

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΝΑΝΟΪΒΡΙΔΙΩΝ ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ  
ΜΕ ΣΤΟΙΒΑΓΜΕΝΑ ΔΙΠΛΑ ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΑ

ΚΑΝΤΩΝΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Δ. ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ.  
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ  
ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

2005

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF  
NANOHYBRIDS OF PORPHYRIN RINGS WITH  
LAYERED DOUBLE HYDROXIDES

KANTONIS GEORGE

SUPERVISOR:PROFESSOR D.GHANOTAKIS

MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF CRETE

2005

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας-Βιοφυσικής του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δημήτριου Γανωτάκη, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για την επιστημονική του καθοδήγηση, αλλά κυρίως για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε ολόκληρο το διάστημα της συνεργασίας μας για την ανεξαρτησία στο χειρισμό θεμάτων που αφορούσαν την πορεία της ερευνητικής μου δουλειάς, τη συνεχή ενθάρρυνση καθώς και για την οικονομική βοήθεια που μου παρείχε.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, καθώς και τους καθηγητές του ΕΠΕΑΕΚ “Σύνθεση και Απομόνωση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα”, που με δέχτηκαν ως μεταπτυχιακό φοιτητή τους και ιδιαίτερα τους κύριους Τσιώπη Γιώργο και Χανιωτάκη Νικόλαο, που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα την παρούσα εργασία συμμετέχοντας στην εξεταστική επιτροπή μου.

Ακολούθως, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω τους Διδάκτορες Δαβόρα Ευάγγελο και Ψυλινάκη Μανώλη αφενός για την βοήθεια της στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο και αφετέρου για τη συνεισφορά της στη διαμόρφωση των σημερινών μου γνώσεων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες μου Τρικεριώτη Μάρκο και Μαργέλλου Μίνα για τις ατέλειωτες ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο όλο το διάστημα της ερευνητικής μου σταδιοδρομίας, για τη στήριξη και συμπαράστασή τους σε κάθε προσπάθειά μου, για τις πολύτιμες συμβουλές τους καθώς και για το υπέροχο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο κατά την συνεργασία μας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Τουλουπάκη Ελευθέριο, Καβελάκη Πόπη, Ανυφαντάκη Ελίνα, Αλεξανδρίδη Νίκο, Χριστοφάκη Μανώλη, Κοκκινίδου Σμαρώ για τη συμμετοχή τους στο υπέροχο κλίμα συνεργασίας που υπήρχε στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Θα ήταν μεγάλη παράληψη εκ μέρους μου να μην ευχαριστήσω τους Ξημεράκη Δημήτρη, Σαράφη Παναγιώτη και Τσαγκαράκη Κώστα για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την λήψη των φασμάτων  $^1\text{H NMR}$  και για την

βοήθεια τους κατά την ερμηνεία αυτών καθώς και τον Αφράτη Θανάση για την λήψη των φασμάτων περίθλασης ακτίνων Χ.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, τον Μονεμβάσιο Ιωάννη, τον Τσίπο Παναγιώτη, τον Μάγδη Γεώργιο, τον Κουμαντάκη Σταύρο, τον Σφακιανάκη Δημήτρη για τις ευχάριστες ώρες που περάσαμε μαζί και για την στήριξη τους σε όλη την διάρκεια των πανεπιστημιακών μου σπουδών καθώς και την Ζουράρη Κυβέλη για την για την ενθάρρυνση της κατά την διάρκεια της συγγραφής της εργασίας καθώς και για την παροχή του υπολογιστή της.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική τους συμπαράσταση κατά τη διάρκεια των φοιτητικών μου σπουδών, για την στήριξη και ενθάρρυνσή τους κάθε χρονική στιγμή της ζωής μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται η σύνθεση νανοϋβριδίων πορφυρινικών δακτυλίων με ανόργανα υλικά και η μελέτη των ιδιοτήτων τους. Πιο συγκεκριμένα συντίθενται υβρίδια του ανόργανου υλικού LDH με την πρωτοπορφυρίνη IX και την αιμίνη. Αρχικά πραγματοποιείται η ακινητοποίηση των πορφυρινικών δακτυλίων στο LDH χρησιμοποιώντας διαφορετικές συνθήκες για κάθε μία από αυτές. Ακολουθεί χαρακτηρισμός του κάθε νανοϋβριδίου με χρήση φασματοσκοπιών IR, XRD, EPR. Στην συνέχεια μελετάται η ικανότητα του νανοϋβριδίου LDH – P.IX να δρα ως φωτοευαίσθητοποιητής κατά την φωτοξείδωση ενός οργανικού υποστρώματος και συγκρίνεται η δραστηριότητα αυτού σε σχέση με αυτή της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX. Το νανοϋβρίδιο LDH – αιμίνη το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα μοντέλο μεταφοράς O<sub>2</sub> μελετάται με φασματοσκοπία ορατού και εξετάζεται η συμπεριφορά του υπό την παρουσία διαφόρων αντιδραστηρίων, ενώ παράλληλα γίνεται και σύγκριση σε σχέση με την ελεύθερη αιμίνη.

**Λέξεις κλειδιά:** στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια, πρωτοπορφυρίνη IX, αιμίνη, οξυγόνο απλής κατάστασης, φωτοδυναμική θεραπεία, μοντέλο μεταφοράς O<sub>2</sub> στα κύτταρα.

## ABSTRACT

The aim of this work was the synthesis of nanohybrids of porphyrin rings with inorganic species and the study of their properties. Specifically the inorganic material LDH was combined with Protoporphyrin IX and Hemin in order to produce organic-inorganic nanohybrids. Initially the two porphyrins were immobilized inside the layers of LDH under different conditions for each one. The two nanohybrids were characterized using IR, XRD and EPR spectroscopy. The ability of the nanohybrid LDH – P.IX to act as a photosensitizer was examined during the photooxidation of an organic substrate and compared with the ability exhibited by the free protoporphyrin IX. The nanohybrid LDH – hemin, which could be used as a model of transfer O<sub>2</sub> to cells was studied with UV – VIS spectroscopy and its properties were investigated in the presence of different reagents, while at the same time a comparison with the free hemin was made.

**Keywords:** layered double hydroxides (LDH), protoporphyrin IX, hemin, singlet oxygen, photodynamic therapy, model for the transfer of O<sub>2</sub> to cells

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b>LDH</b>	: Στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια
<b>P.IX</b>	: Πρωτοπορφυρίνη IX
<b>P.F.C<sub>7</sub></b>	: Υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ
<b>EPR</b>	: Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός
<b>IR</b>	: Φασματοσκοπία Υπερύθρου
<b>XRD</b>	: Περίθλαση Ακτίνων Χ
<b>UV – vis</b>	: Φασματοσκοπία Υπεριώδους Ορατού
<b>PDT</b>	: Φωτοδυναμική Θεραπεία
<b>NMR</b>	: Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
<b>ppm</b>	: μέρη στο εκατομμύριο
<b>rpm</b>	: στροφές ανά λεπτό
<b>TRIS</b>	: Τρις (υδροξυμέθυλο)αμινομεθάνιο

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Γενικά .....	3
1.2 ΣΤΟΙΒΑΓΜΕΝΑ ΔΙΠΛΑ ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΑ .....	5
1.2.1 Εισαγωγή .....	5
1.2.2 Δομή.....	5
1.2.3 Ιδιότητες .....	6
1.2.4 Χαρακτηρισμός.....	8
1.2.5 Εφαρμογές .....	10
1.3 ΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ – ΜΕΤΑΛΛΟΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ.....	13
1.3.1 Πορφυρίνες .....	13
1.3.2 Μεταλλοπορφυρίνες.....	17
1.3.3 Ονοματολογία πορφυρινών.....	19
1.3.4 Ηλεκτρονική Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού.....	21
1.4 Ακίνητοποίηση πορφυρινών σε LDH.....	22
Α΄ ΜΕΡΟΣ : ΠΡΩΤΟΠΟΡΦΥΡΙΝΗ ΙΧ.....	24
2.1.1 Γενικά .....	24
2.1.2 Φωτοδυναμική Θεραπεία .....	25
2.1.3 Φωτοευαίσθητοποιητές σε κύτταρα.....	27
2.1.4 Στόχος εργασίας.....	28
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	29
2.2.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (LDH).....	29
2.2.2 Σύνθεση υβριδίου LDH–P.IX .....	29
2.2.3 Σύνθεση υβριδίου LDH–P.IX–PFC <sub>7</sub> .....	30
2.2.4 Μελέτη δραστηριότητας του υβριδίου LDH–P.IX .....	31
2.2.5 Φάσματα UV – VIS ελεύθερης, δεσμευμένης P.IX .....	32
2.2.6 Μελέτη σταθερότητας υβριδίου LDH–P.IX.....	32
ΑΝΑΛΥΣΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	33
2.3.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (LDH).....	33
2.3.2 Σύνθεση υβριδίου LDH–P.IX .....	35
2.3.3 Σύνθεση υβριδίου LDH–P.IX–PFC <sub>7</sub> .....	37
2.3.4 Μελέτη δραστηριότητας υβριδίων LDH–P.IX, LDH–P.IX–PFC <sub>7</sub> .....	40
2.3.5 Φάσματα UV – VIS ελεύθερης, δεσμευμένης P.IX .....	42
2.3.6 Μελέτη σταθερότητας του υβριδίου LDH–P.IX .....	44
2.4 Συμπεράσματα .....	45



Β΄ ΜΕΡΟΣ : ΑΙΜΙΝΗ .....	47
3.1.1 Γενικά .....	47
3.1.2 Αιμοπρωτεΐνες.....	47
3.1.3 Κυτοχρώματα .....	48
3.1.4 Ένζυμα .....	49
3.1.5 Σκοπός εργασίας.....	50
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	51
3.2.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (LDH).....	51
3.2.2 Σύνθεση LDH–αιμίνη .....	51
3.2.3 Μελέτη υβριδίου LDH–αιμίνη με φασματοσκοπία EPR .....	52
3.2.4 Μελέτη ελεύθερης και δεσμευμένης αιμίνης με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV – VIS) .....	52
ΑΝΑΛΥΣΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	53
3.3.1 Σύνθεση υβριδίου LDH–αιμίνη .....	53
3.3.2 Μελέτη υβριδίου LDH–αιμίνη με φασματοσκοπία EPR .....	56
3.3.3 Μελέτη αιμίνης, υβριδίου LDH–αιμίνη με φασματοσκοπία ορατού ...	57
3.4 Συμπεράσματα .....	71
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Γενικά

Η ανάπτυξη των βιολογικών επιστημών και γενικά των επιστημών υγείας πραγματοποιείται τα τελευταία χρόνια με ολοένα και γρηγορότερους ρυθμούς. Η ραγδαία ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας καθιστά σαφές το γεγονός ότι τα βιολογικά υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα τεχνολογικών εφαρμογών. Έτσι η σύνθεση νέων υλικών που εμπεριέχουν βιομόρια και μιμούνται την δράση τους αυξάνεται ολοένα και περισσότερο. Τα πλεονεκτήματα αυτών των υλικών είναι ότι παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα, ενώ παράλληλα εμφανίζουν και μεγάλη εξειδίκευση στον τομέα με τον οποίο εμπλέκονται. Οι τομείς στους οποίους μπορούν να βρουν εφαρμογή ποικίλουν από την βιομηχανία (βιοκαταλύτες στην παραγωγή χημικών προϊόντων) μέχρι τη διάγνωση (βιοαισθητήρες) και την ιατρική (φωτοδυναμική θεραπεία).

Το βασικότερο μειονέκτημα των βιολογικών υλικών που περιορίζει αρκετά την χρήση τους είναι η μειωμένη σταθερότητα τους ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες χρησιμοποιούνται. Έτσι η έκθεση ενός βιολογικού μορίου σε κάποιο συγκεκριμένο περιβάλλον μπορεί να καταστρέψει τη δομή του και να το αποτρέψει από την εκτέλεση κάποιας συγκεκριμένης λειτουργίας για την οποία προορίζεται. Η ασυμβατότητα των βιολογικών μορίων με τις συνθήκες των τεχνολογικών εφαρμογών μπορεί να ξεπεραστεί με την ακινητοποίησή τους σε κάποιο υλικό.

Οι πορφυρίνες αποτελούν μία εξαιρετικά εκτενή ομάδα αρωματικών χημικών ενώσεων, έντονου κόκκινου (πορφυρού) χρώματος, στο οποίο οφείλουν και το όνομά τους που απαντώνται σε πολλές βιολογικές και χημικές διεργασίες στη φύση. Τα τελευταία όμως χρόνια, το πεδίο εφαρμογών τους επεκτείνεται εκτός των άλλων και σε ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Είναι μόρια εξέχουσας βιολογικής σημασίας και συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως η μεταφορά και αποθήκευση οξυγόνου (αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη), η μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (κυτοχρώματα) καθώς και κατά την διαδικασία της φωτοσύνθεσης

(χλωροφύλλες). Το γεγονός ότι ο πορφυρινικός σκελετός εντοπίζεται σε όλα τα βιολογικά συστήματα, αποτέλεσε σημείο αναφοράς για τη σύγχρονη επιστήμη. Με τη σύνθεση των κατάλληλων πορφυρινών κατέστη δυνατή η αποκωδικοποίηση πολλών περίπλοκων βιολογικών διεργασιών, σε *in vitro* μελέτες. Συγκεκριμένα, πορφυρίνες κατάλληλα σχεδιασμένης αρχιτεκτονικής, στις οποίες μεταβάλλονται επιλεκτικά ορισμένα δομικά τους χαρακτηριστικά, δρουν ως μιμητές του ενεργού κέντρου ορισμένων ενζύμων.

Τέλος, οι πορφυρίνες έχουν προταθεί ως εν δυνάμει πολλά υποσχόμενοι φωτοευαίσθητοποιητές για τη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου, καθόσον πληρούν όλες τις απαραίτητες προδιαγραφές.<sup>1</sup> Συγκεκριμένα, επάγουν τον φωτοχημικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων<sup>2</sup>, χωρίς να επιδρούν σημαντικά στα υγιή.<sup>3</sup> Το εκτεταμένο αρωματικό τους σύστημα οδηγεί στην ευρείας ζώνης απορρόφησή τους, στον έντονο φθορισμό τους και στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων διεγερμένων δραστικών μορίων που προσβάλλουν τα κακοήθη κύτταρα.<sup>4</sup> Επιπρόσθετα, εξαιτίας της συγγένειάς τους με τα συστατικά του ανθρώπινου οργανισμού μπορούν να διαλυθούν εύκολα στον σωματικό ιστό και στη συνέχεια να μεταφερθούν αποτελεσματικά στην περιοχή του όγκου.

Στην παρούσα εργασία μελετάται η ακινητοποίηση πορφυρινικών δακτυλίων σε ένα ανόργανο υπόστρωμα τα στοιβαγμένα διπλά υδροξειδία (Layered Double Hydroxides). Ο κατάλληλος σχεδιασμός του ανόργανου υποστρώματος καθώς και η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών για την σταθεροποίηση των πορφυρινών μπορεί να δώσει νέα υβριδικά υλικά με ποικίλες εφαρμογές. Τα υλικά αυτά μελετήθηκαν φασματοσκοπικά, ενώ ελέγχθηκε και η δραστηότητά τους.

## 1.2 ΣΤΟΙΒΑΓΜΕΝΑ ΔΙΠΛΑ ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΑ

### 1.2.1 Εισαγωγή

Τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια (LDH), ή αλλιώς μικτά μεταλλικά υδροξείδια, είναι ανόργανα πολυμερή που αποτελούνται από υδροξείδια δύο διαφορετικών μετάλλων. Συχνά αποκαλούνται «ανιονικοί πηλοί» καθώς περιέχουν κάποιο ανιόν ( $\text{CO}_3^{-2}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  κ.ά.) και έχουν κοινές ιδιότητες με τους περισσότερους πηλούς. Σημαντικότερες από αυτές τις κοινές ιδιότητες είναι ότι σχηματίζουν κρυστάλλους μεγέθους από μερικά μικρόμετρα έως και λιγότερο από 1μm καθώς επίσης ότι προσροφούν σημαντικές ποσότητες νερού ανάλογα με την υγρασία του περιβάλλοντα χώρου. Οι κατιονικοί πηλοί (ιλλίτης, μοντμοριλλονίτης κ.ά.) ανήκουν στην ομάδα των φυλλοπηριτικών ορυκτών και σε αντίθεση με τους ανιονικούς πηλούς, είναι αρκετά διαδεδομένοι στη φύση.

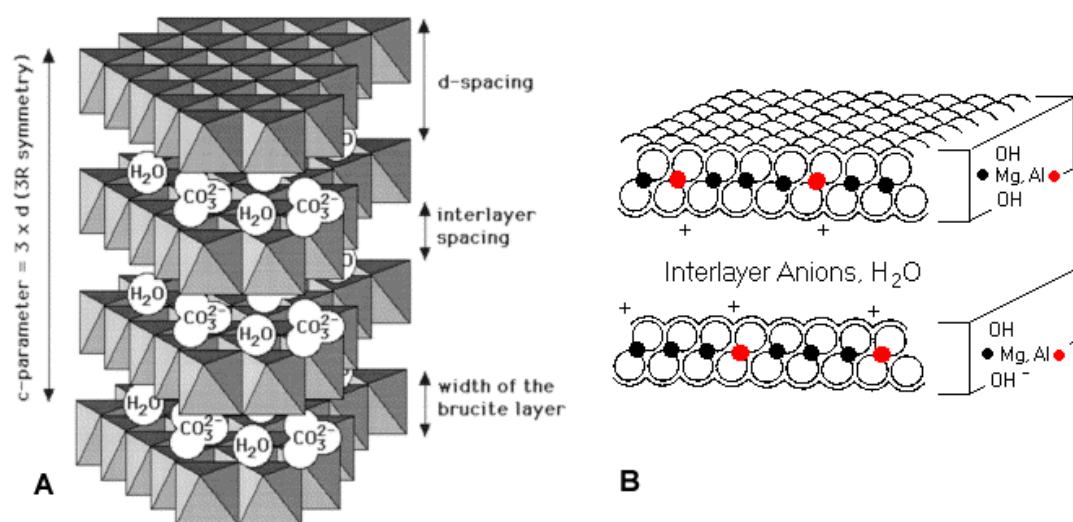
Η χημική σύσταση των LDH μπορεί να περιγραφεί από το γενικό τύπο  $[\text{M}^{\text{II}}_x\text{M}^{\text{III}}_y(\text{OH})_{2x+2y}][\text{A}^{\text{n-}}]_{y/n}z\text{H}_2\text{O}$ , όπου  $\text{M}^{\text{II}}$  και  $\text{M}^{\text{III}}$  είναι ένα δισθενές και ένα τρισθενές μέταλλο αντίστοιχα και  $\text{A}^{\text{n-}}$  είναι το ανιόν. Το φυσικό ορυκτό υδροταλασίτης ανήκει στα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια και έχει τύπο  $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}][\text{CO}_3]4\text{H}_2\text{O}$ . Τόσο ο υδροταλασίτης όσο και τα υπόλοιπα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια μπορούν να παρασκευαστούν εύκολα και με χαμηλό κόστος σε εργαστηριακή κλίμακα.<sup>5,6,7</sup> Κατά τη σύνθεση μπορεί εύκολα να ελεγχθεί το είδος και η αναλογία των  $\text{M}^{\text{II}}$  και  $\text{M}^{\text{III}}$ , καθώς και το είδος του ανιόντος. Έτσι έχουν παρασκευαστεί LDH με Mg-Al, Mg-Fe, Ni-Al, Zn-Al, Li-Al, κ.α.<sup>5,8,9</sup> Οι συνήθεις αναλογίες  $\text{M}^{\text{II}}/\text{M}^{\text{III}}$  είναι 4/1, 3/1 και 2/1. Κατά τη σύνθεση του LDH μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά ανιόντα όπως  $\text{CO}_3^{-2}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{OH}^-$ . Πληθώρα άλλων ανιόντων είναι δυνατόν να εισαχθούν στη συνέχεια με ανιονανταλλαγή στην οποία θα γίνει εκτενής αναφορά παρακάτω.

### 1.2.2 Δομή

Χαρακτηριστικό της δομής των LDH είναι ότι σχηματίζουν διαδοχικά στρώματα μεταλλικών υδροξειδίων και ανιόντων (σχήμα 1). Τα στρώματα

των μεταλλικών υδροξειδίων έχουν δομή παρόμοια με το ορυκτό Βρουσίτης (Brucite,  $Mg(OH)_2$ ) και το πάχος τους είναι  $4.78\text{\AA}$ .<sup>5</sup> Στο Βρουσίτη κάθε άτομο Mg είναι οκταεδρικά συναρμοσμένο με έξι υδροξύλια. Τα οκτάεδρα αυτά σχηματίζουν δισδιάστατα στρώματα όπως φαίνεται στο σχήμα 1Α. Αν ορισμένα από τα άτομα Mg αντικατασταθούν από άτομα Al τότε το στρώμα αποκτά θετικό φορτίο (σχήμα 1). Το φορτίο αυτό αντισταθμίζεται από τα ανιόντα του ενδιαμέσου στρώματος στο οποίο βρίσκονται και τα μόρια  $H_2O$ . Το πάχος του στρώματος αυτού εξαρτάται από το είδος του ανιόντος που το σχηματίζει.

Ανάλυση των LDH με ηλεκτρονική μικροσκοπία δείχνει ότι σχηματίζουν κρυστάλλους σε σχήμα εξαγωνικής πλάκας.<sup>6,10,11</sup> Οι κρύσταλλοι αυτοί έχουν μέγεθος από 100nm έως μερικά μικρόμετρα ανάλογα με τη συνθετική μέθοδο που χρησιμοποιείται.



**Σχήμα 1.** Αναπαράσταση της δομής των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων.

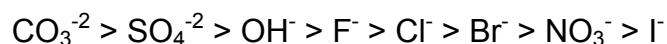
### 1.2.3 Ιδιότητες

Οι βασικότερες ιδιότητες των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων είναι η παραγωγή των αντίστοιχων μεταλλικών οξειδίων μετά από φρύξη, η ιονανταλλαγή και η αποσύνθεσή τους σε όξινες συνθήκες. Δεν θα πρέπει να

παραλείψουμε να αναφέρουμε ότι τα στοιβαγμένα διπλά υδροξειδία είναι βιοσυμβατά και μπορούν να βρουν πολλές εφαρμογές.

Τα μικτά μεταλλικά οξειδία που προκύπτουν μετά από φρύξη του LDH στους 500°C για 18 τουλάχιστον ώρες έχουν μικρό μέγεθος κρυστάλλων με μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας, αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες και αλκαλικές ιδιότητες.<sup>9</sup> Κατά τη φρύξη απομακρύνεται το νερό καθώς και τα ανιόντα με αποτέλεσμα να αλλάζει εντελώς η δομή και οι ιδιότητες του υλικού. Τα μικτά οξειδία μπορούν να επανακτήσουν τη δομή του LDH αν βρεθούν σε υδατικό διάλυμα κάποιου ανιόντος. Έτσι η φρύξη και εφυδάτωση αποτελεί μια εναλλακτική διαδικασία για την αλλαγή του ανιόντος στο ενδιάμεσο στρώμα του LDH.

Η απλούστερη και συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αλλαγή του ενδιάμεσου ανιόντος είναι η ιονανταλλαγή. Η ιδιότητα αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε ανιόν έχει διαφορετική συγγένεια για το LDH. Η σειρά σταθερότητας για ορισμένα μονοσθενή και δισθενή ανιόντα έχει ως εξής.<sup>6,12</sup>



με τα δισθενή ιόντα να δεσμεύονται πολύ ισχυρότερα από τα μονοσθενή. Έτσι αν σε ένα διάλυμα με LDH-NO<sub>3</sub> προστεθεί NaCl θα παραχθεί LDH-Cl μέσω ιονανταλλαγής. Επιπλέον, αν το διάλυμα έρθει σε ισορροπία με τον ατμοσφαιρικό αέρα θα σχηματιστεί LDH-CO<sub>3</sub> λόγω του διαλυμένου CO<sub>2</sub> στο νερό. Με την ιονανταλλαγή μπορούν πολύ εύκολα να δεσμευτούν και να αποδεσμευτούν ανιόντα από τα στοιβαγμένα διπλά υδροξειδία σε ήπιες συνθήκες αντίδρασης και επομένως αποτελεί τη σημαντικότερη ιδιότητα των υλικών αυτών.

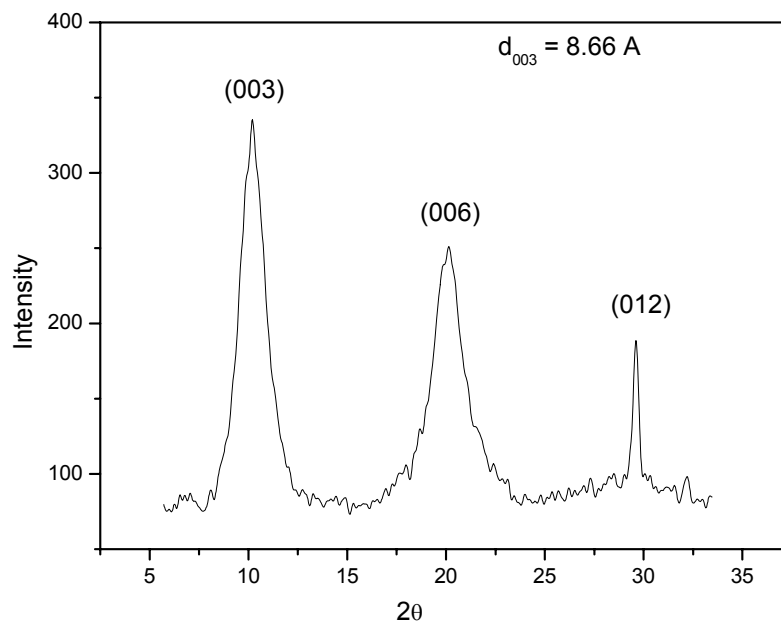
Μία άλλη χρήσιμη ιδιότητα των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων είναι η υδρόλυσή τους σε όξινο περιβάλλον. Όταν το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται το LDH πάρει τιμές χαμηλότερες του 3 αρχίζουν να αποσυντίθενται τα θετικά φορτισμένα στρώματα των μεταλλικών υδροξειδίων με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τα ενδιάμεσα ανιόντα. Πρόκειται δηλαδή για μια διαδικασία αντίστροφη από τη σύνθεση των LDH όπου υδροξυλικά ανιόντα συναρμόζονται με τα μέταλλα σχηματίζοντας διδιάστατα στρώματα.

### 1.2.4 Χαρακτηρισμός

Παρά το γεγονός ότι τα LDH παρουσιάζουν χαμηλή κρυσταλλικότητα, η ανάλυσή τους με περίθλαση ακτίνων X σε σκόνη (Powder X Ray Diffraction) δίνει σημαντικές πληροφορίες για τη δομή τους και αποτελεί τη βασική μέθοδο χαρακτηρισμού τους. Στο διάγραμμα (σχήμα 2) παρουσιάζονται οξείες κορυφές σε χαμηλές τιμές της γωνίας περίθλασης  $2\theta$  στις οποίες έχουν αποδοθεί οι δείκτες (003), (006) και (009).<sup>5,9</sup> Από τη θέση των κορυφών αυτών προκύπτει η απόσταση  $d$  μεταξύ δύο διαδοχικών στρωμάτων μεταλλικών υδροξειδίων σύμφωνα με το νόμο του Bragg:

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

όπου  $n$  είναι η τάξη της κορυφής ( $n=1$  για την (003), 2 για την (006) και 3 για την (009)),  $\lambda$  είναι το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας σε Å,  $d$  είναι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών στρωμάτων μεταλλικών υδροξειδίων σε Å και  $\theta$  είναι η γωνία περίθλασης όπου εμφανίζεται η κορυφή.



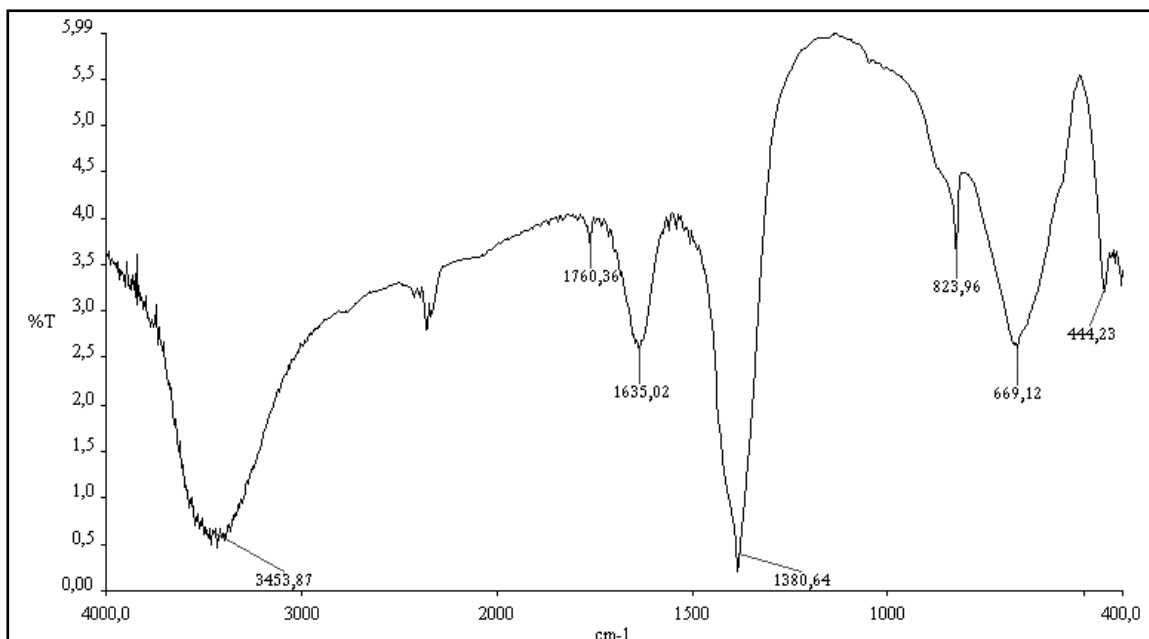
**Σχήμα 2.** Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του Mg<sub>2</sub>Al-LDH-NO<sub>3</sub>.

