

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΠΜΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΥΛΙΚΩΝ**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση, χαρακτηρισμός, και αυτοοργάνωση διπεπτιδίων με
δυναμικές περιβαλλοντικές εφαρμογές**

Μητροπούλου Κωνσταντίνα

Υπεύθυνος Καθηγητής: Αθανάσιος Κουτσολέλος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

POSTGRADUATE PROGRAMME OF CHEMISTRY

**BIOINORGANIC CHEMISTRY LABORATORY
BIOMATERIALS LABORATORY**



Master Thesis

**SYNTHESIS, CHARACTERISATION AND SELF -
ASSEMBLY OF DIPEPTIDES IN DEPOLLUTION
APPLICATIONS**

KONSTANTINA MITROPOULOU

Master Thesis Supervisor: Athanassios Coutsolelos

HERAKLION 2022

*Στα υπέρροχα πλάσματα Χρύσα Κ., Χρύσα Α.,
Μαρίτα Β., Γιώργο Ν., Πέτρο Ν.*

Εξεταστική Επιτροπή

Αθανάσιος Κουτσολέλος

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Άννα Μητράκη

Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιωάννης Παυλίδης

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την πραγμάτωση της διπλωματικής μου εργασίας, πρωτεύοντως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αθανάσιο Κουτσολέλο, καθώς και τη συνεπιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κα. Άννα Μητράκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν και την διαρκή καθοδήγηση και στήριξη τους. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Παυλίδη που δέχτηκε με προθυμία να αξιολογήσει την ερευνητική εργασία μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κα. Αλέκα Μανουσάκη, τεχνικό στο εργαστήριο μικροσκοπίας «Β. Γαλανόπουλος» για την υπέροχη συνεργασία μας.

Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω από την καρδιά μου για την υποστήριξη, την καθοδήγηση, αλλά και για όλες τις στιγμές που περάσαμε μαζί, όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοϋλικών του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών και συγκεκριμένα τη δόκτορα Χρύσα Κοκοτίδου, την Χρύσα Αποστολίδου, τη Μαρίτα Βάσιλα, το Πέτρο Ντιβανάκ, το Γιώργο Νηστικάκη, τη Ρένα Φανουράκη, τη Κυριακή Σταμπούλη, την Ευητίνα Τριανταφύλλου και την Αγγελίνα Καραμεσούτη. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας και ιδίως τον Γιώργο Χαραλαμπίδη, την Ασπασία Στουμπίδη, τον Μάνο Ορφανό και την Μάγδα Τοπούζα, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Βαρβάρα Πλατανιά από το εργαστήριο Βιοϋλικών – Μηχανικής Ιστών για τη συνεργασία μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα μου Βασούλα και τα αδέρφια μου Σταυριάννα, Νάσο και Ευελίνα για την υποστήριξη και την υπομονή τους, καθώς και τους αγαπημένους μου φίλους Μαριλένα, Ηλία, Παντελή και Claudio για την φροντίδα τους.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικές πληροφορίες

Όνοματεπώνυμο: Μητροπούλου Κωνσταντίνα

Διεύθυνση: Μαργουνίου 18, Ηράκλειο, Κρήτη,
Ελλάδα 71306

Ημ/νία γέννησης: 15 Δεκεμβρίου 1996

Εθνικότητα: Ελληνική

Στοιχεία Επικοινωνίας: *τηλέφωνο:* +30 6944072592
e-mail: konstantina.mitr@gmail.com

Εκπαίδευση

10/2019-Today : Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Χημεία:

Τομέας Προηγμένων Υλικών και Φυσικοχημείας,

Τίτλος Μεταπτυχιακής εργασίας: «Σύνθεση, χαρακτηρισμός και αυτοοργάνωση διπεπτιδίων με δυνητικές περιβαλλοντικές εφαρμογές»

Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εργαστήριο Βιολικών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

10/2014–11/2019: Πτυχίο Χημείας: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο.
(6.95/10)

Τίτλος Πτυχιακής εργασίας: «Μελέτη αυτοοργανωμένων δομών υβριδίων πορφυρίνης, διπεπτιδίων και προστατευτικών ομάδων»

Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εργαστήριο Βιολικών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Διδακτική Εμπειρία

- 01/2020-06/2020** Βοηθός στο προπτυχιακό εργαστήριο Ανόργανης Χημείας I, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Υπεύθυνη καθηγήτρια Βαρδαλαχάκη Ε.
- 09/2020-12/2020** Βοηθός στο προπτυχιακό εργαστήριο Ανόργανης Χημείας II, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Υπεύθυνος καθηγητής Τερζάκης Σ..

Εργασιακή Εμπειρία

05/2019–7/2019: Πρακτική άσκηση ως τεχνικός χημικός στο αναλυτικό εργαστήριο “Analysis” του Νικόλαου Φακουρέλη, στο Ηράκλειο Κρήτης

Συνέδια/Σεμινάρια

8-10/05/2015: 12ο Συνέδριο Χημείας Ελλάδος Κύπρου, «Χημεία, Πυλώνας Ανάπτυξης στην Μετά Κρίση Εποχή.», 08-10/05/2015, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

Δημοσιεύσεις

Self-assembly of aliphatic dipeptides coupled with porphyrin and BODIPY chromophores

Nikoloudakis E, Mitropoulou K, Landrou G, Charalambidis G, Nikolaou V, Mitraki A, Coutsolelos AG Chem Commun (Camb), 55(94):14103-14106, 2019
DOI: [10.1039/c9cc06125h](https://doi.org/10.1039/c9cc06125h).

Ξένες γλώσσες

Αγγλικά: Certificate of Proficiency in English from the University of Michigan

Γερμανικά: Goethe-Zertifikat B1 Goethe Institute, State Certificate of Language Learning B2

Ικανότητες και τεχνικές

Σύνθεση, απομόνωση και χαρακτηρισμός χρωμοφόρων και σύνθετων οργανικών ενώσεων.

Σύνθεση, απομόνωση και χαρακτηρισμός πεπτιδίων

Χαρακτηρισμός υδρογελών και σχεδιασμός αντίστοιχων εφαρμογών

Πειράματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων

Έλεγχος αντιμικροβιακών ιδιοτήτων υδρογελών

Εξοικείωση στην NMR Φασματοσκοπία (^1H and ^{13}C), UV-Visible Φασματοσκοπία, MALDI-TOF MS Φασματοσκοπία Μάζας, SEM Scanning Electron Microscopy, TEM Transmission Electron Microscopy.

Ικανότητες Η/Υ

Windows, Microsoft Office (Word, Excel, Power Point), Graphpad, OriginPro, TopSpin, SpectraGryph, Chemdraw

CURRICULUM VITAE

Personal Information

Name: Mitropoulou Konstantina

Address: Margouniou 18, Heraklion, Crete,
Greece 71306

Date of birth : December 15th 1996

Nationality: Greek

Contact information: *phone:* +30 6944072592
e-mail: konstantina.mitr@gmail.com

Education

10/2019-Today :Master Degree in Chemistry, University of Crete

Field of Advanced materials and Physical Chemistry,

Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Chemistry Department, Greece

Laboratory of Biomaterials, Materials Department, Greece

Master Thesis: Synthesis, Characterisation and self-assembly of dipeptides in depollution applications.”

10/2014–11/2019: Bachelor degree in Chemistry, University of Crete

Department of Chemistry, Greece (6.95/10)

Undergraduate Thesis: “Study of self-assembling peptide hybrids with porphyrins and protective groups”

Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Chemistry Department, University of Crete

Laboratory of Biomaterials, Materials Department, University of Crete

Teaching Experience

01/2020-06/2020: Student Practice Inorganic Laboratory assistant: University of Crete,

Department of Chemistry in Inorganic Chemistry Laboratory I, supervising by Prof.

Vardalachaki E.

09/2020-12/2020: Student Practice Inorganic Laboratory assistant: University of

Crete, Department of Chemistry in Inorganic Chemistry Laboratory II, supervising by

Prof. Terzakis S.

Work experience

05/2019–7/2019: Internship as Analytical Chemistry Laboratory Assistant in “Analysis”,

Nikolaos Fakourelis, Heraklion, Greece

Conferences/Seminars

8-10/05/2015: 12th Greek-Cypriot Chemistry Conference “Chemistry, a Pillar of Development in the Post-Crisis Era, Thessaloniki, Greece

Publications

Self-assembly of aliphatic dipeptides coupled with porphyrin and BODIPY chromophores

Nikoloudakis E, Mitropoulou K, Landrou G, Charalambidis G, Nikolaou V, Mitraki A, Coutsolelos AG Chem Commun (Camb), 55(94):14103-14106, 2019
DOI: [10.1039/c9cc06125h](https://doi.org/10.1039/c9cc06125h).

Foreign language

English: Certificate of Proficiency in English from the University of Michigan

German: Goethe-Zertifikat B1 Goethe Institute, State Certificate of Language Learning B2

Skills

Design, synthesis, isolation and characterization of chromophores and complicated organic compounds such as porphyrins.

Design, synthesis, isolation and characterization of peptides

Characterization of hydrogels and design of possible applications

Drug Release Experiments

Antimicrobial tests

Knowledge in NMR Spectroscopy (^1H and ^{13}C), UV-Visible Spectroscopy, MALDI-TOF MS Mass Spectroscopy, SEM Scanning Electron Microscopy, TEM Transmission Electron Microscopy

PC Skills

Windows, Microsoft Office (Word, Excel, Power Point), Graphpad Prism, OriginPro, TopSpin, SpectraGryph, Chemdraw

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πεπτιδικές υδρογέλες βρίσκουν πρόσφατα πληθώρα εφαρμογών σε τομείς όπως η ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων, αλλά και στην απορρύπανση του υδροφόρου ορίζοντα. Στην περίπτωση της ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων πιο συγκεκριμένα, πεπτιδικές υδρογέλες εγκαψυλιώνουν φαρμακευτικά προϊόντα και τα απελευθερώνουν στοχευμένα και με ελεγχόμενο ρυθμό στον οργανισμό. Μια τέτοια πεπτιδική υδρογέλη, σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία. Αρχικά, συντέθηκε το διπεπτιδίο Fmoc-Phe-Leu-OH, με μία καινοτόμα συνθετική πορεία που είναι απλή και σύντομη, ενώ το προϊόν απομονώνεται και καθαρίζεται εύκολα και σε μεγάλη απόδοση.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αυτοοργάνωση του διπεπτιδίου αυτού, το οποίο σχηματίζει σύμφωνα με το πρωτόκολλο καλού/κακού διαλύτη, που στην προκειμένη περίπτωση ήταν οι διαλύτες αιθανόλη/νερό, καλοσχηματισμένες υδρογέλες που αποτελούνται από ιώδεις δομές. Χρησιμοποιήσαμε αυτή την υδρογέλη σε συγκέντρωση πεπτιδίου 2 mg/ml και αναλογία διαλυτών 2.5:7.5 (αιθανόλη:νερό) για την εγκαψυλίωση της υδατοδιαλυτής πορφυρίνης [H₂-TMePyP(I₄)] και μελετήσαμε την απελευθέρωση της τελευταίας σε υδατικό περιβάλλον στους 36.6° C, με στόχο την προσομοίωση των συνθηκών στον ανθρώπινο οργανισμό. Καθορίστηκαν, έτσι, τρία βασικά χαρακτηριστικά αυτής της απελευθέρωσης: α) η υδρογέλη απελευθερώνει περίπου το 79.36% της αρχικά δεσμευμένης υδατοδιαλυτής πορφυρίνης εντός ενός χρονικού πλαισίου 24 ωρών; β) έπειτα από περίπου 48 ώρες η υδρογέλη αποδομείται, μία εξαιρετικά χρήσιμη ιδιότητα σε εφαρμογές drug delivery; γ) η απελευθέρωση του φαρμάκου φθάνει σε πλατό περίπου 6 ώρες κατόπιν της έναρξης της απελευθέρωσης. Τέλος, μελετήσαμε τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του συστήματός μας, αποτελούμενου από την υδρογέλη μαζί με την εγκαψυλιωμένη [H₂-TMePyP(I₄)]. Το σύστημα ελέγχθηκε έναντι βακτηρίων *E.coli* κάτω από διαφορετικές συνθήκες φωτός, συμπεριλαμβανομένης της πλήρους απουσίας φωτός και της φωτοβόλησης. Αποδείχτηκε ότι όταν τα δείγματα δεν φωτοβοληθούν παρουσιάζουν αντιβακτηριδιακή δράση στο *E.Coli*, χωρίς να έχουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, ενώ αν φωτοβοληθούν το δείγμα με την εγκαψυλιωμένη πορφυρίνη παρουσιάζει εντονότερη δράση ενάντια στο *E.Coli*.

Το δεύτερο σκέλος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν προσανατολισμένο στην κατεύθυνση της περιβαλλοντικής εξυγίανσης και περιέλαβε το σχεδιασμό μίας πεπτιδικής υδρογέλης για τη δέσμευση τοξικών οργανικών χρωσσεων και μεταλλικών ιόντων σε υδατικό περιβάλλον. Το πρώτο στάδιο ήταν η σύνθεση της πεπτιδικής υδρογέλης Fmoc-Phe-Leu-OH,

βάσει της συνθετικής πορείας που ήδη περιγράφηκε για την περίπτωση του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Ile-OH. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα του διπεπτιδίου αυτού να σχηματίζει υδρογέλες αλλά και organogels, σύμφωνα με το πρωτόκολλο καλού/κακού διαλύτη. Αποδείχθηκε ότι μείγμα αιθανόλης και νερού προωθεί το σχηματισμό υδρογέλης, ενώ μείγμα DCM και εξανίου/επτανίου προωθεί το σχηματισμό organogels, ενώ και οι δύο σχηματισμοί περιγράφονται από ινώδεις δομές.

Χρησιμοποιήσαμε αυτή την υδρογέλη σε συγκέντρωση πεπτιδίου 2 mg/ml και σε αναλογία διαλυτών 3:7 (αιθανόλη:νερό) για να μελετήσουμε την ικανότητά της να δεσμεύει τοξικές οργανικές χρώσεις και μεταλλικά ιόντα από το υδάτινο περιβάλλον και αποδείξαμε ότι 1 ml της συγκεκριμένης υδρογέλης μπορεί να απορροφήσει σε χρονικό πλαίσιο 3 ημερών το 89.38% της ποσότητας χρώσης Coomassie Brilliant Blue, 20 μ M και όγκου 1 ml, το 82.5% της ποσότητας χρώσης Methylene Blue, 3.2 μ M και όγκου 1 ml, το 85.35 % της ποσότητας χρώσης Congo Red, 10 μ M και όγκου 1 ml, 43.33% της ποσότητας μεταλλικών ιόντων Co^{2+} , 0.1 M και όγκου 1 ml και 58.85% της ποσότητας μεταλλικών ιόντων Ni^{2+} , 0.1 M και όγκου 1 ml. Μελετήσαμε περαιτέρω την ικανότητα της υδρογέλης για δέσμευση μεταλλικών ιόντων Ni^{2+} και Co^{2+} σε περιπτώσεις επαναχρησιμοποίησης και βρήκαμε πως η υδρογέλη διατηρεί την υψηλή της ικανότητα για τους πρώτους τέσσερις κύκλους επαναχρησιμοποίησης. Τέλος, ελέγξαμε και επιβεβαιώσαμε την ικανότητα του πεπτιδίου να δεσμεύει πετρελαιοειδή μέσω του σχηματισμού organogel.

Συμπερασματικά, τα πεπτίδια Fmoc-Phe-Ile-OH και Fmoc-Phe-Leu-OH αποδείχθηκε πως μπορούν να σχηματίσουν υδρογέλες με ποικιλία δυνητικών εφαρμογών όχι μόνο στη φαρμακευτική, αλλά και στην περιβαλλοντική εξυγίανση.

Λέξεις κλειδιά: αυτοοργάνωση, σύνθεση πεπτιδίων, πεπτιδικές υδρογέλες, πεπτιδικά organogels, υδρογέλες για απορρύπανση, μεταφορά φαρμάκου

ABSTRACT

Peptide-based hydrogels find recently a plethora of applications in fields such as drug-delivery, as well as groundwater remediation. In the case of drug-delivery in particular, the peptide-based hydrogels encapsulate pharmaceutical products and then release them inside the organism. The release is both targeted and controlled. Such a peptide-based hydrogel was designed and implemented during the presented thesis. Firstly, the dipeptide Fmoc-Phe-Ile-OH was synthesized through an innovative synthetic process that is both simple and quick, while the product is being isolated and cleaned easily and in high yields.

We have subsequently studied the self-assembly of this dipeptide. According to the protocol of good/ bad solvent, which in this case were the solvents ethanol/ water respectively, the dipeptide forms well-structured hydrogels, consisting of fibril structures. We used this hydrogel in a 2 mg/ml peptide concentration and solvent ratio 2.5:7.5 (ethanol:water) to encapsulate the water-soluble porphyrin [H₂-TMePyP(I₄)] and assessed the release of the latter in aqueous environment at 36.6° C, in order to simulate the conditions in the human organism. We have, thus, established three key aspects of this release: a) the hydrogel releases approximately 79.36% of the initially absorbed water-soluble porphyrin within a timeframe of 24h; b) the hydrogel is being degraded after approximately 48h, which constitutes a useful property for drug delivery applications; c) the release of the drug reaches a plateau approximately 6h after the initiation of its release. Finally, we have examined the antimicrobial properties of our system, consisted of the hydrogel along with the encapsulated [H₂-TMePyP(I₄)]. The system was checked against bacteria *E.coli* under different light conditions, including both absence of light and lighting conditions. All the samples were proven to have antibacterial properties against *E.Coli* in absence of light but with no significant difference between them. On the other hand, under light the sample with the encapsulated porphyrin was proven to have significantly better antibacterial action than the sample of the dipeptide.

The second part of the presented master thesis was oriented towards environmental remediation and included the design of a peptide-based hydrogel for the absorption of toxic organic dyes and metal ions in aqueous environments. The first step was the synthesis of the peptide-based hydrogel Fmoc-Phe-Leu-OH, following the same synthetic process as described above for Fmoc-Phe-Ile-OH dipeptide. We have afterwards examined the capacity of the dipeptide to form hydrogels and organogels according to the protocol of good/ bad

solvent. It was proven that ethanol and water promote the formation of hydrogels, whereas DCM and hexane/ heptane promote the formation of organogels, both formations consisting of fibril structures.

We used this hydrogel in a 2 mg/ml peptide concentration and solvent ratio 3:7 (ethanol:water) to examine its capacity to absorb toxic organic dyes and metal ions from aqueous environments and proved that 1ml of the given hydrogel can absorb within a timeframe of 3 days the 89.38% of 1ml Coomassie Brilliant Blue (20 μ M), the 82.5% of 1ml Methylene Blue (3.2 μ M), the 85.35 % of 1ml Congo Red (10 μ M), the 43.33% of 1ml metal ions Co^{2+} (0.1 M) and 58.85 % of 1ml metal ions Ni^{2+} (0.1 M). We have further examined the absorption capacity of the hydrogel against metal ions Ni^{2+} and Co^{2+} in cases of re-usage and found that the hydrogel maintains its high capacity for the first four cycles of re-usage. Finally, we have checked and confirmed the capacity of the dipeptide-based organogel to absorb petroleum products..

In conclusion, the dipeptides Fmoc-Phe-Ile-OH and Fmoc-Phe-Leu-OH were proven to form hydrogels offering a broad range of potential applications not only in pharmaceuticals, but in environment remediation as well.

Keywords: self-assembly, peptide synthesis, self-assembling peptides, peptide hydrogels, peptide organogels, depollution hydrogels, drug-delivery, porphyrin

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή

1.1	Αυτοοργάνωση.....	18
1.2	Πεπτίδια.....	18
1.3	Πορφυρίνες.....	20
1.4	Σύνδεση πεπτιδίων με αντικαρκινικά φάρμακα, μέσω click αντίδρασης [3+2] κυκλοπροσθήκης αλκινίου και αζιδίου καταλυόμενη από Cu(I)(CuAAC).....	21
1.5	Υδρογέλες.....	23
1.5.1	Υδρογέλες σε εφαρμογές απελευθέρωσης φαρμάκων.....	25
1.5.2	Υδρογέλες σε περιβαλλοντικές εφαρμογές.....	26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....

27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΥΝΘΕΣΗ

3.1	Σύνθεση διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Ile-OH.....	28
3.2	Σύνθεση διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.....	29
3.3	Σύνθεση υβριδικού μορίου Zn-di-N ₃ -DMP με Fmoc-D-Pra-OH.....	29
3.4	Χαρακτηρισμοί συνθετικής διαδικασίας.....	34
3.4.1	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	34
3.4.2	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectroscopy.....	35
3.4.3	Φασματοσκοπία Ορατού – Υπερύθρου UV-Vis.....	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΥΤΟΟΡΓΑΝΩΣΗ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

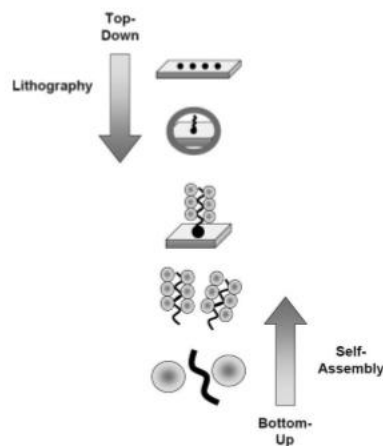
4.1	Διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Ile-OH.....	41
4.1.1	Σχηματισμός υδρογελών.....	41
4.1.2	Μικροσκοπία FESEM.....	43
4.1.3	Μηχανικές ιδιότητες.....	49

4.2 Διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Ile-OH.....	50
4.2.1 Σχηματισμός υδρογελών.....	50
4.2.2 Μικροσκοπία FESEM.....	51
4.2.3 Μηχανικές ιδιότητες.....	51
4.3 Τεχνικές Χαρακτηρισμού.....	55
4.3.1 FESEM – Field Emission Scanning Electron Microscopy.....	55
4.3.2 Sputtering.....	56
4.3.3 Μηχανικές ιδιότητες.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	58
4.1 Διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Ile-OH.....	58
4.1.1 Ελεγχόμενη απελευθέρωση της πορφυρίνης.....	58
4.1.2 Αντιμικροβιακός Έλεγχος της υδρογέλης του Fmoc-Phe-Ile-OH με εγκαψυλιωμένη πορφυρίνη.....	61
4.2 Διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH.....	65
4.2.1 Δέσμευση οργανικών χρώσεων και ιόντων μετάλλων.....	69
4.2.2 Επαναχρησιμοποίηση υδρογελών που έχουν δεσμεύσει ιόντα μετάλλων....	69
4.2.3 Δέσμευση πετρελαιοειδών.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

1.Εισαγωγή

1.1.Αυτο-οργάνωση

Αυτοοργάνωση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα απλά δομικά στοιχεία ενός συστήματος οργανώνονται σε καθορισμένες και πιθανώς λειτουργικές τρισδιάστατες δομές με μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Η οργάνωση αυτή αποτελεί συνέπεια των τοπικών αλληλεπιδράσεων των δομικών λίθων του συστήματος, οι οποίες είναι μη ομοιοπολικές, δεσμοί υδρογόνου, αρωματικές, υδροφοβικές, ηλεκτροστατικές, π-π stacking. Η αυτοοργάνωση συμβαίνει μέσω μοριακής αναγνώρισης, κατά την οποία οι δομικοί λίθοι “συνεργάζονται” ώστε να προκύψει η τρισδιάστατη υπερμοριακή δομή. Τα αποτελέσματα της αυτοοργάνωσης, δηλαδή οι δομές που προκύπτουν εξαρτώνται και από το περιβάλλον του συστήματος δηλαδή τους διαλύτες, την θερμοκρασία και τη συγκέντρωση αλλά και από τα χαρακτηριστικά των δομικών τους λίθων. Η φυσική και αυθόρμητη αυτή διαδικασία χαρακτηρίζεται ως bottom-up και σε αυτή στηρίζονται πολλές βιολογικές διεργασίες που είναι συνυφασμένες με τη ζωή. Αντίθετη της bottom-up είναι η προσέγγιση top-down που δεν είναι αυθόρμητη και πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας μικροτεχνικές π.χ. λιθογραφίας. [1,2]

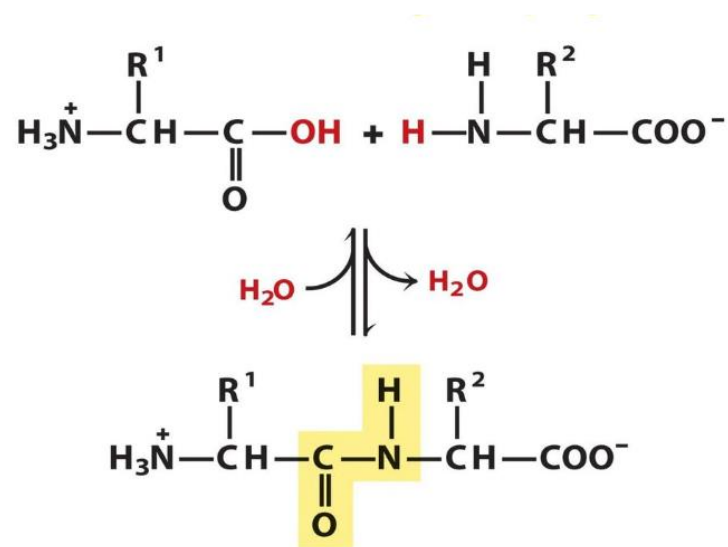


Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση των bottom-up και top-down προσεγγίσεων [1]

1.2 Πεπτίδια

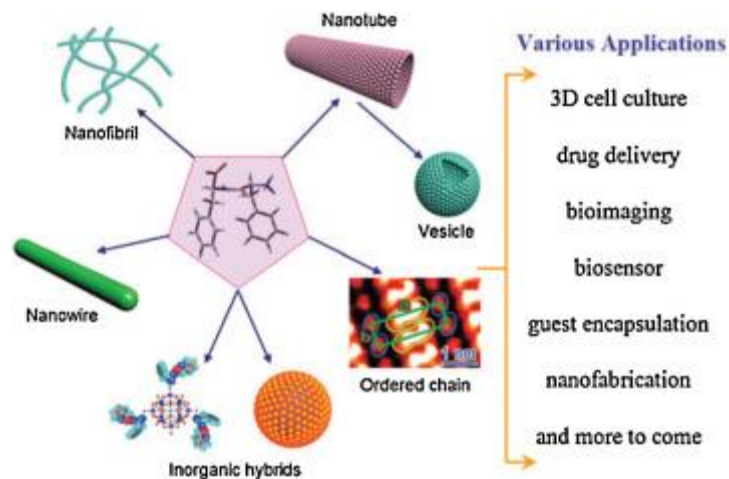
Πεπτίδιο η χημική ένωση που αποτελείται από δύο ή περισσότερα αμινοξέα που είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με πεπτιδικό δεσμό. Ο πεπτιδικός δεσμός συνάπτεται μεταξύ της

καρβοξυλομάδας του πρώτου αμινοξέος και της αμινομάδας του δεύτερου με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού.



Εικόνα 1.2: Σχηματισμός και υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού.

