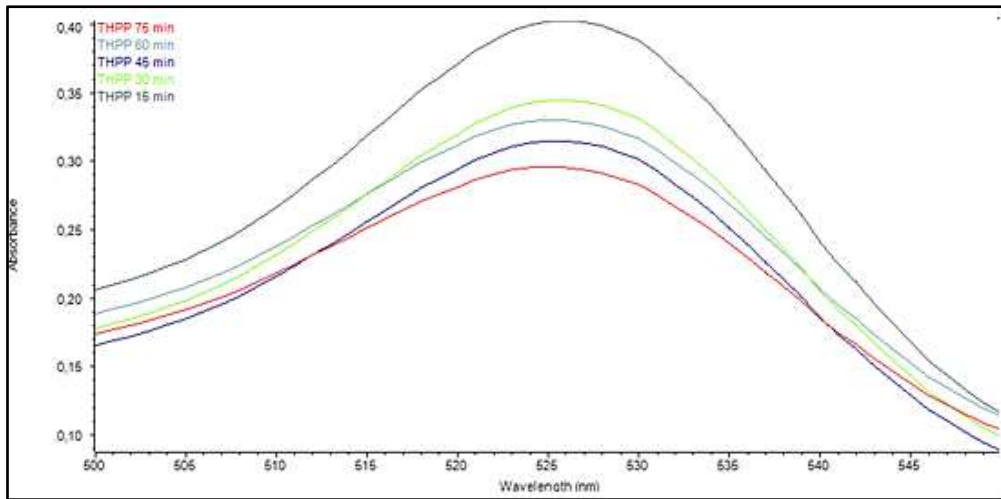


**Εικόνα 3.35:** Τα δείγματα 2 mg TCPP (γκρι), THPP (ροζ), CQDS (ροζ), TCPP-CQDS (κόκκινο), THPP-CQDS (πράσινο) σε 5 mL Rh6G, εντός του φωτοαντιδραστήρα υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας.

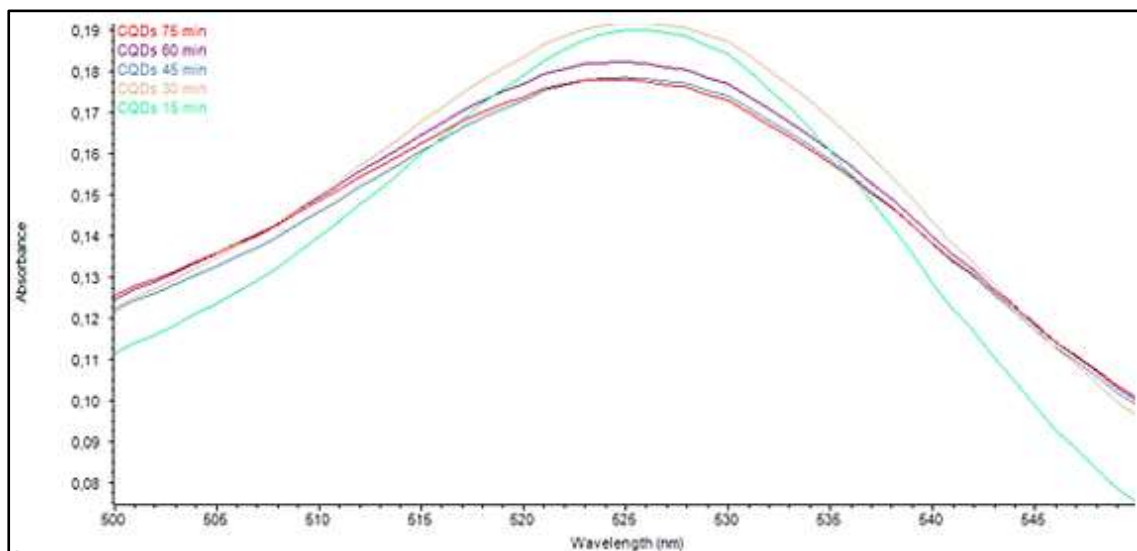


**Εικόνα 3.36:** Φάσμα UV-Vis για δείγματα TCPP-ρύπου κάτω από ορατό φως για 60 min.





Εικόνα 3.37: Φάσμα UV-Vis για δείγματα THPP-ρύπου κάτω από ορατό φως για 60 min.

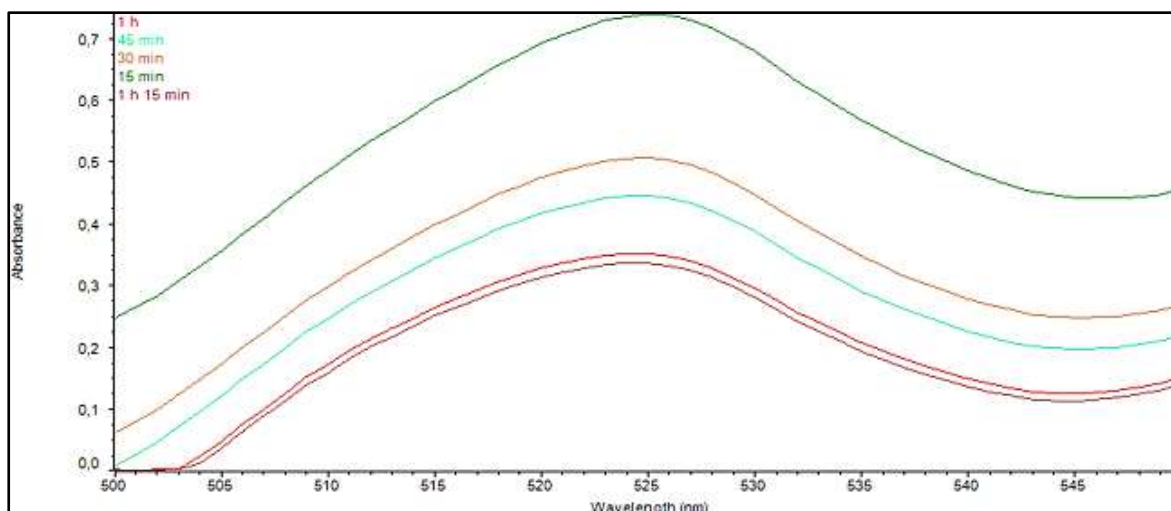


Εικόνα 3.38: Φάσμα UV-Vis για δείγματα CQDs-ρύπου κάτω από ορατό φως για 60 min.

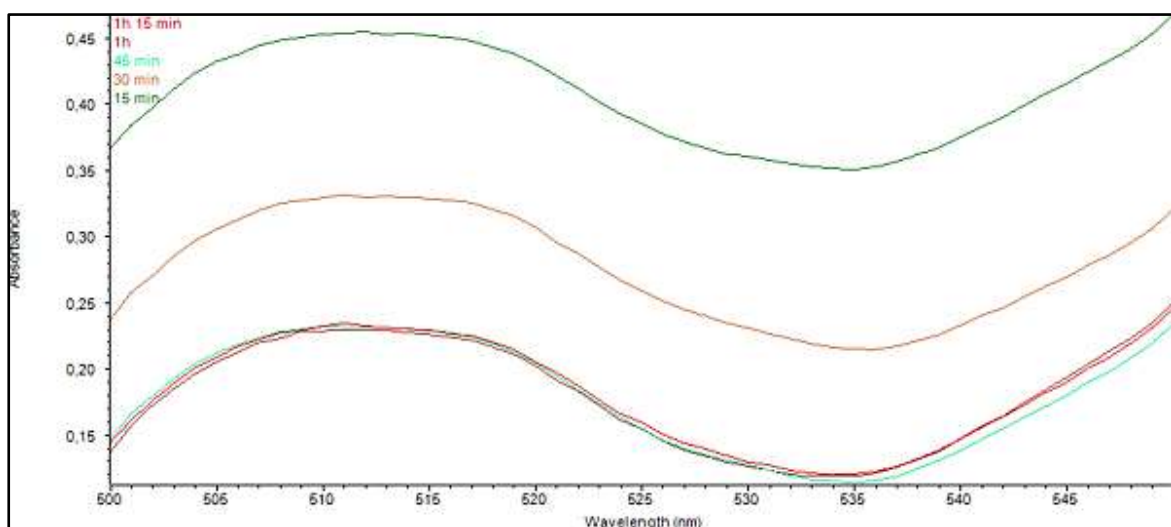
Πίνακας 3.4: Συγκεντρωτικός πίνακας απορροφήσεων πορφυρίνης-ρύπου, κβαντικών τελειών-ρύπου για ανίχνευση ROS σε ορατό φως.

Χρόνος (min)	0	15	30	45	60
Απορρόφηση THPP-Rh6G	0,403	0,345	0,315	0,316	0,296
Απορρόφηση CQDs-Rh6G	0,192	0,181	0,175	0,168	0,161
Απορρόφηση TCPP-Rh6G	0,512	0,498	0,468	0,430	0,396

Από τη λήψη των μετρήσεων, φαίνεται πως στο πέρας των 60 min η THPP παράγει ποσότητα ROS, που οδηγεί σε μείωση της απορρόφησης του ρύπου κατά 26,55%, στην περίπτωση της TCPP η μείωση αυτή ισούται με 22,65%, ενώ η απορρόφηση του ρύπου παρουσία των CQDs, παραμένει σε ένα σχετικά στενό εύρος τιμών, σημειώνοντας μείωση της τάξης του 16,14%. Επομένως, η δράση των ROS οφείλεται εξ'ολοκλήρου στην παρουσία των πορφυρινών [36]. Τα αποτελέσματα για τα υβριδικά σύμπλοκα παρουσιάζονται στις εικόνες που ακολουθούν:



*Εικόνα 3.39: Φάσμα UV-Vis για ανίχνευση ROS για το υβριδικό TCPP-CQDs κάτω από λάμπα ορατού φωτός.*



*Εικόνα 3.40: Φάσμα UV-Vis για ανίχνευση ROS για το υβριδικό THPP-CQDs κάτω από λάμπα ορατού φωτός.*

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες, επιβεβαιώνεται η εκπομπή των δραστικών ειδών οξυγόνου ROS. Το μήκος του φάσματος όπου έγινε εστίαση ήταν από 500 έως 550 nm ώστε

να είναι ευδιάκριτες οι μεταβολές της καμπύλης απορρόφησης του ρύπου ,από την στιγμή που οι Soret και Q-bands απορροφούν πιο έντονα σε σχέση με τον ρύπο.

**Πίνακας 3.5: Συγκεντρωτικός πίνακας απορροφήσεων υβριδικών-ρύπου για ανίχνευση ROS σε ορατό φως.**

<i>Χρόνος (min)</i>	0	15	30	45	60
<i>Απορρόφηση TCPP-CQDs-Rh6G</i>	0,74	0,51	0,45	0,35	0,34
<i>Απορρόφηση THPP-CQDs-Rh6G</i>	0,45	0,33	0,23	0,22	0,20

Με βάση τον παραπάνω συγκεντρωτικό πίνακα φαίνεται πως η υβριδική ένωση TCPP-CQDs καταφέρνει να μειώσει την απορρόφηση του ρύπου κατά 54,05% σε χρονικό διάστημα 45 min και μετά σταθεροποιείται, ενώ το υβριδικό THPP-CQDs μειώνει την απορρόφηση κατά 55,56% σε διάστημα 45 min και μετά σταθεροποιείται. Ενώ και στις δύο περιπτώσεις, φαίνεται πως η διαλυτοποίηση των TCPP-CQDs, THPP-CQDs μέσα στον ρύπο, αρχικά επιφέρει αύξηση της πρωταρχικής απορρόφησης του ρύπου, και επιπλέον, μετακινεί την καμπύλη απορρόφησης της ροδαμίνης από τα 530,25 nm στα 524,54 nm και 511,05 nm, αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, λοιπόν, η συσσωμάτωση των πορφυρινών στις κβαντικές τελείες βελτιώνει την υδατοδιαλυτότητα του τελικού προϊόντος και ευνοεί την παραγωγή ROS σε συγκεκριμένο χρονικό εύρος, όπως αποδεικνύεται από την αύξηση της απόδοσης μείωσης απορρόφησης του ρύπου από το 26,55% στο 55,56% στην περίπτωση των προϊόντων THPP και από το 24,80% στο 54,05% για τα προϊόντα TCPP.

### 3.5. Μελέτη κινητικής αποδόμησης ρύπου από σύμπλοκες ενώσεις

Για την επεξεργασία των παραπάνω φασμάτων για κάθε φωτοκαταλύτη (CQDs, THPP, TCPP, THPP-CQDs, TCPP-CQDs) καταγράφονται οι μετρήσεις απορρόφησης και υπολογίζεται η μέση τιμή των τριών επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε πειραματικό κύκλο. Επίσης, με βάση τον παρακάτω τύπο (Εξίσωση 3.1) υπολογίζεται η τυπική απόκλιση  $\delta x$  των μετρήσεων  $x_i$  από την μέση τιμή  $\bar{x}$ , για ρυθμό επαναλήψεων  $n=3$ .

$$\delta x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} \quad (3.1)$$

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων βασίζεται στον νόμο του Beer-Lambert, που αναφέρει πως η απορροφητικότητα ενός διαλύματος είναι ευθέως ανάλογη με την συγκέντρωση της απορροφητικής ουσίας του διαλύματος και που η αναλυτική του μορφή δίνεται στην παρακάτω εξίσωση <sup>[37]</sup>:

$$A = -\log(T) = \varepsilon * l * C \quad (3.2)$$

όπου:

- A είναι η απορροφητικότητα,
- T είναι η διαπερατότητα,
- L είναι η απόσταση που διανύει η ακτινοβολία μέσα στο δείγμα,
- C είναι η συγκέντρωση της ουσίας, και
- ε είναι σταθερά μοριακής απορροφητικότητας για συγκεκριμένη πίεση και θερμοκρασία.

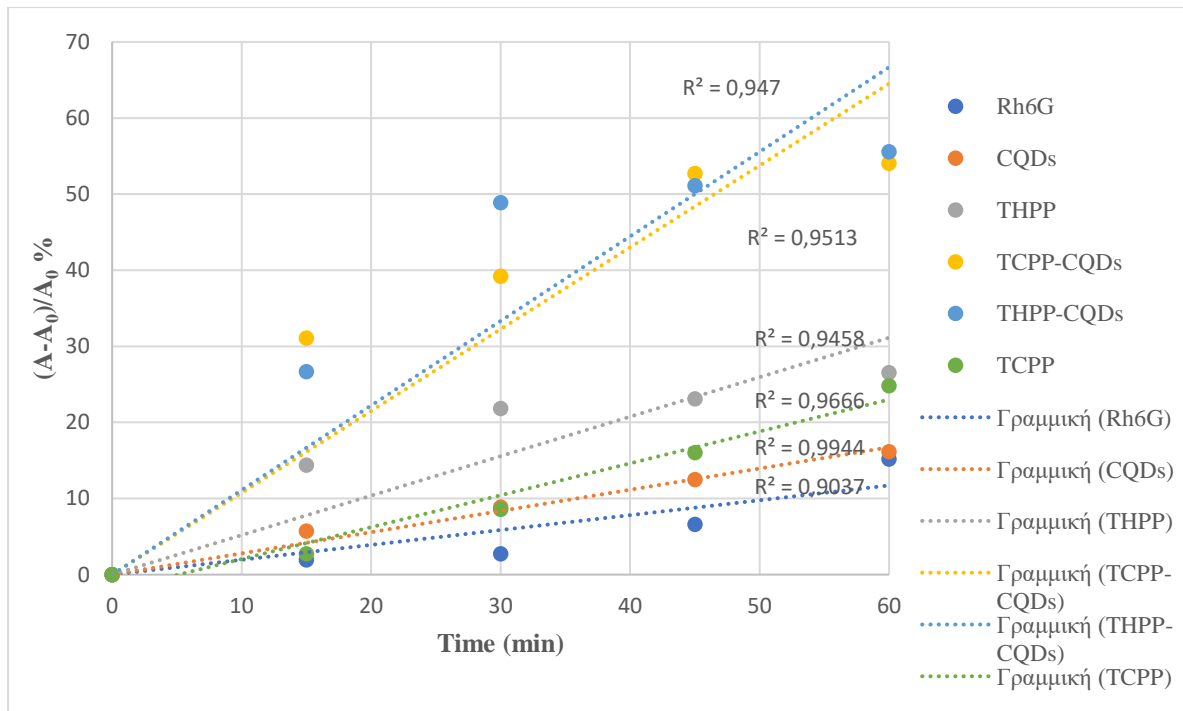
Με βάση το νόμο αυτό, υπολογίζεται αρχικά το ποσοστό φωτόλυσης που εμφανίζει ο ρύπος, και ακολούθως, ο βαθμός αποδόμησης του ρύπου, που οφείλεται στη φωτοκαταλυτική δράση των στερεών δειγμάτων CQDs, TCPP, THPP, TCPP-CQDs, THPP-CQDs, που χρησιμοποιήθηκαν:

$$\text{Απόδοση φωτοκατάλυσης (\%)} = \frac{C - C_0}{C_0} \% = \frac{A - A_0}{A_0} \% \quad (3.3)$$

όπου:

- C<sub>0</sub> είναι η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος ροδαμίνης 6G,
- C είναι η τελική συγκέντρωση του διαλύματος ροδαμίνης 6G,
- A<sub>0</sub> είναι η αρχική απορρόφηση του διαλύματος ροδαμίνης 6G, και
- A είναι η τελική απορρόφηση του διαλύματος ροδαμίνης 6G.