Η απόσταση  $d$  εξαρτάται από το ανιόν που περιέχεται στα στρώματα του LDH. Έτσι η περίθλαση ακτίνων X χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της ολοκλήρωσης μιας αντίδρασης ιονανταλλαγής καθώς η απόσταση είναι

διαφορετική πριν και μετά την αντίδραση. Επιπλέον πληροφορίες δίνει και το σχήμα των κορυφών. Αν το προϊόν είναι καλά οργανωμένο οι κορυφές είναι οξείες και έχουν μεγάλη ένταση, ενώ στην αντίθετη περίπτωση οι κορυφές είναι ευρείες και έχουν χαμηλότερη ένταση.

Συμπληρωματικές πληροφορίες για το ενδιάμεσο ανιόν δίνει η φασματοσκοπία υπερύθρου. Χαρακτηριστικό των φασμάτων IR των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων είναι η ευρεία ταινία απορρόφησης γύρω στα  $3500\text{cm}^{-1}$  που οφείλεται στη δόνηση τάσης των υδροξυλίων των μεταλλικών στρωμάτων καθώς και του νερού του ενδιάμεσου στρώματος το οποίο παρουσιάζει επίσης στους  $1640\text{cm}^{-1}$  τη δόνηση κάμψης  $\nu_{\text{H-O-H}}$ .<sup>5,9,13</sup> Οι δονήσεις στους  $670\text{cm}^{-1}$  και  $445\text{cm}^{-1}$  οφείλονται στους δεσμούς των μετάλλων με τα υδροξύλια.<sup>14</sup> Στην περιοχή από  $1000\text{cm}^{-1}$  έως  $2000\text{cm}^{-1}$  παρουσιάζονται κορυφές που οφείλονται μόνο στα ανιόντα δίνοντας πληροφορίες για την ταυτότητα τους καθώς και για τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν με το θετικά φορτισμένο μεταλλικό στρώμα. Έτσι στο φάσμα υπερύθρου του LDH-NO<sub>3</sub> (σχήμα 3) φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του νιτρικού ιόντος στους  $1380\text{cm}^{-1}$ ,  $1760\text{cm}^{-1}$  και  $825\text{cm}^{-1}$ , μαζί με τις υπόλοιπες χαρακτηριστικές κορυφές του πηλού που προαναφέρθηκαν.





**Σχήμα 3.** Φάσμα υπερύθρου του  $Mg_2Al-LDH-NO_3$ .

Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό των LDH είναι η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, και η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM). Η πρώτη δίνει πληροφορίες για τη θερμική συμπεριφορά του υλικού, όπως το εύρος θερμοκρασιών κατά τις οποίες εξατμίζεται το νερό των ενδιάμεσων στρωμάτων ή τη θερμοκρασία κατά την οποία αποσυντίθεται ο πηλός δίνοντας μικτά μεταλλικά οξειδία. Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία λαμβάνονται πληροφορίες για τη μορφολογία του υλικού όπως για παράδειγμα το μέγεθος των κρυστάλλων.

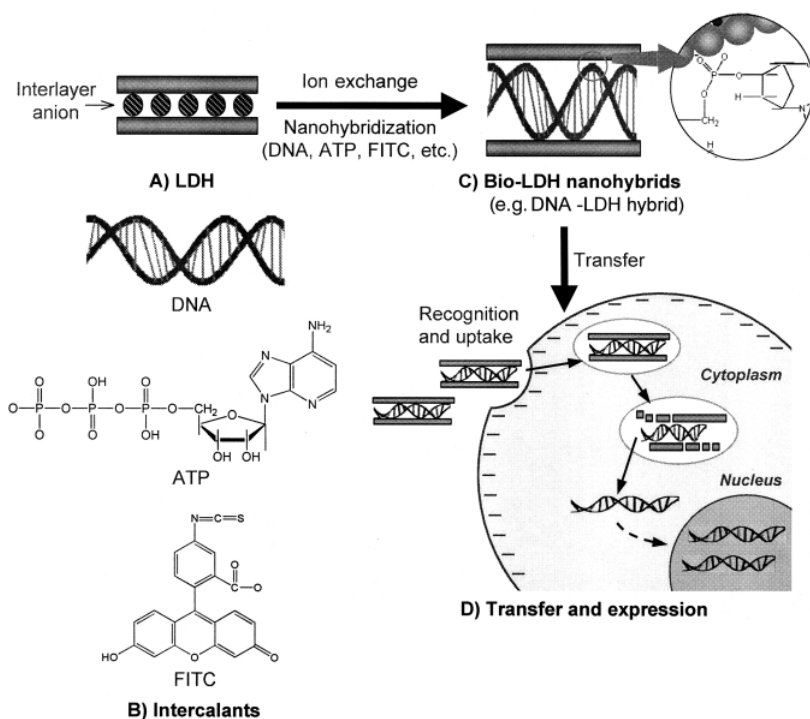
### 1.2.5 Εφαρμογές

Τα LDH, όπως προαναφέρθηκε μετά την διαδικασία της φρύξης εμφανίζουν μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας με αλκαλικές ιδιότητες με αποτέλεσμα να βρίσκουν εφαρμογή ως ετερογενείς καταλύτες σε πληθώρα χημικών μετατροπών. Συγκεκριμένα έχουν χρησιμοποιηθεί σε αλδολικές συμπυκνώσεις, υδρογονώσεις, οξειδώσεις και αντιδράσεις πολυμερισμού.<sup>9</sup> Καταλυτική δραστηριότητα παρουσιάζουν και τα LDH πριν τη φρύξη. Έτσι το  $LDH-CO_3$  καθώς και τα παράγωγά του με  $OH^-$ ,  $Cl^-$  και  $SO_4^{2-}$  μπορούν να δράσουν ως αλκαλικοί καταλύτες στη μετατροπή της 2-μέθυλο-3-βουτιν-2-

όλης σε ακετόνη και ακετυλένιο.<sup>15,16</sup> Επίσης αντιδράσεις ανταλλαγής αλογόνου καταλύονται από το LDH-CI.<sup>15</sup>

Εκτός αυτού τα LDH χρησιμοποιούνται επίσης και ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση καταλυτών με σκοπό τη μετατροπή τους από ομογενείς σε ετερογενείς καθώς και για την αύξηση της δραστηρότητάς τους. Έτσι με την μέθοδο της ανιόνταλλαγής έχουν ακινητοποιηθεί  $\text{MoO}_4^{2-}$  και πολυοξομεταλλικά ανιόντα ( $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$ ,  $\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}^{6-}$ ,  $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ )<sup>15,17,18,19</sup>, διάφορες βαφές όπως το μπλε του Εβανς<sup>20</sup>, αμινοξέα και πεπτίδια<sup>21</sup>, φάρμακα<sup>22</sup> και παράγωγα φαρμάκων<sup>23,24</sup> καθώς επίσης πορφυρίνες<sup>25,26</sup> και φθαλοκυανίνες.<sup>15,27,28,29</sup>

Τα νουκλεϊκά οξέα και το DNA διαθέτουν αρνητικό φορτίο και έτσι έχουν εισαχθεί σε LDH με ιονανταλλαγή.<sup>30</sup> Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός πως τα υβρίδια LDH-DNA μπορούν να εισαχθούν σε ευκαρυωτικά κύτταρα και να απελευθερώσουν το DNA δρώντας έτσι ως γονιδιακοί φορείς.<sup>31</sup>



**Σχήμα 4.** Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας υβριδοποίησης και του αναμενόμενου μηχανισμού εισαγωγής του LDH στο κύτταρο.

Η απελευθέρωση γίνεται είτε στα λυσοσώματα όπου το όξινο περιβάλλον διασπά τη δομή του πηλού, είτε λόγω ιονανταλλαγής από ανιόντα

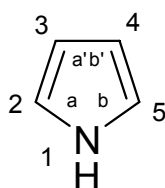
του κυτταροπλάσματος. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ένα υβρίδιο LDH με το κατάλληλο ολιγονουκλεοτίδιο μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, ενώ το σκέτο LDH δεν προκαλεί αναστολή.<sup>32</sup> Επίσης το ολιγονουκλεοτίδιο μόνο του δεν έχει επαρκή δράση καθώς δεν εισέρχεται μέσα στα κύτταρα. Η αυξημένη δράση του υβριδίου του LDH με το ολιγονουκλεοτίδιο οφείλεται στην εξουδετέρωση του θετικού φορτίου των στρωμάτων του LDH με το αρνητικό φορτίο των ολιγονουκλεοτιδίων γεγονός που διευκολύνει την διείσδυση του υβριδίου στο κύτταρο μέσω ενδοκύττωσης.<sup>31</sup> Αυτό συμβαίνει καθώς μειώνονται οι ηλεκτροστατικές απωστικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες του κυττάρου και τα αρνητικά φορτισμένα ολιγονουκλεοτίδια. Το γεγονός ότι τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια μπορούν να απελευθερώσουν το ανιόν που φέρουν στο εσωτερικό τους μέσα σε κύτταρα τα καθιστά ελκυστικά υλικά για εφαρμογές μεταφοράς και ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων. Μελέτες τέτοιων εφαρμογών έχουν γίνει για το αντιφλεγμονώδες φάρμακο ibuprofen<sup>33</sup> καθώς και για τη φυτική αυξητική ορμόνη α-naphthaleneacetate.<sup>34</sup>

Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τις πορφυρίνες είναι αρκετά μεγάλο καθώς πολλές από αυτές συμμετέχουν σε αρκετές βιολογικές διεργασίες. Το γεγονός που έστρεψε το ερευνητικό μας ενδιαφέρον προς αυτές είναι ότι μπορούν να δράσουν ως φωτοευαίσθητοποιητές και έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν στην καταπολέμηση του καρκίνου μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας(πρωτοπορφυρίνη IX), ενώ παράλληλα πολλές μεταλλοπορφυρίνες αποτελούν προσθετικές ομάδες πρωτεϊνών με εξέχουσα βιολογική σημασία (αιμίνη).

## 1.3 ΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ – ΜΕΤΑΛΛΟΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ

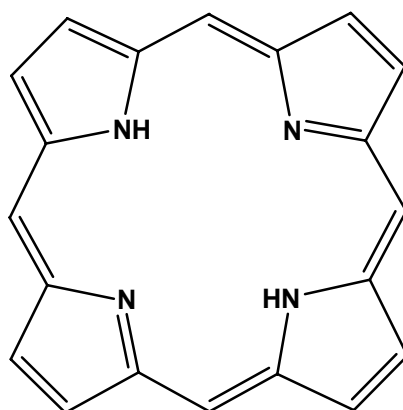
### 1.3.1 Πορφυρίνες

Οι πορφυρίνες είναι τετραπυρρολικά κυκλικά συζυγιακά συστήματα όπου η βασική μονάδα είναι το πυρρόλιο (σχήμα 5). Τα τέσσερα πυρρόλια είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με γέφυρες άνθρακα. Με ελληνικά γράμματα σημειώνονται οι δύο διαφορετικοί τύποι άνθρακα.

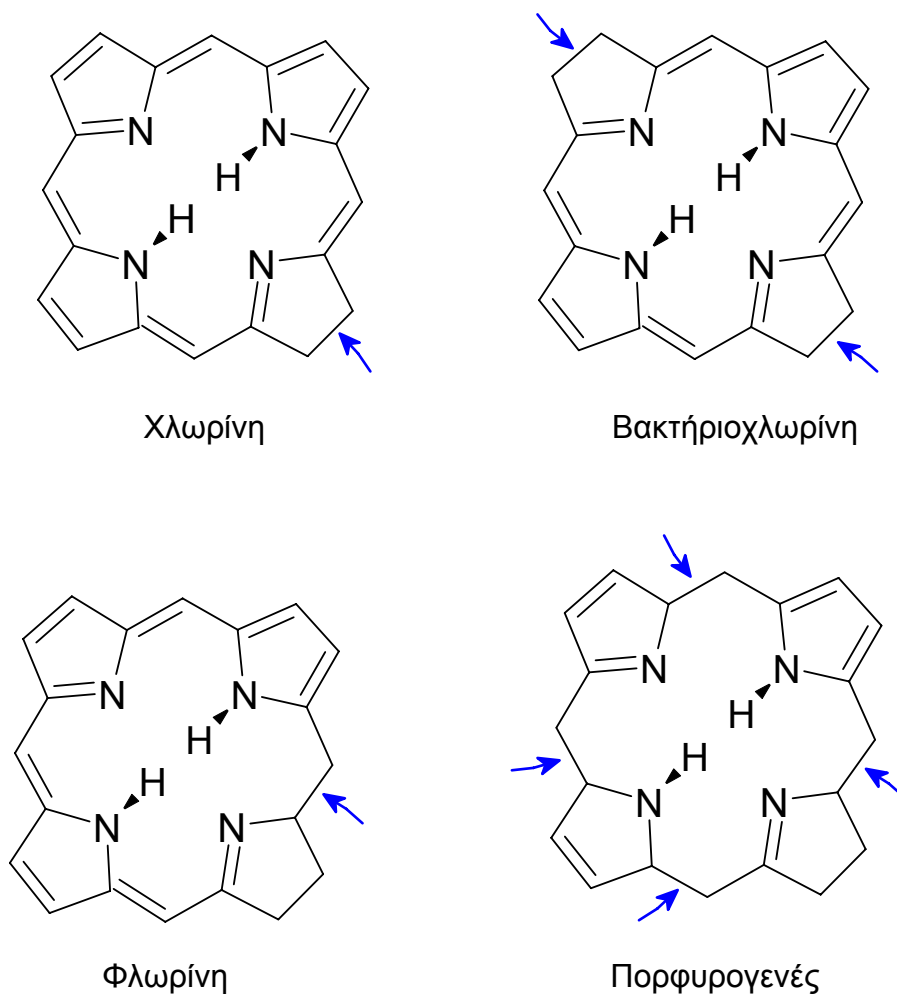


Σχήμα 5. Δομή του πυρρολίου

Η δομή του βασικού μακροκυκλικού δακτυλίου ονομάζεται πορφίνη<sup>35</sup> (σχήμα 6), σύμφωνα με την κατά Fischer ονοματολογία που αναπτύχθηκε στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Άλλες παρόμοιες μακροκυκλικές ενώσεις δίνονται στα παρακάτω σχήματα και αποτελούν ανηγμένες μορφές της πορφίνης είτε μόνο στον ένα πυρρολικό δακτύλιο, οπότε προκύπτει η χλωρίνη, είτε σε δύο απέναντι δακτυλίους οπότε προκύπτει η βακτηριοχλωρίνη. Εκτός αυτών με αναγωγή μίας γέφυρας άνθρακα προκύπτει η φλωρίνη, ενώ με αναγωγή και των τεσσάρων προκύπτει το πορφυρογενές.(σχήμα 7)

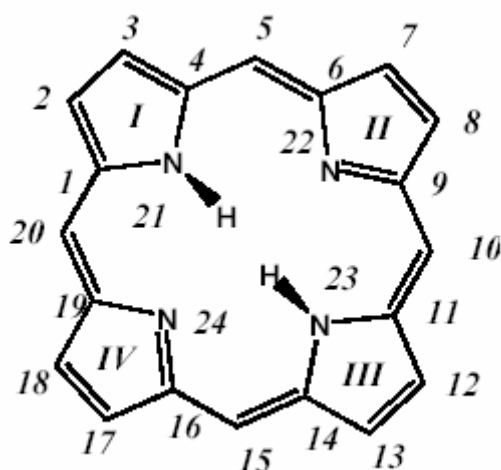


Σχήμα 6. Δομή Πορφίνης



**Σχήμα 7.** Δομές διαφόρων ανηγμένων δομών της πορφύρινης

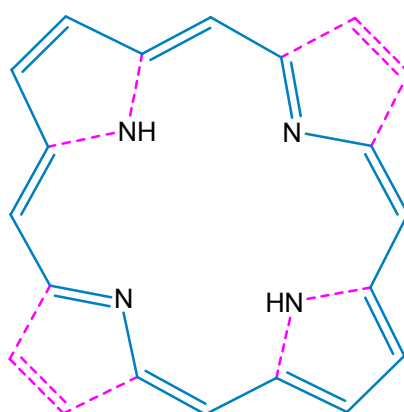
Το 1943 ο Corwin<sup>36</sup> υιοθέτησε για το σύστημα της πορφίνης την ονομασία πορφυρίνη, η οποία έχει πρωτοδιατυπωθεί ανάμεσα στα 1877 και 1878<sup>37</sup> και η οποία επικρατεί μέχρι σήμερα. Οι διάφορες πορφυρίνες θεωρούνται παράγωγα της πορφίνης, με αντικατάσταση των πυρρολικών υδρογόνων 1,2,...,8 ή των υδρογόνων των ανθράκων που σχηματίζουν τις γέφυρες δηλαδή τα α, β, γ, δ αντίστοιχα. Οι πρώτες είναι γνωστές και σαν α-υποκατεστημένες πορφυρίνες, ενώ οι τελευταίες ως β- ή meso-υποκατεστημένες πορφυρίνες. Στο παρακάτω σχήμα δίνεται η αρίθμηση των ατόμων του μορίου της πορφυρίνης, καθώς και η διάκριση των πυρρολικών δακτυλίων κατά τον Corwin<sup>36</sup>.



**Σχήμα 8.** Η αρίθμηση του Corwin για τον σκελετό της πορφυρίνης.

Το μόριο της πορφυρίνης θεωρείται επίπεδο, όμως δύο από τους πυρρολικούς δακτυλίους είναι ελαφρώς στραμμένοι προς τα κάτω, ώστε τα τέσσερα άτομα αζώτου να βρίσκονται ελαφρώς εκτός επιπέδου. Η απόσταση των πυρρολικών αζώτων από το κέντρο του δακτυλίου είναι 2.04 Å.

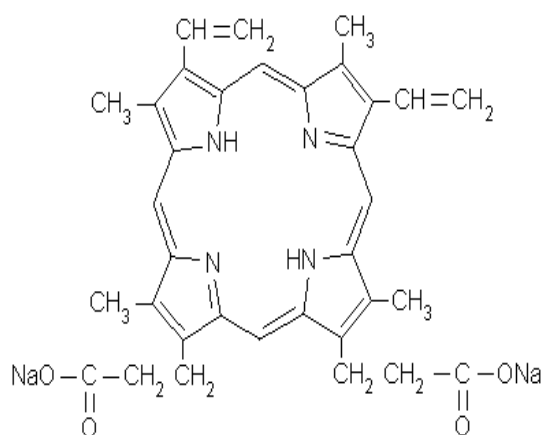
Οι πορφυρίνες μπορούν να προσλάβουν δύο πρωτόνια, σχηματίζοντας διπρωτικά οξέα με συνολικό φορτίο +2, ή να αποβάλλουν δύο πρωτόνια, αποκτώντας συνολικό φορτίο -2. Μάλιστα, το πορφυρινικό διανιόν εμφανίζει πλήρη συζυγία στην περιφέρεια (σχήμα 9), υπακούοντας στον κανόνα των  $4n+2$  ηλεκτρονίων. Αυτή η ιδιότητα προσδίδει στα μόρια και στα παράγωγά τους τον ιδιαίτερα έντονο χρωματισμό.



**Σχήμα 9.** Ο πορφυρινικός δακτύλιος υπακούει στον κανόνα των  $4n + 2$  ηλεκτρονίων του Huckel, όπου οι δεσμοί του συζυγιακού πολυενίου φαίνονται με τη συνεχή μπλε χρώματος γραμμή.

Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η περιφερειακή υποκατάσταση που φέρουν τα πορφυρινικά παράγωγα τους προσδίδει την ικανότητα πρόσληψης-απόδοσης ηλεκτρονιακού φορτίου. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να ρυθμιστεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα των μη εντοπισμένων μοριακών τροχιακών του συμπλόκου και να τροποποιηθούν οι ιδιότητές του.

Η πιο διαδεδομένη από τις πορφυρίνες είναι η πρωτοπορφυρίνη IX, η οποία είναι η πορφυρίνη εκείνη που αποτελείται από ένα τετραπυρρολικό κυκλικό σύστημα όπου το κάθε πυρρόλιο συνδέεται με το γειτονικό του με μία μεθυνική γέφυρα. Το μόριο της πρωτοπορφυρίνης IX έχει ως πλευρικούς υποκαταστάτες τέσσερις μεθυλικές, δύο προπιονικές και δύο βινυλικές ομάδες. Οι ομάδες αυτές μπορούν να τοποθετηθούν με δεκαπέντε διαφορετικούς τρόπους. Ο ένας από αυτούς αποτελεί και την δομή της πρωτοπορφυρίνης IX που είναι το μόνο από τα ισομερή αυτά που υπάρχει στα βιολογικά συστήματα.

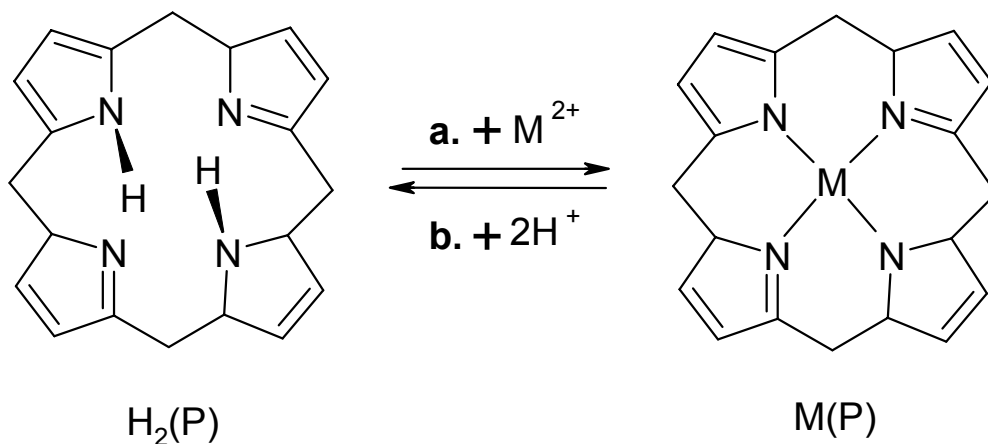


**Σχήμα 10.** Δομή της πρωτοπορφυρίνης IX.

Η πρωτοπορφυρίνη IX αποτελεί ένα μόριο με εξέχουσα σημασία στα βιολογικά συστήματα καθώς συμμετέχει σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Πολύ σημαντικός είναι και ο ρόλος που διαδραματίζει στην φωτοδυναμική θεραπεία καθώς διάφορα παράγωγά της έχουν χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητές κατά την διεξαγωγή αυτής.

### 1.3.2 Μεταλλοπορφυρίνες

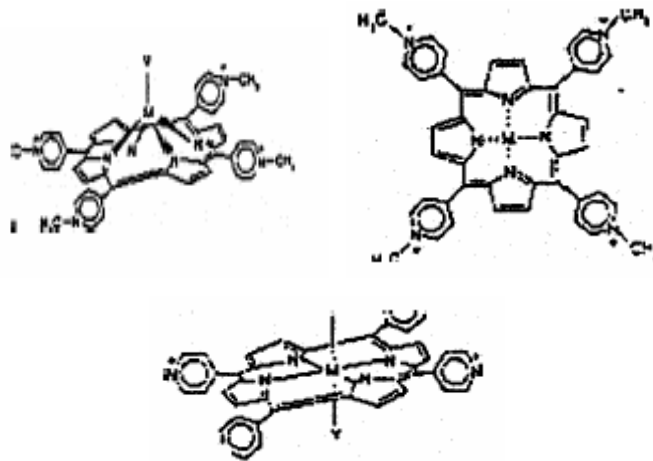
Κάθε παράγωγο πορφυρίνης, στο οποίο δύο από τα κεντρικά άτομα αζώτου σχηματίζουν ένα δεσμό με ένα άτομο μετάλλου, ονομάζεται μεταλλοπορφυρίνη. Η απλούστερη περίπτωση είναι η μονομεταλλική πορφυρίνη  $M(P)$ , η σύνθεση της οποίας φαίνεται στο σχήμα 11 που ακολουθεί. Στις περισσότερες περιπτώσεις, σύνθεση τέτοιων μεταλλοπορφυρινών αφορά την αντίδραση μίας πορφυρίνης  $H_2(P)$  με ένα αλάτι μετάλλου  $MX_2$ , παράγοντας το προϊόν  $M(P)$  και μόρια  $HX(\alpha)$ . Η διαδικασία α ονομάζεται μετάλλωση, ενώ η αντίστροφη της β απομετάλλωση.



**Σχήμα 11.** Μετάλλωση και απομετάλλωση πορφυρινών.

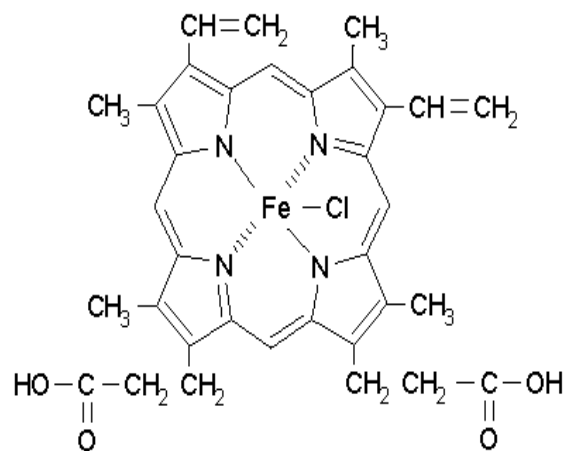
Οι μεταλλοπορφυρίνες είναι βιολογικοί υποκαταστάτες για μία μεγάλη ποικιλία μεταλλικών ιόντων. Τα κεντρικά άτομα υδρογόνου πολύ εύκολα αντικαθίστανται μέσω της εισόδου ενός μετάλλου κατάλληλου μεγέθους, προκειμένου να υιοθετηθεί μία επίπεδη γεωμετρία. Αναλόγως του μεταλλικού κέντρου, αυτό μπορεί να συναρμοστεί με έναν, δύο ή κανέναν αξονικό υποκαταστάτη. Στην πρώτη περίπτωση, το μέταλλο βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου, ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις βρίσκεται στο επίπεδο του δακτυλίου.





**Σχήμα 12.** Δομές διαφόρων μεταλλοπορφυρινών με τους αξονικούς τους υποκαταστάτες.

Η αιμίνη, η μεταλλοπορφυρίνη δηλαδή που αποτελεί το μη πρωτεϊνικό μέρος της αιμοσφαιρίνης είναι η πρώτη μεταλλοπορφυρίνη που συντέθηκε εργαστηριακά, έχει την ίδια ακριβώς δομή με την πρωτοπορφυρίνη IX και έχει επιπλέον ένα άτομο σιδήρου το οποίο δεσμεύεται με τα τέσσερα άζωτα στο κέντρο του πορφυρινικού σκελετού. Ο σίδηρος στην αιμίνη βρίσκεται σε οξειδωτική βαθμίδα +3. Ο σίδηρος στο κέντρο της αιμίνης έχει την ικανότητα να σχηματίσει δύο επιπλέον δεσμούς ένα από την κάθε πλευρά του επιπέδου. Η οξειδωτική κατάσταση +3 καλείται και σίδηρι-μορφή σε αντίθεση με την +2 που καλείται και σίδηρο-μορφή.

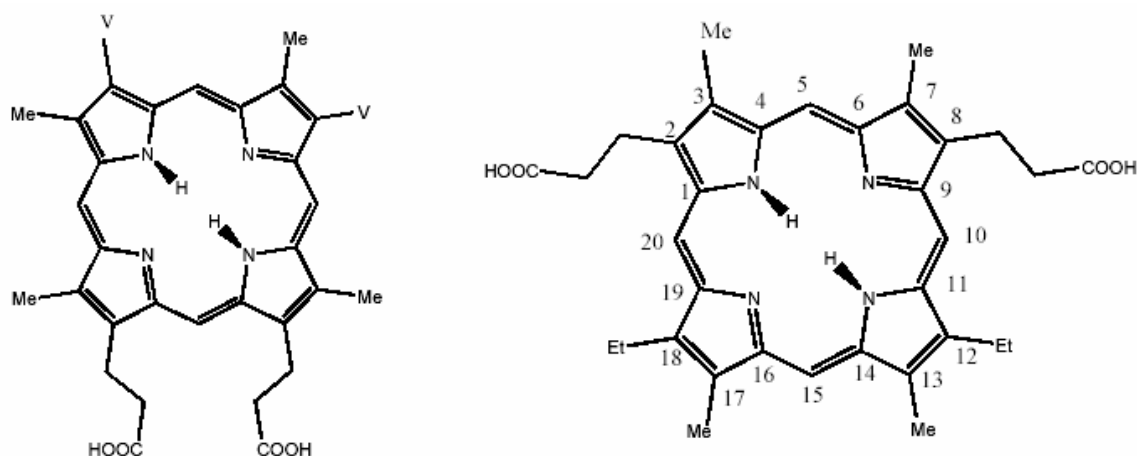


**Σχήμα 13.** Δομή της αιμίνης.

Οι σίδηροπορφυρίνες συμμετέχουν στην λειτουργία αρκετών κατηγοριών βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες μεταφοράς οξυγόνου, τα κυτοχρώματα καθώς και σε αρκετά ένζυμα, η δομή και η λειτουργία των οποίων θα αναλυθεί στο τμήμα εργασίας που αναφέρεται στην αιμίνη.