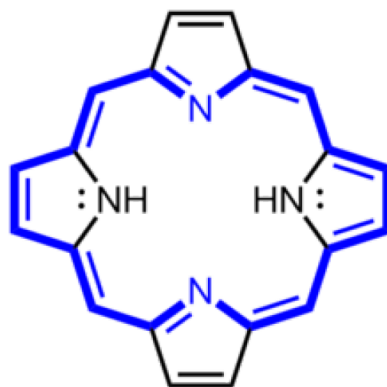
Οι νανοδομές με βάση τα πεπτίδια προσφέρουν εύρος εφαρμογών, λόγω της ποικιλομορφίας των αμινοξέων. Θεμελιώδες διπεπτίδιο που έχει αποτελέσει βάση πολλών ερευνών είναι η διφαινυλαλανίνη (FF) και αποτελεί τμήμα του μοτίβου αναγνώρισης KLVFFAE των β-αμυλοειδών πεπτιδίων που συνδέεται με ασθένειες όπως το Alzheimer, το Parkinson και ο διαβήτης τύπου 2. Οι αρωματικοί δακτύλιοι της φαινυλαλανίνης ενισχύουν τον σχηματισμό νανοσωλήνων καθώς στοιβάζονται, λειτουργώντας ως «κόλλα» μεταξύ των κυλίνδρων που έχουν προκύψει λόγω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου στα πεπτίδια. Οι αυτοοργανωμένες δομές προκύπτουν με μεταβολές στη θερμοκρασία, με αλλαγή στο pH ή με εναλλαγή οργανικών διαλυτών σε υδατικούς. [1,3] Η FF μπορεί να δημιουργήσει σύμπλοκα η ομοιοπολικά συνδεδεμένες ενώσεις με άλλα χημικά είδη και προκύπτουν διαφορετικές δομές. Ένα τέτοιο χημικό είδος είναι και οι πορφυρίνες. [4] Όμως δεν είναι μόνο η διφαινυλαλανίνη που έχει δυνατότητες να δημιουργήσει αυτοοργανωμένες δομές, αλλά το ίδιο έχει αποδειχθεί και για διπεπτίδια αλειφατικών αμινοξέων όπως η ισολευκίνη και η αλανίνη. Τα δύο αυτά αμινοξέα τα αναγνωρίζουμε στην αλληλουχία GAIIIGL η οποία διαθέτει αμυλοειδείς ιδιότητες, καθώς και αυτή αναγνωρίζεται σε β-αμυλοειδή πεπτίδια που σχετίζονται με το Alzheimer, αλλά και στον μίσχο του αδενοϊού του HIV. [5]



Εικόνα 1.3: Ποικιλία αυτοοργανωμένων δομών που προκύπτουν από το διπεπίδιο FF και κάποιες από τις εφαρμογές στις οποίες μπορούν να χρησιμεύσουν αυτές οι δομές [6]

1.3. Πορφυρίνες

Η πορφυρίνη είναι ένα μακροκυκλικό σύστημα που αποτελείται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους, ενωμένους κυκλικά με τέσσερις γέφυρες μεθινίου ($=C-$). Ανήκουν στις αρωματικές ενώσεις, υπακούουν δηλαδή στον κανόνα του Hückel για αρωματικότητα, κατέχοντας $4n + 2$ π ηλεκτρόνια. Κατά συνέπεια οι μακροκυκλικοί δακτύλιοι των πορφυρινών είναι εξαιρετικά συζυγή συστήματα και έχουν πολύ έντονες ζώνες απορρόφησης στο ορατό φάσμα και χρωματίζονται έντονα. Ο πορφυρινικός δακτύλιος έχει 22 π ηλεκτρόνια τα οποία επιτρέπουν στο μόριο να συμμετέχει σε ηλεκτρονιόφιλες αντιδράσεις και αντιδράσεις ριζών. Λόγω των πυρρολίων και του αρωματικού χαρακτήρα των ενώσεων ευνοούνται οι π - π αλληλεπιδράσεις στοιβάξης (π - π stacking) μεταξύ των μορίων των πορφυρινών καθώς και ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μαζί με άλλα μόρια, λόγω ύπαρξης του αζώτου. Τα εσωτερικά πυρρολικά άζωτα προσδίδουν στην πορφυρίνη επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα. Επιπλέον, έχουν sp^2 υβριδισμό. Τα δύο από αυτά σχηματίζουν σ δεσμό με υδρογόνο και το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων συνεισφέρει στην αρωματικότητα, ενώ τα άλλα δύο που δεν συνδέονται με υδρογόνο μπορούν να προσφέρουν το ζεύγος ηλεκτρονίων τους για συναρμογή με κάποιο μέταλλο. Οι πορφυρίνες μπορούν να συνδεθούν με όλα σχεδόν τα μέταλλα του Περιοδικού Πίνακα (με αριθμούς οξείδωσης +2, +3), αποτελούν άριστους υποκαταστάτες, και όταν δεν έχουν συνδεθεί με κάποιο μεταλλικό ιόν αντιμετωπίζονται ως ελεύθερες βάσεις.



Εικόνα 1.4: Η απλούστερη μορφή πορφυρίνης. (Χωρίς υποκαταστάτες)

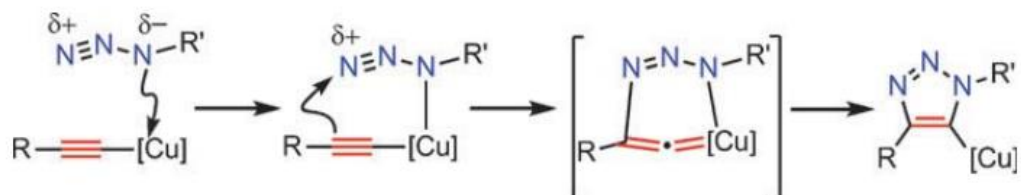
Την πορφυρίνη την συναντάμε συχνά στα βιολογικά συστήματα ως βασικό κομμάτι της χλωροφύλλης και της αίμης, που είναι η χρωμοφόρος ομάδα της μυοσφαιρίνης, της αιμοσφαιρίνης και των κυτοχρωμάτων. Όταν η πορφυρίνη συνδέεται με σίδηρο ονομάζεται αίμη. Μερικές από τις πολύ σπουδαίες εφαρμογές συνθετικών πορφυρινών καταγράφονται παρακάτω:

- Συνθετικές πορφυρίνες χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές και εντοπιστές όγκων στον ανθρώπινο οργανισμό.[7]
- Οι συνθετικές πορφυρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απεικόνιση των όγκων, αλλά και για την καταπολέμηση τους μέσω πειραματικής φωτοδυναμικής θεραπείας (experimental photodynamic therapy).[8]
- Λειτουργούν ως φωτοευαίσθητοποιητές. [9]
- Λειτουργούν ως χημικοί αισθητήρες. [10]
- Εμφανίζουν επίσης αντιμικροβιακές ιδιότητες. [11]
- Η χρήση τους σε dye-based ηλιακά φωτοβολταϊκά κύτταρα ως “αποθήκες” ενέργειας με τη μορφή φωτός. [12]
- Οι πορφυρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακά ηλεκτρονιακά εξαρτήματα. [13]

1.4 Σύνδεση πεπτιδίων με αντικαρκινικά φάρμακα, μέσω click αντίδρασης [3+2] κυκλοπροσθήκης αλκινίου και αζιδίου καταλύομενη από Cu(I) (CuAAC)

Η [3+2] κυκλοπροσθήκη αλκινίου και αζιδίου, μια αντίδραση που καταλύεται από Cu(I), ή αλλιώς click αντίδραση, είναι η αντίδραση ενός αζιδίου με ένα αλκίνιο με αποτέλεσμα μία 1,4 δι-υποκτεστημένη 1,2,3-τριαζόλη και παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα και απόδοση. Η

κατάλυση με χαλκό αλλάζει δραστικά τον μηχανισμό και την έκβαση της αντίδρασης και με μια σειρά διαδοχικών σταδίων οδηγεί στο 5-τριαζολυλο-χαλκο ενδιάμεσο. Ο σχηματιζόμενος δεσμός κλειδί C-N λαμβάνει χώρα μεταξύ του πυρηνόφιλου βινυλικού-β-άνθρακα και του ηλεκτρονιόφιλου ακραίου αζώτου του συναρμοσμένου οργανικού αζιδίου.

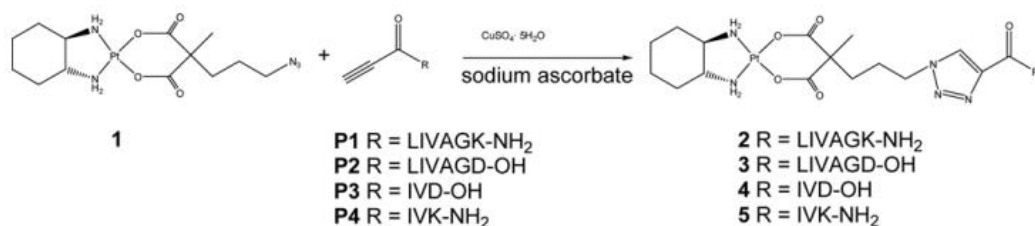


Σχήμα 1.1: Στάδια του σχηματισμού του δεσμού C-N στην αντίδραση CuAAC

Πρέπει να επισημανθεί πως από τις πιο κοινές οξειδωτικές καταστάσεις του χαλκού 0, +1 και +2, η +1 είναι η θερμοδυναμικά λιγότερο σταθερή. Το ιόν του μονοσθενούς χαλκού μπορεί να οξειδωθεί στο ανενεργό ή σε μίγμα Cu(0) και Cu(II). Το ασκορβικό νάτριο είναι ένα μέτριο αναγωγικό μέσο που προτάθηκε από τον Fokin και τους συνεργάτες του ως μια πρακτική επιλογή ώστε να διατηρηθεί ο χαλκός στην οξειδωτική κατάσταση +1. Επιπλέον, οι συνθήκες απουσίας ατμοσφαιρικού οξυγόνου συντελούν σε αυτό το σκοπό. [33]

Αυτή η click αντίδραση, εφαρμόζεται λοιπόν για την δημιουργία 1,2,3 τριαζολών, πολλές από τις οποίες έχουν ενδιαφέρουσες βιοιατρικές εφαρμογές, καθώς αποτελούν φαρμακοφόρα που πιθανώς παρεμβάλλονται στην έλικα του DNA, σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και μπορούν να δράσουν και ως υποκαταστάτες αμιδίων. Επιπλέον, υποκαταστάτες με τις τριαζόλες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σήμανση σε βιολογικά συστήματα [14]

Μια από τις εφαρμογές στις οποίες συναντάται η click χημεία, είναι η σύνδεση αντικαρκινικών φαρμάκων όπως πχ η cis-platin με αλειφατικά ολιγοπεπτίδια.[34] Στην προκειμένη περίπτωση, τα ολιγοπεπτίδια αυτό-οργανώνονται και λειτουργούν ως μεταφορείς του φαρμάκου με αποτέλεσμα την στοχευμένη, αλλά και ελεγχόμενη απελευθέρωση του φαρμάκου, μειώνοντας έτσι τις σοβαρές παρενέργειες της θεραπείας.



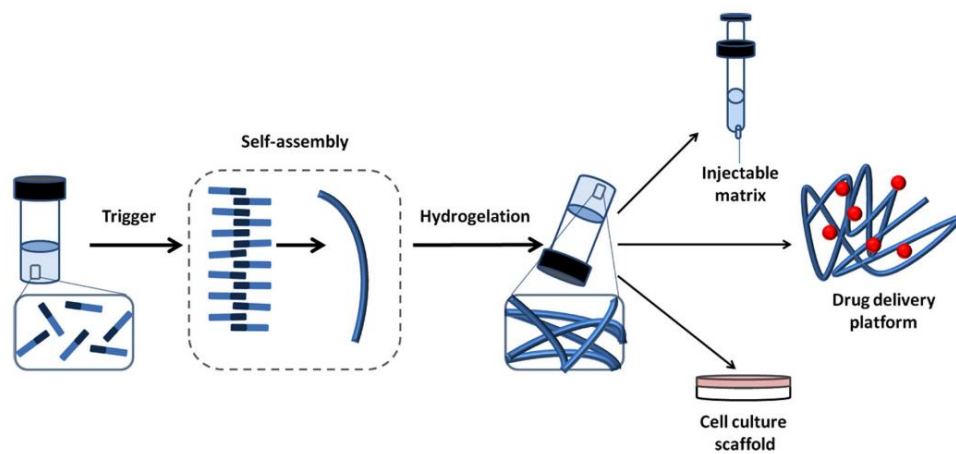
Σχήμα 1.2: Παράδειγμα σύνδεσης του αντικαρκινικού φαρμάκου oxaliplatin με αλειφατικά ολιγοπεπτίδια. [34]

Εντοπισμένες θεραπείες, με χρήση συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων, κατά τα οποία η γέλη έχει σχηματιστεί *in situ* και έχει ενέσιμα εισαχθεί απευθείας στον όγκο, αποτελούν μεθόδους μη παρεμβατικές, που μειώνουν τις παρενέργειες, πετυχαίνουν ικανοποιητική στόχευση και μειώνουν τον χρόνο και το κόστος νοσηλείας. Παράλληλα αν χρειαστεί χειρουργική αφαίρεση του όγκου, τέτοια συστήματα εμφυτεύονται ως βιομιμητικές εξωκυττάριας μήτρες, αναπλάθοντας τους ιστούς και παρέχοντας θεραπευτικές ιδιότητες. Τα ολιγοπεπτίδια αποτελούν ιδανικά βιομόρια για αυτές τις θεραπείες, καθώς μπορούν να έχουν ικανοποιητική διαλυτότητα, να είναι βιοσυμβατά, να αυτοοργανώνονται χωρίς την παρέμβαση φυσικοχημικών τεχνικών όπως ακτινοβολία UV, που δεν είναι συμβατή με αντικαρκινικά φάρμακα όπως η doxorubicin. [15]

1.5. Υδρογέλες

Οι υδρογέλες, είναι τρισδιάστατα πολυμερικά δίκτυα τα οποία είναι μη ρευστά και μπορούν να δεσμεύσουν μεγάλες ποσότητες νερού. Οι υδρογέλες χωρίζονται σε χημικές, αν η δόμηση τους οφείλεται σε cross-linking που έχει προκληθεί από κάποιο ανάλογο παράγοντα και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μονομερών είναι ομοιοπολικές και σε φυσικές αν είναι προϊόν μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, αρωματικές, υδροφοβικές, ηλεκτροστατικές, π-π stacking) μεταξύ των συστατικών του διαλύματος (συνθετικά πολυμερή, πολυσακχαρίτες, πεπτίδια, πρωτεΐνες) που οδηγούν σε αυτοοργάνωση. Ο σχηματισμός της υδρογέλης πυροδοτείται από αλλαγές στις συνθήκες του διαλύματος (pH, θερμοκρασία, προσθήκη αλάτων, αλλαγή διαλύτη) και ο χαρακτηρισμός τους μπορεί να γίνει με οπτική παρατήρηση, ρεολογικές μελέτες, οπτικοποίηση μέσω μικροσκοπίας και φασματοσκοπικές μελέτες. Οι φυσικές υδρογέλες ολιγοπεπτιδίων προσφέρονται για

βιοιατρικές εφαρμογές καθώς είναι ενέσιμες, ελαστικές και μη βιοσυσσωρεύσιμες, δηλαδή βιοαποικοδομήσιμες, καθώς ο πεπτιδικός δεσμός μπορεί να διασπαστεί από τις πρωτεάσες του οργανισμού με αποτέλεσμα μετέπειτα απέκκριση από τον οργανισμό. Επίσης διακρίνονται από βιοσυμβατότητα, γεγονός που καθιστά εφικτή τη σύνδεση λειτουργικών ομάδων που προσδίδουν στα βιολογικά και στα χημικά χαρακτηριστικά της υδρογέλης. Λόγω αυτής της βιοσυμβατότητας μπορούν να αποτελέσουν και ένα βιολογικά λειτουργικό gel που προσφέρεται για την ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών. Οι υδρογέλες πεπτιδίων μπορούν να αποτελέσουν ικανούς μεταφορείς φαρμάκων καθώς είναι μη τοξικές και ευαίσθητες σε αλλαγές στο περιβάλλον. Κατά συνέπεια μπορεί να ρυθμίζονται έτσι ώστε να παγιδεύουν την δραστική ουσία και να την απελευθερώνουν με ελεγχόμενο ρυθμό απελευθέρωσης που εξαρτάται από τις συνθήκες pH, συγκέντρωσης αλάτων στον επιθυμητό ιστό, κλπ.[16,17] Ορισμένες υδρογέλες εμφανίζουν αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητιακές και αντικές ιδιότητες. Τέτοιες είναι οι υδρογέλες κατιονικών πολυμερικών δικτύων και δικτύων μειγμάτων πολυμερών με ενώσεις με αντιμικροβιακές και αντικές ιδιότητες όπως επιφανειοδραστικά μόρια, νανοσωματίδια, πολικά λιπίδια και πολυπεπτίδια. [18]



Εικόνα 1.5: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας σχηματισμού υδρογέλης από πεπτίδια. Αρχικά τα μονομερή βρίσκονται σε διάλυμα. Αλλαγή στις συνθήκες πυροδοτεί αλληλεπίδραση μεταξύ τους και μείωση της διαλυτότητας. Τέλος προκύπτουν αυτοοργανωμένες ινώδεις δομές που σχηματίζουν υδρογέλη η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί σε ποικιλία εφαρμογών. [17]

Διπεπτίδια με ελεύθερο το αμινοτελικό τους άκρο συνήθως δεν μπορούν να σχηματίσουν υδρογέλες. Αντιθέτως η σύνδεση με προστατευτικές ομάδες όπως οι fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), παράγωγα ναφθαλένιου (Nap), βενζοθειαζίνη (PTZ), καρβοξυβενζόλιο (Cbz), azoben-zene (Azo), πυρένιο (Pyr), σπιροπυράνιο ή cinnamoyl συντελεί στον σχηματισμό υδρογελών καθώς οι αρωματικές ομάδες που διαθέτουν συνεισφέρουν στο π-π stacking και στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. [16,17]

1.5.1. Υδρογέλες σε εφαρμογές απελευθέρωσης φαρμάκων

Οι υδρογέλες μπορούν να αποτελέσουν ένα ενδιαφέρον σύστημα drug-delivery. Μέχρι στιγμής έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλούς κλάδους της ιατρικής, συμπεριλαμβανομένης της καρδιολογίας, της ογκολογίας, της ανοσολογίας, της επούλωσης πληγών και της διαχείρισης του πόνου. Οι υδρογέλες αποτελούνται από ένα δίκτυο πολυμερών που έχει προκύψει από crosslinking και έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (τυπικά 70-99%). Αυτό τους παρέχει φυσική ομοιότητα με τους ιστούς, και μπορεί να δώσει στις υδρογέλες εξαιρετική βιοσυμβατότητα αλλά και την ικανότητα να εγκαυλιώνει εύκολα υδρόφιλα φάρμακα. Το crosslinked πολυμερικό δίκτυο καθιστά τις υδρογέλες στερεές και μπορούν να διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα μηχανικών ιδιοτήτων. Για παράδειγμα, η ακαμψία τους μπορεί να είναι συντονιστική από 0.5kPa έως 5MPa, επιτρέποντας τις φυσικές τους ιδιότητες να ταιριάζουν με διαφορετικούς μαλακούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος. Οι υδρογέλες διαφέρουν σε μέγεθος, αρχιτεκτονική και λειτουργία, και αυτά τα χαρακτηριστικά υπαγορεύουν το αν οι υδρογέλες είναι κατάλληλες για τη χορήγηση φαρμάκων.

Οι υδρογέλες μπορούν να σχηματιστούν σχεδόν σε οποιοδήποτε μέγεθος και σχήμα. Οι μικροπόροι, εάν υπάρχουν, επηρεάζουν δραματικά τις συνολικές φυσικές ιδιότητες, ενώ επιτρέπουν την εγκαυλίωση και τη μεταφορά φαρμάκου. Είναι σημαντικό ότι το μέγεθος του πλέγματος διέπει τον τρόπο διάχυσης των φαρμάκων μέσα στο δίκτυο της υδρογέλης. Τέλος, σε μοριακή κλίμακα, διάφορες χημικές αλληλεπιδράσεις μπορεί εμφανίζονται μεταξύ των φαρμάκων και των πολυμερικών αλυσίδων. Ο στόχος του συστήματος είναι τόσο το φάρμακο όσο και η υδρογέλη να είναι χημικά και φυσικά σταθερά. Για το χαρακτηρισμό του συστήματος, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί ο τρόπος απελευθέρωσης του φαρμάκου από

την υδρογέλη ως προς τη διάρκεια διάθεσης του φαρμάκου (βραχυπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα) και ως προς το προφίλ απελευθέρωσης του (συνεχές ή παλμικό). Εκτός από τις γενικές απαιτήσεις, υπάρχουν και άλλες απαιτήσεις με βάση την εφαρμογή. [19]

1.5.2. Υδρογέλες σε περιβαλλοντικές εφαρμογές

Η ρύπανση των υδάτων είναι ένα από τα βασικά περιβαλλοντικά ζητήματα που απασχολούν την ανθρωπότητα σήμερα. Η διαρροή αργού πετρελαίου και πετρελαιοειδών στη θάλασσα είναι μια από τις κυριότερες πηγές ρύπανσης των θαλάσσιων υδάτων και αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για τα θαλάσσια οικοσυστήματα. Μέχρι στιγμής έχουν δοκιμαστεί διάφορες μέθοδοι για την αποκατάσταση τέτοιων περιπτώσεων όπως η βιοαποκατάσταση, η διασπορά και η στερεοποίηση. Παρόλα αυτά, όλες αυτές οι μέθοδοι έχουν παρουσιάσει αδυναμίες στη χρήση τους. Επίσης, hydrogels και organogels έχουν χρησιμοποιηθεί για την δέσμευση πετρελαιοειδών. [20]

Επιπλέον, τις τελευταίες δεκαετίες, εγείρονται ανησυχίες για τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις των αποβλήτων της βιομηχανίας υφασμάτων. Αυτό συμβαίνει γιατί πολλές οργανικές χρώσεις που αποβάλλονται στον υδροφόρο ορίζοντα, παρατηρείται να συσσωρεύονται μέσα στους ζωντανούς οργανισμούς με αποτέλεσμα την πρόκληση καταστροφής του γενετικού υλικού τους, η οποία μπορεί μακροπρόθεσμα να εκδηλωθεί. Επιπλέον οι βιομηχανίες εξόρυξης και επεξεργασίας μετάλλου και χρώσεων, ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για τη μόλυνση των υδάτων από τοξικά μέταλλα όπως το Co, Ni, Cd, Cr, Cu κ.α., προκαλώντας τη βιοσυσσώρευση τους στις τροφικές αλυσίδες. Συνεπώς, προκύπτει η ανάγκη για δέσμευση αυτών των λυμάτων με στόχο την πρόληψη των αρνητικών τους επιπτώσεων στο περιβάλλον και στον άνθρωπο.

Μέχρι στιγμής έχουν μελετηθεί διάφορες μέθοδοι δέσμευσης των παραπάνω ρύπων όπως η δέσμευση σε ενεργό άνθρακα, η χημική καθίζηση, η ανταλλαγή ιόντων αλλά και ηλεκτροχημικές τεχνικές. Αυτές οι μέθοδοι, έχει αποδειχθεί πως έχουν περιορισμένες δυνατότητες λόγω χαμηλής ευαισθησίας, αδυναμίας πλήρους απομάκρυνσης από τα ύδατα, παραγωγής τοξικών παραπροϊόντων και μεγάλων ενεργειακών απαιτήσεων. Για το λόγο αυτό, δημιουργείται χώρος για την ανάπτυξη νέων υλικών με βελτιωμένες ιδιότητες. Ένα τέτοιο υλικό, μπορεί να είναι οι υδρογέλες πεπτιδίων καθώς είναι υδατοπερατές, έχουν μεγάλη επιφάνεια διαθέσιμη για απορρόφηση και είναι απλές στη χρήση. Στις μέχρι στιγμής μελέτες, οι υδρογέλες πεπτιδίων έχουν παρουσιάσει υψηλή ευαισθησία απέναντι σε τοξικά

λήμματα, μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν, ενώ παράλληλα είναι βιοδιασπώμενες. Εκτός από το να ικανοποιεί τις παραπάνω ιδιότητες, ενδιαφέρον θα προκαλούσε μία υδρογέλη, η οποία θα σχηματιζόταν με συγκέντρωση πεπτιδίου κάτω από 0,1% και κατά συνέπεια θα κατατασσόταν στους “super-gelators”, όπως το παράδειγμα του διπεπτιδίου H-Leu-Phe-OMe. [21,22]

2. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

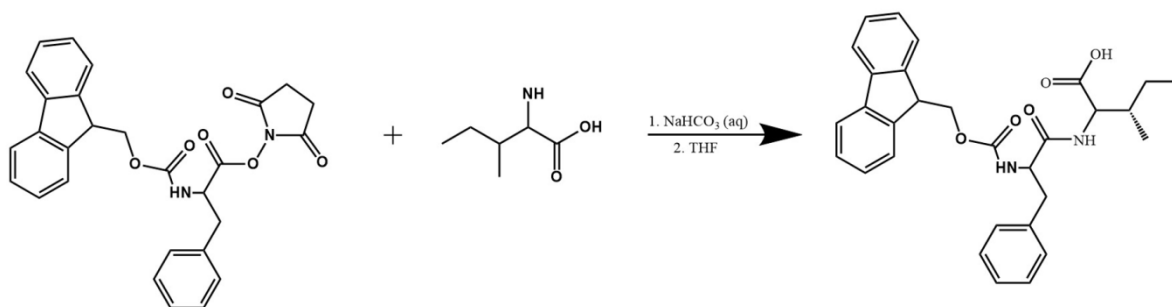
Τα τελευταία χρόνια, η μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα από διαρροές πετρελαιοειδών, αλλά και από τις οργανικές χρώσεις που αποβάλλουν τα εργοστάσια υφάσματος έχουν εγείρει έντονες ανησυχίες για το μέλλον των θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Οι υδρογέλες αποτελούν ένα υλικό που μπορεί να δεσμεύει τις τοξικές χρώσεις και τα πετρελαιοειδή και γι αυτό παρουσιάζουν ερευνητικό ενδιαφέρον. Η συγκεκριμένη εργασία, αρχικά, στοχεύει στο σχεδιασμό μιας απλής και γρήγορης συνθετικής μεθόδου προστατευμένων με Fmoc διπεπτιδίων που θα έχουν την ικανότητα να αυτοοργανώνονται σε υδρογέλες ή organogels με στόχο την αξιοποίηση τους στην δέσμευση πετρελαιοειδών, οργανικών χρώσεων και ιόντων μετάλλων από το υδάτινο περιβάλλον. Το διπεπτίδιο που συντέθηκε γι αυτό το σκοπό, ήταν το Fmoc-Phe-Leu-OH, με χρήση του αντιδραστηρίου Fmoc-Phe-OSu. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ικανότητα των υδρογελών που προέκυπταν από το εν λόγω διπεπτίδιο να απορροφούν οργανικές χρώσεις όπως το Methylene Blue, το Coomassie Brilliant Blue και το Congo Red, καθώς και μεταλλικά ιόντα Ni^{2+} και Co^{2+} . Τέλος ελέγχθηκε η ικανότητα του διπεπτιδίου να δεσμεύει πετρέλαιο, μέσω του σχηματισμού organogel.

Εκτός από την προστασία του περιβάλλοντος, οι πεπτιδικές υδρογέλες συναντώνται συχνά και στην φαρμακευτική. Λόγω του ότι είναι βιοσυμβατές, βιοαποικοδομήσιμες και μπορούν να εγκαυλιώνουν υδρόφιλα φάρμακα, συναντώνται σε εφαρμογές ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων. Σε αυτό το σημείο συντέθηκε με την ίδια με παραπάνω μεθοδολογία το διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Ile-OH και στις υδρογέλες στις οποίες αυτοοργανώθηκε εγκαυλιώθηκε η υδατοδιαλυτή πορφυρίνη [H_2 -TMePyP(I_4)]. Στη συνέχεια μελετήθηκε η ελεγχόμενη απελευθέρωση της πορφυρίνης στους 37° C σε υδατικό περιβάλλον σε πλαίσιο 24 ωρών και η αντιβακτηριδιακή δράση της πεπτιδικής υδρογέλης, αλλά και τις πεπτιδικής υδρογέλης συνδυαστικά με την υδατοδιαλυτή πορφυρίνη ενάντια στο E.Coli.

Τέλος, δοκιμάστηκε η σύνθεση ενός υβριδικού μορίου του πεπτιδίου Fmoc-D-Pra-OH, ομοιοπολικά συνδεδεμένου με την πορφυρίνης Zn-aa, di-azido-DMP μέσω click αντίδρασης, με στόχο την μελέτη των αντικαρκινικών του ιδιοτήτων.

3. Σύνθεση

3.1 Σύνθεση διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Ile-OH

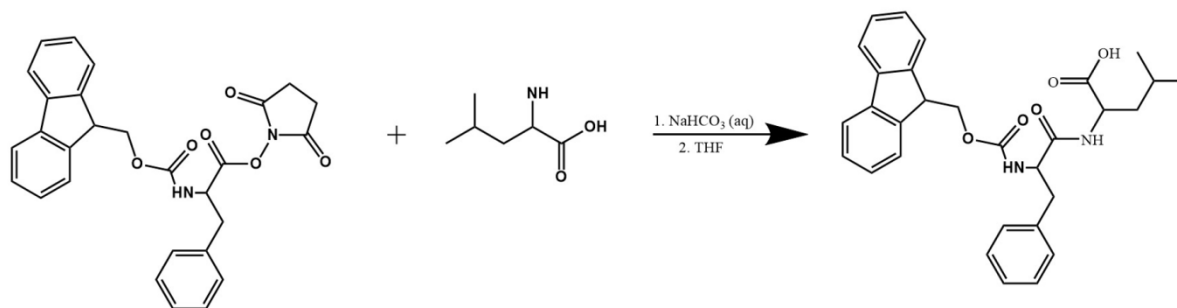


Σχήμα 3.1: Αντίδραση σχηματισμού του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Ile-OH από το Fmoc-Phe-OSu και το H-Ile-OH.