Παρακάτω, παρουσιάζεται γραφικά η αποδόμηση του ρύπου ροδαμίνης 6G στη διάρκεια διαστήματος 1 h, με σκοπό την ποιοτική παρατήρηση της ικανότητας εκπομπής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) των φωτοκαταλυτών, που επακόλουθα αποδομούν τον ρύπο, όπως αναφέρεται και βιβλιογραφικά <sup>[38]</sup>.



**Εικόνα 3.41:** Διάγραμμα απόδοσης φωτοκαταλυτικής αποδόμησης του ρύπου ροδαμίνη 6G με την χρήση 2 mg κάθε φορά των συγκεκριμένων φωτοευαίσθητοποιητών ή νανοσωματιδίων.

Όπως υπολογίστηκε και παραπάνω, η φωτόλυση της ροδαμίνης 6G οδηγεί σε ποσοστό μείωσης της απορρόφησης του ρύπου, επακόλουθα και της συγκέντρωσης, ίσο με 15,17 % σε χρονικό διάστημα 1 h .

Παρατηρήθηκε πως το σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων (CQDs-πορτοκαλί), πορφυρίνες (TCPP-πράσινη, THPP-γκρι) και σύμπλοκα (TCPP/CQDs-κίτρινο, THPP/CQDs-γαλάζιο), βελτιώνουν την απόδοση αποδόμησης του ρύπου. Συγκεκριμένα, οι κβαντικές τελείες (CQDs-πορτοκαλί) φαίνεται να αυξάνουν το ποσοστό αποδόμησης μόλις κατά 1% περίπου, γεγονός που δικαιολογείται από το φάσμα UV-Vis, όπου φαίνεται ότι απορροφούν κυρίως στο υπεριώδες. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη δραστικών ριζών οξυγόνου οφείλεται κατά κύριο λόγο στις πορφυρίνες και τα υδατοδιαλυτά σύμπλοκα, που σχηματίζουν με τις CQDs.

Σε ό,τι αφορά τις πορφυρίνες, η TCPP αυξάνει το ποσοστό αποδόμησης στο 24,80% και η THPP στο 26,55 % σε χρονικό διάστημα 1 h. Κατά τη διαλυτοποίηση των πορφυρινών στο ρύπο, παρατηρήθηκε πως η TCPP παρουσίασε ελαφρώς βελτιωμένη διαλυτότητα στο υδατικό διάλυμα ροδαμίνης 6G, αποδίδοντας μαύρη χρώση στο διάλυμα, σε αντίθεση με την THPP, η οποία εμφάνισε μειωμένη διαλυτότητα στο ίδιο διάλυμα.

Τέλος, τα σύμπλοκα πορφυρινών-κβαντικών τελειών άνθρακα, βελτιώνουν τόσο την υδατοδιαλυτότητα των πορφυρινών, όσο και την απορρόφηση των τελειών στο ορατό φάσμα, καθώς εμφανίζουν απόδοση αποδόμησης 54,05% και 55,56%, αντίστοιχα, στη διάρκεια 1 h.

Επομένως, σημειώθηκε αύξηση του ποσοστού αποδόμησης κατά περίπου 40%, σε σύγκριση με τις CQDs, και κατά 19-29% κατά μέσο όρο, συγκριτικά με τα δείγματα των πορφυρινών.

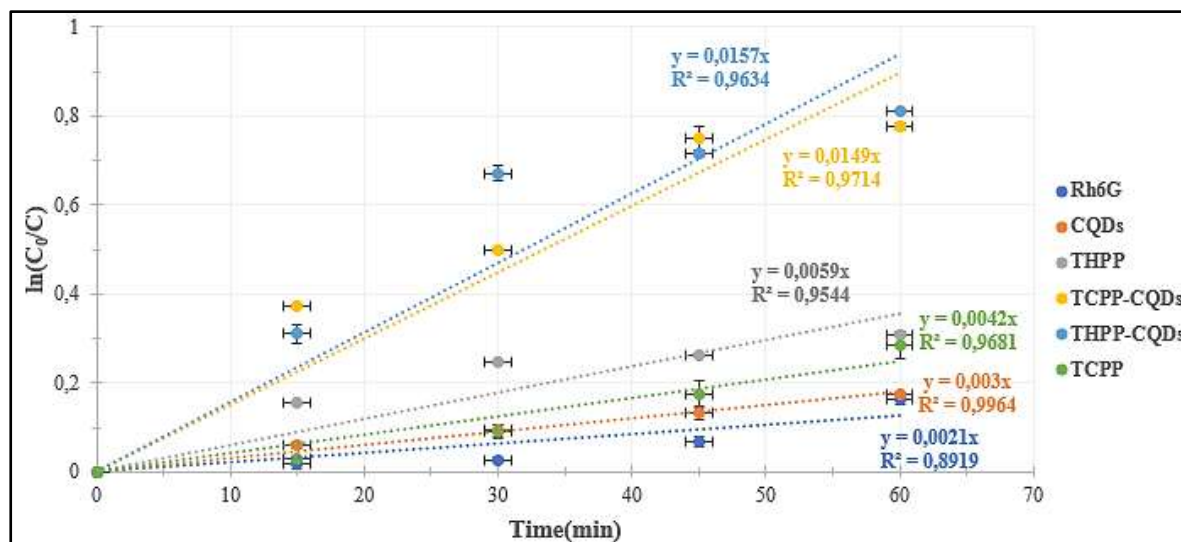
Ακολούθως, προσδιορίζεται η κινητική της φωτοκαταλυτικής αποδόμησης του υγρού οργανικού ρύπου, με βάση το μοντέλο Langmuir-Hinshelwood, που αποτελεί ένα από τα επικρατέστερα μοντέλα [39]. Για πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, η κινητική της αντίδρασης περιγράφεται από την εξίσωση (Εξίσωση 3.4):

$$r = -dC/dt = k_{LH} * K_L * C_{eq} = k_{app} * C_{eq} \quad (3.4)$$

Από την ανωτέρω εξίσωση προκύπτει η εξίσωση 3.5, σύμφωνα με την οποία υπολογίζονται οι φαινόμενες σταθερές κινητικής  $k_{app}$  της φωτοκατάλυσης, που λαμβάνει χώρα με την προσθήκη των καταλυτών.

$$\ln(C_0/C) = k_{app} * t \quad (3.5)$$

Έτσι, αναπαρίσταται σε διάγραμμα η μεταβολή του νεπέριου λογαρίθμου του λόγου της αρχικής συγκέντρωσης προς την τελική για κάθε χρονική στιγμή, συναρτήσει του χρόνου (Εικόνα 3.42). Με βάση τη γραμμική εξάρτηση και την κλίση της βέλτιστης ευθείας, προκύπτει η εκάστοτε σταθερά κινητικής ( $k_{app}$ ) κάθε φωτοκαταλυτικής διεργασίας (Πίνακας 3-6).



Εικόνα 3.42: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωτόλυσης του ρύπου ροδαμίνης 6G και της φωτοκαταλυτικής αποδόμησης με χρήση των CQDs, THPP, THPP-CQDs, TCPP, TCPP-CQDs.

Πίνακας 3.6: Συγκεντρωτικός πίνακας φαινομενικών κινητικών σταθερών  $k_{app}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) για την φωτοκατάλυση του ρύπου ροδαμίνης 6G υπό ορατή ακτινοβολία παρουσία και μη των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Δείγμα	Φαινόμενη σταθερά φωτοκατάλυσης ( $K_{app}$ , $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
<b>Rh6G</b>	$2,10\text{E-}03 \pm 2,75\text{E-}04$	0,8929
<b>CQDs</b>	$3,00\text{E-}03 \pm 5,05\text{E-}05$	0,9964
<b>THPP</b>	$5,90\text{E-}03 \pm 2,07\text{E-}04$	0,9544
<b>THPP-CQDs</b>	$1,57\text{E-}02 \pm 1,52\text{E-}04$	0,9634
<b>TCPP-CQDs</b>	$1,49\text{E-}02 \pm 1,82\text{E-}04$	0,9714
<b>TCPP</b>	$4,20\text{E-}03 \pm 1,59\text{E-}04$	0,9932

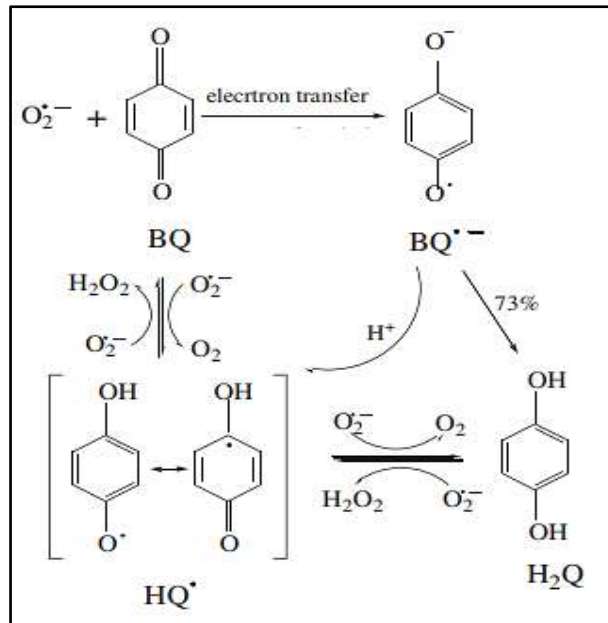
Όπως επιβεβαιώνεται και από τις τιμές του Πίνακα 3-6, οι κινητικές της φωτοκατάλυσης με χρήση συμπλόκων πορφυρίνης-κβαντικών τελειών άνθρακα, παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες τιμές με μικρή διαφορά μεταξύ τους με τιμές, συγκεκριμένα  $1,49 \times 10^{-2}$  και  $1,57 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  για τα TCPP-CQDs και THPP-CQDs, αντίστοιχα. Αντίθετα, οι τιμές των σταθερών των κβαντικών τελειών άνθρακα και των πορφυρινών είναι μια τάξη μεγέθους μικρότερη, σε σχέση με αυτή των συμπλόκων ( $10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ). Επιβεβαιώνεται με αυτόν το τρόπο, η ενίσχυση της φωτοκαταλυτικής δράσης υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας μέσω της χρήσης των υβριδικών ενώσεων πορφυρινών-κβαντικών τελειών άνθρακα.

Τέλος, παρατηρείται πως οι τιμές των συντελεστών προσαρμογής  $R^2$  κυμαίνονται από 0,8929 έως 0,9964, επομένως οι μετρήσεις παρουσιάζουν καλή προσαρμοστικότητα και τα αποτελέσματα θεωρούνται δεκτά.

### 3.6. Μελέτη μηχανισμού παραγωγής ROS

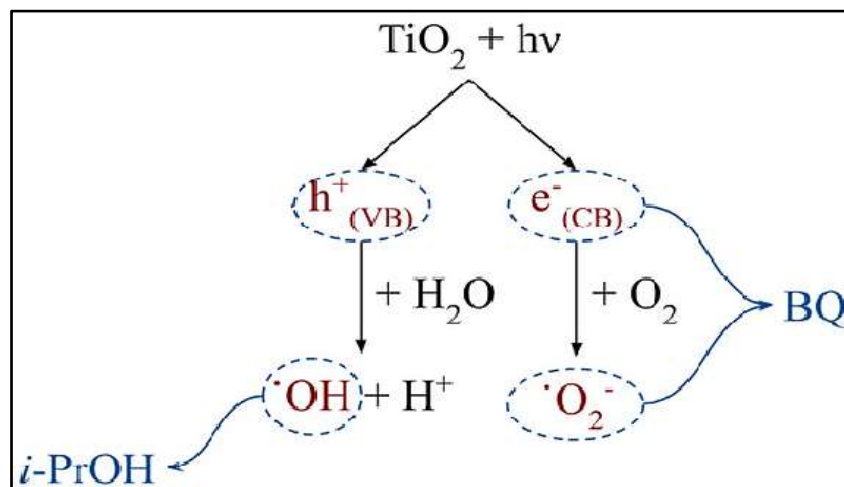
Για την ανίχνευση του είδους των δραστικών ριζών οξυγόνου, κατά την φωτοαντίδραση, επιλέγεται η κατάλληλη ουσία-δεσμευτής (scavenger). Σύμφωνα με τις προηγούμενες βιβλιογραφικές πηγές, οι κύριες δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγουν οι πορφυρίνες είναι το υπεροξειδίο οξυγόνου ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) και το ανιόν υδροξυλίου ( $\bullet\text{OH}$ )<sup>[40-41]</sup>. Επομένως, απαιτείται η κατάλληλη ουσία-δεσμευτής, ώστε οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου να δεσμεύονται και η καμπύλη απορρόφησης του ρύπου να μην μειώνεται εξαιτίας αυτών στις μετρήσεις UV-Vis.

Έτσι, εκτελείται εκ νέου η παραπάνω διαδικασία, με προσθήκη ισο-μαζικής ποσότητα π-βενζοκινόνης-φωτοκαταλύτη, ουσία η οποία δεσμεύει το οξυγόνο και παράγει υδροκινόνη, σύμφωνα με τους Zhu et al.<sup>[42]</sup>, όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 3.43: Μηχανισμός δέσμευσης ριζών οξυγόνου από την π-βενζοκινόνη <sup>[42]</sup>.

Παράλληλα, ετοιμάζονται δείγματα και προστίθενται 2,5  $\mu\text{L}$  προπανόλης, τα οποία αντιστοιχούν σε 2 mg 2-προπανόλης πυκνότητας 0,785  $\text{g}/\text{cm}^3$ , η οποία λειτουργεί ως δεσμευτής των  $\bullet\text{OH}$ .



Εικόνα 3.44: Διαδικασία φωτοενεργοποίησης τιτανίας στο νερό. Τα είδη που ευθύνονται για την αποδόμηση του ρύπου σημειώνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ οι ανιχνευτές (scavengers), που χρησιμοποιούνται με μπλε (*i-PrOH*: 2-προπανόλη και *BQ*: BenzoQuinone) <sup>[43]</sup>.