### 1.3.3 Ονοματολογία πορφυρίνων

Η ονοματολογία που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τις πορφυρίνες και τα παράγωγά τους ήταν αυτή του Fischer, η οποία βασίζονταν σε ένα μεγάλο αριθμό εμπειρικών ονομάτων, με αποτέλεσμα οι πολυπλοκότεροι τύποι της ονοματολογίας να εγκαταλειφθούν και να δημιουργηθεί η ανάγκη για την ανάπτυξη ενός πιο εύχρηστου συστήματος ονοματολογίας. Για παράδειγμα, η πρωτοπορφυρίνη IX ονομάζεται πρωτοπορφυρίνη, ενώ η μεσοπορφυρίνη V ονομάζεται 12,18-διαιθυλ-3,7,13,17-τετράκις-μεθυλ-πορφυρίνη-2,8διπρωπιονικό οξύ.<sup>38</sup>



**Σχήμα 14.** Οι δομές της πρωτοπορφυρίνης και της μεσοπορφυρίνης V.

Οι κανόνες που ισχύουν για την ονομασία των οργανικών και φυσικών προϊόντων, ισχύουν και στην περίπτωση των τετραπυρρολικών συστημάτων.<sup>39</sup> Η αρίθμηση που ακολουθείται φαίνεται στο σχήμα 8. Οι θέσεις 2,3,7,8,12,13,17,18 αναφέρονται ως «βήτα-θέσεις», οι θέσεις 1,4,6,9,11,14,16 και 19 αναφέρονται ως «άλφα», ενώ οι 5,10,15,20 είναι γνωστές ως «μέσο-θέσεις». Οι υποκατεστημένες πορφυρίνες αριθμούνται σύμφωνα με τους κανόνες της IUPAC που ισχύουν για τα οργανικά μόρια,

με την αρίθμηση να γίνεται έτσι ώστε να έχουμε τους μικρότερους αριθμητικούς δείκτες.

Η ονοματολογία των μεταλλοπορφυρινών γίνεται σύμφωνα με τους παρακάτω κανόνες της IUPAC:

I. Τα ονόματα των υποκαταστατών προηγούνται του ονόματος του μετάλλου.

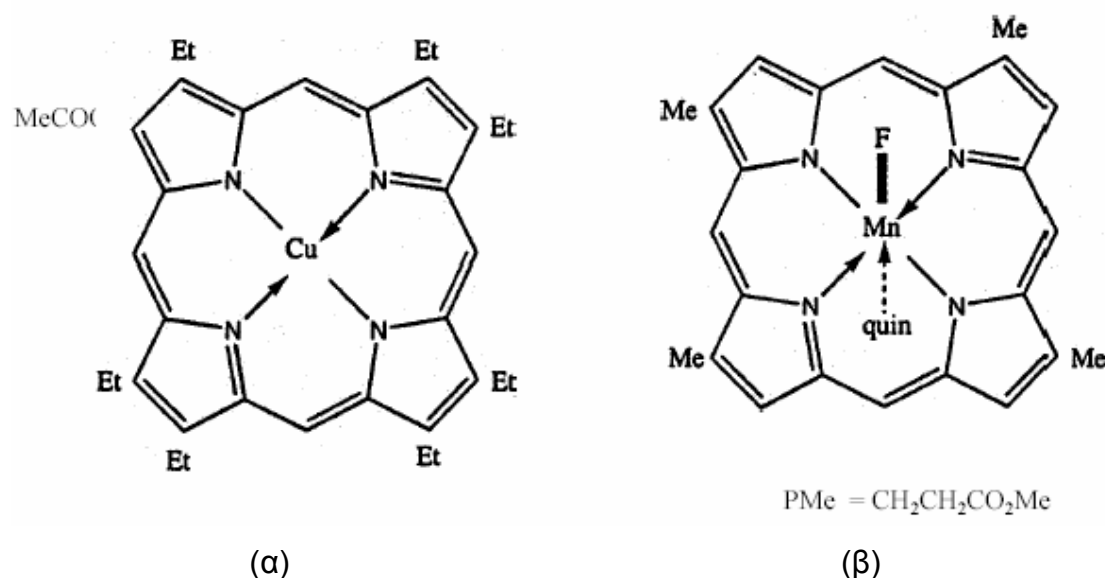
II. Οι υποκαταστάτες ονομάζονται με αλφαβητική σειρά, σύμφωνα με τους κανόνες που ισχύουν για τις ενώσεις συναρμογής.

III. Σύμβολα όπως  $\{[()]\}$ , χρησιμοποιούνται για την ακολουθία.

IV. Όταν το μακροκυκλικό μόριο είναι παρών ως ανιονικός υποκαταστάτης, όπως συνήθως συμβαίνει, τότε παίρνει την κατάληξη -άτο. Έτσι η χλωρίνη γίνεται χλωρινάτο, ενώ η πορφυρίνη πορφυρινάτο.

V. Όταν είναι γνωστή η διάταξη των αξονικών υποκαταστατών, υποδηλώνεται χρησιμοποιώντας  $\alpha$  και  $\beta$  πριν από το όνομα κάθε αξονικού υποκαταστάτη. Το  $\alpha$  δείχνει ότι ο υποκαταστάτης βρίσκεται κάτω από το επίπεδο, ενώ το  $\beta$  ότι βρίσκεται πάνω από αυτό.

Στο σχήμα 15 δίνονται παραδείγματα για την ονοματολογία των μεταλλοπορφυρινών, εφαρμόζοντας τους παραπάνω κανόνες της IUPAC.



**Σχήμα 15.** (α)(2-Ακετόξυ-3,7,8,12,13,17,18-επταεθυλοπορφυρινάτο) χαλκός(III) και (β) (δευτεροπορφυρινάτο δ«μεθυλοεστέρας)-β-φλουόρο-α-(κινολίνη)κοβάλτιο(III).

### 1.3.4 Ηλεκτρονική Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού

Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού είναι φάσματα απορροφήσεως ή εκπομπής, τα οποία λαμβάνονται κατά τη διέγερση ή την αποδιέγερση ενός ατόμου ή μορίου, από την θεμελιώδη ηλεκτρονική κατάσταση σε μία από τις διεγερμένες καταστάσεις και αντίστροφα. Στα φάσματα αυτά, η μεταβολή της μοριακής απορροφητικότητας  $\epsilon$  ή της απορρόφησης  $A$  εξαρτάται από το μήκος κύματος  $\lambda$  του φωτός.<sup>40</sup> Με άλλα λόγια, ισχύει ο νόμος Lambert-Beer, ο οποίος περιγράφεται από τη έκφραση:

$$A = \log I/I_0 = \epsilon cd$$

όπου,  $A$ : η απορρόφηση,

$I_0, I$ : η ένταση της προσπίπτουσας και της διερχόμενης ακτινοβολίας, αντίστοιχα,

$\epsilon$ : η μοριακή απορροφητικότητα ( $\text{lt.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )

$c$ : η συγκέντρωση του διαλύματος ( $\text{mol/lt}$ )

$d$ : η οπτική διαδρομή ( $\text{cm}$ )

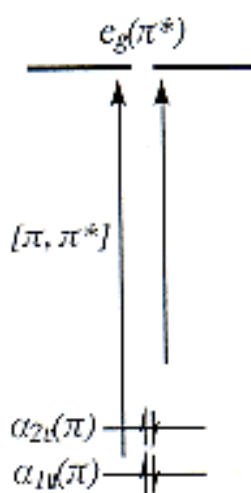
Η ηλεκτρονική φασματοσκοπία χρησιμοποιείται εκτενώς στη μελέτη συζυγιακών συστημάτων. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που απαιτείται για τη μετάβαση  $\pi \rightarrow \pi^*$  εξαρτάται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ των HOMO και LUMO τροχιακών. Συγκεκριμένα, καθώς αυξάνει η συζυγία του συστήματος, η ενεργειακή διαφοροποίηση των HOMO και LUMO τροχιακών ελαττώνεται, με αποτέλεσμα η διέγερση να απαιτεί ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος.

Οι πορφυρίνες, λόγω του δεκαεξαμελούς δακτυλίου τους, ο οποίος περιέχει 18π ηλεκτρόνια, αποτελούν συζυγιακά συστήματα. Στη συζυγία των συγκεκριμένων ηλεκτρονίων οφείλονται τα φάσματα υπεριώδους-ορατού, τα οποία χαρακτηρίζονται από δύο βασικές ομάδες ταινιών απορρόφησης:

a) Τις  $Q$  ταινίες, οι οποίες αποτελούνται από τέσσερις απορροφήσεις [ $Q_y(1,0)$ ,  $Q_y(0,0)$ ,  $Q_x(1,0)$  και  $Q_x(0,0)$ ], στη περιοχή του ορατού φάσματος και συγκεκριμένα από τα 450nm έως τα 700nm και αντιστοιχούν σε ημιεπιτρεπτές διεγερμένες καταστάσεις.

b) Τις  $B$ -ταινίες ή ταινίες Soret, οι οποίες είναι, ισχυρής έντασης, απορροφήσεις σε μήκος κύματος από 320nm έως 450nm και αντιστοιχούν σε ισχυρώς επιτρεπτές μεταβάσεις.

Η πρώτη ερμηνεία των ηλεκτρονικών φασμάτων των πορφυρινών αποπειράθηκε από τους Platt και Simson.<sup>41,42</sup> Ωστόσο, μια πιο ολοκληρωμένη εξήγησή τους προκύπτει από τη μελέτη του Gouterman<sup>43,44</sup>, η οποία οδήγησε στο αποκαλούμενο μοντέλο των τεσσάρων τροχιακών (four orbital model) (σχήμα 16). Σύμφωνα με αυτό, η *B*-ταινία είναι αποτέλεσμα της ανυσματικής πρόσθεσης των μεταβατικών ροπών της  $\pi \rightarrow \pi^*$  μετάβασης, ενώ αντίθετα οι *Q*-ταινίες είναι το αποτέλεσμα της αφαίρεσης των δύο διπολικών ροπών, γεγονός που συνεπάγεται μικρότερη ένταση απορρόφησης σε σχέση με τη *B*-ταινία.<sup>45</sup>



**Σχήμα 16.** Διάγραμμα μοριακών τροχιακών για το μοντέλο των τεσσάρων τροχιακών.

#### 1.4 Ακίνητοποίηση πορφυρινών σε LDH

Η εισαγωγή ενός μακροκυκλικού μορίου (πορφυρίνες) μεταξύ των στρωμάτων του LDH μας παρέχει ένα νέο τρόπο σταθεροποίησης καθώς το υλικό που λαμβάνουμε δεν έχει φορτίο. Με πειράματα, τα οποία έχουν γίνει μέχρι σήμερα έχει αποδειχθεί ότι η εισαγωγή πορφυρινικών συστημάτων εντός των στρωμάτων του LDH μπορεί να επιτευχθεί με τρεις γενικές διαφορετικές μεθοδολογίες.

- Με ιονανταλλαγή του ανιόντος του προπαρασκευασμένου LDH με το ανιόν που επιθυμούμε να ακινητοποιήσουμε.

- Με τη διαδικασία φρύξης-εφυδάτωσης του LDH.
- Με απ'ευθείας σύνθεση αυτού.

Η σταθεροποίηση της 5,10,15,20 τέτρα(4-σουλφονάτοφαίνυλο) πορφυρίνης εντός του δίκτυο LDH μαγνησίου, αργιλίου που είχε χλώριο ως αρχικό αντισταθμιστικό ιόν είχε ως αποτέλεσμα την σύνθεση ενός υβριδίου, τα στρώματα του οποίου απείχαν κατά 22,4 Å. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η πορφυρίνη πρέπει να τοποθετείται λαμβάνοντας μία κάθετη διευθέτηση μεταξύ των στρωμάτων του LDH.

Η τέτρα(ρ-σουλφονάτοφαίνυλο)πορφυρινάτο μαγγάνιο(III) έχει σταθεροποιηθεί μεταξύ των στρωμάτων LDH μαγνησίου, αργιλίου που είχε χλώριο ως αρχικό αντισταθμιστικό ιόν. Η πορφυρίνη αυτή εισάγεται λαμβάνοντας την ίδια γεωμετρία με την προηγούμενη και το υβρίδιο που συντίθεται μελετάται ως καταλύτης κατά την οξειδωση 2,4,6 τρίχλωροφαινόλης.

Η 5,10,15,20 τέτρα(2,6-δίφθορο-3-σουλφονάτοφαίνυλο)πορφυρινάτο σίδηρος (III) ακινητοποιήθηκε μεταξύ των στρωμάτων LDH μαγνησίου, αργιλίου με μία διαδικασία διάταξης και αποδιάταξης. Πιο συγκεκριμένα μετά την σύνθεση LDH που περιείχε ιόντα γλυκίνης ως αντισταθμιστικά, διασπάστηκε η δομή των στρωμάτων αυτού με διάλυση σε φορμαμίδιο. Με διάλυση της πορφυρίνης στον ίδιο διαλύτη και εξάτμιση αυτού επιτυγχάνεται η εισαγωγή αυτής μεταξύ των στρωμάτων του LDH.

Η τέτρα(4-καρβόξυφαινυλο)πορφυρινάτο ψευδάργυρος(II) έχει εισαχθεί στο εσωτερικό των στρωμάτων LDH λιθίου, αργιλίου, τα οποία είχαν μυριστικό οξύ ως αντισταθμιστικό ιόν. Στο υβρίδιο που συντέθηκε η πορφυρίνη σταθεροποιήθηκε σε μονομερή μορφή όπως προκύπτει και από το φάσμα απορρόφησης και χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες φωτοχημικές εφαρμογές.

Η αιμίνη, η οποία αποτελεί και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας έχει εισαχθεί στο εσωτερικό των στρωμάτων ενός ανόργανου υλικού που έχει παρόμοια δομή με το LDH και αποτελείται από μαγνήσιο και πυρίτιο. Το υβρίδιο αυτό που συντέθηκε μπορεί να αποτελέσει ένα μοντέλο αιμοπρωτεΐνης καθώς οι φασματοσκοπικές του ιδιότητες ομοιάζουν πολύ με αυτές της οξυαιμοσφαιρίνης και της καρβόξυαιμοσφαιρίνης.<sup>46</sup>

## Α΄ ΜΕΡΟΣ : ΠΡΩΤΟΠΟΡΦΥΡΙΝΗ ΙΧ

### 2.1.1 Γενικά

Οι πορφυρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φωτοευαισθητοποιητές, καθώς λόγω της εκτεταμένης συζυγίας που διαθέτουν μπορούν να διεγερθούν πολύ εύκολα σε μία διεγερμένη κατάσταση χαμηλής ενέργειας και στην συνέχεια να προκαλέσουν την διέγερση του οξυγόνου. Κύριο εκφραστή αυτής της τάσης των πορφυρινών αποτελεί η πρωτοπορφυρίνη ΙΧ, η οποία μπορεί να εισαχθεί με δύο τρόπους εντός του κυττάρου. Αρχικά μπορεί σχηματιστεί ενδογενώς από τον οργανισμό από το 5 - αμινολεβουλινικό οξύ που θα χορηγηθεί στο οργανισμό καθώς αυτό αποτελεί πρόδρομο της πρωτοπορφυρίνης ΙΧ, ενώ εναλλακτικά μπορεί να χορηγηθεί απευθείας στο κύτταρο. Και με τους δύο τρόπους πάντως το αποτέλεσμα είναι να εισάγεται η πορφυρίνη στο κύτταρο και να προκαλείται η θανάτωση αυτού μέσα από την διαδικασία της φωτοδυναμικής θεραπείας. Η θανάτωση των κυττάρων μέσω φωτοευαισθητοποίησης μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματικότερα αν μαζί με την πρωτοπορφυρίνη ΙΧ καταφέρουμε να εισάγουμε μεταξύ των στρωμάτων του LDH και μίας ουσίας που θα αύξανε την συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου. Το υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ(PFC<sub>7</sub>) είναι ένα ανάλογο του επτανοϊκού οξέος στο οποίο όλα τα αλειφατικά υδρογόνα έχουν αντικατασταθεί από άτομα φθορίου. Η ένωση αυτή επιλέχθηκε να σταθεροποιηθεί μεταξύ των στρωμάτων του LDH καθώς έχει την ικανότητα να αυξάνει την διαλυτότητα του οξυγόνου<sup>47</sup>, ενώ το υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ με επταμελή ανθρακική αλυσίδα προτιμήθηκε σε σχέση με τα άλλα μέλη της σειράς του καθώς έχει βρεθεί από μελέτες σε ποντίκια ότι είναι αυτό που αποβάλλεται γρηγορότερα από τον οργανισμό σε σχέση με τα άλλα μέλη της σειράς.<sup>48,49</sup> Το γεγονός αυτό μαζί με την ικανότητα του LDH να εισάγεται στο κύτταρο και να αποσυντίθεται μέσα σε αυτό εξαιτίας της χαμηλής τιμής του pH εντός αυτού μας οδήγησε στην σκέψη ότι θα ήταν πολύ χρήσιμη η σύνθεση ενός υβριδίου το οποίο, αρχικά θα μπορούσε να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και αφού

ελευθερώσει εντός του κυττάρου την πρωτοπορφυρίνη IX, να της επιτρέψει να δράσει φωτοδυναμικά.

### 2.1.2 Φωτοδυναμική Θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι ένας τύπος θεραπείας του καρκίνου κατά την οποία ένας φωτοευαισθητοποιητής εντοπίζεται σε καρκινικά κύτταρα και εξάγει ένα φωτοδυναμικό αποτέλεσμα εξαιτίας της δράσης του διεισδυτικού προσπίπτοντος φωτός. Η φωτοδυναμική θεραπεία στην σημερινή εποχή βασίζεται στην συνδυασμένη δράση ενός φωτοευαισθητοποιητή, του φωτός και του οξυγόνου το οποίο έχει ως αποτέλεσμα να αδρανοποιεί τα κακοήθη κύτταρα ή να διαμορφώνει τον κυτταρικό μεταβολισμό.

Η επιτυχία της φωτοδυναμικής θεραπείας εξαρτάται από την σωστή ρύθμιση και των τριών παραγόντων που απαιτούνται (φωτοευαισθητοποιητής, φως, οξυγόνο) με αποτέλεσμα να απαιτείται η βελτιστοποίηση των συνθηκών αυτών. Για τον λόγο αυτό απαιτείται η εύρεση του κατάλληλου φωτοευαισθητοποιητή με την κατάλληλη συγκέντρωση, η ένταση του φωτός που πρέπει να χρησιμοποιηθεί καθώς και η βέλτιστη ροή οξυγόνου.<sup>50</sup>

Η θανάτωση των όγκων ξεκινάει κυρίως με την δημιουργία οξυγόνου απλής κατάστασης ( $^1\text{O}_2$ ). Εκτός από αυτό και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου μπορεί να εμπλέκονται στα βιολογικά επακόλουθα της φωτοδυναμικής θεραπείας ιδίως στην περίπτωση όπου πορφυρίνες χρησιμοποιούνται ως φωτοευαισθητοποιητές. Υπάρχουν διάφορες ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να παράγουν οξυγόνο απλής κατάστασης. Βαφές με ικανότητα φωτοευαισθητοποίησης όπως το ερυθρό βεγγάλης, το μπλε του μεθυλίου, ο πυρήνας του φωτοσυστήματος II, φθαλοκυανίνες και διάφορες πορφυρίνες έχουν την ικανότητα να παράγουν οξυγόνο απλής κατάστασης σε εξαιρετικές κβαντικές αποδόσεις.<sup>51,52</sup> Ο χρόνος ζωής καθώς και η δραστικότητα του  $^1\text{O}_2$  που παράγεται διαφέρει ανάλογα τον φωτοευαισθητοποιητή που θα χρησιμοποιηθεί καθώς και τις συνθήκες όπου θα δράσει. Το οξυγόνο απλής κατάστασης το οποίο παράγεται είναι πολύ δραστικό και μπορεί να προκαλέσει την οξειδωτική καταστροφή



πρωτεϊνών.<sup>53,54</sup> Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να παγιδευτεί με την χρήση οργανικών μορίων και διαφόρων αντιοξειδωτικών ουσιών.<sup>55,56</sup>

Το  $^1\text{O}_2$  παράγεται όχι μόνο υπό την παρουσία έντονου φωτός αλλά και υπό κανονικές συνθήκες φωτισμού, αλλά για γίνει κάτι τέτοιο απαιτούνται μεγάλες συγκεντρώσεις της πορφυρίνης.

Ο πιο γνωστός φωτοευαισθητοποιητής που χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα είναι το photofrin , το οποίο παράγεται από την αιμοσφαιρίνη. Το photofrin είναι ένα μίγμα το οποίο περιέχει διάφορες μονομερές πορφυρίνες μαζί με διμερή και ανώτερα ολιγομερή αυτών. Λόγω αυτού πολύ λίγα είναι γνωστά για την δράση του, ενώ παράλληλα το photofrin εμφανίζει σημαντικά μειονεκτήματα εξαιτίας της μικρής εκλεκτικότητας που παρουσιάζει, του γεγονότος ότι εισέρχεται σχεδόν σε κάθε κύτταρο καθώς και λόγω της αργής απομάκρυνσης από τον οργανισμό έχει ως αποτέλεσμα μία μακροχρόνια φωτοευαισθητοποίηση.<sup>57</sup>

Για τον λόγο αυτό απαιτείται η εύρεση νέων φωτοευαισθητοποιητών οι οποίοι θα πρέπει να έχουν πλήρως προσδιορισμένη δομή, να αποτελούνται αποκλειστικά από μία ένωση, να εμφανίζουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τα κύτταρα και επιπλέον να μην ενώνονται με τους υγιείς ιστούς.

Με την πάροδο των χρόνων έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες και έχουν παρασκευαστεί πληθώρα πορφυρινικών συστημάτων με διαφορετικούς υποκαταστάτες το καθένα καθώς και με διαφορετικά κεντρικά μεταλλικά ιόντα τα οποία μπορούν να βρουν διαφορετικές φωτοχημικές εφαρμογές και κατ' επέκταση μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην φωτοδυναμική θεραπεία.<sup>58,59</sup> Οι περισσότερες από αυτές είναι παράγωγα της πρωτοπορφυρίνης IX, καθώς η τοπική φωτοδυναμική θεραπεία προωθεί την ενδογενή μετατροπή του 5 – αμινολεβουλικού οξέος σε πρωτοπορφυρίνη IX.<sup>60</sup>

Το κύριο μέρος του σώματος στο οποίο αποσκοπεί η δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι το δέρμα καθώς ο καρκίνος του δέρματος είναι μία περίπτωση καρκίνου όπου τα κρούσματα αυξάνονται ολοένα και περισσότερο, το δέρμα έχει άμεση επαφή με το φως και η εφαρμογή του φωτοευαισθητοποιητή είναι άμεση, ενώ οι κλινικές απαιτήσεις για την αντιμετώπισή του είναι εμφανείς.

### 2.1.3 Φωτοευαισθητοποιητές σε κύτταρα

Οι πορφυρίνες εμφανίζουν την ικανότητα να δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές, δηλαδή μπορούν όταν φωτοβοληθούν με φως κατάλληλης συχνότητας υπό ροή ρεύματος οξυγόνου να παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου, οι οποίες προκαλούν την θανάτωση κυττάρων. Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αρκετά παραδείγματα όπου διάφορες πορφυρίνες έχουν εισαχθεί σε κύτταρα και έχουν προκαλέσει την θανάτωσή τους.

Έτσι η 5,10,15,20-τετραμεθόξυφαίνυλο-πορφυρίνη παρουσιάζει αυξανόμενη εισαγωγή μέσα στο κύτταρο όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή της, η οποία εισαγωγή σταθεροποιείται ανεξάρτητα της συγκέντρωσης της πορφυρίνης μετά την πάροδο 24 ωρών. Η θανάτωση των κυττάρων είναι άμεση μόλις αυτά εκτεθούν σε ορατό φως.<sup>61</sup>

Η 9-ακετόξυ-2,7,12,17-τετράκισ-β-μεθόξυαιθυλ-πορφυρίνη, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή απορρόφηση γύρω στα 640 nm και μεγάλη κβαντική απόδοση παραγωγής  $^1\text{O}_2$  όταν εισαχθεί σε κύτταρα, εντοπίζεται στην περιοχή των λυσοσωμάτων και όπως έχει βρεθεί από μελέτες φθορισμού αρχίζει να προκαλεί θανάτωση των κυττάρων σε συγκέντρωση της τάξης των 15 nM.<sup>62</sup> Με μελέτες φθορισμού βρέθηκε επίσης ότι η συγκεκριμένη πορφυρίνη μπορεί να εισαχθεί στα κύτταρα σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από τους 4 – 37 °C, με μικρές διαφοροποιήσεις στο ποσοστό εισαγωγής εντός του κυττάρου.<sup>63</sup> Παράγωγα της 9-ακετόξυ-2,7,12,17-τετράκισ-β-μεθόξυαιθυλ-πορφυρίνης έχουν εισαχθεί και σε λιποσώματα. Με μετρήσεις φθορισμού και απορρόφησης βρέθηκε ότι τα παράγωγα αυτά μετά την εισαγωγή τους μέσα στα λιποσώματα εντοπίζονται στη λιπιδική διπλοστοιβάδα του λιποσώματος σε διάφορα βάθη ανάλογα με το πόσο υδρόφιλη είναι η πλευρική αλυσίδα της πορφυρίνης. Αυξάνοντας την ποσότητα της πορφυρίνης ή την ποσότητα του φωτός εντείνεται η ποσότητα των καταστρεφόμενων λιποσωμάτων. Όταν τα συγκεκριμένα παράγωγα εισήχθησαν σε κύτταρα εντοπίστηκαν στην ίδια περιοχή των κυττάρων χωρίς όμως να προκαλέσουν την καταστροφή της κυτταρικής καλλιέργειας.<sup>64</sup>

Εκτός από τα παραπάνω, παράγωγα της χλωρίνης έχει αναφερθεί ότι μπορούν να δράσουν πολύ αποτελεσματικά στην θανάτωση διαφόρων τύπων ιών του AIDS μετά από μελέτες εισαγωγής αυτών σε κύτταρα.<sup>65</sup>

Η 2,3-διύδρο-5,15-δι-3,5-διύδροφαίνυλ-πορφυρίνη όταν εισαχθεί σε κύτταρα εντοπίζεται στην περιοχή του κυτταροπλάσματος και όχι στο πυρήνα του κυττάρου και μπορεί να προκαλέσει μερική καταστροφή του DNA αυτού ακόμα και στο σκοτάδι.<sup>66</sup> Η βακτηριοχλωρίνη όταν εισαχθεί σε κύτταρα μπορεί να μην δράσει τόσο αποτελεσματικά ανάλογα με την κυτταρική καλλιέργεια που θα χρησιμοποιηθεί αφού δεν καταφέρνει να εισέλθει σε όλους τους τύπους των κυττάρων.<sup>67</sup>

Πέρα από τις πορφυρίνες ως φωτοευαισθητοποιητές με ικανότητα εισαγωγής στα κύτταρα μπορούν να δράσουν και άλλες ουσίες. Έτσι στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για την δράση ως φωτοευαισθητοποιητών κινονών<sup>68</sup>, υποκατεστημένων φουλερενίων<sup>69</sup> και άλλων ουσιών οι οποίες κάθε μία με τη σειρά της εντοπίζεται σε διαφορετική περιοχή του κυττάρου.

#### **2.1.4 Στόχος εργασίας**

Επομένως ο στόχος αυτής της εργασίας ήταν να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες για την ακινητοποίηση της πρωτοπορφυρίνης IX μεταξύ των στρωμάτων του LDH τόσο μόνη της όσο και υπό την παρουσία μίας ένωσης που έχει την ικανότητα να αυξάνει την συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου, το υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ. Η επιτυχία της ακινητοποίησης διαπιστώθηκε με την χρήση φασματοσκοπιών υπερύθρου και περίθλασης ακτινών X. Στην συνέχεια εξετάστηκε κατά πόσο η διαδικασία της ακινητοποίησης επηρεάζει την ικανότητα δράσης της πρωτοπορφυρίνης IX ως φωτοευαισθητοποιητής με την χρησιμοποίηση του υβριδίου ως καταλύτη κατά την διάρκεια της φωτοξείδωσης ενός οργανικού υποστρώματος. Συγκρίθηκε η δραστηριότητα της ακινητοποιημένης πρωτοπορφυρίνης IX τόσο σε σχέση με αυτή της ελεύθερης όσο και με αυτή του υβριδίου στο οποίο μεταξύ των στρωμάτων αυτού είχαν ακινητοποιηθεί μαζί η πρωτοπορφυρίνη IX με το υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.2.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (LDH)

Η σύνθεση των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων έγινε με βάση το πρωτόκολλο του Miyata.<sup>5</sup> Συγκεκριμένα, σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη του ενός λίτρου με 200 ml H<sub>2</sub>O τοποθετείται πεχάμετρο και μαγνητικός αναδευτήρας. Στη φιάλη προσαρμόζονται δύο προσθετικές φιάλες από τις οποίες η μία περιέχει 200 ml διαλύματος 0.6 M Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> και 0.3 M Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> και η άλλη 200 ml διαλύματος 2 M NaOH. Τα δύο διαλύματα προστίθενται στο H<sub>2</sub>O ταυτόχρονα με τη ροή να ρυθμίζεται έτσι ώστε το pH του διαλύματος να παραμένει σταθερό και ίσο με 10.0 ± 0.5. Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονται με απιονισμένο νερό που έχει απαερωθεί με διοχέτευση ρεύματος N<sub>2</sub> για 20 min και στη συνέχεια παραμένουν σφραγισμένα ώστε να μην έρχονται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Επίσης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η συσκευή είναι κλειστή και διοχετεύεται αέριο N<sub>2</sub> στη σφαιρική φιάλη.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το λευκό ίζημα που σχηματίζεται αναδεύεται για μία μέρα σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να επιτευχθεί καλύτερος σχηματισμός των σωματιδίων του LDH. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για να απομακρυνθεί ο διαλύτης και στην συνέχεια πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με απαερωμένο νερό. Μετά το τέλος της δεύτερης έκπλυσης το διάλυμα του LDH απαερώνεται και φυλάσσεται σε φιάλη σε μορφή διαλύματος, σφραγισμένο βέβαια για να μην έρχεται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα καθώς τα ανθρακικά ανιόντα που περιέχονται σε αυτόν μπορεί να αντικαταστήσουν τα ενδιάμεσα αντισταθμιστικά ανιόντα λόγω μεγαλύτερης συγγένειας προς LDH.