80 mg H-Ile-OH (1,5 eq) διαλύθηκαν σε 5 ml υδατικού διαλύματος που περιείχε 110 mg NaHCO_3 (3eq). Αντιστοίχως, 207 mg Fmoc-Phe-OSu (1eq) διαλύθηκαν σε 5 ml THF. Τα δύο αυτά διαλύματα αναμείχθηκαν μεταξύ τους και αφέθηκαν υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις αρχικά με 50 ml ethyl acetate και 50 ml HCl 1M, και στη συνέχεια η υδατική φάση εκπλένεται περαιτέρω με ethyl acetate. Έπειτα εκπλένεται η οργανική φάση με υδατικό διάλυμα NaCl, απομονώνεται η οργανική φάση, και το προϊόν απομονώνεται τελικά μετά από την απομάκρυνση του ethyl acetate. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 40%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6):), 8.24 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.61 (m, $J= 8$ Hz, 3H), 7.40 (m, $J= 3.5$ Hz, 2H), 7.29 (m, $J=8.56$ Hz, 6H), 7.18 (t, $J=7.25$ Hz, 1H), 4.27 (m, $J=9.2$ Hz, 2H), 4.14 (d, $J=6.2$ Hz, 3H), 4.12 (d, $J=6.5$ Hz 3H), 3.01 (dd, $J_1=3.5$ Hz, $J_2=14$ Hz 1H), 2.75 (dd, $J_1=15$ Hz, $J_2 =11$ Hz, 1H), 1.66 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 1.55 (m, $J=3.63$ Hz, 2H) 0.89 (d, $J=6,5$ Hz, 3H) 0.84 (d, $J=6.5$ Hz, 3H) ppm

3.2 Σύνθεση διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH



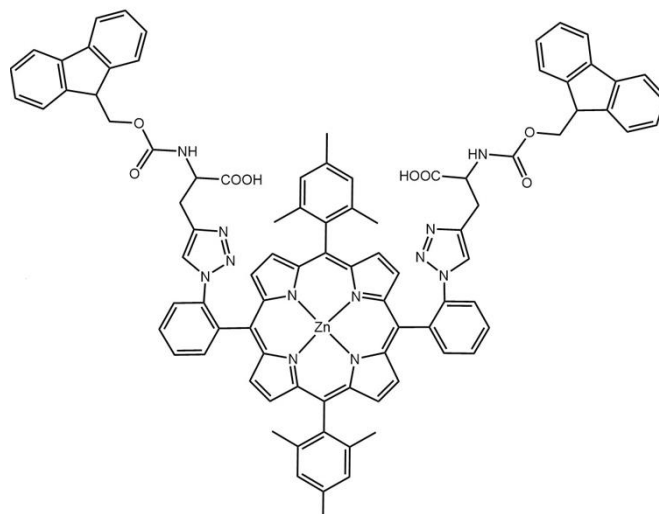
Σχήμα 2.2: Αντίδραση σχηματισμού του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH από το Fmoc-Phe-OSu και το H-Leu-OH.

80 mg H-Leu-OH (1,5 eq) διαλύθηκαν σε 5 ml υδατικού διαλύματος που περιείχε 110 mg NaHCO₃ (3eq). Αντιστοίχως, 207 mg Fmoc-Phe-OSu (1eq) διαλύθηκαν σε 5 ml THF. Τα δύο αυτά διαλύματα αναμείχθηκαν μεταξύ τους και αφέθηκαν υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις αρχικά με 50 ml ethyl acetate και 50 ml HCl 1M, και στη συνέχεια η υδατική φάση εκπλένεται περαιτέρω με ethyl acetate. Έπειτα εκπλένεται η οργανική φάση με υδατικό διάλυμα NaCl, απομονώνεται η οργανική φάση, και το προϊόν απομονώνεται τελικά μετά από την απομάκρυνση του ethyl acetate. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 40%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆):), 8.23 (d, J=7.5 Hz, 6H), 7.88 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.61 (m, J= 8 Hz, 3H), 7.40 (m, J= 2.92 Hz, 2H), 7.29 (m, J=7.70 Hz, 6H), 7.18 (t, J=7.25 Hz, 1H), 4.58 (m, J=5.6 Hz, 2H), 4.15 (s, 3H), 4.12 (t, J=25.75 Hz 3H), 3.02 (dd, J₁=4.75 Hz, J₂=14.25 Hz 6H), 2.77 (m, J=8.33 Hz, 1H), 1.66 (t, J=.25 Hz, 1H), 1.55 (m, J=3.63 Hz, 2H) 0.893 (d, J=6,5 Hz, 3H) 0.845 (d, J=6.5 Hz, 3H) ppm

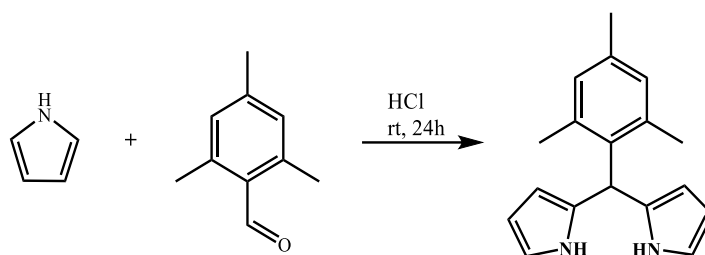
3.3 Σύνθεση υβριδικού μορίου Zn-di-N3-DMP με Fmoc-D-Pra-OH

Ο στόχος της συνθετικής αυτής πορείας ήταν να συντεθεί η υβριδική ένωση που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.1. Στην ένωση αυτή μία άζιδο-υποκατεστημένη πορφυρίνη έχει ενωθεί ομοιοπολικά με το πεπτιδίο Fmoc-Pra-OH μέσω αντίδρασης click. Η συνθετική πορεία έφτασε μόνο μέχρι τη σύνθεση της πορφυρίνης καθώς το τελικό προϊόν ήταν ασταθές και δεν μπορούσε να απομονωθεί.



Εικόνα 3.1: Η άζιδο-υποκατεστημένη πορφυρίνη έχει ενωθεί ομοιοπολικά με το πεπτίδιο Fmoc-Pra-OH μέσω αντίδρασης click.

Σύνθεση του 2,2'-(mesitylmethylene)bis(1*H*-pyrrole)

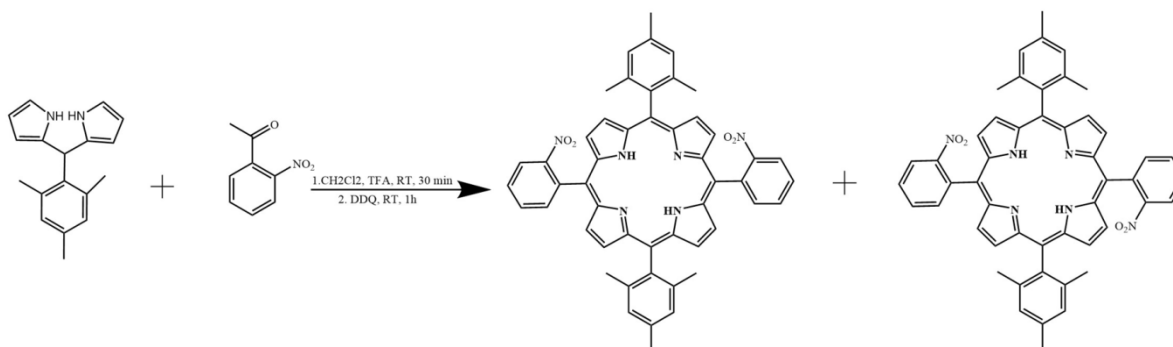


Σχήμα 3.3: Αντίδραση σχηματισμού mesityl dipyrromethane από πυρρόλιο και 2,4,6-trimethylbenzaldehyde.

Σε ξηρή σφαιρική φιάλη των 1000 ml γίνεται προσθήκη 200 ml αραιού διαλύματος HCl 0,18N μαζί με 4 gr (1eq) 2,4,6-trimethylbenzaldehyde και 5.6 ml (3eq) πυρρολίου. Η φιάλη αφήνεται απουσία φωτός, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εκχύλιση με 150 ml DCM και 150 ml απιονισμένου νερού, με σκοπό την απομάκρυνση της υδατικής φάσης. Ακολουθεί εξουδετέρωση του διαλύματος με 200 ml NaHCO₃ και ρύθμιση του pH περίπου στο 8. Η οργανική φάση συλλέγεται και αποστάζεται μέχρι ξηρού. Τέλος, πραγματοποιείται καθαρισμός του mesityl dipyrromethane με χρωματογραφία στήλης silica (SiO₂) και διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂/ Hexane σε αναλογία όγκων 3:7. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 26.6%.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.94 (s, 2H), 6.87 (s, 2H), 6.66 (m, 2H), 6.17 (m, 2H), 6.02 (s, 2H), 5.93 (s, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.06 (s, 6H) ppm.

Σύνθεση της $\alpha\alpha$, di- NO_2 -DMP, $\alpha\beta$, di- NO_2 -DMP

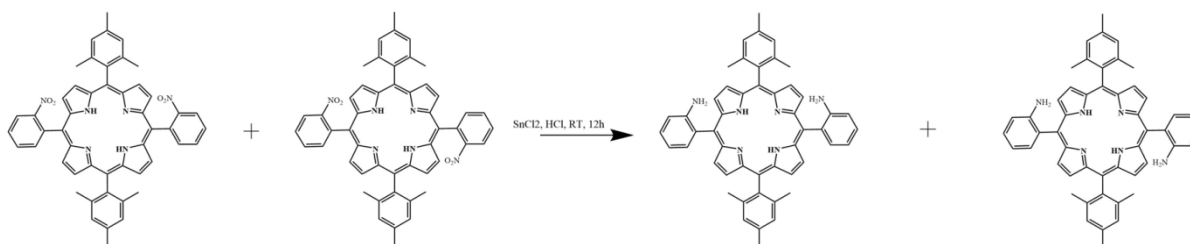


Σχήμα 3.4: Αντίδραση σχηματισμού των $\alpha\alpha$, di- NO_2 -DMP, $\alpha\beta$, di- NO_2 -DMP

Σε ξηρή δύλιμη σφαιρική φιάλη των 500 ml και υπό αδρανείς συνθήκες πραγματοποιείται διάλυση 1 gr (1eq) mesityl dipyrromethane και 578 mg (1 eq) 2-nitro-aldehyde σε 390 mL CH_2Cl_2 , στην οποία γίνεται απαέρωση υπό ροή N_2 για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται σταγόδη 0,55 ml TFA και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά την πάροδο 30 λεπτών προστίθεται 950 mg (1eq) DDQ και η ανάδευση συνεχίζεται για ακόμα μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, όπου το χρώμα του διαλύματος μετατρέπεται από κόκκινο σε πράσινο. Ακολουθεί ήπια εξουδετέρωση του TFA με 0,6 ml triethylamine και το μίγμα μεταφέρεται σε σφαιρική όπου και συμπυκνώνεται υπό κενό στους 40°C . Έπειτα πραγματοποιείται φιλτράρισμα του μίγματος σε κολώνα χρωματογραφίας silica με διαλύτη έκλουσης CH_2Cl_2 . Το μίγμα των δυο ατροποϊσομερών συλλέγεται ως στερεό μοβ χρώματος.

HRMS (MALDI-TOF): calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_4$: 788.91 $[\text{M}]^+$, found 788.91 $[\text{M}]^+$

Σύνθεση των $\alpha\alpha$, di- NH_2 -DMP και $\alpha\beta$, di- NH_2 -DMP



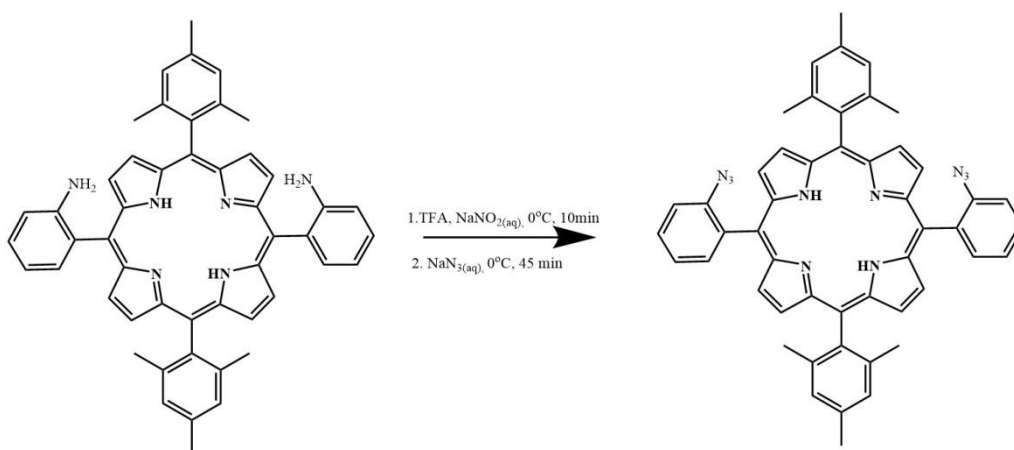
Σχήμα 3.5: Αντίδραση σχηματισμού των $\alpha\alpha$, di- NH_2 -DMP και $\alpha\beta$, di- NH_2 -DMP.

Σε μία σφαιρική των 250 mL διαλύονται 550 mg (1 eq) από το μίγμα των δύο ατροποϊσομερών σε 50 mL CH₂Cl₂ και ακολουθεί προσθήκη 50 ml HCl 12N και 950 mg (20 eq) διχλωριούχου κασσίτερου SnCl₂, όπου και το χρώμα γίνεται πράσινο. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες, αφού έχει εξασφαλιστεί η προστασία του από το φως. Έπειτα από 12 ώρες και αφού έχει ολοκληρωθεί η αντίδραση (έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC και διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂-εξάνιο σε αναλογία διαλυτών 8:2) γίνεται εξουδετέρωση του HCl με πυκνή διάλυμα αμμωνίας (NH₃, 3mL) 20% κ.β. Ακολουθούν εκπλύσεις με υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (3x100 ml) καθώς και κορεσμένου διαλύματος NaCl (2x100ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο MgSO₄, το οποίο στη συνέχεια φιλτράρεται και απομακρύνεται. Το προκύπτον διάλυμα συμπυκνώνεται και φορτώνεται σε κολώνα χρωματογραφίας silica με διαλύτη έκλουσης ξεκινώντας με CH₂Cl₂- Hexane σε αναλογία διαλυτών 6:4 και αυξάνοντας σταδιακά την πολικότητα. Αρχικά εκλύεται το αβ ατροποϊσομερές (απόδοση 35%), ενώ έπειτα απομονώνεται το αα-ατροποϊσομερές. (απόδοση 24%).

αα,di-NH₂-DMP: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 8.84 (d, J=4.63 Hz, 4H), 8.69 (d, J= 4.62 Hz, 4H), 7.92 (d, J= 7.39 Hz, 2H), 7.59 (t, J= 7.82 Hz, 2H), 7.28 (s, 2H), 7.27 (s, 2H), 7.17 (t, J= 7.43 Hz, 2H), 7.10 (d, J= 8.15 Hz, 2H), 3.55 (s, 4H), 2.63 (s, 6H), 1.88 (s, 6H), 1.80 (s, 6H), -2.58 (s, 2H)

αβ,di-NH₂-DMP: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 8.83 (d, J=4.60 Hz, 4H), 8.68 (d, J= 4.62 Hz, 4H), 7.85 (d, J= 7.39 Hz, 2H), 7.59 (t, J= 7.82 Hz, 2H), 7.27 (s, 4H), 7.15 (t, J= 7.39 Hz, 2H), 7.11 (d, J= 8.20 Hz, 2H), 3.61 (s, 4H), 2.62 (s, 6H), 1.84 (s, 12H), -2.58 (s, 2H)

HRMS (MALDI-TOF): calcd for C₅₀H₄₄N₆: 728.94 [M]⁺, found 728.04 [M]⁺



Σχήμα 3.6: Αντίδραση σχηματισμού των α-5,15-bis(2-azido-phenyl)10,20-bis-(2,4,6-trimethyl) porphyrin.

Σύνθεση της αα, di-N₃-DMP

Μία σφαιρική φιάλη των 10 ml, τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο ώστε οι θερμοκρασιακές συνθήκες να είναι 0°C και έπειτα εισήχθησαν 0.05 gr (1 eq) αα, di-NH₂-DMP τα οποία διαλύθηκαν σε 1 ml TFA και τέθηκαν υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0.5 ml υδατικού διαλύματος NaNO₂ συγκέντρωσης 1.72 M (20 eq) και έπειτα από την πάροδο 10 λεπτών προστέθηκαν 0.5 ml υδατικού διαλύματος NaN₃ συγκέντρωσης 1.85 M (20 eq) και αφέθηκε υπό ανάδευση για 45 λεπτά. Στο προκύπτον διάλυμα προστίθεται DCM και εκχυλίζεται σε διαχωριστική χωάνη εναλλάσσοντας τους διαλύτες H₂O (x3), NaHCO₃ (x3) (για την εξουδετέρωση του TFA) και H₂O (x3). Η οργανική φάση απομονώνεται, ξηραίνεται με άνυδρο MgSO₄, το οποίο έπειτα φιλτράρεται και απομακρύνεται. Το DCM απομακρύνεται με απόσταξη και το στερεό που προκύπτει καθαρίζεται σε κολώνα χρωματογραφίας silica gel, ξεκινώντας με διαλύτη έκλουσης το DCM/Hexane σε αναλογία όγκου 4:6 και αυξάνοντας σταδιακά πολικότητα. Προέκυψαν 0.0036 gr προϊόντος. Η απόδοση είναι 7.6 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 8.67 (dd, J₁=4.75 Hz, J₂=15 Hz, 8H), 8.11 (dd, J₁=1.5 Hz, J₂=7.5 Hz, 2H), 7.86 (t, J= 8.13 Hz, 2H), 7.6 (dd, J₁= 0.75 Hz, J₂ = 8Hz, 2H), 7.5 (m, J=7.5 Hz, 2H), 7.3 (d, 5H), 2.65 (s, 6H), 1.91 (s, 6H), 1.85 (s, 6H) , -2.53 (s, 2H) ppm



Σχήμα 3.8: Αντίδραση σχηματισμού των Zn-αα, di-N₃-DMP

3.3.5 Σύνθεση της Zn-aa, di-N₃-DMP

300 mg (20 eq) οξικού ψευδαργύρου διαλύθηκαν σε 4.2 ml μεθανόλης. 50 mg (1 eq) aa-di-N₃-DMP διαλύθηκαν σε 21.5 ml DCM. Τα δύο παραπάνω διαλύματα προστέθηκαν σε μια σφαιρική φιάλη, και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 48 ώρες. Με χρωματογραφία TLC και φασματοσκοπία UV-Vis επιβεβαιώνεται η ολοκλήρωση της μετάλλωσης. Τότε στο διάλυμα προστίθεται 1 ml τριεθυλαμίνης και η σφαιρική υποβάλλεται σε απόσταξη των διαλυτών. Το τελικό προϊόν διαχωρίζεται σε κολώνα χρωματογραφίας και είναι στερεό μωβ χρώματος.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 8.77 (d, J=4.5 Hz, 4H), 8.75 (d, J=4.5 Hz, 4H), 8.13 (dd, J₁=1.25 Hz, J₂=3.6 Hz, 2H), 7.85 (t, J= 15.75 Hz, 2H), 7.56 (m, J= 12 Hz, 4H), 7.3 (d, J=6 Hz, 4H), 2.65 (s, 6H), 1.88 (s, 6H), 1.85 (s, 6H)

3.4 Χαρακτηρισμοί συνθετικής διαδικασίας

3.4.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Όλα τα φάσματα NMR λήφθηκαν μέσω του φασματομέτρου Bruker AVANCE III-500 MHz και κάνοντας χρήση δευτεριωμένων διαλυτών. Η σωστή απόδοση των κορυφών έγινε βάσει τον εκάστοτε χρησιμοποιούμενου διαλύτη που λειτούργησε και ως εσωτερικό πρότυπο.

Η φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια μορφή φασματομετρίας απορρόφησης, όπου το δείγμα που βρίσκεται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (4 έως 900 MHz) και οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας μεταβαίνουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αντιστροφή του spin. Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, οι πυρήνες έχουν συντονισθεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, απ' όπου προκύπτει και ο όρος «συντονισμός».

Η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που παρατηρείται από την αλληλοεπίδρασή της με τους πυρήνες του αναλύτη, είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα, με αποτέλεσμα η μέθοδος NMR να αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την ταυτοποίηση της δομής οργανικών ενώσεων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους και για το χημικό «περιβάλλον» των πυρήνων των ατόμων στα μόρια των χημικών ενώσεων.

Η φασματομετρία NMR είναι συμπληρωματική των άλλων φασματομετρικών μεθόδων, όπως της φασματομετρίας μάζας και της φασματομετρίας υπέρυθρου για την ταυτοποίηση της

δομής ακόμα και εξαιρετικά περίπλοκων μορίων. Επιπλέον συμβάλλει στη στερεοχημική ταυτοποίηση των οργανικών ενώσεων παρέχοντας τη συγκεκριμένη στερεοχημική διάταξη του ανθρακικού σκελετού με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο, δεδομένου ότι οι πυρήνες που εξετάζονται ως επί το πλείστον στο NMR για την οργανική ανάλυση είναι το υδρογόνο (^1H) και ο άνθρακας (^{13}C).

Οι καινούριες εξελίξεις στη φασματομετρία NMR, όπως ο συνδυασμός με την τεχνική μετασχηματισμού Fourier (FT-NMR) και η ανάπτυξη δισδιάστατων (2D) και πολυδιάστατων (multidimensional) τεχνικών NMR, έδωσαν άλλες διαστάσεις στη χαρτογράφηση της δομής οργανικών ενώσεων.



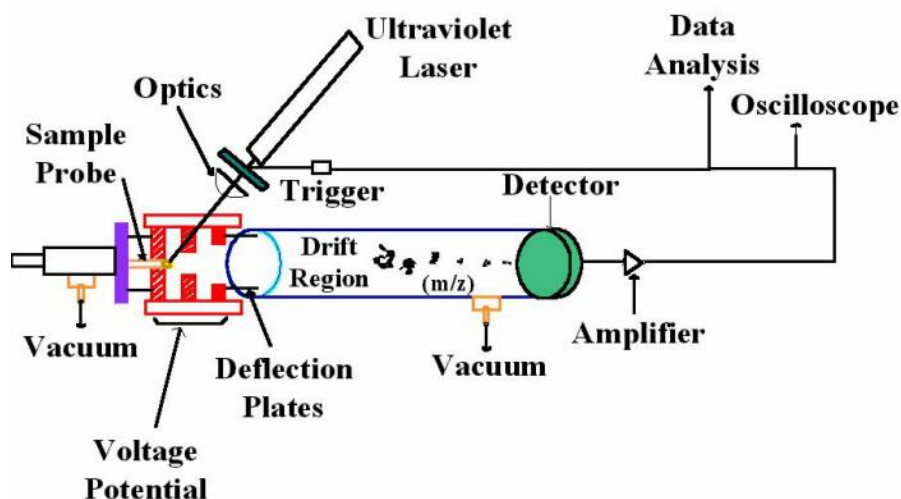
Εικόνα 3.2: Όργανο NMR 500 MHz, Bruker.

3.4.2 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectroscopy

Τα φάσματα μάζας υψηλής ανάλυσης καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF χρησιμοποιώντας ως προστατευτική μήτρα *trans*-2-[3-(4-*tert*-butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile (DCTB).

Η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα είδος φασματοσκοπίας μάζας κατά την οποία χαρακτηρίζονται συνθετικά πολυμερή με κριτήριο τη μοριακή τους μάζα. Βασίζεται στη παραγωγή ιόντων κατά τον ιονισμό του μορίου και τον διαχωρισμό τους βάσει του λόγου m/z , όπου m η μάζα του ιόντος και z το φορτίο του ιόντος. Η μέθοδος αυτή εμφανίζει εξαιρετική ακρίβεια. Για

την πραγμάτωση αυτής της τεχνικής αρχικά αναμειγνύεται η ένωση που είναι προς χαρακτηρισμό με την μήτρα σε κατάλληλο διαλύτη. Στη συνέχεια απομακρύνεται ο διαλύτης με αποτέλεσμα το σχηματισμό ομογενών κρυστάλλων με ομοιόμορφη διασπορά πολυμερούς. Τέλος το δείγμα ακτινοβολείται με UV laser στην μήτρα, η οποία ατμοποιείται μερικώς και άθικτα μόρια πολυμερούς περνούν στην αέρια φάση. Ο χρόνος πτήσης ανιχνεύεται από ανιχνευτή TOF-MS και από τον χρόνο πτήσης υπολογίζεται η μάζα του πολυμερούς. (23)



Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του MALDI MS.

Η χρήση της μήτρας, αποτελεί την βασική ιδιαιτερότητα της μεθόδου. Αναλυτικότερα, απορροφά την ενέργεια που δίνει το laser με αποτέλεσμα, η ένωση να μένει άθικτη, απορροφά στο μήκος κύματος που εκπέμπει το laser έτσι ώστε ο αναλύτης να μην απορροφά σημαντικά, απομονώνει το ένα μόριο πολυμερούς από τα άλλα, μειώνει σημαντικά τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και κατά συνέπεια μειώνεται η ενέργεια εξαέρωσης, συμμετέχει στη δημιουργία ιόντων και δίνει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού ενώσεων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (της τάξεως των pM). Συνολικά, αποτελεί μία γρήγορη και ακριβή μέθοδο χαρακτηρισμού πολυμερών μεγάλου μοριακού (>200.000 Da), διατηρώντας άθικτο το δείγμα. [24]

3.4.3 Φασματοσκοπία Ορατού – Υπερύθρου UV-Vis

Τα φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1700 PharmaSpec χρησιμοποιώντας κυψελίδες μήκους διαδρομής 1 cm.

Η φασματοφωτομετρία UV-Vis είναι μία φασματοσκοπική μέθοδος χημικής ανάλυσης που χρησιμοποιείται για την επίλυση χημικών προβλημάτων που αφορούν τη δομή, την κινητική, την ταυτοποίηση, αλλά και την ποσοτική ανάλυση διάφορων ενώσεων. Η μέθοδος αυτή απαιτεί μικρή ποσότητα δείγματος, είναι μη καταστρεπτική, είναι ακριβής, γρήγορη και ευαίσθητη.

Στην περίπτωση της φασματοφωτομετρίας UV-Vis, το δείγμα, απορροφά την ακτινοβολία στην υπεριώδη περιοχή (ενέργεια περίπου 100 Kcal/mole) και συνεπώς, προκαλούνται μεταβολές ηλεκτρονιακές, δόνησης και περιστροφής. Οι ηλεκτρονιακές και οι δονητικοπεριστοφικές ταινίες είναι γειτονικές και αδύνατο να διαχωριστούν και γι αυτό, το τελικό αποτέλεσμα είναι η λήψη ευρείων κορυφών. Στο υπεριώδες διακρίνονται δύο περιοχές, το εγγύς υπεριώδες (400 με 190 nm) και το άπω υπεριώδες (190 με 100 nm). Συνήθως στο άπω υπεριώδες δεν επιτρέπονται μετρήσεις, διότι οι κυψελίδες χαλαζία και το ατμοσφαιρικό οξυγόνο δεν επιτρέπουν απορρόφηση κάτω από τα 190 nm. Για να πραγματοποιηθεί απορρόφηση ακτινοβολίας, τα φωτόνια που προσκρούουν στο δείγμα πρέπει να έχουν ενέργεια ίση με αυτή που χρειάζεται για να προκληθεί μια κβαντισμένη ενεργειακή μεταβολή.

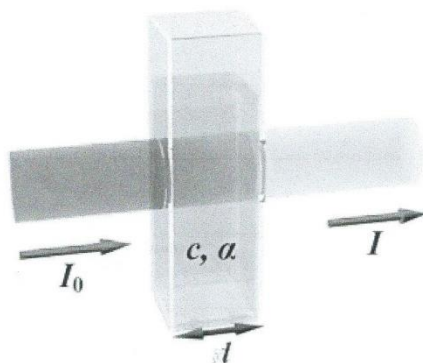
Η ενέργεια των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων είναι της τάξης μερικών eV, δίνεται δε από τον τύπο:

$$E = E_1 - E_2 = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

Όπου: E είναι η ενέργεια, h η σταθερά του Planck, ν η συχνότητα της ακτινοβολίας και λ το μήκος κύματος.

Η απορρόφηση της ακτινοβολίας εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας που απορροφά την ακτινοβολία, συνεπώς η UV-Vis φασματοφωτομετρία μπορεί να δώσει ποσοτικές μετρήσεις.

Η ποσοτική σχέση δίνεται από το νόμο Beer-Lambert.