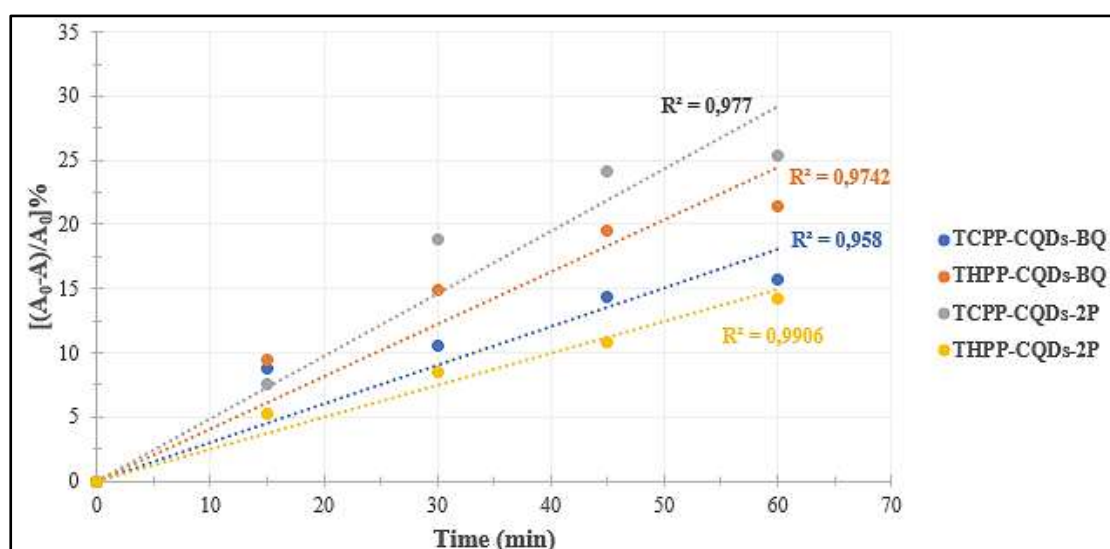
Η διαδικασία φωτοκατάλυσης που ακολουθήθηκε είναι η ίδια με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε ανωτέρω και λαμβάνονται μετρήσεις ανά 15 min για χρονικό διάστημα 1 h, ενώ τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα προηγούμενα, ώστε να εξακριβωθεί η επιρροή της π-βενζοκινόνης στην δράση των ROS που παράγονται από τα πορφυρινικά σύμπλοκα.



Για τη φωτοκαταλυτική διεργασία, επιλέγεται ορατή ακτινοβολία (daylight). Τα αποτελέσματα για τις υβριδικές ενώσεις TCPP-CQDs, THPP-CQDs μαζί με τους δεσμευτές ριζών (scavengers) παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.7):

**Πίνακας 3.7: Μετρήσεις απορρόφησης ρύπου (ροδαμίνης) παρουσία πορφυρινικών συμπλόκων και π-βενζοκινόνης, 2-προπανόλης.**

Time (min)	0	15	30	45	60
TCPP-CQDs-BQ (abs)	0,754	0,688	0,674	0,646	0,636
THPP-CQDS-BQ(abs)	0,557	0,504	0,474	0,448	0,438
TCPP-CQDS-2P (abs)	0,921	0,851	0,747	0,699	0,657
THPP-CQDS-2P (abs)	0,756	0,716	0,692	0,674	0,648



**Εικόνα 3.45: Γραφική απεικόνιση των μειώσεων του ρύπου Rh6G παρουσία παρεμποδιστών BQ:p-βενζοκινόνη, 2P:2-προπανόλη για τα προϊόντα πορφυρινών-κβαντικών τελειών.**

**Πίνακας 3.8: Αποδόσεις αποδόμησης του ρύπου (ροδαμίνης) παρουσία πορφυρινικών συμπλόκων και π-βενζοκινόνης, 2-προπανόλης.**

Δείγματα	% απόδοση
TCPP-CQDs-BQ	15,65
THPP-CQDS-BQ	21,36
TCPP-CQDS-2P	25,41
THPP-CQDS-2P	16,67

Σε σύγκριση με τον Πίνακα 3.5, φαίνεται πως η αποδόμηση του ρύπου μειώθηκε αισθητά από 54,05% σε 15,65% και από 55,56% σε 21,36% για τα TCPP-CQDs και THPP-CQDs, αντίστοιχα με τη χρήση π-βενζοκινόνης. Ακόμη, παρατηρώντας τα δείγματα 2-προπανόλης

φαίνεται πως η απόδοση του TCPP-CQDS μειώθηκε στο 28,66 %, ενώ στην περίπτωση του THPP-CQDs η απόδοση φτάνει το 16,67%. Επομένως, αποδεικνύεται ότι το  $O_2^{\bullet-}$  που δεσμεύει η βενζοκινίνη αποτελεί τη βασική ρίζα οξυγόνου, που παράγει το σύμπλοκο TCPP-CQDs, ενώ το  $\bullet OH$ , που δεσμεύεται από την 2-προπανόλη αποτελεί την βασική παραγόμενη ρίζα του THPP-CQDs. Και στις δύο περιπτώσεις, τα ποσοστά αποδόμησης του ρύπου προσεγγίζουν αρκετά το ποσοστό φωτόλυσής του (15,18%), συμπεραίνεται πως επικρατεί ο μηχανισμός παραγωγής ROS τύπου I (βλ. Κεφάλαιο 1), καθώς εμφανίζονται ρίζες οξυγόνου, οι οποίες προκύπτουν από μεταφορά ηλεκτρονίων κατά τη διεργασία φωτοκατάλυσης.

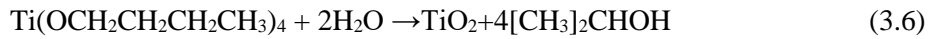
Για λόγους σύγκρισης και περαιτέρω διερεύνησης, δοκιμάζεται ο συνδυασμός των πορφυρινών με νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου ( $TiO_2$ ), τα οποία αποτελούν ένα φωτοκαταλύτη ιδιαίτερης σημασίας, τόσο στη φωτοδυναμική θεραπεία, όσο και σε διεργασίες φωτο-απολύμανσης υδάτων.

### 3.7. Σύνθεση νανοσωματιδίων $TiO_2$

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων  $TiO_2$  πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο sol-gel, καθώς αποτελεί μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τη χημική σύνθεση νανοσωματιδίων  $TiO_2$ . Αυτή η μέθοδος παρέχει τα πλεονεκτήματα του ελέγχου της στοιχειομετρίας, της ομοιογένειας των προϊόντων, του εύκολου σχηματισμού σύνθετων δομών και της παρασκευής σύνθετων υλικών <sup>[44]</sup>.

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων καθαρού διοξειδίου του τιτανίου πραγματοποιήθηκε με χρήση  $Ti(C_4H_9O)_4$  (titanium (IV) butoxide) ως πρόδρομης ένωσης. Η υδρόλυση πραγματοποιείται σε όξινο περιβάλλον (διάλυμα  $H_2O/HNO_3$ ), διότι στα περισσότερα διαλύματα με πρόδρομη ένωση αλκοξειδίου του τιτανίου, η επαφή με το νερό οδηγεί σε βίαιη υδρόλυση του αλκοξειδίου, άμεση καταβύθιση ιζήματος υδροξειδίου του τιτανίου  $Ti(OH)_4$  και τελικά το σχηματισμό σωματιδίων  $TiO_2$ , μεγάλου μεγέθους, με ανομοιογενή δομή και ηχητώματα κακής ποιότητας. Οπότε, για τη σύνθεση ομογενών διαλυμάτων απαιτείται ο έλεγχος και ο περιορισμός της καταβύθισης  $Ti(OH)_4$ , κατά συνέπεια με την προσθήκη του αλκοξειδίου σε όξινο διάλυμα πραγματοποιείται έλεγχος της υδρόλυσής του <sup>[45]</sup>.

Αρχικά, σε ένα ποτήρι ζέσεως μεταφέρονται 100 mL απιονισμένου νερού, με χρήση ογκομετρικής φιάλης και το διάλυμα τοποθετείται πάνω σε ένα μαγνητικό αναδευτήρα. Στην συνέχεια, προστίθενται 2 mL πυκνού διαλύματος  $HNO_3$ , με χρήση πιπέτας ακριβείας ρυθμιζόμενης στο 1 mL, ώστε να δημιουργηθεί το απαιτούμενο όξινο περιβάλλον για να πραγματοποιηθεί η υδρόλυση. Έπειτα, με χρήση σιφωνίου μέτρησης των 5 mL και υπό συνεχή έντονη ανάδευση, γίνεται στάγδην προσθήκη 15 mL της πρόδρομης ένωσης. Το διάλυμα αποκτά σταδιακά ένα θολό λευκό χρώμα και αναδεύεται για 1 h. Η όξινη υδρόλυση που πραγματοποιείται απεικονίζεται στην αντίδραση:

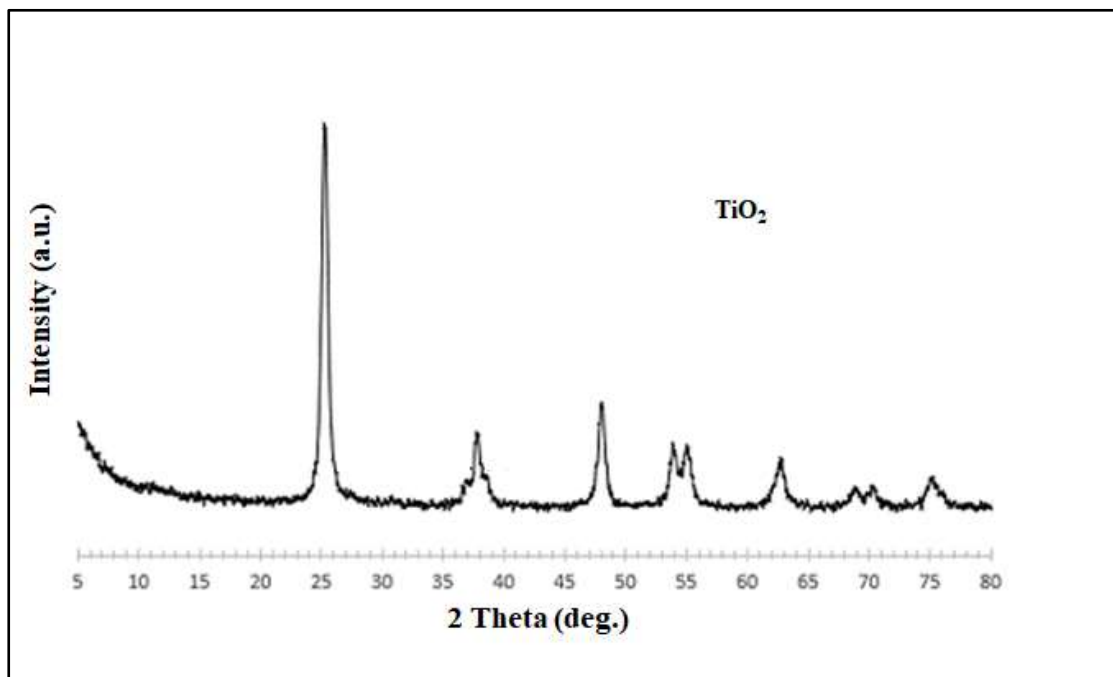


Ακολούθως, γίνεται προσθήκη 30 mL διαλύματος 1-προπανόλης, προκαλώντας τον αποχρωματισμό του διαλύματος, το οποίο έπειτα τοποθετείται στο πυριαντήριο στους 100°C για 24 h, μέχρι να εξατμιστεί ο διαλύτης.

Υστερα, το στερεό δείγμα που προκύπτει τοποθετείται στον κλίβανο σε θερμοκρασία 450°C για 4 h, όπου λαμβάνει την επιθυμητή κρυσταλλική δομή. Το τελικό δείγμα κονιοποιείται και αποθηκεύεται σε ειδικό σκουρόχρωμο δοχείο για την προστασία του από την επίδραση ακτινοβολίας.

### 3.7.1. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων $\text{TiO}_2$

#### 3.7.1.1. Περίθλαση ακτίνων X (XRD)

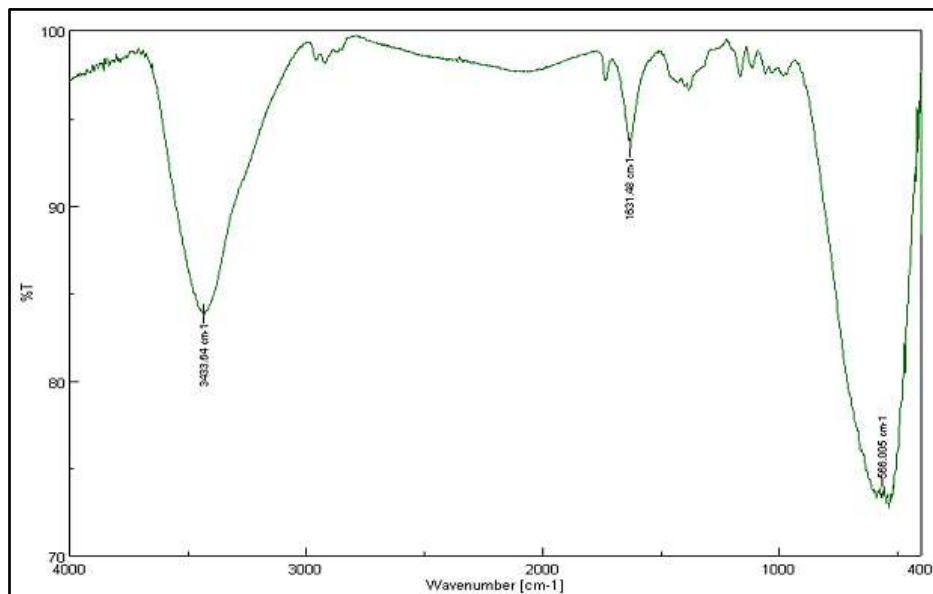


Εικόνα 3.46: Φάσμα XRD για τα νανοσωματίδια  $\text{TiO}_2$ .

Το διάγραμμα XRD των συντιθέμενων νανοσωματιδίων  $\text{TiO}_2$  παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.46. Οι Varshney et al. αναφέρουν ότι η απουσία ψευδών διαθλάσεων υποδηλώνει την κρυσταλλογραφική καθαρότητα <sup>[46]</sup>. Το πειραματικό πρότυπο XRD συμφωνεί με την βάση δεδομένων JCPDS 21-1272 (ανατάσης  $\text{TiO}_2$ ) και το πρότυπο XRD των νανοσωματιδίων  $\text{TiO}_2$  σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία <sup>[46]</sup>. Το  $2\theta$  στην κορυφή 25,4° επιβεβαιώνει την κρυσταλλική δομή ανατάση. Οι ισχυρές κορυφές περίθλασης στις 25° και 48° υποδεικνύουν επίσης ότι το  $\text{TiO}_2$  βρίσκεται στην κρυσταλλική φάση του ανατάση <sup>[47]</sup>. Η ένταση των κορυφών

XRD του δείγματος υποδηλώνει ότι τα παραγόμενα νανοσωματίδια είναι κρυσταλλικά και οι κορυφές ευρείας περίθλασης υποδεικνύουν πολύ μικρό μέγεθος κρυσταλλιτών.