Το LDH, το οποίο συντέθηκε μελετάται φασματοσκοπικά με την χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR) και περίθλασης ακτίνων X (XRD).

### 2.2.2 Σύνθεση υβριδίου LDH-P.IX

Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 20 ml H<sub>2</sub>O, τα οποία απαερώνονται για 20 min με την

διοχέτευση ρεύματος  $N_2$ . Η πρωτοπορφυρίνη IX προστίθεται στο νερό υπό μορφή του άλατος αυτής με νάτριο σε συγκέντρωση 10 mM. Το διάλυμα αναδεύεται καλά για να διαλυθεί πλήρως η πορφυρίνη, ενώ γίνεται και η χρήση υπερήχων για την καλύτερη διάλυση των σωματιδίων. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του LDH σε ποσοστό 0.1% w/w. Ρυθμίζεται το pH στο 8 μετά την προσθήκη του LDH και το διάλυμα απαερώνεται για άλλα 20 min. Η φιάλη σφραγίζεται και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 μέρες.

Το διάλυμα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση του διαλύτη της αντίδρασης. Πραγματοποιούνται δύο εκπλύσεις με  $H_2O$  για την απομάκρυνση κάποιας ποσότητας της πορφυρίνης, η οποία πιθανόν να μην δεσμεύτηκε μέσα στο δίκτυο του LDH. Στην συνέχεια το διάλυμα διηθείται υπό κενό και αφήνεται να ξηρανθεί στο αέρα.

Το υβρίδιο, το οποίο έχει συντεθεί μελετάται φασματοσκοπικά με την χρήση φασματοσκοπίας υπερώθρου (IR) και περίθλασης ακτίνων X (XRD).

### **2.2.3 Σύνθεση υβριδίου LDH-P.IX-PFC<sub>7</sub>**

Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 13,34 ml  $H_2O$ , τα οποία απαερώνονται για 20 min με την διοχέτευση ρεύματος  $N_2$ . Η πρωτοπορφυρίνη IX προστίθεται στο νερό υπό μορφή του άλατος αυτής με νάτριο σε συγκέντρωση 3 mM. Η πρωτοπορφυρίνη IX διαλύεται σχετικά εύκολα στο  $H_2O$  μετά από ανάδευση και την χρήση υπερήχων. Στην συνέχεια προστίθεται στην φιάλη αντίδρασης και το PFC<sub>7</sub> σε συγκέντρωση 9 mM. Το διάλυμα θολώνει ελαφρά και φαίνεται σαν να σχηματίζονται μικρά σωματίδια, τα οποία εξαφανίζονται με την χρήση υπερήχων. Στο διάλυμα που προκύπτει μετράται το pH το οποίο είναι 2,7. Ακολουθεί προσθήκη 6,66 ml του διαλύματος του LDH (0,1 % w/w) οπότε το pH του διαλύματος ανεβαίνει στο 7,7. Ρυθμίζεται το pH στο 9 με την προσθήκη βάσης και αφού το διάλυμα απαερωθεί για άλλα 20 min για να ελαχιστοποιηθεί η ποσότητα του αέρα κατά την διάρκεια της αντίδρασης, η φιάλη σφραγίζεται και αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 μέρες για να επιτευχθεί η εισαγωγή των δύο μορίων μέσα στο δίκτυο του LDH.

Το διάλυμα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση του διαλύτη της αντίδρασης. Πραγματοποιούνται δύο εκπλύσεις με H<sub>2</sub>O για την απομάκρυνση κάποιας ποσότητας της πορφυρίνης ή του PFC<sub>7</sub>, οι οποίες πιθανόν να μην δεσμεύτηκαν μέσα στο δίκτυο του LDH. Στην συνέχεια το διάλυμα διηθείται υπό κενό και αφήνεται να ξηρανθεί στο αέρα.

Το υβρίδιο, το οποίο έχει συντεθεί μελετάται φασματοσκοπικά με την χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR) και περίθλασης ακτίνων X (XRD).

#### **2.2.4 Μελέτη δραστηριότητας του υβριδίου LDH-P.IX**

Σε φιαλίδιο των 20 ml που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 6 ml CHCl<sub>3</sub> και διαλύονται 10 ml 2,3 διμέθυλο-2 βουτενίου. Το διάλυμα αναδεύεται καλά για να επιτευχθεί καλύτερη διάλυση. Στο διάλυμα που προκύπτει προστίθενται 1 mgf υβριδίου LDH – P.IX , η διάλυση του οποίου επιτυγχάνεται μετά από έντονη ανάδευση και χρήση υπερήχων. Το φιαλίδιο σφραγίζεται για να αποφύγουμε την εξάτμιση του διαλύτη. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 0°C με χρήση παγόλουτρου σε απόσταση 10 cm από την λυχνία 300 W Xenon. Ταυτόχρονα, ένα αργό ρεύμα ξηρού οξυγόνου διαβιβάζεται μέσω του μίγματος της αντίδρασης. Η αντίδραση διεξάγεται για χρόνο 10 min. Κατά την διάρκεια της φωτοξείδωσης η φιάλη της αντίδρασης βρίσκεται μέσα σε πάγο για να αποφύγουμε την καταστροφή τόσο του υβριδίου όσο και του υποστρώματος, εξαιτίας της υψηλής θερμότητας που αναπτύσσεται από τον φωτισμό. Μετά την πάροδο 5 min λαμβάνεται ένα δείγμα για διαπιστωθεί η πρόοδος της φωτοξείδωσης.

Μετά την ολοκλήρωση της φωτοξείδωσης στα δύο δείγματα που προκύπτουν απομακρύνουμε τον διαλύτη με συμπύκνωση σε ρότορα. Τα ιζήματα διαλύονται σε CDCl<sub>3</sub> και λαμβάνονται φάσματα <sup>1</sup>H NMR.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την φωτοξείδωση του υποστρώματος επαναλαμβάνεται με την χρήση ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX, αλλά και με την χρήση του υβριδίου LDH – πρωτοπορφυρίνης IX – PFC<sub>7</sub> έτσι ώστε να συγκριθεί η δραστηριότητα της ελεύθερης σε σχέση με την δεσμευμένη στο LDH, αλλά και σε σχέση με το υβρίδιο που περιέχει πρωτοπορφυρίνη και PFC<sub>7</sub>. Εκτός αυτού το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται χωρίς την χρήση φωτοευαισθητοποιητή (control).

### **2.2.5 Φάσματα UV – VIS ελεύθερης, δεσμευμένης P.IX**

Διαλύεται μικρή ποσότητα της ελεύθερης και της δεσμευμένης πρωτοπορφυρίνης IX σε H<sub>2</sub>O και λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης αυτών στην περιοχή από 200 – 700 nm. Το pH και των διαλυμάτων κατά την λήψη του φάσματος ήταν περίπου 7,5. Τα φάσματα που λαμβάνονται συγκρίνονται μεταξύ τους.

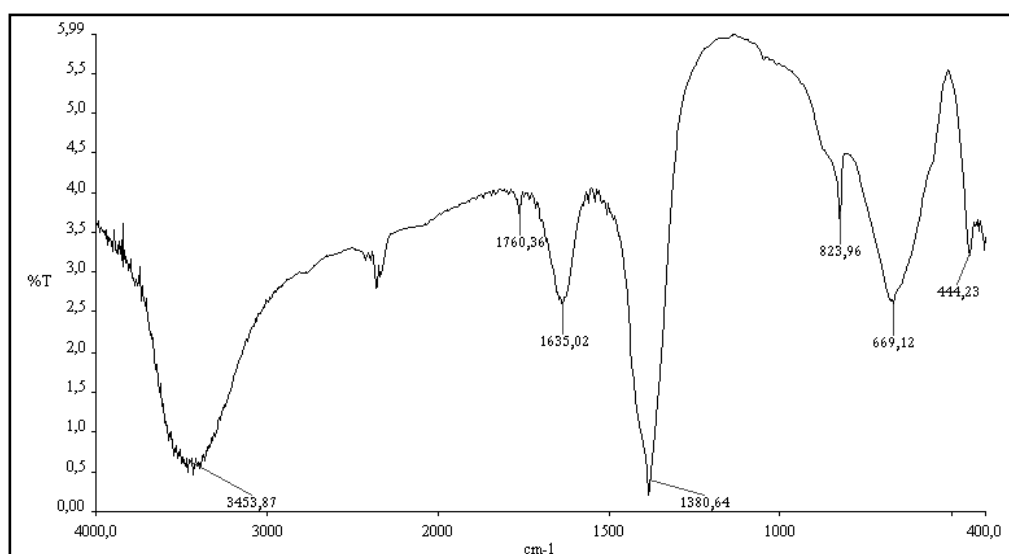
### **2.2.6 Μελέτη σταθερότητας υβριδίου LDH–P.IX**

Διαλύεται μικρή ποσότητα της ελεύθερης και της δεσμευμένης πρωτοπορφυρίνης IX σε CHCl<sub>3</sub> και λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης στην περιοχή από 200 – 700 nm. Στην συνέχεια τα δύο δείγματα φωτίζονται σε θερμοκρασία 0°C με χρήση παγόλουτρου σε απόσταση 10 cm από την λυχνία 300 W Xenon. Ταυτόχρονα, ένα αργό ρεύμα ξηρού οξυγόνου διαβιβάζεται μέσω του μίγματος της αντίδρασης. Η φωτισμός διαρκεί για χρόνο 5 min. Μετά το τέλος του φωτισμού λαμβάνεται φάσμα απορρόφησης στην ίδια περιοχή και κάτω από τις ίδιες συνθήκες που ελήφθησαν τα φάσματα πριν τον φωτισμό και συγκρίνονται τα αποτελέσματα.

## ΑΝΑΛΥΣΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### 2.3.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (LDH)

Το LDH που συντέθηκε μελετάται φασματοσκοπικά με την χρήση φασματοσκοπίας υπερώθρου (IR) και περίθλασης ακτίνων Χ (XRD). Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται το φάσμα υπερώθρου του LDH.



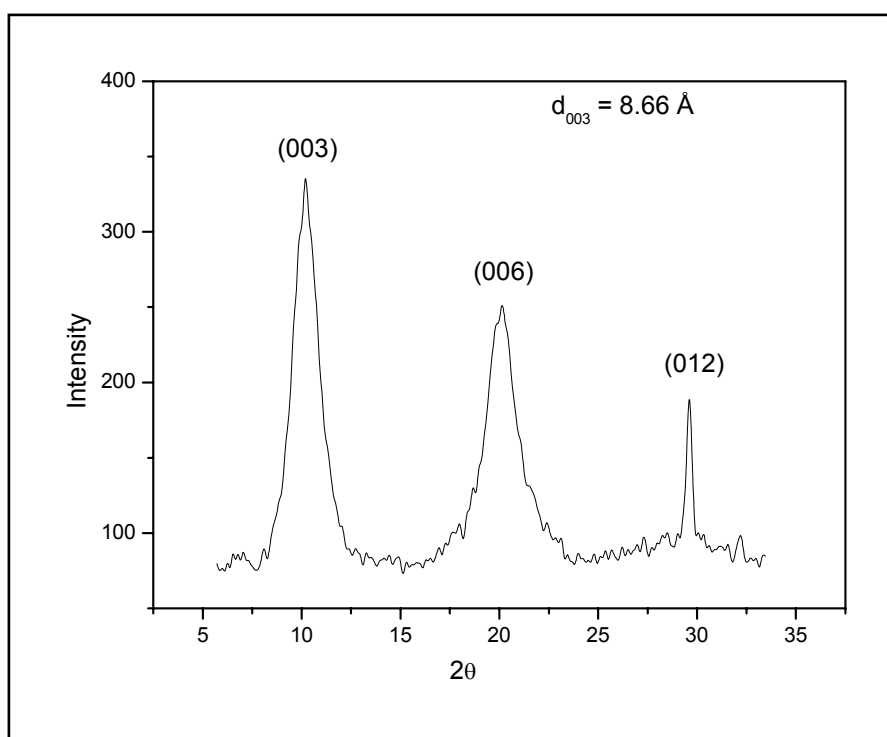
Σχήμα 17. Φάσμα υπερώθρου του Mg<sub>2</sub>Al-LDH-NO<sub>3</sub>.

Χαρακτηριστικό των φασμάτων IR των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων είναι η ευρεία ταινία απορρόφησης γύρω στα 3500cm<sup>-1</sup> που οφείλεται στη δόνηση τάσης των υδροξυλίων των μεταλλικών στρωμάτων καθώς και του νερού του ενδιάμεσου στρώματος το οποίο παρουσιάζει επίσης στους 1635cm<sup>-1</sup> και τη δόνηση κάμψης ν<sub>H-O-H</sub>. Οι δονήσεις στους 669cm<sup>-1</sup> και 444cm<sup>-1</sup> οφείλονται στους δεσμούς των μετάλλων με τα υδροξύλια. Στην περιοχή από 1000cm<sup>-1</sup> έως 2000cm<sup>-1</sup> παρουσιάζονται κορυφές που οφείλονται μόνο στα ανιόντα δίνοντας πληροφορίες για την ταυτότητα τους καθώς και για τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν με το θετικά φορτισμένο μεταλλικό στρώμα. Έτσι στο φάσμα υπερώθρου του LDH-NO<sub>3</sub> φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του νιτρικού ιόντος στους 1380cm<sup>-1</sup>, 1760cm<sup>-1</sup> και



$823\text{cm}^{-1}$ , μαζί με τις υπόλοιπες χαρακτηριστικές κορυφές του πηλού που προαναφέρθηκαν.

Το  $\text{NO}_3^-$  βέβαια μπορεί να έχει δεσμευθεί εσωτερικά ή εξωτερικά των στρωμάτων του LDH. Την πληροφορία για το αν έχουμε επιτύχει εσωτερική δέσμευση των νιτρικών ανιόντων θα μας την δώσει το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X.



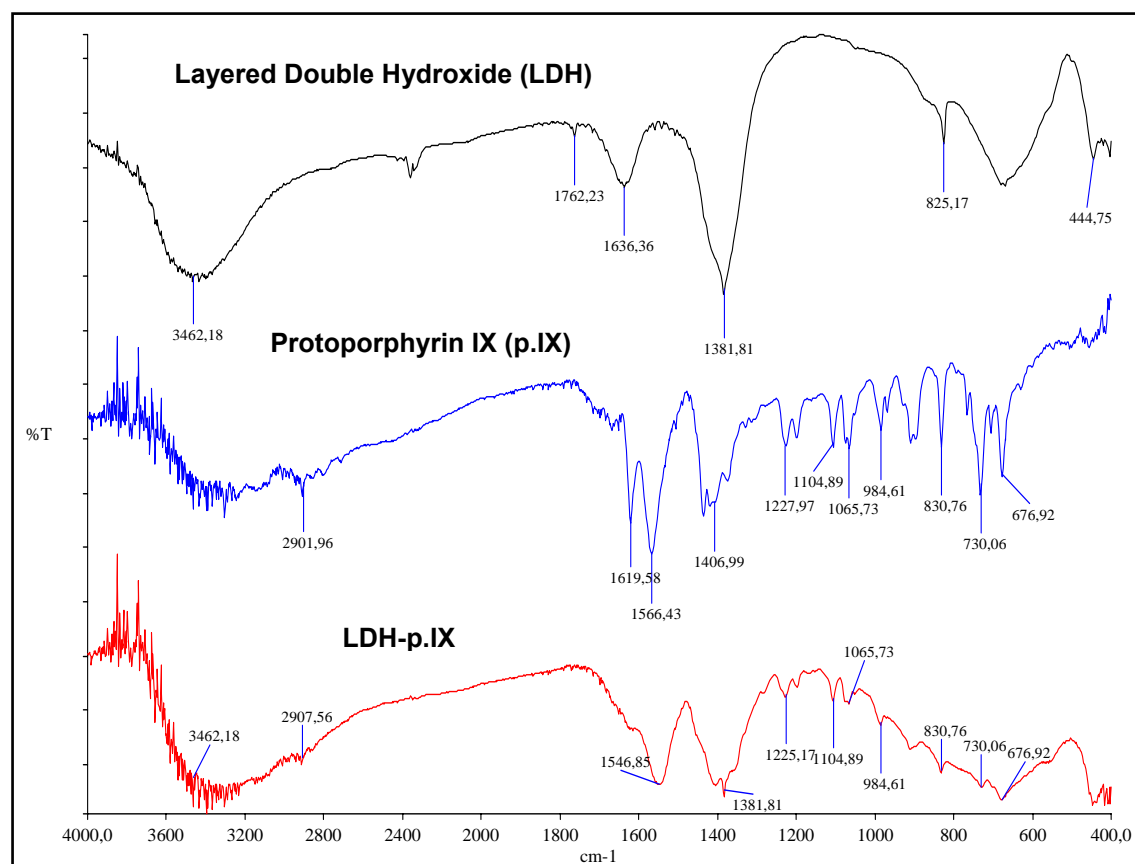
**Σχήμα 18.** Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του  $\text{Mg}_2\text{Al-LDH-NO}_3$ .

Με εφαρμογή του Νόμου του Bragg για την πρώτη αρμονική κορυφή του φάσματος προκύπτει ότι η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων του LDH είναι  $8,66 \text{ \AA}$  κάτι το οποίο συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Επιπλέον το γεγονός ότι η απόσταση των στρωμάτων του πηλού είναι  $8,66 \text{ \AA}$  αποδεικνύει ότι έχουμε σταθεροποιήσει μεταξύ των στρωμάτων αυτού νιτρικά ανιόντα και όχι ανθρακικά καθώς τα ανθρακικά οδηγούν σε απόσταση μεταξύ των στρωμάτων ίση με  $7,8 \text{ \AA}$ .<sup>9</sup> Κάτι τέτοιο δεν θα ήταν επιθυμητό κατά την σύνθεση του LDH καθώς τα ανθρακικά ανιόντα δεσμεύονται πιο ισχυρά σε σχέση με τα νιτρικά και δεν μπορούν να απομακρυνθούν τόσο εύκολα. Έτσι

πλέον έχουμε βάσιμα την ένδειξη ότι τα νιτρικά ανιόντα έχουν δεσμευθεί στο εσωτερικό των στρωμάτων του LDH και το υλικό που έχει παρασκευαστεί μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή νέων ουσιών μέσω της διαδικασίας της ιονανταλλαγής αυτών.

### 2.3.2 Σύνθεση υβριδίου LDH-P.IX

Κατά την σύνθεση του υβριδίου δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες όσο αφορά την συγκέντρωση της πρωτοπορφυρίνης και τον χρόνο ανάδευσης του μίγματος. Αυτές που αναφέρονται στο πειραματικό μέρος αποτελούν τις βέλτιστες συνθήκες, οι οποίες έχουν προσδιοριστεί. Αρχικά το υβρίδιο, το οποίο συντέθηκε μελετήθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου για να διαπιστωθεί η επιτυχής δέσμευση της πρωτοπορφυρίνης στο LDH. Στο φάσμα IR που ακολουθεί φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX, οι οποίες υπάρχουν και στο φάσμα της δεσμευμένης στο LDH.

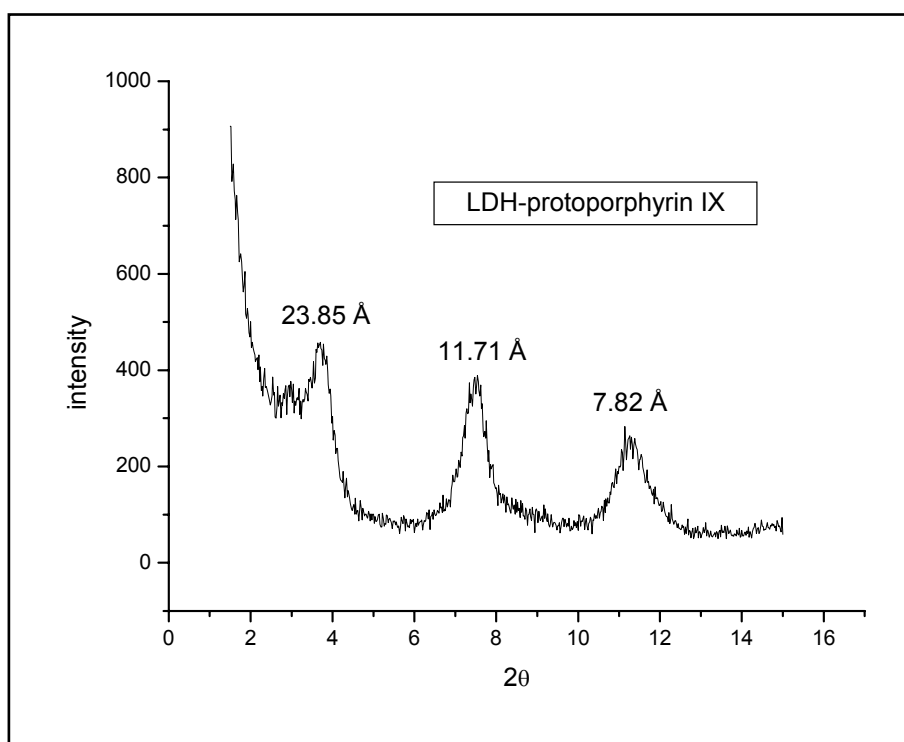


**Σχήμα 19.** Φάσματα υπερύθρου του LDH, της πρωτοπορφυρίνης IX, και του υβριδίου LDH-P.IX

Παρατηρώντας το φάσμα της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX μπορούμε να δούμε τις κορυφές στους 984, 1406, 1566, 1619 και 2901  $\text{cm}^{-1}$ , οι οποίες οφείλονται στην ύπαρξη του καρβοξυλικού ανιόντος στην ένωση, ενώ οι υπόλοιπες κορυφές στην περιοχή από του 676 μέχρι 1227  $\text{cm}^{-1}$  οφείλονται στις μεθυλικές και βινυλικές ομάδες της πρωτοπορφυρίνης IX καθώς στους πυρρολικούς δακτυλίους αυτής.<sup>70</sup>

Στο φάσμα του υβριδίου LDH – P.IX μπορούμε πολύ εύκολα να παρατηρήσουμε ότι υπάρχουν τόσο οι κορυφές του LDH όσο και της πρωτοπορφυρίνης IX κάτι που μας πληροφορεί ότι έχει επιτευχθεί δέσμευση της ένωσης μας στο LDH. Η κορυφή στους 1381  $\text{cm}^{-1}$  μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν έχουν απομακρυνθεί εντελώς τα νιτρικά ανιόντα μέσα από το δίκτυο των στρωμάτων του πηλού, αλλά συνυπάρχουν σε κάποιο ποσοστό μαζί με την πρωτοπορφυρίνη IX.

Το γεγονός ότι οι κορυφές υπάρχουν τόσο στο φάσμα της ελεύθερης όσο και της δεσμευμένης πρωτοπορφυρίνης IX μας πληροφορεί ότι έχει επιτευχθεί η δέσμευση στο LDH χωρίς όμως να γνωρίζουμε αν η δέσμευση έχει γίνει εσωτερικά ή εξωτερικά των στρωμάτων αυτού. Την πληροφορία αυτή μας την δίνει το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X της ένωσης.

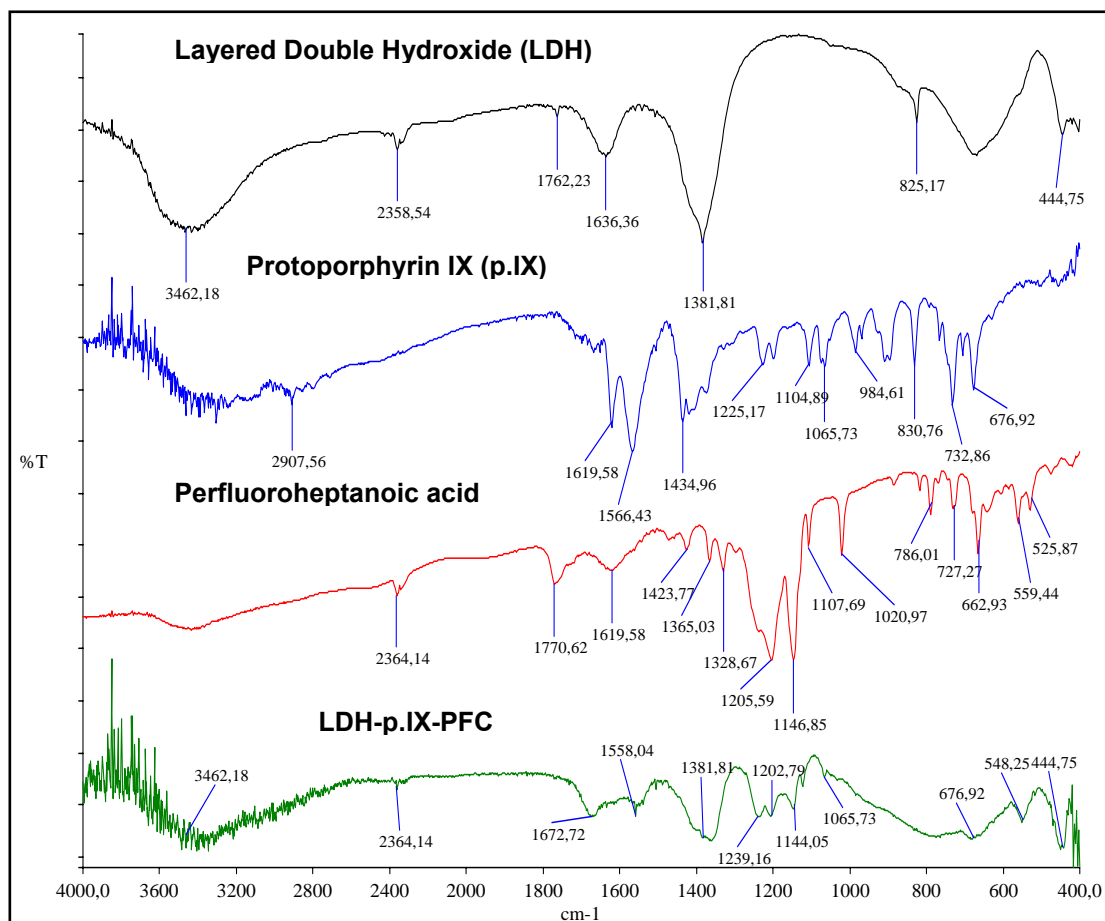


**Σχήμα 20.** Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του υβριδίου LDH-P.IX.

Η αρχική απόσταση των στρωμάτων του LDH όταν βρίσκεται στο εσωτερικό τους  $\text{NO}_3^-$  είναι 8,66 Å, ενώ μετά την προσθήκη της πρωτοπορφυρίνης IX αυξάνεται στα 23,85 Å κάτι το οποίο αποδεικνύει ότι η πρωτοπορφυρίνη έχει εισαχθεί στο εσωτερικό των στρωμάτων του LDH με αποτέλεσμα την διάνοιξη αυτών. Το γεγονός ότι οι κορυφές δεν είναι αρκετά οξείες οφείλεται στην ανομοιόμορφη διάταξη των μορίων της πρωτοπορφυρίνης IX στο εσωτερικό των στρωμάτων του LDH με αποτέλεσμα το δίκτυο των στρωμάτων να μην είναι πολύ καλά οργανωμένο.

### **2.3.3 Σύνθεση υβριδίου LDH–P.IX–PFC<sub>7</sub>**

Κατά την σύνθεση του υβριδίου δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες όσο αφορά την συγκέντρωση της πρωτοπορφυρίνης IX και του PFC<sub>7</sub>, την αναλογία των τριών συστατικών, την σειρά με την πρέπει να προστεθούν οι δύο ουσίες κατά την διάρκεια της αντίδρασης, έτσι ώστε να έχουμε επιτυχή εισαγωγή και των δύο καθώς και τον χρόνο ανάδευσης του μίγματος. Αυτές που αναφέρονται στο πειραματικό μέρος αποτελούν τις βέλτιστες συνθήκες, οι οποίες έχουν προσδιοριστεί. Στο φάσμα IR που ακολουθεί φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης και του PFC<sub>7</sub>, οι οποίες υπάρχουν στο φάσμα του υβριδίου LDH – P.IX – PFC<sub>7</sub>.



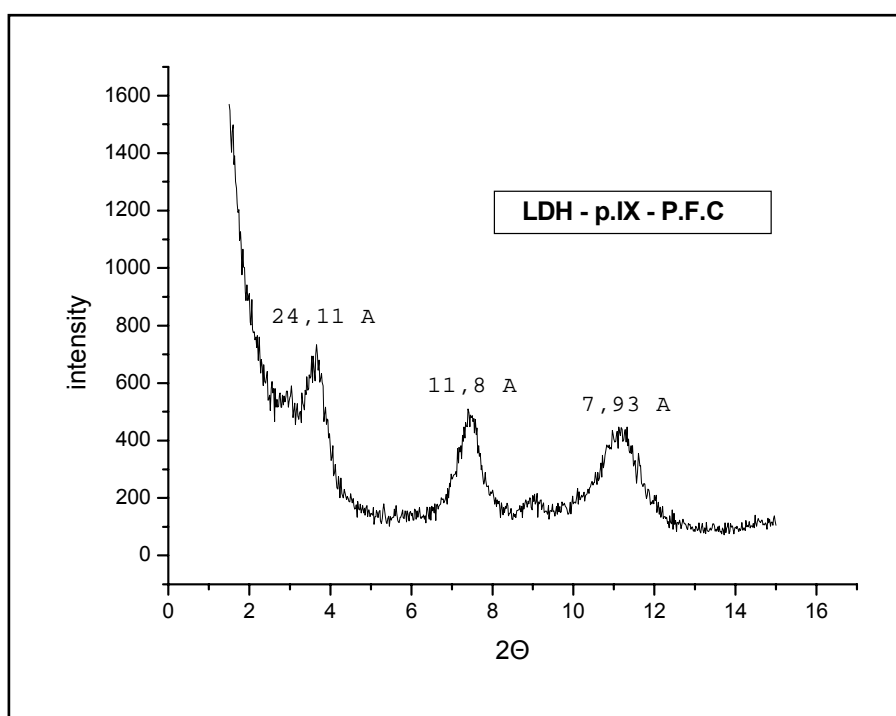
**Σχήμα 21.** Φάσματα υπερύθρου του LDH, της πρωτοπορφυρίνης IX, του υπερφθοροεπτανοϊκού οξέος και του υβριδίου LDH-P.IX-PFC.