Σχήμα 3.9: Ακτινοβολία αρχικής έντασης I_0 διέρχεται μέσα από κυψελίδα, η οποία περιέχει κάποιο διάλυμα χημικής ουσίας και εξέρχεται με τελική ένταση I .

Σύμφωνα με το νόμο Beer-Lambert ισχύει:

$$I = I_0 e^{-\alpha Cl} \quad (2)$$

Όπου: c είναι η συγκέντρωση του διαλύματος, l η διαδρομή που κάνει η ακτινοβολία μέσα στο διάλυμα και α ο συντελεστής απορρόφησης, ο οποίος εξαρτάται από το μόριο ή ιόν που απορροφά σε ορισμένο διαλύτη και από τη συχνότητα της ακτινοβολίας.

Η σχέση (2) μετασχηματίζεται σε λογαριθμική μορφή:

$$\log \frac{I}{I_0} = -\epsilon C l \quad (3)$$

Το ϵ είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης (molar absorption coefficient), είναι χαρακτηριστικός για κάθε ένωση και συνδέεται με το συντελεστή απορρόφησης α με τη σχέση:

$$\epsilon = \frac{\alpha}{2.303} \quad (4)$$

Το γινόμενο $\epsilon C l$ ονομάζεται απορρόφηση A , absorbance.

$$A = \epsilon C l \quad (5)$$

Ο λόγος $\frac{I}{I_0}$ ονομάζεται διαπερατότητα T .

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (6)$$

Από τις σχέσεις (3) και (6) ισχύει

$$A = -\log T \quad (7)$$

Ο νόμος του Beer ισχύει όταν:

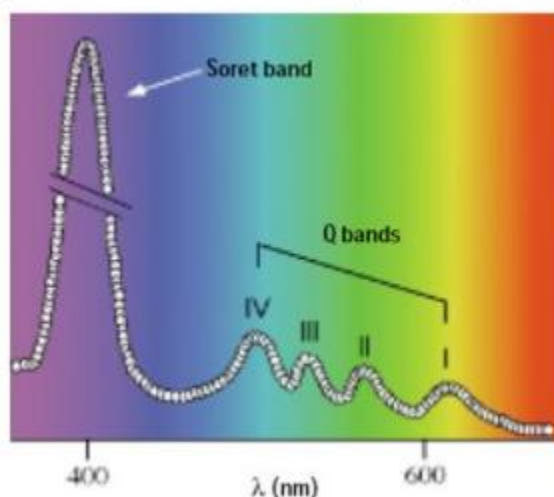
- 1) Η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μονοχρωματική
- 2) Τα χημικά είδη που απορροφούν δρουν ανεξάρτητα στη διαδικασία απορρόφησης
- 3) Η απορρόφηση συμβαίνει σ' έναν όγκο ομοιόμορφης διατομής
- 4) Η ενεργειακή υποβάθμιση είναι γρήγορη (όχι φθορισμός). Γενικά ισχύει για αραιά διαλύματα.

Η γραφική απεικόνιση της απορρόφησης ενός διαλύματος σε σχέση με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας δίνει το φάσμα απορρόφησης της διαλυμένης ουσίας.

Το μήκος κύματος στο οποίο παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης, ονομάζεται μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και συμβολίζεται με λ_{\max} . Η τιμή του λ_{\max} είναι χαρακτηριστική της ουσίας, άρα μας δίνει ποιοτική πληροφορία. Το εμβαδόν της κορυφής του φάσματος σχετίζεται με τη ποσότητα της ουσίας, άρα δίνει ποσοτική πληροφορία.

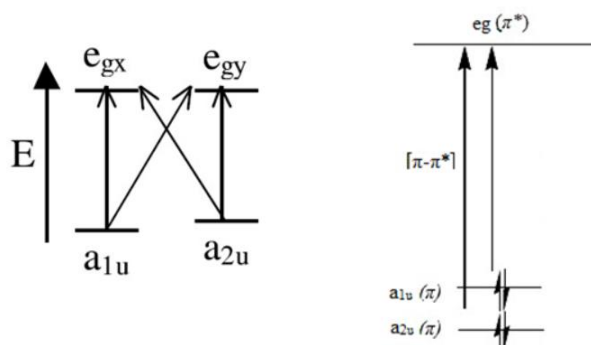
Οι πορφυρίνες είναι γνωστές χρωμοφόρες ενώσεις, με ισχυρές ταινίες απορρόφησης στην περιοχή του ορατού. Αυτό οφείλεται στον εσωτερικό 16-μελή δακτύλιο ο οποίος έχει 18π ηλεκτρόνια και αποτελεί τον ηλεκτρονιακό πυρήνα των πορφυρινών. Το χαρακτηριστικό φάσμα μίας ελεύθερης πορφυρίνης αποτελείται από μία ταινία υψηλής απορρόφησης η οποία βρίσκεται περίπου στα 420nm (Soret band) και άλλες τέσσερις χαμηλότερης απορρόφησης οι οποίες βρίσκονται μεταξύ 500-650 nm (Q bands) [25]

Typical UV-visible absorption spectrum



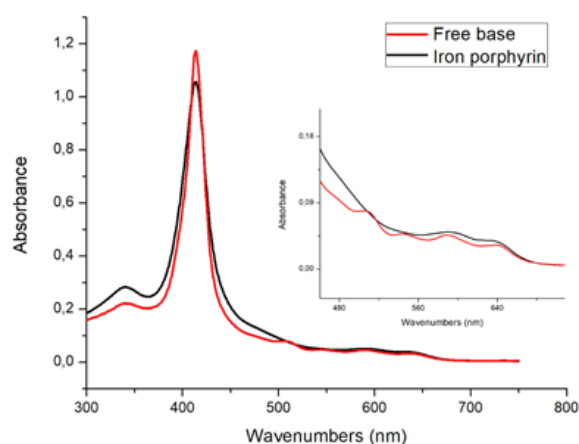
Εικόνα 3.4: Ένα τυπικό φάσμα UV-Vis μιας πορφυρίνης, όπου διακρίνονται οι Soret και οι Q μπάντες. [26]

Το χρώμα των πορφυρινών οφείλεται σε απορροφήσεις μέσα στον πορφυρινικό δακτύλιο λόγω των διεγέρσεων $\pi \rightarrow \pi^*$ τροχιακών του δακτυλίου. Για την περιγραφή των ηλεκτρονιακών καταστάσεων έχουν αναπτυχθεί πολλές θεωρίες. Ένα σημαντικό θεωρητικό μοντέλο δόθηκε το 1961 από τον Gouterman ο οποίος ανέπτυξε το θεωρητικό μοντέλο των τεσσάρων τροχιακών για την περιγραφή των διαφόρων ηλεκτρονιακών καταστάσεων των φασμάτων των πορφυρινών καθώς και των συμπλόκων τους. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο τα δύο HOMO μοριακά τροχιακά ενός πορφυρινικού δακτυλίου είναι σχεδόν εκφυλισμένα όπως και τα δύο LUMO μοριακά τροχιακά του. Τα HOMO τροχιακά παρουσιάζουν συμμετρία a_{1u} και a_{2u} ενώ τα LUMO έχουν συμμετρία e_g . Συγκεκριμένα η ταινία Soret προέρχεται από τη μετάπτωση $a_{1u}(\pi) - e_g^*(\pi)$, ενώ οι υπόλοιπες Q ταινίες οφείλονται λόγω μετάπτωσης $a_{2u}(\pi) - e_g^*(\pi)$ (27)



Σχήμα 3.11: Σχηματική αναπαράσταση των τεσσάρων επιτρεπτών μεταβάσεων ($a_{1u}e_{gx}$), ($a_{2u}e_{gy}$), ($a_{1u}e_{gy}$), ($a_{2u}e_{gy}$) και των μεταπτώσεων $a_{1u}(\pi) - eg^*(\pi)$ και $a_{2u}(\pi) - eg^*(\pi)$

Το φάσμα UV-Vis μιας μεταλλοπορφυρίνης διαφέρει από το φάσμα μιας ελεύθερης πορφυρίνης. Συνήθως στο φάσμα των μεταλλοπορφυρινών διαγράφεται μια ταινία Soret και μια ή δυο Q ταινίες. Αυτό συμβαίνει διότι, όταν το μεταλλικό ιόν συναρμόζεται με τα άτομα αζώτου, η συμμετρία του συστήματος αυξάνεται και συνεπώς ο αριθμός των Q ταινιών μειώνεται.



Σχήμα 3.12: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis μιας αμετάλλωτης πορφυρίνης (μαύρη γραμμή) και μιας μεταλλωμένης πορφυρίνης με σίδηρο (κόκκινη γραμμή) με μεγέθυνση στην περιοχή απορρόφησης των ταινιών [28]

4. Αυτοοργάνωση διπεπτιδίων

4.1 Διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Phe-OH

4.1.1 Σχηματισμός υδρογελών

Σε αυτό το σημείο της διπλωματικής, εξετάστηκε η ικανότητα του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Phe να σχηματίζει αυτοοργανωμένες δομές αν ακολουθηθεί η πρακτική της διάλυσης του, αρχικά σε έναν “καλό” διαλύτη και στη συνέχεια προστεθεί ένας “κακός” διαλύτης. Η μελέτη αυτή

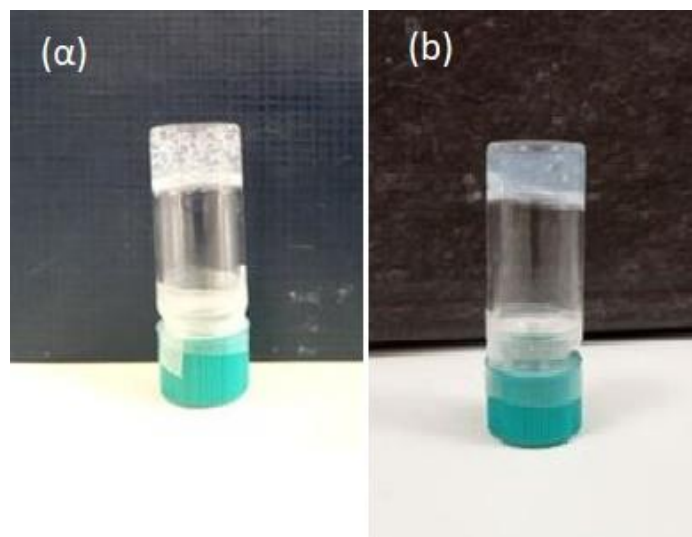
στοχεύει στο να διερευνηθεί αν σχηματίζεται υδρογέλη, η οποία θα αξιολογηθεί ως φαρμακευτικό υλικό αλλά και το αν και ποιες δομές σχηματίζονται.

Αρχικά δοκιμάστηκε η δημιουργία διαλύματος συγκέντρωσης 3 mg/ml σε συνδυασμό διαλυτών αιθανόλη/νερό (καλός/κακός) σε αναλογίες 3:7 και 2:8. Πρέπει να σημειωθεί πως για την διάλυση του διπεπτιδίου στην αιθανόλη πραγματοποιήθηκε sonication για 30 δευτερόλεπτα στους 37° C. Έγινε λήψη δειγμάτων για παρατήρηση στη 1 ώρα, 1 μέρα, 3 μέρες και 1 εβδομάδα.

Για να μειωθεί η ταχύτητα σχηματισμού της υδρογέλης, έγινε η επιλογή να μειωθεί η συγκέντρωση του διπεπτιδίου στα 2 mg/ml και στο 1 mg/ml. Και σε αυτή την περίπτωση ως “καλός” διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η αιθανόλη και ως “κακός” το νερό σε αναλογίες 2:8 και 3:7, ενώ επίσης απαιτήθηκε sonication για 30 δευτερόλεπτα στους 37° C. Έγινε λήψη δειγμάτων για παρατήρηση στη 1 ώρα, 1 μέρα, 3 μέρες και 1 εβδομάδα.

Για να προσδιοριστεί, από ποιες παραμέτρους καθορίζεται το gelation, επηρεάστηκαν οι συνθήκες θερμοκρασίας του πειράματος. Πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε μία πειραματική διαδικασία σε ψυχρές συνθήκες (αντιδραστήρια στο ψυγείο και εκπόνηση του πειράματος στο cold room σε θερμοκρασία 4° C) αλλά και σε θερμές συνθήκες (αντιδραστήρια και εκπόνηση του πειράματος στους 37,5 ° C μέσα σε incubator). Για την διαδικασία αυτή επιλέχθηκαν οι αναλογίες και η συγκέντρωση διπεπτιδίου που είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της καλύτερης υδρογέλης, δηλαδή C=2 mg/ml και αιθανόλη/νερό 2:8.

Τέλος, δοκιμάστηκαν ως καλός διαλύτης η αιθανόλη και ως κακοί διαλύτες το PBS (Phosphate Buffer Saline) και το οξικό οξύ σε διάλυμα συγκέντρωσης 2 mg/ml και με αναλογία διαλυτών 2:8 και 3:7. Το PBS επιλέχθηκε καθώς αποτελεί ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη κυττάρων, αλλά καθώς και επειδή περιέχει NaCl που συνεισφέρει στην αυτό-οργάνωση λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Το οξικό οξύ επιλέχθηκε διότι έχει παρατηρηθεί πως το όξινο pH επιδρά προωθητικά στην αυτοοργάνωση. Για να διαλυθεί το Fmoc-Phe-Ile στην αιθανόλη έγινε sonication για 30 δευτερόλεπτα στους 37° C, ενώ για να γίνει ομοιόμορφα ο σχηματισμός της υδρογέλης ο κακός διαλύτης προστίθεται ενώ το vial έχει τοποθετηθεί σε vortex.

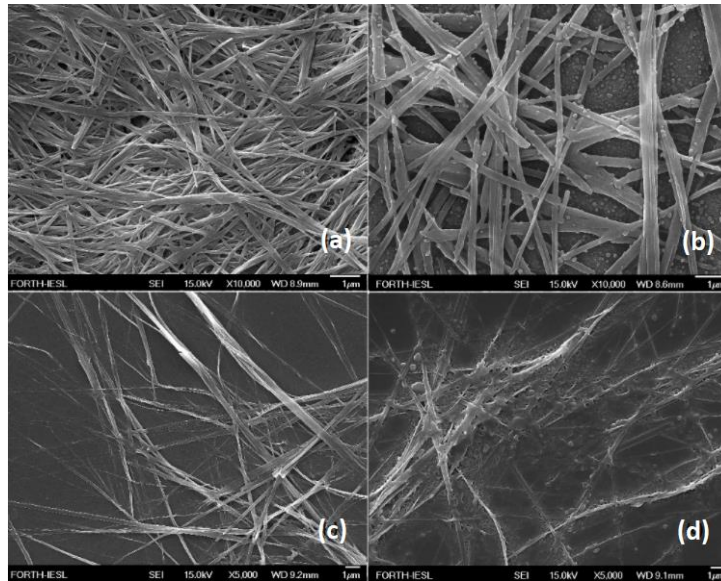


Εικόνα 4.1: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό (a)3:7 (b)2:8

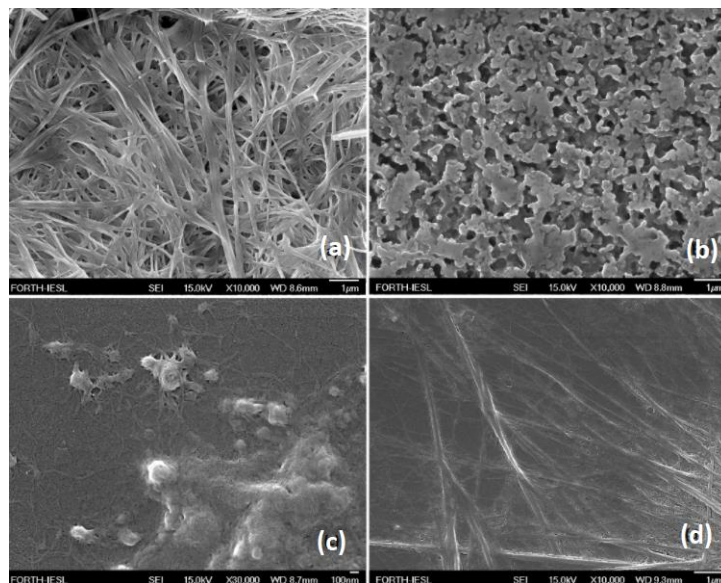
4.1.2 Μικροσκοπία FESEM

Για την παρατήρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε κυρίως το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης πεδίου FESEM JEOL 7000 στα 15 kV τα οποία βρίσκονται στο τμήμα Φυσικής, για την ερευνητική ομάδα μικροηλεκτρονικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του Ι.Τ.Ε. Το μικροσκόπιο χειρίστηκε η κα. Αλέκα Μανουσάκη.

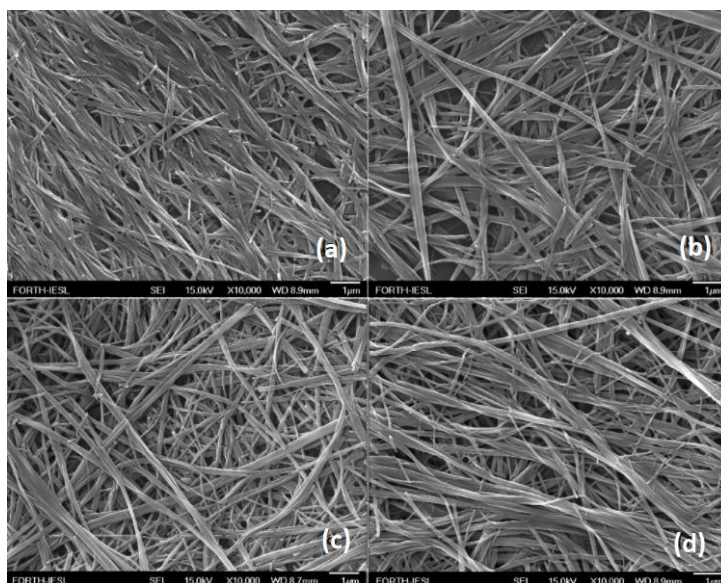
Για την παρατήρηση 10 μl δείγματος τοποθετήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδα και αφέθηκαν σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα για ξήρανση. Στη συνέχεια, υποβλήθηκαν στην διαδικασία Sputtering, ώστε να επιστρωθούν με νανοσωματίδια χρυσού για 60 δευτερόλεπτα και συνεπώς να καταστούν ηλεκτρικά αγώγιμα και κατάλληλα για παρατήρηση.



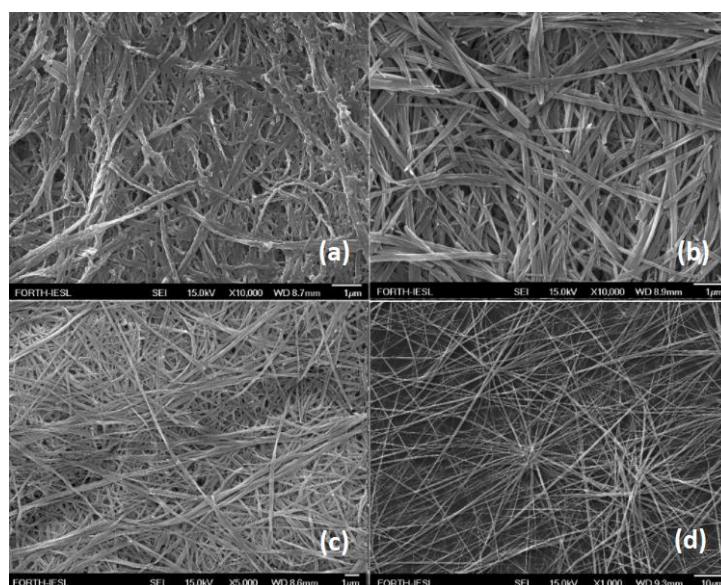
Εικόνα 4.2: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 3mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό 3:7 (α) 1 ώρα (β) 1 μέρα (γ) 3 μέρες (δ) 1 εβδομάδα



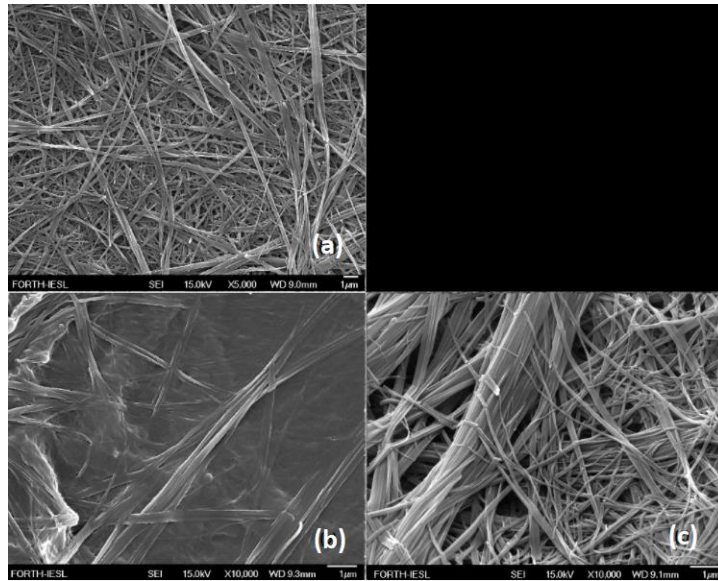
Εικόνα 4.3: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 3mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό 2:8 (α) 1 ώρα (β) 1 μέρα (γ) 3 μέρες (δ) 1 εβδομάδα



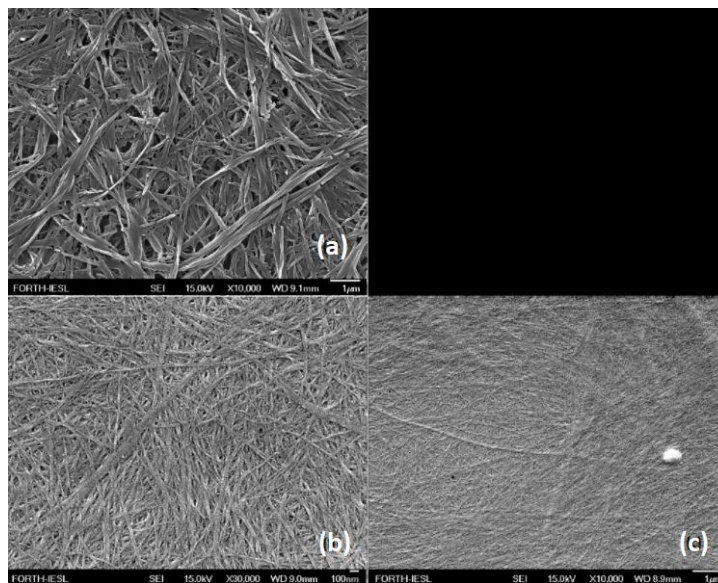
Εικόνα 4.4: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό 3:7 (α) 1 ώρα (β) 1 μέρα (γ) 3 μέρες (δ) 1 εβδομάδα



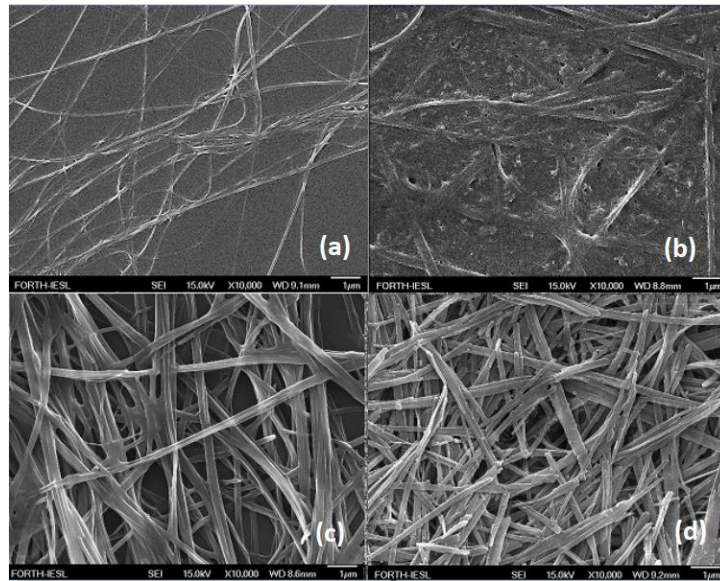
Εικόνα 4.5: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό 2:8 (α) 1 ώρα (β) 1 μέρα (γ) 3 μέρες (δ) 1 εβδομάδα



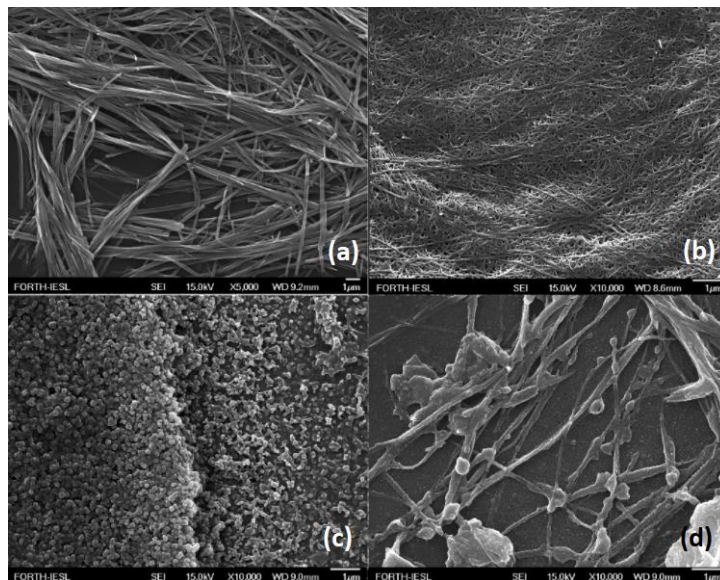
Εικόνα 4.6: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 1mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό 2:8 (α) 1 ώρα (β) 3 μέρες (γ) 1 εβδομάδα



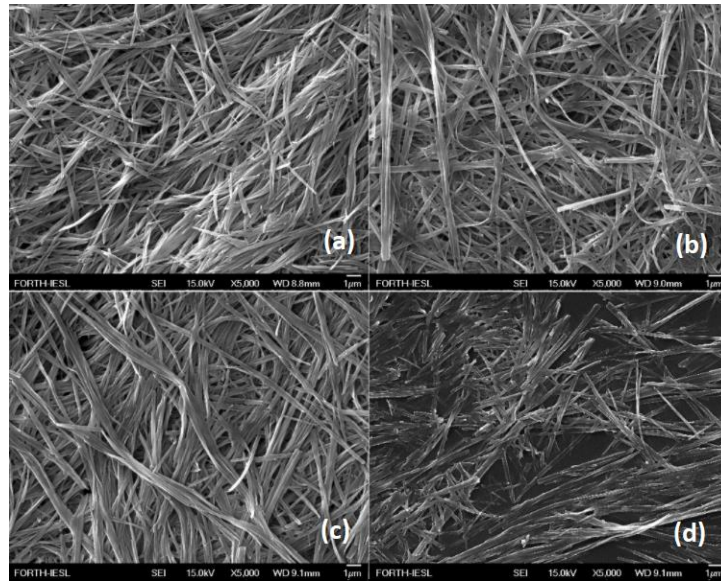
Εικόνα 4.7: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 1mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό 3:7 (α) 1 ώρα (β) 3 μέρες (γ) 1 εβδομάδα



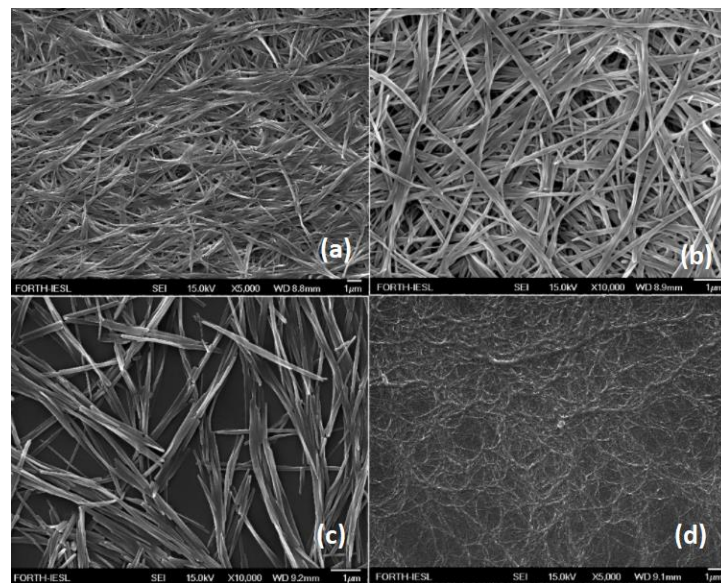
Εικόνα 4.8: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό 2:8 σε θερμές συνθήκες $T=37,5^{\circ}C$ (α) 1 ώρα (β) 1 μέρα (γ) 3 μέρες (δ) 1 εβδομάδα



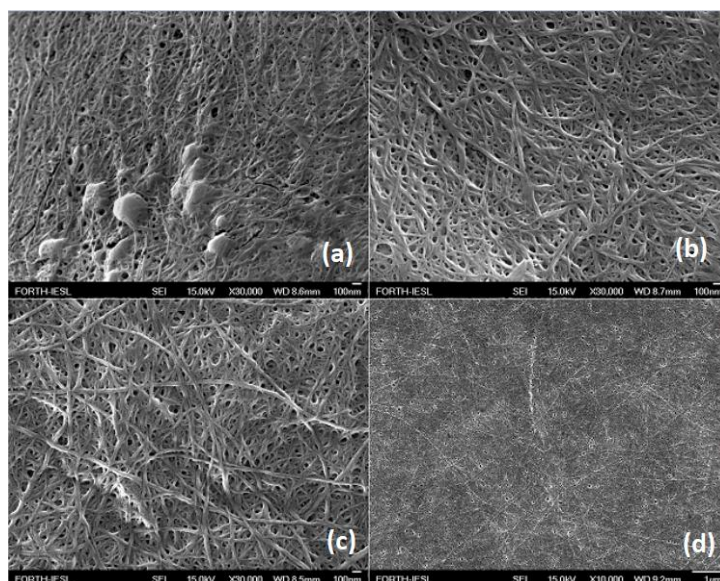
Εικόνα 4.9: Foc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό 2:8 σε ψυχρές συνθήκες $T=4^{\circ}C$ (α) 1 ώρα (β) 1 μέρα (γ) 3 μέρες (δ) 1 εβδομάδα



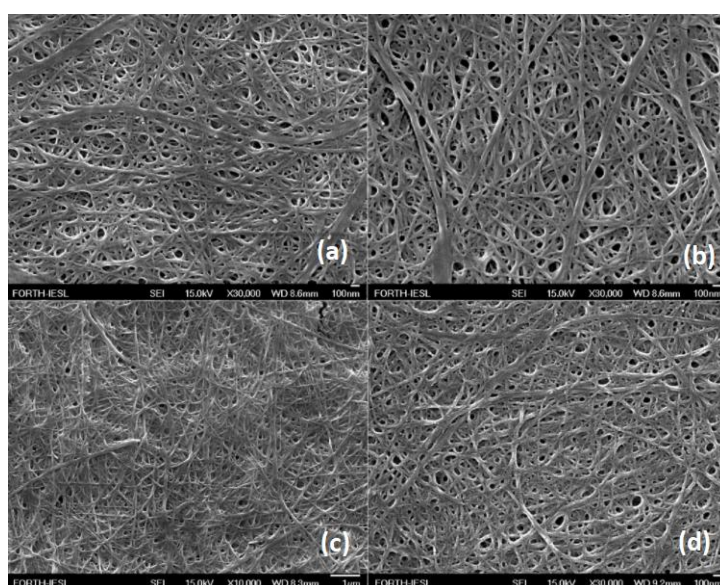
Εικόνα 4.10: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/οξικό οξύ σε αναλογία 2:8 (α) 1 ώρα (β) 1 μέρα (γ) 3 μέρες (δ) 1 εβδομάδα



Εικόνα 4.11: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/οξικό οξύ σε αναλογία 3:7 (α) 1 ώρα (β) 1 μέρα (γ) 3 μέρες (δ) 1 εβδομάδα



Εικόνα 4.12: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/PBS σε αναλογία 2:8 (α) 1 ώρα (β) 1 μέρα (γ) 3 μέρες (δ) 1 εβδομάδα



Εικόνα 4.13: Fmoc-Phe-Ile σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/PBS σε αναλογία 3:7 (α) 1 ώρα (β) 1 μέρα (γ) 3 μέρες (δ) 1 εβδομάδα

4.1.3 Μηχανικές ιδιότητες

Ο έλεγχος των μηχανικών ιδιοτήτων των υδρογελών έγινε με χρήση του όργανου UniVert, CellScale Biomaterials Testing, από την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Βιοϋλικών - Μηχανικής Ιστών, Βαρβάρα Πλατανιά.