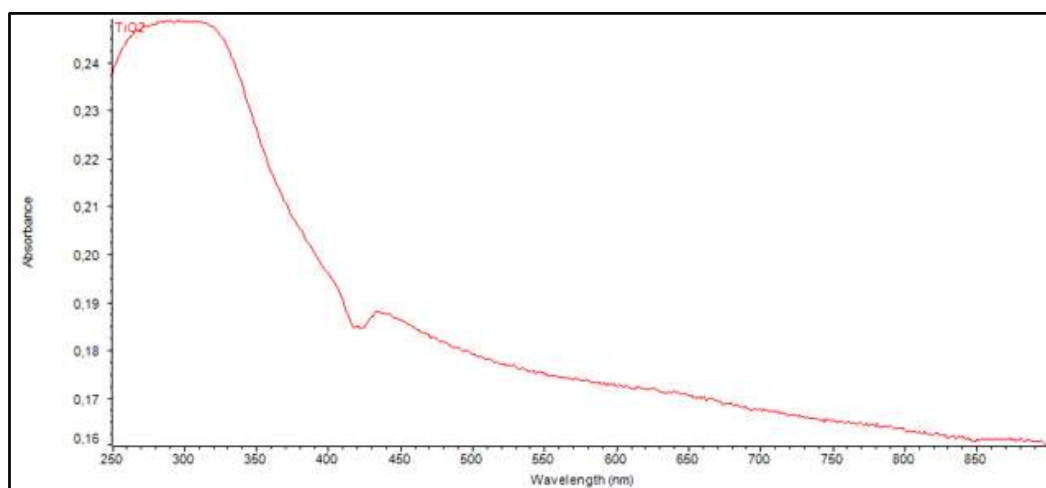
### 3.7.1.2. Φασματοσκοπία FTIR <sup>[54]</sup>



Εικόνα 3.47: Φάσμα FTIR νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub>.

Από το φάσμα FTIR των νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub>, η λειτουργία κάμψης Ti-O και η παραμορφωτική δόνηση της λειτουργίας τάνυσης Ti-OH μπορεί να παρατηρηθεί στο εύρος 800-400 cm<sup>-1</sup> και 1631,48 cm<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάνυσης της ομάδας υδροξυλίου (-OH) μπορούν να παρατηρηθούν στα 3433,54 cm<sup>-1</sup>. Οι ζώνες στα 1600-1000 cm<sup>-1</sup> μπορεί να αποδοθεί επίσης στο νερό που έχει προσροφηθεί στην επιφάνεια του TiO<sub>2</sub> ή σε οργανικά υπολείμματα .

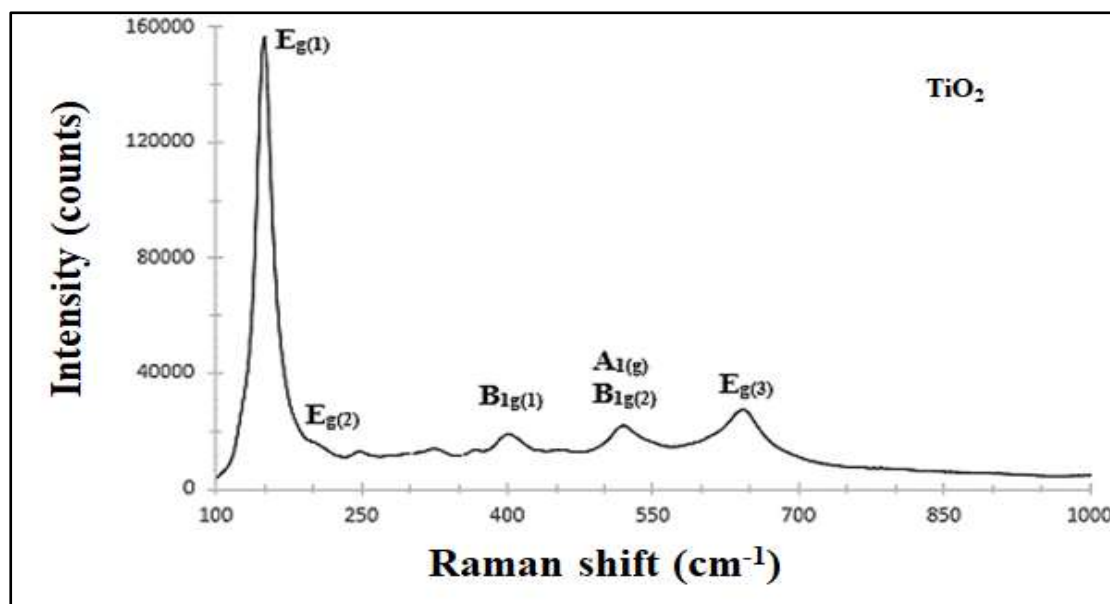
### 3.7.1.3. Φασματοσκοπία UV-Vis



Εικόνα 3.48: Φάσμα UV-Vis για τα νανοσωματίδια TiO<sub>2</sub> διαλυμένα σε αιθανόλη.

Παρατηρείται πως τα νανοσωματίδια  $\text{TiO}_2$  εμφανίζουν καμπύλη από 260-300 nm, γεγονός που επιβεβαιώνει και την άριστη απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα [53].

### 3.7.1.4 Φασματοσκοπία Raman



Εικόνα 3.49: Φάσμα Raman παραγόμενων νανοσωματιδίων  $\text{TiO}_2$ .

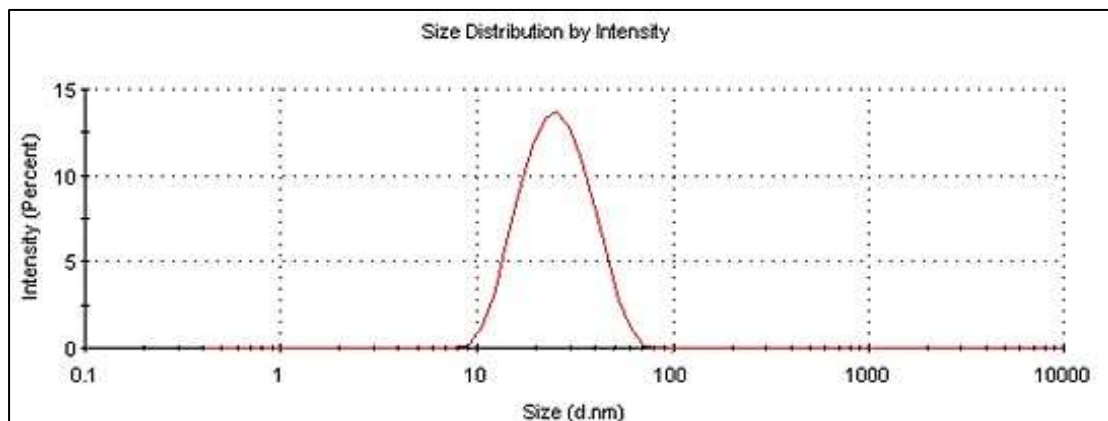
Το διάγραμμα που προέκυψε από τη φασματοσκοπία Raman έδωσε πληροφορίες για τις διαφορετικές φάσεις της μικροδομής της τιτανίας. Στην Εικόνα 3.49 παρουσιάζεται το φάσμα για το  $\text{TiO}_2$ . Ο ανατάσης διαθέτει έξι ενεργές δονήσεις Raman:  $E_g(1)$  ( $149 \text{ cm}^{-1}$ ),  $E_g(2)$  ( $199 \text{ cm}^{-1}$ ),  $B_{1g}(1)$  ( $399 \text{ cm}^{-1}$ ),  $A_{1g}/B_{1g}(2)$  (επικαλυπτόμενη στα  $519 \text{ cm}^{-1}$ ) και  $E_g(3)$  ( $641 \text{ cm}^{-1}$ ) [54]. Η παρουσία της κορυφής  $E_g(2)$ , η οποία συνήθως είναι δύσκολο να ανιχνευθεί, αποδεικνύει τον υψηλό βαθμό κρυσταλλικότητας των δειγμάτων.

### 3.7.1.5 Δυναμική σκέδαση φωτός DLS

Για την παρασκευή των διαλυμάτων που χαρακτηρίστηκαν με την τεχνική DLS, προστέθηκαν 0.0013 g κάθε δείγματος σε 50 mL απιονισμένου νερού. Τα μίγματα υπέστησαν υπερήχους για 2h, σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τα δείγματα τοποθετηθούν στο φασματόμετρο DLS, η απορρόφηση του φωτός τους μετρήθηκε στα 633 nm. Τα αποτελέσματα για τα  $\text{TiO}_2$  ήταν 0.061 ABS. Είναι επίσης σημαντικό να προστεθεί στο λογισμικό της μέτρησης ο ακριβής δείκτης διάθλασης, ο οποίος μετρήθηκε στους  $24.5^\circ\text{C}$ , και είναι 1.3327.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα δείγματα  $\text{TiO}_2$  σωματιδίων, που συντέθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, παρουσιάζουν καλή κατανομή, και αποδεκτό εύρος

μεγέθους σωματιδίων (1-100 nm). Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα θεωρούνται αποδεκτά και η ποιότητα καλή, καθώς οι επιπλέον κορυφές παρουσιάζουν χαμηλή ένταση και πιθανώς οφείλονται σε συσσωματώματα.



Εικόνα 3.50: Διάγραμμα κατανομής μεγέθους δείγματος TiO<sub>2</sub>.

Πίνακας 3.9: Μέσο μέγεθος σωματιδίων και δείκτης PdI των παραγόμενων νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub>.

TiO <sub>2</sub>	Z-Average(d.nm): 23,7 PdI: 0.157 Intercept: 0,946 Result quality: Good	Peak 1: 27 nm	Intensity (%)	sdev. (d. nm)
			100 %	10.7

### 3.8. Ανάπτυξη συμπλόκων πορφυρινών-TiO<sub>2</sub>

#### 3.8.1. Σύνθεση συμπλόκων πορφυρινών-TiO<sub>2</sub>

Για την παρασκευή των συμπλόκων τιτανίας-πορφυρινών ζυγίζεται 1 g TiO<sub>2</sub> νανοσωματιδίων και 25 mg στερεής πορφυρίνης (TCPP και THPP, αντίστοιχα). Στη συνέχεια, τα δείγματα αφήνονται υπό ανάδευση σε 150 mL μεθανόλης για 24 h <sup>[48]</sup>.



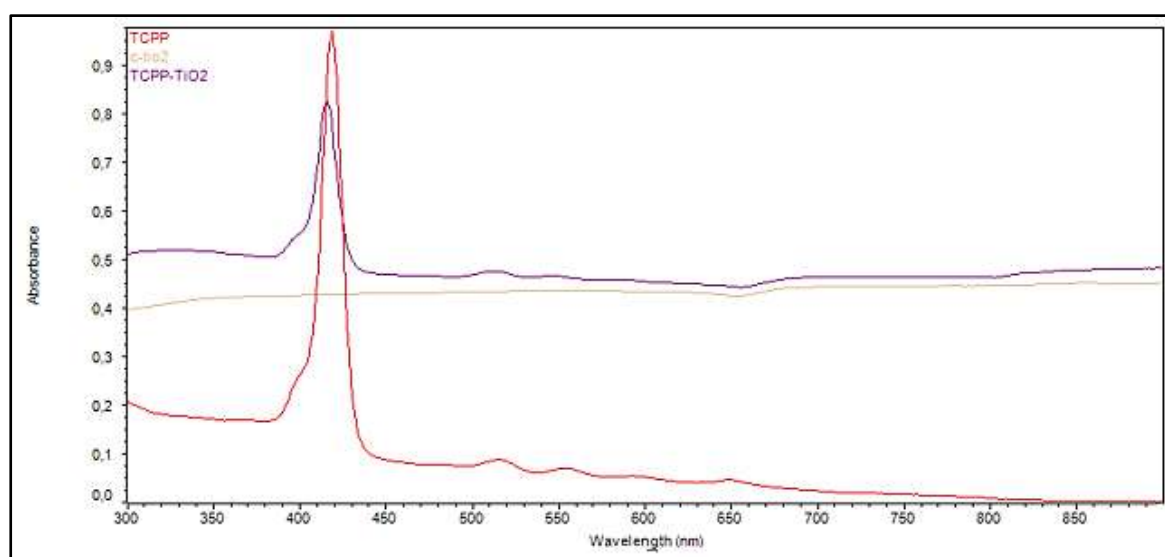
Εικόνα 3.51: Διαλύματα πορφυρινών-TiO<sub>2</sub> σε μεθανόλη υπό ανάδευση.

Σημειώνεται πως η σκούρα χρώση που αποκτούν τα διαλύματα οφείλεται στην διαλυτοποίηση των πορφυρινών στη μεθανόλη.

Εν συνεχεία, τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στα 9000 rpm για 10 min. Τέλος, τα στερεά συλλέχθηκαν και ξηράνθηκαν στους 100°C για 2 h. Μετά τη λήψη στερεού συμπλόκου, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός-ταυτοποίηση των συμπλόκων.

### 3.8.2. Χαρακτηρισμός συμπλόκων πορφυρινών-TiO<sub>2</sub>

#### 3.8.2.1. Φασματοσκοπία UV-Vis (σύμπλοκο TCPP-TiO<sub>2</sub>)



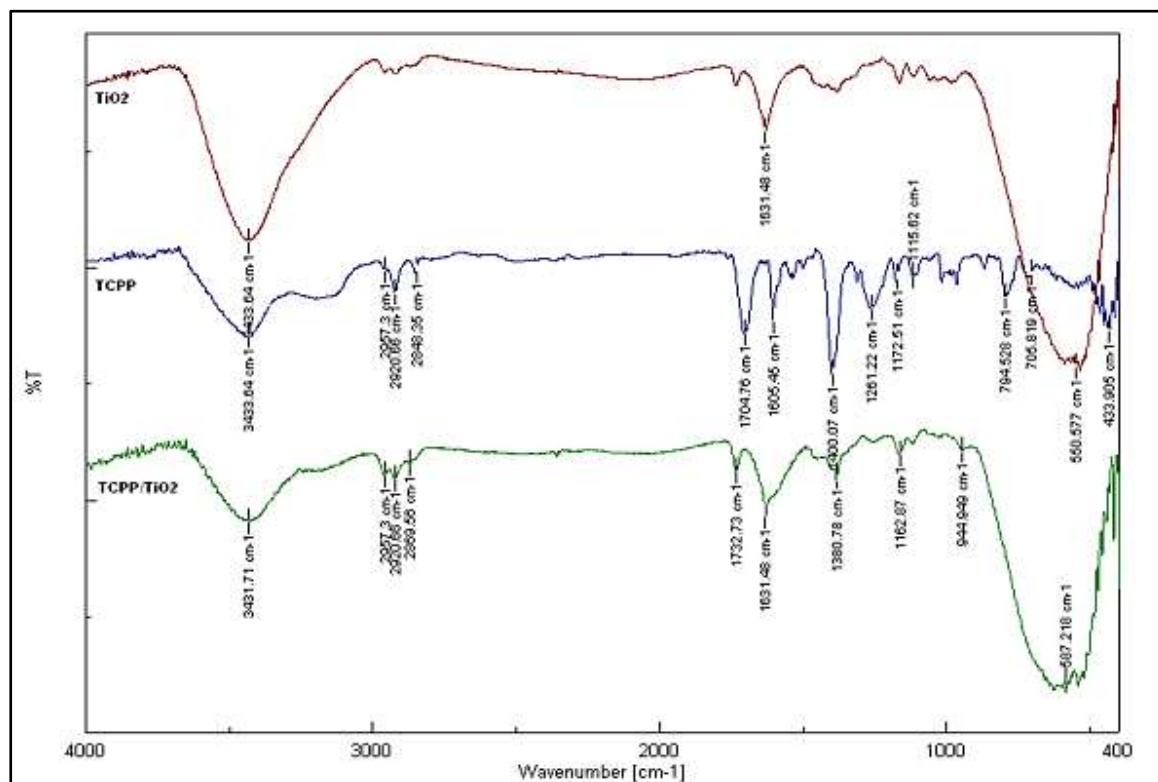
Εικόνα 3.52: Φάσμα UV-Vis για το σύμπλοκο TCPP-TiO<sub>2</sub>.