Παρατηρώντας το φάσμα της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX μπορούμε να δούμε τις κορυφές στους 984, 1434, 1566, 1619 και 2901  $\text{cm}^{-1}$ , οι οποίες οφείλονται στην ύπαρξη του καρβοξυλικού ανιόντος στην ένωση, ενώ οι υπόλοιπες κορυφές στην περιοχή από του 676 μέχρι 1227  $\text{cm}^{-1}$  οφείλονται στις μεθυλικές και βινυλικές ομάδες της πρωτοπορφυρίνης IX καθώς στους πυρρολικούς δακτυλίους αυτής.

Παρατηρώντας το φάσμα του υπερφθοροεπτανοϊκού οξέος μπορούμε να δούμε τις κορυφές στους 1107, 1146, 1205  $\text{cm}^{-1}$ , οι οποίες οφείλονται στα υποκατεστημένα με δύο φθόρια άτομα του άνθρακα της ένωσης, ενώ οι κορυφές στους 525, 559, 662, 727, 786, 1146, 1205 και 1328  $\text{cm}^{-1}$  στην  $\text{CF}_3$  – ομάδα της ένωσης. Πέρα από αυτές υπάρχουν και οι κορυφές στους 1619, 1423  $\text{cm}^{-1}$ , οι οποίες οφείλονται στην ύπαρξη του καρβοξυλικής ομάδας της ένωσης.

Στο φάσμα του υβριδίου LDH – p.IX – PFC<sub>7</sub> μπορούμε πολύ εύκολα να παρατηρήσουμε ότι υπάρχουν τόσο οι κορυφές του LDH, της πρωτοπορφυρίνης IX και του PFC<sub>7</sub> κάτι που μας πληροφορεί ότι έχει επιτευχθεί δέσμευση των δύο ενώσεων στο LDH. Η κορυφή μικρής έντασης στους 1381 cm<sup>-1</sup> μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν έχουν απομακρυνθεί εντελώς τα νιτρικά ανιόντα μέσα από το δίκτυο των στρωμάτων του πηλού αλλά συνυπάρχουν σε κάποιο μικρό ποσοστό μαζί με τις δύο ουσίες.

Το γεγονός ότι υπάρχουν στο φάσμα του υβριδίου οι κορυφές τόσο της πρωτοπορφυρίνης όσο και του PFC<sub>7</sub> μας παρέχει μία ένδειξη ότι στο LDH έχουν δεσμευθεί και οι δύο ενώσεις χωρίς όμως να γνωρίζουμε αν η δέσμευση έχει γίνει εσωτερικά ή εξωτερικά των στρωμάτων αυτού. Την πληροφορία αυτή μας την δίνει το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X της ένωσης.



**Σχήμα 22.** Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του υβριδίου LDH-P.IX-PFC<sub>7</sub>.

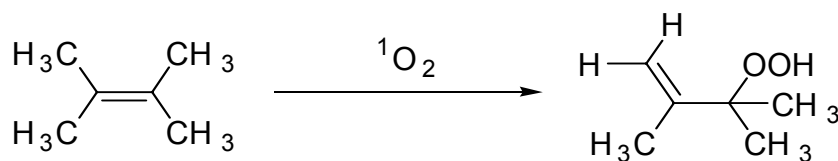
Η αρχική απόσταση των στρωμάτων του LDH όταν βρίσκεται στο εσωτερικό τους NO<sub>3</sub><sup>-</sup> είναι 8,66 Å, ενώ μετά την προσθήκη της πρωτοπορφυρίνης και του PFC<sub>7</sub> αυξάνεται στα 24,11 Å κάτι το οποίο αποδεικνύει ότι η πρωτοπορφυρίνη και το PFC<sub>7</sub> έχουν εισαχθεί στο εσωτερικό

των στρωμάτων του LDH με αποτέλεσμα την διάνοιξη αυτών. Το διάστημα μεταξύ των στρωμάτων του πηλού βέβαια δεν διαφέρει αρκετά σε σχέση με το διάστημα που προκύπτει όταν έχουμε την πρωτοπορφυρίνη IX μόνη της μέσα στο LDH, αλλά αυτό μπορεί να οφείλεται στο τρόπο με τον οποίο σταθεροποιείται ο πορφυρινικός δακτύλιος μεταξύ των στρωμάτων του LDH υπό την παρουσία του PFC<sub>7</sub> με αποτέλεσμα η αύξηση του διαστήματος μεταξύ των στρωμάτων αυτού να μην διαφέρει και πολύ παρά την εισαγωγή δύο ουσιών μέσα σε αυτό. Οι κορυφές και πάλι όπως στο φάσμα XRD του υβριδίου LDH – P.IX δεν είναι και τόσο οξείες εξαιτίας της ανομοιόμορφης κατανομής των μορίων του οξέος και της πορφυρίνης εντός των στρωμάτων του LDH.

#### 2.3.4 Μελέτη δραστηριότητας υβριδίων LDH–P.IX, LDH–P.IX–PFC<sub>7</sub>

Η δραστηριότητα του υβριδίου LDH – πρωτοπορφυρίνης IX, μελετήθηκε με την χρήση αυτού ως φωτοευαισθητοποιητή κατά την φωτοξείδωση ενός οργανικού υποστρώματος σύμφωνα με μία γνωστή από την βιβλιογραφία αντίδραση. Η δραστηριότητα του υβριδίου συγκρίθηκε σε σχέση με αυτή της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX και του υβριδίου LDH – πρωτοπορφυρίνης IX – PFC<sub>7</sub>.

Η ένωση που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση ως υπόστρωμα είναι το 2,3 διμέθυλο – 2 βουτενίου, το οποίο είναι μία πλήρως συμμετρική ένωση και εμφανίζει μόνο μία κορυφή στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR. Κατά την φωτοξείδωση της ένωσης αυτής η αντίδραση που συμβαίνει είναι η εξής:



Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε τρεις φορές χρησιμοποιώντας διαφορετικό φωτοευαισθητοποιητή την κάθε φορά, έτσι ώστε να συγκριθεί η δραστηριότητα των υβριδίων που συντέθηκαν σε σχέση με αυτή της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX. Έτσι πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως φωτοευαισθητοποιητές ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX, LDH – P.IX, LDH – P.IX – PFC<sub>7</sub>, ενώ πραγματοποιήθηκε και μία αντίδραση

στην οποία δεν χρησιμοποιήθηκε φωτοευαισθητοποιητής για να εξετάσουμε την περίπτωση εάν συμβαίνει αυτοξειδωση της ένωσης(control).

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την μελέτη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR μετά την κάθε αντίδραση είναι τα εξής:

- Αρχικά η ένωση δεν αυτοξειδώνεται καθώς το φάσμα της είναι ακριβώς το ίδιο μετά την φωτοβόληση του δείγματος χωρίς την χρήση φωτοευαισθητοποιητή.
- Τα φάσματα που προέκυψαν μετά τις αντιδράσεις εμφανίζουν τις ίδιες κορυφές γεγονός που μας πληροφορεί ότι η φωτοξείδωση πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο τόσο όταν η πρωτοπορφυρίνη IX είναι ελεύθερη όσο και όταν είναι δεσμευμένη στο LDH είτε μόνη της είτε υπό την παρουσία του PFC<sub>7</sub>.
- Η ένταση των κορυφών όταν η φωτοξείδωση πραγματοποιείται με δεσμευμένη στο LDH πρωτοπορφυρίνη IX μετά την πάροδο του ίδιου χρονικού διαστήματος είναι λίγο μεγαλύτερη και όταν η πρωτοπορφυρίνη IX είναι μόνη της αλλά και υπό την παρουσία του PFC<sub>7</sub>. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι η ποσότητα που εισάγεται μέσα στο LDH να είναι ακριβώς αυτή που απαιτείται για την καλύτερη πρόοδο της φωτοξείδωσης κάτι το οποίο μπορεί να μην συμβαίνει με την ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX, της οποίας η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να ήταν μεγαλύτερη από την απαιτούμενη, με αποτέλεσμα να μην προχωρά αρκετά γρήγορα η διαδικασία.

Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR παρατίθενται στο παράρτημα και οι κορυφές που εντοπίζονται σε αυτά αποδίδονται στις χημικές μετατοπίσεις των χημικά μη ισοδυνάμων υδρογόνων της ένωσης τα οποία είναι τα εξής:

Η κορυφή στα 1,347 ppm αποδίδεται στα έξι ισοδύναμα υδρογόνα των δύο μεθυλίων που είναι ενωμένα με τον άνθρακα που έχει σχηματίσει το υπεροξειδίο, η κορυφή 1,795 ppm αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα υδρογόνα του μεθυλίου που είναι ενωμένο με τον άνθρακα του διπλού δεσμού, οι δύο απλές κορυφές στα 5 ppm αποδίδονται στα δύο μεθυλικά υδρογόνα τα οποία δεν είναι ισοδύναμα μεταξύ και έτσι εμφανίζουν δύο διαφορετικές κορυφές, ενώ η κορυφή στα 7,289 ppm αποδίδεται στο υπεροξειδικό υδρογόνο. Η κορυφή στα 7,28 ppm οφείλεται στην απορρόφηση του  $\text{CDCl}_3$ , ενώ η κορυφή στα 3,7 ppm πιθανώς να οφείλεται σε κάποια ακαθαρσία.

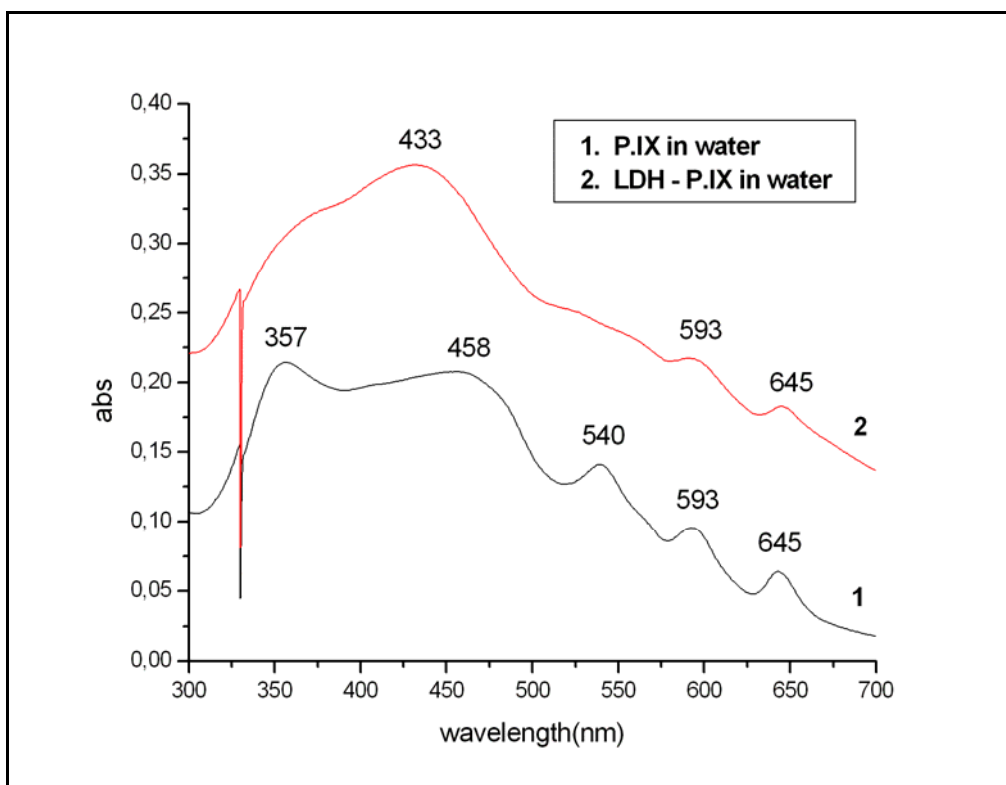


Επομένως το χρήσιμο συμπέρασμα που προκύπτει από την αντίδραση αυτή είναι ότι η ακινητοποίηση της πρωτοπορφυρίνης IX στο LDH είτε μόνη της είτε υπό την παρουσία του PFC<sub>7</sub>, μιας ένωσης που έχει την ικανότητα να αυξάνει την διαλυτότητα του οξυγόνου, δεν επιδρά στην δραστικότητα αυτής καθώς η φωτοξείδωση του οργανικού υποστρώματος διεξάγεται με τον ίδιο τρόπο σε όλες τις περιπτώσεις. Για να μετρηθεί επακριβώς το ποσοστό επιτυχίας της φωτοξείδωσης συγκρίνοντας την ελεύθερη και την δεσμευμένη πρωτοπορφυρίνη IX τότε θα πρέπει να υπολογιστεί ακριβώς η ποσότητα που δεσμεύεται μεταξύ των στρωμάτων του LDH. Στην συνέχεια από την σχετική αναλογία των κορυφών του φάσματος <sup>1</sup>H NMR να υπολογιστεί εάν η ίδια ποσότητα πρωτοπορφυρίνης IX μπορεί να προκαλέσει την φωτοξείδωση ίδιας ποσότητας υποστρώματος και στο ίδιο ποσοστό όταν είναι ελεύθερη και όταν είναι δεσμευμένη κάτι το οποίο όμως δεν αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, αφού ο έλεγχος της δραστικότητας της ουσίας μετά την ακινητοποίησή της ήταν αυτό που επιδιώκαμε να εξετάσουμε.

Το επόμενο βήμα ήταν να εξεταστεί κατά πόσο η διαδικασία της φωτοβόλησης δεν προκαλεί την αποδέσμευση της πρωτοπορφυρίνης IX από τα στρώματα του LDH. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας UV – VIS.

### **2.3.5 Φάσματα UV – VIS ελεύθερης, δεσμευμένης P.IX**

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα φάσματα UV – VIS που ελήφθησαν για την ελεύθερη και την δεσμευμένη στο LDH πρωτοπορφυρίνη IX μετά την διάλυση αυτής σε H<sub>2</sub>O.

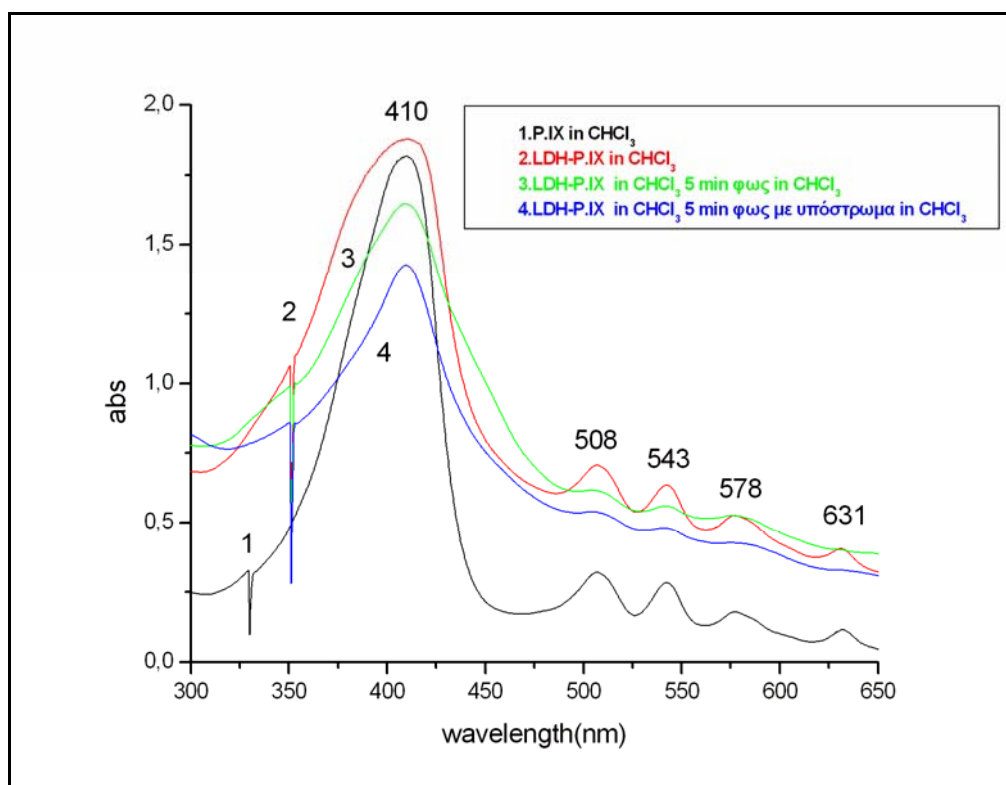


**Σχήμα 23.** Φάσματα UV – VIS της πρωτοπορφυρίνης IX και του LDH – P.IX.

Από το παραπάνω σχήμα προκύπτει ότι το φάσμα της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX αλλάζει μετά την εισαγωγή αυτής μεταξύ των στρωμάτων του LDH. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι όταν η P.IX διαλυθεί στο νερό όπως προκύπτει και από την βιβλιογραφία σχηματίζει και διμερή τα οποία εμφανίζουν μία κορυφή που πλησιάζει στην περιοχή του υπεριώδους (357 nm) με αποτέλεσμα κατά την λήψη του φάσματος της ελεύθερης P.IX να έχουμε μίγμα μονομερών και διμερών αυτής. Η μείωση της έντασης αυτής της κορυφής μετά την εισαγωγή της P.IX στο LDH μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων της πορφυρίνης εισάγονται στο LDH με την μονομερή του μορφή καθώς η πιθανότητα να τοποθετούνται τα διμερή μεταξύ των στρωμάτων του LDH φαντάζει δύσκολη, εξαιτίας του μεγαλύτερου μεγέθους αυτών.

### 2.3.6 Μελέτη σταθερότητας του υβριδίου LDH–P.IX

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα φάσματα UV – VIS που ελήφθησαν για την ελεύθερη και την δεσμευμένη στο LDH πρωτοπορφυρίνη IX πριν και μετά την φωτοβόληση αυτής αντίστοιχα.



**Σχήμα 24.** Φάσματα ορατού της πρωτοπορφυρίνης IX και του υβριδίου LDH – P.IX πριν και μετά την φωτοβόληση.

Όπως παρατηρούμε και από τα φάσματα η Soret ταινία της ελεύθερης P.IX υπάρχει στο 410 nm και δεν μετατοπίζεται ούτε κατά την υβριδοποίηση αυτής στο LDH ούτε και κατά την φωτοβόληση του υβριδίου. Οι Q ταινίες που εντοπίζονται στα 508, 543, 578, 631 nm δεν μετατοπίζονται, απλά μειώνεται η απορρόφηση του κατά τις παραπάνω διαδικασίες.

Μελετώντας τα φάσματα φαίνεται ότι το φάσμα του υβριδίου LDH – πρωτοπορφυρίνης IX δεν αλλάζει μετά την φωτοβόληση απλά και μόνο μειώνεται η απορρόφησης του. Αυτό εν μέρει είναι δικαιολογημένο καθώς κατά την διάρκεια της φωτοξείδωσης καταστρέφεται μέρος του φωτοευαίσθητοποιητή, και έτσι μειώνεται η απορρόφηση του δείγματος χωρίς όμως να παρατηρείται αισθητή μετατόπιση κάποιας κορυφής. Ένα ακόμα

αρκετά χρήσιμο συμπέρασμα που προκύπτει από τα παραπάνω φάσματα είναι ότι η φωτοβόληση του υβριδίου υπό την παρουσία του υποστρώματος έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη μείωση της απορρόφησης σε σχέση με το φάσμα χωρίς την παρουσία αυτού. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην μεγαλύτερη κατανάλωση του φωτοευαισθητοποιητή εξαιτίας της φωτοξείδωσης του υποστρώματος κάτι που μας πληροφορεί ότι δρα καταλυτικά.

## 2.4 Συμπεράσματα

Επομένως σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα :

- Επιτεύχθηκε η εισαγωγή της πρωτοπορφυρίνης IX μέσα στο δίκτυο των στρωμάτων του LDH σε υδατικό διάλυμα τόσο μόνη της όσο και υπό την παρουσία του υπερφθοροεπτανοϊκού οξέος κάτι που επιβεβαιώνεται από τα φάσματα IR και XRD που ελήφθησαν για τα υβρίδια που παρασκευάστηκαν.
- Το υβρίδιο LDH - πρωτοπορφυρίνη IX διατηρεί τις καταλυτικές του ιδιότητες αφού έχει την ικανότητα να δράσει ως φωτοευαισθητοποιητής κατά την φωτοξείδωση του 2,3 διμέθυλο – 2 βουτενίου.
- Κατά την διάρκεια της αντίδρασης αυτής δεν προκαλείται η έξοδος της ένωσης από τα στρώματα του LDH γεγονός που αποδεικνύει ότι συγκρατείται αρκετά σταθερά λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται με τα θετικά φορτισμένα στρώματα του LDH και δεν αποδεσμεύεται από αυτά
- Το υβρίδιο LDH – πρωτοπορφυρίνης IX – PFC<sub>7</sub> που παρασκευάστηκε μπορεί και αυτό να δράσει ως φωτοευαισθητοποιητής κατά την φωτοξείδωση του 2,3 διμέθυλο – 2 βουτενίου και πιθανώς με μεγαλύτερη απόδοση καθώς το υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ έχει την ικανότητα να αυξάνει την συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου.

Μελλοντικά θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί εκτενέστερη σύγκριση των δύο υβριδίων που παρασκευάστηκαν όσον αφορά την αποτελεσματικότητά τους. Έτσι θα διαπιστωθεί αν το υβρίδιο που περιέχει το PFC<sub>7</sub> μπορεί να αυξήσει την συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου.

Επιπλέον πρέπει να μελετηθεί κατά πόσο το μέγεθος των σωματιδίων που παρασκευάστηκε είναι αρκετά μικρό ώστε να επιτρέπει την εισαγωγή αυτών μέσα στα κύτταρα.

## **Β΄ ΜΕΡΟΣ : ΑΙΜΙΝΗ**

### **3.1.1 Γενικά**

Οι μεταλλοπορφυρίνες αποτελούν προσθετικές ομάδες πολλών πρωτεϊνών. Ειδικότερα η αιμίνη, η πρωτοπορφυρίνη ΙΧ δηλαδή που έχει συναρμοστεί με ένα άτομο σιδήρου που βρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα +3 αποτελεί προσθετική ομάδα των αιμοπρωτεϊνών, των κυτοχρωμάτων και αρκετών ενζύμων. Η ικανότητα των αιμοπρωτεϊνών να μεταφέρουν οξυγόνο το οποίο είναι απαραίτητο για την ζωή του ανθρώπου έδωσε στους ερευνητές το ερέθισμα για την εύρεση υποκατάστατων του αίματος τα οποία θα είχαν την ικανότητα να μεταφέρουν οξυγόνο στα κύτταρα. Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αρκετά παραδείγματα τέτοιων υποκατάστατων που στις περισσότερες περιπτώσεις είναι παράγωγα της αιμοσφαιρίνης καθώς και φθορισμένα παράγωγα καρβοξυλικών οξέων.<sup>71,72</sup> Η περιορισμένη μέχρι σήμερα χρήση αυτών οφείλεται στο ότι αυτοί οι τύποι μεταφορέων οξυγόνου εμφάνισαν παρενέργειες όπως η υπέρταση, γαστρεντερικούς ερεθισμούς και αυτόματη ρύθμιση των αποθεμάτων οξυγόνου. Για τον λόγο απαιτείται η εκτεταμένη βελτίωση αυτών των υποκατάστατων έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ευρύτερη κλίμακα. Το σημαντικό όμως επίτευγμα αυτών των ουσιών είναι ότι βοήθησαν στην κατανόηση του θεμελιώδους ρόλου που κατέχει το οξυγόνο στην ανθρώπινη φυσιολογία.<sup>71,72</sup> Έτσι κρίνεται αναγκαία η εύρεση νέων μοντέλων μεταφοράς οξυγόνου στα κύτταρα τα οποία θα είναι βιοσυμβατά και θα μπορούν να διατηρούν την δραστηριότητα των ουσιών που μεταφέρουν. Ως τέτοιο μοντέλο θα μπορούσε να προταθεί ένα υβρίδιο του LDH που πληρεί τις παραπάνω προϋποθέσεις και της αιμίνης, μιας μεταλλοπορφυρίνης που αποτελεί προσθετική ομάδα σε πρωτεΐνες μεταφοράς και αποθήκευσης οξυγόνου στους ιστούς.

### **3.1.2 Αιμοπρωτεΐνες**

Οι αιμοπρωτεΐνες, η αιμοσφαιρίνη και η μυοσφαιρίνη δηλαδή, οι οποίες αποτελούν πρωτεΐνες μεταφοράς και αποθήκευσης οξυγόνου στα ερυθροκύτταρα και στους μυς αντίστοιχα, στηρίζουν την ικανότητά τους να

δεσμεύουν οξυγόνο στην ύπαρξη μίας προσθετικής ομάδας, της αίμης. Το άτομο σιδήρου για να έχει την ικανότητα να δεσμεύει οξυγόνο θα πρέπει να βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση +2. Οι αιμοπρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ένα μόριο  $O_2$  ανά άτομο Fe(II). Η μυοσφαιρίνη που δεσμεύει το οξυγόνο είναι η πρωτεΐνη που συγκρατεί και μεταφέρει το οξυγόνο στα κύτταρα. Αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 135 αμινοξέων που απαρτίζεται από επτά α έλικες και έξι μη ελικωμένα τμήματα, όπου είναι προσαρτημένη η προσθετική ομάδα της Fe-πρωτοπορφυρίνης IX που δεσμεύει το οξυγόνο. Η Fe-πρωτοπορφυρίνη IX συγκρατείται μέσα στην σχισμή που σχηματίζεται από την πρωτεΐνη χωρίς να σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με αυτή. Ο μόνος δεσμός συναρμογής που σχηματίζεται είναι μεταξύ του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης και του σιδήρου.<sup>73</sup>

Η αιμοσφαιρίνη είναι τετραμερής, αποτελείται από δύο α και δύο β πολυπεπτιδικές αλυσίδες και κάθε υπομονάδα της έχει δομή ανάλογη με αυτή της μυοσφαιρίνης, δηλαδή σε κάθε αλυσίδα υπάρχει μία Fe-πρωτοπορφυρίνη IX που συγκρατείται από την ιμιδαζολική πλευρική αλυσίδα μίας ιστιδίνης. Το οξυγόνο δεσμεύεται αξονικά και άμεσα στο άτομο του σιδήρου και στις δύο αιμοπρωτεΐνες, έτσι με αυτό τον τρόπο μεταφέρεται στο αίμα.<sup>74</sup> Η αλληλεπίδραση του μοριακού οξυγόνου με τις αιμοπρωτεΐνες είναι πρωταρχικής σημασίας για την αναπνοή και τον μεταβολισμό.

### 3.1.3 Κυτοχρώματα

Η αίμη, εκτός από προσθετική ομάδα στη μυοσφαιρίνη και αιμοσφαιρίνη, αποτελεί και προσθετική ομάδα των κυτοχρωμάτων, όπου ο ρόλος της είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων. Τέτοια είδη μεταλλοπορφυρινών συναντώνται σε πολλές βιολογικές δραστηριότητες. Ο ρόλος που έχει αποδοθεί στα κυτοχρώματα σχετίζεται με την γρήγορη και εύκολη μεταφορά ηλεκτρονίων, μιας και παρακάμπτονται στερεοχημικές παρεμποδίσσεις καθώς και υψηλά δυναμικά οξειδοαναγωγής. Τα κυτοχρώματα συμμετέχουν επίσης στον κύκλο του αζώτου. Αν και έχουν χαρακτηριστεί πάνω από πενήντα κυτοχρώματα έως σήμερα, το κυτόχρωμα που έχει μελετηθεί ευρέως είναι το κυτόχρωμα c.

Τα κυτοχρώματα τύπου c είναι συνήθως χαμηλού σπιν και περιέχουν μία ομάδα αίμης συναρμοσμένη ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη μέσω θειοαιθερικής γέφυρας. Είναι πολύ σταθερές πρωτεΐνες τόσο ως προς την θερμοκρασία όσο και ως προς τις αλλαγές του pH. Το κυτόχρωμα c είναι μέλος της αλυσίδας του αναπνευστικού συστήματος του μιτοχονδρίου. Η λειτουργία του βασίζεται στο ότι δέχεται ένα ηλεκτρόνιο από το κυτόχρωμα c<sub>1</sub> και το μεταφέρει στο σύμπλοκο της κυτοχρωμικής οξειδάσης.<sup>75,76</sup>

### 3.1.4 Ένζυμα

Εκτός από τα παραπάνω η αίμη παίζει σημαντικό ρόλο και στην λειτουργία κάποιων ενζύμων όπως οι υπεροξειδάσες, οι καταλάσες, η κυτοχρωμική οξειδάση και το κυτόχρωμα P450.