Υδρογέλες όγκου 1ml σχηματίστηκαν μέσα σε κυλινδρικά καλούπια. Στην προκειμένη περίπτωση η υδρογέλη του πεπτιδίου Fmoc-Phe-Ile-OH συγκέντρωσης 2 mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό σε αναλογία όγκων 2.5:7.5. Τα δείγματα παρέμειναν overnight στα καλούπια και στη συνέχεια υποβλήθηκαν στον έλεγχο μηχανικών ιδιοτήτων. Ο συντελεστής ελαστικότητας Young Modulus της συγκεκριμένης υδρογέλης υπολογίστηκε 10.48 kPa. Επιπλέον υπολογίστηκε ο συντελεστής ελαστικότητας της συγκεκριμένης υδρογέλης όταν έχει εγκαψυλώσει την υδατοδιαλυτή πορφυρίνη H₂-T(MePyP(I₄)) σε συγκέντρωση 0.128 mM 4.95 kPa.

4.2 Διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH

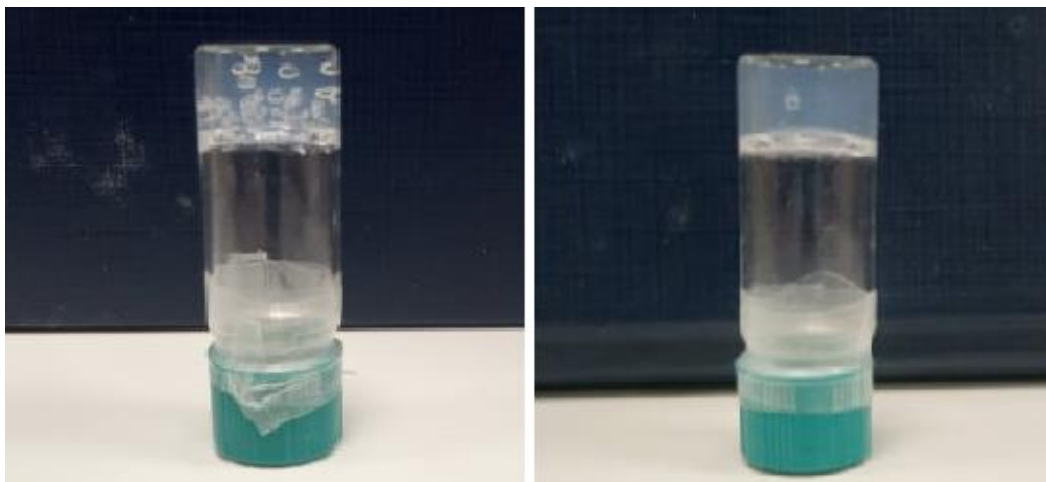
4.2.1 Σχηματισμός υδρογελών

Σε αυτό το σημείο της διπλωματικής, εξετάστηκε η ικανότητα του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu να σχηματίζει αυτοοργανωμένες δομές αν ακολουθηθεί η πρακτική της διάλυσης του, αρχικά σε έναν “καλό” διαλύτη και στη συνέχεια προστεθεί ένας “κακός” διαλύτης. Η μελέτη αυτή στοχεύει στο να διερευνηθεί αν σχηματίζεται υδρογέλη, η οποία θα αξιολογηθεί ως υλικό που δεσμεύει οργανικές χρώσεις και ιόντα τοξικών μετάλλων αλλά και το αν και ποιες δομές σχηματίζονται.

Αρχικά δοκιμάστηκε η δημιουργία διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml και 2 mg/ml σε συνδυασμό διαλυτών αιθανόλη/νερό (καλός/κακός) σε αναλογίες 3:7 και 2:8. Πρέπει να σημειωθεί πως για την διάλυση του διπεπτιδίου στην αιθανόλη πραγματοποιήθηκε sonication για 1 λεπτό στους 37° C.



Εικόνα 4.14: Υδρογέλες του Fmoc-Phe-Leu, C=1mg/ml, 2:8 αιθανόλη/νερό(αριστερά), 3:7 αιθανόλη/νερό (δεξιά)



Εικόνα 4.15: Υδρογέλες του Fmoc-Phe-Leu, C=2 mg/ml, 2:8 αιθανόλη/νερό (αριστερά), 3:7 αιθανόλη/νερό (δεξιά)

4.2.2 Σχηματισμός organogel

Σε αυτό το σημείο, εξετάστηκε η ικανότητα του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH να σχηματίζει αυτοοργανωμένες δομές αν ακολουθηθεί η πρακτική της διάλυσης του, αρχικά σε έναν “καλό” διαλύτη και στη συνέχεια προστεθεί ένας “κακός” διαλύτης. Η μελέτη αυτή στοχεύει στο να διερευνηθεί αν σχηματίζεται organogel, με στόχο τη δέσμευση πετρελαιοειδών από το υδάτινο περιβάλλον.

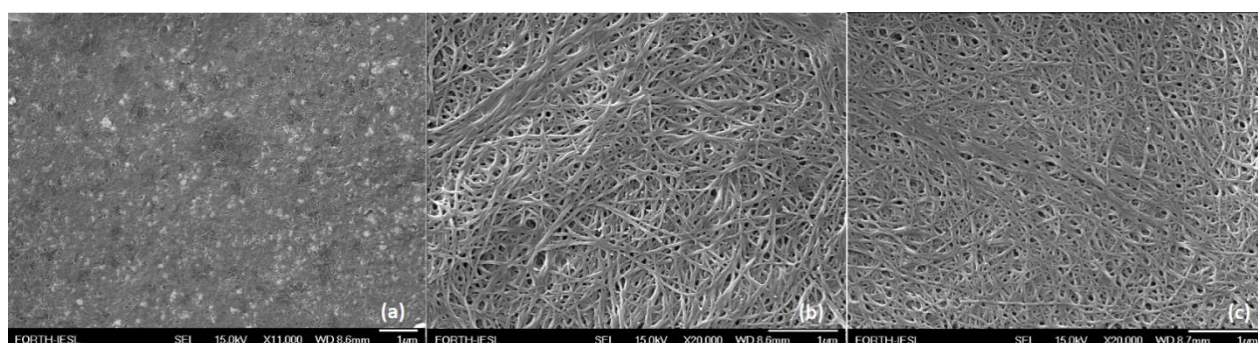
Αρχικά δοκιμάστηκε η δημιουργία διαλυμάτων συγκέντρωσης 2 mg/ml 3 mg/ml σε συνδυασμό διαλυτών DCM/εξάνιο και DCM/επτάνιο (καλός/κακός) σε αναλογίες 3:7 και 2:8, σε θερμοκρασία δωματίου. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ο σχηματισμός καλοσχηματισμένων organogel που αποτελούνται από ινώδεις δομές. Παρόλα αυτά για τον έλεγχο δέσμευσης του αλκανίου, προτιμήθηκε η συγκέντρωση 2 mg/ml για οικονομία υλικού και η αναλογία διαλυτών 2:8, λόγω της πιθανής δέσμευσης παραπάνω ρύπου από ότι στην περίπτωση της αναλογίας 3:7.

4.2.3 Μικροσκοπία FESEM

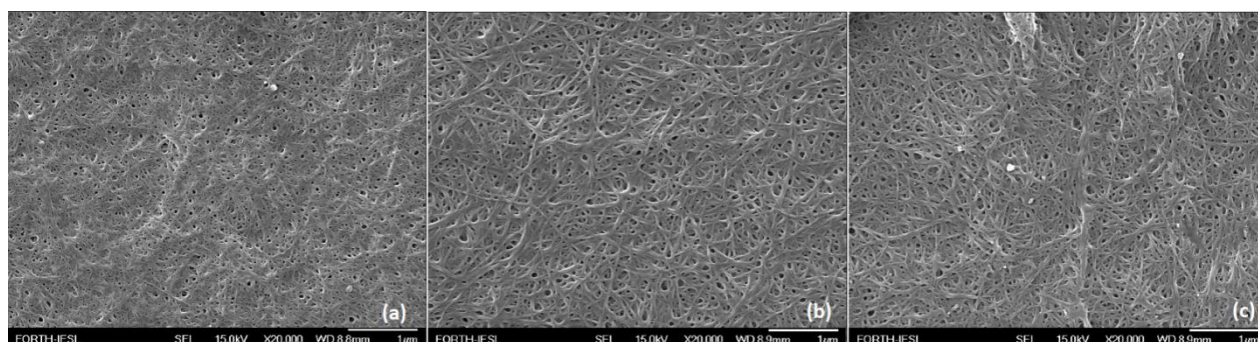
Για την παρατήρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε κυρίως το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης πεδίου FESEM JEOL 7000 στα 15 kV τα οποία βρίσκονται στο τμήμα Φυσικής,

για την ερευνητική ομάδα μικροηλεκτρονικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του Ι.Τ.Ε. Το μικροσκόπιο χειρίστηκε η κα. Αλέκα Μανουσάκη.

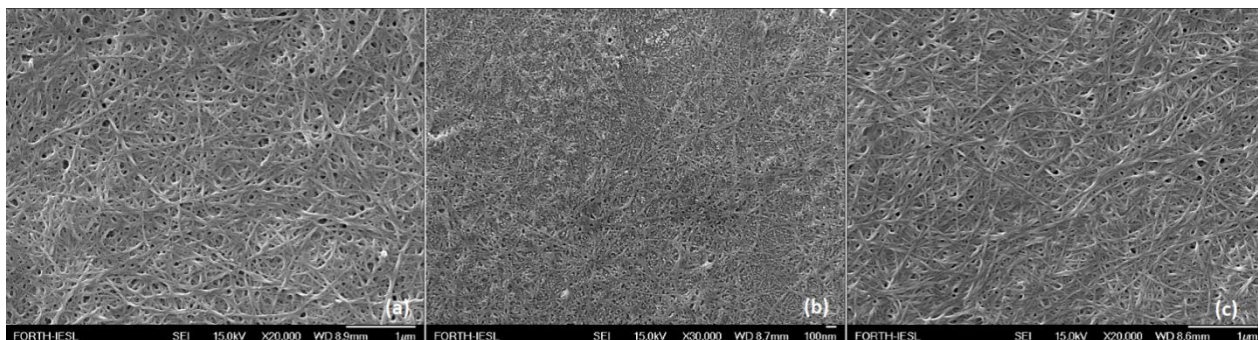
Για την παρατήρηση 10 μl δείγματος τοποθετήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδα και αφέθηκαν σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα για ξήρανση. Στη συνέχεια, υποβλήθηκαν στην διαδικασία Sputtering, ώστε να επιστρωθούν με νανοσωματίδια χρυσού για 60 δευτερόλεπτα και συνεπώς να καταστούν ηλεκτρικά αγώγιμα και κατάλληλα για παρατήρηση.



Εικόνα 4.16: Fmoc-Phe-Leu-OH σε συγκέντρωση 1 mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό σε αναλογία 2:8 (a) 1 ώρα (b) 1 μέρα (c) 3 μέρες



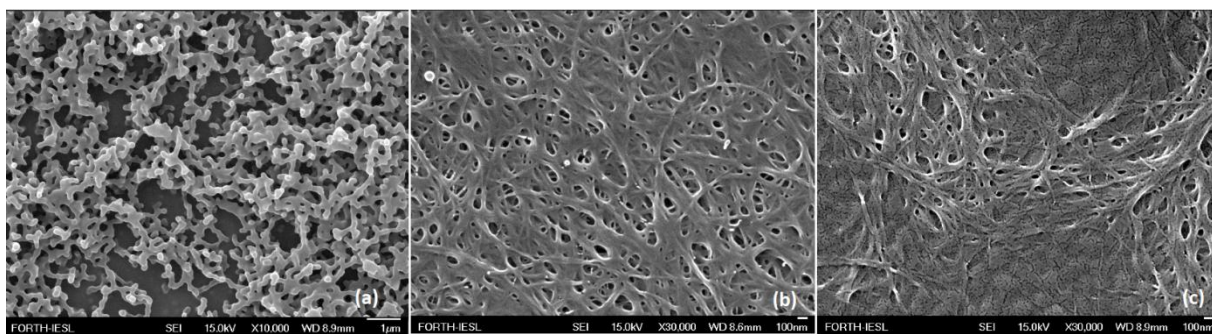
Εικόνα 4.17: Fmoc-Phe-Leu-OH σε συγκέντρωση 1 mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό σε αναλογία 3:7 (a) 1 ώρα (b) 1 μέρα (c) 3 μέρες



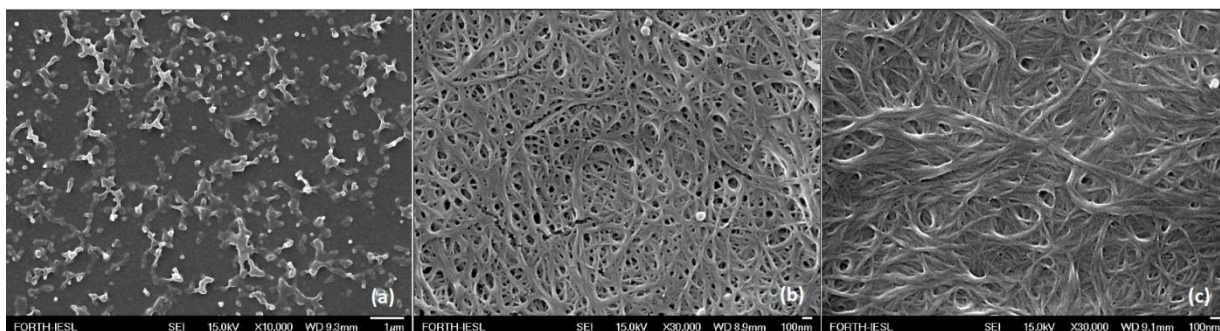
Εικόνα 4.18: Fmoc-Phe-Leu-OH σε συγκέντρωση 2 mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό σε αναλογία 2:8 (a) 1 ώρα (b) 1 μέρα (c) 3 μέρες



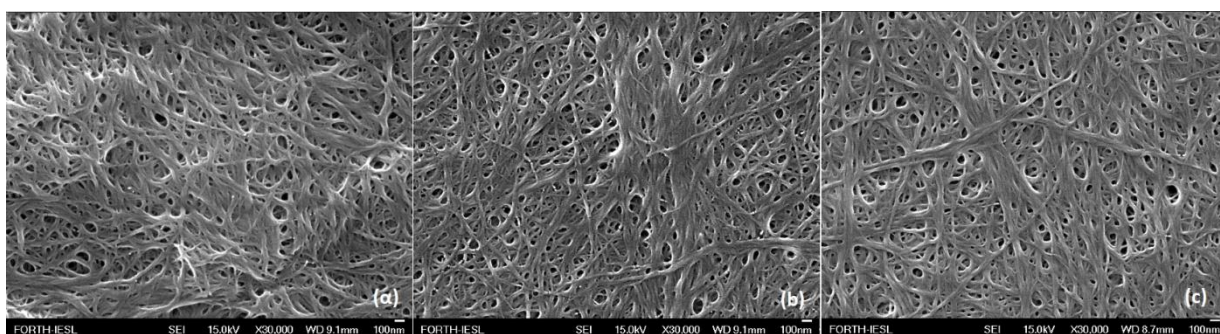
Εικόνα 4.19: Fmoc-Phe-Leu-OH σε συγκέντρωση 2 mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό σε αναλογία 3:7 (a) 1 ώρα (b) 1 μέρα (c) 3 μέρες



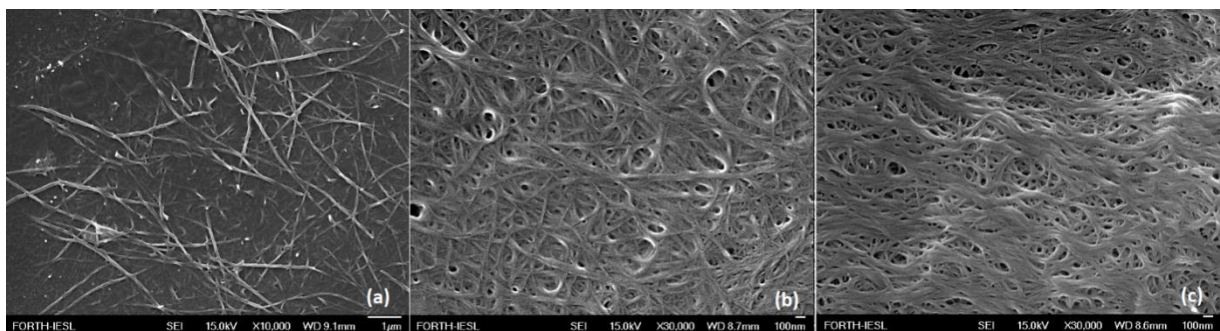
Εικόνα 4.20: Fmoc-Phe-Leu-OH σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες DCM/εξάνιο σε αναλογία 2:8 (a) 1 ώρα (b) 1 μέρα (c) 1 εβδομάδα



Εικόνα 4.21: Fmoc-Phe-Leu-OH σε συγκέντρωση 2mg/ml σε διαλύτες DCM/επτάνιο σε αναλογία 2:8 (a) 1 ώρα (b) 1 μέρα (c) 1 εβδομάδα



Εικόνα 4.22: Fmoc-Phe-Leu-OH σε συγκέντρωση 3mg/ml σε διαλύτες DCM/εξάνιο σε αναλογία 3:7 (a) 1 ώρα (b) 1 μέρα (c) 1 εβδομάδα



Εικόνα 4.23: Fmoc-Phe-Leu-OH σε συγκέντρωση 3mg/ml σε διαλύτες DCM/επτάνιο σε αναλογία 3:7 (a) 1 ώρα (b) 1 μέρα (c) 1 εβδομάδα

4.2.4 Μηχανικές Ιδιότητες

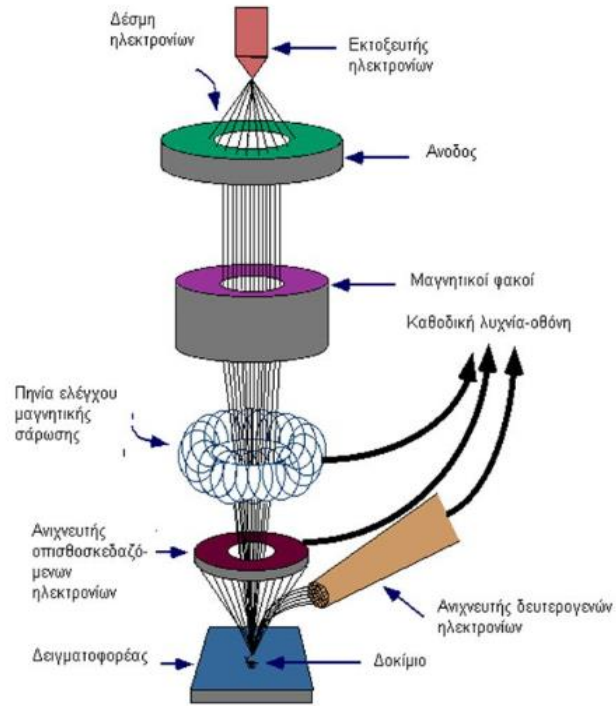
Ο έλεγχος των μηχανικών ιδιοτήτων των υδρογελών έγινε με χρήση του όργανου UniVert, CellScale Biomaterials Testing, από την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Βιοϋλικών - Μηχανικής Ιστών Βαρβάρα Πλατανιά.

Υδρογέλες όγκου 1ml σχηματίστηκαν μέσα σε κυλινδρικά καλούπια. Στην προκειμένη περίπτωση η υδρογέλη του πεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH συγκέντρωσης 2 mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό σε αναλογία όγκων 2:8. Τα δείγματα παρέμειναν overnight στα καλούπια και στη συνέχεια υποβλήθηκαν στον έλεγχο μηχανικών ιδιοτήτων. Ο συντελεστής ελαστικότητας Young Modulus της συγκεκριμένης υδρογέλης υπολογίστηκε 28.97kPa.

4.3 Τεχνικές χαρακτηρισμού

4.3.1 FESEM – Field Emission Scanning Electron Microscopy

Για την απεικόνιση βιολογικών δομών σε μεγάλη μεγέθυνση χρησιμοποιείται το μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM). Το όργανο αυτό, με τη χρήση μιας δέσμης ηλεκτρονίων τα οποία εκπέμπονται από έναν εκτοξευτή ηλεκτρονίων δίνουν τη δυνατότητα απεικόνισης σε υπολογιστή, όπως το φως αντίστοιχα στο οπτικό μικροσκόπιο. Τα ηλεκτρόνια που παράγονται από ένα νήμα βολφραμίου, εκπέμπονται από τον εκτοξευτή ηλεκτρονίων, επιταχύνονται και με τη βοήθεια συγκεντρωτικών μαγνητικών φακών εστιάζονται και σκανάρουν το δείγμα με μεγάλη ταχύτητα. Η αλληλεπίδραση της δέσμης με το δείγμα προκαλεί την παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων τα οποία ανιχνεύονται και δίνουν μια τρισδιάστατη μεγεθυμένη εικόνα στον υπολογιστή. Για να αποφευχθούν οι παρεμβολές, η διαδικασία αυτή γίνεται σε κενό αέρος. [29]

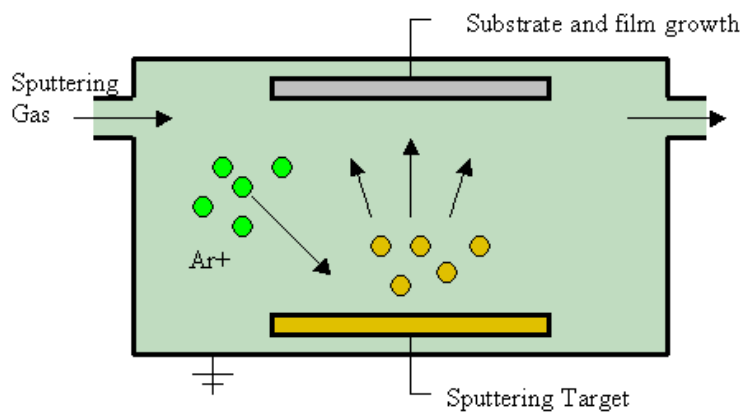


Εικόνα 4.24: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας ενός μικροσκοπίου SEM.

Στην περίπτωση που το μικροσκόπιο SEM δεν μπορεί να αναπεξέλθει στην απεικόνιση του δείγματος, το μικροσκόπιο FESEM (Filled Emission Scanning Electron Microscopy) έχει δυνατότητα καλύτερης ανάλυσης και κατά συνέπεια δίνει φωτογραφίες σε πιο μεγάλη μεγέθυνση από το SEM, ενώ μπορεί να λειτουργήσει σε χαμηλότερες τάσεις.

4.3.2 Sputtering

Ένα βιολογικό δείγμα για να μπορέσει να παρατηρηθεί με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας πρέπει να εξασφαλιστεί ότι θα είναι ανθεκτικό στην πρόσπτωση δεσμών ηλεκτρονίων, στο κενό αέρος και θα είναι ηλεκτρικά αγωγίμο. Αυτό, επιτυγχάνεται με τη χρήση DC Magnetron Sputtering. Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα αφαίρεσης ατόμων από τις επιφάνειες στερεών υλικών, χωρίς να τις χαράσσει, ενώ ταυτόχρονα τα εναποθέτει ως λεπτά υμένια σε επιφάνειες στερεών υλικών. Έτσι το βιολογικό δείγμα καλύπτεται με ένα λεπτό υμένιο χρυσού 10-15 nm που του προσδίδει τις ιδιότητες που του χρειάζεται για να παρατηρηθεί. [29]



Εικόνα 4.25: Απεικόνιση του τρόπου κατά τον οποίο πραγματοποιείται η επίστρωση του δείγματος με νανοσωματίδια χρυσού, κατά την τεχνική sputtering.