Το φάσμα UV-Vis των νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub> παρουσιάζει ευρείες καμπύλες στα 400 nm περίπου. Το φάσμα UV-Vis των μονομερών μορίων TCPP δείχνει μια ισχυρή κορυφή απορρόφησης Soret στα 418,93 nm, ως αποτέλεσμα της μετάβασης από το  $a_{1u}(\pi)$  στο  $e^*g(\pi)$  και τέσσερις ασθενείς κορυφές στην περιοχή από 500-700 nm που αποδίδονται σε ζώνες Q της μετάβασης  $a_{2u}(\pi)$  σε  $e^*g(\pi)$  [49].

Μετά το σχηματισμό του συμπλόκου, το φάσμα UV-Vis εμφανίζει τις χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης τόσο των νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub> όσο και της πορφυρίνης. Ενώ η κορυφή στα 330 nm περίπου αποδίδεται στα νανοσωματίδια TiO<sub>2</sub>, η ισχυρή κορυφή απορρόφησης στα 416,16 nm και τέσσερις αδύναμες κορυφές στην περιοχή 500-700 nm αποδίδονται στη ζώνη Soret και τις ζώνες Q συσσωρευμένων πορφυρινικών κρυστάλλων, αντίστοιχα. Σε σύγκριση με τη ζώνη Soret των μονομερών TCPP, υπάρχουν διακριτές βαθοχρωμικές και υποχρωματικές μετατοπίσεις κατά 3 nm (από 419 nm σε 416 nm), υποδεικνύοντας ότι τα περισσότερα από τα δομικά στοιχεία της TCPP σχηματίζουν

συσσωματώματα J κατά τη διάρκεια της υπερμοριακής συναρμολόγησης με τη βοήθεια του  $\text{TiO}_2$  [50]. Η μετατόπιση του κόκκινου στις ζώνες Q υποδηλώνει επίσης καλά καθορισμένα συγκροτήματα τύπου J, μονομερών TCPP σε συνδυασμό με νανοδομημένα σωματίδια  $\text{TiO}_2$ .

### 3.8.2.2. Φασματοσκοπία FTIR (σύμπλοκο TCPP- $\text{TiO}_2$ )



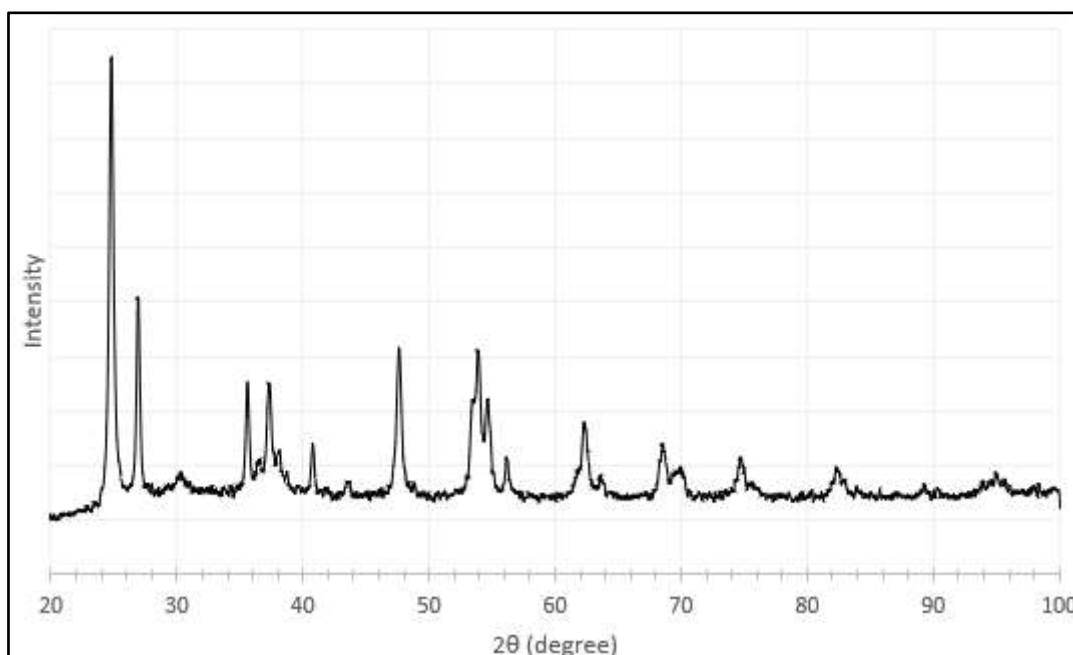
Εικόνα 3.53: Φάσματα FTIR συμπλόκου TCPP- $\text{TiO}_2$  (πράσινο), TCPP (μπλε) και  $\text{TiO}_2$  (κόκκινο).

Όπως παρατηρείται στο φάσμα FTIR του συμπλόκου, εντοπίζονται χαρακτηριστικές ζώνες τόσο του  $\text{TiO}_2$  όσο και των πορφυρινών. Αρχικά, συγκρίνοντας με το φάσμα της TCPP, φαίνεται πως υπάρχει αισθητή μείωση στην κορυφή στα  $1400,07\text{ cm}^{-1}$ , ενώ οι κορυφές στα  $1704,76$ ,  $1261,22$  και  $794,53\text{ cm}^{-1}$ , που σχετίζονται με τους δεσμούς άνθρακα μεταξύ πορφυρίνης-αρυλομάδων, καθώς και στη δόνηση έκτασης των διπλών δεσμών άνθρακα, στη δόνηση κάμψης των δεσμών C-N και στη δόνηση κάμψης του δεσμού C-H αντίστοιχα, χάνονται εντελώς. Οι κορυφές που οφείλονται στο διοξείδιο του τιτανίου φαίνεται πως διατηρούνται με ελαφρές μειώσεις στην ένταση, λόγω επικάλυψης από την πορφυρίνη ή διαφορετικής συγκέντρωσης των ειδών. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πιθανότατα ότι τα μόρια TCPP έχουν συνδεθεί μη ομοιοπολικά με τα νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου, τα οποία διατηρούν τις βασικές κορυφές δόνησής τους με στοίβαξη π-π, με παρόμοιο τρόπο όπως τα συσσωματώματα πορφυρινών J.



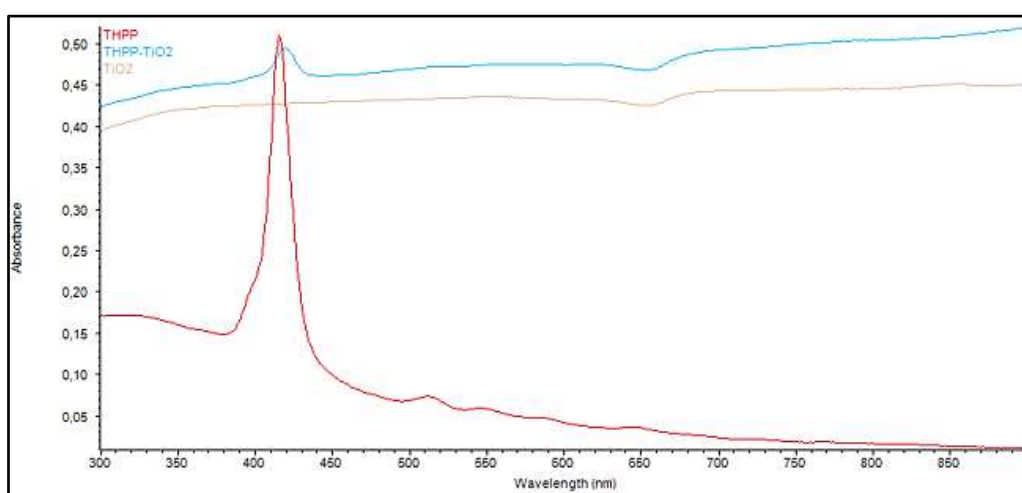
### 3.8.2.3. Περίθλαση ακτίνων X<sup>[50]</sup>.

Σε ό,τι αφορά το διάγραμμα XRD των συμπλόκων TCPP-TiO<sub>2</sub>, εκτός από τις κορυφές που έχουν αποδοθεί στα νανοσωματίδια ανατάση-TiO<sub>2</sub>, η εμφάνιση κορυφών στις 24° και 26,5° περίπου, αποδίδεται στην κρυσταλλική φύση των συσσωματωμένων μορίων TCPP, που μπορεί να οφείλεται σε αρωματική στοίβαξη π-π μεταξύ των μορίων της πορφυρίνης.



Εικόνα 3.54: Διάγραμμα XRD συμπλόκου TCPP-TiO<sub>2</sub>.

### 3.8.2.4. Φασματοσκοπία UV-Vis (σύμπλοκο THPP-TiO<sub>2</sub>)

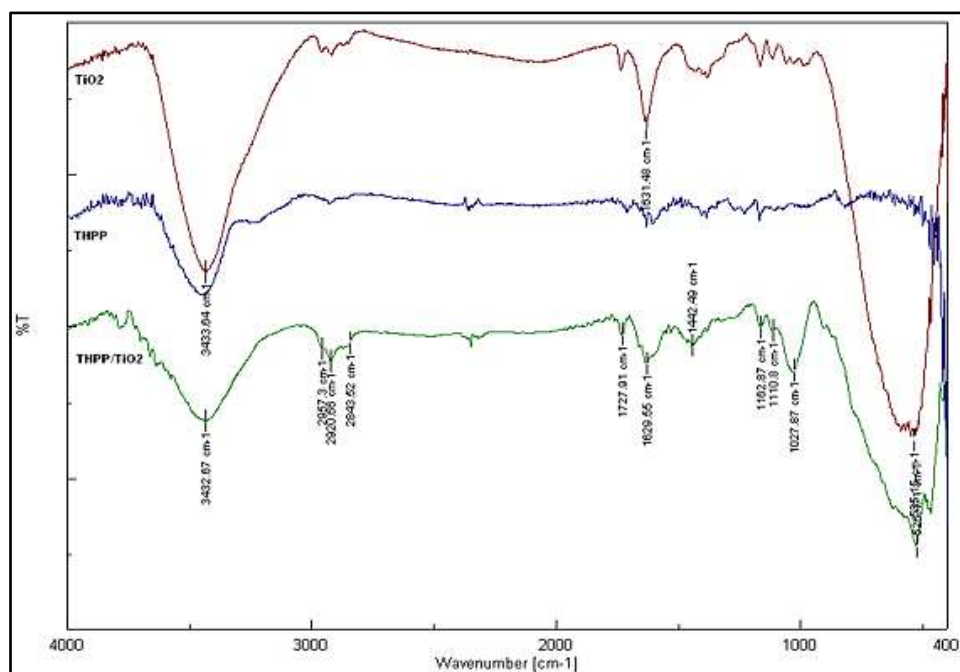


Εικόνα 3.55: Φάσμα UV-Vis συμπλόκου THPP-TiO<sub>2</sub>.

Όταν η πορφυρίνη προστέθηκαν στο sol TiO<sub>2</sub>, το σύμπλοκο εμφάνισε μια μετατόπιση κόκκινου και επέκτεινε σημαντικά το προφίλ απορρόφησης, που πιθανότατα προήλθε από την

ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των τμημάτων –OH των πορφυρινών και –Ti του TiO<sub>2</sub>. Όπως φαίνεται, η γαλάζια γραμμή στο φάσμα έχει χαρακτηριστικές κορυφές και των δύο υλικών, όπως την καμπύλη του TiO<sub>2</sub> στα 650 nm και την κορυφή Soret στα 416,18 nm της THPP, γεγονός που υποδηλώνει πως το σύμπλοκο THPP-TiO<sub>2</sub> έχει καλύτερη απορρόφηση στο ορατό φάσμα (κορυφή στα 419,81 nm).

### 3.8.2.5. Φασματοσκοπία FTIR (σύμπλοκο THPP-TiO<sub>2</sub>)

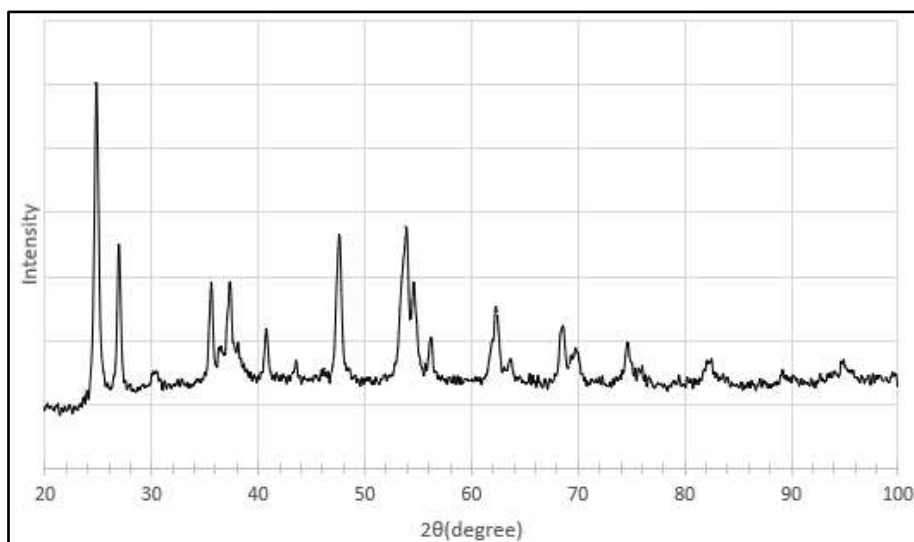


Εικόνα 3.56: Φάσματα FTIR συμπλόκου THPP-TiO<sub>2</sub> (πράσινο), THPP (μπλε) και TiO<sub>2</sub> (κόκκινο).

Μια ισχυρή κορυφή στα 799 cm<sup>-1</sup> ανήκει στη δόνηση κάμψης –OH της καθαρής THPP, ενώ οι δύο κορυφές στα 1220 cm<sup>-1</sup> και 1442 cm<sup>-1</sup>, αντιστοιχίζονται στις δονήσεις τάνυσης και παραμόρφωσης των δεσμών C–O και O–H, αντίστοιχα. Οι τρεις κορυφές που εντοπίζονται στην THPP εξαφανίζονται μετά την εισαγωγή των νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub> στην THPP.

Η ευρεία κορυφή περίπου στα 710 cm<sup>-1</sup> αποδίδεται στη δόνηση κάμψης του Ti–O στον κρύσταλλο TiO<sub>2</sub>, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί στην αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου μεταξύ των νανοσφαιρών TiO<sub>2</sub> και της THPP. Η χαρακτηριστική δόνηση κάμψης C–N στα 966 cm<sup>-1</sup>, μπορεί να παρατηρηθεί στο φάσμα FTIR της THPP. Ωστόσο, εξαφανίζεται στο φάσμα του συμπλόκου και παρατηρείται μια νέα δόνηση στα 1027 cm<sup>-1</sup>, που δείχνει ότι έλαβε χώρα ο συντονισμός μεταξύ του μορίου THPP και του TiO<sub>2</sub> [55]. Από αυτά τα αποτελέσματα, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι, εκτός από την αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου, υπάρχει η αλληλεπίδραση συντονισμού μεταξύ THPP και νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub>.

### 3.8.2.6. Περίθλαση ακτίνων X (σύμπλοκο THPP-TiO<sub>2</sub>)



Εικόνα 3.57: Διάγραμμα XRD συμπλόκου THPP-TiO<sub>2</sub>.

Οι κορυφές του διαγράμματος του συμπλόκου THPP-TiO<sub>2</sub>, ταιριάζουν καλά σε εκείνα του καθαρού TiO<sub>2</sub>, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία πορφυρινών στο σύμπλοκο δεν άλλαξε την κρυσταλλικότητα του TiO<sub>2</sub>.