Οι υπεροξειδάσες όσο οι καταλάσες περιέχουν σιδηριπρωτοπορφυρίνη IX. Οι υπεροξειδάσες που καταλύουν οξειδώσεις που γίνονται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, κατά τις οποίες το υπεροξείδιο του υδρογόνου ανάγεται σε νερό από ένα αναγωγικό μέσο

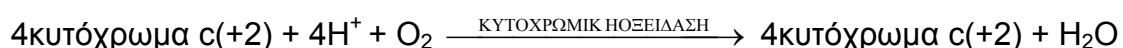


Οι καταλάσες είναι πρωτεΐνες που καταλύουν την μετατροπή δύο μορίων του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο.



Και τα δύο ένζυμα είναι πολύ σημαντικά και ευρέως διαδεδομένα. Κύριος ρόλος τους είναι να προστατεύουν τους ζώντες οργανισμούς από την δημιουργία επικίνδυνων συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου που θα είχε ως συνέπεια την μερική αναγωγή του O<sub>2</sub>. Ένα προϊόν μερικής αναγωγής του O<sub>2</sub> είναι και το υπεροξειδικό ανιόν (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).

Η κυτοχρωμική οξειδάση είναι ένα ένζυμο, το οποίο συμμετέχει στην αναπνευστική αλυσίδα. Περιέχει δύο ομάδες αίμης A και δύο ιόντα χαλκού. Καταλύει την μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ανηγμένο κυτόχρωμα c προς το μοριακό οξυγόνο το οποίο αποτελεί τον τελικό αποδέκτη κατά την διαδικασία αυτή.



Το κυτόχρωμα P450 είναι ένα κυτόχρωμα τύπου β το οποίο περιέχει σαν προσθετική ομάδα σίδηρο-πρωτοπορφυρίνη IX. Ο σίδηρος(III) που



υπάρχει είναι είτε σε χαμηλού spin μορφή με αριθμό συναρμογής έξι, είτε σε υψηλού spin μορφή με αριθμό συναρμογής πέντε. Είναι μέλος της ομάδας των ενζύμων που καταλύουν την προσθήκη μοριακού οξυγόνου στο υπόστρωμα με ενεργοποίηση αυτού. Αποτελεί μέρος του συστήματος αποτοξίνωσης του σώματος υδροξυλιώνοντας ενώσεις που τις κάνει περισσότερο διαλυτές στο νερό.

### **3.1.5 Σκοπός εργασίας**

Επομένως ο στόχος αυτής της εργασίας ήταν να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες για την ακινητοποίηση της αιμίνης μεταξύ των στρωμάτων του LDH. Η ιδέα για την εισαγωγή της ένωσης αυτής μεταξύ των στρωμάτων του LDH στηρίχθηκε στο γεγονός ότι η αιμίνη περιέχει σίδηρο στην οξειδωτική κατάσταση +3, η αναγωγή του οποίου οδηγεί στην αίμη, η οποία αποτελεί προσθετική ομάδα πολλών βιολογικών μορίων. Έτσι το υβρίδιο που συντέθηκε έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σαν μοντέλο μελέτης αυτών των συστημάτων σε συνθήκες βέβαια που μοιάζουν με αυτές που επικρατούν στα βιολογικά συστήματα. Η επιτυχία της ακινητοποίησης διαπιστώθηκε με την χρήση φασματοσκοπιών IR και XRD. Στην συνέχεια μελετήθηκε η συμπεριφορά του υβριδίου με φασματοσκοπία ορατού σε διάφορα pH, υπό την παρουσία αναγωγικού αντιδραστηρίου καθώς και η ικανότητα της ακινητοποιημένης αιμίνης να δεσμεύσει κυάνιο όλα αυτά πάντα σε σύγκριση με την ελεύθερη αιμίνη.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 3.2.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (LDH)

Η σύνθεση των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων πραγματοποιείται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο όπως γίνεται και η σύνθεση στο πειραματικό μέρος της ενότητας με την πρωτοπορφυρίνη IX. (βλέπε τμήμα 2.2.1 σελ.29)

### 3.2.2 Σύνθεση LDH-αιμίνη

Σε σφαιρική φιάλη των 250 ml, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 44 ml απαερωμένου H<sub>2</sub>O και 50 ml πυριδίνης. Στην διάλυμα που προκύπτει προσθέτουμε 0,2 gr αιμίνης (2 mM). Το διάλυμα αναδεύεται, ενώ γίνεται χρήση υπερήχων για την καλύτερη διάλυση της ουσίας. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,5 οπότε το διάλυμα αποκτά σκούρο κόκκινο χρώμα και φαίνεται αρκετά διαυγές.

Απαερώνεται πάλι το διάλυμα για άλλα 20 min και στην συνέχεια προστίθενται 6 ml διαλύματος LDH. Το διάλυμα απαερώνεται για άλλα 30 min και τελικά η φιάλη σφραγίζεται και αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 μέρες.

Το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 min στις 12000 g. Το υπερκείμενο έχει αρκετά κόκκινο χρώμα γεγονός που αποδεικνύει την μερική δέσμευση της αιμίνης. Πραγματοποιούμε τρεις εκπλύσεις με τον διαλύτη που χρησιμοποιήσαμε στην αντίδραση. Τα υγρά των εκπλύσεων έχουν πολύ ελαφρύ κόκκινο χρώμα που εξασθενεί με την πάροδο των εκπλύσεων, ενώ το ίζημα έχει σκούρο πράσινο χρώμα. Το διάλυμα που προκύπτει διηθείται υπό κενό και το πράσινο ίζημα που προκύπτει αφήνεται να ξηρανθεί στο αέρα.

Το υβρίδιο, το οποίο έχουμε συνθέσει μελετάται φασματοσκοπικά με την χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR) και περίθλασης ακτίνων X (XRD).

### 3.2.3 Μελέτη υβριδίου LDH–αιμίνη με φασματοσκοπία EPR

Το υβρίδιο που συντέθηκε μελετάται με την χρήση φασματοσκοπίας EPR για να διαπιστωθεί αν οι υποκαταστάτες που έχουν συναρμοστεί στον σίδηρο της αιμίνης διατηρούν την αξονική τους συμμετρία. Το φάσμα ελήφθη σε θερμοκρασία δωματίου και το υβρίδιο LDH-αιμίνη βρισκόταν σε στερεή κατάσταση σε μορφή λεπτής σκόνης.

### 3.2.4 Μελέτη ελεύθερης και δεσμευμένης αιμίνης με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV – VIS)

Σε μίγμα πυριδίνης – H<sub>2</sub>O με αναλογία 1/1 διαλύεται μικρή ποσότητα ελεύθερης και δεσμευμένης αιμίνης. Αφού ληφθούν τα φάσματα στην περιοχή από 350 – 650 nm μελετήθηκαν οι αλλαγές που συμβαίνουν σε αυτά κάτω από διάφορες συνθήκες όπως η αλλαγή του pH, η προσθήκη αναγωγικού (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), η προσθήκη NaCN και η διοχέτευση ρεύματος O<sub>2</sub>.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Σε 10 ml μίγματος 1/1 πυριδίνης/H<sub>2</sub>O διαλύεται 1 mgr ελεύθερης ή δεσμευμένης αιμίνης. Λαμβάνονται 2 ml από το παραπάνω παρασκεύασμα και αραιώνονται στα 6 ml με διαλύτη. Μετράται το pH του διαλύματος που είναι περίπου 9 και ρυθμίζεται στο 7,5 με προσθήκη οξέος. Μετά την λήψη του φάσματος ορατού στην περιοχή από 350 – 650 nm, γίνονται οι διάφορες προσθήκες.

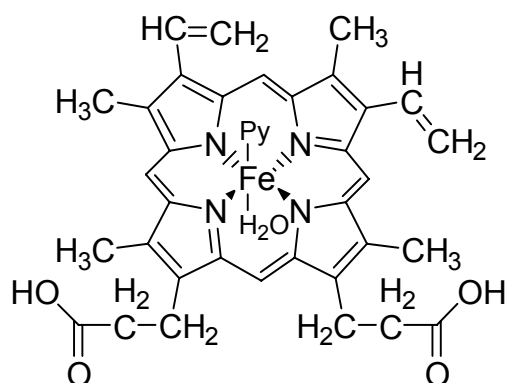
- Τα διαλύματα βάσης και οξέος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολύ αραιά, αφού το pH των διαλυμάτων αλλάζει πολύ εύκολα.
- Το διάλυμα που αναγωγικού που προστίθεται, παρασκευάζεται με προσθήκη Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε H<sub>2</sub>O σε συγκέντρωση 20 mM.
- Το διάλυμα του NaCN που προστίθεται, παρασκευάζεται με προσθήκη NaCN σε H<sub>2</sub>O σε συγκέντρωση 50 mM.

## ΑΝΑΛΥΣΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### 3.3.1 Σύνθεση υβριδίου LDH-αιμίνη

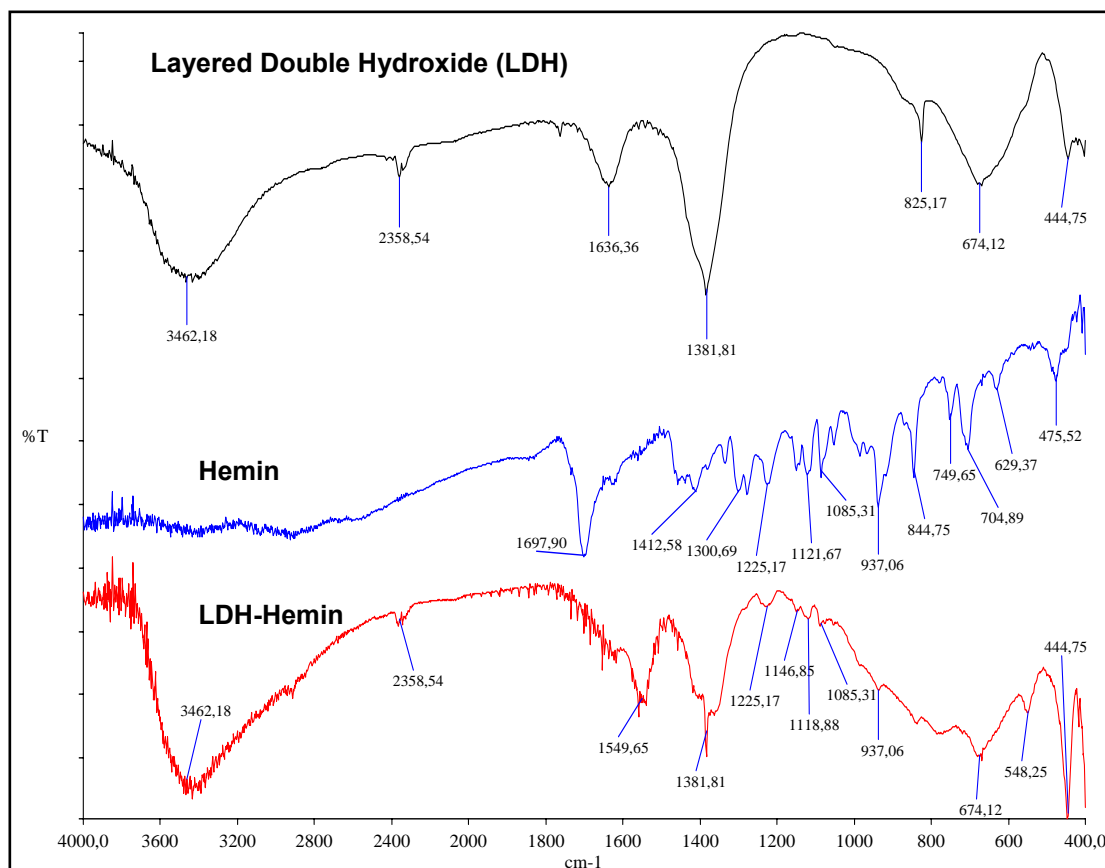
Κατά την σύνθεση του υβριδίου δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες όσο αφορά τον διαλύτη μέσα στο οποίο θα γινόταν η αντίδραση. Έτσι αρχικά δοκιμάστηκε ως διαλύτης το  $H_2O$  και η αιθανόλη. Στο νερό η αιμίνη δεν διαλυόταν πολύ καλά με αποτέλεσμα να υπάρχει ο κίνδυνος να μην μπορεί να εισαχθεί μεταξύ των στρωμάτων του LDH, ενώ στην αιθανόλη διαλυόταν αρκετά καλά, αλλά μετά το τέλος της αντίδρασης το υπερκείμενο είχε σκούρο πράσινο χρώμα και το LDH κατά την διάρκεια των εκπλύσεων αποχρωματιζόταν συνεχώς με αποτέλεσμα στο τέλος να αποκτήσει το αρχικό του λευκό χρώμα κάτι το οποίο αποδεικνύει ότι η αιμίνη δεν δεσμεύεται αρκετά ισχυρά στο LDH όταν χρησιμοποιηθεί η αιθανόλη ως διαλύτης της αντίδρασης. Εξαιτίας των παραπάνω συνθηκών αποφασίστηκε να δοκιμασθεί ως διαλύτης της αντίδρασης μίγμα πυριδίνης/ $H_2O$ . Δοκιμάστηκαν διάφορες αναλογίες των δύο διαλυτών, αλλά αυτή με την οποία επιτύχαμε την καλύτερη εισαγωγή της αιμίνης μέσα στα στρώματα του LDH ήταν η αναλογία 1/1.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία όταν η αιμίνη διαλυθεί σε μίγμα πυριδίνης/ $H_2O$  σε οποιαδήποτε αναλογία, συναρμόζεται στο σίδηρο της αιμίνης ένα μόριο  $H_2O$  και ένα μόριο πυριδίνης.<sup>77</sup> Η αιμίνη δηλαδή αμέσως μόλις διαλυθεί μέσα στο διαλύτη υπάρχει σε μεγαλύτερο ποσοστό με την μορφή που φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί και με αυτή εισάγεται και μεταξύ των στρωμάτων του LDH.



**Σχήμα 25.** Δομή της αιμίνης αμέσως μετά την διάλυση αυτής σε μίγμα πυριδίνης/ $H_2O$  σε αναλογία 1/1.

Μετά το τέλος της αντίδρασης το υβρίδιο, το οποίο παρασκευάστηκε μελετήθηκε φασματοσκοπικά. Στο φάσμα IR που ακολουθεί φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της αιμίνης, οι οποίες υπάρχουν στο φάσμα τόσο της ελεύθερης όσο και της δεσμευμένης στο LDH.

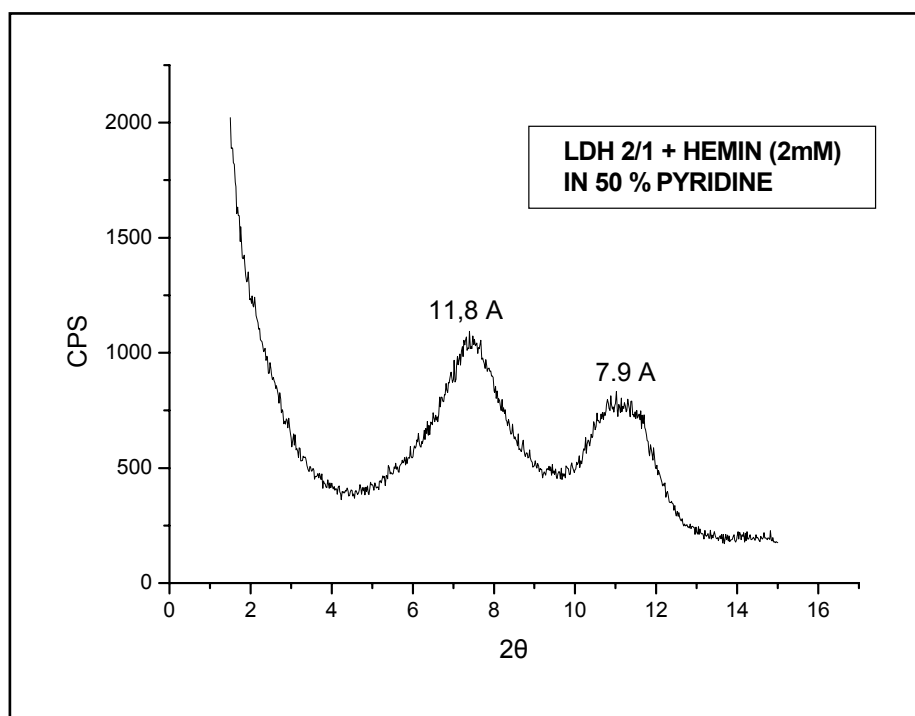


**Σχήμα 26.** Φάσματα υπερύθρου του LDH, της αιμίνης, και του υβριδίου LDH-αιμίνη

Παρατηρώντας το φάσμα της ελεύθερης αιμίνης μπορούμε να δούμε τις κορυφές στους 937, 1412 και 1697 cm<sup>-1</sup>, οι οποίες οφείλονται στην ύπαρξη της καρβοξυλικής ομάδας στην ένωση, ενώ οι υπόλοιπες κορυφές στην περιοχή από του 676 μέχρι 1225 cm<sup>-1</sup> οφείλονται στις μεθυλικές και βινυλικές ομάδες της αιμίνης καθώς στους πυρρολικούς δακτυλίους αυτής. Οι κορυφές της πυριδίνης εμφανίζονται στις περιοχές 1150–1190 και 1230–1320 cm<sup>-1</sup> σύμφωνα με την βιβλιογραφία. και στο φάσμα του υβριδίου δεν είναι αρκετά ευδιάκριτες. Η ένταση των κορυφών στο φάσμα του υβριδίου είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με το φάσμα της ελεύθερης αιμίνης γεγονός το οποίο οφείλεται στο ότι η συγκέντρωση της αιμίνης κατά την αντίδραση ήταν

αρκετά μικρή με αποτέλεσμα το ποσοστό της αιμίνης που έχει δεσμευθεί στον πηλό να είναι αρκετά μικρό.

Το γεγονός ότι υπάρχουν στο φάσμα του υβριδίου οι κορυφές τόσο του LDH όσο και της αιμίνης μας πληροφορεί ότι στο LDH έχει πραγματοποιηθεί η δέσμευση αυτής χωρίς όμως να γνωρίζουμε αν η δέσμευση έχει γίνει εσωτερικά ή εξωτερικά των στρωμάτων αυτού. Την πληροφορία αυτή μας την δίνει το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X της ένωσης.



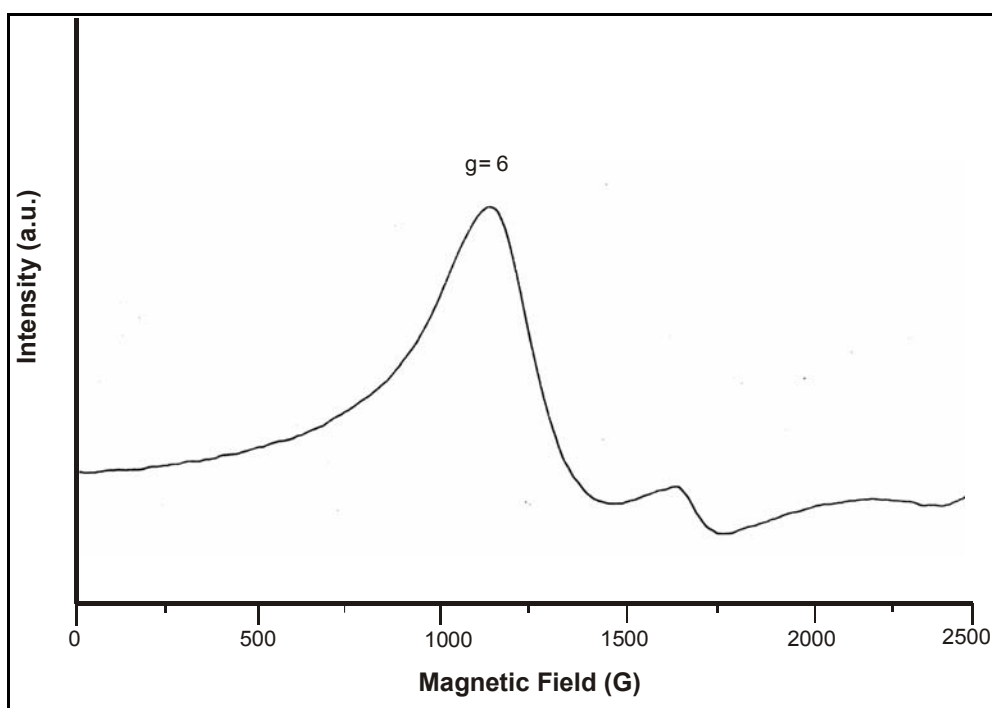
**Σχήμα 27.** Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του υβριδίου LDH-αιμίνη.

Η αρχική απόσταση των στρωμάτων του LDH όταν βρίσκεται στο εσωτερικό τους  $\text{NO}_3^-$  είναι  $8,66 \text{ \AA}$ , ενώ μετά την προσθήκη της αιμίνης στην οποία έχουν συναρμοστεί ένα μόριο πυριδίνης και ένα μόριο  $\text{H}_2\text{O}$  αυξάνεται στα  $11,8 \text{ \AA}$  κάτι το οποίο αποδεικνύει ότι η αιμίνη έχει εισαχθεί στο εσωτερικό των στρωμάτων του LDH με αποτέλεσμα την διάνοιξη αυτών. Το διάστημα μεταξύ των στρωμάτων του LDH διαφέρει σε σχέση με το διάστημα που βρήκαμε για την πρωτοπορφυρίνη IX παρότι η δομή των δύο ενώσεων είναι παρόμοια και διαφέρει μόνο στην ύπαρξη του μετάλλου που είναι συναρμοσμένο με τα άτομα του αζώτου της πορφυρίνης. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο σταθεροποίησης της αιμίνης μεταξύ των

στρωμάτων του LDH σε σχέση με την πρωτοπορφυρίνη IX, δηλαδή τον τρόπο που αλληλεπιδρά αυτή με τα θετικά φορτισμένα στρώματα του πηλού καθώς και στην διαφορετική διεύθυνση των μορίων της αιμίνης μεταξύ τους εντός των στρωμάτων του LDH. Το γεγονός ότι οι κορυφές δεν είναι αρκετά οξείες οφείλεται στην ανομοιόμορφη διάταξη των μορίων της πρωτοπορφυρίνης IX στο εσωτερικό των στρωμάτων του LDH με αποτέλεσμα το δίκτυο των στρωμάτων να μην είναι πολύ καλά οργανωμένο.

### 3.3.2 Μελέτη υβριδίου LDH-αιμίνη με φασματοσκοπία EPR

Το φάσμα EPR του υβριδίου που ελήφθη φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί:



**Σχήμα 28.** Φάσμα EPR του υβριδίου LDH-αιμίνη.

Το βασικό συμπέρασμα που προκύπτει από το παραπάνω φάσμα συγκρινόμενο με την βιβλιογραφία<sup>26</sup> είναι ότι οι δύο υποκαταστάτες της αιμίνης(πυριδίνη, νερό) που έχουν συναρμοστεί με αυτή αμέσως μετά την διάλυση της σε μίγμα πυριδίνης/H<sub>2</sub>O με αναλογία 1/1, μετά την ακινητοποίηση της αιμίνης μεταξύ των στρωμάτων του LDH διατηρούν την αξονική τους συμμετρία λαμβάνοντας την τιμή  $g=6$ . Η ύπαρξη του τυπικού Fe(III) EPR

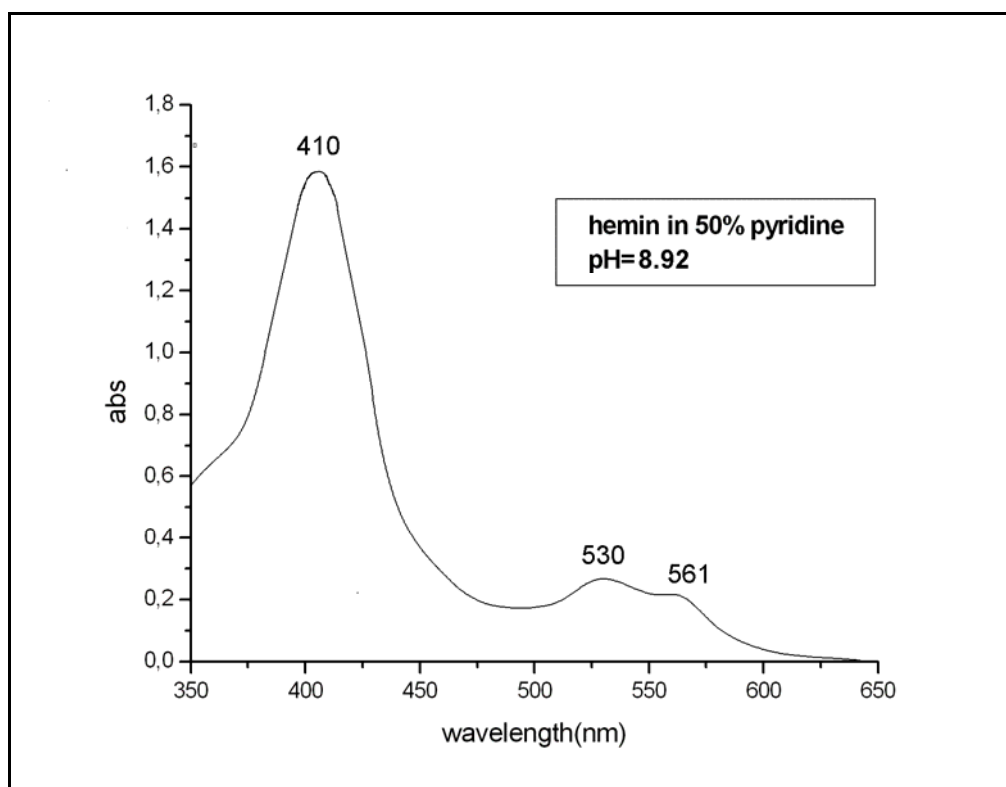
σήματος επιβεβαιώνει ότι κατά την διάρκεια της διαδικασίας της ακινητοποίησης δεν συνέβει απομετάλλωση της πορφυρίνης.<sup>78,79</sup>

### 3.3.3 Μελέτη αιμίνης, υβριδίου LDH–αιμίνη με φασματοσκοπία ορατού

#### α. Φάσματα σε διάφορα pH

##### Φάσμα αιμίνης

Διαλύεται μικρή ποσότητα αιμίνης σε μίγμα 50 % πυριδίνη σε νερό. Λαμβάνεται φάσμα ορατού αυτής στην περιοχή από 350 – 650 nm.



**Σχήμα 29.** Φάσμα ορατού της αιμίνης

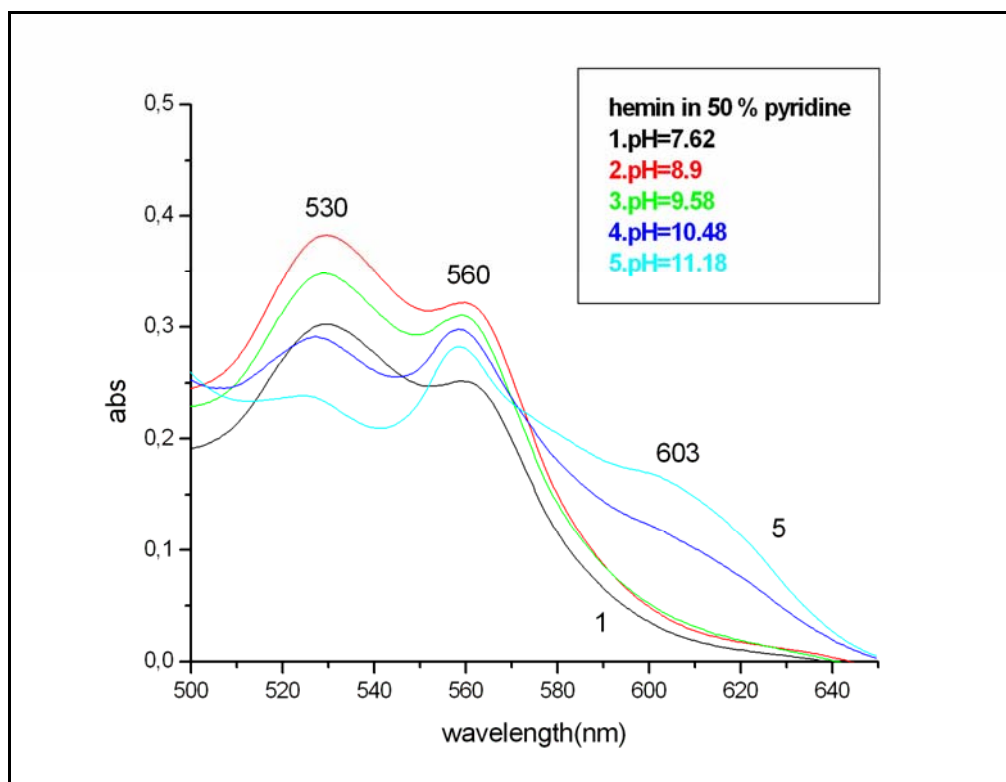
Οι κορυφές εμφανίζονται στα εξής μήκη κύματος : 410 , 530 , 561 nm.

Το pH του διαλύματος μετά την διάλυση της αιμίνης είναι 8.92.

Προσθέτοντας οξύ στο διάλυμα οι κορυφές παραμένουν στα ίδια μήκη κύματος. Προσθέτοντας βάση αλλάζει η αναλογία των κορυφών στα 530 , 561 nm και αρχίζει να εμφανίζεται ένας ώμος λίγο πάνω από τα 600 nm, ο οποίος αυξάνεται όσο αυξάνεται το pH. Η βασική κορυφή δεν μετατοπίζεται



και παραμένει στα 410 nm. Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται αυτές οι μεταβολές στην περιοχή από 500 – 650 αυξάνοντας το pH.