4.3.2 Μηχανικές ιδιότητες

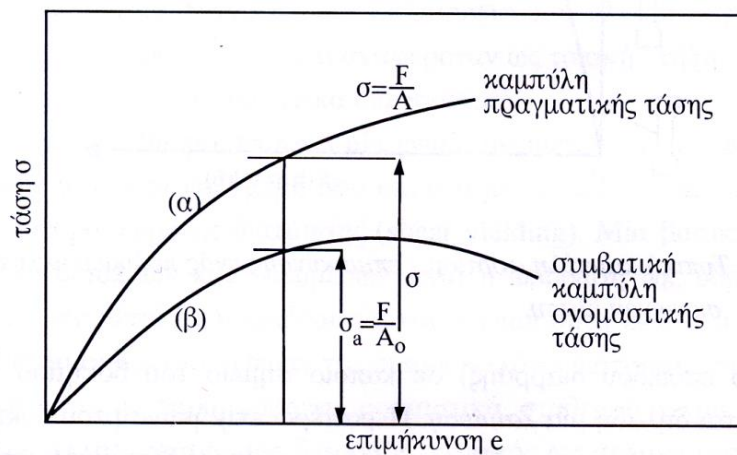
Η δοκιμή συμπίεσης είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για να εξετάσει τις μηχανικές ιδιότητες πολλών διαφορετικών τύπων υδρογελών. Το υλικό τοποθετείται μεταξύ δύο πλακών και υποβάλλεται σε δοκιμή συμπίεσης, καθώς σε αυτό δύο δυνάμεις, ίσου μέτρου, ίδιας διεύθυνσεως, αντίθετης όμως φοράς, τέτοιας ώστε να προκαλείται συμπίεση του υλικού και να μπορεί να προσδιοριστεί η σχέση μεταξύ τάσης και παραμόρφωσης. Με τη δοκιμή ενός υλικού σε συμπίεση το όριο ελαστικότητας και ο συντελεστής ελαστικότητας μεταξύ άλλων παραμέτρων μπορούν να προσδιοριστούν. Με την κατανόηση αυτών των διαφορετικών παραμέτρων και των τιμών που σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο υλικό μπορεί να καθοριστεί εάν το υλικό είναι κατάλληλο για συγκεκριμένες εφαρμογές. Από την μέτρηση της παραμόρφωσης του δείγματος υπό σταθερή εφαρμοζόμενη πίεση παίρνουμε τα δεδομένα που χρειάζονται για να φτιάξουμε το διάγραμμα τάσης/παραμόρφωσης.

Η μηχανική τάση σε διατομή, δηλαδή στην επιφάνεια νοητής τομής, στερεού σώματος ορίζεται ως η δύναμη που ασκείται ανά μονάδα επιφάνειας της διατομής.

$$\sigma_{\text{avg}} = \frac{F_n}{A} \approx \sigma.$$

Η μηχανική παραμόρφωση είναι γενικά η αλλαγή του σχήματος ή του μεγέθους ενός σώματος έπειτα από την ασκήση κάποιας δύναμης πάνω στο σώμα. Ελαστική

παραμόρφωση, ονομάζεται η παραμόρφωση που δεν είναι μόνιμη, δηλαδή το σώμα επανέρχεται στο αρχικό του σχήμα (από τον ίδιο δρόμο και ακαριαία) όταν πάψει να ενεργεί η δύναμη που προκάλεσε την παραμόρφωση. Τα πραγματικά σώματα έχουν ένα όριο στο πόσο μπορούν να παραμορφωθούν ελαστικά και εξαρτάται από το σχήμα, το υλικό και τη θερμοκρασία τους. Η ελαστική παραμόρφωση περιγράφεται μαθηματικά από το νόμο του Hooke ($\sigma = E \cdot \epsilon$, όπου σ η μηχανική τάση, E το μέτρο ελαστικότητας του υλικού και ϵ η αναλογία του παραμορφωμένου μήκους προς το αρχικό), σύμφωνα με τον οποίο η παραμόρφωση είναι ανάλογη της δύναμης που ασκείται.



Γράφημα 4.1: Καμπύλη τάσης – παραμόρφωσης

Η κλίση της καμπύλης τάσης-παραμόρφωσης στην ελαστική περιοχή είναι το μέτρο ελαστικότητας, E , ή μέτρο Young. Το μέτρο ελαστικότητας εκφράζει την ακαμψία του υλικού, δηλαδή την αντίσταση σε ελαστική παραμόρφωση. Η γραμμικότητα της καμπύλης τάσης – παραμόρφωσης στην ελαστική περιοχή είναι η γραφική παράσταση του νόμου του Hooke: $\sigma = E \cdot \epsilon$.

5. Εφαρμογές

5.1 Διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Ile-OH

5.1.1 Ελεγχόμενη απελευθέρωση της πορφυρίνης

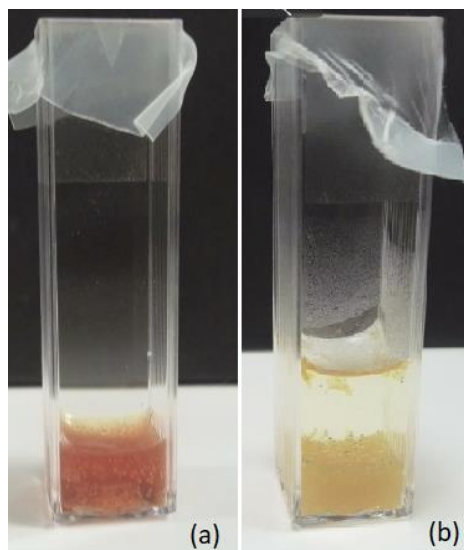
Όπως αναφέρθηκε και στο τμήμα της εισαγωγής, οι πεπτιδικές υδρογέλες χρησιμοποιούνται ευρέως σε φαρμακευτικές εφαρμογές. Μία από αυτές είναι και η ελεγχόμενη απελευθέρωση

φαρμακευτικών προϊόντων. Στην προκειμένη περίπτωση η υδατοδιαλυτή πορφυρίνη [H₂-TMePyP(I₄)] με μοριακό βάρος 1186 εγκαψυλιώθηκε στην υδρογέλη του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Ile-OH 2 mg/ml, η οποία σχηματίστηκε σε αναλογία διαλυτών αιθανόλη/νερό 2.5:7.5. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η ικανότητα της υδρογέλης να απελευθερώνει ελεγχόμενα το φαρμακευτικό υλικό και υπολογίστηκε το ποσοστό ουσίας που απελευθερώθηκε, αλλά και ο ρυθμός απελευθέρωσης.

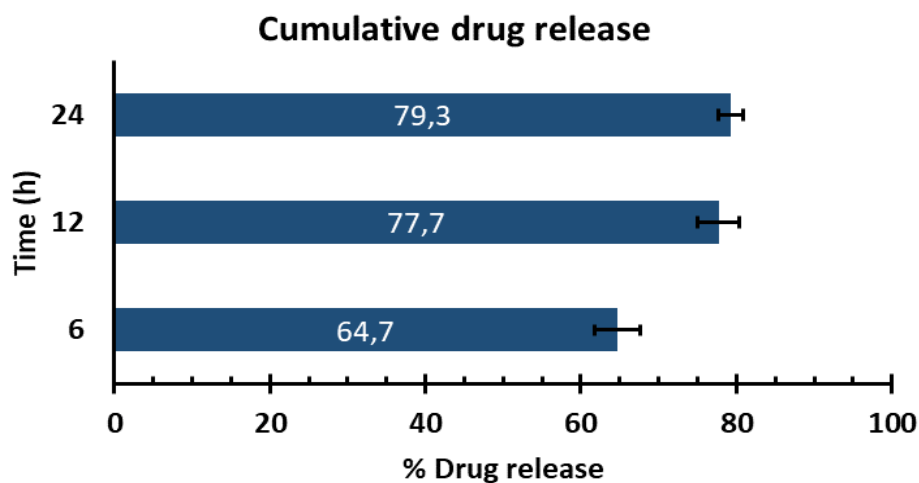
Πιο αναλυτικά, μέσα σε κυβέττα, 1mg Fmoc-Phe-Ile-OH διαλύθηκε σε 150 μl αιθανόλης. Στη συνέχεια προστέθηκαν 350 μl υδατικού διαλύματος [H₂-TMePyP(I₄)] συγκέντρωσης 184 μM. Η συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος πορφυρίνης υπολογίστηκε βάσει της εξής αναλογίας [Πεπτίδιο]:[H₂-T(MePyP(I₄))] = 30:1. Σε μερικά λεπτά σχηματίστηκε υδρογέλη όγκου 500 μl και τελικής συγκέντρωσης σε [H₂-TMePyP(I₄)] 128 μM. Έπειτα από αναμονή 1 ώρας, προστέθηκε 1 ml υπερκείμενο νερό ως υπερκείμενο, το δείγμα σφραγίστηκε με parafilm και τοποθετήθηκε στον incubator στους 37° C, προσομοιώνοντας έτσι τις συνθήκες του ανθρώπινου σώματος. Η απελευθέρωση της πορφυρίνης στο νερό ξεκινάει αμέσως. Τις χρονικές στιγμές 6, 12, 24 και 48 ώρες η συγκέντρωση της πορφυρίνης στο υπερκείμενο νερό μετρήθηκε με φασματοσκοπία UV-Vis και έπειτα από κάθε μέτρηση καθαρό νερό τοποθετούταν ως υπερκείμενο. Από τα φάσματα απορρόφησης που συλλέχθηκαν και με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης απορρόφησης προς συγκέντρωση, υπολογίστηκε το ποσοστό πορφυρίνης που απελευθερώθηκε καθώς και ο ρυθμός απελευθέρωσης, μέσω της σχέσης:

$$cumulative\ drug\ release = \frac{amount\ of\ drug\ released}{amount\ of\ drug\ encapsulated\ in\ gel} * 100\%$$

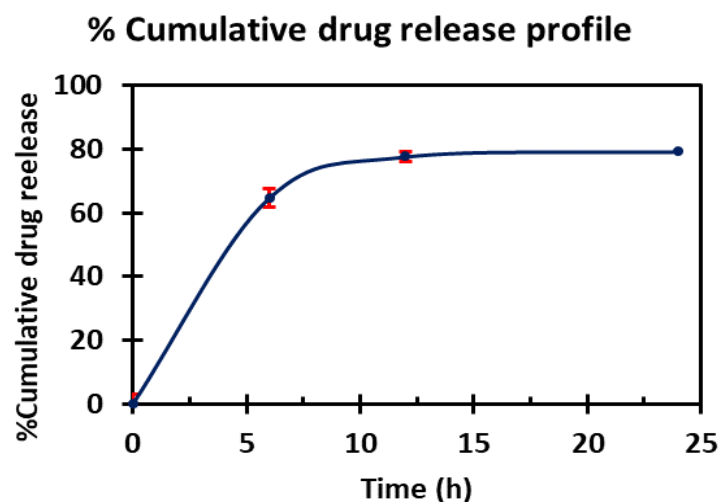
αυτές κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη απορρόφησης ως προς την συγκέντρωση. [30]



Εικόνα 5.1: (a) Το δείγμα του πεπτιδικού gel με την εγκαψυλιωμένη υδατοδιαλυτή πορφυρίνη την χρονική στιγμή 0, πριν προστεθεί το υδατικό υπερκείμενο. (b) Το δείγμα έπειτα από την πάροδο 24 ωρών. Δεν απελευθερώνεται πλέον άλλη πορφυρίνη, έχει απομακρυνθεί το 79.36% της αρχικά εγκαψυλιωμένης πορφυρίνης και έχει ξεκινήσει η αποδόμηση της υδρογέλης. Για τον υπολογισμό της ποσότητας της πορφυρίνης που απελευθερώθηκε χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλης απορρόφησης προς συγκέντρωση. (Παράρτημα, Σχήμα 9)



Γράφημα 5.1: Γραφική αναπαράσταση ποσοστιαίας απελευθέρωσης φαρμάκου ως προς τον χρόνο.



Γράφημα 5.2: Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού του cumulative drug release ως προς τον χρόνο.

5.1.2 Αντιμικροβιακός Έλεγχος της υδρογέλης του Fmoc-Phe-Ile-OH με εγκαψυλιωμένη πορφυρίνη

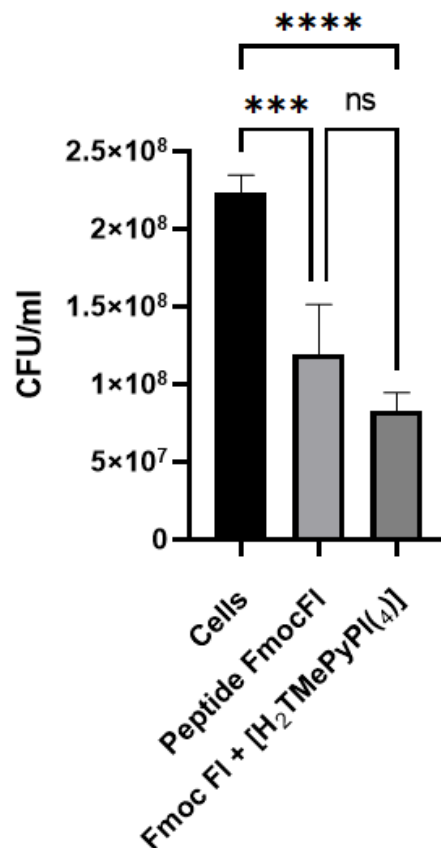
Έχει αποδειχτεί ότι οι πορφυρίνες εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, καθώς έχουν την ικανότητα να καταλύουν αντιδράσεις υπεροξειδάσης και οξειδάσης, να απορροφούν φωτόνια και να δημιουργούν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και να κατανέμονται σε λιπίδια βακτηριακών μεμβρανών. [32] Στην παρακάτω πειραματική διαδικασία ελέγχθηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του διπεπτιδίου Fmoc-F-I-OH, καθώς και η συνδυαστική αντιμικροβιακή δράση του διπεπτιδίου μαζί με την υδατοδιαλυτή πορφυρίνη [H₂-T(MePyP(I₄))], υπό την επίδραση έντονης φωτοβόλησης ορατού φωτός, και υπό την απουσία της.

1 ml υδρογέλης παράχθηκε σε σύριγγα του 1 ml. Η δύο σύριγγες περιείχαν πεπτιδικό gel Fmoc-Phe-Ile-OH συγκέντρωσης 2 mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό σε αναλογία όγκων 3.5:7.7. Οι άλλες δύο περιείχαν πεπτιδικό gel Fmoc-Phe-Ile-OH συγκέντρωσης 2 mg/ml σε διαλύτες αιθανόλη/νερό σε αναλογία όγκων 3.5:7.7 στο οποίο είχε εγκαψυλωθεί πορφυρίνη [H₂-TMePyP(I₄)] συγκέντρωσης 184 μM. Τα δείγματα αφήθηκαν σε περιβάλλον χωρίς φως overnight. Σε αποστειρωμένες και σκοτεινές συνθήκες σε erpendorf των 2 ml παρασκευάζονται τα εξής δείγματα:

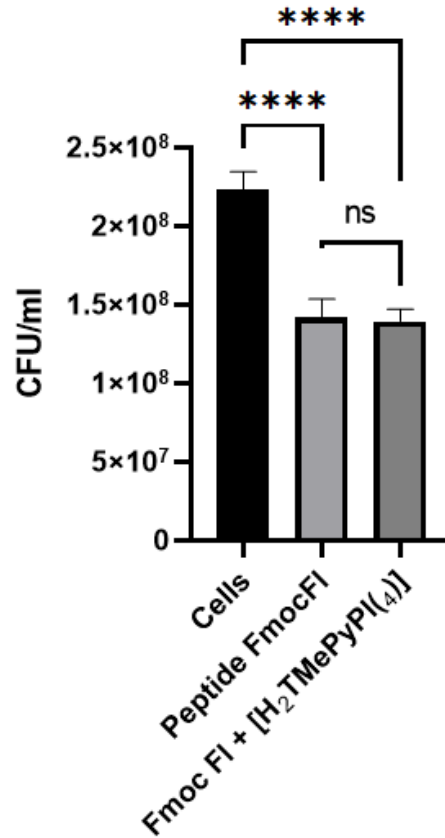
1. 3x 600 μl LB Broth
2. 3x 500 μl LB Broth + 100 μl E.Coli (O.D.= 0.1)
3. 3x 500 μl LB Broth + 100 μl E.Coli (O.D.= 0.1) + 100 μl πεπτιδικού gel
4. 3x 500 μl LB Broth + 100 μl E.Coli (O.D.= 0.1) + 100 μl πεπτιδικού gel με εγκαψυλιωμένη πορφυρίνη

Τα erpendorf καλύπτονται με αλουμινόχαρτο για την εξασφάλιση πλήρους απουσίας φωτός και τοποθετούνται στον incubator στους 36.6° C και στα 200 rpm για 5 ώρες. Στο γράφημα του ποσοστιαίου cumulative drug release profile (Γράφημα 5.3) παρατηρούμε ότι δημιουργείται πλατό περίπου στις 6 ώρες. Έπειτα από την πάροδο 5 ωρών 3 δείγματα που περιέχουν πεπτιδικό gel και 3 δείγματα που περιέχουν πεπτιδικό gel με

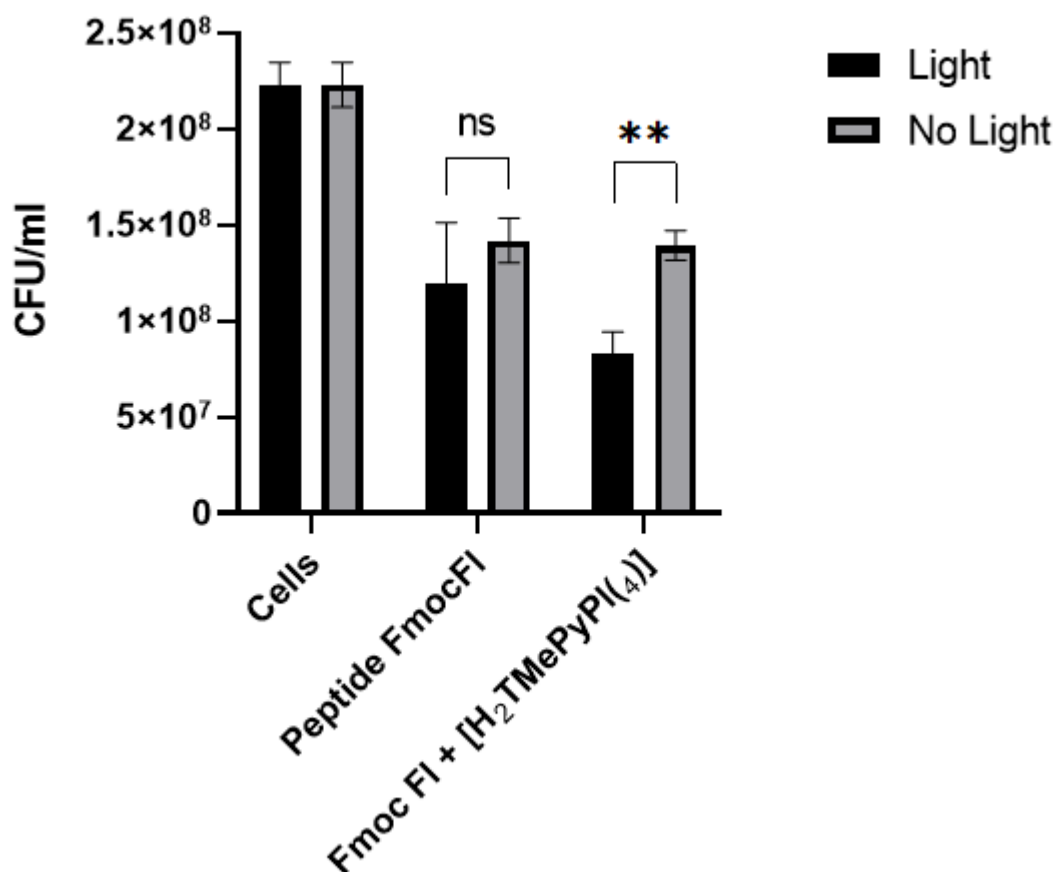
εγκαυλιωμένη πορφυρίνη, φωτοβολούνται σε λάμπα ορατού φωτός, LED 40W 230V, στους 37° C και στους 200 rpm, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα παραμένουν σε συνθήκες απουσίας φωτός για την επόμενη μία ώρα. Αυτό συμβαίνει γιατί από τα δεδομένα που συλλέχθηκαν στα πειράματα του κεφαλαίου 5.1.1 η απελευθέρωση πορφυρίνης κορυφώνεται περίπου στις 6 ώρες, συνεπώς φωτοβολώντας την εκείνη τη χρονική στιγμή, επιτυγχάνουμε την ενεργοποίηση της ώστε να καταφέρει να παράγει περισσότερες ελεύθερες ρίζες ROS, γνωστές για την αντιμικροβιακή τους δράση. 10 μl από κάθε δείγμα αραιώνονται σε LB Broth κατά 10⁻⁵ και στη συνέχεια στρώνονται σε plates LB agar. Τέλος τοποθετούνται στον incubator στους 37° C overnight. Το επόμενο πρωί γίνεται καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε plate. [31] Οι υπολογισμοί για την βιωσιμότητα των κυττάρων γίνονται σύμφωνα με την σχέση: $\frac{CFU}{ml} = \frac{\text{number of colonies} \cdot \text{dilution factor}}{\text{ml per plate}}$



Γράφημα 5.5: Ποσοτικοποίηση της βιωσιμότητας των E. Coli υπό την επίδραση του πεπτιδίου Fmoc-Phe-Ile-OH και του Fmoc-Phe-Ile-OH με εγκαυλιωμένη την υδατοδιαλυτή πορφυρίνη H₂-T(MePyP(I₄)), έπειτα από φωτοβόληση των δειγμάτων από t=5h έως t=6h, *P<0.05, ***P<0.01, ****P<0.0001 Μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (One-way ANOVA), N=4



Γράφημα 5.7: Ποσοτικοποίηση της βιωσιμότητας των *E. Coli* υπό την επίδραση του πεπτιδίου Fmoc-Phe-Ile-OH και του Fmoc-Phe-Ile-OH με εγκαυλιωμένη την υδατοδιαλυτή πορφυρίνη H₂-T(MePyP(I₄), χωρίς φωτοβόληση των δειγμάτων από t=5h έως t=6h, *P<0.05, ***P<0.01, ****P<0.0001 Μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (One-way ANOVA), N=4



Γράφημα 5.8: Ποσοτικοποίηση της βιωσιμότητας των E. Coli υπό την επίδραση του πεπτιδίου Fmoc-Phe-Ile-OH και του Fmoc-Phe-Ile-OH με εγκαυλιωμένη την υδατοδιαλυτή πορφυρίνη H₂-T(MePyP(I₄)), και σύγκριση των δειγμάτων που φωτοβολήθηκαν από t=5h έως t=6h με αυτά που δεν φωτοβολήθηκαν. **P=0.01, ***P=0.001, ****P<0.0001 Διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (two-way ANOVA), N=4

5.2 Διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH

5.2.1 Δέσμευση οργανικών χρώσεων και ιόντων μετάλλων

Αρχικά παρασκευάστηκαν stock διαλύματα των χρώσεων και των ιόντων μετάλλων, σε συγκεντρώσεις που καθορίστηκαν από την απορρόφηση των προτύπων στο UV-Vis φασματοφωτόμετρο του εργαστηρίου. Τα stock διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

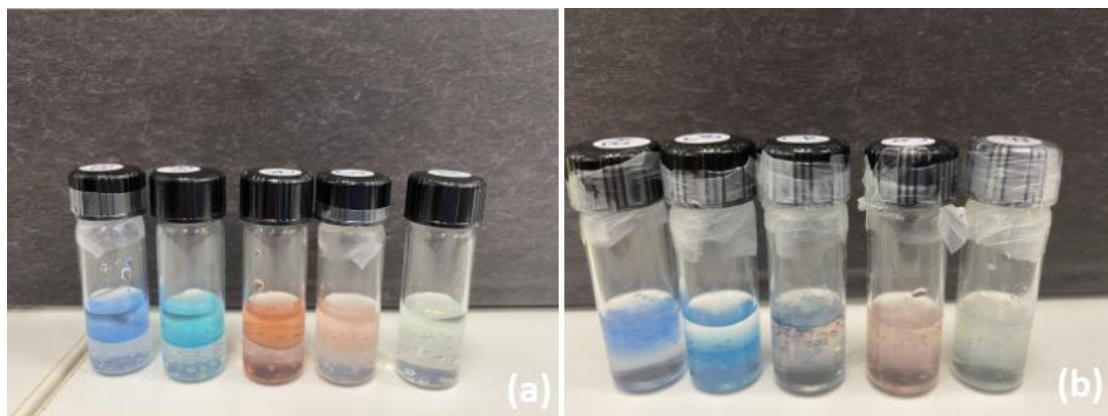
Methylene Blue 3 μM , Congo Red 10 μM , Coomassie Brilliant Blue 20 μM , CoCl_2 0,1M, NiCl_2 0,1M.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν σε 5 διαφορετικά vial υδρογέλες Fmoc-Phe-Leu-OH συγκέντρωσης 2 mg/ml και όγκου 1 ml σε αναλογία διαλυτών 3:7 αιθανόλη/νερό.

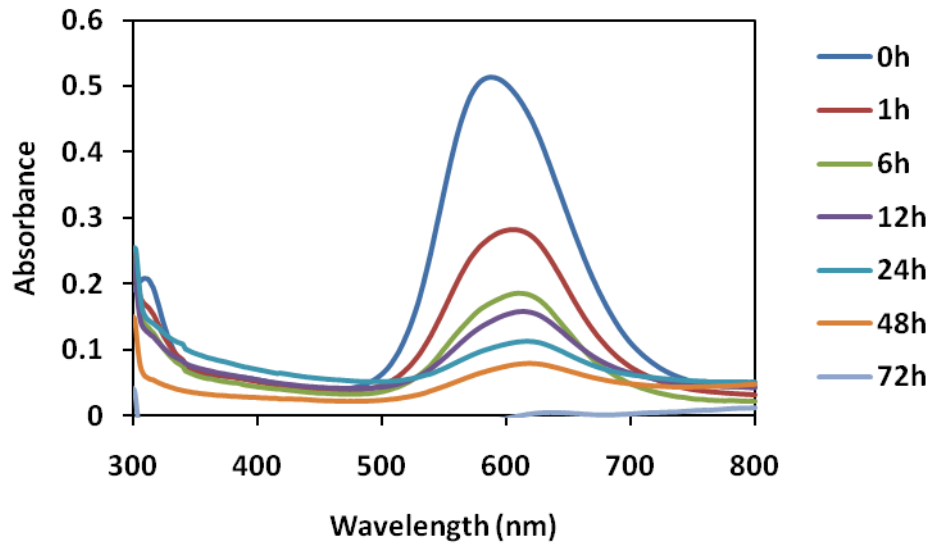
Έπειτα από το πέρας μιας μέρας για την ολοκλήρωση του gelation, προστέθηκε 1 ml από κάθε stock διάλυμα ως υπερκείμενο των gel και υποβάλλονταν σε ήπια ανάδευση καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας δηλαδή, για 3 ημέρες.

Ήδη από την πρώτη ώρα, ήταν εμφανές έπειτα από μακροσκοπική παρατήρηση ότι οι χρώσεις και τα ιόντα μετάλλων προσροφούνταν στις υδρογέλες.