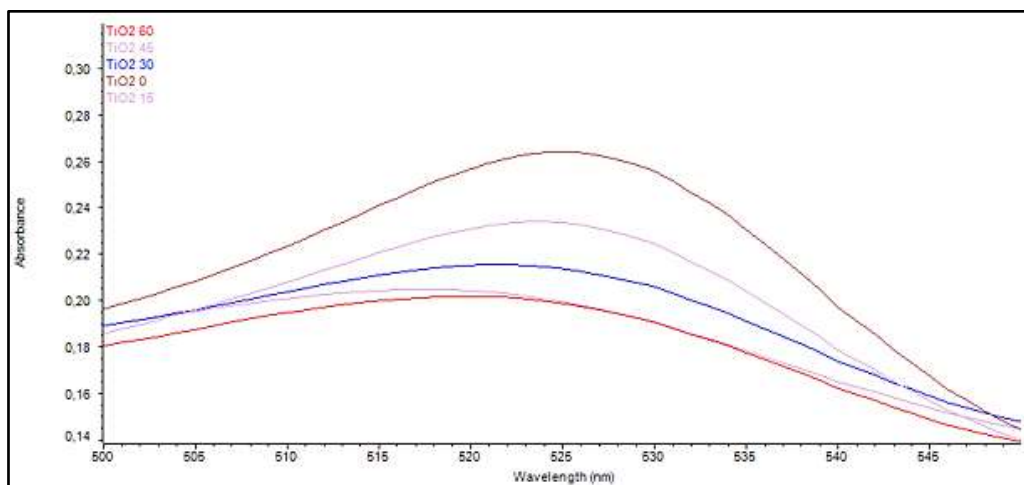
### 3.8.3. Μελέτη φωτοκαταλυτικής δράσης συμπλόκων πορφυρινών-TiO<sub>2</sub>

Όπως και στην περίπτωση των κβαντικών τελειών άνθρακα, τα δείγματα εισάγονται σε φωτοαντιδραστήρα υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας. Τα δείγματα λαμβάνονται και προσδιορίζεται η απορρόφηση του ρύπου ανά 15 min. Κάθε πείραμα, όπως και προηγουμένως, επαναλήφθηκε σε τρεις κύκλους.

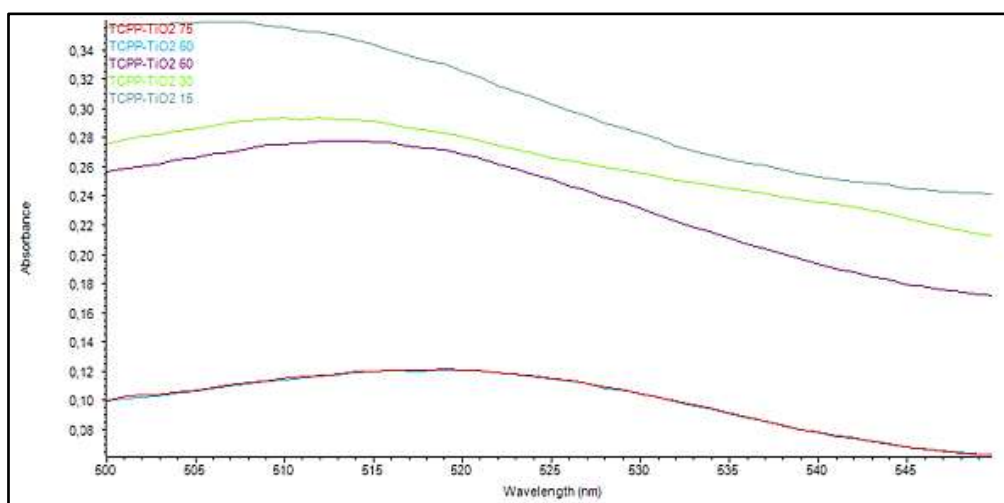


Εικόνα 3.58: Τα δείγματα TCPP-TiO<sub>2</sub>, THPP-TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> πριν (πάνω) και μετά (κάτω) τη φωτοκατάλυση.

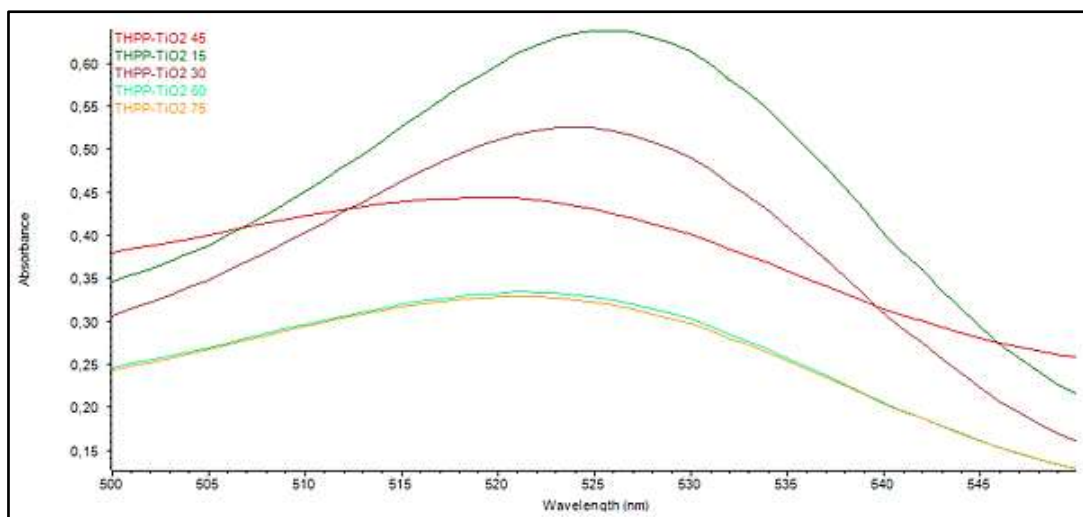
Όπως φαίνεται από την Εικόνα 3.58 τα διαλύματα του ρύπου μετά το πέρας της 1 h αποχρωματίζονται, γεγονός που υποδηλώνει την εξουδετέρωση του ρύπου από τις παραγόμενες δραστικές ρίζες των εξεταζόμενων δειγμάτων.



**Εικόνα 3.59: Φάσμα UV-Vis για ανίχνευση ROS για τα νανοσωματίδια TiO<sub>2</sub> υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας.**



**Εικόνα 3.60: Φάσμα UV-Vis για ανίχνευση ROS για το σύμπλοκο TCPP-TiO<sub>2</sub> κάτω από λάμπα ορατού φωτός.**



**Εικόνα 3.61:** Φάσμα UV-Vis για ανίχνευση ROS για το σύμπλοκο THPP-TiO<sub>2</sub> υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας.

Από τη λήψη των μετρήσεων, φαίνεται πως τα νανοσωματίδια TiO<sub>2</sub> και τα σύμπλοκα TCPP-TiO<sub>2</sub> και THPP-TiO<sub>2</sub> μειώνουν την καμπύλη απορρόφησης του ρύπου (ροδαμίνη 6G) στο πέρας του χρόνου. Συγκεκριμένα:

**Πίνακας 3.10:** Μετρήσεις απορρόφησης ρύπου παρουσία TiO<sub>2</sub>, TCPP-TiO<sub>2</sub>, και THPP-TiO<sub>2</sub> και αποδόσεις σε χρονικό διάστημα 1 h.

Time (min)	0	15	30	45	60	Yield %
TiO <sub>2</sub>	0,264	0,234	0,215	0,204	0,201	23,86
TCPP-TiO <sub>2</sub>	0,355	0,297	0,266	0,132	0,129	62,61
THPP-TiO <sub>2</sub>	0,627	0,520	0,445	0,315	0,313	50,08

Φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα και από τις τιμές απόδοσης της τιτανίας και των συμπλόκων της, στην αποδόμηση του ρύπου, πως η σύζευξη των πορφυρινών με τα νανοσωματίδια TiO<sub>2</sub> αυξάνει τις αποδόσεις αποδόμησης του ρύπου, καθώς ενισχύει σημαντικά την απορρόφηση του φωτοκαταλύτη τιτανίας στο ορατό φως .

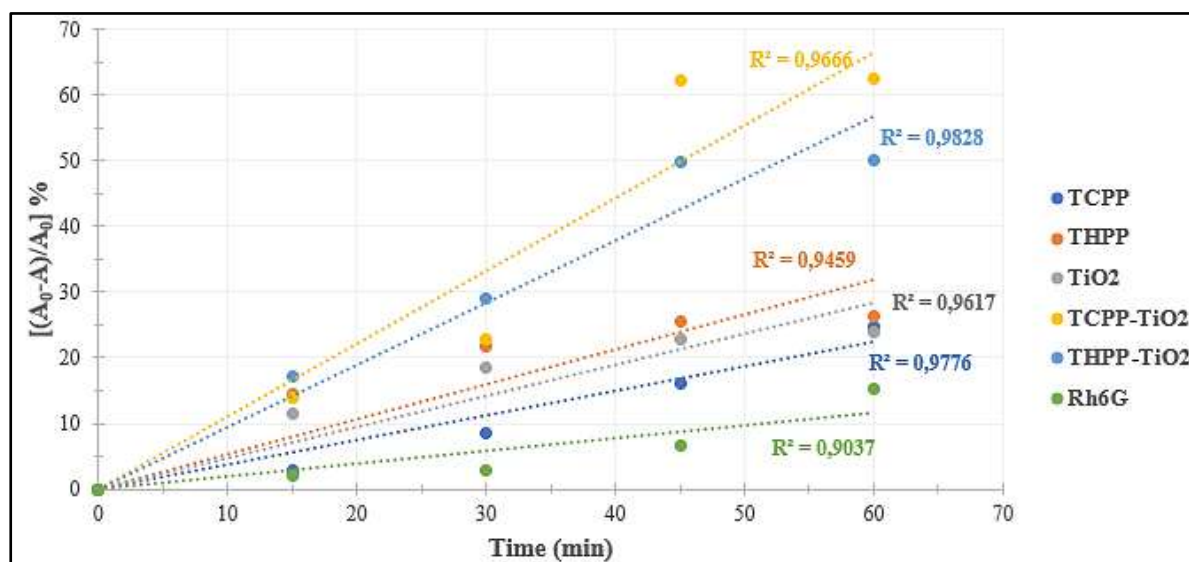
Αναλυτικά, από τα φάσματα των εξεταζόμενων δειγμάτων φαίνεται πως τα σύμπλοκα αυξάνουν το ποσοστό απόδοσης αποδόμησης του ρύπου σε σχέση με τα μονομερή τους, επακόλουθα λοιπόν και την παραγωγή ROS. Συγκεκριμένα, για το σύμπλοκο TCPP-TiO<sub>2</sub> η απόδοση αυξήθηκε κατά 37,81%, σε σύγκριση με τη σκέτη πορφυρίνη, ενώ κατά 38,75% σε σχέση με τα νανοσωματίδια TiO<sub>2</sub>. Οι συγκριτικές αυτές τιμές για την περίπτωση του συμπλόκου THPP-TiO<sub>2</sub> είναι 23,78% και 26,22%, αντίστοιχα. Ακόμα, φαίνεται πως με την προσθήκη των συμπλόκων υπάρχει τόσο αύξηση των εντάσεων απορρόφησης του ρύπου, όσο

και μετατοπίσεις της χαρακτηριστικής καμπύλης του ρύπου από τα 525,97 nm στα 513,83 nm για το σύμπλοκο TCPP-TiO<sub>2</sub> και στα 521,19 nm για το THPP-TiO<sub>2</sub>.

### 3.8.4. Μελέτη κινητικής υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας για τα σύμπλοκα πορφυρινών-τιτανίας

Στην περίπτωση προσδιορισμού της κινητικής της φωτοκατάλυσης των συμπλόκων πορφυρινών-τιτανίας, ακολουθήθηκε η ίδια μεθοδολογία, όπως στην περίπτωση των κβαντικών τελειών άνθρακα, σύμφωνα με την κινητική Langmuir-Hishelwood.

Από τις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis και με επακόλουθη επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκύπτουν τα εξής γραφήματα:

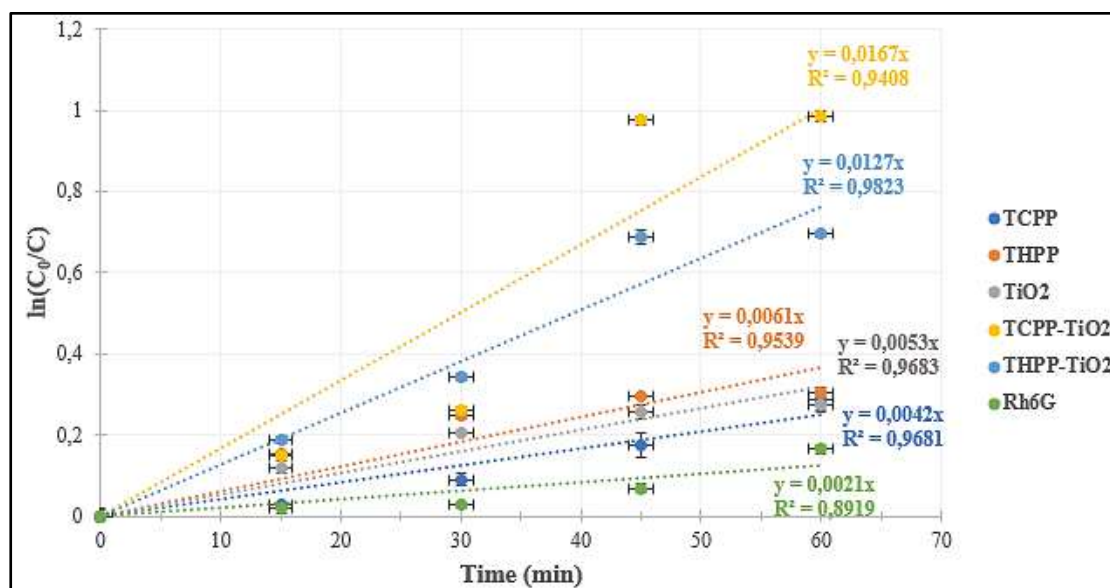


Εικόνα 3.62: Διάγραμμα απόδοσης φωτοκαταλυτικής αποδόμησης του ρύπου ροδαμίνη 6G με την χρήση 2 mg του εκάστοτε εξεταζόμενου δείγματος.

Αποδείχτηκε πως το καθένα από τα εξεταζόμενα δείγματα: διοξείδιο του τιτανίου (TiO<sub>2</sub>-γκρι), πορφυρίνες (TCPP-μπλε, THPP-πορτοκαλί) και σύμπλοκα (TCPP/TiO<sub>2</sub>-κίτρινο, THPP/TiO<sub>2</sub>-γαλάζιο), βελτιώνει την απόδοση αποδόμησης του ρύπου. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια TiO<sub>2</sub> φαίνεται να αυξάνουν το ποσοστό κατά 8,68%, γεγονός που δικαιολογείται από την ύπαρξη δραστικών ομάδων -OH στην επιφάνειά τους, επομένως η δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου οφείλεται και στα νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου και στις πορφυρίνες.

Στη συνέχεια, προσδιορίζεται η κινητική της φωτοκαταλυτικής αποδόμησης του οργανικού ρύπου, με βάση το μοντέλο Langmuir-Hinshelwood. Για το λόγο αυτό, αναπαρίσταται σε διάγραμμα η μεταβολή του νεπέριου λογαρίθμου του λόγου της αρχικής συγκέντρωσης προς την τελική για κάθε χρονική στιγμή, συναρτήσει του χρόνου. Με βάση τη γραμμική εξάρτηση

και την κλίση της βέλτιστης ευθείας, προκύπτει η εκάστοτε σταθερά κινητικής ( $k_{app}$ ) κάθε φωτοκαταλυτικής διεργασίας, ενώ οι τιμές των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.11.