**Σχήμα 30.** Φάσμα ορατού της αιμίνης σε διάφορα pH.

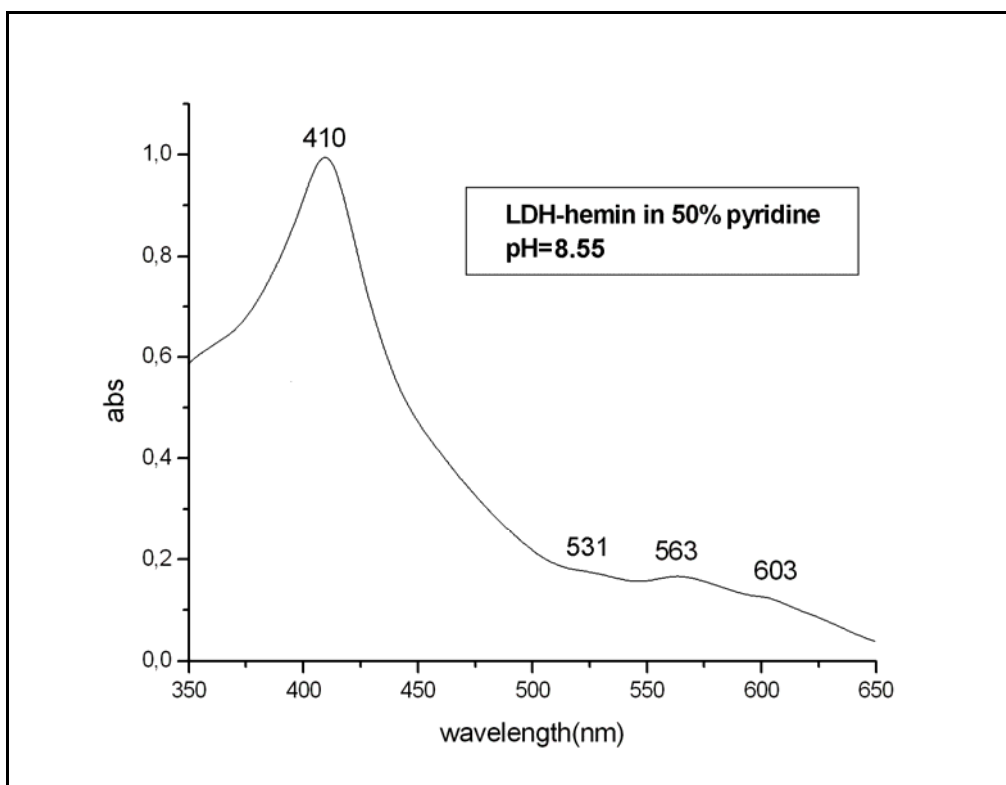
#### Φάσμα LDH – αιμίνης

Διαλύεται μικρή ποσότητα υβριδίου LDH - αιμίνης σε μίγμα 50 % πυριδίνη σε νερό. Λαμβάνεται φάσμα ορατού αυτού στην περιοχή από 350 – 650 nm (σχήμα 31).

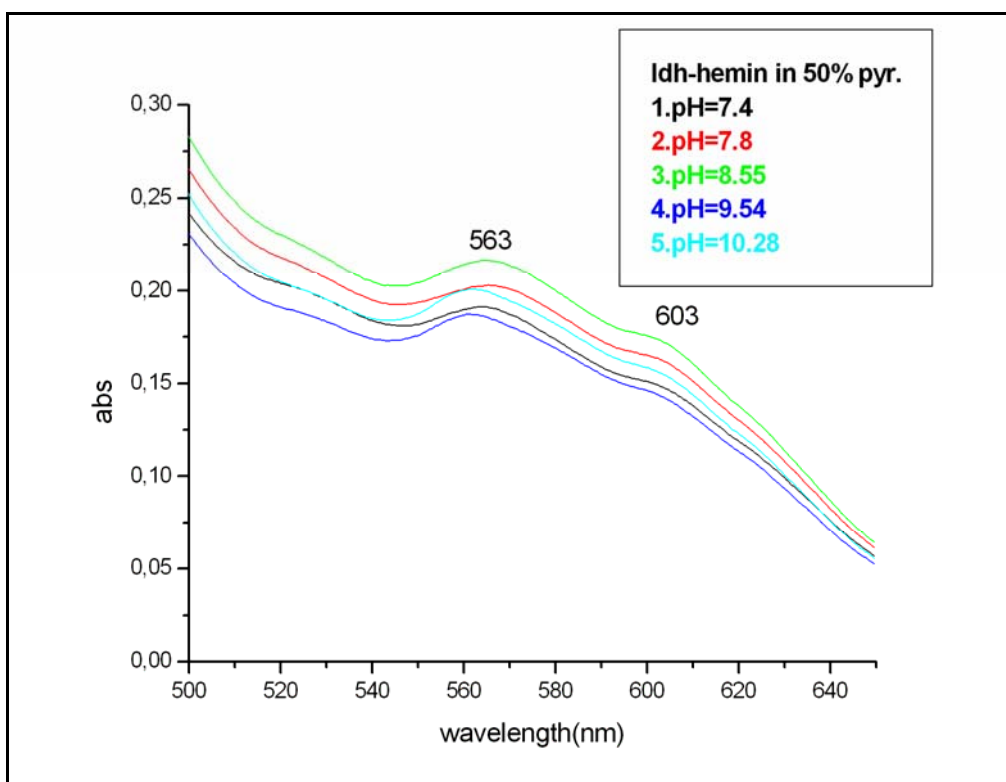
Οι κορυφές εμφανίζονται στα εξής μήκη κύματος : 410 , 531, 563 , 603 nm.

Το pH του διαλύματος μετά την διάλυση του υβριδίου είναι 8.55.

Προσθέτοντας οξύ ή βάση το φάσμα δεν αλλάζει αισθητά στην περιοχή από 500 – 650 nm. Αυτή η περιοχή του φάσματος μοιάζει αρκετά με την περιοχή του φάσματος της αιμίνης σε υψηλά pH. Η βασική κορυφή παραμένει στα ίδια μήκη κύματος μέχρι το pH =10, αλλά από εκεί και πάνω και όσο αυξάνεται το pH μετατοπίζεται στα 415 nm. Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται πως αλλάζει το φάσμα του υβριδίου όταν αυξάνεται το pH στην περιοχή από 500 – 650 nm.



**Σχήμα 31.** Φάσμα ορατού του υβριδίου LDH – αιμίνη.



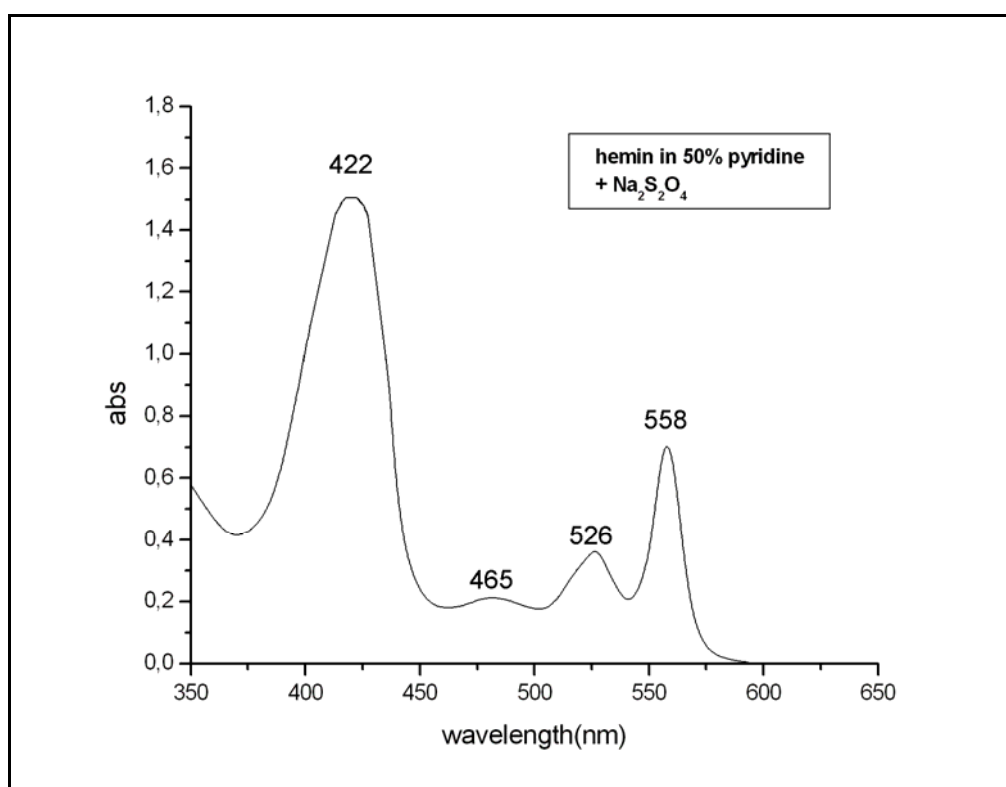
**Σχήμα 32.** Φάσμα ορατού του υβριδίου LDH – αιμίνη σε διάφορα pH.

Από την μελέτη των δύο φασμάτων προκύπτει ότι το φάσμα της αιμίνης δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές μετά την εισαγωγή της στο LDH. Οι βασικές κορυφές διατηρούνται στα ίδια μήκη κύματος, ενώ ο ώμος που εμφανίζει το φάσμα του υβριδίου οφείλεται στην αλλαγή του χρώματος αυτού σε σχέση με το χρώμα της ελεύθερης αιμίνης.

### β. Φάσματα μετά την προσθήκη του αναγωγικού $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

#### Φάσμα αιμίνης

Διαλύεται μικρή ποσότητα αιμίνης σε μίγμα 50 % πυριδίνη σε νερό. Αφού ρυθμιστεί το pH στο 7,5 με την προσθήκη μικρής ποσότητας οξέος, προστίθεται διάλυμα του αναγωγικού  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (20 mM). Λαμβάνεται φάσμα ορατού στην περιοχή από 350 – 650 nm.



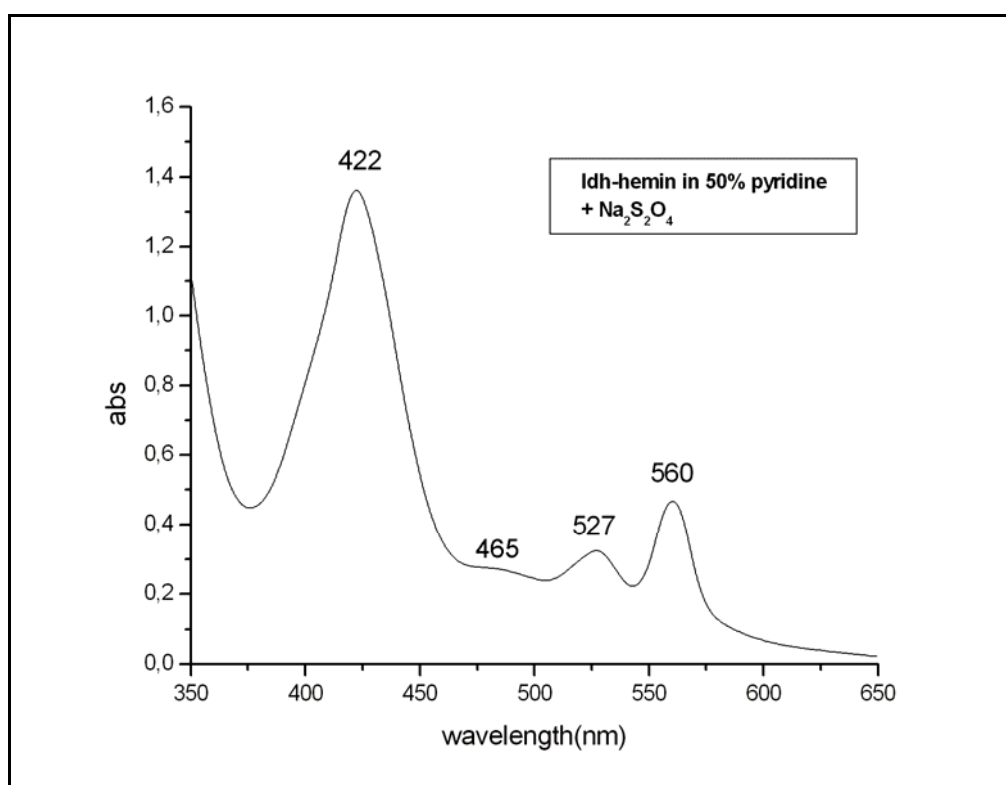
**Σχήμα 33.** Φάσμα ορατού της ελεύθερης αιμίνης μετά την προσθήκη του αναγωγικού  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ .

Οι κορυφές εμφανίζονται στα εξής μήκη κύματος : 422, 465, 526, 558 nm.

Κατά την προσθήκη του αναγωγικού αλλάζει η αναλογία των κορυφών στην περιοχή 530 – 560 nm σε σχέση με το φάσμα της αιμίνης πριν την προσθήκη του αναγωγικού, ενώ εμφανίζεται και μία νέα κορυφή στα 465 nm. Η βασική κορυφή μετατοπίζεται από τα 410 περίπου στα 422 nm λόγω της αναγωγής του σιδήρου από την οξειδωτική βαθμίδα +3 στην +2.

#### Φάσμα LDH – αιμίνης

Διαλύεται μικρή ποσότητα υβριδίου LDH - αιμίνης σε μίγμα 50 % πυριδίνη σε νερό. Αφού ρυθμιστεί το pH στο 7,5 με την προσθήκη μικρής ποσότητας οξέος, προστίθεται διάλυμα του αναγωγικού  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (20 mM), ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία όπως και με την ελεύθερη αιμίνη λαμβάνεται φάσμα ορατού στην περιοχή από 350 – 650 nm.



**Σχήμα 34.** Φάσμα ορατού του υβριδίου LDH – αιμίνη μετά την προσθήκη του αναγωγικού  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ .

Οι κορυφές εμφανίζονται στα εξής μήκη κύματος : 422, 465, 527 , 560 nm.

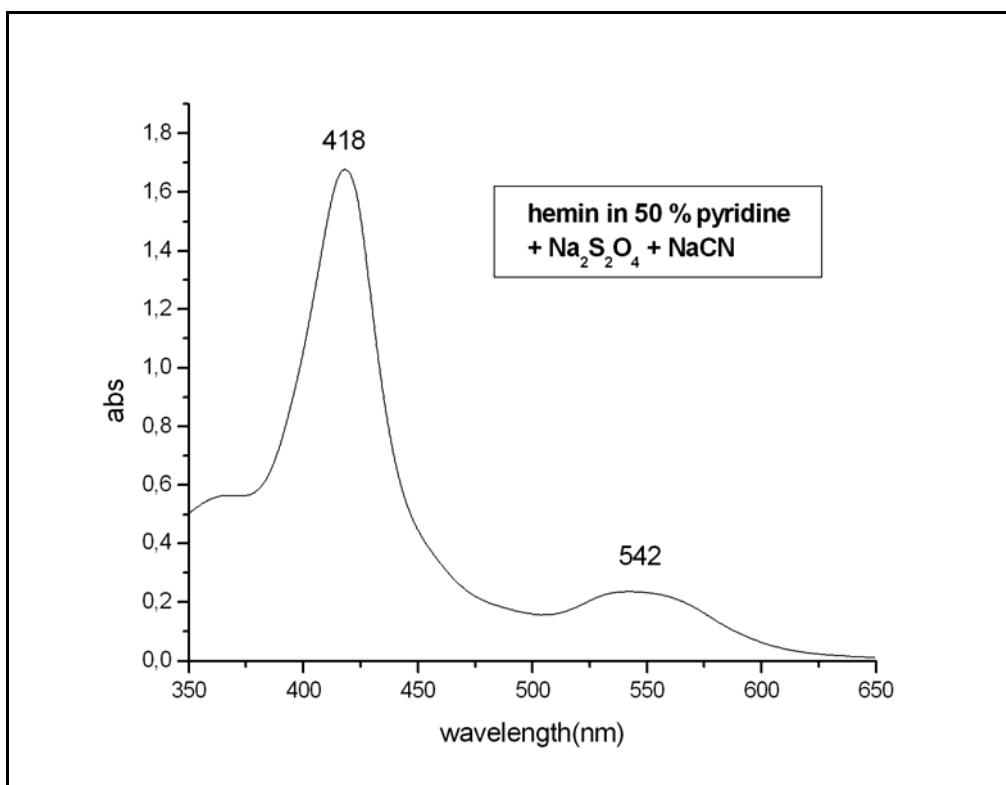
Κατά την προσθήκη του αναγωγικού εξαφανίζεται ο ώμος στα 600 nm που υπήρχε στο φάσμα του υβριδίου πριν την προσθήκη του αναγωγικού (σχήμα 31), ενώ εμφανίζονται δύο κορυφές στα 527 , 560 nm ίδιες με αυτές της ελεύθερης αιμίνης και μία ευρεία κορυφή περίπου στα 465 nm. Η βασική κορυφή μετατοπίζεται όπως και στην ελεύθερη αιμίνη από τα 410 στα 422 nm.

Από την μελέτη των δύο φασμάτων μετά την προσθήκη του αναγωγικού  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αναγωγή του σιδήρου πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο είτε η αιμίνη είναι ελεύθερη είτε είναι δεσμευμένη μεταξύ των στρωμάτων του LDH, παρότι το φάσμα ορατού των δύο ενώσεων είχε κάποιες διαφορές πριν την προσθήκη του αναγωγικού.

#### **γ. Φάσματα μετά την προσθήκη NaCN αφού έχει προστεθεί το αναγωγικό $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$**

##### *Φάσμα αιμίνης*

Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία μέχρι την προσθήκη του αναγωγικού οπότε έχουμε τις κορυφές στα εξής μήκη κύματος: 422 , 465, 526, 558 nm (σχήμα 33). Στο διάλυμα που προκύπτει προστίθεται διάλυμα NaCN (50 mM) με σκοπό να εξετάσουμε αν μπορεί το  $\text{CN}^-$  να αντικαταστήσει έναν από τους δύο υποκαταστάτες (πυριδίνη ή νερό) που έχουν συναρμοστεί στο σίδηρο μετά την διάλυση της αιμίνης στον διαλύτη της αντίδρασης.

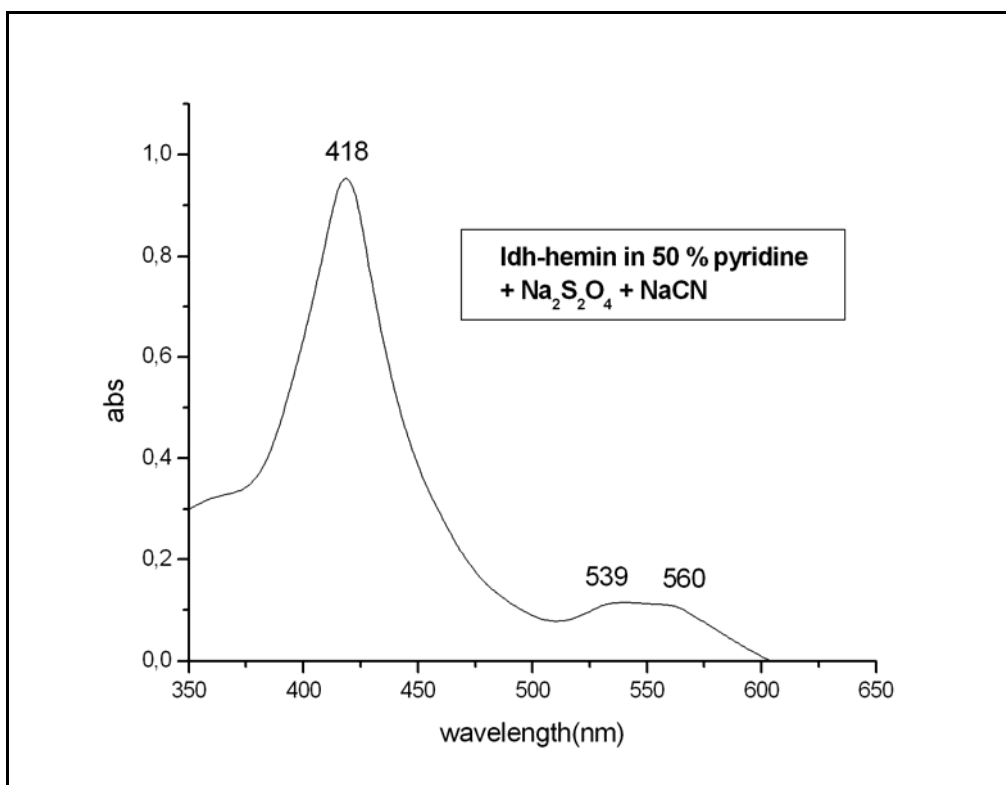


**Σχήμα 35.** Φάσμα ορατού της ελεύθερης αιμίνης μετά την προσθήκη του NaCN αφού έχει γίνει αναγωγή με Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Από το παραπάνω φάσμα προκύπτει ότι αμέσως μετά την προσθήκη του CN<sup>-</sup> η βασική κορυφή μετατοπίζεται στα 418 nm, ενώ οι κορυφές στα 526 και 558nm αντικαθίστανται από μία ευρεία κορυφή στα 542 nm. Στο ίδιο διάλυμα ελήφθη φάσμα με την πάροδο μίας μέρας χωρίς να παρατηρηθεί μετατόπιση κάποιας κορυφής σε σχέση με το αρχικό. Η μόνη διαφορά ήταν ότι οι κορυφές εμφάνιζαν μειωμένη απορρόφηση σε σχέση με αυτό.

#### Φάσμα LDH – αιμίνης

Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία μέχρι την προσθήκη του αναγωγικού οπότε εμφανίζονται οι κορυφές στα εξής μήκη κύματος: 422, 465, 527, 560 nm (σχήμα 34). Στο διάλυμα του υβριδίου που προκύπτει προστίθεται διάλυμα NaCN (50 mM) με σκοπό να εξετάσουμε αν μπορεί το CN<sup>-</sup> να αντικαταστήσει ένα από τους δύο υποκαταστάτες (πυριδίνη ή νερό) που έχουν συναρμοστεί στο σίδηρο μετά την διάλυση του υβριδίου LDH - αιμίνη στον διαλύτη της αντίδρασης.



**Σχήμα 36.** Φάσμα ορατού του υβριδίου LDH – αιμίνη μετά την προσθήκη του NaCN αφού έχει γίνει αναγωγή με Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Από το παραπάνω φάσμα προκύπτει ότι αμέσως μετά την προσθήκη του CN<sup>-</sup> η βασική κορυφή μετατοπίζεται στα 418 nm, ενώ οι κορυφές στα 526.5 και 558nm αντικαθίστανται από μία ευρεία κορυφή περίπου στα 540 nm, η οποία παρουσιάζει δύο ώμους στα 539, 560 nm αντίστοιχα κάτι το οποίο συμφωνεί με την βιβλιογραφία<sup>80</sup>, για την περιοχή εμφάνισης των κορυφών μετά την συναρμογή του κυανίου στο σίδηρο της αιμίνης. Στο ίδιο διάλυμα ελήφθη φάσμα με την πάροδο μίας μέρας χωρίς να παρατηρηθεί μετατόπιση κάποιας κορυφής σε σχέση με το αρχικό απλά οι κορυφές εμφάνιζαν μειωμένη απορρόφηση σε σχέση με αυτό.

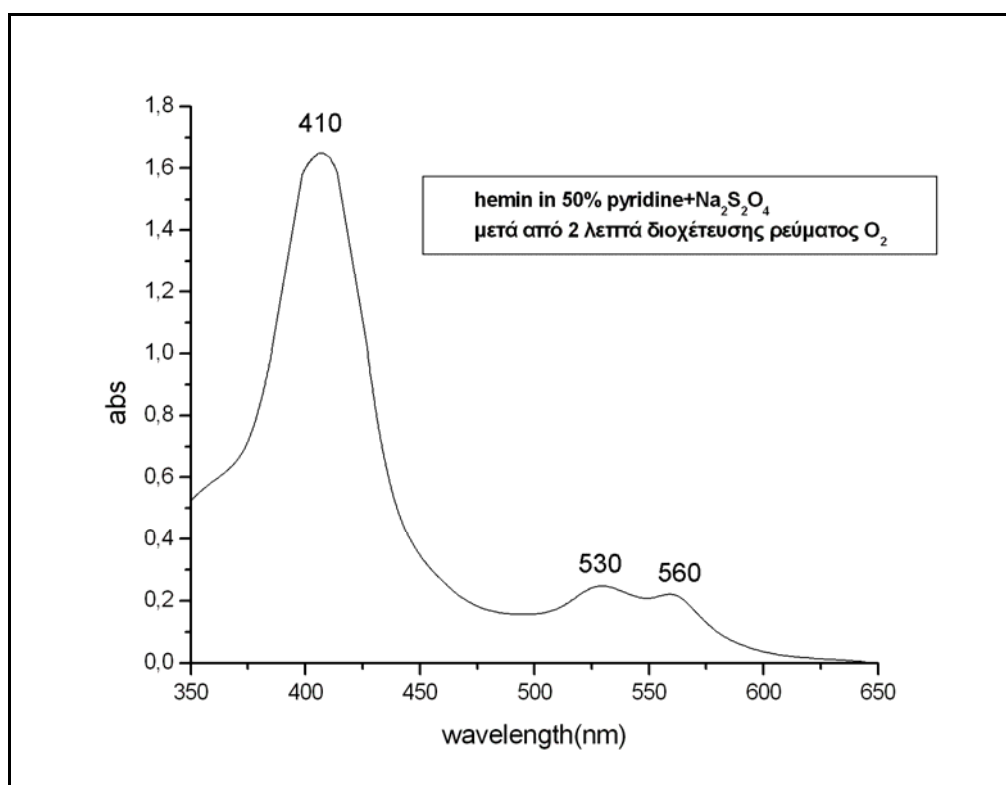
Από την μελέτη των δύο φασμάτων μετά την προσθήκη του NaCN, αφού έχει πραγματοποιηθεί η αναγωγή του σιδήρου από την οξειδωτική βαθμίδα +3 στην +2 με Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> προκύπτει το συμπέρασμα ότι το CN<sup>-</sup> λόγω της μεγαλύτερης δραστηριότητας που διαθέτει αντικαθιστά το μόριο του H<sub>2</sub>O ή του OH<sup>-</sup> που υπάρχει ως έκτος υποκαταστάτης συναρμοσμένος στο σίδηρο καθώς η πυριδίνη συναρμόζεται πολύ πιο ισχυρά με το σίδηρο σύμφωνα με την φασματοχημική σειρά των υποκαταστατών. Καθώς τα δύο φάσματα είναι

παρόμοια καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η διαδικασία αυτή γίνεται με τον ίδιο τρόπο τόσο στην ελεύθερη όσο και στην δεσμευμένη αιμίνη. Τα σύμπλοκα που δημιουργούνται και στις δύο περιπτώσεις είναι ιδιαίτερα σταθερά και δεν αλλάζουν με την πάροδο του χρόνου.

#### δ. Φάσματα μετά την προσθήκη του αναγωγικού $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ και διοχετεύοντας ρεύμα $\text{O}_2$

##### Φάσμα αιμίνης

Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία μέχρι την προσθήκη του αναγωγικού οπότε έχουμε τις κορυφές στα εξής μήκη κύματος: 422 , 465, 526, 558 nm (σχήμα 33). Αμέσως μετά την αναγωγή του σιδήρου της αιμίνης με την προσθήκη  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  διοχετεύουμε ρεύμα  $\text{O}_2$  για 2 λεπτά. Λαμβάνεται φάσμα ορατού στην περιοχή από 350 – 650 nm.



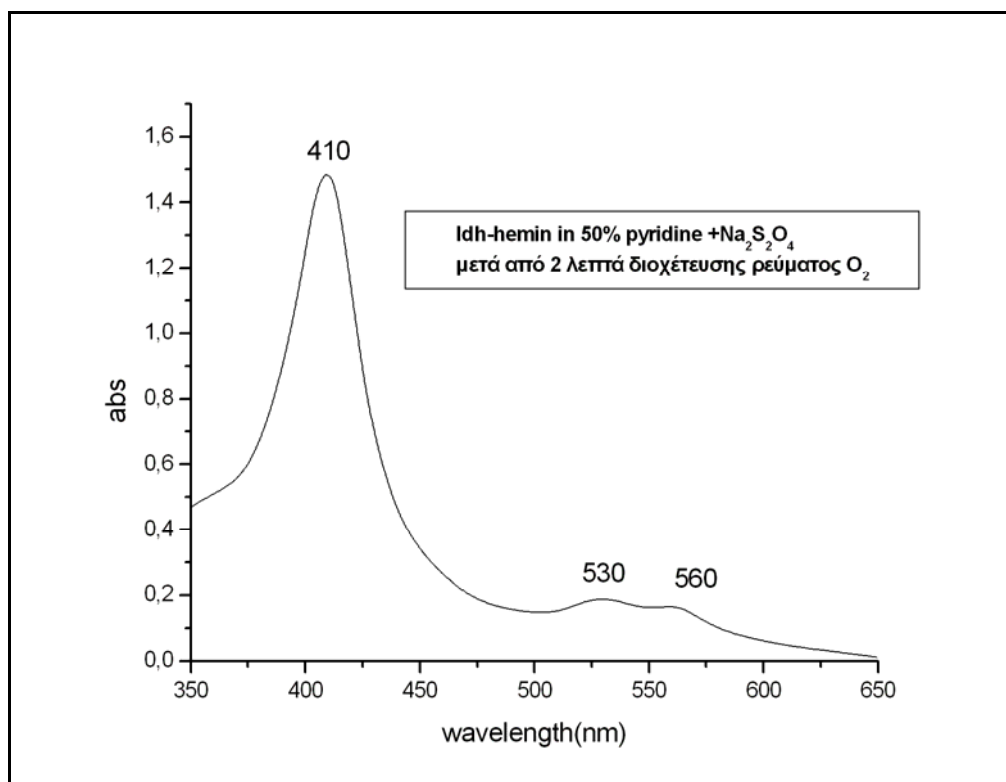
**Σχήμα 37.** Φάσμα ορατού της ελεύθερης αιμίνης μετά από την διοχέτευση ρεύματος  $\text{O}_2$  για 2 λεπτά, αφού έχει γίνει αναγωγή με  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ .