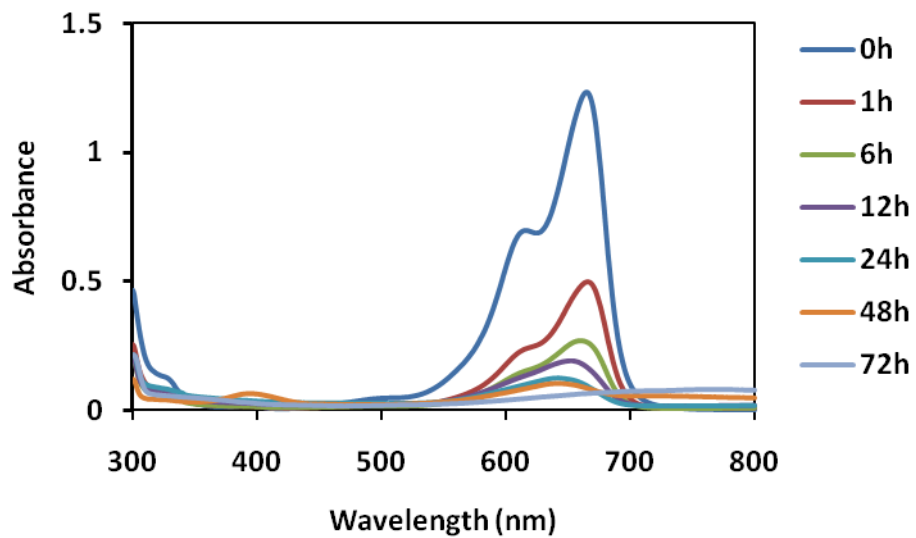
Για να επιβεβαιωθεί αυτή η παρατήρηση, φάσματα UV-Vis ελήφθησαν για όλα τα υπερκείμενα διαλύματα ανά 1, 6, 12, 24, 48, 72 ώρες. Έπειτα από τη λήψη φάσματος, τα διαλύματα των χρώσεων και των μετάλλων επέστρεφαν ως υπερκείμενα στις υδρογέλες, μέχρι τη λήψη του επόμενου φάσματος. Για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση ότι οι χρώσεις και τα ιόντα των μετάλλων δεσμεύονται από τις υδρογέλες, η απορρόφηση των υπερκειμένων πρέπει να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. [20,22] Η ικανότητα της υδρογέλης να απορροφά χρώσεις ή μεταλλικά ιόντα υπολογίζεται από την σχέση: $loading\ efficiency = \frac{initial\ dye - unabsorbed\ dye}{initial\ dye} * 100\%$ και για τον υπολογισμό της ποσότητας των χρώσεων και των μεταλλικών ιόντων έγινε χρήση πρότυπων καμπουλών απορρόφησης προς συγκέντρωση (Παράρτημα, Σχήμα 10 – Σχήμα 14)



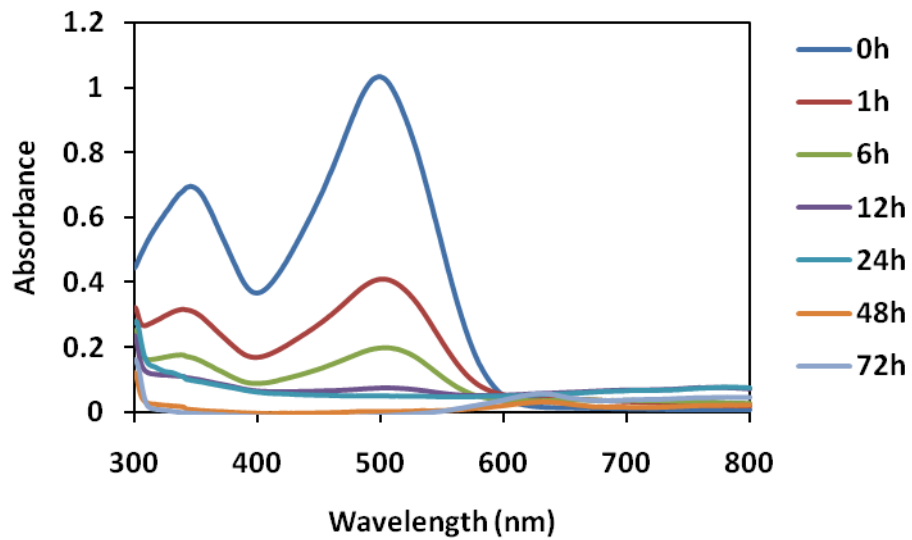
Εικόνα 5.2: Τεστ απορρόφησης οργανικών χρώσεων και μεταλλικών ιόντων. Δείγματα κατά σειρά: Coomassie Brilliant Blue 20 μM , Methylene Blue 3.2 μM , Congo Red 10 μM , Co^{2+} 0.1M, Ni^{2+} 0.1M σε (a) $t = 0$ (b) $t = 3$ days



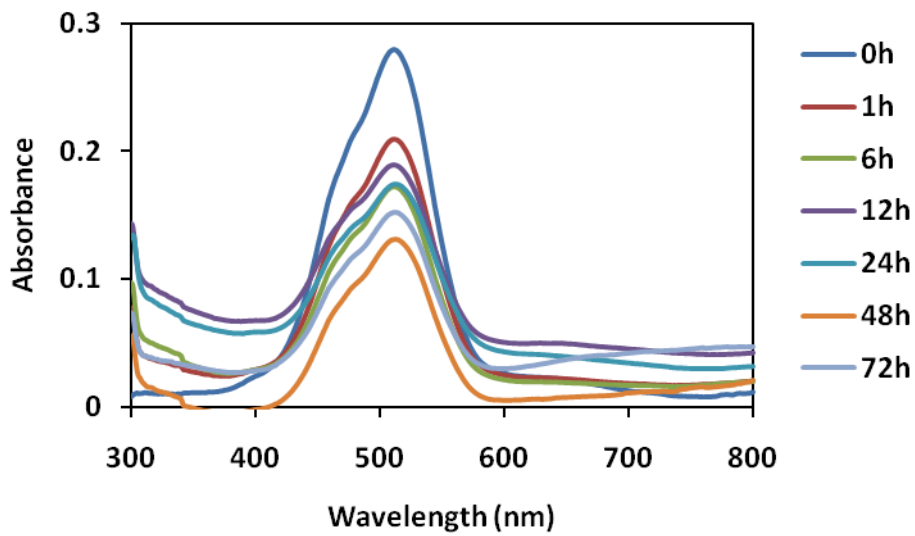
Γράφημα 5.4: Φάσματα UV-Vis για το δείγμα Coomassie Brilliant Blue 20 μM , στις 0, 1, 6, 12, 24, 48, και 60 ώρες.



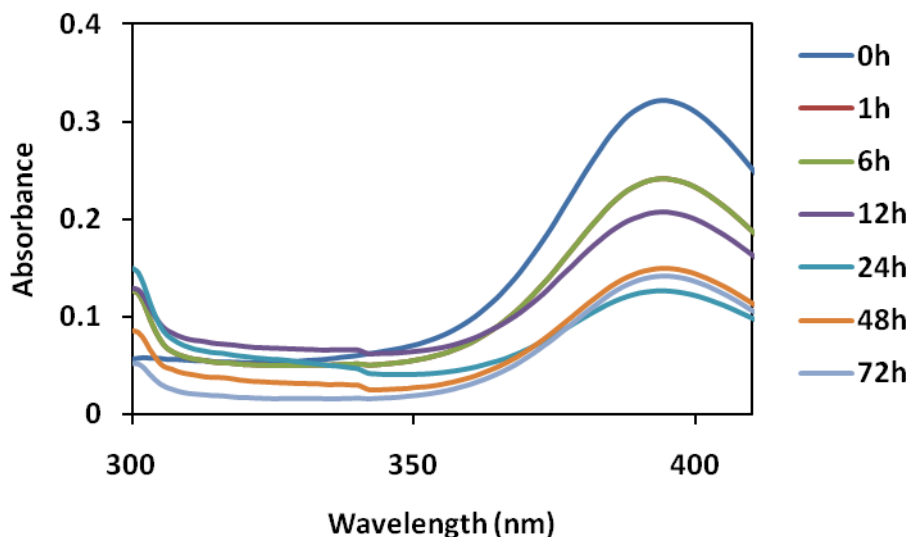
Γράφημα 5.5: Φάσματα UV-Vis για το δείγμα Methylene Blue 3.2 μM , στις 0, 1, 6, 12, 24, 48, και 60 ώρες.



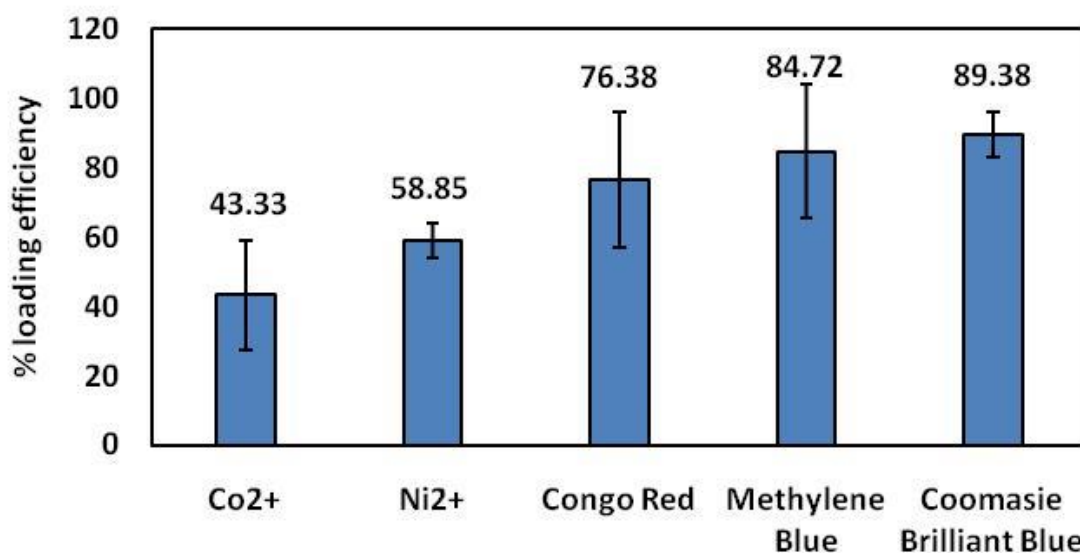
Γράφημα 5.6: Φάσματα UV-Vis για το δείγμα Congo Red 10 μM , στις 0, 1, 6, 12, 24, 48, και 60 ώρες



Γράφημα 5.7: Φάσματα UV-Vis για το δείγμα Co^{2+} 0,1 M, στις 0, 1, 6, 12, 24, 48, και 60 ώρες.



Γράφημα 5.8: Φάσματα UV-Vis για το δείγμα Ni^{2+} 0,1 M, στις 0, 1, 6, 12, 24, 48, και 60 ώρες.

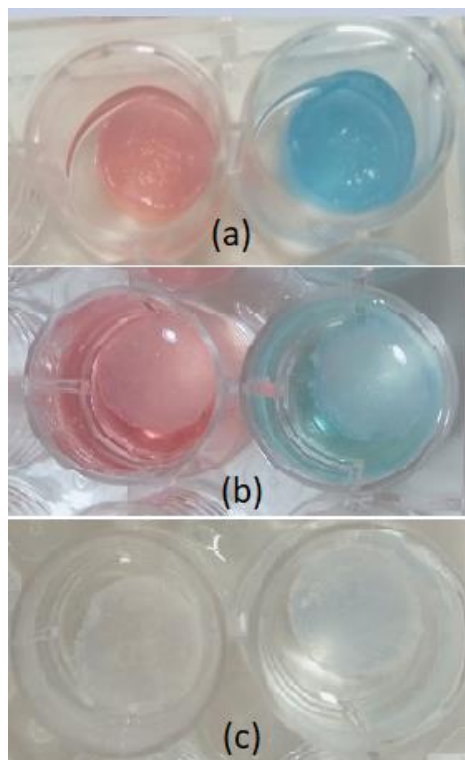


Γράφημα 5.9: Γραφική απεικόνιση της ποσοστιαίας ικανότητας της πεπτιδικής υδρογέλης να απορροφά τις χρώσεις και τα μεταλλικά ιόντα που μελετήθηκαν.

5.2.2 Επαναχρησιμοποίηση υδρογελών που έχουν δεσμεύσει ιόντα μετάλλων

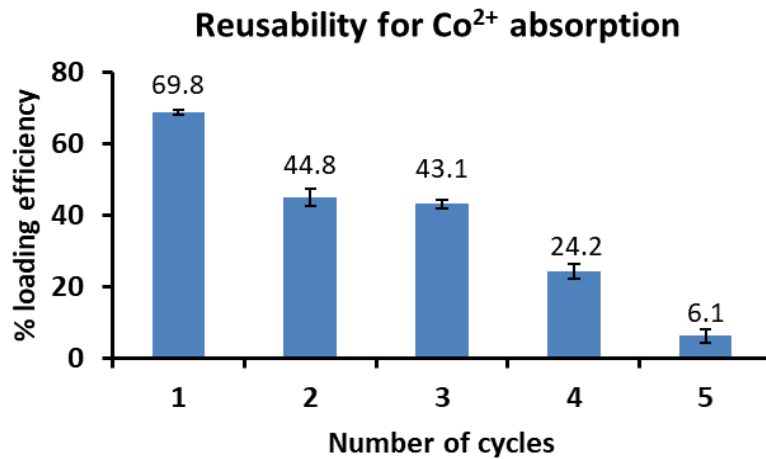
2 πεπτιδικά gel 1 ml, συγκέντρωσης 2 mg/ml, με διαλύτες αιθανόλη/νερό σε αναλογία όγκων 3:7 παρασκευάστηκαν σε κυλινδρικά καλούπια και αφήθηκαν overnight. Στη συνέχεια, το καθένα τοποθετήθηκε σε ένα πηγάδι σε 24άρι well-plate και στο ένα πηγάδι εισήχθη 1 ml

υδατικού διαλύματος NiCl_2 0.1 M και στο άλλο 1 ml υδατικού διαλύματος CoCl_2 0.1M. Τα δείγματα αφέθηκαν υπό ανάδευση για 3 μέρες στα 100 rpm σε συνθήκες δωματίου. Ο λόγος που αφέθηκαν 3 μέρες είναι διότι η ικανότητα τους για απορρόφηση μελετήθηκε ως τις 3 μέρες. Έπειτα ελήφθη μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis για να προσδιοριστεί η ποσότητα ιόντων μετάλλου που απορροφήθηκε από την υδρογέλη. Οι χρώσεις απομακρύνθηκαν και ακολούθησαν πλύσεις με EDTA 0.05M για 24 ώρες. Το EDTA απομακρύνθηκε και ακολούθησαν πλύσεις με H_2O για 6 ώρες. Τότε νέα διαλύματα μετάλλων συγκέντρωσης 0.1 M προστέθηκαν στα πηγάδια και η διαδικασία επαναλήφθηκε. Στόχος της διαδικασίας ήταν η μελέτη της ικανότητας των υδρογελών να επαναχρησιμοποιούνται, πόση ποσότητα μεταλλικών ιόντων δύνανται να απορροφούν σε κάθε κύκλο επαναχρησιμοποίησης, αλλά και έπειτα από πόσους κύκλους αποδομούνται. Για τον προσδιορισμό της ποσότητας μεταλλικών ιόντων που απορροφήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες απορρόφησης ως προς την συγκέντρωση.

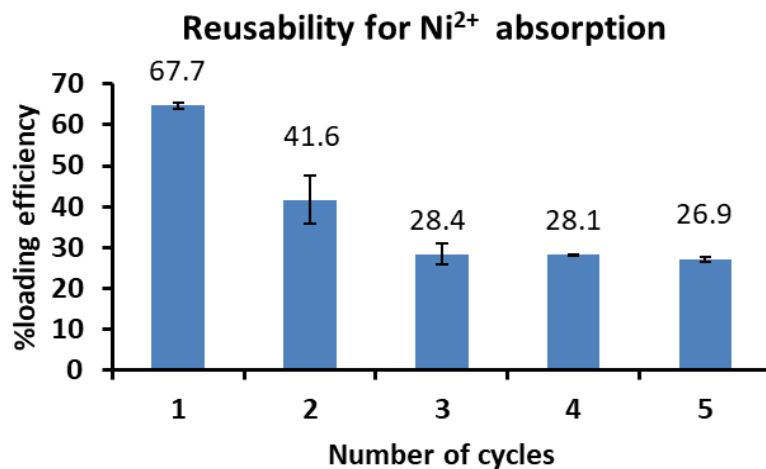


Εικόνα 5.3: (α) Οι πεπτιδικές υδρογέλες έπειτα από την πάροδο 3 ημερών εμφάνισης σε υδατικά διαλύματα μεταλλικών ιόντων Co^{2+} και Ni^{2+} . (b) Πλύσεις των υδρογελών που έχουν απορροφήσει τα μεταλλικά ιόντα με EDTA. Τα μεταλλικά ιόντα απομακρύνονται από τις

υδρογέλες. (c) Σχεδόν πλήρης απομάκρυνση των μεταλλικών ιόντων από τις υδρογέλες. Ακολουθούν πλύσεις με νερό για απομάκρυνση του EDTA.



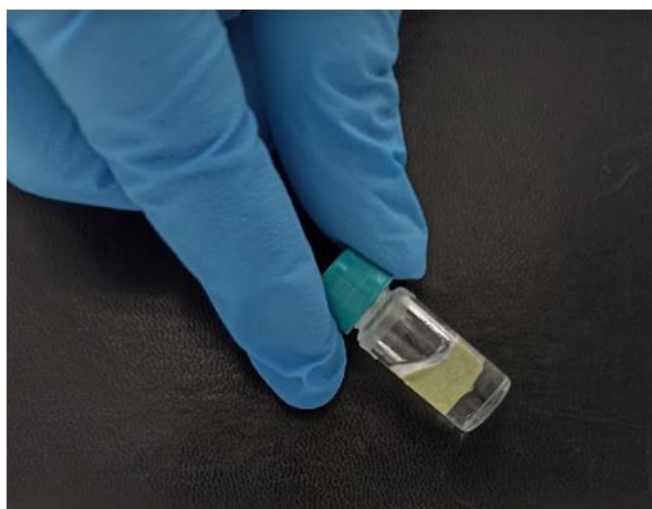
Γράφημα 5.10: Γραφική απεικόνιση ποσοστού ιόντων Co²⁺ που απορροφήθηκε σε κάθε έναν από τους 5 κύκλους επαναχρησιμοποίησης της υδρογέλης.



Γράφημα 5.11: Γραφική απεικόνιση ποσοστού ιόντων Ni²⁺ που απορροφήθηκε σε κάθε έναν από τους 5 κύκλους επαναχρησιμοποίησης της υδρογέλης.

5.2.3 Δέσμευση πετρελαιοειδών

1 mg διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH διαλύεται σε 100 μl DCM σε ένα vial. Σε ένα errendorf προστίθεται μίγμα 400 μl νερού και 400 μl επτανίου. Το μίγμα επτανίου/ νερού μεταφέρεται στο vial. Στιγμαία σχηματίζεται organogel με το επτάνιο, ενώ το νερό παραμένει αδέσμευτο. Συμπερασματικά το διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu έχει τη δυνατότητα εφαρμογής σε δέσμευση πετρελαιοειδών. (21)



Εικόνα 5.4: Επιλεκτική δέσμευση πετρελαίου από το διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH. Το νερό παραμένει αδέσμευτο. Το organogel που σχηματίζεται είναι συγκέντρωσης 2 mg/ml και αποτελείται από αναλογία διαλυτών 2:8 DCM/πετρέλαιο.

6. Συμπεράσματα

Ο πρώτος στόχος της παρούσας πτυχιακής ήταν ο σχεδιασμός μιας γρήγορης, απλής και αποδοτικής συνθετικής πορείας διπεπτιδίων. Αυτός επιτεύχθηκε, και έτσι συντέθηκαν τα διπεπτίδια Fmoc-Phe-Ile-OH και Fmoc-Phe-Leu-OH με χρήση του αντιδραστηρίου Fmoc-Phe-OSu. Η αντίδραση είναι απλή (1 στάδιο), πολύ αποδοτική (40.5%) και το προϊόν απομονώνεται και καθαρίζεται πολύ εύκολα, καθώς απαιτείται μόνο εκχύλιση.

Όσον αφορά το διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Ile-OH, εξετάστηκε η ικανότητα του να σχηματίζει υδρογέλες και συνεπώς η πιθανή χρήση του σε εφαρμογές ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων. Αποδείχτηκε ότι το εν λόγω διπεπτίδιο σχηματίζει υδρογέλες όταν υποβληθεί στο πρωτόκολλο καλού/κακού διαλύτη με διαλύτες αιθανόλη/νερό, ενώ οι δομές που το χαρακτηρίζουν είναι καλοσχηματισμένα πλέγματα ινιδίων. 167562215 Αυτές οι υδρογέλες και συγκεκριμένα η υδρογέλη συγκέντρωσης 2 mg/mL και αναλογίας όγκου διαλυτών 3.5:7.5 εγκαυλώσε την υδατοδιαλυτή πορφυρίνη [H₂-T(MePyP(I₄))], με [πεπτιδίου]:[H₂-

T(MePyP(I₄)] = 1:30. Στη συνέχεια εξετάστηκε η ελεγχόμενη απελευθέρωση της πορφυρίνης σε υδατικό περιβάλλον και θερμοκρασία 36.6° C, συνθήκες που προσομοιάζουν τον ανθρώπινο οργανισμό. Αποδείχτηκε ότι σε χρονικό πλαίσιο 24 ωρών η υδρογέλη το 79.36% της εγκαυλιωμένης πορφυρίνης, ενώ έπειτα από τις 24 ώρες ξεκινά η αποικοδόμηση της. Η καμπύλη που περιγράφει τον ποσοστιαίο ρυθμό απελευθέρωσης της πορφυρίνης κάνει πλατό περίπου στις 6 ώρες. Στη συνέχεια ελέγχθηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες της πεπτιδικής υδρογέλης, και της υδατοδιαλυτής πορφυρίνης H₂-T(MePyP(I₄)) σε βακτήρια E. Coli, σε συνθήκες φωτοβόλησης από t=5h έως t=6h με λάμπα LED ορατού φωτός 40 W και σε συνθήκες απουσίας φωτός στο ίδιο χρονικό πλαίσιο. Αποδείχθηκε ότι στην περίπτωση που τα δείγματα δεν ακτινοβολήθηκαν από t=5h έως t=6h, ο δείκτης CFU/ml εμφανίζει μια μείωση της τάξης του 36.32% όταν στα E.Coli επιδρά μόνο η πεπτιδική υδρογέλη και μια μείωση της τάξης του 37.44% όταν στα E.Coli επιδρά η πεπτιδική υδρογέλη με την εγκαυλιωμένη πορφυρίνη, σε σχέση με το control δείγμα (μόνο E.Coli, δίχως επίδραση κάποιου εν δυνάμει φαρμακευτικού προϊόντος). Στην περίπτωση που τα δείγματα φωτοβολήθηκαν από t=5h έως t=6h, ο δείκτης CFU/ml εμφανίζει μια μείωση της τάξης του 46.6% όταν στα E.Coli επιδρά μόνο η πεπτιδική υδρογέλη και μια μείωση της τάξης του 62.78% όταν στα E.Coli επιδρά η πεπτιδική υδρογέλη με την εγκαυλιωμένη πορφυρίνη, σε σχέση με το control δείγμα (μόνο E.Coli, δίχως επίδραση κάποιου εν δυνάμει φαρμακευτικού προϊόντος). Τα δεδομένα αυτά, φανερώνουν ότι και το διπεπτιδίο, και το διπεπτιδίο με την εγκαυλιωμένη πορφυρίνη παρουσιάζουν αντιβακτηριδιακή δράση ενάντια στο E.Coli, χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Αυτό πιθανώς συμβαίνει καθώς η υδρόφοβη προστατευτική ομάδα Fmoc έχει τη δυνατότητα να προσδένεται στην λιπόφιλη μεμβράνη του βακτηρίου συμπαρασύροντας μικρά μόρια στο εσωτερικό του κυττάρου, προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο. [35] Αντιθέτως, έπειτα από τη φωτοβόληση το δείγμα με την εγκαυλιωμένη πορφυρίνη φαίνεται να ενεργοποιείται, παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με το δείγμα που δεν έχει φωτοβοληθεί. Αυτό συμβαίνει, διότι η πορφυρίνη ως φωτοευαίσθητοποιητής έχει τη δυνατότητα όταν διεγείρεται μέσω φωτονίων, ένα ηλεκτρόνιο να μεταβαίνει από την διεγερμένη κατάσταση σε μία triplet διεγερμένη κατάσταση μέσω intersystem crossing. Από εκεί η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί με τη μορφή ενός πρωτονίου ή ενός ηλεκτρονίου σε μόρια νερού ή οξυγόνου που βρίσκονται στο γειτονικό κύτταρο, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου ή triplet οξυγόνου που προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο. [36]

Όσον αφορά το διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH εξετάστηκε η ικανότητα να σχηματίζει υδρογέλες και organogels, τα οποία θα αξιοποιηθούν στην απορρύπανση του περιβάλλοντος. Αποδείχτηκε ότι το εν λόγω διπεπτίδιο μπορεί να σχηματίζει υδρογέλες με διαλύτες την αιθανόλη/νερό και organogels με διαλύτες με DCM/εξάνιο-επτάνιο, ενώ οι δομές που σχηματίζονται είναι καλοσχηματισμένα πλέγματα ινιδίων. Η υδρογέλη του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH, και συγκεκριμένα σε συγκέντρωση 2 mg/ml, διαλύτες αιθανόλη νερό, σε αναλογία όγκων 3:7 αξιοποιήθηκε για την δέσμευση τοξικών οργανικών χρώσεων και μεταλλικών ιόντων από το υδάτινο περιβάλλον. Αποδείχθηκε ότι η συγκεκριμένη υδρογέλη όγκου 1 ml μπορεί να απορροφήσει σε χρονικό πλαίσιο 3 ημερών το 89.38% της ποσότητας χρώσης Coomassie Brilliant Blue, 20 μ M και όγκου 1 ml, το 82.5% της ποσότητας χρώσης Methylene Blue, 3.2 μ M και όγκου 1 ml, το 85.35 % της ποσότητας χρώσης Congo Red, 10 μ M και όγκου 1 ml, 43.33% της ποσότητας μεταλλικών ιόντων Co^{2+} , 0.1M και όγκου 1 ml και 58.85% της ποσότητας μεταλλικών ιόντων Ni^{2+} , 0.1M και όγκου 1 ml. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της υδρογέλης που έχει δεσμεύσει τα μεταλλικά ιόντα Ni^{2+} και Co^{2+} , και αποδείχτηκε ότι μέχρι τον 4 κύκλο επαναχρησιμοποίησης η ικανότητα για απορρόφηση μεταλλικών ιόντων είναι υψηλή. Τα πειράματα πρέπει να επαναληφθούν. Παράλληλα κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την επαναχρησιμοποίηση των υδρογελών που έχουν απορροφήσει τις προαναφερθείσες οργανικές χρώσεις. Τέλος, ελέγχθηκε η ικανότητα του πεπτιδίου να δεσμεύει πετρελαιοειδή μέσω του σχηματισμού organogel. Αυτό εξετάστηκε εισάγοντας διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH διαλυμένο σε DCM, σε μείγμα diesel και νερού. Παρατηρήθηκε ότι το διπεπτίδιο σχημάτισε organogel με το diesel, απομονώνοντας το από το νερό το οποίο παρέμενε καθαρό. Το organogel που προέκυψε είναι συγκέντρωσης 2 mg/ml και αποτελείται από αναλογία διαλυτών 2:8 DCM/diesel. Και σε αυτή την περίπτωση κρίνεται αναγκαίος ο σχεδιασμός μεθόδου επαναχρησιμοποίησης του πεπτιδίου, έπειτα από αυτή του την εφαρμογή.

7. Βιβλιογραφία

1. Mitraki G. Gazit, Mitraki Plenty of room from Biology at the Bottom -An introduction to Bionanotechnology 2nd Edition (2013), ISBN: 978-1-84816-930-2, Imperial College Press (World Scientific Publishing).
2. Mai Y, Eisenberg A. Self-assembly of block copolymers. *Chem Soc Rev.* 2012;41(18):5969–85.
3. Gazit E. Self-assembled peptide nanostructures: The design of molecular building blocks and their technological utilization. *Chem Soc Rev.* 2007;36(8):1263–9.
4. Kasotakis E, Mitraki A, Charalambidis G, Coutsolelos AG, Lazarides T. SelfAssembly Into Spheres of a Hybrid Diphenylalanine-Porphyrin: Increased Fluorescence Lifetime and Conserved Electronic Properties. *Chem – A EurJ.*2011;17(26):7213–9.
5. Mitchell EP, Llamas-Saiz AL, Jakubowski JM, Orr AA, Mossou E, Apostolidou CP, et al. A novel amyloid designable scaffold and potential inhibitor inspired by GAIIG of amyloid beta and the HIV-1 V3 loop. *FEBS Lett.*2018;592(11):1777–88
5. Neda Habibi, Nazila Kamaly, Adnan Memic, Hadi Shafiee, Self-assembled peptide-based nanostructures: Smart nanomaterials toward targeted drug delivery, *Nano Today*, Volume 11, Issue 1, 2016, Pages 41-60, ISSN 1748-0132, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.02.004>.
6. Acuña, Sergio & Veloso, María & Toledo, Pedro. (2018). Self-Assembly of Diphenylalanine-Based Nanostructures in Water and Electrolyte Solutions. *Journal of Nanomaterials.* 2018. 1-7. 10.1155/2018/8140954.
7. William D. U . S . Patent Sep . 17 , 1985. 1985;(19).
8. Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, Pandey RK. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev.* 2011;40(1):340–62

9. He W, Zhong X, Wang D, Cao H, Zhao W, Yu Z, et al. Meso-substituted porphyrin photosensitizers with enhanced near-infrared absorption: Synthesis, characterization and biological evaluation for photodynamic therapy. *Tetrahedron* [Internet]. 2018;74(21):2677–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.04.025>
10. Purrello R, Gurrieri S, Lauceri R. Porphyrin assemblies as chemical sensors. *Coord Chem Rev.* 1999;190–192:683–706.
11. Stojiljkovic I, Evavold BD, Kumar V. Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005;10(2):309–20.
12. Birel OÖ , Nadeem S, Duman H. Porphyrin-Based Dye-Sensitized Solar Cells (DSSCs):a Review. *J Fluoresc.* 2017;27(3):1075–85.
13. Jurow M, Schuckman AE, Batteas JD, Drain CM. Porphyrins as molecular electronic components of functional devices. *Coord Chem Rev* [Internet]. 2010;254(19–20):2297–310. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.0141>
14. Nicola J. Farrer, Darren M. Griffith, Exploiting azide–alkyne click chemistry in the synthesis, tracking and targeting of platinum anticancer complexes, *Current Opinion in Chemical Biology*, Volume 55, 2020, Pages 59-68, ISSN 1367-5931
15. Reithofer, Michael & Chan, Kiat & Lakshmanan, Anupama & Lam, Dang & Mishra, Archana & Gopalan, Began & Joshi, Mangesh & Wang, Shu & Hauser, Charlotte. (2014). Ligation of anti-cancer drugs to self-assembling ultrashort peptides by click chemistry for localized therapy. *Chem. Sci.* 5. 625-630. 10.1039/C3SC51930A.