Εικόνα 3.63: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωτόλυσης του ρύπου ροδαμίνης 6G και της φωτοκαταλυτικής αποδόμησης με χρήση των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Πίνακας 3.11: Συγκεντρωτικός πίνακας φαινομενικών κινητικών σταθερών  $k_{app}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) για την φωτοκατάλυση του ρύπου ροδαμίνης 6G υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας για το σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων.

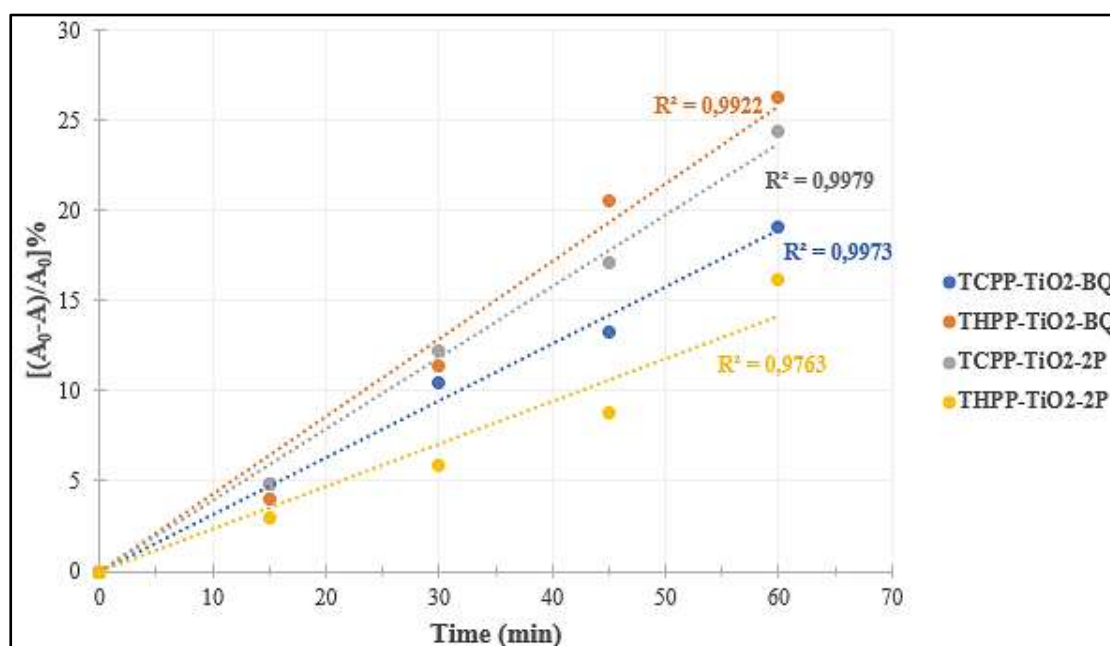
Δείγμα	Φαινόμενη σταθερά φωτοκατάλυσης ( $K_{app}, \text{min}^{-1}$ )	$R^2$
Rh6G	$2,10\text{E-}03 \pm 2,75\text{E-}04$	0,8919
TiO <sub>2</sub>	$5,30\text{E-}03 \pm 6,63\text{E-}05$	0,9680
THPP	$6,10\text{E-}03 \pm 2,07\text{E-}04$	0,9539
THPP-TiO <sub>2</sub>	$1,27\text{E-}02 \pm 2,07\text{E-}04$	0,9823
TCPP-TiO <sub>2</sub>	$1,67\text{E-}02 \pm 1,42\text{E-}04$	0,9408
TCPP	$4,20\text{E-}03 \pm 1,59\text{E-}04$	0,9681

Όπως επιβεβαιώνεται και από τις τιμές του Πίνακα 3-11, οι κινητικές της φωτοκατάλυσης με χρήση συμπλόκων πορφυρίνης-TiO<sub>2</sub> παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες τιμές με μικρή διαφορά μεταξύ τους ( $1,67 \times 10^{-2}$  και  $1,27 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  για τα TCPP-TiO<sub>2</sub> και THPP-TiO<sub>2</sub>, αντίστοιχα). Επιβεβαιώνεται με αυτό τον τρόπο, η ενίσχυση της φωτοκαταλυτικής δράσης υπό την επίδραση ορατής ακτινοβολίας με την χρήση συμπλόκων πορφυρινών-διοξειδίου του τιτανίου. Τέλος, παρατηρείται πως οι συντελεστές προσαρμογής  $R^2$  κυμαίνονται από 0,8919 έως 0,9823,

επομένως οι μετρήσεις έχουν καλή προσαρμοστικότητα και τα αποτελέσματα θεωρούνται δεκτά.

### 3.8.5. Παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου ROS

Ομοίως, με την περίπτωση των CQDs ακολουθείται η δοκιμασία ανίχνευσης ριζών οξυγόνου με π-βενζοκινόνη και 2-προπανόλη. Ακολούθως, παραθέτονται τα γραφήματα και οι μετρήσεις φασματοσκοπίας UV-Vis.



**Εικόνα 3.64:** Γραφική απεικόνιση της αποδόμησης του ρύπου Rh6G παρουσία παρεμποδιστών (scavengers) (BQ: π-βενζοκινόνη, 2P: 2-προπανόλη) για τα σύμπλοκα πορφυρινών-διοξειδίου του τιτανίου.

**Πίνακας 3.12:** Μετρήσεις απορρόφησης ρύπου παρουσία συμπλόκων πορφυρινών-διοξειδίου του τιτανίου και χρησιμοποιούμενων scavengers.

Time (min)	0	15	30	45	60
TCPP-TiO <sub>2</sub> -BQ (abs)	0,841	0,800	0,753	0,729	0,680
THPP-TiO <sub>2</sub> -BQ (abs)	0,720	0,691	0,638	0,572	0,531
TCPP-TiO <sub>2</sub> -2P (abs)	0,412	0,390	0,360	0,340	0,310
THPP-TiO <sub>2</sub> -2P (abs)	0,341	0,330	0,320	0,310	0,285

**Πίνακας 3.13:** Αποδόσεις μείωσης ρύπου παρουσία συμπλόκων πορφυρινών-διοξειδίου του τιτανίου και χρησιμοποιούμενων scavengers.

Δείγματα	% Απόδοση
----------	-----------



TCPP-TiO <sub>2</sub> -BQ	19,14
THPP-TiO <sub>2</sub> -BQ	26,25
TCPP-TiO <sub>2</sub> -2P	24,39
THPP-TiO <sub>2</sub> -2P	16,18

Σε σύγκριση με τον Πίνακα 3-10, φαίνεται πως η απορρόφηση του ρύπου μειώθηκε αισθητά από 62,61% σε 19,14% και από 50,08% σε 26,25% για το TCPP-TiO<sub>2</sub> και THPP-TiO<sub>2</sub>, αντίστοιχα, με την χρήση της π-βενζοκινόνης. Ακόμη, παρατηρώντας τα δείγματα 2-προπανόλης, φαίνεται πως η απόδοση του TCPP-CQDS μειώθηκε στο 24,39%, ενώ στην περίπτωση του THPP-CQDs η απόδοση φτάνει το 16,18%. Επομένως, αποδεικνύεται ότι το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> που δεσμεύει η π-βενζοκινόνη αποτελεί τη βασική ρίζα οξυγόνου που παράγει το σύμπλοκο TCPP-TiO<sub>2</sub>, ενώ το OH<sup>-</sup> που δεσμεύεται από την 2-προπανόλη αποτελεί τη βασική παραγόμενη ρίζα του THPP-TiO<sub>2</sub>. Από τη στιγμή, που και στις δύο περιπτώσεις τα ποσοστά αποδόμησης του ρύπου προσεγγίζουν αρκετά το ποσοστό φωτόλυσης του ρύπου (15,18%), συμπεραίνεται πως επικρατεί ο μηχανισμός παραγωγής ROS τύπου I (βλ. Κεφάλαιο 1), καθώς εμφανίζονται ρίζες οξυγόνου που προκύπτουν από μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την φωτοκατάλυση.

## Βιβλιογραφία (Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>)

- [1]. Li H., He X., Huang H., Liu Y., Lian S., 2010. Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalytic design. *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (26), 4430-4434.
- [2]. Zheng X., Ananthanarayanan A., Luo K.Q., Chen P., 2015. Glowing graphene quantum dots and carbon dots: properties, syntheses, and biological applications. *Small*, 11 (14), 1620-1636.
- [3]. Li H., Chen L., Wu, H., He, H., Jin Y., 2014. Ionic liquid-functionalized fluorescent carbon nanodots and their applications in electrocatalysis, biosensing, and cell imaging. *Langmuir*, 30, 15016-15021.
- [4]. Yang S., Brüller S., Wu Z.S., Liu Z., Parvez K., Parvez K., Dong, R., Richard F., Samori P., Feng X., Müllen K., 2015. Organic radical-assisted electrochemical exfoliation for the scalable production of high-quality graphene. *Journal of the American Chemical Society*, 137, 13927-13932.
- [5]. Bergmann M.E.H., Rollin J., 2007. Product and by-product formation in laboratory studies on disinfection electrolysis of water using boron-doped diamond anodes. *Catalysis Today*, 124, 198-203.
- [6]. Wei D., Grande L., Chundi V., White R., Bower C., Andrew P., Ryhanen T., 2012. Graphene from electrochemical exfoliation and its direct applications in enhanced energy storage devices. *Chemical Communications*, 48, 1239-1241.
- [7]. Lu J., Yang J.X., Wang J., Lim A., Wang S., Loh K.P., 2009. One-pot synthesis of fluorescent carbon nanoribbons, nanoparticles, and graphene by the exfoliation of graphite in ionic liquids. *ACS Nano*, 3 (8), 2367-2375.
- [8]. Rao K.S., Sentilnathan J., Cho H.W., Wu J.J., Yoshimura M., 2015. Soft Processing of Graphene Nanosheets by Glycine-Bisulfate Ionic-Complex-Assisted Electrochemical Exfoliation of Graphite for Reduction Catalysis. *Advanced Functional Materials*, 25 (2), 298-305.
- [9]. Puvvada N., Kumar B.N.P., Konar S., Kalita H., Mandal M., Pathak A., 2012. Synthesis of biocompatible multicolor luminescent carbon dots for bioimaging applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 13, 045008.
- [10]. Yu L., Ruan H., Zheng Y., Li D., 2013. A facile solvothermal method to produce ZnS quantum dots-decorated graphene nanosheets with superior photoactivity. *Nanotechnology*, 24 (37), 375601.

- [11]. Gedda G., Lee C.Y., Lin Y.C., Wu H., 2016. Green synthesis of carbon dots from prawn shells for highly selective and sensitive detection of copper ions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 224, 396-403.
- [12]. Gu J., Zhang X., Pang A., Yang J., 2016. Facile synthesis and photoluminescence characteristics of blue-emitting nitrogen-doped graphene quantum dots. *Nanotechnology*, 27 (16), 165704.
- [13]. Mao L.H., Tang W.Q., Deng Z.Y., Liu S.S., Wang C.F., Chen S., 2014. Facile access to white fluorescent carbon dots toward light-emitting devices. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53 (15), 6417-6425.
- [14]. Liu R., Wu D., Liu S., Koynov K., Knoll W., Li Q., 2009. An aqueous route to multicolor photoluminescent carbon dots using silica spheres as carriers. *Angewandte Chemie International Edition*, 48 (25), 4598-4601.
- [15]. De B., Kumar M., Mandal B.B., Karak N., 2015. An in situ prepared photo-luminescent transparent biocompatible hyperbranched epoxy/carbon dot nanocomposite. *RSC Advances*, 5 (91), 74692-74704.
- [16]. Liu Q., Guo B., Rao Z., Zhang B., Gong J.R., 2013. Strong two-photon-induced fluorescence from photostable, biocompatible nitrogen-doped graphene quantum dots for cellular and deep-tissue imaging. *Nano Letters*, 13 (6), 2436-2441.
- [17] Embleton, M.L.; Nair, S.P.; Heywood, W.; Menon, D.C.; Cookson, B.D.; Wilson, M. Development of a novel targeting system for lethal photosensitization of antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 3690–3696.
- [18]. Rothmund, 1935, [*J. Am. Chem. Soc.* 1935, 57, 10, 2010–2011 Publication Date: October 1, 1935 <https://doi.org/10.1021/ja01313a510>]
- [19]. Neutral Porphyrin Derivative Exerts Anticancer Activity by Targeting Cellular Topoisomerase I (Top1) and Promotes Apoptotic Cell Death without Stabilizing Top1-DNA Cleavage Complexes Subhendu K. Das, Arijit Ghosh, Srijita Paul Chowdhuri, Nyancy Halder, Ishita Rehman, Souvik Sengupta, Krushna Chandra Sahoo, Harapriya Rath, and Benu Brata Da *Journal of Medicinal Chemistry* **2018** 61 (3), 804-817 DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01297
- [20]. Rothmund and Adler-Longo Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins under Equilibrium Conditions Jonathan S. Lindsey,\* Irwin C. Schreiman, Henry C. Hsu, Patrick C. Kearney, and Anne M. Marguerettaz Department of Chemistry, Carnegie-Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania 15213 Received July 30, 1986.
- [21]. Adler, A.D.; Longo, F.R.; Finarelli, J.D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphyrin. *J. Org. Chem.* 1967, 32, 476.

- [22]. Lindsey, J.S. Synthesis of meso-substituted porphyrins. In *The Porphyrin Handbook*; Kadish, M., Smith, K.M., Guillard, R., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2000; ISBN 0-12-393200-9.
- [23]. *Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy*, Ethan D. Sternberg, David Dolphin\* Department of Chemistry, University of British Columbia, 2036 Main Mall, Vancouver, B.C., V6T 1Z1, CANADA, Christian Brlickner, Department of Chemistry, University of California at Berkeley, Berkeley, CA., 94720 U.S.A., Received 28 July 1997.
- [24]. Shen, Hai-Min & Qi, Bei & Hu, Meng-Yun & Liu, Lei & Ye, Hong-Liang & She, Yuan-Bin. (2020). Selective Solvent-Free and Additive-Free Oxidation of Primary Benzylic C–H Bonds with O<sub>2</sub> Catalyzed by the Combination of Metalloporphyrin with N-Hydroxyphthalimide. *Catalysis Letters*. 150. 10.1007/s10562-020-03214-y
- [25]. Sharon Murphy, Carla Saurel, Anne Morrissey, John Tobin, Michael Oelgemöller, Kieran Nolan, Photocatalytic activity of a porphyrin/TiO<sub>2</sub> composite in the degradation of pharmaceuticals, *Applied Catalysis B: Environmental*, Volumes 119–120, 2012, Pages 156-165, ISSN09263373, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2012.02.027>.
- [26]. Riyue Ge, Xinyue Wang, Chao Zhang, Shi-Zhao Kang, Lixia Qin, Guodong Li, Xiangqing Li, The influence of combination mode on the structure and properties of porphyrin–graphene oxide composites, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 483, 2015, Pages 45-52, ISSN 0927-7757, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.05.056>.
- [27]. Sun ZC, She YB, Zhou Y, Song XF, Li K. Synthesis, characterization and spectral properties of substituted tetraphenylporphyrin iron chloride complexes. *Molecules*. 2011 Apr 6;16(4):2960-70. doi: 10.3390/molecules16042960. PMID: 21471935; PMCID: PMC6260636.]
- [28]. Lewandowska, K.; Rosiak, N.; Bogucki, A.; Cielecka-Piontek, J.; Mizera, M.; Bednarski, W.; Suchecki, M.; Szaciłowski, K. Supramolecular Complexes of Graphene Oxide with Porphyrins: An Interplay between Electronic and Magnetic Properties. *Molecules* **2019**, *24*, 688. <https://doi.org/10.3390/molecules24040688>
- [29]. Borissevitch & Gandini, 1998[S.C.M Gandini, V.E Yushmanov, I.E Borissevitch, M Tabak Langmuir, 15 (1999), pp. 6233-6243]; Pasternack et al, 1985[R. F. Pasternack, E. J. Gibbs, A. Gaudemer, A. Antebi, S. Bassner, L. De Poy, D. H. Turner, A. Williams, F. Laplace, M. H. Lansard, C. Merienne, and M. Perree-Fauvet *Journal of the American Chemical Society* **1985** *107* (26), 8179-8186 DOI: 10.1021/ja00312a061
- [30]. van de Craats, A.M. and Warman, J.M. (2001), The Core-Size Effect on the Mobility of Charge in Discotic Liquid Crystalline Materials. *Adv. Mater.*, 13: 130-133. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200101\)13:2<130::AID-ADMA130>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200101)13:2<130::AID-ADMA130>3.0.CO;2-L)