Μετά την διοχέτευση ρεύματος  $O_2$  αλλάζει και πάλι η αναλογία των κορυφών στην περιοχή ανάμεσα στα 530 – 560 nm, ενώ η βασική κορυφή επιστρέφει στο αρχικό μήκος κύματος. Συγκρίνοντας το φάσμα αυτό σε σχέση με το φάσμα της αιμίνης αμέσως μόλις διαλυθεί στο διαλύτη της αντίδρασης φαίνεται σαν η διαδικασία αυτή να αναστέλλει την δράση του αναγωγικού πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με αν το αφήναμε να επαναοξειδωθεί από μόνο στο περιβάλλον.

#### Φάσμα LDH – αιμίνης

Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία μέχρι την προσθήκη του αναγωγικού οπότε έχουμε τις κορυφές στα εξής μήκη κύματος: 422, 465, 527, 560 nm (σχήμα 34). Αμέσως μετά την αναγωγή του σιδήρου της αιμίνης που είναι δεσμευμένη στο LDH διαβιβάζεται στο διάλυμα ρεύμα  $O_2$  για 2 λεπτά. Λαμβάνεται φάσμα ορατού στην περιοχή από 350 – 650 nm.



**Σχήμα 38.** Φάσμα ορατού του υβριδίου LDH – αιμίνη μετά από την διοχέτευση ρεύματος  $O_2$  για 2 λεπτά, αφού έχει γίνει αναγωγή με  $Na_2S_2O_4$ .

Μετά την διοχέτευση ρεύματος  $O_2$  αλλάζει και πάλι η αναλογία των κορυφών στην περιοχή ανάμεσα στα 530 – 560 nm, ενώ η βασική κορυφή

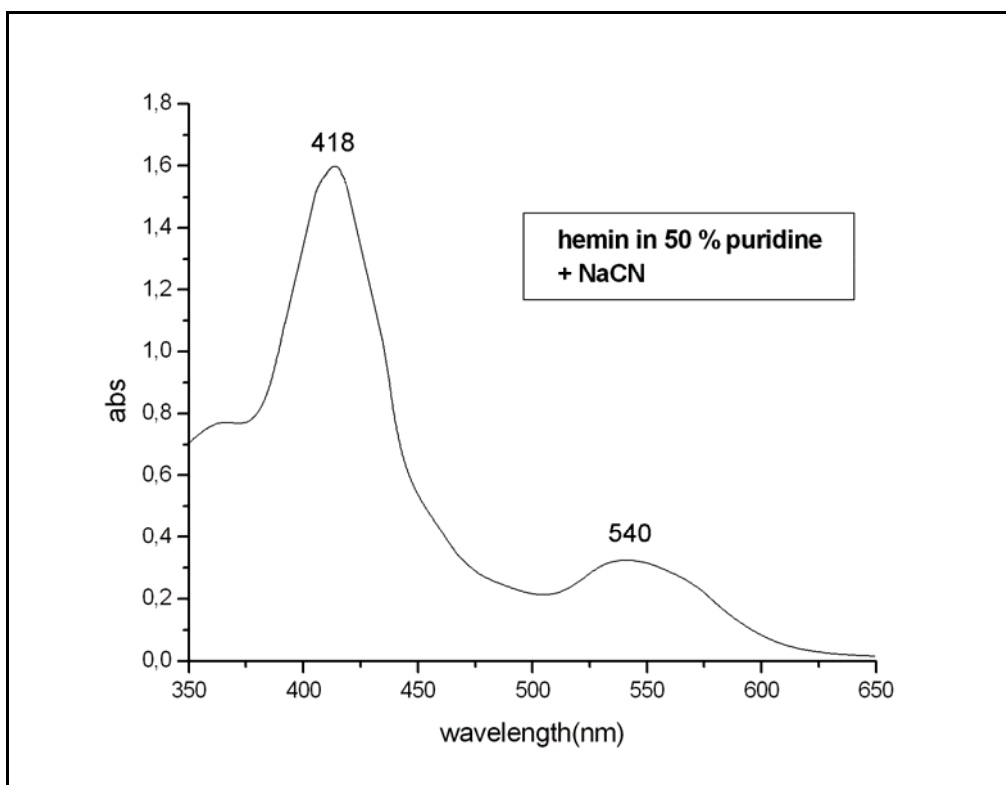
επιστρέφει στο αρχικό μήκος κύματος όπως ακριβώς συμβαίνει και με το φάσμα της ελεύθερης αιμίνης.

Από την μελέτη των δύο φασμάτων μετά την διοχέτευση ρεύματος  $O_2$  για 2 λεπτά, αφού έχει πραγματοποιηθεί η αναγωγή του σιδήρου από την οξειδωτική βαθμίδα +3 στην +2 με  $Na_2S_2O_4$  προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα δύο φάσματα μοιάζουν να είναι ακριβώς τα ίδια. Η διοχέτευση του ρεύματος οξυγόνου προκαλεί την επανοξείδωση του σιδήρου πολύ πιο γρήγορα από ότι αυτό θα γινόταν αν αφήναμε το σίδηρο να οξειδωθεί από μόνος του στο περιβάλλον με αποτέλεσμα το φάσμα να επανέρχεται στην αρχική του μορφή αυτή δηλαδή μετά την διάλυση της αιμίνης ή του υβριδίου στο διαλύτη της αντίδρασης. Εκτός αυτού παρατηρήθηκε ότι το οξυγόνο δε δεσμεύεται στον σίδηρο, αλλά προκαλεί την οξείδωση αυτού στην οξειδωτική βαθμίδα +3, όπως προκύπτει από τα φασματοσκοπικά δεδομένα.

#### **ε. Φάσματα μετά την προσθήκη NaCN**

##### *Φάσμα αιμίνης*

Διαλύεται μικρή ποσότητα αιμίνης σε μίγμα 50 % πυριδίνη σε νερό. Αφού ρυθμιστεί το pH στο 7,5 με την προσθήκη μικρής ποσότητας οξέος, προστίθεται διάλυμα του NaCN (50 mM). Λαμβάνεται φάσμα ορατού στην περιοχή από 350 – 650 nm.



**Σχήμα 39.** Φάσμα ορατού της ελεύθερης αιμίνης μετά την προσθήκη του NaCN.

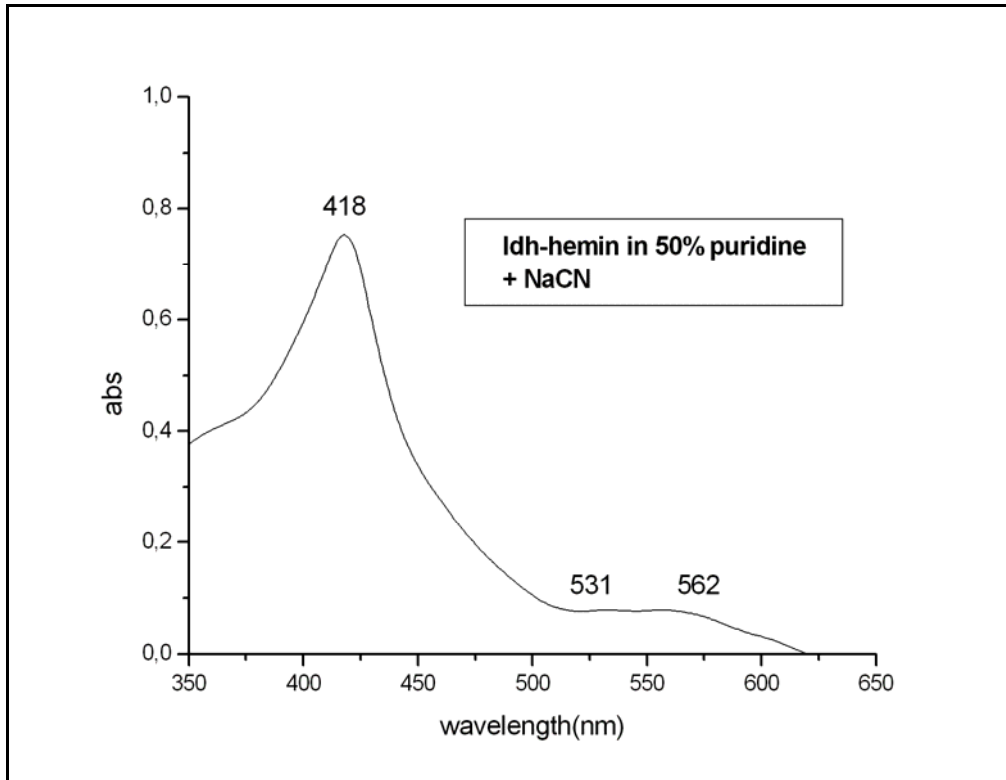
Οι κορυφές εμφανίζονται στα εξής μήκη κύματος : 418 , 540 nm.

Η βασική κορυφή μετατοπίζεται στα 418 nm, ενώ έχουμε και την εμφάνιση μίας ευρείας κορυφής περίπου στα 540 nm. Στο διάλυμα που προκύπτει μετά την προσθήκη του NaCN κάνουμε διάφορες διεργασίες για να μελετηθεί η συμπεριφορά της αιμίνης κάτω από αυτές τις συνθήκες.

- Διοχετεύοντας ένα αργό ρεύμα ξηρού οξυγόνου το φάσμα δεν αλλάζει καθόλου κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι το σύμπλοκο που δημιουργείται μετά την συναρμογή του κυανίου στο σίδηρο της αιμίνης είναι σταθερό με αποτέλεσμα το οξυγόνο που διοχετεύουμε να μην μπορεί να δεσμευθεί πάνω στο σίδηρο και το φάσμα να παραμένει αμετάβλητο.
- Προσθέτοντας το αναγωγικό  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  το φάσμα αλλάζει και μοιάζει με αυτό μετά την προσθήκη του αναγωγικού απευθείας στην αιμίνη, το οποίο αν ληφθεί μετά την πάροδο μίας μέρας φαίνεται να επιστρέφει και να σταθεροποιείται στην μορφή όπου ο σίδηρος βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση +3 και είναι ενωμένος με  $\text{CN}^-$  (418, 540 nm).

### Φάσμα LDH – αιμίνης

Διαλύεται μικρή ποσότητα υβριδίου LDH - αιμίνης σε μίγμα 50 % πυριδίνη. Αφού ρυθμιστεί το pH στο 7,5 με την προσθήκη μικρής ποσότητας οξέος, προστίθεται διάλυμα του NaCN (50 mM). Λαμβάνεται φάσμα ορατού στην περιοχή από 350 – 650 nm.



**Σχήμα 40.** Φάσμα ορατού του υβριδίου LDH – αιμίνη μετά την προσθήκη του NaCN.

Οι κορυφές εμφανίζονται στα εξής μήκη κύματος : 418 , 531 , 562 nm.

Η βασική κορυφή μετατοπίζεται στα 418 nm όπως συμβαίνει και με την ελεύθερη αιμίνη, ενώ εμφανίζεται και μία ευρεία κορυφή στα 540 nm, η οποία παρουσιάζει δύο ώμους στα 531 και 562 nm. Στο διάλυμα που προκύπτει μετά την προσθήκη του NaCN κάνουμε διάφορες διεργασίες για να μελετήσουμε την συμπεριφορά του υβριδίου LDH – αιμίνη στο οποίο έχει δεσμευθεί το CN<sup>-</sup> κάτω από αυτές τις συνθήκες.

- Διοχετεύοντας ένα αργό ρεύμα ξηρού οξυγόνου το φάσμα δεν αλλάζει καθόλου κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι το σύμπλοκο που δημιουργείται μετά την συναρμογή του κυανίου στο σίδηρο της αιμίνης που έχει εισαχθεί στο LDH είναι σταθερό με αποτέλεσμα το οξυγόνο που διοχετεύεται να

μην μπορεί να δεσμευθεί πάνω στο σίδηρο και το φάσμα να παραμένει αμετάβλητο.

- Προσθέτοντας το αναγωγικό  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  αφού έχει γίνει η προσθήκη του  $\text{NaCN}$  η βασική κορυφή μετατοπίζεται στα 423 nm, ενώ έχουμε και άλλες δύο κορυφές στα 527 , 561 nm. Αν το διάλυμα αφεθεί για μία νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου ο σίδηρος επιστρέφει στην οξειδωτική κατάσταση +3 στην οποία ένα  $\text{CN}^-$  έχει συναρμοστεί με αυτόν όπως φαίνεται και από τις κορυφές (418, 542 nm).

Το συμπέρασμα που προκύπτει από την μελέτη των φασμάτων είναι ότι το κυάνιο συναρμόζεται στην αιμίνη παίρνοντας πιθανότατα την θέση του νερού ως 6ο υποκαταστάτη, αφού σύμφωνα με την φασματοχημική σειρά των υποκαταστατών το κυάνιο είναι πολύ πιο δραστικό από το  $\text{H}_2\text{O}$  ή το  $\text{OH}^-$  με αποτέλεσμα να αντικαθίσταται πιο εύκολα.

Διοχετεύοντας ρεύμα  $\text{O}_2$  μετά την προσθήκη του  $\text{NaCN}$  το φάσμα δεν αλλάζει, ενώ το σύμπλοκο αυτό ανάγεται στην +2 οξειδωτική κατάσταση μετά την προσθήκη του αναγωγικού (κορυφή στα 423 nm) , το οποίο όμως δεν είναι τόσο σταθερό και αν το αφήσουμε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μία μέρα σταθεροποιείται +3 οξειδωτική κατάσταση έχοντας ως 5ο και 6ο υποκαταστάτη πυριδίνη και κυάνιο αντίστοιχα σε όλη την διάρκεια της αναγωγής.

Το φάσμα του LDH – αιμίνη μετά την προσθήκη του  $\text{NaCN}$  παρουσιάζει ομοιότητες με αυτό της ελεύθερης αιμίνης. Η βασική κορυφή βρίσκεται στα ίδια μήκη κύματος, ενώ φαίνεται να μοιάζει και η κορυφή στα 540 nm.

Διοχετεύοντας ρεύμα  $\text{O}_2$  μετά την προσθήκη του  $\text{NaCN}$  το φάσμα δεν αλλάζει, ενώ αν κάνουμε προσθήκη  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  μετά την προσθήκη του  $\text{NaCN}$  η βασική κορυφή μεταφέρεται στα 423 nm, ενώ οι κορυφές στα 527 , 561 nm είναι πιο έντονες και μοιάζουν με αυτές που εμφανίζει η ελεύθερη αιμίνη.

### 3.4 Συμπεράσματα

Επομένως σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι επιτεύχθηκε η σταθεροποίηση της αιμίνης σε ένα ανόργανο υπόστρωμα όπως είναι το LDH σε διαλύτη πυριδίνη/νερό με αναλογία 1/1. Η διατήρηση της αξονικής συμμετρίας των δύο υποκαταστατών μετά την εισαγωγή της αιμίνης στο LDH διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία EPR. Το υβρίδιο που συντέθηκε μελετήθηκε φασματοσκοπικά και τα αποτελέσματα που προέκυψαν για αυτό συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν για την ελεύθερη αιμίνη. Έτσι μετά από μελέτη και σύγκριση των φασμάτων προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα.

Μελετώντας τις αλλαγές που επιφέρει η μεταβολή του pH στο φάσμα της ελεύθερης και της δεσμευμένης διαπιστώνεται ότι:

Μεταβάλλοντας το pH στην περιοχή από 7 – 11.5 η B ταινία δεν μετατοπίζεται σχεδόν καθόλου στην ελεύθερη αιμίνη, ενώ στην περίπτωση της δεσμευμένης μετατοπίζεται από τα 410 nm στα 415 nm όταν το pH γίνει υψηλότερο του 10. Οι Q ταινίες στην περίπτωση της ελεύθερης αιμίνης αλλάζουν την αναλογία τους όσο αυξάνεται το pH, ενώ παράλληλα εμφανίζεται και ένας ώμος λίγο πάνω από τα 600 nm. Στην περίπτωση της δεσμευμένης αιμίνης οι ταινίες αυτές παραμένουν ανεπηρέαστες στην αλλαγή του pH.

Η προσθήκη του αναγωγικού επιφέρει την αναγωγή του Fe όπου και στις δύο περιπτώσεις παραμένει εξασυναρμοσμένος.

Η προσθήκη του NaCN οδηγεί στην συναρμογή του κυανίου στον σίδηρο αντικαθιστώντας έναν από τους δύο επιπλέον υποκαταστάτες που έχει η αιμίνη αρκετά εύκολα καθώς το κυάνιο είναι υποκαταστάτης υψηλού πεδίου και έχει την δυνατότητα να αντικαταστήσει το H<sub>2</sub>O ή την πυριδίνη.

Η διοχέτευση ρεύματος οξυγόνου δεν επιφέρει καμία αλλαγή στο φάσμα της ελεύθερης και την δεσμευμένης αιμίνης. Μετά την προσθήκη του αναγωγικού το ρεύμα οξυγόνου φαίνεται σύμφωνα με το φάσμα να επανοξειδώνει τον σίδηρο χωρίς να δεσμεύεται με αυτόν τόσο στην περίπτωση της ελεύθερης αιμίνης όσο και της υβριδοποιημένης, ενώ αν διοχετεύσουμε ρεύμα οξυγόνου μετά την προσθήκη του NaCN το φάσμα δεν παρουσιάζει καμία αλλαγή δηλαδή το οξυγόνο δεν δεσμεύεται στον σίδηρο

όταν αυτός βρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα +2, αλλά προκαλεί την οξειδωσή του.

Οι κορυφές των φασμάτων για την ελεύθερη και την δεσμευμένη αιμίνη φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΑΙΜΙΝΗ		LDH – ΑΙΜΙΝΗ		ΔΕΙΓΜΑΤΑ
	B ΤΑΙΝΙΑ	Q ΤΑΙΝΙΕΣ	B ΤΑΙΝΙΑ	Q ΤΑΙΝΙΕΣ	
αιμίνη	410	530,561	410	563,603	LDH-αιμίνη
αιμίνη + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	422,	465,526,558	422	465,527,560	LDH-αιμίνη + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
αιμίνη + NaCN	418	540	418	531,562	LDH-αιμίνη + NaCN
αιμίνη + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + O <sub>2</sub>	410	530,560	410	530,560	LDH-αιμίνη + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + O <sub>2</sub>
αιμίνη + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + NaCN	418	540	418	540	LDH-αιμίνη + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + NaCN
μετά από μία μέρα	418 > ABS	540 > ABS	418 > ABS	540 > ABS	μετά από μία μερα
αιμίνη + NaCN + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	422	527,557	423	527,561	LDH-αιμίνη + NaCN + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
μετά από μία μέρα	418	540	418	542	μετά από μία μερα

**Πίνακας 1.** Οι τιμές των B,Q ταινιών των φασμάτων της αιμίνης και του υβριδίου LDH – αιμίνη για τα διάφορα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε διαλύτη πυριδίνη/νερό με αναλογία 1/1 και σε pH=7,5.

#### 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- 1 D.Frackowiak, A.Planner, R.M.Ion, K.Wiktorowicz, Ed.S.Daehne, Kluwer *Acad.Publ., NATO ASI Series* **1998**.
- 2 R.M.Ion, *Progr.Catal.* **1997**, 1, p.55.
- 3 R.M.Ion, A.Planner, K.Wiktorowicz, D.Frackowiak, *Acta Biochimica Polonica* **1998**, 45, p.833.
- 4 R.M.Ion, *Rom. J. Biophys.* **1996**, 6, p.205.
- 5 Miyata S.*et al Clays and Clay Minerals*, **1975**, 23 , p. 369.
- 6 Reichle W., *Solid State Ionics*, **1986**, 22, p. 135.
- 7 Olanrewaju J., Newalkar B., L., Mancino C., Komarneni S., *Materials Letters*, **2000**, 45, p. 307.
- 8 Meng W., Feng L., Evans D., Duan X., *Materials Research Bulletin*, **2004**, 39, p.1185.
- 9 Cavani F., Trifirò F., Vaccari A., *Catalysis Today*, **1991**, 11, p. 173.
- 10 Ogawa M., Kaiho H., *Langmuir*, **2002**, 18, p. 4240.
- 11 Zhao Y., Li F., Zhang R., Evans D., Duan X., *Chemistry of Materials*, **2002**, 14, p. 4286.
- 12 Carlino S., *Solid State Ionics*, **1997**, 98, p. 73.
- 13 Hussein M.Z.B., Zainal Z., Yahaya A.H., Aziz A.B.A., *Materials Science and Engineering*, **2002**, B88, p. 98.
- 14 Whilton N.T., Vickers P.J., Mann S., *Journal of Materials Chemistry*, **1997**, 7, p. 1623.
- 15 Pinnavaia T.J., Chibwe M., Constantino V.R.L., Yun S.K., *Applied Clay Science*, **1995**, 10, p. 117.
- 16 Constantino V.R.L., Pinnavaia T.J., *Inorganic Chemistry*, **1995**, 34, p. 883.



- 
- 17** Van Laar F.M.P.R., De Vos D.E., Pierard F., Kirsch-De Mesmaeker A., Fierman L., Jacobs P.A., *Journal of Catalysis*, **2001**, 197, p. 139.
- 18** Drezdon M.A., *Inorganic Chemistry*, **1988**, 27, p. 4628.
- 19** Dimotakis E. D., Pinnavaia T.J., *Inorganic Chemistry*, **1990**, 29, p. 2393.
- 20** Hussein M., Yahaya A., Ping L., *Dyes and Pigments*, **2004**, 63, p.135.
- 21** Nakayama H., Wada N., Tshako M., *International J. of Pharmaceutics*, **2004**, 269, p.469.
- 22** Tyner K., Sciffman S., Giannelis E., *Journal of Controllerd Release*, **2004**, 95, p.501.
- 23** Choy J., Jung J., Oh J., Park M., Jeong J., Kang Y., Han O., *Biomaterials*, 2004, 25, p.3059.
- 24** Kwak S., Kriven W., Wallig M., Choy J., *Biomaterials*, **2004**, 25, p.5995.
- 25** Wypych F., Bubniak G.A., Halma M., Nakagaki S., *Journal of Colloid and Interface Science*, **2003**, 264, p.203.
- 26** Nakagaki S., Halma M., Bail A., Arizaga G.G., Wypych F., *Journal of Colloid and Interface Science*, **2005**, 281, p.417.
- 27** Chibwe M., Ukrainczyk L., Boyd S.A., Pinnavaia T.J., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **1996**, 113, p. 249.
- 28** Robins D.S., Dutta P.K., *Langmuir*, **1996**, 12, p. 402.
- 29** Tong Z., Shichi T., Takagi K., *Materials Letters*, **2003**, 57, p. 2258.
- 30** Choy, J., H., Kwak, S., Y., Park, J., S., Jeong, Y., J., Portier, J., *Journal of the American Chemical Society*, **1999**, 121, p. 1399.
- 31** Choy, J., H., Kwak, S., Y., Jeong, Y., J., *Angewandte Chemie International Edition*, **2000**, 39, p. 4041.

- 
- 32** Kwak, S., Y., Jeong, Y., J., Park, J., S., Choy, J., H., *Solid State Ionics*, **2002**, 151, p. 229.
- 33** Ambrogi, V., Fardella, G., Grandolini, G., Perioli, L., *International Journal of Pharmaceutics*, **2001**, 220, p. 23.
- 34** Hussein, M., Z., B., Zainal, Z., Yahaya, A., H., Foo, D., W., V., *Journal of Controlled Release*, **2002**, 82, p. 417.
- 35** Porphyrins and Metalloporphyrins. , *Elsevier Scientific K. Smith Company*, **1975**, p.2.
- 36** Corwin A.H., *Organic Chemistry* ,**1943**, Vol.II, 1272, Willey, New York.
- 37** Hoppe-Seyler F., *Phys. Chem.*, **1987-1988**, 1, p.121.
- 38** Bonnett R., Dolphin D., The Porphyrins., *Academic Press*, New York, **1978**, Vol I.
- 39** IUPAC, Nomenclature of Organic Chemistry, Pergamon **1979**.
- 40** Χατζηιωάννου Θ.Α., Κούππαρης Μ.Α., *Ενόργανη Ανάλυση*, **1990**.
- 41** Platt J.R., "Radiation Biology" 1956, A. Hollaender Ed., Mc Graw-Hill Book Co., Vol III, Chapt. 2.
- 42** Simpson W.T., *Journal of Physical Chemistry*, **1949**, 17, p.1218.
- 43** Gouterman M., *Journal of Molecular Spectroscopy* **1961**, 6, p.138.
- 44** Gouterman M., Wagniere G.H., Snyder L.C., *Journal of Molecular Spectroscopy*, **1963**, 11, p.108.
- 45** Suslick K.S., Watson R.A., *New J. Chem.* **1992**, 16, p.633.
- 46** Itoh T., Yamada T., Kodera Y., Matsushima A., Hiroto M., Sakurai K., Nishimura H., Inada Y., *Bioconjugate Chemistry*, **2001**, 12, p.3.
- 47** Lonstro P., Choi S., Ku C., Chen S., *Journal of Physical Chemistry*, **1999**, 103, p.5347.

- 
- 48** Ohmori K., Kudo N., Katayama K., Kawashima Y., *Toxicology*, **2003**, 184, p.135.
- 49** Kudo N., Suzuki E., Katakura M., Ohmori K., Noshiro R., Kawashima Y., *Chemico-Biological Interactions*, **2001**, 134, p.203.
- 50** Fuchs J., Thiele J., *Free Radical Biology and Medicine*, **1998**, 5, p.835.
- 51** Neckers D.C., Valdes-Aguilera O.M., *Advances in Photochemistry*, **1993**, 8, p.315.
- 52** Wilkinson F., Helman W.P., Ross A.B., *Journal of Physical Chemistry*, **1993**, 22, p.113.
- 53** Mishra N.P., Ghanotakis D.F., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1994**, 1187, p.296.
- 54** Rinalducci S., Pedersen J., Zolla L., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1608, p.63.
- 55** Mishra R.K., Mishra N.P., Kambourakis S., Orfanopoulos M., Ghanotakis D.F., *Plant Science*, **1996**, 115, p.151.
- 56** Bohm F., Edge R., Foley S., Lange L., Truscott G., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2001**, 65, p.177.
- 57** Sylvain I., Zerrouki R., Granet R., Huang Y.M., Lagorce J.F., Guilloton M., Blais J.C., Krausz P., *Biorganic and Medicinal chemistry*, **2002**, 10, p.57.
- 58** Faust D., Funken K.H., Horneck G., Milow B., Ortner J., Sattlegger M., Schaffer M., Schmitz C., *Pergamon Solar Energy*, **1999**, 65, p.71.
- 59** Schwab A.D., Smith D.E., Watts B.B., Johnston D.E., Hone J., Johnson A.T., De Paula J.C., Smith W.F., *Nanoletters*, **2004**, 4, p.1261.
- 60** Kennedy J.C., Pottier R.H., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1992**, 98, p.275.

- 
- 61** Yslas I., Alvarez M.G., Marty C., Mori G., Durantini E.N, Rivarola v., *Toxicology*, **2000**, 149, p.69.
- 62** Fickweiler S., Abels C., Karrer S., Baumler W., Landthaler M., Hofstadter F., Szeimies R.M., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1999**, 48, p.27.
- 63** Szeimies R.M., Karrer S., Abels C., Steinbach P., Fickweiler S., Messmann H., Baumler W., Landthaler M., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1996**, 34, p.67.
- 64** Toledano H., Edrei R., Kimel S., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1998**, 48, p.20.
- 65** Grandadam M., Ingrad D., Huraux J.M., Aveline B., Delgado O., Vever-Bizet C., Brault D., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1995**, 31, p.171.
- 66** David O., Bourre L., Krika Y., Durand M., Patrice T., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005**, 2, p.25.
- 67** Schuitmaker J.J., Jannink J.E., Dubbelman T.M.A.R, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1995**, 28, p.143.
- 68** Pagoria D., Lee A., Geurtsen W., *Biomaterials*, **2005**, 26, p.4091.
- 69** Rancan D., Helmreich M., Molich A., Jux N., Hirsch A., Roder B., Witt C., Bohm F., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2005**, 80, p.91.
- 70** Lange's Handbook of Chemistry, 15<sup>th</sup> Edition
- 71** Winslow R., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2000**, 40, p.131.
- 72** Habler O., Messmer K., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2000**, 40, p.171.

- 
- 73** Χατζηλιάδης Ν. Βιοανόργανη Χημεία 2, *Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ στην Βιοανόργανη Χημεία*, **1999**.
- 74** Stryer L. "ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ" ,*Πανεπιστημικές εκδόσεις Κρήτης*, **1997** , Vol 1 , 3th Edition.
- 75** Μανουσάκης Γ., Κεσίσσογλου Δ. , Βιοανόργανη Χημεία , *Εκδόσεις Κυρικήδη*, **1999**.
- 76** Hueey J.E., Ανόργανη Χημεία, *Εκδόσεις Ιων* **1993**.
- 77** Bartocci C., Scandola F., Ferri A., Carrasiti V., *Inorganica Chimica Acta*, **1979**, 37, p.473.
- 78** Barloy L., Lallier J.P., Battioni P., Mansuy D., Pitfard Y., Tournoux M., Valim J.B., Jones W., *New J.Chemistry*, **1992**, 16, p.71.
- 79** Machado A.M., Wypych F., Drechsel S.M., Nakagaki S., *Journal of Colloid and Interface Science*, **2002**, 254, p.158.
- 80** Leclerc E., Leclerc L., Poyart C., Marden M., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1993**, 306, p.158.

# **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