16. Adler-Abramovich L, Gazit E. Correction: The physical properties of supramolecular peptide assemblies: from building block association to technological applications. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2014;43(20):7236.
17. Fichman G, Gazit E. Self-assembly of short peptides to form hydrogels: Design of building blocks, physical properties and technological applications. *Acta Biomater* [Internet]. 2014;10(4):1671–82.
18. Malmsten M. Antimicrobial and antiviral hydrogels. *Soft Matter*. 2011;7(19):8725–36
19. Li, J., Mooney, D. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater* **1**, 16071 (2016).
20. Chetia, M. et al. (2020) ‘Self-assembly and multifunctionality of peptide organogels: Oil spill recovery, dye absorption and synthesis of conducting biomaterials’, *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 10(9), pp. 5220–5233. doi: 10.1039/c9ra10395c.
21. Mondal, B. et al. (2020) ‘Peptide-based gel in environmental remediation: Removal of toxic organic dyes and hazardous Pb²⁺ and Cd²⁺ ions from wastewater and oil spill recovery’, *Langmuir*, 36(43), pp. 12942–12953. doi: 10.1021/acs.langmuir.0c02205.
22. Nandi, N. et al. (2017) ‘A dipeptide-based superhydrogel: Removal of toxic dyes and heavy metal ions from waste water’, *Biopolymers*, 108(1). doi: 10.1002/bip.22915
23. N. SRINIVASAN, C. A. HANEY, J. S. LINDSEY, W. ZHANG and B. T. CHAIT, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 1999, 03, 283-291
24. Φασματοσκοπία Μάζας MS-TOF, Γιάννης Μαργαρός
25. H. L. Anderson, *Chem Commun*, 1999, 2323-2330.
26. K. M. Smith, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Ed. (Elsevier, Amsterdam, 1975), M. Boulton et al., *J. Photochem. & Photobio. B: Biology*, 64, 144, (2001), E.I. Sagun et al., *Chem. Phys.*, 275, 211, (2002)

27. M. Gouterman, G. H. Wagnière and L. C. Snyder, *Journal of Molecular Spectroscopy*, 1963, **11**, 108-127.
28. Q. Gangemi, Chiara & Iudici, Mario & Spitaleri, Luca & Randazzo, Rosalba & Gaeta, Massimiliano & D'Urso, Alessandro & Gulino, Antonino & Purrello, Roberto & Fragalà, Maria. (2019). Polyethersulfone Mats Functionalized with Porphyrin for Removal of Para-nitroaniline from Aqueous Solution. *Molecules*. 24. 3344. 10.3390/molecules24183344.
29. Newbury, D. E., Joy, D. C., Echlin, P., Fiori, C. E., & Goldstein, J. I. (1986). *Advanced Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*
30. Mahler, A. & Reches, M. & Rechter, M. & Cohen, Smadar & Gazit, Ehud. (2006). Rigid, Self-Assembled Hydrogel Composed of a Modified Aromatic Dipeptide. *Advanced Materials*. 18. 1365 - 1370. 10.1002/adma.200501765.
31. Chauhan, Neelam & Singh, Yashveer. (2020). Self-Assembled Fmoc-Arg-Phe-Phe Peptide Gels with Highly Potent Bactericidal Activities. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 6. 10.1021/acsbmaterials.0c00660.
32. Stojiljkovic, Igor & Evavold, Brian & Kumar, Veena. (2001). Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert opinion on investigational drugs*. 10. 309-20. 10.1517/13543784.10.2.309.
33. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 210-216.
34. Reithofer, Michael & Chan, Kiat & Lakshmanan, Anupama & Lam, Dang & Mishra, Archana & Gopalan, Began & Joshi, Mangesh & Wang, Shu & Hauser, Charlotte. (2014). Ligation of anti-cancer drugs to self-assembling ultrashort peptides by click chemistry for localized therapy. *Chem. Sci.*. 5. 625-630. 10.1039/C3SC51930A.
35. Debnath, Sisir & Shome, Anshupriya & Das, Dibyendu & Das, Prasanta. (2010). Hydrogelation Through Self-Assembly of Fmoc-Peptide Functionalized Cationic Amphiphiles: Potent Antibacterial Agent. *The journal of physical chemistry. B*. 114. 4407-15. 10.1021/jp909520w.

36.Amos-Tautua, Bamidele & Songca, Sandile & Oluwafemi, Oluwatobi. (2019). Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules*. 24. 2456. 10.3390/molecules24132456.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Fmoc: fluorenylmethoxycarbonyl

Phe: phenylalanine

Leu: leukine

Ile: isoleukine

Fmoc-F-I-OH: fluorenylmethoxycarbonyl - phenylalanine - isoleukine

Fmoc-F-L-OH: fluorenylmethoxycarbonyl – phenylalanine - leukine

FESEM: Field Emission Scanning Electron Microscopy

EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid

[H2-TMePyP(I4)]: [5,10,15,20-Tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrinato] tetraiodide

DCM: Dichloromethane

DMP: di-mesytil-porphyrin

TFA: Trifluoroacetic-acid

THF: TetraHydroFuran

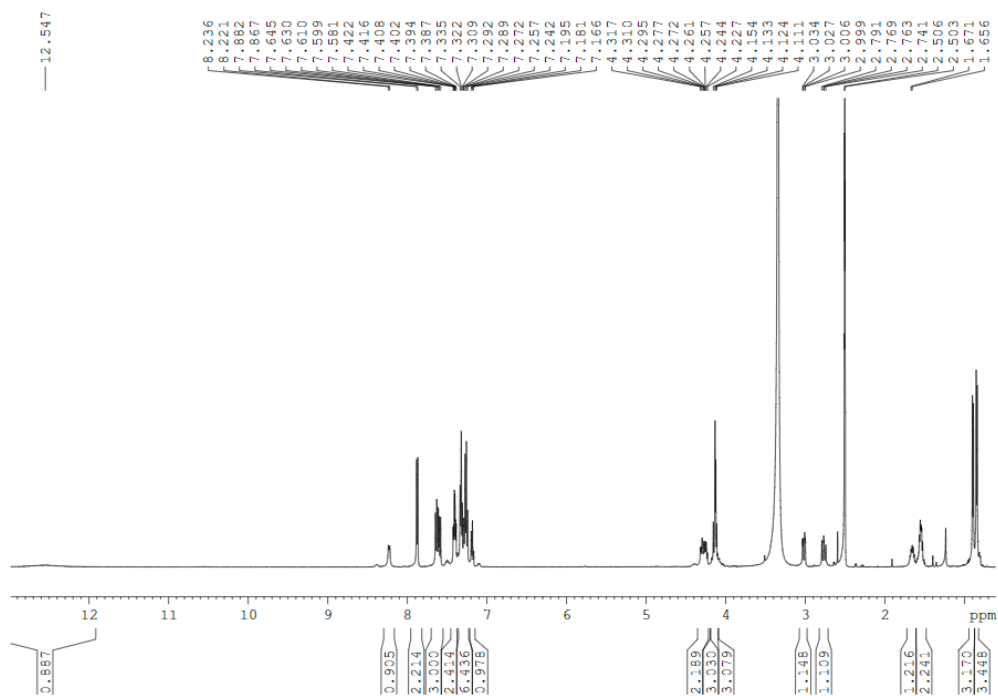
RT: Room Temperature

DDQ: 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

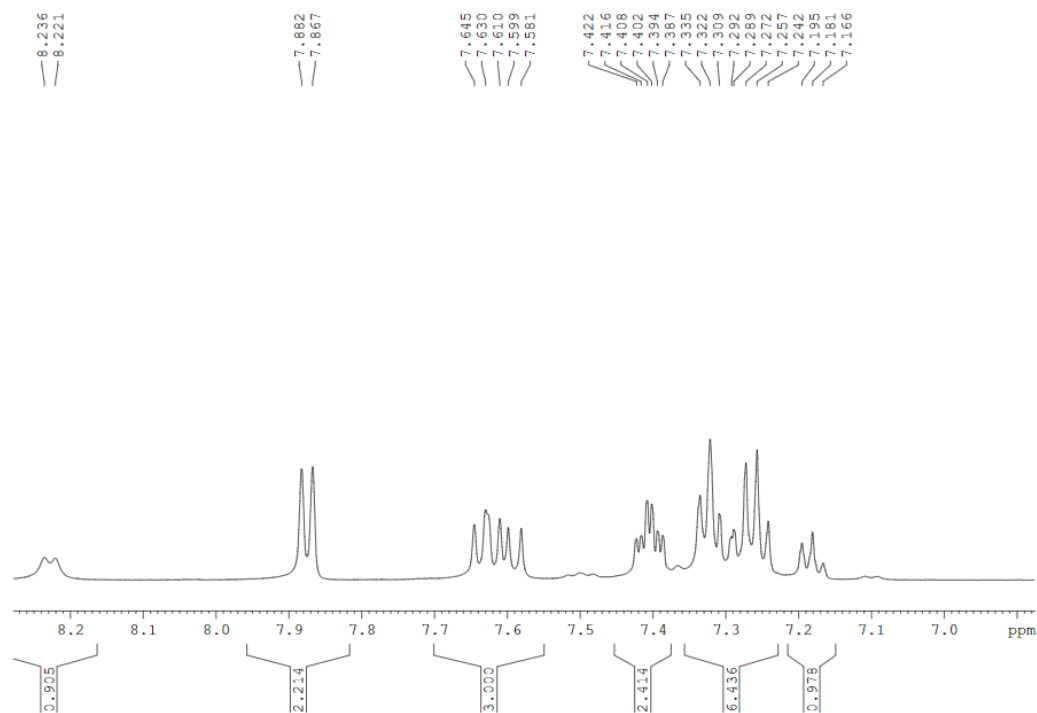
NMR: Nucleic Magnetic Resonance

TLC: Thin-layer chromatography

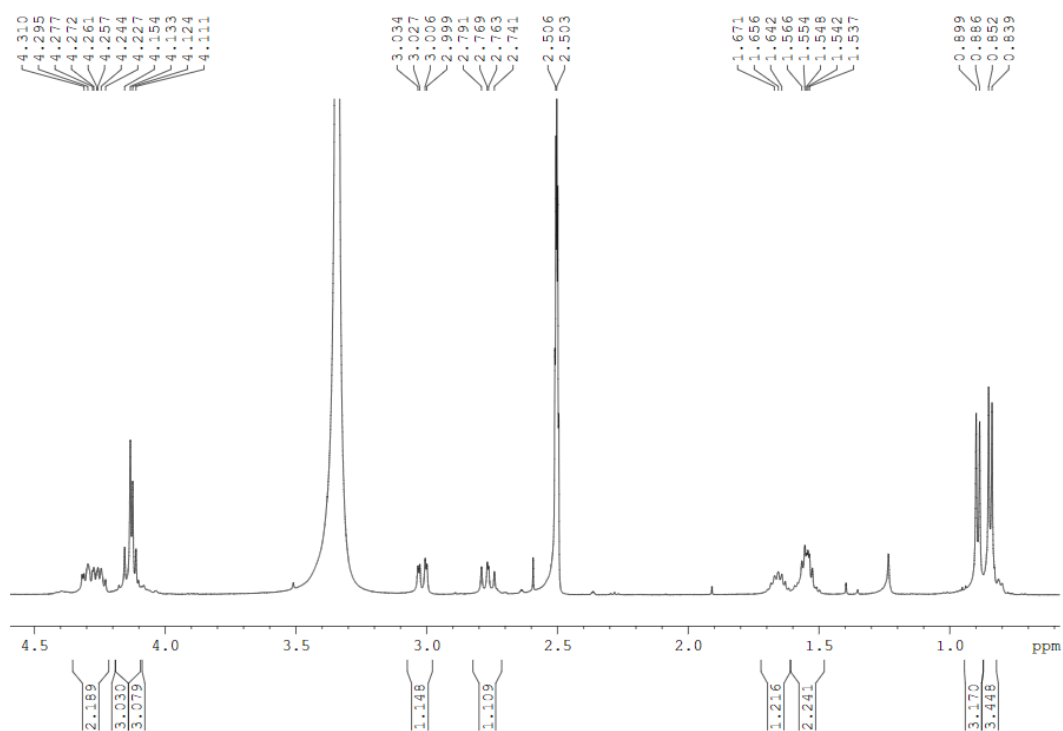
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



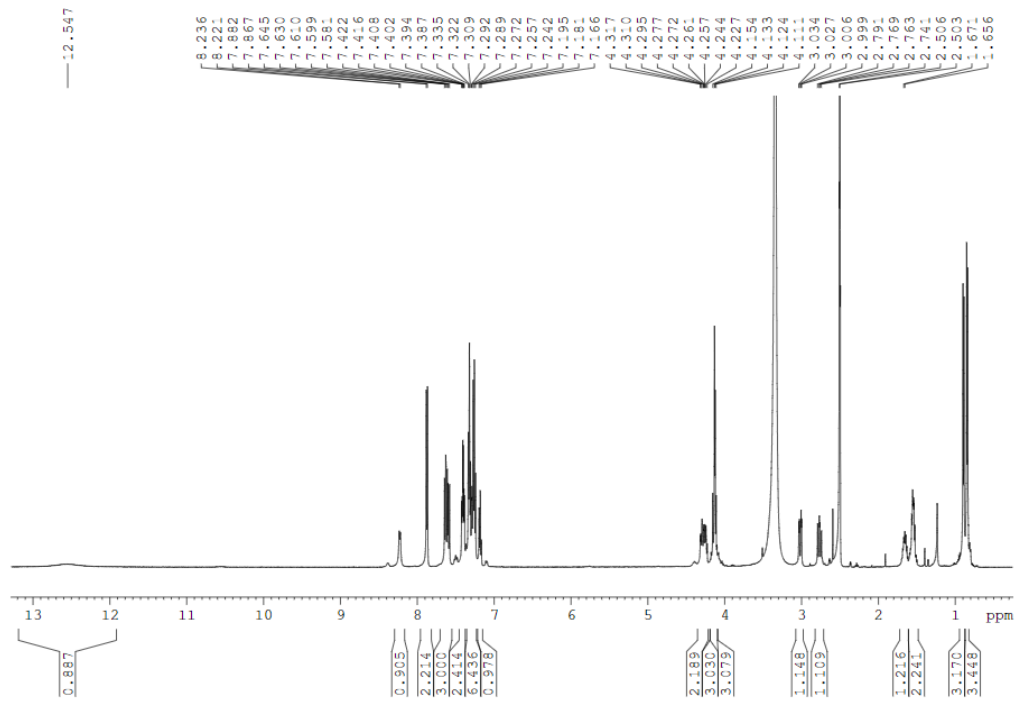
Σχήμα 1: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆), Fmoc-Phe-Ile-OH.



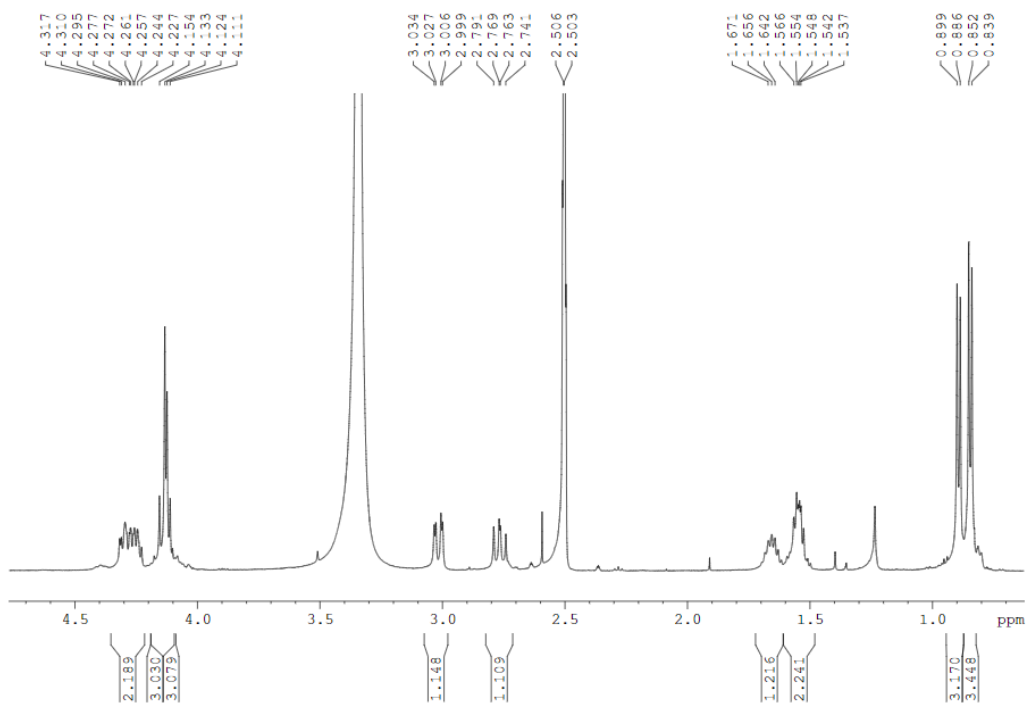
Σχήμα 2: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆), Fmoc-Phe-Ile-OH (αρωματική περιοχή)



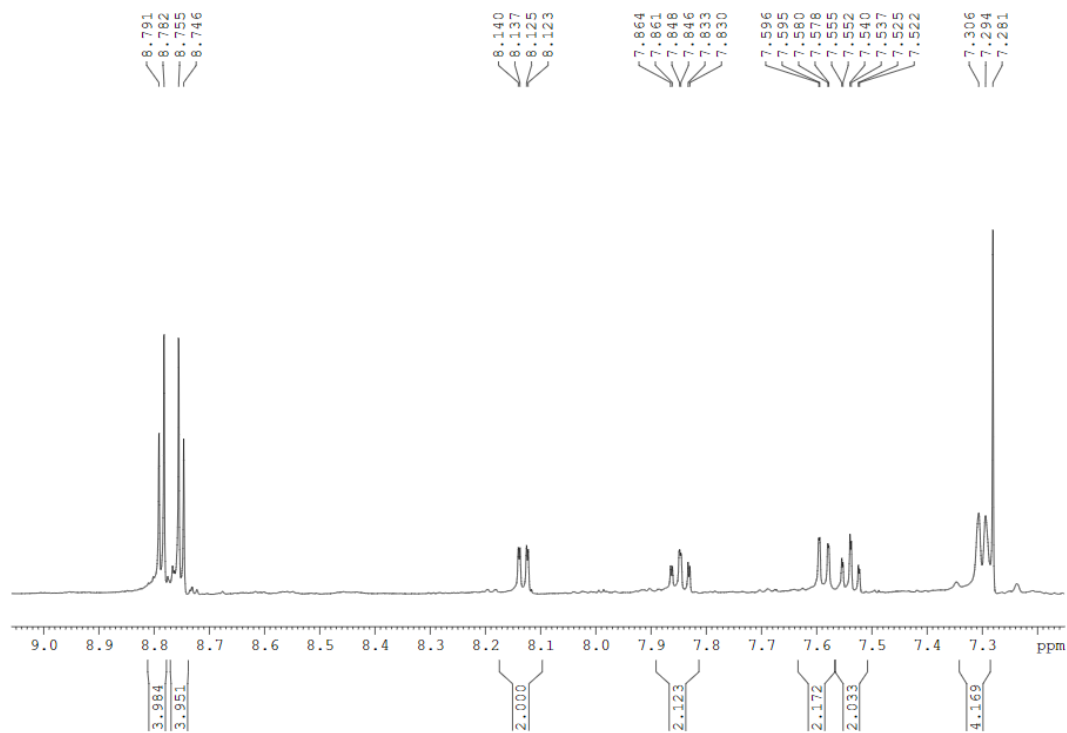
Σχήμα 3: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆), Fmoc-Phe-Ile-OH (αλειφατική περιοχή)



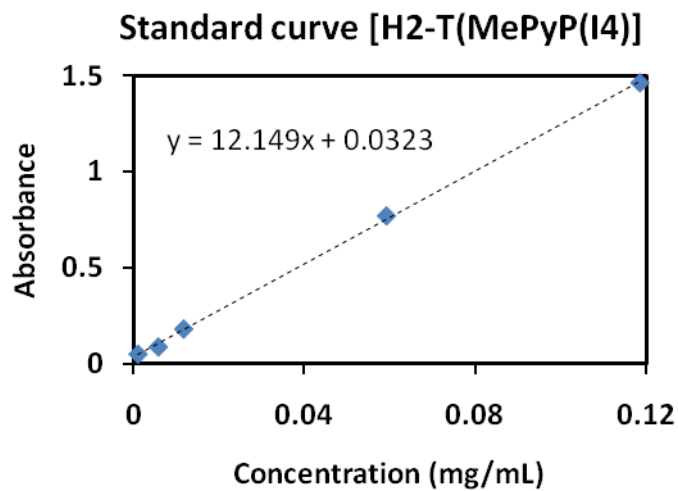
Σχήμα 4: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆), Fmoc-Phe-Leu-OH



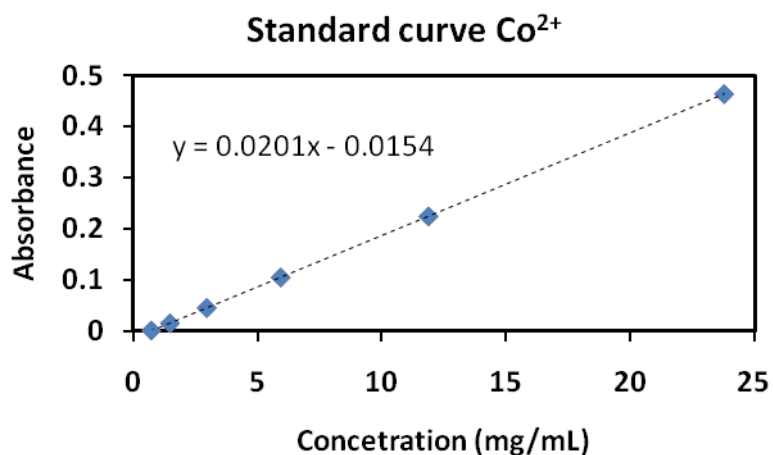
Σχήμα 5: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆), Fmoc-Phe-Leu-OH (αρωματική περιοχή)



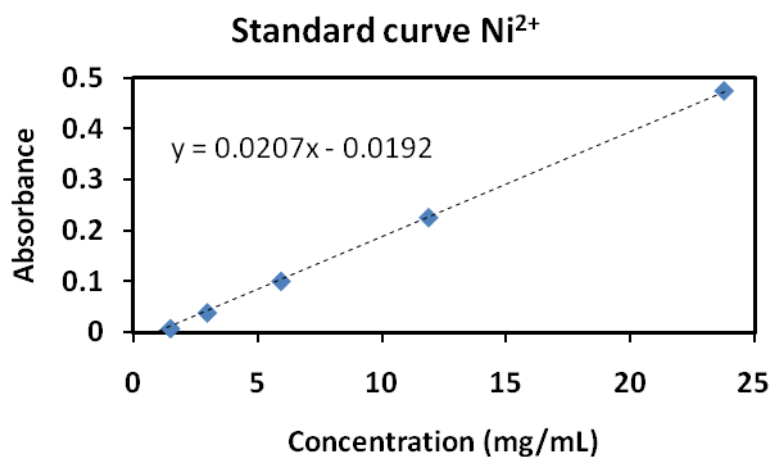
Σχήμα 8: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) της Zn- α -5,15-bis(2-azido-phenyl)10,20-bis-(2,4,6-trimethyl) porphyrin



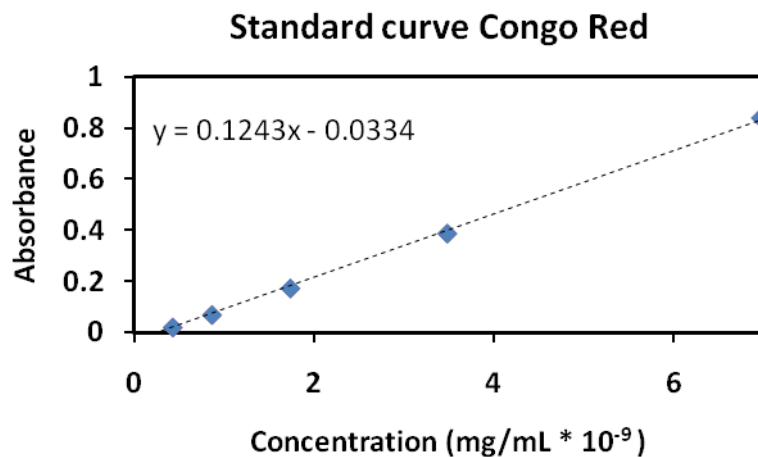
Σχήμα 9: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης προς συγκέντρωση σε mg/ml της υδατοδιαλυτής πορφυρίνης. Σχηματίστηκε με την μέτρηση της απορρόφησης υδατικών διαλυμάτων πορφυρίνης γνωστής συγκέντρωσης.



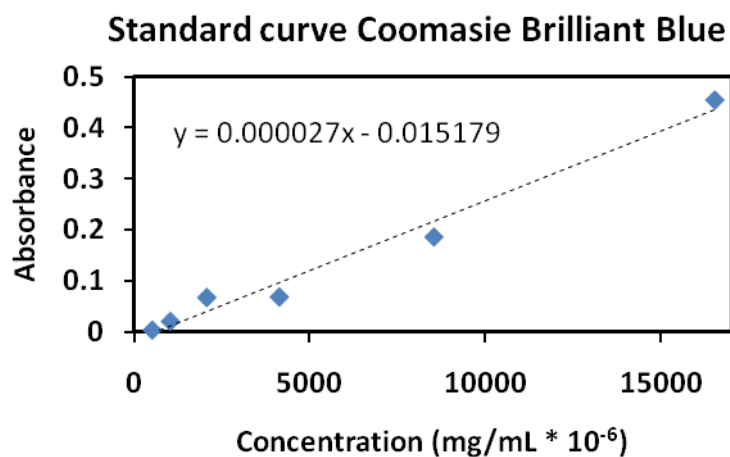
Σχήμα 10: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης προς συγκέντρωση σε mg/ml των μεταλλικών ιόντων Co²⁺. Σχηματίστηκε με την μέτρηση της απορρόφησης υδατικών διαλυμάτων Co²⁺ γνωστής συγκέντρωσης.



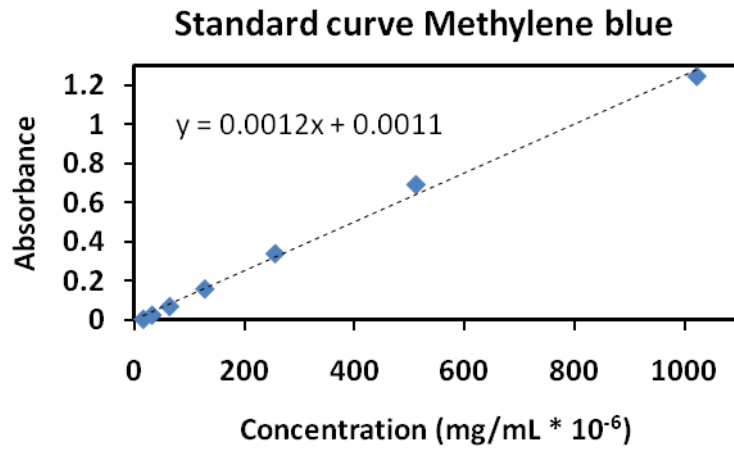
Σχήμα 10: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης προς συγκέντρωση σε mg/ml των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺. Σχηματίστηκε με την μέτρηση της απορρόφησης υδατικών διαλυμάτων Ni²⁺ γνωστής συγκέντρωσης.



Σχήμα 11: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης προς συγκέντρωση σε mg/ml της οργανικής χρώσης Congo Red. Σχηματίστηκε με την μέτρηση της απορρόφησης υδατικών διαλυμάτων χρώσης γνωστής συγκέντρωσης.



Σχήμα 12: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης προς συγκέντρωση σε mg/ml της οργανικής χρώσης Coomassie Brilliant Blue. Σχηματίστηκε με την μέτρηση της απορρόφησης υδατικών διαλυμάτων χρώσης γνωστής συγκέντρωσης.



Σχήμα 13: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης προς συγκέντρωση σε mg/ml της οργανικής χρώσης Methylene Blue. Σχηματίστηκε με την μέτρηση της απορρόφησης υδατικών διαλυμάτων χρώσης γνωστής συγκέντρωσης.