- [31]. A. Pallikkara, D. Sebastian, K. Ramakrishnan, *ChemistrySelect* **2021**, 6, 12224.
- [32]. Vasilica Țucureanu, Alina Matei & Andrei Marius Avram (2016) FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46:6, 502-520, DOI: 10.1080/10408347.2016.1157013
- [33]. M. Barzan and F. Hajiesmaeilbaigi, "Investigation the concentration effect on the absorption and fluorescence properties of Rhodamine 6G dye," *Optik (Stuttg)*, vol. 159, pp. 157–161, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.IJLEO.2018.01.075
- [34]. F. M. Zehentbauer *et al.*, "Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 121, pp. 147–151, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.SAA.2013.10.062
- [35]. Photochemistry of Water-Soluble Porphyrins: Comparative Study of Isomeric Tetrapyrrolyl- and Tetrakis (N-Methylpyridiniumyl) porphyrins K. KALYANASUNDARAM
- [36]. Sadananda Mandal, Sandip K. Nayak, Sivaramakrishna Mallampalli, and Amitava Patra *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014** 6 (1), 130-136 DOI: 10.1021/am403518d
- [37]. DF Swinehart - Journal of chemical education, 1962 - ACS Publications
- [38]. *J. Phys. Chem. C* 2020, 124, 29, 15769–15780 Publication Date: June 19, 2020 <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c03907>
- [39]. "Analysis of Langmuir-Hinshelwood Kinetics Model for Photocatalytic Degradation of Aqueous Direct Blue 71 Through Analytical Expression | Semantic Scholar." <https://www.semanticscholar.org/paper/Analysis-of-Langmuir-Hinshelwood-Kinetics-Model-for-Loghambal-Catherine/fa3cba3b4b66cb35fa7895e9beaf110489fa0fef>
- [40]. Zijian Zhang, Li Wang, Weixu Liu, Zihe Yan, Yongfa Zhu, Shuyun Zhou, Shanyue Guan, Photogenerated-hole-induced rapid elimination of solid tumors by the supramolecular porphyrin photocatalyst, *National Science Review*, Volume 8, Issue 5, May 2021, nwaal155, <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaal155>
- [41]. *ACS Omega* 2018, 3, 9, 10638–10646 Publication Date: September 5, 2018 <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01822>
- [42]. Zhu, M., Lu, J., Hu, Y. *et al.* Photochemical reactions between 1,4-benzoquinone and  $O_2^-$ . *Environ Sci Pollut Res* **27**, 31289–31299 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09422-8>
- [43]. Allegri, A.; Maslova, V.; Blosi, M.; Costa, A.L.; Ortelli, S.; Basile, F.; Albonetti, S. Photocatalytic Oxidation of HMF under Solar Irradiation: Coupling of Microemulsion and Lyophilization to Obtain Innovative  $TiO_2$ -Based Materials. *Molecules* **2020**, 25, 5225. <https://doi.org/10.3390/molecules25225225>
- [44] S. M. Gupta and M. Tripathi, "A review of  $TiO_2$  nanoparticles," *Chinese Science Bulletin*, vol. 56, no. 16, pp. 1639–1657, Jun. 2011, doi: 10.1007/S11434-011-4476-1

- [45] M. E. K. K. Ψ. Δ. T. N. Λ. E.A. Παυλάτου, “Άσκηση 2α. Σύνθεση νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub> με την τεχνική λύματος – πηκτής - Μελέτη Φωτοκαταλυτικής Δράσης.” Αθήνα, 2019
- [46]. Varshney R, Bhadauria S, Gaur MS. Biogenic synthesis of silver nanocubes and nanorods using sundried *Stevia rebaudiana* leaves. *Adv.Mat.Lett.* 2010; 1(3): 232-237, DOI:10.5185/amlett.2010.9155.].
- [47]. Thamaphat K, Limsuwan P, Ngotawornchai B. Phase Characterization of TiO<sub>2</sub> Powder by XRD and TEM. *Kasetsart.J.(Nat. Sci.)*. 2008; 42: 357-361
- [48]. M.A. Ahmed, Z.M. Abou-Gamra, H.A.A. Medien, M.A. Hamza, Effect of porphyrin on photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward Rhodamine B photodegradation, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 176, 2017, Pages 25-35, ISSN 1011-1344, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.09.016>
- [49]. Sun J, Meng D, Jiang S, Wu G, Yan S, Geng J and Huang Y 2012 *J. Mater. Chem.* **22** 18879
- [50]. Duong Duc La *et al* 2017 *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* **8** 015009, Kano H and Kobayashi T 2002 *J. Chem. Phys.* **116** 184
- [51]. P. Huo *et al.*, “Incorporation of N–ZnO/CdS/Graphene oxide composite photocatalyst for enhanced photocatalytic activity under visible light,” *Journal of Alloys and Compounds*, vol. C, no. 670, pp. 198–209, 2016, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2016.01.247.]
- [52]. S. Du, J. Lian, and F. Zhang, “Visible Light-Responsive N-Doped TiO<sub>2</sub> Photocatalysis: Synthesis, Characterizations, and Applications,” *Transactions of Tianjin University*, vol. 28, no. 1, pp. 33–52, Feb. 2022, doi: 10.1007/S12209-021-00303-W/FIGURES/17.].
- [53]. Grama, S., et al. "NOVEL PORPHYRIN-BASED POLYSILOXANE MICROMATERIAL." *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)* 5.4 (2010).
- [54] Hanaor, D.A.H.; Sorrell, C.C., 2011, Review of the anatase to rutile phase transformation. *J. Mater. Sci.*, 46, 855–874.

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>:

### Συζήτηση και προτάσεις για μελλοντική έρευνα

#### 4.1. Γενικές παρατηρήσεις και συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιτεύχθηκαν τα ακόλουθα:

- Επιτυχής σύνθεση TCPP, THPP, TiO<sub>2</sub>, CQDs και υβριδικών προϊόντων TCPP-CQDs/TiO<sub>2</sub>, THPP-CQDs/TiO<sub>2</sub>
- Επιτυχής αποδόμηση του ρύπου Ροδαμίνης 6G υπό ορατή ακτινοβολία
- Αύξηση απόδοσης αποδόμησης του ρύπου παρουσία υβριδικών προϊόντων κατά 24-37% στο εύρος της 1h
- Παραγωγή ROS(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, •OH<sup>-</sup>) με μηχανισμό τύπου I

Ακόμη προκύπτει ότι, οι απλές, ποικίλες και πράσινες συνθετικές μέθοδοι, οι εξαιρετικές οπτικές και ηλεκτρικές ιδιότητες, το χαμηλό κόστος σύνθεσης, καθώς και η καλή βιοσυμβατότητα καθιστούν τις τελείες άνθρακα δημοφιλείς στον τομέα της Βιοχαρτικής. Έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στη μελέτη των τελειών άνθρακα (CDs), όσον αφορά στις δομές, στις ιδιότητες τους, στις στρατηγικές σύνθεσης αλλά και στις εφαρμογές τους. Τα ενθαρρυντικά ερευνητικά αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι τις τελείες άνθρακα θα μας απασχολήσουν πολύ στο μέλλον, αν και υπάρχουν πολλά κρίσιμα ζητήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Σε σύγκριση με τις κβαντικές τελείες ημιαγωγών (Quantum Dots) και άλλα υλικά άνθρακα, η έρευνα για τις τελείες άνθρακα εξακολουθεί να βρίσκεται σε εκκολαπτόμενο στάδιο. Επί του παρόντος, ένα από τα πιο θεμελιώδη και σημαντικά ζητήματα είναι η έλλειψη ενός πρωτοκόλλου συστηματικής και κλιμακούμενης σύνθεσης για την παραγωγή υψηλής ποιότητας τελειών άνθρακα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα, μέγεθος, σχήμα, κρυσταλλικότητα, αριθμός λειτουργικών ομάδων, κτλ.

Ο ακριβής μηχανισμός αντίδρασης, ο μηχανισμός πυρηνογένεσης και η διαδικασία σχηματισμού τους είναι επίσης ασαφείς, λόγω των μη τυποποιημένων συνθετικών οδών και των προσμίξεων.

Ως εκ τούτου, για το scale up της παραγωγής τελειών άνθρακα με υψηλή απόδοση και καθαρότητα, θα πρέπει να διερευνηθούν συστηματικά οι επιδράσεις των πρόδρομων ενώσεων και των συνθηκών αντίδρασης (π.χ. θερμοκρασία, χρόνος, pH). Θα πρέπει ακόμη να αναπτυχθεί ένα σύστημα καθαρισμού (purification) με βάση το μέγεθος ή την πολικότητα.

Επί του παρόντος, ο μηχανισμός φωτοφωταύγειας (PL) των τελειών άνθρακα παραμένει αμφιλεγόμενος, λόγω των διαφορετικών συνθηκών αντίδρασης και των πρόδρομων ενώσεων.

Για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού φωτοφωταύγειας απαιτούνται ακριβείς χαρακτηρισμοί της δομής τους, συμπεριλαμβανομένου του μοριακού βάρους, του αριθμού των

επιφανειακών ομάδων, του βαθμού διασταυρούμενης σύνδεσης (cross-linking) και της λεπτομερούς φύσης των διεγερμένων καταστάσεων, χρησιμοποιώντας προηγμένες τεχνικές με σκοπό να αποκαλυφθεί η σχέση δομής-απόδοσης για την ανάπτυξη των τελειών άνθρακα.

Λαμβάνοντας υπόψη τη μικρότερη σκέδαση του φωτός, τη λιγότερη ζημιά και τη βαθύτερη διείσδυση του φωτός στον ιστό, οι τελείες άνθρακα που εκπέμπουν στο βαθύ κόκκινο έως το εγγύς υπέρυθρο NIR (650-1700 nm) και διεγείρονται στα ίδια μήκη κύματος (650-1700 nm) είναι ιδιαίτερα επιθυμητές για μελλοντικές κλινικές εφαρμογές στον τομέα της βιοϊατρικής. Επιπλέον, η συστηματική έρευνα σχετικά με την τοξικότητα και τις μεταβολικές οδούς των τελειών άνθρακα σε ζωικά μοντέλα είναι κρίσιμη για τις μελλοντικές κλινικές εφαρμογές τους.

Συνοπτικά, οι τελείες άνθρακα ως ένας νέος τύπος νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, διαθέτουν μοναδικά οπτικά χαρακτηριστικά, εξαιρετική βιοσυμβατότητα, χαμηλό κόστος, εύκολη τροποποίηση και λειτουργικότητα και παρουσιάζουν αξιοσημείωτες δυνατότητες για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Ωστόσο, από την άποψη των πραγματικών εφαρμογών των υλικών που βασίζονται σε τελείες άνθρακα, υπάρχει ακόμα πολλή ερευνητική εργασία που πρέπει να γίνει.

Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν και από τα πειράματα με τα νανοσωματίδια τιτανίας, τα οποία αποτελούν εξίσου σπουδαίους φορείς για εφαρμογές στην φωτοδυναμική θεραπεία λόγω του μειωμένου κόστους παρασκευής τους και του πράσινου αποτυπώματός τους .

## 4.2. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Η παρούσα μελέτη αποτέλεσε μια *πρωταρχική* διερεύνηση για τη σύνθεση κβαντικών τελειών άνθρακα, μέσω μιας απλής και οικονομικής ηλεκτροχημικής διεργασίας, απουσία τοξικών ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων. Σκοπός των παραγόμενων αυτών κβαντικών τελειών άνθρακα είναι να δοκιμαστούν μελλοντικά στη φωτοδυναμική θεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου, ξεπερνώντας την δυσκολία υδατοδιαλυτότητας των πορφυρινών μέσω της δημιουργίας υβριδικού προϊόντος. Ορισμένες συστάσεις για περαιτέρω έρευνα είναι οι ακόλουθες:

- Περαιτέρω μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των τελειών άνθρακα που συντέθηκαν μέσω χαρακτηρισμών TEM και σε ορισμένες περιπτώσεις FE-SEM.
- Περαιτέρω μελέτη της επίδρασης της τιμής του pH, της θερμοκρασίας και της σύστασης του ηλεκτρολύτη στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ηλεκτροχημικά παραγόμενων τελειών άνθρακα.
- Μελέτη της επίδρασης της ποιότητας γραφίτη των ηλεκτροδίων που χρησιμοποιούνται κατά την ηλεκτροχημική σύνθεση των κβαντικών τελειών άνθρακα.
- Σύνθεση κβαντικών τελειών άνθρακα, μέσω μιας κλασσικής υδροθερμικής μεθόδου και νόθευση (doping) των τελειών που προκύπτουν με φώσφορο, ώστε να διαπιστωθεί



εάν όντως τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής μετατοπίζονται προς το εγγύς υπέρυθρο

- Σύνθεση κβαντικών τελειών άνθρακα μέσω μιας κλασικής υδροθερμικής μεθόδου ή μιας μεθόδου υποβοηθούμενης από μικροκύματα και σύγκρισή τους με τις ηλεκτροχημικά παραγόμενες, ώστε αρχικά να πραγματοποιηθεί μελέτη της επίδρασης της συνθετικής πορείας στο μέγεθος, τα μορφολογικά και δομικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων κβαντικών τελειών άνθρακα και ακολούθως, να γίνει μια πρώτη αντιστοίχιση της καταλληλότητας τη εκάστοτε συνθετικής πορείας με την εφαρμογή για την οποία προορίζονται οι CQDs.
- Χρήση διαφορετικής μεθόδου σύνθεσης (bottom up ή top down), που να μπορεί να ελέγξει αποτελεσματικότερα τη διασπορά στις διαμέτρους των τελειών άνθρακα που προκύπτουν.
- Πειράματα ως προς το λειτουργικότητα των συντιθέμενων τελειών άνθρακα σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων, ώστε να επιβεβαιωθεί η φωτοδυναμική και η φωτοθερμική δράση τους.
- Σύζευξη των κβαντικών τελειών άνθρακα με παράγοντες στόχευσης των καρκινικών κυττάρων, όπως είναι τα αντισώματα, τα αμινοξέα και τα πεπτίδια, ώστε να διαπιστωθεί εάν όντως επιτυγχάνεται η συσσώρευση σε στοχευμένες θέσεις στους φωτοευαίσθητοποιητές τρίτης γενιάς.
- Σύνθεση τελειών άνθρακα ευαίσθητων σε αλλαγές του pH στη μορφή βιο-αισθητήρα, που επιδεικνύει «off-on» φθορισμό κατά την εσωτερίκευση από τα καρκινικά κύτταρα ή φθορισμό με διαφορετικά μήκη κύματος εκπομπής μετά την εσωτερίκευση.
- Δοκιμές σύζευξης των κβαντικών τελειών και των νανοσωματιδίων τιτανίας με περισσότερα είδη πορφυρινών με σκοπό την δημιουργία προϊόντων φωτοευαίσθητοποιητών με ευρύ φάσμα λειτουργικών ομάδων και ιδιοτήτων.